



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Lara Stoeberl

Avaliação da atividade e expressão de enzimas antioxidantes e de parâmetros de estresse oxidativo em células de linhagem de astroglioma expostas a elevadas concentrações de cobre

Florianópolis

2023

Lara Stoeberl

Avaliação da atividade e expressão de enzimas antioxidantes e de parâmetros de estresse oxidativo em células de linhagem de astroglioma expostas a elevadas concentrações de cobre

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof.^a Viviane Glaser, Dra.

Florianópolis

2023

Stoeberl, Lara

Avaliação da atividade e expressão de enzimas antioxidantes e de parâmetros de estresse oxidativo em células de linhagem de astroglioma expostas a elevadas concentrações de cobre / Lara Stoeberl ; orientadora, Viviane Glaser, 2023.

73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Neurotoxicidade. I. Glaser, Viviane. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Lara Stoeberl

Avaliação da atividade e expressão de enzimas antioxidantes e de parâmetros de estresse oxidativo em células de linhagem de astroglioma expostas a elevadas concentrações de cobre

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 14 de agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Andrea Trentin, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.^a Aline Pertile Remor, Dra.

Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC)

Prof.^a Greicy Michelle Marafiga Conterato, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Geisson Nardi, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Viviane Glaser, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2023

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a "bom porto" sem o precioso apoio de várias pessoas. Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer a minha orientadora, Professora Doutora Viviane Glaser, por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho e em todos aqueles que realizei durante o mestrado. Muito obrigada por me ter corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar.

Meu agradecimento aos professores, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do mestrado e aos membros da banca da defesa da dissertação e os membros suplentes, que aceitaram e dedicaram seu tempo para colaborar nesse estudo. A todas as contribuições, debates e enriquecimento na minha dissertação. Tenho a honra dessas contribuições na minha formação.

Por último, desejo igualmente agradecer a todos da minha família que sempre estiveram comigo, por toda paciência, amor e dedicação. Não poderia deixar de mencionar o tamanho do amor e motivação que o nascimento da Agnes Stoeberl Pscheidt trouxe, que aconteceu no decorrer deste mestrado, trazendo mais inspiração para a finalização desta etapa. Obrigado a Anderson Sill Fukner, Larissa Stoeberl Pscheidt e Nadyan Surriel Pscheidt por sempre acreditarem em mim, por nunca desistirem e não me deixarem desistir e com paciência me acolherem nas inúmeras crises de ansiedade cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Com amor,
Lara Stoeberl

RESUMO

O cobre (Cu) é um oligoelemento essencial que desempenha um papel importante nas funções cerebrais, atuando, por exemplo, no sistema de defesa antioxidante e no metabolismo do ferro. No entanto, altos níveis celulares desse metal resultam em estresse oxidativo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar as alterações provocadas pelo excesso de cobre em parâmetros de estresse oxidativo, e na atividade e expressão de enzimas do sistema antioxidante, utilizando como modelo uma linhagem de astroglioma mais resistente às elevações de cobre (U-87 MG) e uma linhagem mais suscetível (C6). As células foram cultivadas na ausência ou presença de CuSO_4 (0 - 600 μM) por 24h ou 48h. A atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx) foram avaliadas espectrofotometricamente, assim como os níveis de tióis não proteicos (NPSH) e proteicos (PSH). A produção de superóxido foi determinada usando a sonda fluorescente dihidroetídio (DHE). Já a expressão dos genes que codificam para as enzimas antioxidantes GR, GPx1 e SOD1 foi determinada por RT-PCR em tempo real. Na linhagem C6 e U-87 MG foi possível observar uma diminuição da atividade das enzimas GPx, GR e CAT após 24h e 48h de exposição ao CuSO_4 , enquanto que para a SOD verificou-se um aumento em sua atividade após 24h de exposição ao toxicante, sendo que na linhagem U-87 MG isso foi verificado já nas concentrações iniciais de CuSO_4 ; porém em 48h observou-se uma redução em sua atividade em ambas as linhagens. Em relação ao NPSH e PSH, verificou-se uma diminuição após 24h de exposição ao metal, sendo que nas células U-87 MG os níveis de PSH diminuíram somente em concentrações mais elevadas de CuSO_4 , e nas células C6 essa redução já é observada nas menores concentrações; assim como foi observado um aumento na geração de superóxido. Quanto à expressão dos genes que codificam para enzimas antioxidantes, observou-se uma redução no conteúdo de mRNA para GR após 24h de exposição ao metal, em ambas as linhagens. Por outro lado, verificou-se que houve um aumento no conteúdo de mRNA de GPx1 na linhagem C6 após o mesmo período de exposição ao CuSO_4 . Em relação à expressão do SOD1, observou-se que houve um aumento no conteúdo de mRNA nas células U-87 MG após exposição ao toxicante; por outro lado, na linhagem C6 verificou-se uma diminuição na expressão dessa enzima. Em conjunto, estes resultados indicam que altos níveis de Cu causam uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes e nos níveis de grupos tióis principalmente na linhagem mais suscetível ao cobre, podendo estar associado ao estresse

oxidativo ou a uma interação direta entre Cu e as enzimas em seu sítio ativo. Por fim, conclui-se que existem diferenças espécie-específicas para a toxicidade do Cu, provavelmente devido a diferentes mecanismos de resposta ao estresse oxidativo, sendo que a linhagem derivada de humanos parece ser menos sensível ao excesso do metal em comparação com a linhagem proveniente de ratos.

Palavras-chave: metais, estresse oxidativo, estudo *in vitro*, neurotoxicidade.

ABSTRACT

Copper (Cu) is an essential trace element that plays an important role in brain functions, acting, for example, in the antioxidant defense system and in iron metabolism. However, high cellular levels of this metal result in oxidative stress. Therefore, the aim of this study was to analyze the changes caused by excess copper in oxidative stress parameters, and in the activity and expression of enzymes of the antioxidant system, using as a model a astroglioma cell line that is more resistant to high levels of copper (U-87 MG) and a more susceptible cell line (C6). The cells were cultured in the absence or presence of CuSO₄ (0 - 600 μM) for 24h or 48h. The activity of the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx) were evaluated spectrophotometrically, as were the levels of non-protein thiols (NPSH) and protein thiols (PSH). Superoxide production was determined using the fluorescent probe dihydroethidium (DHE). The expression of the genes coding for the antioxidant enzymes GR, GPx1 and SOD1 was determined by real-time RT-PCR. In both C6 and U-87 MG cell lines, it was possible to observe a decrease in the activity of the GPx, GR and CAT enzymes after 24h and 48h of exposure to CuSO₄, while for SOD, there was an increase in its activity after 24h of exposure to the toxicant, and in the U-87 MG cells this was already seen in the initial concentrations of CuSO₄; however, after 48h, a reduction in its activity was observed in both cell lines. In relation to NPSH and PSH, there was a decrease after 24 hours of exposure to the metal, and in the U-87 MG cells PSH levels only decreased at higher concentrations of CuSO₄, while in the C6 cells this reduction was already observed at lower concentrations; as well as an increase in superoxide generation. As for the expression of genes coding for antioxidant enzymes, there was a reduction in the mRNA content for GR after 24 hours of exposure to the metal in both cell lines. On the other hand, there was an increase in the mRNA content of GPx1 in the C6 cell line after the same period of exposure to CuSO₄. Regarding the expression of SOD1, it was observed that there was an increase in mRNA content in U-87 MG cells after exposure to the toxicant; on the other hand, in the C6 cell line there was a decrease in the expression of this enzyme. Taken together, these results indicate that high levels of Cu cause a decrease in the activity of antioxidant enzymes and in the levels of thiol groups, especially in the cell line most susceptible to copper, which may be associated with oxidative stress or with a direct interaction between Cu and the enzymes in its active site. Finally, we conclude that there are species-specific differences in Cu toxicity,

probably due to different oxidative stress response mechanisms, and that the human-derived cell line appears to be less sensitive to excess metal compared to the rat-derived cell line.

Keywords: metals, oxidative stress, in vitro study, neurotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Absorção e metabolismo do cobre no organismo humano.	20
Figura 2 — Função do cobre nas sinapses e modulação dos receptores de neurotransmissores	26
Figura 3 — Ação das enzimas antioxidantes.....	33
Figura 4 — Viabilidade de células das linhagens C6 e U-87 MG pelas técnicas do MTT e do vermelho neutro (NR) após 24h e 48h de exposição ao CuSO ₄	44
Figura 5 — Atividade da catalase em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO ₄	46
Figura 6 — Atividade da glutatona peroxidase em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO ₄	47
Figura 7 — Atividade da Glutaciona redutase em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO ₄	48
Figura 8 — Atividade da superóxido dismutase em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO ₄	49
Figura 9 — Análise de parâmetros de estresse oxidativo em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO ₄	51
Figura 10 — Expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO ₄	52
Figura 11 — Principais alterações observadas em parâmetros de estresse oxidativo após a exposição ao excesso de cobre e a sua relação com diferentes espécies.	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 — Sequência de primers para <i>Rattus norvegicus</i> utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real	41
Quadro 2 — Sequência de primers para <i>Homo sapiens sapiens</i> utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -syn	Alfa-sinucleína
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
APP	Proteína precursora de amiloide
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada
Atox1	Chaperona antioxidante 1 de cobre
ATP7A	ATPase alfa transportadora de cobre
ATP7B	ATPase beta transportadora de cobre
A β	Beta amiloide
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT	Catalase
CcO	Citocromo c oxidase
CCS	Chaperona de cobre para SOD1
cDNA	DNA complementar
CoQ10	Coenzima Q10
CoQ10H ₂	Ubiquinol
Cox	Chaperona de cobre citocromo c oxidase
Cp	Ceruloplasmina
Cp-Cu	Cobre ligado à Cp
Cr	Cromo
Ctrl	Transportador de cobre 1
Cu	Cobre
Cu ⁺	Cobre monovalente
Cu ²⁺	Cobre divalente
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DA	Doença de Alzheimer
DCYTB	Citocromo b duodenal
DH	Doença de Huntington
DHE	Di-hidroetídio
DMEM	Eagle's com modificação de Dubelcco
DMSO	Dimetilsulfóxido

DMT1	Transportador de metal divalente 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
DTNB	(5,5'-Ditio-bis(Ácido 2-Nitrobenzoico))
DW	Doença de Wilson
DβH	Dopamina-β-hidroxilase
EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
EPM	Erro padrão da média
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
GSSH	Glutationa oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HTT	Proteína mutante Huntingtina
LDH	Lactato desidrogenase
LOO•	Radical peroxil
LOOH	Hidroperóxido de lipídio
LOX	Lisil oxidase
LRP1	Proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína
MT	Metalotioneínas
MTF	Fator de transcrição responsivo a metais 1
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NGF	Fator de crescimento do nervo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NPSH	Tióis não proteicos

NR	Vermelho neutro
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PA	Poliaminas
PAM	Peptidil-glicina α-amidante monoxigenase
PBS	Tampão fosfato salina
PHM	Peptidilglicina-α-hidroxilante
PrPC	Proteína priônica celular
Prxs	Peroxirredoxinas
PSH	Tióis proteicos
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SDH	Succinato desidrogenase
Se	Selênio
SFB	Soro fetal bovino
SH	Grupo sulfidril
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SOD1	Cu/Zn superóxido dismutase
SOD2	Mn superóxido dismutase
SOD3	Superóxido dismutase extracelular
STEAP2	Do inglês <i>six-transmembrane epithelial antigen of prostate 2</i>
TBOOH	Hidroperóxido de t-butil
TCA	Ácido tricloroacético
TFK	Tampão fosfato de potássio
-Toc [•]	Tocoferoxil
Trx	Tiorredoxinas
Trx-S2	Tiorredoxina oxidada
TrxR	Tiorredoxina redutase

Zn

Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	METABOLISMO DO COBRE.....	18
1.2	CUPROENZIMAS	21
1.3	IMPORTANCIA DO COBRE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)....	23
1.4	EFEITOS TÓXICOS DO EXCESSO DE COBRE INTRACELULAR	26
1.5	DOENÇAS RELACIONADAS AO EXCESSO DE COBRE.....	27
1.5.1	Doença de Wilson (DW)	27
1.5.2	Doenças neurodegenerativas	28
1.6	SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	30
1.6.1	Antioxidantes não enzimáticos	30
1.6.2	Antioxidantes enzimáticos	32
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	CULTIVO CELULAR E EXPOSIÇÃO AO $CUSO_4$	36
3.2	VIABILIDADE CELULAR.....	36
3.2.1	Ensaio do MTT	36
3.2.2	Ensaio do vermelho neutro	37
3.3	NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS (NPSH) E TIÓIS PROTEICOS (PSH). 37	
3.4	ENSAIO DHE (DI-HIDROETÍDIO) PARA MENSURAÇÃO QUALITATIVA DE SUPERÓXIDO	38
3.5	ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	38
3.6	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	39
3.7	EXPRESSÃO POR RT-PCR EM TEMPO REAL DE GPX1, GR E SOD	39
3.7.1	Extração do RNA	40
3.7.2	Síntese do cDNA	40
3.7.3	RT-PCR em tempo real	40
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4	RESULTADOS	43
4.1	VIABILIDADE CELULAR.....	43
4.2	ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	45
4.2.1	Catalase	45
4.2.2	Glutathiona peroxidase	46
4.2.3	Glutathiona redutase	47
4.2.4	Superóxido dismutase	48
4.3	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO (PSH, NPSH E DHE).....	49
4.4	CONTEÚDO RELATIVO DE MRNA DE ENZIMAS RELACIONADAS AO SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	51

5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O micronutriente essencial cobre (Cu) atua como um cofator catalítico chave em uma ampla gama de processos biológicos, incluindo respiração mitocondrial, defesa antioxidante e síntese de compostos bioquímicos. É importante ressaltar que a concentração de Cu intracelular é mantida em uma faixa baixa, e um aumento moderado pode causar citotoxicidade e até morte celular; assim, a captação, distribuição e eliminação de Cu são rigorosamente reguladas (WALSHE, 2007). O primeiro registro da participação do cobre como nutriente essencial data de 1928, com a observação do metal na eritropoiese de ratos, e a sua deficiência nutricional vem sendo descrita desde 1964 (UAUY, 1998; BARAN, 2004). O cobre é obtido através da nutrição, e os alimentos com as maiores concentrações do elemento são os órgãos de animais (por exemplo, fígado), mariscos, frutos secos e cereais. Estima-se que sua ingestão diária necessária seja em média entre 1 e 3 mg (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003).

Intracelularmente, o cobre atua principalmente como cofator ou componente estrutural de várias enzimas, incluindo Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1), citocromo c oxidase (CcO) e ceruloplasmina (Cp) (TROCELLO *et al.*, 2010; KAPLAN; MARYON, 2016; NAVARRO; SCHNEUWLY, 2017; MAUNG, 2021). A deficiência de cobre pode levar à diminuição dos níveis dessas enzimas e afetar negativamente o metabolismo celular (LETÉLIER *et al.*, 2009; ZISCHKA; EINER, 2018).

Ainda, uma das funções mais significativas do cobre é a sua participação na produção de neurotransmissores no cérebro, o que o torna crucial para o sistema nervoso central (SNC). O cobre é necessário para a produção da enzima dopamina- β -hidroxilase (D β H), que é responsável pela conversão da dopamina em noradrenalina (HSU *et al.*, 2019; NAVARRO; SCHNEUWLY, 2017; ZORODDU *et al.*, 2019). Além disso, o cobre também é um cofator essencial para a produção de mielina, que reveste os axônios dos neurônios. A mielina é importante para a transmissão rápida de sinais nervosos e para a proteção dos neurônios (GAIER; EIPPER; MAINS, 2013; GROMADZKA *et al.*, 2020). A deficiência de cobre pode levar a danos na mielina e conseqüentemente a doenças neurológicas (BISAGLIA; BUBACCO, 2020; WANG *et al.*, 2014).

O cobre também está envolvido na proteção contra o estresse oxidativo, o qual decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos antioxidantes e oxidantes, favorecendo a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) em detrimento da velocidade de remoção destes. Esse processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de

suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; URIU-ADAMS; KEEN, 2005). Neste sentido, o SNC é especialmente suscetível ao estresse oxidativo, e a deficiência de cobre pode levar a danos no cérebro, assim como em outros órgãos, devido à diminuição da atividade da SOD1.

Por outro lado, um aumento nas concentrações deste metal pode ser citotóxico, principalmente relacionado à inibição de função de proteínas e à produção de ERO pela reação de Fenton (URIU-ADAMS; KEEN, 2005). Esse aumento pode levar ao estresse oxidativo, danos ao DNA e até mesmo à morte celular (SCHEIBER; DRINGEN, 2013). Por isso, é importante que as células mantenham um equilíbrio adequado de cobre intracelular para garantir seu bom funcionamento e prevenir danos celulares.

1.1 METABOLISMO DO COBRE

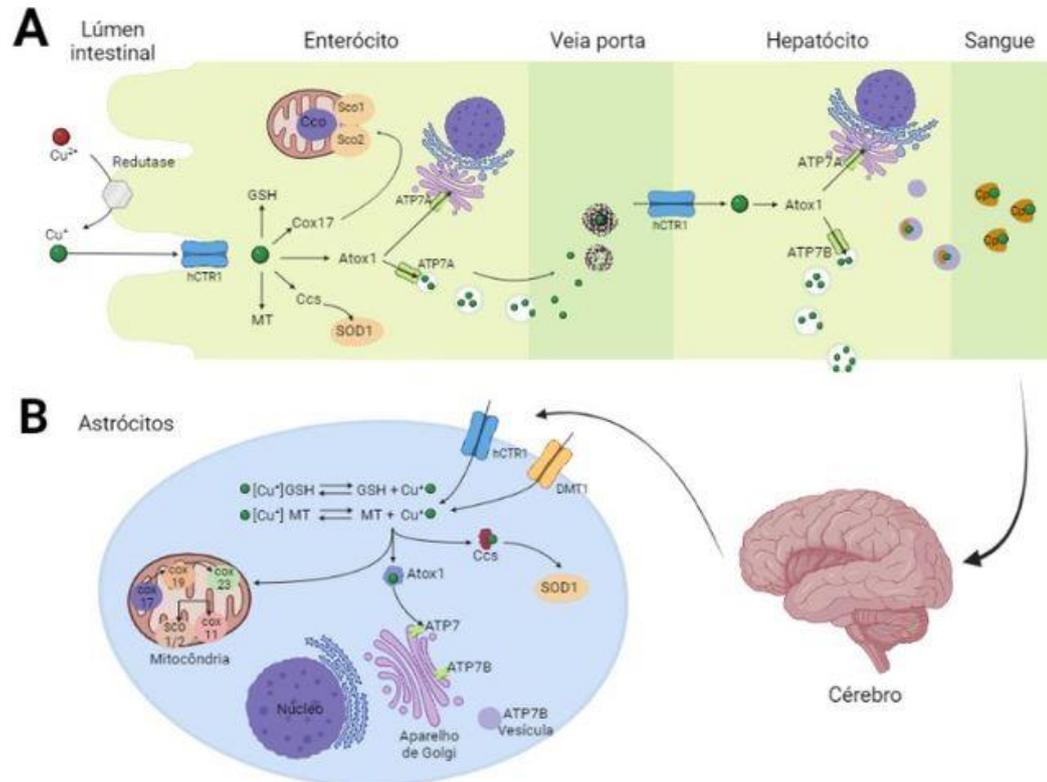
O cobre é um mineral essencial que é adquirido através da dieta. Após a ingestão, o cobre é absorvido no intestino delgado, na porção do duodeno (MANSON, 1979). A captação de cobre pelas células epiteliais intestinais é mediada principalmente pelo transportador de cobre 1 (Ctr1), localizado no ápice dos enterócitos. O transportador de metal divalente 1 (DMT1) também atua no transporte do cobre para o interior da célula, e tanto o Ctr1 quanto o DMT1 são os transportadores mais utilizados para a internalização do metal pelas células (ILYECHOVA *et al.*, 2019). A captação do cobre é facilitada pela atividade de metaloredutases, como a citocromo b duodenal (DCYTB) (DANCIS *et al.*, 1992; GEORGATSOU *et al.*, 1997), que reduzem Cu^{2+} (divalente) a Cu^+ (monovalente), visto que o Ctr1 transporta o estado iônico de Cu; já o transportador DMT1 transporta cobre em ambos os estados de oxidação ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$) (ILYECHOVA *et al.*, 2019). Após absorção pelo trato gastrointestinal, o cobre é secretado no sangue (circulação portal) pelos enterócitos através da ATPase alfa transportadora de cobre (ATP7A), e neste local é ligado a proteínas como albumina, transferrina, ao aminoácido histidina e macroglobulinas. Após atingir o fígado, os hepatócitos mediam a captação de Cu também via Ctr1/DMT1 (Figura 1) (WEISS, 1985; LIU *et al.*, 2007; MORIYA *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2016).

Dentro do citoplasma, o Cu é então entregue a proteínas específicas por chaperonas de Cu, ou sequestrado por metalotioneínas (MT) ou glutathiona (GSH) para armazenamento, evitando que haja danos oxidativos durante o processo de internalização do cobre (PUFAHL *et*

al., 1997; HEATON *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2016; BOYD *et al.*, 2020). As chaperonas de Cu incluem Cox17 (que fornece Cu para CcO), CCS (chaperona de cobre para SOD1) que fornece Cu para superóxido dismutase 1, e Atox1 (chaperona antioxidante 1 de cobre) que fornece Cu para ATP7B (ATPase beta transportadora de cobre). A ATP7B bombeia íons Cu do fígado de volta para o sangue, onde esses se ligam principalmente à Cp, para ser transportado a outros tecidos (CATER *et al.*, 2006; GOTO *et al.*, 2020; BISAGLIA; BUBACCO, 2020; SQUITTI *et al.*, 2021). Ao chegar nos tecidos alvo, o Cu é distribuído para as enzimas dependentes de cobre (como comentado acima), participando de várias reações em processos fisiológicos, incluindo produção de energia mitocondrial, metabolismo de tirosina e neurotransmissores, homeostase redox e remodelação da matriz extracelular (CSISZAR, 2001; LUTSENKO; BHATTACHARJEE; HUBBARD, 2010; LUTSENKO, 2016). O excesso de cobre é eliminado do organismo através da bile, que é secretada no intestino delgado e excretada nas fezes. A eliminação de cobre é controlada pela ATP7B presente nas células do fígado (Figura 1) (COBINE; MOORE; LEARY, 2021).

No SNC, os astrócitos - que fazem parte da barreira hematoencefálica - são as primeiras células deste tecido a terem contato com o cobre proveniente da circulação sanguínea (DRINGEN *et al.*, 2007; SCHEIBER; SCHMIDT; DRINGEN, 2012). Por esse motivo, essas células são eficientes na captação do cobre e protegem os neurônios dos efeitos tóxicos deste elemento, já que os neurônios são mais suscetíveis a uma elevação nas concentrações do metal (ASHRAF *et al.*, 2019). Como ocorre para a internalização do cobre pelos enterócitos, para que o metal seja captado pelos transportadores Ctr1, independentemente do tipo de célula, este deve ser reduzido por metaloredutases, como STEAP2 (do inglês *six-transmembrane epithelial antigen of prostate 2*) e citocromo b férrica/cúprica redutase. Após a redução desse elemento ele é então transportado até o citoplasma (DOGUER; HA; COLLINS, 2018). A eliminação do cobre pelos astrócitos é realizada pelas ATPases ATP7A e ATP7B, sendo o transportador ATP7A o mais expresso nessas células (Figura 1) (SCHEIBER; SCHMIDT; DRINGEN, 2012). Essas células são responsáveis por disponibilizar o cobre para as demais células do SNC. Em condições de sobrecarga de cobre, o excesso do metal é eficientemente absorvido pelos astrócitos e armazenado em MT ou como complexo GSH para prevenir a neurotoxicidade induzida pelo cobre (SCHEIBER; DRINGEN, 2013).

Figura 1 — Absorção e metabolismo do cobre no organismo humano



A) Absorção do cobre pelos enterócitos. O cobre extracelular é reduzido pelas redutases de Cu^{2+} a Cu^+ , que é transportado para dentro da célula através do transportador de Cu Ctr1. Em sequência, o metal é entregue a metalochaperonas de Cu citosólicas, que fazem a transferência para enzimas dependentes de cobre. A proteína ATP7A é responsável pela exportação desse metal dos enterócitos para a liberação na circulação portal. Para entrada nos hepatócitos, o cobre é internalizado pelo transportadores de cobre, transferindo o metal às chaperonas de cobre, para este ser incorporado nas cuproproteínas. A eliminação do cobre no organismo se dá através da bile, pelo transportador ATP7B. A proteína transportadora ATP7B também incorpora o cobre na ceruloplasmina (Cp), sendo esse complexo liberado na corrente sanguínea (Cp-Cu) para que o cobre seja distribuído aos demais tecidos, incluindo o SNC. B) Metabolismo intracelular do cobre nos astrócitos. Os astrócitos realizam a captação do cobre e o disponibilizam para outras células neurais. O cobre, depois de reduzido pelas redutases, é absorvido pelos astrócitos pelo transportador Ctr1 e por mecanismos independentes de Ctr1, como o transportador DMT1. O cobre acumulado é armazenado nos astrócitos como complexo com GSH ou em metalotioneínas (MT). Além disso, o cobre é transportado para seu alvo celular específico, pelas metalochaperonas de cobre CCS para SOD1, por Cox17 para Sco1/2 e Cox11 para posterior incorporação na CcO e pela Atox1 onde disponibiliza o cobre às ATPases ATP7A e ATP7B. A ATP7A transporta cobre para o aparelho de Golgi para posterior incorporação em enzimas dependentes de cobre. Quando os níveis de cobre celular aumentam acima de um certo limite, o ATP7A transloca-se reversivelmente por meio de vesículas para a membrana plasmática para exportar cobre. Fonte: adaptado de DRINGEN; SCHEIBER; MERCER, 2013; VERWILST; SUNWOO; KIM, 2015; BISAGLIA e BUBACCO, 2020. Figura produzida com o auxílio do software Biorender (O autor, 2023).

1.2 CUPROENZIMAS

O cobre tem um papel importante no equilíbrio metabólico, visto que esse elemento é incorporado e tem especificidade em muitas proteínas estruturais e com funções enzimáticas. As cuproenzimas são dependentes do cobre para seu funcionamento, sendo elas, citocromo c oxidase (CcO), dopamina- β -monooxigenase (D β H), peptidil-glicina α -amidante monooxigenase (PAM), intra e extracelular Cu/Zn superóxido dismutases (SOD1 e 3), tirosinase, lisil oxidase (LOX) e ceruloplasmina (Cp) (LINDER; HAZEGH-AZAM, 1996; LINDER, 2010).

A CcO é um complexo enzimático da membrana mitocondrial interna, sendo o último complexo presente na cadeia de transporte de elétrons, reduzindo o oxigênio à água. O complexo IV ainda tem o papel de bombear prótons através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembranas, para que haja o potencial de membrana mitocondrial, necessário para a síntese de ATP (KHALFAOUI-HASSANI *et al.*, 2018). Na CcO estão inseridos três átomos de cobre: dois átomos na subunidade I, envolvidos na transferência de elétrons do citocromo para o centro heme a_3 -CuB, e um átomo na subunidade II, que tem como função reduzir o oxigênio (SHOUBRIDGE, 2001; GAO *et al.*, 2012, BRISCHIGLIARO; ZEVIANI, 2020).

A D β H participa de uma via com várias enzimas, que produzem catecolaminas que vão atuar como hormônios e neurotransmissores. A D β H realiza a conversão da dopamina levando a formação de noradrenalina/norepinefrina (CREVELINE *et al.*, 1962; ROBERTSON; HOLLISTER; BIAGGIONI, 1991). Essa cuproenzima possui dois sítios catalíticos que contêm cobre, desenvolvendo diferentes funções na sua atividade enzimática. A D β H é importante bioquimicamente e farmacologicamente, pois as monoaminas são importantes mensageiros intracelulares, como neurotransmissores e hormônios, e envolvem a regulação de funções neuronais, comportamento e emoção em mamíferos (RAHMAN *et al.*, 2009; RAHMAN *et al.*, 2012).

PAM é normalmente uma enzima ligada à membrana ou à vesículas, e essa enzima possui um domínio que se liga ao cobre, referido como monooxigenase peptidilglicina- α -hidroxilante (PHM), o qual catalisa a hidroxilação da glicina C-terminal em um grande número de neuropeptídeos inativos (EIPPER *et al.*, 1992; PROCHASKA *et al.*, 1997). A PAM faz modificações pós-traducionais de muitos neuropeptídeos, incluindo a oxitocina, vasopressina, neuropeptídeo Y, colecistocinina, gastrina, entre outros (PROHASKA; BRODERIUS, 2006; BOUSQUET-MOORE; MAINS; EIPPER, 2010).

As Cu/Zn superóxido dismutases (SOD) são enzimas antioxidantes responsáveis pela dismutação de dois ânions superóxido (produto gerado da respiração celular), para formar peróxido de hidrogênio e oxigênio. A SOD1 tem monômeros ligando-se a um íon de cobre e zinco ligado por pontes dissulfeto. Essa enzima pode ser encontrada em abundância no citoplasma, mas pode ser encontrada também, em quantidade menores, no espaço intermembranas mitocondrial (GREENLEAF *et al.*, 2004; SHIN *et al.*, 2009; FETHEROLF *et al.*, 2017). A SOD3 contém também íons Cu e Zn, e catalisa a mesma reação que a enzima SOD1, sendo encontrada no meio extracelular. A SOD3 é estabilizada por uma ligação dissulfeto intra-subunidade adicional não encontrada na SOD1 (MARKLUND, 1984; MARKLUND, 1985). Desta forma, o cobre é essencial para que essas isoformas de SOD consigam realizar suas atividades antioxidantes e redox (SHIN *et al.*, 2009; FETHEROLF *et al.*, 2017).

A LOX é uma amino oxidase dependente de cobre que é capaz de oxidar substratos de amina primária a aldeídos reativos (LARGERON, 2011). Os aldeídos produzidos passam por reações químicas espontâneas com outros aldeídos derivados de LOX, ou com resíduos de lisina não modificados, resultando na reticulação de colágeno e elastina, essencial para a estabilização das fibrilas de colágeno e para a integridade e elasticidade da elastina madura (SMITH-MUNGO; KAGAN, 1998; STITES; MITCHELL; RUCKER, 2000). A LOX pode apresentar quatro diferentes isoformas, sendo que todas contém um domínio de ligação ao cobre. Esse elemento se torna essencial para a reoxidação do cofator lisil tirosilquinona, que realiza a desaminação oxidativa dos resíduos de lisina e hidroxilisina que existem nos precursores do colágeno e da elastina (CSISZAR, 2001; HALPER; KJAER, 2014).

A tirosinase é uma oxidase que também é dependente de cobre, sua função é catalisar principalmente as etapas iniciais da biossíntese de melanina (RILEY, 1997; SLOMINSKI, 2004). As tirosinases são enzimas que exibem atividade monooxigenase e oxidase e ambas as atividades ocorrem devido a ligação do dioxigênio aos dois átomos de cobre, localizados no sítio ativo (CLAUS; DECKER, 2006; WOGELIUS *et al.*, 2011).

A Cp é a principal proteína do plasma sanguíneo contendo Cu. Essa proteína é uma ferroxidase que converte Fe^{2+} em Fe^{3+} na membrana plasmática das células, sendo assim, implicada na mediação do efluxo de ferro de certas células. Também tem a função de inativação oxidativa do óxido nítrico e algumas aminas biogênicas (como catecolaminas e serotonina) (SHIVA, *et al.*, 2006; VASHCHENKO; MACGILLIVRAY, 2013), bem como atua como uma

proteína de transporte de cobre na circulação (BIELLI; CALABRESE, 2002; RAMOS *et al.*, 2016).

1.3 IMPORTÂNCIA DO COBRE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Além de ser essencial para o funcionamento das enzimas citadas acima, o cobre também está envolvido em importantes reações que ocorrem no SNC. A contribuição do cobre para as células neurais não se limita aos cofatores de enzimas redox, mas também inclui a transmissão sináptica, o direcionamento axonal e a regulação das cascatas de sinalização induzidas por fatores neurotróficos. O cobre não apenas modula diretamente os receptores de neurotransmissores nas sinapses, mas também afeta o tráfego das vesículas sinápticas e modula as interações entre as proteínas envolvidas nas vias das vesículas secretoras (GAIER; EIPPER; MAINS, 2013; SCHEIBER; MERCER; DRINGEN, 2014).

Observou-se que o cobre tem efeitos inibitórios ou estimulantes nos processos de proliferação neuronal induzidos pela modulação da ação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do fator de crescimento do nervo (NGF) (MORIYA *et al.*, 2008; LINDER, 2016; RAMOS *et al.*, 2016; ANTONUCCI *et al.*, 2017). Este elemento pode interagir com o domínio N-terminal do BDNF, afetando sua conformação, assim como a ligação do BDNF ao receptor neuronal (receptor da tropomiosina B quinase) (CHAO, 2003; TRAVAGLIA *et al.*, 2012; NALETOVA *et al.*, 2019). A interação entre o cobre-NGF pode estimular o acúmulo deste metal nas células e induzir a metilação de proteínas dependentes de cobre ou o crescimento de neuritos. Por outro lado, foi determinado que o cobre impede que o NGF induza neuroproteção contra danos oxidativos. Esses efeitos podem depender do tipo de célula e da concentração de cobre, a qual afeta vários processos em que o metal está envolvido, incluindo estresse oxidativo, metilação de proteínas ou crescimento de neuritos (WANG *et al.*, 1999; ROSS *et al.*, 2001; BIRKAYA; ALETTA, 2005).

Esse elemento está localizado nos terminais sinápticos e pode ser liberado por despolarização da membrana plasmática. O controle da liberação de cobre nas sinapses é crítico para regular a transmissão sináptica e é controlado por ATP7A (BLANKE; VANDONGEN, 2009; JOHNSON; CONN; NISWENDER, 2009; LIU, J. *et al.*, 2019). O cobre, por exemplo, pode controlar a transmissão sináptica por atuar nos receptores de neurotransmissores, visto que pode interagir com receptores ionotrópicos, como os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropiónico), com o receptor

de GABA (ácido gama-aminobutírico), e com receptores purinérgicos (D'AMBROSI; ROSSI, 2015).

Após a estimulação do receptor NMDA pelo glutamato, os íons de cálcio entram na célula e induzem a translocação de cobre-ATP7A para sinapses e liberação de cobre na fenda sináptica, quando liberado o cobre em excesso pode inibir o receptor NMDA (SCHLIEF; CRAIG; GITLIN, 2005), prevenindo a excitotoxicidade glutamatérgica. No receptor AMPA, que permite a entrada de íons sódio na célula, o cobre exposto de forma aguda induz um mecanismo para a inibição desse receptor, envolvendo a oxidação da cisteína presente na proteína, bloqueando a neurotransmissão. Porém, em uma exposição crônica, observou-se que o metal pode aumentar a atividade destes receptores ionotrópicos (PETERS *et al.*, 2011). O cobre também pode interagir com o receptor de GABA, o qual é o principal neurotransmissor inibitório do cérebro, inibindo-o (D'AMBROSI; ROSSI, 2015). Além disso, relata-se que a interação do cobre com receptores purinérgicos também pode ter efeito dual, podendo ativar ou inibir estes receptores, dependendo da família do receptor purinérgico analisado, as quais possuem sítios distintos de ligação ao metal (D'AMBROSI; ROSSI, 2015).

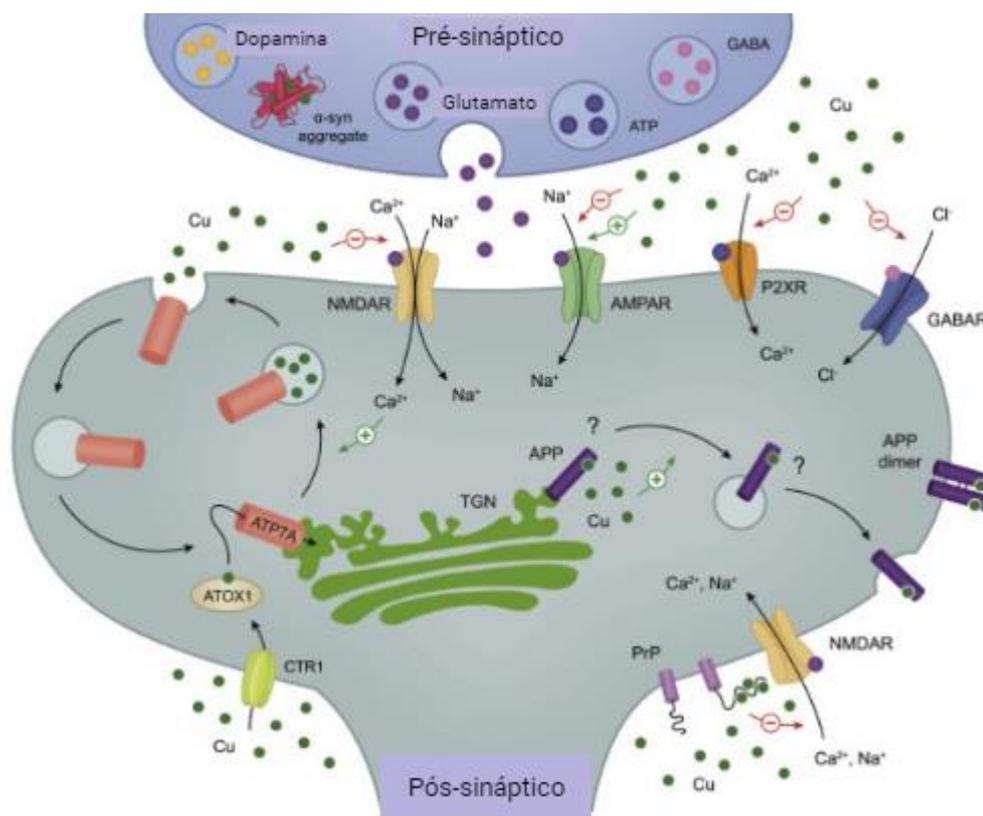
Ainda, a APP (proteína precursora de amilóide) é uma proteína transmembranar tipo I altamente expressa no sistema nervoso humano e, que após a clivagem pela β -secretase, origina polipeptídeos tóxicos, que se acumulam em placas nas regiões cortical e hipocampal do cérebro, sendo responsáveis pela patogênese da doença de Alzheimer (DA). O cobre, com grande afinidade por cisteína, se liga a APP, prevenindo assim a clivagem amiloidogênica. O APP faz migração do retículo endoplasmático para a membrana plasmática, dependentemente do cobre, sendo que esse metal promove uma fosforilação de APP. Essa proteína não tem sua função esclarecida, porém é uma boa candidata para modular os efeitos do cobre na transmissão e plasticidade sináptica (ACEVEDO *et al.*, 2011; D'AMBROSI; ROSSI, 2015).

Esse metal está presente também na ligação ao domínio N-terminal da proteína priônica celular (PrPC), que se acredita que esteja envolvida no metabolismo do cobre, auxiliando também no transporte do metal através da membrana plasmática. Esta capacidade de ligar-se ao cobre e sua localização levam a crer que PrPC age controlando os níveis de cobre nas sinapses. A ligação com o cobre também induz alterações conformacionais na PrPC, promovendo sua interação com NMDA, diminuindo a atividade deste, prevenindo assim a excitotoxicidade glutamatérgica. Esse elemento também pode induzir uma elevação de PrPC, que é modulada através da regulação positiva da transcrição mediada pela ataxia-telangiectasia mutada (ATM), e essa elevação de PrPC desempenha um mecanismo celular protetor para

prevenir o acúmulo de ERO, induzido pelo cobre, e conseqüentemente a morte celular (HWANG; PARK; KOH, 2007; QIN *et al.*, 2009; D'AMBROSI; ROSSI, 2015).

Ainda, foi demonstrado que o cobre regula diretamente a atividade de vários fatores de transcrição, embora o mecanismo não seja claro. Em mamíferos, em particular, os fatores de transcrição responsivos ao cobre precisam de um domínio de ligação ao metal; no entanto alguns fatores de transcrição respondem ao cobre mesmo sem conter esse domínio. Foi proposto que o excesso do metal atua para deslocar outros íons (como o zinco), alterando assim a conformação do fator de transcrição que contém um domínio de ligação ao zinco, por exemplo. Isso pode ocorrer no caso da proteína reguladora do gene MTF-1 (fator de transcrição responsivo a metais 1), levando à expressão do mRNA para α -syn (alfa-sinucleína) no SNC (HWANG; PARK; KOH, 2007; D'AMBROSI; ROSSI, 2015).

Figura 2 — Função do cobre nas sinapses e modulação dos receptores de neurotransmissores



O cobre (pontos verdes) liberado nas sinapses pode modular a função dos receptores de neurotransmissores ionotrópicos. Essa regulação às vezes mostra um comportamento bifásico, inibitório ou estimulante (+ e -), afetando também a plasticidade sináptica, a potencialização de longo prazo e a morte celular excitotóxica. O cobre pode interferir o transporte de APP (Proteína Precursora de Amilóide) para a membrana plasmática, o que pode modular a função dessa proteína na sinapse. Ainda, a proteína de ligação ao cobre PrPC (proteína príon celular) ao complexar o cobre pode modular alostericamente a função do receptor de glutamato (pontos roxos) NMDA (os quais são receptores ionotrópicos de glutamato) por um mecanismo de interação proteína/proteína. Fonte: adaptado de D'AMBROSI; ROSSI, 2015.

1.4 EFEITOS TÓXICOS DO EXCESSO DE COBRE INTRACELULAR

Em humanos, a intoxicação por cobre pode ocorrer por ingestão acidental de água contaminada, exposição ocupacional ou por distúrbios genéticos que levam a uma acumulação excessiva de cobre no organismo (BOST *et al.*, 2016). O cobre é um elemento essencial para diversas funções, no entanto, em excesso, o cobre pode ser tóxico para as células (ZISCHKA; EINER, 2018). O cobre livre é muito ativo em reações de óxido-redução, capacitando esse metal como potente catalisador das reações de geração de ERO podendo promover o estresse oxidativo. A propriedade intrínseca de oscilar entre o estado reduzido, confere a esse metal a

participação, se não controlada, de catalisar também a reação de Fenton e Haber-Weiss. A reação de Fenton corresponde a geração de radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), por meio da reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com o cobre, enquanto na reação de Haber-Weiss, o cobre catalisa a reação entre o H_2O_2 e o radical ânion superóxido (O_2^-), a fim de gerar, da mesma forma, o radical $\text{OH}\cdot$ (BRYCE; GURD, 1966; SUZUKI; KARASAWA; YAMANAKA, 1989; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; LETELIER *et al.*, 2009).

As ERO, quando produzidas em massa, podem modificar e alterar a função de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, o que pode resultar em morte celular. Além disso, no cérebro, a reação do óxido nítrico (NO), molécula sinalizadora da neurotransmissão, com O_2^- ou com tióis endógenos, produz as espécies reativas de nitrogênio (ERN) peroxinitrito (ONOO^-) ou S-nitroso-tióis, respectivamente. Tanto as ERO como as ERN, quando produzidas em níveis elevados, estão associadas a danos oxidativos e doenças neurodegenerativas (GREENOUGH; CAMAKARIS; BUSH, 2013).

O cobre livre pode também se ligar a resíduos de cisteína presente em proteínas, inativando assim as enzimas (CECCONI *et al.*, 2002; LETELIER *et al.*, 2009), como, por exemplo, podendo interromper a organização e a função dos complexos proteicos mitocondriais, levando à disfunção mitocondrial (ARCIELLO; ROTILIO; ROSSI, 2005), ou ainda pode causar agregação e fibrilação de proteínas (ATWOOD *et al.*, 2004; RASIA *et al.*, 2005). Além disso, esse elemento pode induzir modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade, resultando em alterações do transporte reverso do colesterol com acúmulo de colesterol nos tecidos periféricos e enriquecimento de lipoproteínas aterogênicas com ésteres de colesterol (HAIDARI *et al.*, 2001). Além disso, os íons de cobre podem incitar a oxidação da dopamina e catecolaminas relacionadas, formando assim complexos com a dopamina oxidada, que por sua vez pode danificar o DNA (SQUITTI *et al.*, 2006; SPENCER *et al.*, 2011).

Ainda, o excesso de cobre pode interferir na homeostase do ferro, diminuindo a sua disponibilidade para as células (URIU-ADAMS; KEEN, 2005). O metabolismo do cobre e do ferro estão interligados pela atividade ferroxidase da ceruloplasmina. Essa cuproenzima atua oxidando o Fe^{+2} (íon ferroso) em Fe^{3+} (íon férrico), processo que possibilita que o ferro possa se ligar à transferrina sérica que o transporta a nível plasmático (DÍAZ *et al.*, 2015).

1.5 DOENÇAS RELACIONADAS AO EXCESSO DE COBRE

1.5.1 Doença de Wilson (DW)

A DW é um exemplo clássico de uma condição de sobrecarga de Cu. Essa patologia é autossômica recessiva, caracterizada por várias mutações do gene ATP7B. Com a função do ATP7B defasada, há um prejuízo da excreção de cobre que, conseqüentemente, leva a um acúmulo persistente de cobre no cérebro, fígado e outros tecidos (CZLONKOWSKA *et al.*, 2018). O excesso de cobre e sua toxicidade é considerada a principal causa de danos aos órgãos em pacientes com DW. Os portadores dessa patologia apresentam lesões generalizadas no mesencéfalo, tálamo e cerebelo, bem como atrofia cortical (SCHEINBERG; STERNLIEB, 1996; HALLIWELL, 2006; HUSTER *et al.*, 2007). A perda de neurônios e a ocorrência de anormalidades na morfologia dos astrócitos são características neuropatológicas típicas em pacientes com essa doença (BERTRAND *et al.*, 2001). Como consequência desse acúmulo de Cu, os pacientes com DW apresentam sintomas neurológicos, como tremores, síndrome acinético-rígida (parkinsonismo), ataxia e distonia; outros achados neurológicos comuns podem incluir disartria, espasticidade e falta de coordenação motora (POUJOIS; WOIMANT, 2018).

1.5.2 Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são um grupo de doenças que se desenvolvem em células neurais e causam a morte progressiva delas. Essas doenças podem ser causadas por fatores genéticos ou ambientais, incluindo a exposição a metais tóxicos, como o cobre. A DA (doença de Alzheimer) é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns, e tem como característica a deposição de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares na massa cinzenta, devido ao processamento da proteína precursora amilóide (APP) (que resulta na agregação de peptídeos β -amilóide - A β), e da agregação da proteína tau hiperfosforilada, respectivamente (GUZIOR, 2015).

Várias evidências vêm sendo apresentadas que implicaram que a homeostase alterada do Cu pode ser associada a DA. Relata-se que os níveis de Cu total e livre aumentam no soro de pacientes com DA em comparação com controles saudáveis (SQUITTI *et al.*, 2002; BUCOSSI *et al.*, 2011; SQUITTI *et al.*, 2014), apesar dessas alterações não serem observadas por todos os autores que analisaram os níveis do metal entre pacientes com DA e idosos sem doenças neurodegenerativas. O excesso de Cu poderia ligar-se aos peptídeos A β diretamente, com alta afinidade, aumentando a agregação de A β e conduzindo ao aumento da neurotoxicidade (ATWOOD *et al.*, 2004; CHEIGNON *et al.*, 2018). A ligação de Cu a A β forma dímeros β -amilóides ligados à ditirosina neurotóxicos, o que leva a evitar que esses

dímeros se degradem em monômeros e, portanto, podem ser relevantes para a formação de placas amilóides. Ainda, descreve-se que os complexos Cu-A β reduzem a expressão de LRP1 (proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína), reduzindo ainda mais a depuração de A β , e consequentemente aumentando a deposição de placas amiloides no cérebro (ATWOOD *et al.*, 2004; KITAZAWA; HSU; MEDEIROS, 2016).

Além da DA, concentrações anormalmente altas de Cu foram encontradas no corpo estriado em pacientes com Doença de Huntington (DH) e em camundongos usados como modelos para DH (DEXTER *et al.*, 1991; FOX *et al.*, 2007). A DH é uma rara doença neurológica autossômica dominante caracterizada por uma perda progressiva das funções motoras, psiquiátricas e cognitivas. Acredita-se que a DH seja causada por uma expansão anormal da repetição de poliglutamina no terminal N da proteína mutante Huntingtina (HTT), que leva à formação de proteínas HTT mutantes que tendem a se agregar. Em neurônios, isso leva à redução da produção de energia, estresse oxidativo e neurodegeneração (STURROCK; LEAVITT, 2010).

O aumento nos níveis de Cu pode levar à agregação da proteína HTT pois interage com os resíduos de histidina no terminal N da proteína. Ainda, ensaios *in vitro* mostraram que o Cu se liga a proteína HTT em seu resíduo de glutamina, e que os quelantes de Cu podem inibir a formação de agregados HTT mutantes, enquanto a suplementação de Cu promove a formação de agregados (FOX *et al.*, 2007). O Cu também pode contribuir com a progressão dessa doença pela inibição das desidrogenases mitocondriais, como a succinato desidrogenase (SDH) e a lactato desidrogenase (LDH), que são suscetíveis à inativação mediada pelo Cu (SHELLINE; CHOI, 2004; PAMP *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de outra doença neurodegenerativa que vem sendo associado ao excesso de cobre é a Doença de Parkinson (DP), a qual tem como principais características a perda dos neurônios dopaminérgicos na substância negra do cérebro, assim como formação de fibrilas de α -sinucleína que tendem a se agregar e a formar os corpos de Lewy (LI *et al.*, 2020). A formação dessas estruturas ocorre devido ao mal dobramento da proteína α -sinucleína, ocasionando a formação de oligômeros e posteriormente de fibrilas insolúveis, que ao se associarem a outras moléculas como as proteínas neurofilamentares e ubiquitina, resultam na formação dos corpos de Lewy (FAN; LIU; WU, 2021). Como comentando anteriormente, o excesso de cobre pode ser neurotóxico, visto que pode catalisar a formação de ERO pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (LETELIER *et al.*, 2009), além de promover a oxidação da dopamina, que também leva a geração de compostos tóxicos (ERO e dopamina-quinona)

(PHAM; WAITE, 2014). Os produtos finais gerados por essa oxidação da dopamina catalisada pelo cobre geram ainda danos ao DNA (SPENCER *et al.*, 2011). Ainda, alguns autores têm relacionado o excesso de cobre com a formação dos corpos de Lewy, já que o metal possui afinidade com a α -sinucleína, promovendo a formação de conformações da proteína que tendem a se agregar (PAIK *et al.*, 1999; UVERSKY; LI; FINK, 2001; BINOLFI *et al.*, 2006; BISAGLIA; BUBACCO, 2020)

1.6 SISTEMA ANTIOXIDANTE

O sistema antioxidante é uma importante defesa frente ao estresse oxidativo gerado pelo cobre, sendo crucial para a eliminação de ERO. Os antioxidantes têm por definição qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Essas substâncias interagem diretamente, fazendo a neutralização da ação de ERO, ou indiretamente, fazendo parte dos sistemas enzimáticos que tenham essa capacidade. A proteção conferida por esse sistema inclui componentes enzimáticos e não enzimáticos. Os componentes enzimáticos são enzimas produzidas no organismo, as quais as principais incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e peroxirredoxinas (Prxs) (MAXWELL, 1995). Quanto aos antioxidantes não enzimáticos, fazem parte deste grupo as vitaminas e outras substâncias, que incluem a glutaciona reduzida (GSH), ceruloplasmina, melatonina, ácido úrico, bilirrubina e poliaminas (PA) (BEYER, 1992; SEQUEIRA; RAO; RAO, 2012; HE *et al.*, 2017).

1.6.1 Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos podem atuar sob diferentes formas. A GSH é um importante elemento desse sistema, sendo formada pela ligação peptídica entre o ácido glutâmico e a cisteína, catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase. O dipeptídeo formado liga-se ao aminoácido glicina pela ação da glutaciona sintase, formando a GSH (IRATO *et al.*, 2001). A GSH desempenha uma variedade de importantes funções fisiológicas e metabólicas em todas as células, podendo atuar através dos elétrons doados que provêm do grupo sulfidril (-SH) do seu resíduo de cisteína para que a GPx possa catalisar a eliminação de ERO (Figura 3) (HAN; MA; YIN, 2010). Essa molécula também se liga a metais endógenos,

como Cu, Se, Cr e Zn por meio de reações não enzimáticas, que desempenham um papel importante no transporte, armazenamento e metabolismo de metais (WANG; BALLATORI, 1993; HULTBERG; ANDERSSON; ISAKSSON, 1997; HWANG *et al.*, 2002).

Como outros exemplos de antioxidantes não-enzimáticos, pode-se citar a ceruloplasmina e metalotioneína, as quais são metaloproteínas cobre-dependentes e mantêm a proteção antioxidante intra e extracelular, respectivamente, que transportam e armazenam íons de cobre (BARBOSA *et al.*, 2010; SEQUEIRA; RAO; RAO, 2012). Já a vitamina E atua como um antioxidante não-enzimático pois está associado ao grupo -OH presente no grupo fenólico contido no anel cromanol dos tocoferóis. A vitamina E doa o átomo de hidrogênio fenólico ao radical peróxil (LOO•) gerando hidroperóxido de lipídio (LOOH) e radical -tocoferoxil (-Toc•) que, apesar de também ser radical, é incapaz de continuar a reação em cadeia oxidativa. O -Toc• é capaz de reagir com outro radical lipídico livre para formar um produto não-radicalar. Por esse processo, a vitamina E neutraliza os LOO• e bloqueia a peroxidação lipídica, em especial a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, que é essencial para a proteção das membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; HE *et al.*, 2017). A coenzima Q10 (CoQ10), principalmente na sua forma reduzida, chamada de ubiquinol (CoQ10H₂), é capaz de reduzir o α -tocoferol (vitamina E) oxidado, regenerando-o para sua forma antioxidante (BEYER, 1992; NAVASA; VILALBA; CABOR, 2007).

Já o ácido úrico, substância produzida a partir da quebra de purinas (bases nitrogenadas), atua como antioxidante inibindo a nitrosilação de proteínas por peroxinitritos, assim como a peroxidação de lipídios (WARING; WEBB; MAXWELL, 2001). Já as espermidina, espermina e putrescina, promovem a estabilização dos lipídeos de membrana celular, mais especificamente dos fosfolipídeos. Além disso, são capazes de proteger o DNA das espécies reativas (RIDER *et al.*, 2007).

A melatonina, por sua vez, é um neuro-hormônio produzido pela glândula pineal a partir do aminoácido triptofano e é responsável pelo controle do ritmo circadiano (DIAS *et al.*, 2013). Atua como antioxidante devido sua capacidade de quelar-se às espécies reativas, principalmente as ERO (RIDER *et al.*, 2007). A bilirrubina também é um antioxidante orgânico não enzimático. Esse pigmento, produzido através da quebra do grupo prostético heme da hemoglobina, é capaz de captar, quando não conjugada, o oxigênio e reagir com o radical superóxido, além de servir de substrato redutor das peroxidases na presença de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos (STOCKER; AMES, 1987)

1.6.2 Antioxidantes enzimáticos

Como comentado anteriormente, os antioxidantes enzimáticos compreendem enzimas que realizam a detoxificação de espécies reativas, como a SOD, GPx, GR, CAT e Prx (Figura 3). A SOD apresenta três isoformas, sendo a CuZn-SOD (SOD1), que possui como cofator cobre e zinco, encontrada no citosol; a Mn-SOD (SOD2), que possui em seus sítios ativos o manganês, e é encontrada na matriz mitocondrial; e a SOD extracelular (ecSOD ou SOD3), que também possui como cofator cobre e zinco, e é encontrada extracelularmente (HE *et al.*, 2017). Essas três isoformas catalisam a reação de transformação do radical superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e O_2 (TIWARI *et al.*, 2019).

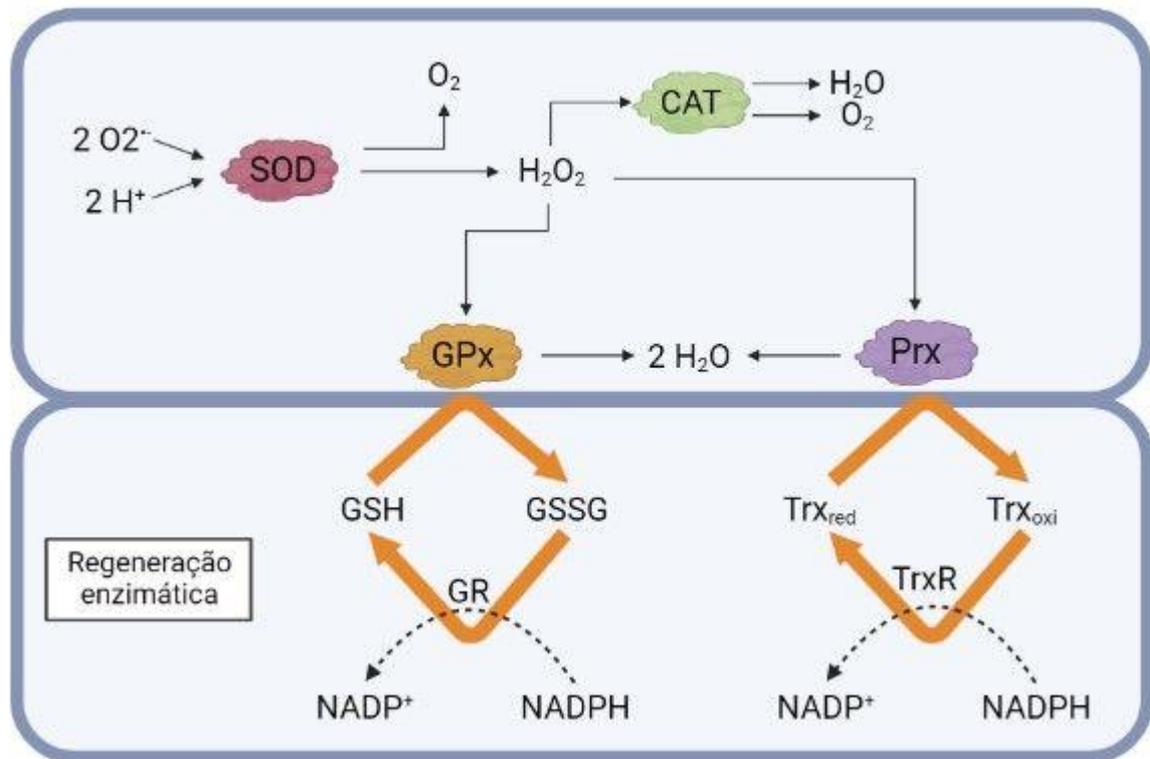
A CAT, por sua vez, é encontrada principalmente nos hepatócitos e eritrócitos, e está amplamente localizada em organelas subcelulares, como peroxissomos. Possui a capacidade de transformar o H_2O_2 em altas concentrações em oxigênio e água (Figura 3) (SUNG *et al.*, 2013).

A GPx, uma enzima selênio dependente, atua na redução de H_2O_2 e peróxidos orgânicos. Durante a reação, a GPx utiliza como cofator a GSH, a qual é convertida a glutationa oxidada (GSSH) e, posteriormente, a enzima GR reduz GSSH à GSH, através dos elétrons provenientes do NADPH. Assim, a GSH pode continuar agindo como antioxidante (Figura 3) (HAN; MA; YIN, 2010).

As Prx, juntamente com a GPx e a CAT, são tíois peroxidases responsáveis por degradar o H_2O_2 , além de peróxidos orgânicos e peroxinitritos. Atuam pela utilização de um resíduo de cisteína em seu sítio ativo (PARSONAGE; KARPLUS; POOLE, 2008). Nos mamíferos já foram identificadas 6 isoformas de Prxs: A Prx1, Prx2 e Prx6 encontradas no citoplasma, a Prx3 na mitocôndria, a Prx4 no retículo endoplasmático, e a Prx5 presente no citoplasma, mitocôndria, peroxissomos e no núcleo. Semelhante ao que ocorre com a GSH, ao final do processo de degradação dos peróxidos, as Prxs ficam em sua forma oxidada, sendo necessária a atuação das enzimas tiorredoxinas (Trx) para promover sua redução e permitir que as mesmas continuem atuando na degradação dessas espécies reativas. A tiorredoxina oxidada (Trx-S2) é reduzida pela tiorredoxina redutase (TrxR) que utiliza o NADPH como doador de elétrons (Figura 3) (LU *et al.*, 2009).

A exposição constante ao estresse oxidativo e o consequente desequilíbrio das defesas antioxidantes do organismo levam a alterações estruturais e metabólicas das células, gerando processos patogênicos envolvidos em doenças neurodegenerativas, sendo que sob estresse de cobre, as enzimas antioxidantes são cruciais para a eliminação de ERO.

Figura 3 — Ação das enzimas antioxidantes



A superóxido dismutase (SOD) faz a degradação do radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). A CAT, por sua vez, transforma o H_2O_2 em O_2 e H_2O . A glutatona peroxidase (GPx) catalisa a redução de H_2O_2 , utilizando glutatona (GSH), que é convertida a glutatona oxidada (GSSG); posteriormente, a enzima glutatona redutase (GR) reduz a GSSG a GSH, através de elétrons provenientes do NADPH. As peroxirredoxinas (Prx) catalisam a redução de H_2O_2 , ficando em sua forma oxidada e, através de tiorredoxinas (Trx) são convertidas a sua forma reduzida novamente, e a Trx é convertida a tiorredoxina oxidada (Trx_{oxi}), que por sua vez é reduzida pela tiorredoxina redutase (TrxR), que utiliza o NADPH como doador de elétrons. Fonte: Figura produzida com o auxílio do software Biorender (O autor, 2023).

O conteúdo e a expressão das enzimas antioxidantes, assim como os mecanismos de defesa antioxidante não-enzimáticos, diferem entre as diferentes células presentes no organismo. Assim, espera-se que dependendo da célula, podem ocorrer diferentes respostas ao estresse oxidativo desencadeado pelo excesso de cobre. Neste sentido, algumas células, incluindo as do SNC, são mais resistentes às elevações deste metal, enquanto outras são mais suscetíveis, podendo ser levadas à morte celular quando as concentrações do cobre se encontram elevadas. Como já comentado, a relação do cobre com o surgimento e progressão das doenças que afetam o SNC vem sendo investigada nos últimos anos, seja por uma falta deste no organismo ou por seu excesso, pois seu papel no SNC ainda não é totalmente compreendido (BISAGLIA e BUBACCO, 2020). Estudos realizados até o presente revelam

uma complexa rede de vias interligadas através das quais o cobre pode modular a sinalização através de múltiplos alvos, as quais são desconhecidas (ASHRAF *et al.*, 2019). Para uma melhor compreensão sobre os efeitos do cobre existe uma necessidade de novos trabalhos sobre as consequências da elevação das concentrações deste metal no interior das células, principalmente no tecido nervoso. Para que isso seja possível, estudos utilizando modelos de linhagens de células mais resistentes e mais suscetíveis ao excesso do metal podem ser utilizados, investigando, de forma comparativa, quais mecanismos são ativados frente à toxicidade do cobre, como a ativação do sistema antioxidante. Neste contexto, as análises realizadas no presente estudo focaram na existência ou não de diferenças espécie-específicas para a toxicidade do Cu, as quais estejam relacionadas a mecanismos de resposta ao estresse oxidativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as alterações provocadas pelo excesso de cobre em parâmetros de estresse oxidativo e na atividade e expressão de enzimas do sistema antioxidante, utilizando como modelo uma linhagem de astroglioma mais resistente às elevações de cobre (U-87 MG) e uma linhagem mais suscetível (C6), comparando a resposta observada entre os dois modelos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a viabilidade das células de linhagem de astroglioma humano e de rato após 24h e 48h de exposição ao excesso de cobre;
- Avaliar a geração de superóxido após a exposição durante 24h ao CuSO_4 nas linhagens U-87 MG e C6;
- Determinar os níveis de tióis não proteicos (NPSH) e tióis proteicos (PSH) em células de linhagens de astroglioma após exposição ao CuSO_4 durante 24h;
- Avaliar a atividade das enzimas GPx, GR, CAT e SOD após exposição de células U-87 MG e C6 a elevadas concentrações de cobre, durante 24h e 48h;
- Verificar alterações na expressão das proteínas GPx1, GR e SOD1 após exposição ao cobre por 24h em células de linhagem de astroglioma.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR E EXPOSIÇÃO AO CuSO_4

As células da linhagem de glioblastoma humano (U-87 MG) foram cultivadas em frascos em meio Eagle's com modificação de Dubelcco (DMEM) contendo 1 U/mL penicilina, 1 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B, suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB); enquanto as células de linhagem de glioma de rato (C6) o mesmo meio de cultivo foi suplementado com 5% de SFB. As células foram mantidas a 37°C com no mínimo 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO_2 . Após confluência, as células foram tratadas com 0,05% de tripsina/ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) e cultivadas em placas distintas para diferentes análises (DOS SANTOS *et al.*, 2006). As linhagens foram expostas durante 24h e 48h a 0, 100, 300 ou 600 μM de CuSO_4 . Estas concentrações refletem as estimadas no encéfalo em humanos (50-100 μM) (QIAN *et al.*, 2012), e no encéfalo de pacientes com a doença de Wilson, onde as concentrações de cobre encontram-se elevadas (297 μM – 1092 μM) (LAI; BLASS, 1984).

3.2 VIABILIDADE CELULAR

3.2.1 Ensaio do MTT

A técnica do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) foi utilizada para análise da viabilidade celular após exposição das células às concentrações de CuSO_4 . O MTT é um corante amarelo que é reduzido pelas células metabolicamente ativas, pelas desidrogenases mitocondriais, para formar um produto insolúvel em água de coloração arroxeadada, o formazan. A quantidade de formazan formado é proporcional ao número de células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

Para o ensaio foram plaqueadas 50.000 células por poço em uma placa de 96 poços. Após confluência, as células foram expostas ao CuSO_4 . No final do período de incubação (24 ou 48h), o meio de cultivo foi retirado e o MTT diluído em meio de cultivo foi adicionado, na concentração de 0,1 mg/mL (C6) ou 0,25 mg/mL (U-87 MG). Após 20 minutos de incubação a 37°C para C6, e 45 minutos para U-87 MG, o meio foi removido e o formazan produzido nas células pela ação das desidrogenases foi dissolvido com a adição de dimetilsulfóxido (DMSO).

A formação do formazan foi analisada espectrofotometricamente a 570nm. Os resultados foram expressos em percentagem dos controles, no qual foram atribuídos 100% de viabilidade (MOSMANN, 1983).

3.2.2 Ensaio do vermelho neutro

O ensaio de viabilidade celular vermelho neutro é um método baseado na incorporação deste corante pelas células vivas. O corante é incorporado nas células ativas e viáveis através do processo de endocitose nos lisossomos. Foram semeadas 10.000 células por poço em uma placa de 96 poços e, após confluência, as células foram expostas a diferentes concentrações de cobre. No final do período de exposição ao CuSO_4 (24 ou 48h), as células foram incubadas com uma solução de vermelho neutro 0,04 mg/mL, durante quatro horas a 37°C. Após, o corante vermelho neutro incorporado nas células foi extraído com uma solução de ácido acético. A quantidade de corante incorporado pelas células foi analisada espectrofotometricamente a 540 nm. Os resultados foram expressos em percentagem dos controles, no qual foram atribuídos 100% de viabilidade (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

3.3 NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS (NPSH) E TIÓIS PROTEICOS (PSH)

Para análise de NPSH e PSH, as células foram cultivadas em placas de Petri e, após adquirirem confluência, a exposição ao CuSO_4 foi realizada. Após incubação com diferentes concentrações de cobre por 24h, o meio foi retirado, e a tripsina foi adicionada e incubada a 37°C por 3 minutos para desagregamento das células. Após foi adicionado DMEM com 5% ou 10% de SFB, seguido de centrifugação a 1.500 rpm por 5 min. Em seguida, os pellets celulares foram ressuspensos em tampão fosfato de potássio (TFK) 1M, pH 7,4, e coletados em microtubos. Os pellets celulares foram novamente centrifugados, a 1.000 rpm por 5 min. Após, o sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 2% de TCA (ácido tricloroacético) em TFK 0,5 M, com pH 7,4. As amostras foram novamente centrifugadas durante 10 min a 3.000 rpm, e os sobrenadantes foram coletados e utilizados para análise do NPSH, dos quais 90% são representados por GSH (COOPER; KRISTAL, 1997). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços contendo 80 μL do sobrenadante, 100 μL de TFK 1M (pH 7,4) e 25 μL de DTNB (5,5'-Ditio-bis(Ácido 2-Nitrobenzoico) 10 mM (ELLMAN, 1959). Para análise do PSH foi utilizado o *pellet* da última centrifugação, adicionando aos microtubos 170 μL de TFK 1M, pH 7,4, e 1,7

uL de DTNB 10 mM (HERMIDA-AMEIJEIRAS *et al.* 2004). Os microtubos foram homogeneizados e incubados por 20 min a temperatura ambiente com agitação constante. Em uma placa de 96 poços foi adicionado 100 µL de amostra em cada poço e 100 µL de TFK 1M, pH 7,4. A absorbância do NPSH e PSH foi lida a 412 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax[®]). Os resultados foram expressos em µmol/mg de proteína.

3.4 ENSAIO DHE (DI-HIDROETÍDIO) PARA MENSURAÇÃO QUALITATIVA DE SUPERÓXIDO

A produção intracelular de superóxido foi detectada utilizando o composto di-hidroetídio (DHE). O DHE permeia a membrana plasmática e ao entrar em contato com o O₂⁻ é oxidada por este, formando-se o 2-hidroxi-etídio, que emite fluorescência vermelha após a ligação ao DNA nuclear (KOPPERS *et al.*, 2008).

Para o cultivo celular foram plaqueadas, nos tratamentos de 100 e 300 µM de cobre e no controle, 10.000 células por poço em placas de 12 poços contendo lamínulas circulares, e para o tratamento de 600 µM de cobre foram plaqueadas 15.000 células por poço, visto que no tratamento com essa concentração tem um aumento excessivo de morte celular, sendo assim, a maior quantidade de células é necessária para a visualização da fluorescência. Após a exposição ao CuSO₄ por 24h, o meio foi removido e as células foram incubadas com DHE (2 µM) durante 30 min a 37 °C. Após este período, as células foram lavadas com PBS (tampão fosfato salina), e as lamínulas foram dispostas em lâminas, utilizando como meio de montagem o FluoroMount (Sigma-Aldrich). Em seguida, a fluorescência foi avaliada utilizando um microscópio de fluorescência Olympus BX53. Os resultados foram apresentados em imagens para avaliação qualitativa.

3.5 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para análise da atividade das enzimas antioxidantes, foram plaqueadas 500.000 células por poço em uma placa de 6 poços e, após adquirirem confluência, a exposição ao CuSO₄ foi realizada. Após incubação por 24h ou 48h, o meio foi retirado e adicionado aos poços tampão HEPES 20mM, pH 7,0. As células foram coletadas em microtubos, com o auxílio de um *scraper*, e para lisar as membranas as células foram passadas através da ponta de uma seringa de 1 ml por dez vezes, mantendo os microtubos no gelo, para posterior mensuração das

atividades das enzimas GPx (glutathione peroxidase), GR (glutathione reductase), CAT (catalase) e SOD (superóxido dismutase).

A atividade da GR foi mensurada de acordo com Carlberg e Mannervik (1985). Resumidamente, a análise foi realizada em um meio de reação contendo TFK 0,25M, pH 7,0, com 2,5mM de EDTA; 0,2mM de NADPH e 0,2mM de GSSG. A velocidade de consumo de NADPH foi acompanhada durante 5 minutos em espectrofotômetro Spectramax (leitura a 340 nm). Os resultados foram expressos em μmol de NADPH consumido/min/mg de proteína.

A atividade da enzima GPx foi mensurada de acordo com Wendel (1981), em um meio de reação contendo TFK 0,25M pH 7,0 com 2,5mM de EDTA; 1mM de GSH, 0,2U/mL de GR, 0,2mM de TBOOH e 0,2mM de NADPH. A atividade enzimática foi mensurada através da leitura em espectrofotômetro (Spectramax) a 340nm, por 5 minutos. Os resultados foram expressos em μmol de NADPH consumido/min/mg de proteína.

A dosagem da atividade da enzima CAT foi realizada em meio de reação contendo tampão fosfato de sódio e potássio 50mM pH 7,0 e H_2O_2 0,03M (AEBI, 1984). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 240nm, durante 5 min. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

Por fim, a atividade da SOD foi mensurada em um meio de reação contendo tampão glicina 50mM, pH 10,2 com epinefrina (adrenalina), pH 1,2. Radicais superóxido (O_2^-) oxidam a adrenalina, formando adenocromo; desta forma, quanto maior a atividade da SOD, menor será a quantidade de O_2^- , e menos adenocromo será formado (. Esse processo foi acompanhado durante 5 minutos em espectrofotômetro Spectramax (leitura a 480nm). Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas dos homogeneizados celulares foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), usando albumina sérica bovina como padrão.

3.7 EXPRESSÃO POR RT-PCR EM TEMPO REAL DE GPX1, GR E SOD1

Para realização dos ensaios de RT-PCR foram cultivadas 500.000 células por poço em placas de 6 poços. Após adquirirem confluência, a exposição de 24h ao CuSO_4 foi realizada. Após incubação, o meio foi retirado e foi realizada a extração do RNA, como descrito abaixo.

3.7.1 Extração do RNA

O RNA total foi extraído com TRI[®] Reagent (Sigma[®]), adicionando-se aos poços 200 L do produto. As células foram coletadas em microtubos, com o auxílio de um scraper e levados ao vórtex. Em seguida, o material foi incubado por cinco minutos, à temperatura ambiente, e, em seguida, adicionados 40µL de clorofórmio e homogeneizado por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos, de 2-8°C, na velocidade de 12.000 \times g. A fase incolor resultante foi transferida para novos microtubos e a eles foram adicionados 100µL de isopropanol e levados ao vórtex. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 10 minutos, a temperatura ambiente, para precipitação do RNA. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por dez minutos, de 2-8°C, e velocidade de 12.000 \times g. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200µL de etanol 75% para lavar o pellet. As amostras foram, então, centrifugadas por cinco minutos, de 2-8°C, com velocidade de 7.500 \times g. Todo o álcool 75% foram descartados e as amostras foram secadas ao ar por dez minutos. Na sequência, o RNA foi ressuscitado em 20µL de água Milli-Q. A concentração e pureza do RNA extraído foram determinadas através de um espectrofotômetro NanoDrop, a 260nm e a 280nm.

3.7.2 Síntese do cDNA

O cDNA foi construído a partir de 2µg de RNA para linhagem de células C6, e a partir de 4µg de RNA para linhagem de células U-87 MG, utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher). A reação foi realizada em microtubo de 200µL contendo o tampão (RT Buffer), dNTP Mix (100 mM; mix de nucleotídeos), RT Random Primers, MultiScribe[™] transcriptase reversa, inibidor de RNase, e quantidade de água livre de endonucleases (DPEC) suficiente para completar 20µL. Os microtubos foram colocados para reação em um Termociclador Eppendorf, de acordo com o seguinte protocolo: 25°C por 10 minutos, 37°C durante 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C como tempo de espera.

3.7.3 RT-PCR em tempo real

A expressão de GPx1, GR e SOD1 foi realizada utilizando PowerUp[™] SYBR[™] Green Master Mix (Applied Biosystems), contendo 5 µL de cDNA, na presença de 1 µL de primers dos tipos *forward* e *reverse* nas concentrações expressas no Quadro 1 e 2, 10 µL de SYBR e

completado com água DPEC até um volume final de 20 μ L, em equipamento de RT-PCR em tempo real Stratagene Mx 3005P (Agilent Technologies). Os resultados foram analisados utilizando o software MxPro qPCR. As sequências dos primers utilizados são descritos nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 — Sequência de primers para *Rattus norvegicus* utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real

Proteína	Quantidade em nM de primer (células C6)	Primer sequência forward	Primer sequência reverse
SOD1	600	GTGCAGGGCGTCATTCCTTC	GCCTCTTTCATCCGCTGGA
GR	600	GAGTTTGTAGCCTAGCCCCG	GAGTTTGTAGCCTAGCCCCGA
GPx1	600	TATCGAGAATGTGGCGTCCC	GCAGCTACGAGCAACAGAAAG
ATP5B	600	GGCACCAATCAAATTCCT	AGCCTCAGCATGAATAGGAG

Quadro 2 — Sequência de primers para *Homo sapiens sapiens* utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real

Proteína	Quantidade em nM de primer (células U-87 MG)	Primer sequência forward	Primer sequência reverse
SOD1	3500	ACTGGTGGTCCATGAAAAAGC	AACGACTTCCAGCGTTTCCT
GR	4500	TGCACTTCCCGGTAGGAAAC	GATCGCAACTGGGGTGAGAA
GPx1	3000	CGGACATCAGGAGAATGGCA	TTCGATGTCGATGGTGCGAA
ATP5B	600	CCACAGGCGCATCTTCTACT	CCCAAGGTCTCAGGACCAAC

A reação foi realizada com o seguinte protocolo: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, seguido de 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 22 segundos e 72°C por 1 minuto. A curva de dissociação foi analisada em uma etapa posterior, seguindo de 15 segundos a 95°C, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. Os resultados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo ATP5B, empregado como padrão (*housekeeping gene*), de acordo com Del Pozo *et al.* (2016). Os dados foram expressos em conteúdo relativo de mRNA em relação ao grupo controle.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram primeiramente analisados quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentaram distribuição normal, estes foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnet, quando F foi considerado significativo. Quando os dados não apresentaram uma distribuição normal, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post hoc* de Dunn, quando F foi considerado significativo. Para análise dos efeitos dependentes da dose foi utilizada a regressão linear. Foi utilizada a correlação de Pearson para verificar a correlação entre NPSH e GPx para a linhagem C6 (distribuição normal), e a de Spearman para analisar a correlação entre estas variáveis para a linhagem U-87 MG (distribuição não normal dos dados). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism 9.4[®]. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

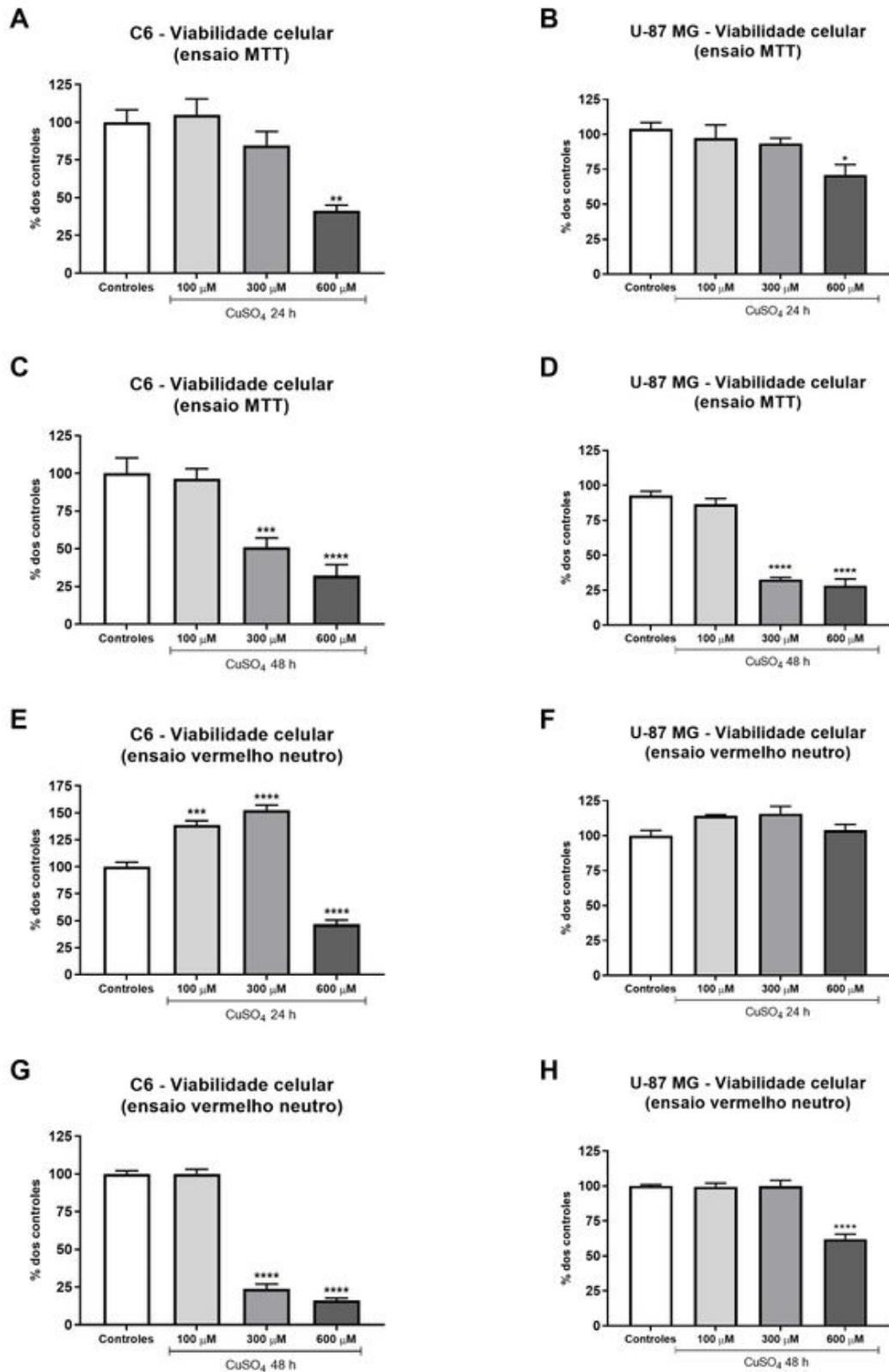
4 RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular avaliada pela técnica do MTT nas linhagens C6 e U-87 MG diminuiu significativamente em 600 μ M de cobre após 24h de exposição [C6: $F_{(3,8)} = 12,11$ $p < 0,01$; U-87 MG: $F_{(3,13)} = 5,481$ $p < 0,05$] (Figura 4A e 4B), e já a partir de 300 μ M de cobre em 48h de exposição [C6: $F_{(3,20)} = 19,08$ $p < 0,0001$; U-87 MG: $F_{(3,33)} = 92,41$ $p < 0,0001$] (Figura 4C e 4D). Nas linhagens C6 e U-87 MG houve uma diminuição de 58,6% e 33,0% na viabilidade celular em comparação aos controles após 24h de exposição ao CuSO₄ na concentração de 600 μ M, respectivamente. Além disso, quando expostas ao cobre por 48h a 300 e 600 μ M, as linhagens C6 e U-87 MG apresentaram uma diminuição significativa na viabilidade celular em relação ao controle de 49,0% (300 μ M) e 67,9% (600 μ M), e 60,1% (300 μ M) e 64,5% (600 μ M).

A viabilidade celular também foi avaliada pela técnica do vermelho neutro (NR, do inglês *neutral red*), considerando que o autor Perez *et al.* (2017) observou que o cobre pode interagir com o produto formazan da redução do MTT que resultaria em viabilidade celular subestimada; já o ensaio do NR parece desprovido de efeitos de interferência por compostos de cobre. Por essa técnica, foi demonstrado que a viabilidade da linhagem C6 diminuiu significativamente em 600 μ M de cobre após exposição por 24h [$F_{(3,8)} = 129,4$ $p < 0,0001$] (Figura 4E), e já a partir de 300 μ M de cobre em 48h de exposição [$F_{(3,8)} = 327,5$ $p < 0,0001$] (Figura 4G). Por outro lado, na linhagem U-87 MG foi observado que a viabilidade não foi afetada após o tratamento com CuSO₄ [$F_{(3,8)} = 3,960$ $p = 0,0531$] (Figura 4F), a não ser em 600 μ M e somente após 48h de exposição [$F_{(3,8)} = 38,07$ $p < 0,0001$] (figura 4H). Após 24h de exposição a 600 μ M de CuSO₄ houve uma diminuição de 53,4% na viabilidade celular em comparação ao controle na linhagem C6. Quando as células foram expostas ao cobre por 48h, na linhagem C6 foi observado uma redução na viabilidade celular de 76,2% (em 300 μ M de CuSO₄), e 83,7% (em 600 μ M de CuSO₄) em relação aos controles. Já na linhagem U-87 MG houve uma diminuição de 37,9% na viabilidade celular somente na exposição de 600 μ M de CuSO₄. Desta forma, foi possível observar que a linhagem C6 apresenta maior susceptibilidade frente a toxicidade do cobre, principalmente evidenciada pela técnica do NR.

Figura 4 — Viabilidade de células das linhagens C6 e U-87 MG pelas técnicas do MTT e do vermelho neutro (NR) após 24h e 48h de exposição ao CuSO_4



Efeito *in vitro* do CuSO_4 após 24 e 48h de exposição sobre a viabilidade de células C6 (astroglioma de rato) e U-87 MG (astroglioma humano) (A-D: redução do MTT; E-H: absorção do corante vermelho neutro). As barras indicam a média \pm erro padrão da média (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnet). A diferença estatística foi simbolizada por *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$) em comparação ao grupo controle.

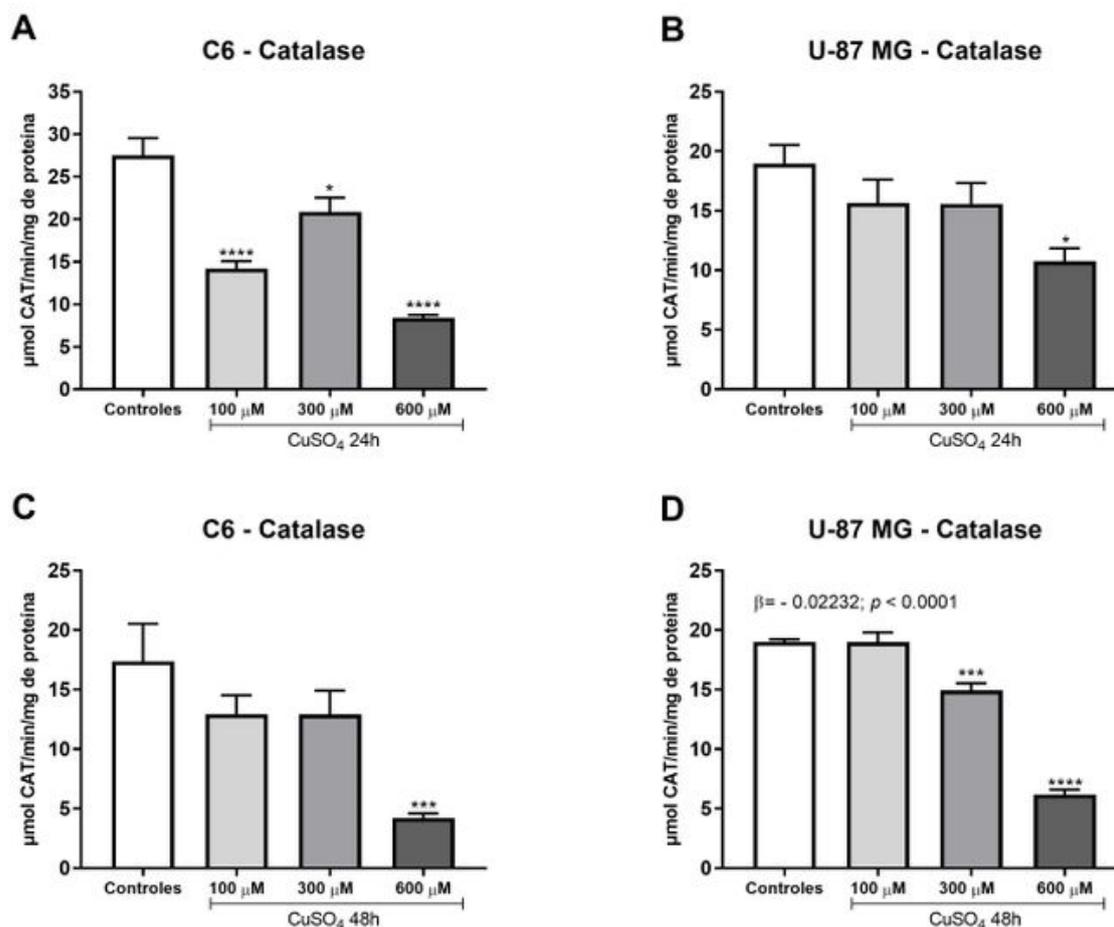
4.2 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

As atividades das principais enzimas antioxidantes, que formam a primeira linha de defesa contra ERO e estresse oxidativo, foram determinadas em células C6 (astroglioma de rato) e U-87 MG (astroglioma humano). As atividades de todas as quatro enzimas analisadas (GPx, GR, SOD e CAT) diminuem com o aumento das concentrações de CuSO_4 e tempo de exposição, principalmente nas células C6, indicando mais uma vez uma susceptibilidade maior dessa linhagem frente à toxicidade do cobre.

4.2.1 Catalase

Em nosso estudo, a exposição ao cobre promoveu uma diminuição significativa na atividade da CAT na linhagem celular C6 em todas as concentrações de cobre em 24h [$F_{(3, 12)} = 34,69$ $p < 0,0001$] e uma diminuição em 600 μM de CuSO_4 na exposição por 48h [$F_{(3, 16)} = 7,278$ $p < 0,05$] (Figura 5A e 5B). Na linhagem U-87 MG observou-se em 24h uma diminuição na atividade da enzima em 600 μM de CuSO_4 [$F_{(3, 12)} = 4,281$ $p < 0,05$] (Figura 5B), e em 48h essa diminuição pode ser vista já a partir de 300 μM do toxicante [$F_{(3, 12)} = 115,3$ $p < 0,0001$] (Figura 5D). Ainda, observou-se que este efeito foi dose dependente [$\beta = -0,02232$; $p < 0,001$].

Figura 5 — Atividade da catalase em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO_4



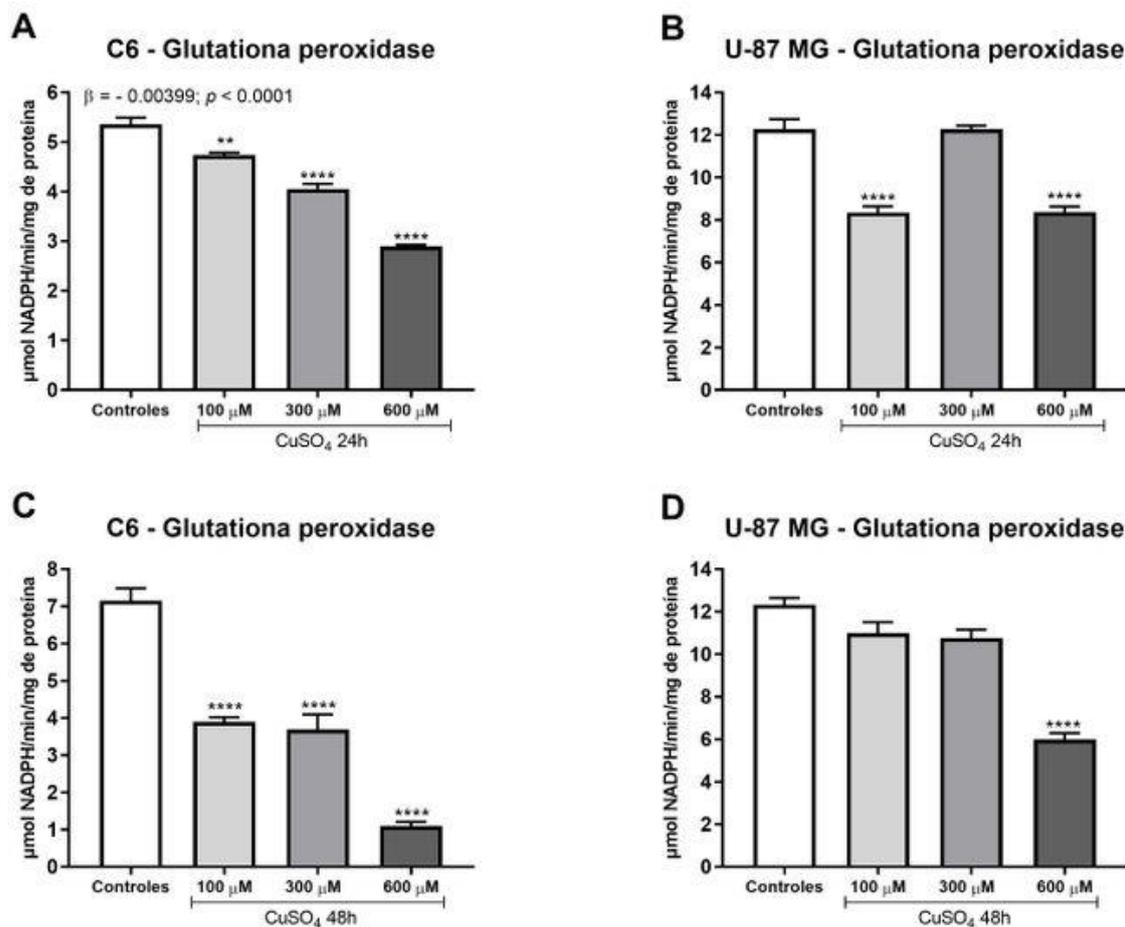
Atividade da enzima catalase em células C6 (astroglioma de rato) e U-87 MG (astroglioma humano). As barras indicam a média \pm erro padrão da média (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnet). A diferença estatística foi simbolizada por *($p < 0,05$), ***($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$) em comparação ao grupo controle.

4.2.2 Glutathiona peroxidase

Observou-se uma redução na atividade da enzima glutathiona peroxidase na linhagem C6 em 24h e 48h, já a partir de $100\mu\text{M}$ de CuSO_4 [24h: $F_{(3, 11)} = 109,4$ $p < 0,0001$; 48h: $F_{(3, 12)} = 82,86$ $p < 0,0001$] (Figura 6A e 6C), sendo que a redução observada em 24h apresentou-se dose dependente [$\beta = - 0.00399$; $p < 0.0001$]. Na linhagem U-87 MG houve uma diminuição na atividade dessa enzima em $100\mu\text{M}$ e $600\mu\text{M}$ de CuSO_4 após exposição por 24h [$F_{(3, 12)} = 51,59$ $p < 0,0001$] (Figura 6B). Por outro lado, após 48h de exposição verificou-se uma diminuição na

atividade da GPx somente em 600 μ M quando comparado ao grupo controle [$F_{(3, 14)} = 47,86$ $p < 0,0001$] (Figura 6D).

Figura 6 — Atividade da glutatona peroxidase em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO₄



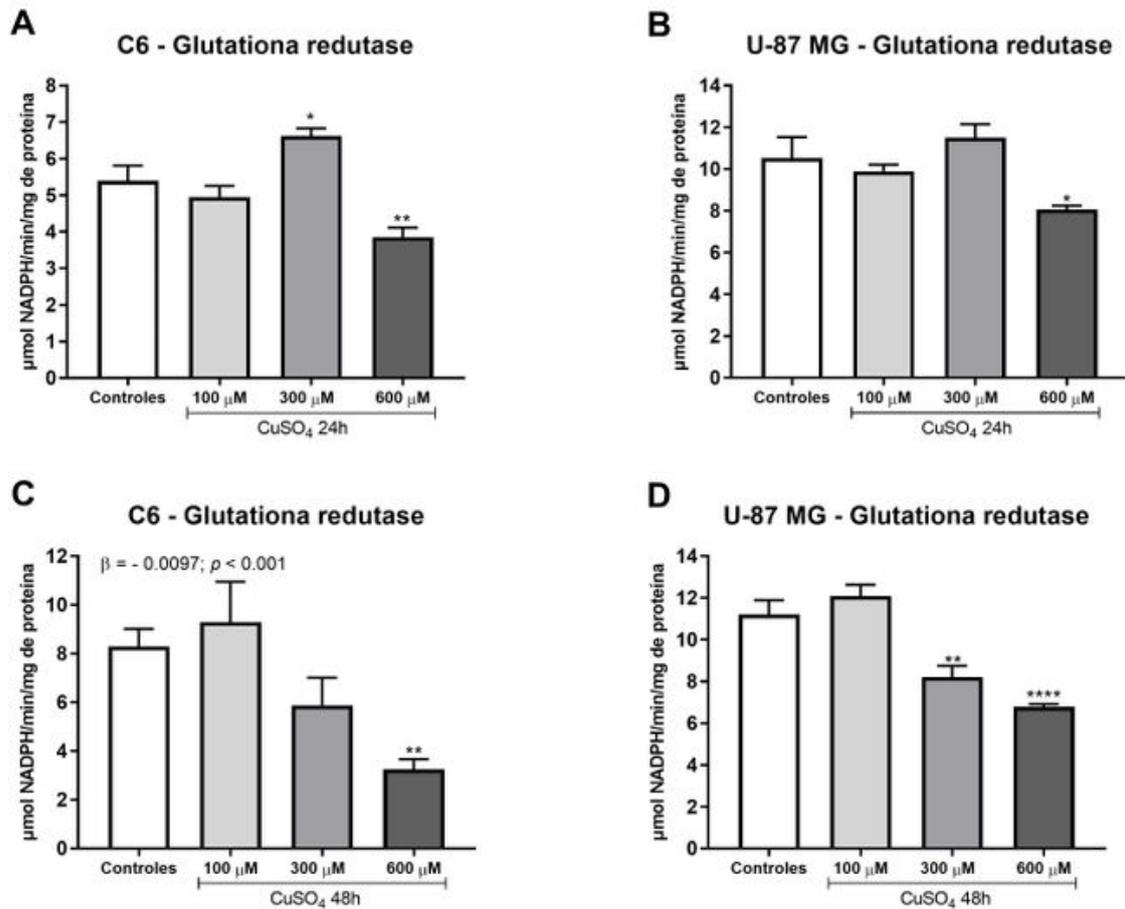
Atividade da enzima glutatona peroxidase em células C6 (astroglioma de rato) e U-87 MG (astroglioma humano). As barras indicam a média \pm erro padrão da média (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnet). A diferença estatística foi simbolizada por *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$) em comparação ao grupo controle.

4.2.3 Glutaciona redutase

Na Figura 7 pode-se observar que a atividade da glutatona redutase (GR) na linhagem C6 apresentou uma redução em 24h e 48h em 600 μ M de CuSO₄ [24h: $F_{(3, 14)} = 13,86$ $p < 0,001$; 48h: $F_{(3, 23)} = 6,435$ $p < 0,05$] (Figura 7A e 7C). Por outro lado, na exposição ao CuSO₄ durante 24h pode-se observar que houve um aumento significativo da atividade enzimática em 300 μ M

quando comparado ao grupo controle. Já na linhagem U-87 MG observamos uma diminuição da atividade da GR em 600 μ M de CuSO₄ em 24h [$F_{(3, 15)} = 6,827$ $p < 0,05$] (Figura 7B) e a partir de 300 μ M em 48h [$F_{(3, 16)} = 24,04$ $p < 0,0001$] (Figura 7D).

Figura 7 — Atividade da glutaciona redutase em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO₄



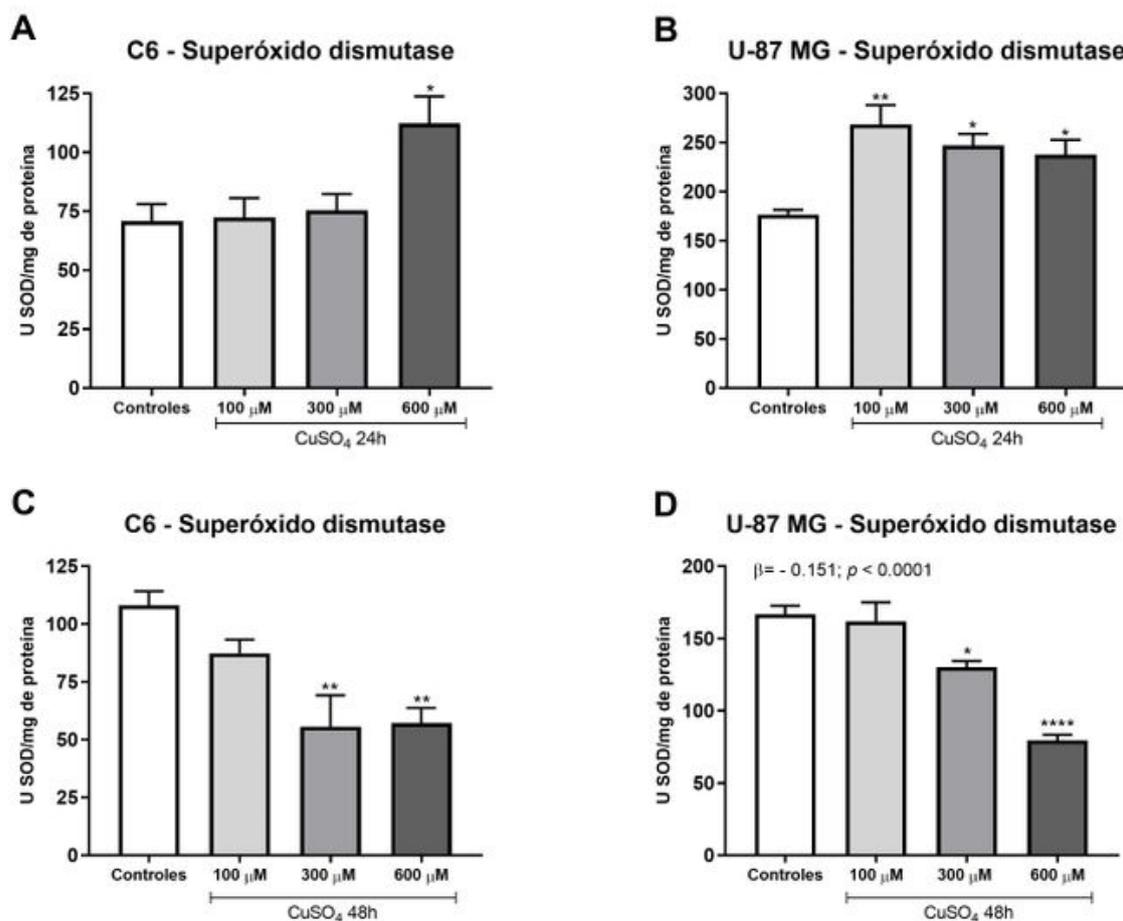
Atividade da enzima glutaciona redutase em células C6 (astroglioma de rato) e U-87 MG (astroglioma humano). As barras indicam a média \pm erro padrão da média (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnet). A diferença estatística foi simbolizada por *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), e ****($p < 0,0001$) em comparação ao grupo controle.

4.2.4 Superóxido dismutase

Na Figura 8 observamos que na linhagem C6 após 24h de exposição a 600 μ M de CuSO₄ houve um aumento da atividade da SOD [$F_{(3, 12)} = 5,183$ $p < 0,05$] (Figura 8A), mas verificou-se uma diminuição a partir de 300 μ M em 48h de exposição ao cobre [$F_{(3, 12)} = 8,578$ $p < 0,05$]

(Figura 8C). Na linhagem U-87 MG esse aumento da atividade da enzima acontece em 24h já a partir de 100 μ M de CuSO₄ [$F_{(3, 12)} = 7,926$ $p < 0,05$] (Figura 8B) e, semelhantemente ao que ocorreu na linhagem C6, em 48h observamos uma diminuição da atividade da SOD a partir de 300 μ M [$F_{(3, 12)} = 27,33$ $p < 0,0001$] (Figura 8D).

Figura 8 — Atividade da superóxido dismutase em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO₄



Atividade da enzima superóxido dismutase em células C6 (astroglioma de rato) e U-87 MG (astroglioma humano). As barras indicam a média \pm erro padrão da média (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnet). A diferença estatística foi simbolizada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo controle.

4.3 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO (PSH, NPSH E DHE)

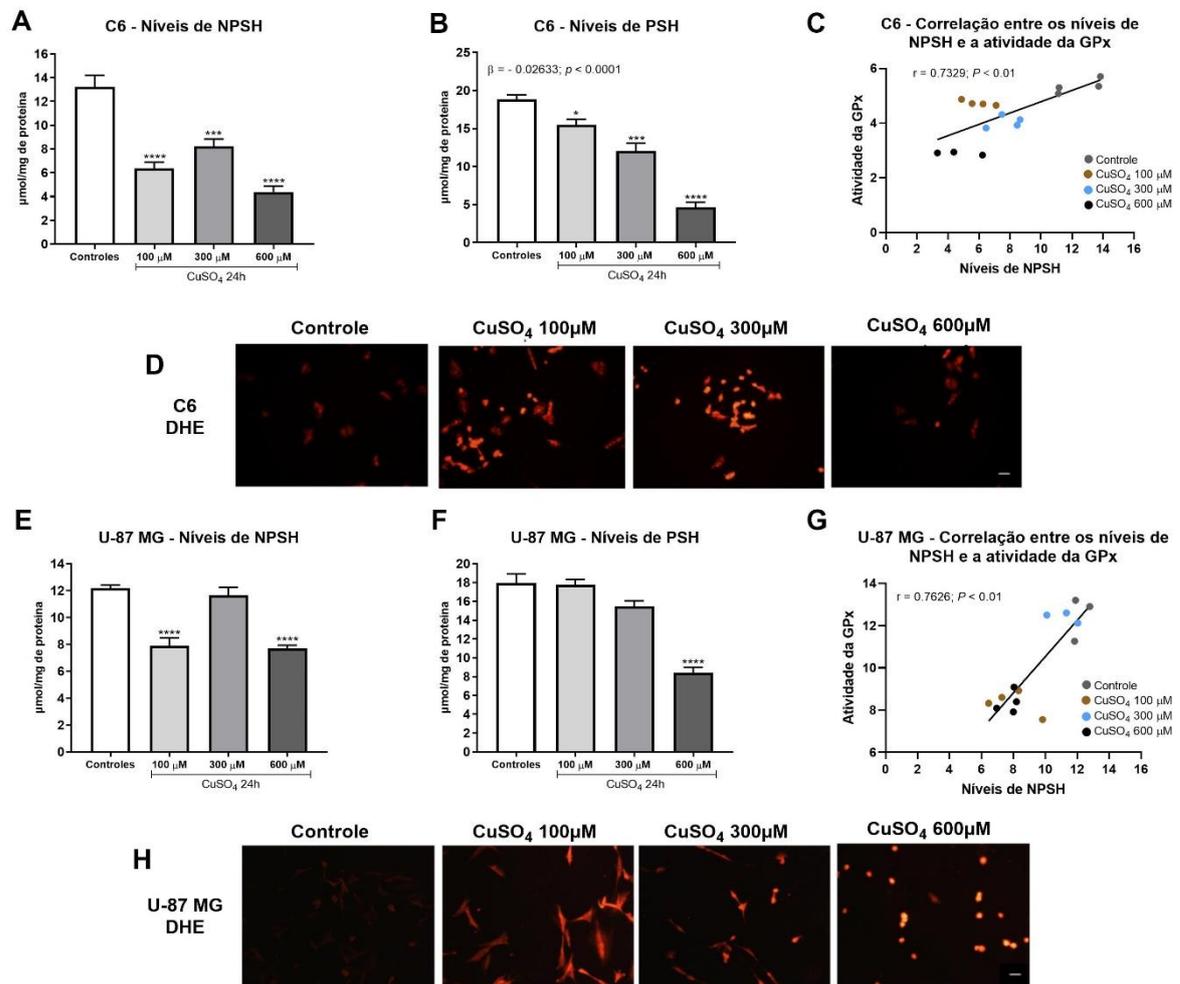
Os resultados aqui apresentados mostram o consumo dos tióis após 24h de exposição ao cobre, além da análise qualitativa da produção de superóxido. Na linhagem C6 verificou-se que

os níveis de PSH (tióis proteicos livres) e NPSH (tióis não proteicos) são menores que os do grupo controle em todas as concentrações de cobre utilizadas, sendo que a redução no PSH ocorreu de forma dose-dependente [NPSH: $F_{(3, 16)} = 31,13$ $p < 0,0001$; PSH: $F_{(3, 12)} = 63,77$ $p < 0,0001$; $\beta = -0,02633$; $p < 0,0001$] (Figura 9A e 9B). Já na linhagem U-87 MG observou-se uma redução significativa do NPSH na concentração de 100 μ M e 600 μ M do toxicante [$F_{(3, 14)} = 27,39$ $p < 0,0001$] (Figura 9F); enquanto que os níveis de PSH diminuem somente em 600 μ M de CuSO₄ [$F_{(3, 16)} = 40,68$ $p < 0,0001$] (Figura 9G).

Como descrito na Figura 6, foi observado a diminuição da atividade da GPx após exposição ao cobre, e essa enzima utiliza a GSH como cofator para seu funcionamento; sendo assim, foi realizada uma análise de correlação entre a atividade da GPx e os níveis de NPSH. Verificou-se que houve uma correlação entre a atividade da GPx e o NPSH nas linhagens U-87 MG ($r = 0,7626$; $p < 0,01$) e C6 ($r = 0,7329$; $p < 0,01$), onde observa-se que a diminuição da atividade da GPx está relacionada com a diminuição do NPSH (Figura 9C e 9G).

Quanto à análise qualitativa da produção de superóxido nas linhagens C6 e U-87 MG, as Figuras 9D e 9H mostram que as células tratadas com o cobre apresentaram maior intensidade de fluorescência para sonda DHE se comparado com o controle, em ambas as linhagens, indicando assim uma maior produção de superóxido frente a toxicidade do cobre.

Figura 9 — Análise de parâmetros de estresse oxidativo em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO_4

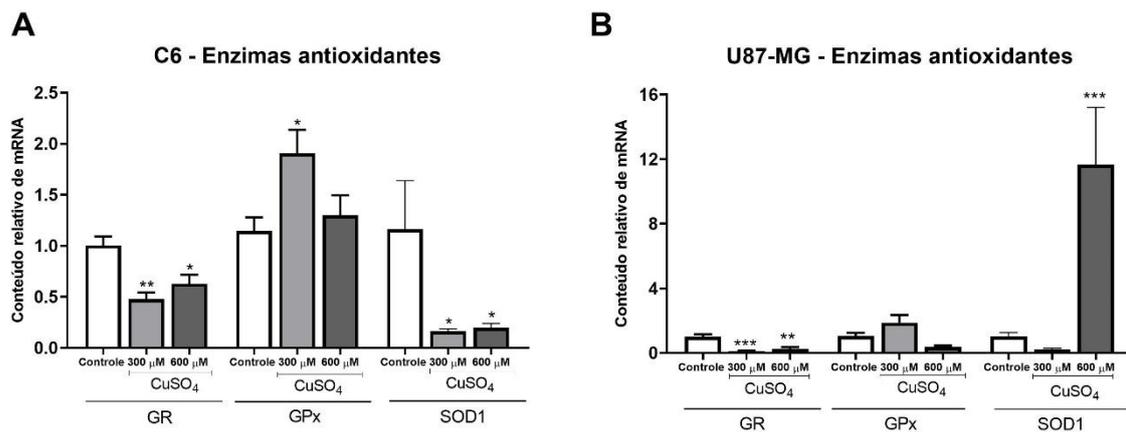


Níveis de tióis proteicos (PSH) (B e G) e não-proteicos (NPSH) (A e F) em células C6 (astroglioma de rato) e U-87 MG (astroglioma humano) expostas durante 24h ao CuSO_4 . Valores representados como a média \pm erro padrão da média (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnet, exceto para a análise estatística dos dados de PSH na linhagem C6, onde foi utilizado Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn). Foi utilizada a correlação de Pearson para verificar a correlação entre os níveis de NPSH e a atividade da GPx para a linhagem C6 (distribuição normal), e a de Spearman para analisar a correlação entre estas variáveis para a linhagem U-87 MG (distribuição não normal dos dados) (C e G, respectivamente). A diferença estatística foi simbolizada por *($p < 0,05$), ***($p < 0,001$) e *****($p < 0,0001$) em comparação ao grupo controle. D e H: Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência sobre a análise qualitativa da produção de superóxido usando a sonda DHE. A barra nas imagens representa 20 μM .

4.4 CONTEÚDO RELATIVO DE MRNA DE ENZIMAS RELACIONADAS AO SISTEMA ANTIOXIDANTE

A Figura 10 mostra a expressão dos genes que codificam para as proteínas antioxidantes GR, GPx e SOD1, após exposição das linhagens ao CuSO₄ durante 24h. Pode ser observado na Figura 10 que houve uma redução significativa no conteúdo de mRNA de GR em ambas as linhagens quando comparado com os controles [C6: $F_{(2, 8)} = 10,60$ $p < 0,01$; U-87 MG: $F_{(2, 8)} = 21,52$ $p < 0,001$]. Por outro lado, observa-se que houve um aumento significativo no conteúdo de mRNA de GPx na exposição a 300 μ M de CuSO₄ em células C6 [$F_{(2, 9)} = 4,482$ $p < 0,05$] que, na linhagem U-87 MG, não foi modificada pelos tratamentos. Na expressão de SOD1 houve uma redução no conteúdo de mRNA nos grupos tratados com o CuSO₄ na linhagem C6 [$F_{(2, 8)} = 6,133$ $p < 0,05$]; no entanto, na linhagem U-87 MG observa-se um aumento significativo no conteúdo de mRNA de SOD1 após exposição a 600 μ M de CuSO₄ [$F_{(2, 7)} = 26,82$ $p < 0,001$].

Figura 10 — Expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante em células das linhagens C6 e U-87 MG após 24h e 48h de exposição ao CuSO₄



Expressão de genes que codificam para as proteínas GR, GPx e SOD1 em células de astroglioma C6 (rato) e U-87 MG (humano) submetidos a toxicidade induzida pelo CuSO₄ após 24h de exposição. Os resultados foram normalizados mediante a quantificação da expressão do gene que codifica para ATP5B, e expressos em conteúdo relativo de mRNA. Valores representados como a média \pm erro padrão da média (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnet), *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$); comparado ao grupo controle.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos houve um aumento da expectativa de vida em grande parte dos países; porém, com as pessoas vivendo mais há também um elevado risco de desenvolver doenças neurodegenerativas. Para algumas dessas doenças, como as doenças de Parkinson e de Alzheimer, as causas e tratamentos não são totalmente conhecidas, mas para outras doenças relacionadas ao SNC, como a Doença de Wilson, há melhor compreensão de seus mecanismos e seus tratamentos (GITLER; DHILLON; SHORTER, 2017).

Os astrócitos estão entre os primeiros alvos de substâncias tóxicas como o Cu no sistema nervoso, já que participam da barreira hematoencefálica. Essas células são frequentemente usadas para determinar a citotoxicidade no SNC em condições *in vitro*. Como os astrócitos realizam a captação do cobre e o fornecem para as demais células do SNC, além de proteger os neurônios dos efeitos tóxicos deste elemento, estas células são continuamente expostas a ERO; desta forma, os astrócitos possuem um sistema de defesa antioxidante mais eficiente para combater a condição de estresse oxidativo, quando comparado a outras células do SNC. Além disso, essas células, em caso de excesso de cobre, fazem o armazenamento do metal em MT ou como complexo GSH, para prevenir a neurotoxicidade induzida por esse elemento (SCHEIBER; DRINGEN, 2013), representando assim, um bom modelo para investigar os efeitos tóxicos do cobre, pois as alterações induzidas pelo metal nos parâmetros/propriedades dos astrócitos servem como um bom indicador de dano oxidativo.

A relação do cobre com o surgimento e progressão das doenças que afetam o SNC vem sendo investigada nos últimos anos, seja por uma falta deste no organismo ou por seu excesso, pois seu papel no SNC ainda não é totalmente compreendido (BISAGLIA e BUBACCO, 2020). Estudos realizados até o presente revelam uma complexa rede de vias interligadas através das quais o cobre pode modular a sinalização através de múltiplos alvos, as quais são desconhecidas (ASHRAF *et al.*, 2019). Sendo assim, este estudo amplia o conhecimento sobre os efeitos do excesso de cobre no SNC, observado em duas linhagens de astroglioma utilizadas como modelos para verificar a toxicidade deste metal, fornecendo evidências de que alterações no sistema antioxidante e o estresse oxidativo estão envolvidos, mas que as respostas frente à toxicidade do cobre ocorrem de maneiras distintas entre as diferentes linhagens.

Assim como observado neste estudo, onde a diminuição da viabilidade celular foi mais evidente na linhagem de astroglioma de ratos do que na linhagem de glioblastoma humano, estudos com astrócitos primários de ratos revelaram alta toxicidade celular do Cu onde 100µM

de CuCl_2 reduziu a viabilidade celular em 40% após 24h de incubação (CHEN *et al.*, 2008). Já em outro estudo com a linhagem U-87 MG, efeitos tóxicos significativos de CuCl_2 puderam ser observados somente a partir de $250\mu\text{M}$ após 24h de incubação, onde a viabilidade celular foi reduzida em 40% (MERKER *et al.*, 2005). Assim, observa-se que existem diferenças espécie-específicas na toxicidade do Cu, e que linhagens de astrócitos humanos parecem ser muito menos sensíveis em comparação com os astrócitos de ratos. Desta forma, para melhor avaliar o potencial de toxicidade do Cu e o seu modo de ação é importante a utilização de diferentes modelos, para que estes possam ser caracterizados e comparados, verificando se os mecanismos de resposta frente à toxicidade do metal são similares entre as diferentes espécies ou mesmo entre diferentes células de um mesmo organismo.

Os diferentes mecanismos de resposta frente à toxicidade do Cu podem estar relacionados com diferenças relacionadas ao sistema antioxidante, visto que para combater o estresse oxidativo as células possuem antioxidantes não-enzimáticos e enzimas antioxidantes. Neste sentido, a GSH é o antioxidante não enzimático, contendo tiol, mais abundante presente nas células que mantém o ambiente redutor na célula (FORMAN *et al.*, 2009). Além de seu papel de protetor do estresse oxidativo, GSH pode quelar metais, como Cu e Zn, e a rápida formação de complexos intracelulares estáveis de cobre-GSH foi relatada para prevenir a toxicidade induzida pelo cobre, principalmente devido a formação de ERO pela reação de Fenton e Haber-Weiss, ou mesmo evitando a interação do metal com proteínas que contenham histidina e cisteína, aminoácidos que possuem alta afinidade com o cobre, sendo que a ligação do metal com estes aminoácidos pode alterar o funcionamento dessas enzimas (FREEDMAN *et al.*, 1989; SCHEIBER; DRINGEN, 2011). Além de observarmos uma diminuição do NPSH (os quais 90% são representados pela GSH), observou-se uma diminuição dos níveis de PSH, o que indica que o metal, além de ligar-se com GSH, pode interagir com os grupos tíóis presentes nas proteínas, ou que as ERO geradas a partir da reação de Fenton e Haber-Weiss reagem com estes grupos -SH, podendo afetar a atividade enzimática destas proteínas. Apesar da formação do complexo GSH-cobre prevenir a reatividade do cobre livre, foi demonstrado que em situações de estresse oxidativo e toxicidade associada à exposição de células a altas concentrações de cobre, que o complexo cobre-GSH é capaz de reagir continuamente com o oxigênio molecular para produzir superóxido; além disso, essa característica explica a capacidade do Cu-GSH de reduzir Fe^{3+} e estimular a liberação de Fe^{2+} da ferritina, promovendo a produção catalisada por ferro de radicais hidroxila pela reação de Fenton (ALIAGA *et al.*, 2011; SCHEIBER; MERCER; DRINGEN, 2014).

Como comentado acima, o excesso de CuSO_4 , ou o excesso de ERO causado pela exposição ao metal, levou à uma diminuição dos níveis de GSH (NPSH), e é altamente provável que isto tenha ocorrido devido à formação do complexo cobre-GSH, pois a rápida formação destes complexos intracelulares estáveis foi relatada para prevenir a toxicidade induzida por esse metal (FREEDMAN; CIRIOLO; PEISACH, 1989). Em astrócitos primários de ratos, autores demonstraram que há um aumento dos níveis de GSH quando estas células foram expostas ao CuCl_2 por 24h, onde na concentração de $30\mu\text{M}$ do toxicante os níveis totais de GSH aumentaram em 60%, o que provavelmente ajudaria a neutralizar os efeitos tóxicos deste metal (SCHEIBER; DRINGEN, 2011). Apoiando a suposição de que uma estratégia de defesa celular seria aumentar a capacidade de ligação ao cobre com a GSH e que há diferenças nestes mecanismos de resposta entre as espécies, estudos revelaram que a linhagem celular de astrocitoma humano (1321 N1) é capaz de manter os níveis de GSH extracelular na presença de $2,5\mu\text{M}$ do metal, enquanto em culturas primárias de astrócitos de ratos esse limite é alcançado com $0,25\mu\text{M}$ de cobre; portanto, a linhagem de astrocitoma humano parece ser menos suscetível à toxicidade do Cu (POPE; MILTON; HEALES, 2008). Dessa forma, ao comparar os dados da literatura de estudos de toxicidade em células de linhagens de rato e de humanos, e de linhagens de astroglioma dessas espécies aqui estudados, essa suposição pode ser confirmada.

A diminuição da GSH ocasionado pelo excesso de cobre resulta em uma falta de proteção das células ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre uma maior geração de ERO e diminuição do sistema de defesa antioxidante. Como a exposição ao CuSO_4 causou alterações nos marcadores de estresse oxidativo (NPSH e PSH), foi realizado o ensaio do DHE para detectar a geração do superóxido, assim caracterizando o dano oxidativo nas células. Neste sentido, além de diminuir o conteúdo de GSH, a exposição ao CuSO_4 resultou em aumento na geração de superóxido, mostrando que esse metal causa danos oxidativo nas linhagens de astroglioma de ratos e humanos. Estudos em astroglioma humanos (U373 MG) mostraram níveis aumentados de hidróperóxidos quando essas células eram expostas a níveis excessivos de Cu. Além disso, o pré-tratamento com antioxidantes foi capaz de prevenir a morte celular nessa linhagem exposta ao CuSO_4 ($10\mu\text{M}$), mostrando que o cobre exerce seus efeitos tóxicos nestas células devido ao aumento da geração de ERO (REDDY; RAO; NORENBURG, 2008). Ainda, ressalta-se que o aumento de superóxido pode oxidar antioxidantes como o próprio GSH, α -tocoferol e ascorbato (ISCHIROPOULOS; AL-

MEHDI, 1995), e este processo reduzirá ainda mais os níveis de GSH e outros antioxidantes presentes nas células.

Para elucidar as razões para a variação das respostas das linhagens quando expostas ao excesso de Cu, a atividade de enzimas antioxidantes e os níveis de mRNA de genes relacionados a estas enzimas foram determinados. De forma geral, verificou-se que a atividade das principais enzimas antioxidantes apresentou diminuição nas duas linhagens de astroglioma expostas ao excesso de CuSO₄. Neste sentido, as ERO e ERN são conhecidas por inativar a catalase (PIGEOLET *et al.* 1990; ESCOBAR *et al.* 1996), podendo reagir diretamente com íons de ferro ligados a esta enzima, levando a redução de sua atividade; assim como o excesso de cobre pode diminuir o conteúdo de ferro intracelular através da competição com o transportador DMT1, diminuindo o conteúdo deste cofator e conseqüentemente a atividade enzimática da CAT (ESCOBAR *et al.* 1996). Além disso, a GPx utiliza como cofator o GSH e, devido à provável formação do complexo Cu-GSH, a redução nos níveis deste tripeptídeo podem também afetar a sua atividade enzimática.

O cobre também pode reagir diretamente com os aminoácidos cisteína e histidina presente nas proteínas, e a ligação a esses aminoácidos pode ter como consequência a perda da atividade enzimática, como relatado anteriormente; além da inibição da atividade enzimática ser causada pela oxidação de grupos -SH por ERO geradas a partir das reações de Fenton e Haber-Weiss (BRYCE; GURD, 1966; BERGER *et al.*, 1999). Neste sentido, as diferentes isoformas de GPx possuem cisteína ou selenocisteína em seu sítio ativo, as quais são essenciais para a sua atividade enzimática (SUZUKI; KARASAWA; YAMANAKA, 1989). Desta forma, a interação do cobre com estes aminoácidos, ou a oxidação destes pelo excesso de ERO pode levar a um prejuízo na atividade da GPx. Ainda, embora a histidina (His) não esteja diretamente envolvida no sítio ativo da glutathione peroxidase, resíduos de histidina podem estar presentes em outras regiões da proteína e desempenhar outros papéis estruturais ou de estabilização (KOH *et al.*, 2007). Além disso, a cisteína também está presente no sítio ativo da glutathione reductase, estando também envolvida na sua atividade catalítica (MITTL; SCHULZ, 1994); assim, a diminuição da atividade dessa enzima observada após a exposição ao CuSO₄ pode ser resultante da interação do metal com o seu sítio ativo. A enzima SOD1 (que contém como cofatores cobre e zinco) também possui um resíduo de histidina e um resíduo de cisteína no sítio ativo (LAMB *et al.*, 1999; HALL *et al.*, 2000), já a SOD2 (superóxido dismutase de manganês) possui em seu sítio ativo três histidinas (BORGSTAHL *et al.*, 1992).

Ainda, as enzimas antioxidantes que utilizam de NADPH para seu funcionamento também podem ser afetadas pela diminuição da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que participa da geração do NADPH (TIAN *et al.*, 1998; HO *et al.*, 2007). Como observado em resultados *in vitro* realizado em eritrócitos de rato, íons de cobre têm um efeito inibitório na via das pentoses fosfato e, conseqüentemente, nas enzimas do sistema antioxidante que dependem de NADPH (BAYRAMOGLU *et al.*, 2021). Cabe ressaltar que a catalase contém quatro moléculas de NADPH ligados a enzima, os quais são necessários para sua atividade biológica (KIRKMAN *et al.*, 1999). Assim, níveis mais baixos de NADPH também reduzem a atividade dessa enzima. A glutatona redutase é outra enzima que utiliza NADPH, para regenerar o GSH (a partir de GSSG), mantendo-o na forma reduzida. A inibição da atividade da G6PD, por exemplo, reduzirá o conteúdo de NADPH da célula e, conseqüentemente, a atividade da glutatona redutase diminui. Além dos fatores citados acima que podem contribuir para a diminuição na atividade das enzimas do sistema antioxidante observadas no presente trabalho, verificou-se a redução da expressão da GR na concentração de 300 e 600 μ M de CuSO₄ em ambas as linhagens.

Por outro lado, verificou-se que a exposição a 300 μ M de CuSO₄ resultou em um aumento da expressão da GPx na linhagem C6. No entanto, este aumento do conteúdo de mRNA não refletiu em um aumento da atividade da GPx nesta linhagem, provavelmente devido ao fato da enzima utilizar como cofator o GSH que, como comentado anteriormente, está diminuído em condições de excesso do metal. Ainda, observou-se que houve um aumento na atividade da SOD em ambas as linhagens, sendo este resultado mais evidente principalmente na linhagem de astroglioma humano, bem como verificou-se que há uma maior expressão da SOD1 na linhagem U-87 MG. Neste sentido, estudos em cérebro de peixes (carpas Jian) expostos a 0,60 mg Cu/L mostrou que após a exposição ao toxicante houve um aumento nos níveis de mRNA de GPx1 e SOD1, sugerindo um mecanismo adaptativo contra o estresse. Além disso, os autores verificaram que a exposição ao cobre aumentou o acúmulo nuclear de Nrf2, corroborando o aumento dos níveis de mRNA desta enzima (JIANG *et al.*, 2014).

Inúmeros fatores de transcrição regulam a expressão de SOD, principalmente aquelas sensíveis ao estresse oxidativo, como a proteína AP-1 e o NF- κ B, que estão entre os componentes importantes da resposta celular em situação de estresse oxidativo, além de participarem nas questões de sobrevivência ou morte celular em caso de elevados níveis de radicais livres (KARIN, 1999; SHAULIAN e KARIN, 2002; BUBICI *et al.*, 2006). Neste sentido, o aumento observado na atividade da SOD pode ser uma readaptação do metabolismo

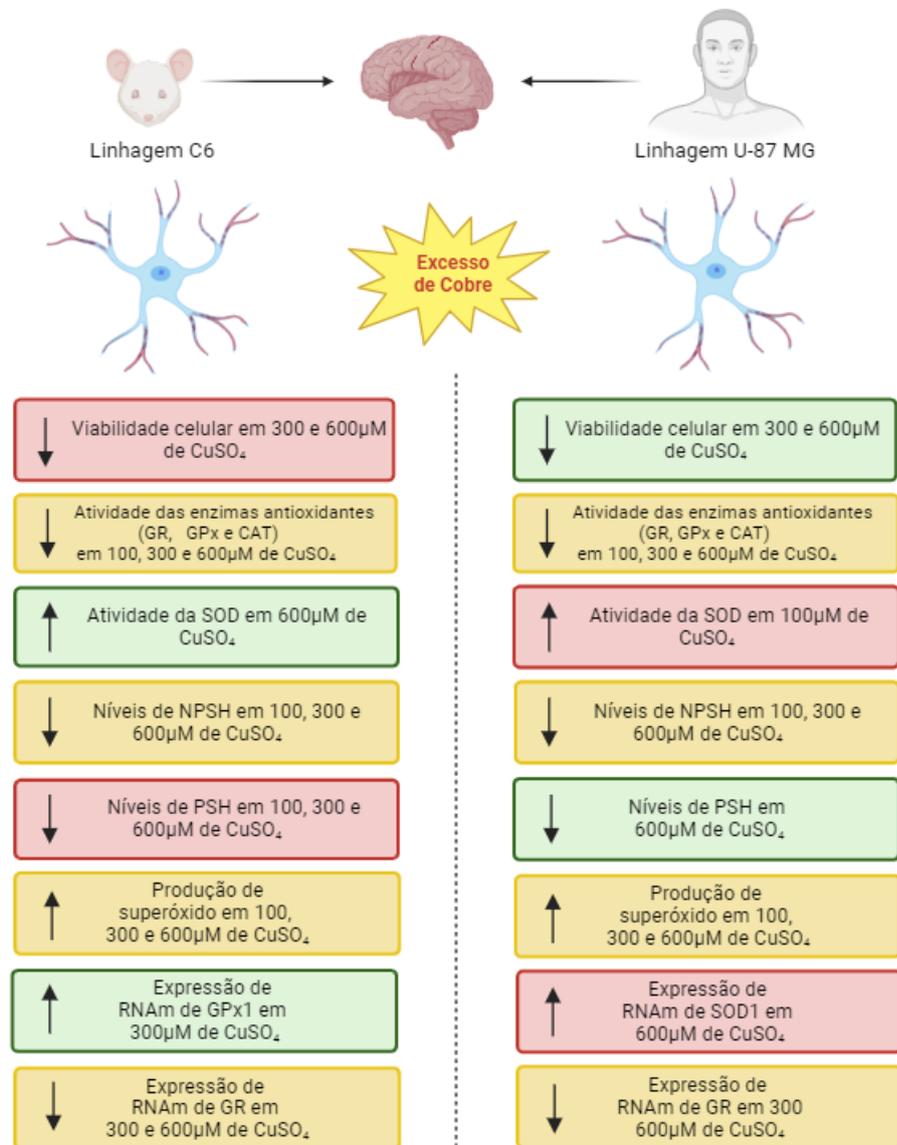
frente ao aumento da geração de superóxido, sendo que na linhagem U-87 MG o aumento da atividade e expressão dessa enzima foi observado em concentrações mais baixas de CuSO_4 que na linhagem C6. Apesar de um aumento na atividade da SOD ter sido observada após exposição durante 24h a $600\mu\text{M}$ de CuSO_4 na linhagem C6, verificou-se uma diminuição na expressão dessa enzima em relação ao controle. Esses resultados podem refletir em uma resposta mais eficiente na linhagem de astroglioma humano frente à toxicidade do cobre, quando comparada a linhagem C6. Porém, não se pode descartar que o aumento da atividade da SOD possa estar relacionado também há um aumento da expressão da SOD2, a qual não foi determinada neste estudo, principalmente na linhagem C6.

Os resultados apresentados nesta dissertação indicam que altos níveis de Cu causam uma diminuição nas atividades de enzimas antioxidantes e nos níveis de grupos tióis principalmente na linhagem mais suscetível ao cobre, podendo estar associado ao estresse oxidativo ou a uma interação direta entre Cu e as enzimas em seu sítio ativo. Assim, conclui-se que existem diferenças espécie-específicas para a toxicidade do Cu, provavelmente devido a diferentes mecanismos de resposta ao estresse oxidativo, apesar de não podermos descartar diferenças nos mecanismos de absorção de cobre pelas células, sendo que a linhagem derivada de humanos parece ser menos sensível ao excesso do metal em comparação com a linhagem proveniente de ratos.

6 CONCLUSÕES

- A viabilidade celular foi diminuída após exposição por 24h e 48h ao CuSO_4 nas linhagens C6 e U-87 MG, sendo que as células U-87 MG mostraram-se mais resistentes que as células C6;
- O CuSO_4 após exposição por 24h e 48h provoca maior produção de superóxido, levando ao estresse oxidativo, que pode estar relacionado a alteração na atividade de enzimas antioxidantes principalmente na linhagem C6 (inibição das atividades da GPx, GR e CAT, e aumento da SOD), podendo levar a um aumento do dano oxidativo ao DNA, além de levar à neurodegeneração;
- Os níveis de NPSH foram diminuídos após exposição por 24h ao toxicante, sendo que esse teor diminuído está relacionado à ligação do complexo cobre-GSH ou ao excesso de ERO gerado pela reação de Fenton e Haber-Weiss; além disso, verificou-se uma diminuição dos níveis de PSH, que ocorreu em concentrações menores de CuSO_4 na linhagem C6 quando comparada à U-87 MG;
- A expressão das enzimas antioxidantes foi alterada de diferentes maneiras entre as linhagens estudadas após exposição por 24h ao CuSO_4 : na linhagem C6 houve um aumento na expressão de GPx, enquanto na linhagem U-87 MG o aumento foi visto na expressão de SOD1.

Figura 11 — Principais alterações observadas em parâmetros de estresse oxidativo após a exposição ao excesso de cobre e a sua relação com diferentes espécies



A potencial via de ação do dano oxidativo induzido por CuSO₄ e alteração do sistema antioxidante, sendo a coloração vermelha representativa de um resultado mais acentuado que a coloração verde e a coloração amarela representando igualdade nos resultados em ambas as linhagens de astroglioma (C6 e U-87 MG). Fonte: Figura produzida com o auxílio do software Biorender (O autor, 2023).

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, K.M. *et al.* Copper promotes the trafficking of the amyloid precursor protein. **J. Biol. Chem**, v. 286, p. 8252-8262, 2011.

AEBI H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-6, 1984.

ALIAGA, M.E. *et al.* Superoxide-dependent reduction of free Fe³⁺ and release of Fe²⁺ from ferritin by the physiologically-occurring Cu(I)-glutathione complex. **Bioorg. Med. Chem**, v. 19, p. 534-541, 2011.

ALTARELLI, M. *et al.* Copper Deficiency: Causes, Manifestations, and Treatment. and participation of cysteine *in vivo* and *in vitro*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 273, p. 572-577, 1989.

ANTONUCCI, L. *et al.* Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Nutritional Implications: Special Focus on Copper. **Nutrients**, v. 9, p. 1137, 2017.

ARCIELLO, M.; ROTILIO, G.; ROSSI, L. Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 327, p. 454-459, 2005.

ASHRAF, A. *et al.* Regional Distributions of Iron, Copper and Zinc and Their Relationships With Glia in a Normal Aging Mouse Model. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, p. 1–15, 2019.

ATWOOD C.S. *et al.* Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta. **Biochemistry**, v. 43, p. 560-568, 2004.

BARAN, E.J. Trace elements supplementation: recent advances and perspectives. **Mini Rev Med Chem**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2004.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BAYRAMOGLU A. M. *et al.* Ameliorative effects of astaxanthin against copper(II) ion-induced alteration of pentose phosphate pathway and antioxidant system enzymes in rats. **Environ Sci Pollut Res**, v. 28, p. 62919–62926, 2021.

BERGER, P. *et al.* Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. **Wat. Res**, v. 33, n. 2, p. 433 – 441, 1999.

BERTRAND, E. *et al.* Neuropathological analysis of pathological forms of astroglia in Wilson's disease. **Folia Neuropathol**, v. 39, p. 73–79, 2001.

BEYER, R. E. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 70, n. 6, p. 390-403, 1992.

BIELLI P, CALABRESE L. Structure and function relationships in ceruloplasmin: a 'moonlighting' protein. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, p. 1413–1427, 2002.

- BINOLFI, A. *et al.* Interaction of α -synuclein with divalent metal ions reveals key differences: A link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 30, p. 9893–9901, 2006.
- BIRKAYA, B.; ALETTA, J.M. NGF promotes copper accumulation required for optimum neurite outgrowth and protein methylation. *J. Neurobiol*, v. 63, p. 49–61, 2005.
- BISAGLIA, M.; BUBACCO, L. Copper ions and Parkinson's disease: Why is homeostasis so relevant?. *Biomolecules*, v. 10, n. 2, 2020.
- BLANKE, M.L.; VANDONGEN, A.M.J. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. *In Biology of the NMDA Receptor*, v. 13, 2009.
- BORGSTAHL G. E. O. *et al.* The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell*, v. 71, p. 107-118, 1992.
- BOST, M. *et al.* Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved ion complexes of L-histidine-containing peptides. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 35, p. 107–115, 2016.
- BOUSQUET-MOORE, D.; MAINS, R. E.; EIPPER, B. A. Peptidylglycine α -amidating monooxygenase and copper: A gene-nutrient interaction critical to nervous system function. *Journal of Neuroscience Research*, v. 88, n. 12, p. 2535–2545, 2010.
- BOYD, S.D. *et al.* Copper sources for Sod1 activation. *Antioxidants*, v. 9, p. 500, 2020.
- BRISCHIGLIARO, M; ZEVIANI, M. Cytochrome c oxidase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 148335, 2020.
- BRYCE, G.F.; GURD, F.R. Visible spectra and optical rotatory properties of cupric ion complexes of L-histidine-containing peptides. *The Journal of biological chemistry*, v. 241, p. 122-129, 1996.
- BUBICI, C.; PAPA, S.; PHAM, C. G.; ZAZZERONI, F.; FRANZOSO, G. The NF κ B-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histology and Histopathology*, v. 21, p. 69–80, 2006.
- BUCOSSI, S. *et al.* Copper in Alzheimer's disease: a meta-analysis of serum, plasma, and cerebrospinal fluid studies. *J. Alzheimers Dis*, v. 24, p. 175–185, 2011.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, v. 113, p. 484-490, 1985.
- CATER, M. A. *et al.*, ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: Insight into biliary copper excretion. *Gastroenterology*, v. 130, n. 2, p. 493–506, 2006.
- CECCONI, I. *et al.* Oxidative modification of aldose reductase by copper ion: definition of the metal-protein interaction mechanism. *J. Biol. Chem*, v. 277, p. 42017-42027, 2002.

CHANG, C.J. Searching for harmony in transition-metal signaling. **Nat. Chem. Biol**, v. 11, p. 744–747, 2015.

CHAO, M.V. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. **Nat. Rev. Neurosci**, v. 4, p. 299–309, 2003.

CHEIGNON, C. *et al.* Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. **Redox Biol**, v. 14, p. 450–464, 2018. KITAZAWA, M.; HSU, H. W.; MEDEIROS, R. Copper exposure perturbs brain inflammatory responses and impairs clearance of amyloid-beta. **Toxicol. Sci**, v. 152, p. 194–204, 2016.

CHEN, S.H. *et al.* Apoptosis of cultured astrocytes induced by the copper and neocuproine complex through oxidative stress and JNK activation. **Toxicol. Sci**, v. 102, n. 1, p. 138-149, 2008.

CLAUS, H; DECKER, H. Bacterial tyrosinases. **Syst. Appl. Microbiol**, v. 29, p. 3, 2006.

COBINE, P. A.; MOORE, S. A.; LEARY, S. C. Getting out what you put in: Copper in mitochondria and its impacts on human disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research**, v. 1868, p. 118867, 2021.

COOPER, A.J.; KRISTAL, B.S. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. **Biol Chem**, v. 378, p. 793-802, 1997.

CREVELINE C.R. *et al.* Substrate and Inhibitors of dopamine- β -hydroxylase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 64 p. 125–134, 1962.

CSISZAR K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 70, p. 1-32, 2001.

CZŁONKOWSKA, A. *et al.* Wilson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, 2018.

D'AMBROSI, N.; ROSSI, L. Copper at synapse: Release, binding and modulation of neurotransmission. **Neurochemistry international**, v. 90, p. 36-45, 2015.

DANCIS, A. *et al.* Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 3869–3873, 1992.

DEL POZO, T. *et al.* Identification of reference genes for quantitative real-time PCR studies in human cell lines under copper and zinc exposure. **Biomaterials**, v. 295, p. 935-44, 2016.

DEXTER, D. T. *et al.* Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. **Brain** v. 114, p. 1953–1975, 1991.

DIAS, C. A. G. M. *et al.* Luz, melatonina e estresse oxidativo na piscicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 3, p. 169-176, 2013.

- DÍAZ, T. *et al.* Metabolismo do cobre na nutrição animal: Revisão. **PubVet**, v. 9, n. 6, 279–286, 2015.
- DOGUER, C.; HA, J. H.; COLLINS, J. F. Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 4, p. 1433–1461, 2018.
- DOS SANTOS, A. Q. *et al.* Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Arch Biochem Biophys**, n. 453, p. 161-167, 2006.
- DRINGEN R., SCHEIBER I., MERCER J. Copper metabolism of astrocytes. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 5, p. 1663-4365, 2013.
- DRINGEN, R. *et al.* The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 11, p. 1884–1890, 2007.
- EIPPER B.A.; STOFFERS D.A.; MAINS R.E. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. **Annu. Rev. Neurosci**, v. 15, p. 57–85, 1992.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, p. 70-77, 1959.
- ESCOBAR, J.A.; RUBIO, M.A.; LISSI, E.A. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. **Free Rad. Biol. Med**, v. 20, p. 285–290, 1996.
- ESKICI, G. AXELSEN, P. H. Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry**, v. 51, p. 6289–6311 2012.
- FAN, T.S.; LIU, S.; C.H.; WU, R.M. Alpha-Synuclein and Cognitive Decline in Parkinson Disease. **Life**, v. 11, n. 11, p. 1239, 2021.
- FERRETTI, G. *et al.* Copper-induced oxidative damage on astrocytes: protective effect exerted by human high density lipoproteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1635, n. 1, p. 48-54, 2003.
- FETHEROLF, M. *et al.* Oxygen-dependent activation of Cu,Zn-superoxide dismutase-1. **Metallomics**, v. 9, n. 8, p. 1047–1059, 2017.
- FORMAN H.J.; ZHANG H; RINNA A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Mol Aspects Med**, v. 30, p. 1-12, 2009.
- FOX, J. H. *et al.* Mechanisms of copper ion mediated Huntington's disease progression. **Plos One**, v. 2, p. 334, 2007.
- FREEDMAN, J.H.; CIRIOLO, M.R.; PEISACH, J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. **J. Biol. Chem**, v. 264, p. 5598-5605, 1989.
- FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. **J. Biol. Chem**, v. 272, n. 30, p. 18515-18517, 1997.
- GAIER E. D; EIPPER B. A; MAINS R.E. Copper signaling in the mammalian nervous system: synaptic effects. **J Neurosci Res**, v. 91, n. 1, p. 2-19, 2013.

- GAO, Y. *et al.* Heme-copper terminal oxidase using both cytochrome c and ubiquinol as electron donors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 9, p. 3275–3280, 2012.
- GEORGATSOU, E. *et al.* The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 13786–13792, 1997.
- GITLER, A. D.; DHILLON, P.; SHORTER, J. Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 10, n. 5, p. 499–502, 2017.
- GOTO, N. *et al.* Hydrogen sulfide increases copper-dependent neurotoxicity via intracellular copper accumulation. **Metallomics**, v. 12, n. 6, p. 868-875, 2020.
- GREENLEAF, W.B. *et al.* Role of hydrogen bonding in the active site of human manganese superoxide dismutase. **Biochemistry**, v. 43, p. 7038-7045, 2004.
- GREENOUGH, M.A. CAMAKARIS, J. BUSH, A.I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease Neurochem. **Int**, v. 62, p. 540-555, 2013.
- GROMADZKA G. *et al.* Copper Dyshomeostasis in Neurodegenerative DiseasesTherapeutic Implications. **Int J Mol Sci**, v.21, n. 23, p. 9259, 2020.
- GUZIOR, N. *et al.* Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. **Curr. Med. Chem**, v. 22, p. 373–404 2015.
- H Aidari, M. *et al.* Enhanced susceptibility to oxidation and diminished vitamin E content of LDL from patients with stable coronary artery disease. **Clin. Chem**, v. 47, p. 1234-1240, 2001.
- HALL, L. T. *et al.* X-ray Crystallographic and Analytical Ultracentrifugation Analyses of Truncated and Full-Length Yeast Copper Chaperones for SOD (LYS7): A Dimer-Dimer Model of LYS7-SOD Association and Copper Delivery. **Biochemistry**, v. 39, p. 3611-3623, 2000.
- HALLIWELL B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J. Neurochem**, v. 97, p. 1634–1658, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford**, ed. 5, 2015.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALPER J.; KJAER M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. **Adv Exp Med Biol**, v. 802, p. 31-47, 2014.

HAN, P.; MA, X.; YIN, J. The effects of lipoic acid on soybean β -conglycinin-induced anaphylactic reactions in a rat model. **Archives of Animal Nutrition**, v. 64, n. 3, p. 254-264, 2010.

HE, L. *et al.* Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n.2, p. 532-553, 2017.

HEATON, D.N. *et al.* The mitochondrial copper metallochaperone Cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex. **Biochemistry**, v. 40, p. 743-751, 2001.

HERMIDA-AMEIJEIRAS, A. *et al.* Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: Role of ferrous and ferric ions. **Neurochemistry international**, v. 45, p. 103-16, 2004.

HSU H.W; BONDY, S.C; KITAZAWA M. Environmental and dietary exposure to copper and its cellular mechanisms linked to Alzheimer's disease. **Toxicol Sci**, v. 163, n. 2, p. 338-345, 2018.

HSU, H. W. *et al.* Copper-Induced Upregulation of MicroRNAs Directs the Suppression of Endothelial LRP1 in Alzheimer's Disease Model. **Toxicol Sci**, v. 170, n. 1, p. 144-156, 2019.

HULTBERG B., ANDERSSON A., ISAKSSON A. Copper ions differ from other thiol reactive metal ions in their effects on the concentration and redox status of thiols in HeLa cell cultures. **Toxicology**, v. 117, p. 89-97, 1997.

HUSTER, D. *et al.* High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease. **J. Biol. Chem**, v. 282, p.8343-8355, 2007.

HWANG J.M. *et al.* Inhibitory effect of berberine on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. **Arch Toxicol**, v. 76, p. 664-670, 2002.

HWANG, J.J.; PARK, M.H.; KOH, J.Y. Copper activates TrkB in cortical neurons in a metalloproteinase-dependent manner. **J. Neurosci. Res**, v. 85, p. 2160-2166, 2007.

ILYECHOVA, E. *et al.* CRISP-R/Cas9 Mediated Deletion of Copper Transport Genes CTR1 and DMT1 in NSCLC Cell Line H1299. **Biological and Pharmacological Consequences. Cells**, v. 8, n. 4, p. 1-16, 2019.

IRATO, P. *et al.* Oxidative burst and metallothionein as a scavenger in macrophages. **Immunology & Cell Biology**, v.79, n. 3, p. 251-254, 2001.

ISCHIROPOULOS H, AL-MEHDI A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Lett**, v. 64, p. :279-82, 1995.

- JIANG W. *et al.* Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: Protective effects of myo-inositol. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 301-313, 2014.
- JOHNSON, K.A.; CONN, P.J.; NISWENDER, C.M. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, v. 8, p. 475–491, 2009.
- KAPLAN, J. H.; MARYON, E. B. How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal. **Biophysical Journal**, v. 110, n. 1, p. 7–13, 2016.
- KARDOS, J. *et al.* Copper signalling: Causes and consequences. **Cell Commun. Signal**, v. 16, p. 71, 2018.
- KARIN, M. How NF- κ B is activated: the role of I κ B kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, p. 6867–6874, 1999.
- KHALFAOUI-HASSANI, B. *et al.* Widespread Distribution and Functional Specificity of the Copper Importer CcoA: Distinct Cu Uptake Routes for Bacterial Cytochrome c Oxidases. **mBio**, v. 9, n. 1, 2018.
- KOH, C.S. *et al.* Crystal Structures of a Poplar Thioredoxin Peroxidase that Exhibits the Structure of Glutathione Peroxidases: Insights into Redox-driven Conformational Changes. **Journal of Molecular Biology**, v. 370, n. 3, p. 512-529, 2007.
- KOPPERS, A. *et al.* Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3199–3207, 2008.
- KUMAR, V. *et al.* Relationship of antioxidant and oxidative stress markers in different organs following copper toxicity in a rat model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 293, p. 37–43, 2016.
- LAI, J. C. K.; BLASS, J. P. Neurotoxic effects of copper: Inhibition of glycolysis and glycolytic enzymes. **Neurochemical Research**, v. 9, n. 12, p. 1699-1710, 1984.
- LAMB, A. L. *et al.* Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. **Nature Structural Biology**, v. 6, p. 724-729, 1999.
- LARGERON M. Amine oxidases of the quinoproteins family: their implication in the metabolic oxidation of xenobiotics. **Pharm Fr**, v. 69, n. 1, p. 53-61, 2011.
- LETELIER, M. E. *et al.* Mechanisms underlying the inhibition of the cytochrome P450 system by copper ions. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 8, p. 695–702, 2009.
- LI, Z. *et al.* Dopamine beta-hydroxylase and its role in regulating the growth and larval metamorphosis in *Sinonovacula constricta*. **Gene**, v. 737, p. 144418, 2020.
- LIMÓN-PACHECO, J.H. *et al.* Glutathione depletion activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that display organ-specific responses and brain protection in mice. **Free Radic. Biol. Med**, v. 43, p. 1335-1347, 2007.

LINDER, M.C. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: An update. **Metallomics**, v. 8, p. 887–905, 2016.

LINDER, MC. Nutritional biochemistry of copper, with emphasis on the perinatal period. **Biochemical Aspects of Human Nutrition.**, p. 143–179, 2010.

LINDER, MC; HAZEGH-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology. **Am J Clin Nutr**, v. 63, p. 797–811, 1996.

LIU, J. *et al.* The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. **Front. Neurosci**, v. 13, p. 43, 2019.

LIU, N. *et al.* Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. **J. Nutr. Biochem**, v. 18, p. 597–608, 2007.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, J. *et al.* Trace amounts of copper exacerbate beta amyloid-induced neurotoxicity in the cholesterol-fed mice through TNF-mediated inflammatory pathway. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 2, p. 193-203, 2009.

LUTSENKO, S. Copper trafficking to the secretory pathway. **Metallomics**, v. 8, p. 840–852 2016.

LUTSENKO, S.; BHATTACHARJEE, A.; HUBBARD, A. L. Copper handling machinery of the brain. **Metallomics**, v. 2, p. 596–608, 2010.

MANISH K. *et al.* Copper ion / H₂O₂ oxidation of Cu/Zn-Superoxide dismutase: Implications for enzymatic activity and antioxidant action. **Redox Biology**, v. 26, p. 2213-2317, 2019.

MARKLUND, S.L. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. **J. Clin. Invest**, v. 74, p. 1398-1403. 1984.

MARKLUND, S.L. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis **FEBS Lett**, v. 184, p. 237-239, 1985.

MASON, D.A. Function and development of the primary thickening meristem in the monocotyledon. *Allium cepa* L. **Bot. Guz**, v. 140, p. 51-66, 1979.

MASON, K.E. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. **J. Nutr**, v. 109, p. 1979–2066, 1979.

MAUNG, M.T. *et al.* The molecular and cellular basis of copper dysregulation and its relationship with human pathologies. **FASEB J**, v. 35, e21810, 2021.

MAXWELL SRJ. Prospects for the use antioxidant therapies. **Department of Medicine**, v. 49, n. 3, p. 345-361, 1995.

Medicine and Cellular Longevity, 2014.

MERKER K. *et al.* Copper related toxic effects on cellular protein metabolism in human astrocytes. **Biofactors**, v. 24, n. 1-4, p. 255-261, 2005.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **REF**, v. 247, n. 10, p. 3170, 1972.

MITTL, P.R.E.; SCHULZ, G.E. Structure of glutathione reductase from escherichia coli at 1.86 Å resolution: Comparison with the enzyme from human erythrocytes. **Protein Science**, v. 3, p. 799-809, 1994.

MONTES, S. *et al.* Copper and Copper Proteins in Parkinson's Disease. Oxidative MORIYA, M. *et al.* Copper is taken up efficiently from albumin and alpha2-macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, v. 295, p. 708–721, 2008.

MORIYA, M. *et al.* Copper is taken up efficiently from albumin and alpha2-macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, v. 295, p. 708–721. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55, 1983.

NAGASAKA, H. *et al.* Relationship between oxidative stress and antioxidant systems in the liver of patients with Wilson disease: hepatic manifestation in Wilson disease as a consequence of augmented oxidative stress. **Pediatr. Res**, v. 60, n. 4, p. 472-477, 2006.

NALETOVA, I. *et al.* The Copper (II)-Assisted Connection between NGF and BDNF by Means of Nerve Growth Factor-Mimicking Short Peptides. **Cells**, v. 8, p. 301, 2019.

NAVARRO, J.A, SCHNEUWLY S. Copper and zinc homeostasis: Lessons from drosophila melanogaster. **Front. Genet**, v. 8, p. 223, 2017.

NAVASA, P.; VILLALBA, J M.; CABO, R. Importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. **Mitochondrion**, v. 7 Suppl, p. S34-40, 2007.

PAIK, S. R. *et al.* Copper (II)-induced self-oligomerization of α -synuclein. **Biochemical Journal**, v. 340, n. 3, p. 821–828, 1999.

PAMP, K. *et al.* NAD(H) enhances the Cu (II)-mediated inactivation of lactate dehydrogenase by increasing the accessibility of sulfhydryl groups. **Free Radic. Res**, v. 39, p. 31–40, 2005.

PARSONAGE D.; KARPLUS P.A.; POOLE L.B. Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, 2008.

PEREZ, M.G. *et al.* Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 535, p. 43-46, 2017.

PETERS, C. *et al.* Biphasic effects of copper on neurotransmission in rat hippocampal neurons. **J. Neurochem**, v. 119, p. 78-88, 2011.

- PHAM, A. N.; WAITE, T. D. Cu(II)-catalyzed oxidation of dopamine in aqueous solutions: Mechanism and kinetics. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 137, p. 74–84, 2014.
- PIGEOLET, E. *et al.* Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. **Mech. Ageing Dev**, v. 51, p. 283–297, 1990.
- POPE, S.A; MILTON, R.; HEALES, S.J. Astrocytes protect against copper-catalysed loss of extracellular glutathione. **Neurochem. Res**, v. 33, n. 7, p. 1410-1418, 2008.
- POUJOIS, A.; WOIMANT, F. Wilson's disease: a 2017 update. **Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol**, v. 42, p. 512–520, 2018.
- POURAHMAD J., O'BRIEN P.J. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. **Toxicology**, v. 143, p. 263–273, 2000.
- POURAHMAD J.; O'BRIEN, P.J. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. **Toxicology**, v. 143, n. 3, p. 263-273, 2000.
- PROHASKA JR *et al.* In vitro copper stimulation of plasma peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase in Menkes disease variant with occipital horns. **Pediatr. Res**, v. 42, p. 862–865, 1997.
- PROHASKA, J. R.; BRODERIUS, M. Plasma peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM) and ceruloplasmin are affected by age and copper status in rats and mice. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, n.3, p. 360–366, 2006.
- PUFAHL, R.A. *et al.* Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. **Science**, v. 278, p. 853–856, 1997.
- QIAN, Y. *et al.* Involvement of the molecular chaperone Hspa5 in copper homeostasis in astrocytes. **Brain Res**, v. 1447, p. 9-19, 2012.
- QIN, K. *et al.* ATM-mediated transcriptional elevation of prion in response to copper-induced oxidative stress. **J. Biol. Chem**, v. 284, p. 4582-4593, 2009.
- RAHMAN MK. *et al.* Dopamine-β-hydroxylase (DBH), its cofactors and other biochemical parameters in the serum of neurological patients in Bangladesh. **Int. J. Biomed. Sci**, v. 5, n. 4, p. 395–401, 2009.
- RAHMAN MK. *et al.*, Developmental changes of catecholamine-mediating enzyme – dopamine-β-hydroxylase and its cofactors in central and peripheral tissues and serum of Long-Evans rats. **Int. J. Biomed. Sci**, v. 8, n. 3, p. 194–203, 2012.
- RAMOS D. *et al.* Mechanism of Copper Uptake from Blood Plasma Ceruloplasmin by Mammalian Cells. **PLOS ONE**, v. 11, 2016.
- RAMOS, D. *et al.* Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by Mammalian cells. **Plos One**, v. 11, n. 3, 2016.

RAMOS, D. *et al.* Mechanism of Copper Uptake from Blood Plasma Ceruloplasmin by Mammalian Cells. **PLOS ONE**, v. 11, e0149516, 2016.

RASIA, R.M. *et al.* Structural characterization of copper(II) binding to alpha-synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 102, p. 4294-4299, 2005.

REDDY, P.V.; RAO, K.V.; NORENBERG M.D. The mitochondrial permeability transition, and oxidative and nitrosative stress in the mechanism of copper toxicity in cultured neurons and astrocytes. **Lab. Invest**, v. 88, n. 8, p. 816-830, 2008.

REPETTO, G.; DEL PESO A.; ZURITA J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1125–1131, 2008.

RIDER, J. E. *et al.* Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. **Amino Acids**, v. 33, n. 2, p. 231-240, 2007.

RIDER, J. E. *et al.* Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. **Amino Acids**, v. 33, n. 2, p. 231-240, 2007.

RILEY P. Melanin. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 29, n. 11, p. 1235-1239. 1997.

ROBERTSON D, HOLLISTER AS, BIAGGIONI I. Dopamine- β -hydroxylase deficiency and cardiovascular control. **Hypertension**. 1991;18:1–8.

ROSS, G.M. *et al.* The binding of zinc and copper ions to nerve growth factor is differentially affected by pH: Implications for cerebral acidosis. **J. Neurochem**, v. 78, p. 515–523, 2001.

SCHEIBER I.F.; DRINGEN, R. Copper-treatment increases the cellular GSH content and accelerates GSH export from cultured rat astrocytes. **Neurosci. Lett**, v. 498, n. 1, p. 42-46, 2011.

SCHEIBER, I. F.; DRINGEN, R. Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 556–565, 2013.

SCHEIBER, I. F.; SCHMIDT, M. M.; DRINGEN, R. Copper export from cultured astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 60, n. 3, p. 292–300, 2012.

SCHEIBER, I. F; DRINGEN, R. Copper-treatment increases the cellular GSH content and accelerates GSH export from cultured rat astrocytes. **Neurosci Lett**, v. 498, n. 1, p. 6-42, 2011.

SCHEIBER, I.F., MERCER, J.F., AND DRINGEN, R. Metabolism and functions of copper in brain. **Progress in neurobiology**, v. 116, p. 33-57, 2014.

SCHEINBERG, I. H.; STERNLIEB, I. Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 63, p. 842–845, 1996.

SCHLIEF, M.L.; CRAIG, A.M.; GITLIN, J.D. NMDA receptor activation mediates copper homeostasis in hippocampal neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 239-246, 2005.

- SCHLIEF, M.L.; GITLIN, J.D. Copper homeostasis in the CNS: A novel link between the NMDA receptor and copper homeostasis in the hippocampus. **Mol. Neurobiol**, v. 33, p. 81–90, 2006.
- SCHWARZ, G.; A.A, B. Cobalt in human health and disease. **Metal ions in life sciences**, v.13, p. 295–320, 2013.
- SEQUEIRA, S.; RAO, A. V.; RAO, A. Increased oxidative stress and altered antioxidants status in patients with chronic allergic rhinitis. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, n. 7A, p. 951-956, 2012.
- SHAULIAN, E. e KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 131–136, 2002.
- SHELIN, C. T.; CHOI, D. W. Cu²⁺ toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. **Ann. Neurol**, v. 55, p. 645–653, 2004.
- SHIN, D.S. *et al.* Tainer Superoxide dismutase from the eukaryotic thermophile *Alvinella pompejana*: structures, stability, mechanism, and insights into amyotrophic lateral sclerosis. **J. Mol. Biol**, v. 385, p. 1534-1555, 2009.
- SHIVA, S. *et al.* Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. **Nat Chem Biol**, v. 2, p. 486–493, 2006.
- SHOUBRIDGE, E.A. Cytochrome c oxidase deficiency. **Am. J. Med. Genet**, v. 106, n. 1 p. 46-52, 2001.
- SLOMINSKI A. *et al.* Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1155-1228, 2004.
- SMITH-MUNGO L.I.; KAGAN H.M. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. **Matrix Biol**, v. 16, n. 7, p. 387-398, 1998.
- SPENCER, W. A. *et al.* Oxidatively generated DNA damage after Cu(II) catalysis of dopamine and related catecholamine neurotransmitters and neurotoxins: Role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 1, p. 139–147, 2011.
- SQUITTI, R. *et al.* Copper Imbalance in Alzheimer’s Disease and Its Link with the Amyloid Hypothesis: Towards a Combined Clinical, Chemical, and Genetic Etiology. **Journal of Alzheimer’s Disease**, v. 83, n. 1, p. 23–41, 2021.
- SQUITTI, R. *et al.* Elevation of serum copper levels in Alzheimer’s disease. **Neurology**, v. 59, p. 1153–1161, 2002.
- SQUITTI, R. *et al.* Excess of nonceruloplasmin serum copper in AD correlates with MMSE, CSF [beta]-amyloid, and h-tau **Neurology**, v. 67, p. 76-82, 2006.
- SQUITTI, R. *et al.* Meta-analysis of serum non-ceruloplasmin copper in Alzheimer’s disease. **J. Alzheimers Dis**, v. 38, p. 809–822, 2014.

- STITES T.E.; MITCHELL A.E.; RUCKER R.B. Physiological importance of quinoenzymes and the O-quinone family of cofactors. **J Nutr**, v. 130, n. 4, p. 719-727, 2000.
- STOCKER R., AMES B. N. Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 22, p. 8130-8134, 1987.
- STURROCK, A.; LEAVITT, B. R. The clinical and genetic features of Huntington disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol*, v. 23, p. 243–259, 2010.
- SUNG, C. *et al.* Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.
- SUZUKI, K.T.; KARASAWA, A.; AND YAMANAKA, K. Binding of copper to albumin and participation of cysteine in vivo and in vitro. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 273, p. 572-577, 1989.
- TAPIERO H., TOWNSEND D.M., TEW K.D. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. **Biomed Pharmacother**, v. 57, n. 9, p. 98-386, 2003.
- TIWARI, M. K. *et al.* Copper ion / H₂O₂ oxidation of Cu/Zn-Superoxide dismutase: Implications for enzymatic activity and antioxidant action. **Redox Biology**, v. 26, p. 2213-2317, 2019.
- TRAVAGLIA, A. *et al.* Copper, BDNF and Its N-terminal domain: Inorganic features and biological perspectives. **Chemistry** v. 18, p. 15618–15631, 2012.
- TROCELLO, J.M. *et al.* Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte. **La Revue de Médecine Interne**, v. 31, n. 11, p. 750-756, 2010.
- UAUY R., OLIVARES M., GONZALEZ M. Essentiality of copper in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 67, n. 5, 1998.
- URIU-ADAMS, J. Y.; KEEN, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4, p. 268–298, 2005.
- UVERSKY, V. N.; LI, J.; FINK, A. L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein: A possible molecular link between parkinson's disease and heavy metal exposure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 44284–44296, 2001.
- VASHCHENKO G.; MACGILLIVRAY R.T.A. Multi-copper oxidases and iron metabolism. **Nutrients**, v. 5, p. 2289–2313, 2013.
- VERWILST, P.; SUNWOO, K.; KIM, J. S. The role of copper ions in pathophysiology and fluorescent sensors for the detection thereof. **Chemical Communications**, v. 51, n. 26, p. 5556–5571, 2015.
- WALSHE, J.M. Wilson's disease. **Lancet**, v. 369, p. 902, 2007.

WANG W., BALLATORI N. Endogeneous glutathione conjugates: Occurrence and biological functions. **Pharmacol**, v. 50, p. 335–355, 1993.

WANG, W. *et al.* Zinc and copper inhibit nerve growth factor-mediated protection from oxidative stress-induced apoptosis. **Neurosci. Lett**, v. 259, p. 115–118, 1999.

WANG, X. *et al.*, Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 8, p. 1240–1247, 2014.

WANG, Y. *et al.* Excessive Cu (2+) deteriorates arsenite-induced apoptosis in chicken brain and resulting in immunosuppression, not in homeostasis. **Chemosphere**, v. 239, 124758, 2020.

WARING, W. S.; WEBB, D. J.; MAXWELL, S. R. J. Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 38, n. 3, p. 365-371, 2001.

WEISS, K.C; LINDER, M.C. Copper transport in rats involving a new plasma protein. **Am. J. Physiol.**, n. 249, p. 77–88, 1985.

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

WOGELIUS, R.A. *et al.* Trace metals as biomarkers for eumelanin pigment in the fossil record. **Science**, v. 333, p. 1622, 2011.

ZISCHKA, H.; EINER, C. Mitochondrial copper homeostasis and its derailment in Wilson disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 102, p. 71–75, 2018.

ZORODDU. *et al.* The essential metals for humans: a brief overview. **J. Inorg. Bioquim**, v. 195, p. 120-129, 2019.