



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS SINTÉTICOS DE SELÊNIO
SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E
NEUROTOXICIDADE DO MANGANÊS**

THAÍS POSSER

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS SINTÉTICOS DE SELÊNIO
SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E
NEUROTOXICIDADE DO MANGANÊS**

THAÍS POSSER

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Neurociências.

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal
Departamento de Bioquímica – BQA
Florianópolis, 2009.**

*How many roads must a man walk down
Before you call him a man?
How many seas must a white dove sail
Before she sleeps in the sand?
How many times must the cannon balls fly
Before they're forever banned?
The answer, my friend, is blowin' in the wind,
The answer is blowin' in the wind.*

Bob Dylan

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, foi Nele que eu busquei forças quando mais precisei;
- ✓ Agradeço de forma especial ao meu orientador, Prof. Rodrigo Bainy Leal pela sua orientação e amizade, que se estendeu desde o mestrado e foi de fundamental importância para o meu crescimento pessoal e intelectual;
- ✓ Ao professor João pela amizade, colaboração, disposição em colaborar e compartilhar ensinamentos e por ter concedido os compostos de selênio;
- ✓ Ao professor Alcir pela convivência, amizade, colaboração e por compartilhar seu conhecimento científico;
- ✓ À professora Ana Lúcia, pela amizade e pela oportunidade de realizar experimentos em seu laboratório, bem como aos alunos do laboratório de Neurobiologia da Depressão, em especial à Manuella, por sua amizade e ajuda na realização dos experimentos;
- ✓ Aos professores Marcelo, Nelson, Carla e Adair pela amizade, companheirismo, colaboração e valiosos ensinamentos;
- ✓ Às garotas que passaram pelo laboratório de Neuroquímica-3 e que por sinal não foram poucas, Camila, a veterana, Sara, Ana Paula Rigon, minhas filhas Daiane e irmã Ilza, Ana Paula Costa... foi um tempo maravilhoso...e aos colegas mais recentes Fabiano, Mark, Michael e Carol...obrigada pela amizade e convivência;
- ✓ Um agradecimento especial é dedicado ao TH group, da University of Newcastle. Agradeço ao Prof. Peter Dunkley, pela orientação, pelo maravilhoso convívio, pelos valiosos ensinamentos e claro, pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa. Ao Professor Richard Rodnight por seus ensinamentos e por ser um exemplo de disposição e amor à ciência. Ao Phil, Larisa, Sarah, Lin, Jackie entre outros que colaboraram não apenas com idéias e auxílio técnico, mas também com amizade, disponibilidade e claro, paciência com a barreira linguística, *thank you guys...*
- ✓ Aos professores das disciplinas da pós-graduação que muito colaboraram para minha formação.
- ✓ Aos professores membros da banca pela disponibilidade em fazer a leitura desta tese e compor a comissão examinadora;
- ✓ Ao Secretário da Pós-Graduação Nivaldo pela sua dedicação e disponibilidade em facilitar a vida dos pós-graduandos e professores;

- ✓ Aos nossos companheiros que continuam na Austrália Fernanda e Ramatis, e aos que retornaram um pouco antes, Andrés e Luciana, com quem compartilhamos grandes experiências e amizade;
- ✓ Ao Natan e Maggie, obrigada pela acolhida e pela amizade, seremos eternamente gratos;
- ✓ A minha família, vocês estão sempre no meu coração; mãe, você é exemplo de bondade, dedicação, fé e luta... A prova viva de que exemplos substituem palavras;
- ✓ Ao Jeferson, meu companheiro de vida e de ciência, obrigada por todo seu apoio e por ter estado ao meu lado ao longo desta longa trajetória, que nossa estrada seja iluminada;
- ✓ A CAPES, pela bolsa concedida ao longo de meu doutorado;
- ✓ Ao CNPq, por ter concedido a bolsa de doutorado sanduíche.

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estresse Oxidativo e o SNC	1
Reação 1. Reação de degradação de H ₂ O ₂ e formação de radical OH [•] catalisada por metais de transição, de acordo com a reação de Fenton. Modificado de Valko et al., 2006.....	2
1.2. MAPKs	3
1.3. Selênio	6
1.3.1. Compostos orgânicos sintéticos de Selênio.....	8
1.3.2. Neuroproteção por compostos de Selênio	9
1.3.3. Compostos de selênio e depressão.....	11
1.4. MAPKs e tumores	13
1.5. Selenio e tumores	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos específicos:	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Reagentes e drogas	19
3.3. Equipamentos	20
3.4. Síntese de difenil disseleneto e ebselen	20
3.5. Preparação e tratamento de fatias hipocâmpais.....	21
3.6. Viabilidade celular das fatias hipocâmpais	22
3.7. Separação de proteínas das fatias hipocâmpais	22
3.8. Eletrotransferência.....	23
3.9. Imunodeteção.....	24
3.10. Dosagem de proteínas	25
3.11. Peroxidação Lipídica.....	25
3.12. Níveis de Tióis.....	26
3.13. Atividade GPx	26
3.14. Preparação de cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e tratamentos	27
3.15. Análise de apoptose e viabilidade celular	27
3.16. Análise de fosforilação de proteínas em cultura de células	28
3.17. Tratamentos <i>in vivo</i>	29
3.18. Teste do nado forçado	30
3.19. Teste de suspensão da cauda.....	31
3.20. Teste do campo aberto	31
3.21. Análise Estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Análise da viabilidade celular e metabolismo redox celular em fatias hipocâmpais incubadas com H ₂ O ₂ e proteção por difenil disseleneto	33
4.2. Estudo dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na proteção pelo composto difenil disseleneto.....	37

4.3. Análise da fosforilação de MAPKs em resposta ao tratamento de fatias hipocâmpais com H ₂ O ₂ e difenil disseleneto	40
4.4. Estudo do possível efeito antidepressivo do ebselen	42
4.5. Estudo de mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo do ebselen no teste do nado forçado	44
4.5.1. <i>Estudo do envolvimento do sistema serotoninérgico</i>	44
4.5.2. <i>Estudo do envolvimento do sistema noradrenérgico</i>	46
4.5.3. <i>Estudo do envolvimento do sistema dopaminérgico</i>	48
4.6. Efeito do difenil disseleneto sobre a viabilidade celular e clivagem de PARP em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	50
4.7. Efeito do tratamento com difenil disseleneto na fosforilação das MAPKs ERK1/2 e p38 ^{MAPK} e substratos de PKC	52
4.8. Estudo do papel da fosforilação de ERK1/2 no efeito citotóxico do difenil disseleneto	54
5. DISCUSSÃO	56
6. REFERÊNCIAS	68
CAPÍTULO II.....	80
1. INTRODUÇÃO	80
1.1. Contaminação por metais	80
1.1.1. Manganês	80
1.2. Mecanismos moleculares de ação do Mn	83
1.3. Tirosina hidroxilase	85
2. OBJETIVOS	87
2.1. Objetivo Geral	87
2.2. Objetivos específicos:	87
3. MATERIAIS E MÉTODOS	88
3.1. Reagentes e drogas	88
3.2. Culturas celulares e tratamentos	89
3.3. Análise da fosforilação de proteínas	90
3.4. Viabilidade celular das fatias hipocâmpais	90
3.5. Medida da atividade da Tirosina Hidroxilase	90
3.4. Análise da geração de H ₂ O ₂	91
3.5. Análise estatística	92
4. RESULTADOS	93
4.1. Efeito da exposição prolongada ao Mn sobre a fosforilação e atividade da proteína Tirosina Hidroxilase	93
4.2. Estudo do efeito do Manganês na viabilidade celular e fosforilação de proteínas cinase ativadas por estresse (SAPKs) JNK1/2 e p38 ^{MAPK}	95
4.3. Efeitos do Mn sobre proteínas cinases capazes de fosforilar Ser40	96
4.4. Envolvimento do estresse oxidativo na fosforilação de TH	99
4.5. Estudo da fosforilação de TH em diferentes sítios (Ser19, Ser31 e Ser40) em resposta ao Mn ao longo do período de incubação	101
5. DISCUSSÃO	104
6. CONCLUSÕES GERAIS	107
7. REFERÊNCIAS	110
8. ARTIGOS CIENTÍFICOS	114

RESUMO

O elemento selênio é um mineral essencial, componente de várias proteínas, incluindo a glutathiona peroxidase. Na última década foram realizados muitos estudos sobre as propriedades químicas e biológicas dos compostos orgânicos sintéticos de selênio. No presente estudo foi analisado o potencial antioxidante e protetor do composto orgânico sintético de selênio difenil disseleneto contra dano oxidativo induzido por H_2O_2 em fatias hipocâmpais de ratos adultos. Além disso, o efeito pró-apoptótico deste composto foi testado na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Paralelamente, o potencial antidepressivo do composto de selênio ebselen foi investigado em modelos animais de depressão. Primeiramente, o tratamento com H_2O_2 causou uma significativa diminuição na viabilidade celular em fatias hipocâmpais, além de aumentar a peroxidação lipídica destas fatias. Estes efeitos foram revertidos pela co-incubação com difenil disseleneto. A proteção mediada pelo calcogênio contra o dano induzido por H_2O_2 foi aumentada pela adição de tióis não permeáveis (GSH e DTT) no meio de incubação, o mesmo não foi observado quando o composto permeável GSH monoéster foi adicionado ao meio. Após incubação com H_2O_2 foi também observada uma estimulação transitória na fosforilação de ERK1/2, sendo este efeito bloqueado por difenil disseleneto. O tratamento prolongado de células SH-SY5Y (24h) com difenil disseleneto aumentou significativamente o número de células apoptóticas. Este efeito foi acompanhado por aumento na fosforilação de ERK1/2 e inibição de $p38^{MAPK}$ e de PKC. Interessantemente, a inibição da via de ERK1/2 potencializou os efeitos citotóxicos do difenil disseleneto. O efeito antidepressivo de outro composto orgânico sintético de selênio, ebselen, foi avaliado através de sua administração aguda em camundongos. Ebselen (10-20 mg/kg; via subcutânea) diminuiu o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado. Este efeito anti-imobilidade do ebselen foi revertido pelo antagonismo dos receptores adrenérgicos e dopaminérgicos e inalterados pelo antagonismo dos receptores serotoninérgicos, ou mesmo pela inibição da síntese de serotonina. Estes resultados demonstram um efeito antidepressivo do ebselen envolvendo uma interação com os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico. Metais pesados são importantes agentes neurotóxicos que podem alterar vias de sinalização intracelular e produzir estresse oxidativo. O manganês tem sido indicado como um metal capaz de causar neurotoxicidade por mecanismos pouco conhecidos. Nosso estudo avaliou o efeito do manganês sobre a fosforilação e atividade de tirosina hidroxilase em células PC12. O tratamento com Mn (100 μ M) por 24 horas aumentou de forma prolongada a fosforilação de TH em Ser40, resultando em um aumento da atividade desta enzima, sem alterar a viabilidade celular. Este efeito não foi dependente da ativação de PKA ou PKC. O co-tratamento com o antioxidante Trolox TM, não foi capaz de bloquear o efeito do Mn em relação à fosforilação de TH, embora o estresse oxidativo tenha sido implicado como mediador dos eventos citotóxicos do Mn. Em resumo, nossos resultados demonstraram um efeito neuroprotetor de difenil disseleneto contra insulto oxidativo com H_2O_2 , atuando de uma forma extracelular. Além disso, foi demonstrado o potencial pró-apoptótico do difenil disseleneto em uma linhagem de células tumorais humanas, atribuindo à ERK1/2 um papel crítico na sobrevivência destas células. A propriedade antidepressiva do ebselen foi demonstrada em camundongos submetidos ao teste do nado forçado, sendo este efeito não relacionado com o sistema serotoninérgico, ao contrário de antidepressivos clássicos. Além disso, foi proposto um novo mecanismo mediando a neurotoxicidade do manganês em neurônios dopaminérgicos, que envolve a ativação da fosforilação e atividade de tirosina hidroxilase, independentemente da PKA, PKC ou estresse oxidativo.

Financiamento: CNPq, FINEP, FAPESC, CAPES e International Society for Neurochemistry.

ABSTRACT

Selenium is an essential trace element and is component of several proteins, including glutathione peroxidases. The studies related with chemical and biological properties of synthetic organic selenium compounds increased in the last decade since many of these compounds presented antioxidant and protective effects against oxidative insults, which is attributed in part to their glutathione peroxidase –like activity. In the present study we analysed the protective and antioxidant potential of synthetic organic selenium compound diphenyl diselenide against H₂O₂-induced insult in adult rat hippocampal slices. Moreover the pro-apoptotic effects of this compound were tested in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. In parallel studies, the antidepressant-like property of the selenium compound ebselen was investigated in animal models of depression. Firstly, in hippocampal slices the treatment with H₂O₂ caused a significant decrease in cell viability which was concomitant with an increase in lipid peroxidation. These effects were reverted by co-incubation with diphenyl diselenide. The protection mediated by the chalcongen against H₂O₂ damage was ameliorated by addition of non permeable thiols (GSH and DTT) to the incubation media, but it was unaltered by addition of the permeable GSH monoethylester. We also observed a transient stimulation of ERK1/2 phosphorylation after incubation with H₂O₂ and such effect was blocked by diphenyl diselenide. It was demonstrated that prolonged treatment of human neuroblastoma cells SH-SY5Y (24 h) with diphenyl diselenide significantly increased the number of apoptotic cells. This effect was accompanied by increase in ERK1/2 phosphorylation and inhibition of p38^{MAPK} and PKC activity without altering the total content of these kinases. Interestingly, the inhibition of ERK1/2 signaling pathway, potentiated the cytotoxic effects of diphenyl diselenide in SH-SY5Y cells. The antidepressant like effect of ebselen was evaluated after acute administration in mice. Ebselen administration (10-20 mg/kg subcutaneously) decreased the immobility time of mice submitted to the forced swimming test. This antiimmobility effect of ebselen was prevented by antagonism of adrenergic and dopaminergic receptors, and it was unaltered by antagonism of serotonergic receptors, or even inhibition of serotonin synthesis. These results suggest an antidepressant-like effect of ebselen involving an interaction with dopaminergic and noradrenergic systems. Heavy metals are important neurotoxic compounds that alter cell signalling pathways and produce oxidative stress. Manganese has been indicated as a neurotoxic metal, however, the mechanism of this process are not well understood. In the present study it was investigated the effects of manganese on the phosphorylation and activity of tyrosine hydroxylase in PC12 cells. Mn treatment (100 µM) for 24 h caused a sustained increase in Ser40 phosphorylation which resulted in increased TH activity without altering cell viability. Such effect was not dependent on PKA and PKC activation, since the inhibition of these kinases did not prevent Mn effects on Ser40. The co-treatment with the antioxidant TroloxTM, was not able to block the Mn effect toward TH phosphorylation, although oxidative stress has been implicated in Mn cytotoxic events. In summary, our results demonstrated a neuroprotective effect of (PhSe)₂ against H₂O₂ oxidative insult, acting in an extracellular manner. Moreover, it was shown the pro-apoptotic potential of diphenyl diselenide in a human tumoral cell line, attributing to ERK1/2 a critical role in cell survival. The antidepressant-like properties of ebselen was confirmed in mice submitted to the forced swimming test and this effect seems to be not related to serotonergic system, as does classical antidepressants. In addition, we proposed a new mechanism that could mediate manganese neurotoxicity in dopaminergic neurons, which involves stimulation of TH phosphorylation and activity in a manner independent of PKA, PKC or oxidative stress.

Supported by CNPq, FINEP, FAPESC, CAPES and the International Society for Neurochemistry.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Espécies oxidantes interagem com alvos celulares gerando produtos de oxidação que em alguns casos também podem levar ao dano oxidativo nos tecidos.....	1
Figura 2. Figura representativa dos fatores que fazem do cérebro um tecido especialmente suscetível ao estresse oxidativo.	3
Figura 3. Cascata de sinalização de MAPKs.....	5
Tabela 1. Importantes selenoproteínas de mamíferos e suas respectivas funções biológicas.....	7
Figura 4. Redução de H ₂ O ₂ a partir de GSH, catalizada pela GPx, seguindo um mecanismo “pingpong”.....	8
Figura 5. Estrutura química do difenil disseleneto e ebselen	9
Figura 6. Modelo de resposta ao estresse causado por agentes químicos levando à ativação da via de sinalização de MAPKs e subsequente ativação de genes responsivos ao fator de transcrição NRF-2.	14
Figura 7. Diferentes tipos de tratamento aos quais foram submetidas as fatias hipocampais.....	22
Figura 8. Imunodeteção de um polipeptídeo através de Quimiluminescência.....	25
Figura 9. Teste do nado forçado.....	31
Figura 10. Teste de suspensão da cauda.....	31
Figura 11. Efeito do difenil disseleneto sobre a viabilidade e seu papel protetor em fatias hipocampais submetidas ao insulto com H ₂ O ₂	35
Tabela 2. Efeito do tratamento com difenil disseleneto e H ₂ O ₂ na atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) e conteúdo de tióis protéicos (PSH) e não protéicos (GSH total) em fatias hipocampais.....	36
Figura 12. Efeito da adição de compostos tiólicos, DTT, GSH e GSH monoetil ester (GSHMEE), junto ao tratamento com difenil disseleneto e H ₂ O ₂ , sobre a viabilidade celular de fatias hipocampais.....	39
Figura 13. Efeito do tratamento com difenil disseleneto e/ou H ₂ O ₂ sobre a fosforilação de MAPKs.	41
Figura 14. Efeito da administração do ebselen (3-30 mg/kg; s.c.) no TNF (A), campo aberto (B), TST (C) e curva de tempo do efeito anti-imobilidade do ebselen no TNF (D).	43
Figura 15. Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg; i.p; por 4 dias consecutivos), NAN-190 (0,5 mg/kg; i.p.) e cetanserina (5 mg/kg; i.p.) sobre a diminuição do tempo de imobilidade causada pelo ebselen (10 mg/kg; s.c.) no TNF.. ...	45
Figura 16. Efeito do pré-tratamento com prazosim (1 mg/kg; i.p.) ou ioimbina (1 mg/kg; i.p.) sobre a diminuição do tempo de imobilidade causada pelo ebselen (10 mg/kg; s.c.) no TNF.....	47
Figura 17. Efeito do pré-tratamento com SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c.) (A) ou sulpiride (50 mg/kg, i.p. (B) sobre a diminuição do tempo de imobilidade causada pelo ebselen (10 mg/kg; s.c.) no TNF.....	49

Figura 18. Efeito do tratamento com difenil disseleneto sobre a viabilidade celular.....	65
Figura 19. Efeito do tratamento com difenil disseleneto sobre a fosforilação de ERK1/2, p38 ^{MAPK} e substratos de PKC.	53
Figura 20. Efeito do difenil disseleneto e UO126 (inibidor de ERK1/2) sobre a viabilidade celular e clivagem de PARP em linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y.....	55
Figura 21. Ciclo catalítico do difenil disseleneto para a detoxificação de peróxidos.....	71
Figura 22. Estrutura química da GSH (A) e GSHMEE (B).	58
Figura 23. Reação de selenito com grupos sulfidrílicos no domínio catalítico de PKC. Selenito diminui a atividade de PKC e induz modificações nos quatro resíduos de cisteína resultando na formação de dois dissulfetos.	66
Figura 24. Ilustração de componentes sensíveis à modulação redox na via de ERK.....	67
Figura 25. Mecanismos de transporte de Mn ao longo da Barreira Hemato Encefálica quando em níveis plasmáticos fisiológicos.	82
Figura 26. Transporte de Mn, similar ao do Fe, de modo dependente ou independente de Tf, em células PC12.....	83
Figura 27. Biossíntese de catecolaminas.	85
Figura 28. Proteínas cinases e fosfatases (PPs) capazes de modular a fosforilação de TH <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	86
Figura 29. Efeitos da exposição prolongada ao Mn no conteúdo, fosforilação de Ser19, Ser31 e Ser40 e atividade de TH.	94
Figura 30. Efeitos do tratamento com Mn sobre a viabilidade, clivagem de PARP (poli ADP ribose polimerase) e conteúdo e fosforilação de p38 ^{MAPK} e JNK1/2.....	96
Figura 31. Efeito do tratamento com Mn sobre a atividade de PKA e PKC e fosforilação do sítio Ser40 de TH.	98
Figura 32. Estudo do envolvimento do estresse oxidativo na indução de fosforilação de Ser40 pelo tratamento com Mn.	100
Figura 33. Curva de tempo da fosforilação dos sítios Ser31 e Ser40 e ERK1/2 em resposta ao Mn.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

ARE: elemento responsive a antioxidantes e eletrófilos

ASK1: cinase reguladora de sinal apoptótico -1

ATP: trifosfato de adenosina

BAD: Proteína de morte associada a Bcl-2

Bax: Proteína X associada à Bcl-2

Bcl-2: Proteína de células B de linfoma-2

BSA: albumina sérica bovina

CaMK: proteína cinase cálcio/calmodulina dependente

CREB: Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc

DMEM: “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”

DMSO: dimetil sulfóxido

DMT-1: Transportador de metais divalentes 1

DNA: ácido desoxirribonucléico

DTNB: ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico

DTT: ditioneitol

ECL: quimiluminescência

EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético

ERK: cinase regulada por sinal extracelular

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GPx: glutathione peroxidase

GR: glutathione reductase

GSH: glutathione

HEPES: ácido N-2-Hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico

HO-1: heme-oxigenase 1

JNK: cinase c-Jun NH₂-terminal

MAO: monoamina oxidase

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

MAPKK: cinase da proteína cinase ativada por mitógeno

MAPKKK: cinase da cinase da proteína cinase ativada por mitógeno

MEK: cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular

MEKK: cinase da cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular

MKK: cinase da proteína cinase ativada por mitógeno
MTT: brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium
NADPH oxidase : nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-oxidase
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NFκB: fator de transcrição nuclear kappa B
NGF: fator de crescimento do nervo
NRF-2: Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2.
p38^{MAPK}: proteína cinase ativada por mitógeno de 38 kDa
PARP: poli (ADP) ribose polimerase
PBS: tampão salina fosfato
PCPA: *p*-clorofenilalanina metil ester
PKA: proteína cinase A
PKC: proteína cinase C
PP2A: proteína fosfatase 2A
Raf: cinase serina/treonina de 74 kDa
Ras: proteína G de 21 kDa
ROS: espécies reativas de oxigênio
SAPK: proteína cinase ativada por estresse
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SFB: soro fetal bovino
SNC: sistema nervoso central
SOD: superóxido dismutase
TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBS: tampão tris-salina
TBS-T: tampão tris-salina com Tween-20
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TNFα: fator de necrose tumoral α

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse Oxidativo e o SNC

O estresse oxidativo pode resultar de uma alteração na homeostase celular caracterizada por um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio EROs e/ou diminuição das defesas celulares antioxidantes responsáveis pela neutralização destas espécies químicas. O resultado deste fenômeno é o dano celular pela oxidação de macromoléculas, como proteínas e lipídios que ainda podem gerar outras espécies reativas, os chamados produtos de oxidação, ampliando o dano celular através de uma reação em cascata, conforme representação na figura 1. Para evitar este processo as células dispõem de diversos mecanismos de defesa antioxidante que incluem enzimas como superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase e moléculas antioxidantes como vitamina E, ascorbato, piruvato, flavonóides e glutatona (GSH) (Finkel e Holbrook, 2000; Floyd and Hensley, 2002).

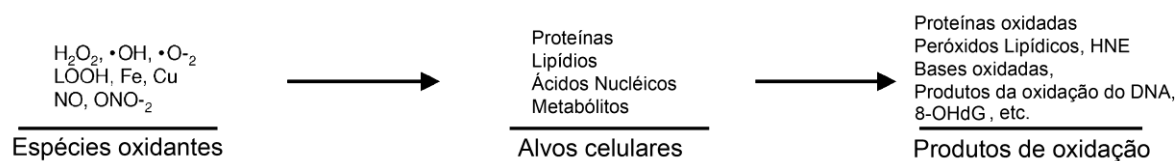


Figura 1. Espécies oxidantes interagem com alvos celulares gerando produtos de oxidação que em alguns casos também podem levar ao dano oxidativo nos tecidos. As abreviações das espécies oxidantes acima incluem H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; $\cdot OH$, radical livre hidroxila; $O_2^{\cdot -}$, superóxido; $LOOH$, hidroperóxido lipídico; Fe , íons ferro; Cu , íons cobre; NO , óxido nítrico; ONO_2 , peroxinitrito; HNE, 4-hidroxi-2-nonenal; 8-OHdG, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina. Modificado de Floyd and Hensley, 2002.

Patologias do sistema nervoso central (SNC) como doenças de Alzheimer e Parkinson, insultos como isquemia seguida de reperfusão, exposição a metais pesados, compostos quimioterápicos ou o próprio processo de envelhecimento podem levar a um

aumento da produção de EROs o que pode causar estresse oxidativo e consequentemente danos celulares irreversíveis (McKubrey et al., 2006).

A produção de EROs ocorre naturalmente como resultado do metabolismo celular. Sistemas enzimáticos como o da NADPH oxidase e óxido nítrico sintase (NOS) são exemplos de geradores de EROs. Entretanto, o metabolismo mitocondrial é considerado o maior gerador de EROs na célula, processo que ocorre ao longo dos complexos da cadeia respiratória. Algumas EROs são bastante instáveis como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}). Entretanto, outras espécies como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem uma meia vida bem maior e pode se difundir através das membranas biológicas e ao reagir com metais livres como o Fé(II), Cu(I), Ti(III), Co(II), através da reação de Fenton (reação 1), podem levar a produção de radical hidroxila, consistindo esta a principal fonte deste radical *in vivo* (Valko et al., 2007).

$M^{n+} (Cu^+, Fe^{2+}, Ti^{3+}, Co^{2+}) + H_2O_2 \rightarrow M^{(n+1)+} (= Cu^{2+}, Fe^{3+}, Ti^{4+}, Co^{3+}) + OH^{\cdot} + OH^-$ onde M^{n+} é um metal de transição

Reação 1. Reação de degradação de H_2O_2 e formação de radical OH^{\cdot} catalisada por metais de transição, de acordo com a reação de Fenton. Modificado de Valko et al., 2006.

No que se refere ao SNC deve ser ressaltado que o cérebro é considerado um alvo especialmente suscetível a danos oxidativos tendo em vista algumas características singulares deste tecido que incluem: alto conteúdo de ácidos graxos (suscetíveis à oxidação), alto consumo de oxigênio (20% do oxigênio consumido pelo organismo) e regiões com alto acúmulo de Fe, conferindo maior produção potencial de EROs. Além disso, o cérebro apresenta baixos níveis de defesas antioxidantes quando comparado a outros tecidos (Finkel e Holbrook, 2000; Floyd and Hensley, 2002) como está representado na figura 2.

Fatores que fazem do cérebro um alvo suscetível ao estresse oxidativo

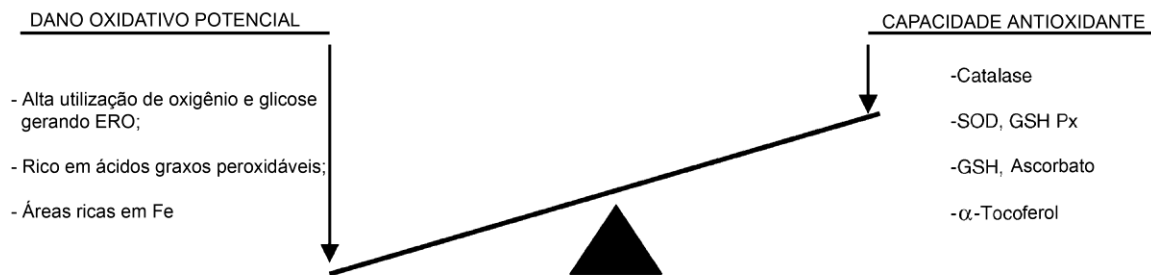


Figura 2. Figura representativa dos fatores que fazem do cérebro um tecido especialmente suscetível ao estresse oxidativo. *Modificado de* Floyd and Hensley, 2002.

1.2. MAPKs

Proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) compõem um grupo de proteínas serina-treonina cinases cuja função e regulação têm sido conservadas ao longo da evolução desde organismos unicelulares como leveduras a organismos complexos como o homem (Nebreda & Porras, 2000; Martín-Blanco, 2000; Schlessinger, 2000; Chang & Karin, 2001; Johnson & Lapadat, 2002).

As MAPKs conduzem, amplificam e integram sinais originados de uma diversidade de estímulos extracelulares recebidos na superfície da célula. Entre estes sinais estão fatores de crescimento, toxinas, citocinas ou estresse ambiental (Tibbles & Woodgett, 1999; Martín-Blanco, 2000; Chang & Karin, 2001). O resultado disto inclui a execução de respostas celulares como proliferação, diferenciação, desenvolvimento, inflamação ou apoptose (Davis, 2000; Dong & Bode, 2003).

Nos mamíferos, as MAPKs são agrupadas em pelo menos três famílias com base na similaridade das seqüências de aminoácidos, mecanismos de regulação por proteínas colocadas acima na via de sinalização e sensibilidade à ativação (Robinson & Cobb, 1997).

Estas famílias compreendem as proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs) que incluem as JNKs ou Jun cinases, composta por JNK1/2/3 (Tibbles & Woodget, 1999), a

proteína ativada por estresse p38^{MAPK} composta por proteínas p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ (Martín-Blanco, 2000) e a ERK1/2 (proteína cinase ativada por sinal extracelular), uma das famílias de MAPKs melhor estudada no cérebro (Chang & Karin, 2001). Todas as MAPKs são ativadas por dupla fosforilação em resíduos de treonina e tirosina (Yang et al., 2003).

A cascata de sinalização das MAPK compõe-se de uma cascata de três cinases (figura 3) a qual se inicia pela chamada cinase da cinase da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPKKK). Esta, por sua vez, ativa uma segunda cinase, a MAPKK através da fosforilação de resíduos de serina e treonina. A ativação da MAPKK é responsável pela subsequente fosforilação de MAP cinases em resíduos de treonina e tirosina (Robinson & Cobb, 1997; Keyse, 2000).

Os principais alvos das MAPKs são os fatores de transcrição. Para que haja fosforilação destes fatores, as MAPKs podem translocar-se do citoplasma para o núcleo, sendo que esta translocação geralmente está associada com ativação das MAPKs (Keyse, 2000; Chang & Karin, 2001). A ativação de fatores de transcrição pode resultar em transcrição gênica de proteínas celulares importantes como citocinas, receptores e fatores de crescimento (Chang & Karin, 2001).

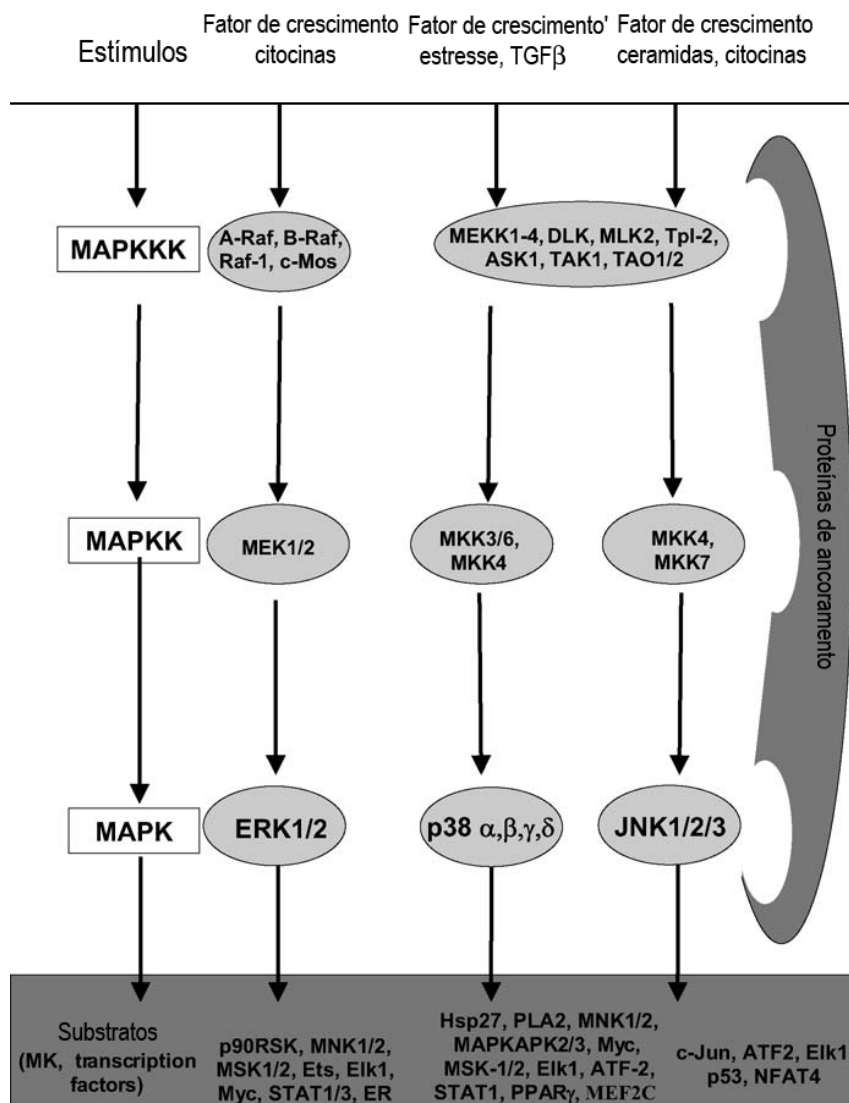


Figura 3. Cascata de sinalização de MAPKs. Conforme descrito no texto a via das MAPKs é composta por três módulos ativados em série: as MAPKKK, a MAPKK e as MAPK. Alguns substratos de cada via estão indicados no esquema. A cascata das MAPKs é organizada em complexos através das proteínas de ancoramento, contribuindo assim para a especificidade e localização das vias. Abreviações: ATF, fator de transcrição de ativação; ASK, cinase regulada por sinal apoptótico; DLK, cinase voltada para duplo zipper de leucina; ER, receptor de estrógeno; ERK, cinase regulada por sinal extracelular; hsp27, proteína de choque térmico de 27 kDa; JNK, cinase c-Jun amino-terminal; MAPKAP, MAP cinase ativada por proteína cinase; MEF, fator estimulador de miócitos; MEK, MAP/ERK cinase; MEKK, MEK cinase; MLK, proteína cinase de linhagem mista; Mnk, cinase que interage com MAP cinase; Msk, proteína cinase ativada por estresse e mitógeno; NFAT4, fator nuclear de células T ativadas 4; PLA2, fosfolipase A2; PPAR, receptor ativado por peroxisoma proliferativo; Rsk, cinase S6 ribossomal; STAT, sinal transdutor e ativador de transcrição; TAK, proteína cinase ativada por fator de crescimento transformante β. Modificado de Aouadi et al., 2006.

1.3. Selênio

O elemento selênio (Se) foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Berzelius, que nomeou este elemento em homenagem à deusa grega da lua, Selena. O Se consiste em um micronutriente de fundamental importância para a saúde do ser humano, cuja principal fonte é a dieta, sendo localizado no grupo 16 da tabela periódica e podendo ser encontrado sob diferentes estados de oxidação (Papp et al., 2007).

O Se entra para a cadeia alimentar animal através do consumo de plantas, que o absorve a partir do solo na forma inorgânica. Nas plantas, o Se é convertido em formas orgânicas, como o aminoácido selenometionina (SeMet) e selenocisteína (Sec). SeMet é considerado o principal composto de selênio em cereais, grãos, legumes e soja, e serve de precursor para a síntese de Sec em animais. O aminoácido Sec é encontrado no sítio de pelo menos 25 diferentes selenoproteínas, todas com importantes funções biológicas sendo algumas delas descritas na Tabela 1, juntamente com suas respectivas funções. Sec é estruturalmente similar ao aminoácido cisteína, entretanto, pelo fato de o Se ser um melhor nucleófilo do que o S, em pH fisiológico o grupo selenol das selenocisteínas é ionizado, enquanto que o grupo tiol das cisteínas é normalmente protonado (Chen e Berry, 2003; Papp et al., 2007; Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008).

<i>Importantes selenoproteínas e suas respectivas funções biológicas</i>	
<i>Selenoproteínas</i>	<i>Funções Biológicas</i>
Isoformas de Glutathione Peroxidase	Enzimas antioxidantes que protegem contra o estresse oxidativo por degradar peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos e fosfolipídicos formando água e respectivos alcoóis.
Iodotironina desidrogenases	Síntese e regulação metabólica de hormônios da tireóide (T2, T3, T4).
Tioredoxina redutases	Redução de substratos intracelulares como deidroascorbato, sendo relacionada com efeitos antitumorais. Participa na redução de nucleotídeos durante a síntese de DNA e regulação da expressão gênica por controle redox da ligação de fatores de transcrição ao DNA.
Selenoproteína P	Antioxidante extracelular associada ao endotélio vascular; protege as células endoteliais do dano promovido pelo peroxinitrito. Importante papel suplementando as células com Se.
Selenoproteína W	Necessária para função muscular.
Selenofosfato sintetase	Necessária para a biosíntese de selenofosfato

Tabela 1. Importantes selenoproteínas de mamíferos e suas respectivas funções biológicas. Modificado de Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008.

A proteína glutathione peroxidase (GPx) foi inicialmente descoberta em 1957, em tecido animal, embora seja também encontrada em plantas e bactérias aeróbica (*E.coli*). A família glutathione peroxidase inclui os seguintes membros: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5, GPx6 e GPx7, sendo que estas enzimas diferem em muitas propriedades, entre elas localização, número de subunidades, estrutura e propriedades enzimáticas (Halliwell e Gutteridge, 2007; Nogueira et al., 2004). Nas células, a GPx efetua a remoção de H₂O₂, reduzindo-o a água pela oxidação de glutathione reduzida (GSH), um tripeptídeo que contém tiol (figura 4). Outros peróxidos além de H₂O₂ podem ser reduzidos por essas enzimas, como hidroperóxidos de ácidos graxos e outros hidroperóxidos sintéticos, como hidroperóxido cumeno e t-butil hidroperóxido, frequentemente utilizados como substratos em ensaios *in vitro* sendo que neste caso, o peróxido é reduzido a álcool (Arthur, 2000; Halliwell e

Gutteridge, 2007). Considerando que a GPx catalisa a redução de diferentes hidroperóxidos e juntamente com a GSH constitui um poderoso sistema de defesa celular contra o estresse oxidativo, muitas pesquisas visando a síntese de compostos capazes de imitar a propriedade catalítica da GPx têm sido realizadas. Desde então, diferentes compostos orgânicos de selênio com atividade GPx foram sintetizados.

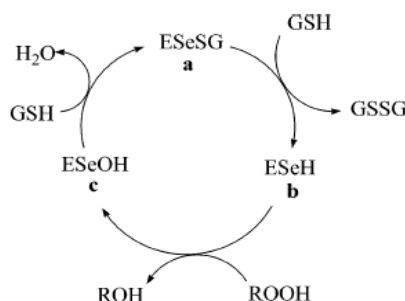


Figura 4. O esquema acima demonstra a redução de H_2O_2 a partir de GSH, catalisada pela GPx, seguindo um mecanismo “ping-pong”. O selenol (b) de uma selenocisteína reduzida é oxidado por hidroperóxidos gerando o ácido selenínico (c). O tripeptídeo GSH então reage com o composto c, formando água e o selenenil sulfeto (a). Uma segunda molécula de GSH ataca o grupo S, de selenenil sulfeto (a) gerando um dissulfeto e regenerando selenol (b), completando o ciclo catalítico. Retirado de Nogueira et al., 2004.

1.3.1. Compostos orgânicos sintéticos de Selênio

A implicação do estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas, processos isquêmicos e no mecanismo de toxicidade por metais pesados tem impulsionado a pesquisa por novos compostos com propriedade antioxidante e potencial para serem utilizados como agentes terapêuticos contra danos cerebrais promovidos pelo estresse oxidativo.

Nas últimas décadas, o interesse pela síntese de compostos orgânicos de selênio aumentou consideravelmente devido ao fato de muitos destes compostos apresentarem propriedades antioxidantes (Mugesh e Singh, 2000; Mugesh et al., 2001). De particular interesse, o composto ebselen (Figura 5 B) foi demonstrado originalmente agir como mimético da enzima GPx (Muller et al., 1984). Entretanto, diferente de várias isoformas de GPx, ebselen é capaz de reduzir peróxidos através do consumo de diversos compostos

tiólicos além de GSH. Além do ebselen (figura 5A) outros compostos de selênio têm sido sintetizados, entre eles o difenil disseleneto (figura 5 B).

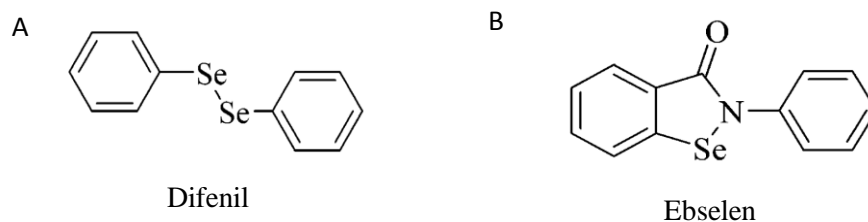


Figura 5. Estrutura química do difenil disseleneto e ebselen

O difenil disseleneto é um composto orgânico sintético de selênio que compartilha propriedades químicas com o ebselen, entre estas a atividade tiol peroxidase (Wendel, 1984; Nogueira et al., 2004).

1.3.2. Neuroproteção por compostos de Selênio

Os efeitos neuroprotetores do ebselen foram demonstrados tanto *in vivo* quanto *in vitro* em modelos de isquemia (Dawson et al., 1995; Namura et al., 2001; Imai et al., 2003), toxicidade glutamatérgica (Porciúncula et al., 2001; Centurião et al., 2005; Xu et al., 2006), indução de dano à medula espinhal (Kalayci et al., 2005) e neurotoxicidade por exposição ao metil mercúrio (Farina et al., 2003). Além disso, é importante ressaltar que o composto ebselen foi testado em estudos clínicos para o tratamento de infarto isquêmico agudo e hemorragia subaracnóidea apresentando melhora relativa no quadro clínico destes pacientes (Yamaguchi et al., 1998; Saito et al., 1998).

Dentre os mecanismos potencialmente envolvidos no neuroproteção por ebselen, citam-se a inibição da peroxidação lipídica (Porciúncula et al., 2001), inibição de enzimas envolvidas em processos inflamatórios (lipoxigenases, NADPH oxidase, PKC, lipoxigenases, NAPH oxidase, PKC, H^+/K^+ ATPase) (Schewe, 1995) e interação com peroxinitrito (Masumoto e Sies, 1996). Além disso, o tratamento prolongado de culturas celulares com ebselen induziu a transcrição de genes dependentes do fator de transcrição NRF-2, bem como

aumentou os níveis de GSH em culturas celulares (Tamasi et al., 2004). Além disso, ebselen reverteu tanto a inibição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 como a indução da expressão da proteína pró apoptótica Bax induzida por glutamato (Xu et al., 2006). Adicionalmente, o tratamento com ebselen levou à diminuição de danos celulares induzidos por isquemia *in vivo* entre eles a inibição da liberação de cit C, ativação de caspases e fragmentação de DNA (Namura et al., 2001). Embora o efeito antioxidante do ebselen seja principalmente atribuído a sua atividade GPx, outros estudos sugerem que a interação do ebselen com peroxinitrito bem como com o sistema tioredoxina redutase, podem ser importantes mecanismos responsáveis pelo efeito antioxidante deste composto (Zhao et al., 2002).

Com relação ao composto difenil disseleneto, apesar de sua propriedade antioxidante ter sido demonstrada em diferentes modelos (Rossato et al., 2002; Santos et al., 2005; Puntel et al., 2007; Luchese et al., 2007; Borges et al., 2006), existem poucos estudos relacionados ao efeito neuroprotetor deste composto (Ghisleni et al., 2003; de Freitas et al., 2009). Além disso, torna-se importante ressaltar que difenil disseleneto apresentou menor toxicidade em relação ao ebselen quando administrado *in vivo* (Meotti et al., 2003). Além disso, o ebselen demonstrou efeitos pró oxidantes em estudos *in vivo*, quando associado ao MeHg, sendo atribuído principalmente à oxidação da GSH (Farina et al., 2004).

1.3.3. Compostos de selênio e depressão

A depressão é um tipo de transtorno mental crônico e recorrente, caracterizado por sintomas como alterações no humor, irritação, baixa capacidade de concentração, diminuição ou aumento de apetite, distúrbios do sono, cansaço e anedonia (perda de interesse por estímulos prazerosos) (Richardson, 1991). A depressão afeta uma significativa parcela da população e é uma das principais causas de afastamento do trabalho e suicídios (Wong e Licinio, 2001; Nestler et al., 2002; Berton e Nestler, 2006).

Entre as teorias da depressão, a hipótese monoaminérgica, baseada em observações clínicas, atribui a causa da depressão a uma diminuída função monoaminérgica no SNC. Desta forma, os neurotransmissores serotonina (5-HT), noradrenalina (NE) e dopamina (DA), têm sido considerados mediadores dos efeitos comportamentais de agentes antidepressivos (Krishnan e Nestler, 2008).

Atualmente, as terapias disponíveis para o tratamento da depressão atuam principalmente aumentando a transmissão monoaminérgica, tanto inibindo a recaptção neuronal de monoaminas como inibindo a sua degradação. Entretanto estas terapias são associadas a muitos efeitos colaterais, além disso, elas não tem se demonstrado eficaz a uma significativa parcela de pacientes (Wong and Licinio, 2001; Nestler et al., 2002; Berton and Nestler, 2006). Desta forma, a investigação por terapias alternativas com potencial para serem utilizadas no tratamento da depressão é de grande relevância, dada a gravidade do tema.

Neste sentido, a baixa toxicidade de compostos de selênio e suas propriedades biológicas tornam-os alvos atrativos para o tratamento da depressão. Além disso, diferentes trabalhos demonstraram que antidepressivos clinicamente utilizados, bem como compostos com atividade antidepressiva, também exibiram propriedades neuroprotetoras relacionadas com neuroplasticidade e viabilidade celular (Kolla et al., 2005; Brocardo et al., 2007; Peng et

al., 2008). Este fato aponta para o estudo de compostos com propriedades neuroprotetoras como potenciais agentes antidepressivos.

Recentemente, o composto difenil disseleneto exerceu efeito antidepressivo em ratos quando expostos ao TNF, sendo que este efeito foi mediado pelos sistemas de monoaminas 5-HT, DA e NE, como demonstrado através de inibidores farmacológicos de receptores específicos destes sistemas. Outro achado importante do estudo, que o composto levou à inibição da atividade da enzima monoamina oxidase (MAO), responsável pela oxidação de monoaminas (Savegnago et al., 2007).

EROs exercem um papel importante na patogênese de muitas doenças, principalmente neurológicas e psiquiátricas, sendo este fato associado a grande vulnerabilidade do SNC ao estresse oxidativo (Bilici et al., 2001; Takuma et al., 2004; Eren et al., 2007). Foi demonstrado que ERO modulam reversivelmente a transmissão sináptica (Chen et al., 2001), podendo causar diminuição da liberação de neurotransmissores como glutamato e dopamina (Zoccarato et al., 1995; Joseph et al., 1996).

Estudos realizados em pacientes deprimidos correlacionaram a depressão com alteração da atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica no sangue e cérebro (Bilici et al, 2001; Michel et al, 2007), sendo estes efeitos revertidos pelo tratamento com antidepressivos (Herken et al., 2007). Além disso, estudos demonstraram aumento na atividade de MAO em pacientes com depressão (Pandey et al., 1992). Sabe-se que a oxidação de catecolaminas como dopamina e norepinefrina por MAO pode estimular a produção de espécies radicalares (Herken et al., 2007), sugerindo assim uma correlação entre aumentada atividade de MAO e estresse oxidativo em pacientes com depressão. Além disso, estimulação de respostas inflamatórias imunes e alteração na estrutura de certos lipídios, pode levar a aumento de ERO, bem como peroxidação lipídica (Bilici et al., 2001). Tendo isto em vista, supõe-se que o uso de antioxidantes em terapias antidepressivas poderia ser de grande valia, dado o envolvimento de ERO nesta doença.

1.4. MAPKs e tumores

JNK e p38^{MAPK} podem ser ativadas em resposta a agentes quimioterápicos, sendo que esta ativação está implicada na apoptose das células tumorais (Boldt et al., 2002). Ao contrário, a proteína ERK parece ter importante papel na sobrevivência celular, desde que a inibição de ERK1/2 aumenta a morte celular promovida pela droga paclitaxel em linhagens tumorais (MacKeigan et al., 2000). Em linhagens de feocromocitoma PC12, a remoção de NGF (nerve growth factor) do meio causa ativação sustentada de JNK e p38^{MAPK}, e inibição de ERK1/2 além de morte celular apoptótica, sendo que a inativação da via de fosforilação de JNK e p38^{MAPK} e ativação da via de ERK bloquearam a apoptose causada por remoção de NGF (Xia et al., 1995).

Entre as consequências da ativação de MAPKs por estímulos extracelulares, como agentes quimioterápicos, está a fosforilação e ativação do fator de transcrição NRF-2 o qual se liga ao elemento ARE (antioxidant-electrophile responsive element), que está presente em muitos genes responsivos ao estresse, incluindo o gene das enzimas metabolizadoras de drogas glutathione S-transferase (GST) e quinona redutase (QR), bem como genes que codificam proteínas de defesa ao estresse oxidativo como hemeoxigenase-1 (HO-1) (Yu et al., 2000; Owor e Kong, 2002) (figura 6).

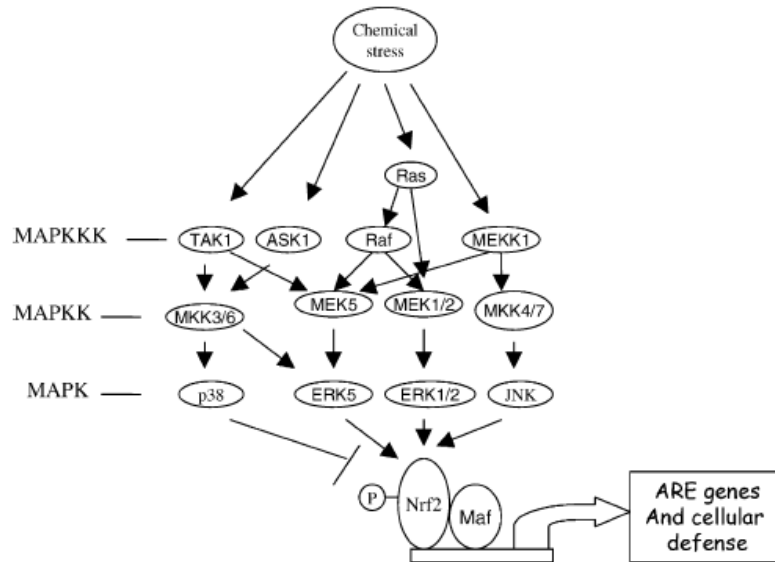


Figura 6. Modelo de resposta ao estresse causado por agentes químicos levando à ativação da via de sinalização de MAPKs e subsequente ativação de genes responsivos ao fator de transcrição NRF-2. Modificado de Owor e Kong, 2002.

Foi demonstrado que a ativação de ERK por compostos quimioprotetores levou a transcrição gênica mediada por ARE, enquanto que a ativação de $p38^{MAPK}$ causou uma diminuição na expressão de genes ligados a este elemento (Yu et al., 1999; Yu et al., 2000). Estes estudos sugerem que a modulação da cascata de MAPKs por xenobióticos ou estresse oxidativo pode ser crítica na regulação de genes responsivos ao elemento ARE, sendo assim uma forma de regular a sobrevivência celular. Além disso, entre os mecanismos envolvidos nos efeitos pró apoptótico das MAPKs, foi demonstrado que a ativação de JNK por agentes antitumorais pode levar a fosforilação e inibição de Bcl-2 e liberação de citocromo C da mitocôndria, tornando as células mais suscetíveis ao estresse (Fan et al., 2001). Além disso, pode estimular a transcrição de produtos gênicos pró-apoptóticos entre eles, o $TNF\alpha$ (Fan et al., 2001).

1.5. Selênio e tumores

A relação entre Se e anticarcinogenicidade foi sugerida na década de 60, baseada na observação de uma relação inversa entre níveis de Se na população e número de mortes atribuídas a câncer. Sendo que os maiores níveis de Se foram encontrados na população de regiões cuja agricultura baseava-se em grãos e vegetais com maiores índices deste elemento (Shamberger e Frost, 1969). A partir deste período, muitos estudos em humanos têm demonstrado o papel antitumoral do Se em diferentes tumores, incluindo pulmonar, esofágico e cardio gástrico e de próstata (Zhuo et al. 2004; Wei et al., 2004; van den Brandt et al., 2003; Li et al. 2004).

Os efeitos antitumorais do Se são atribuídos em parte à produção *in vivo* de metabólitos de baixo peso molecular como CH_3SeH (metilselenol), que demonstrou apresentar potente atividade antitumoral em diversos estudos (Ip, 1998; Jiang et al. 1999; Ip et al. 2000; Whanger, 2004). São muitos os mecanismos associados ao efeito antitumoral do Se, entre estes a diminuição de dano ao DNA (Kowalska et al., 2005), diminuição do estresse oxidativo (Rayman, 2005) e de inflamação (Rayman, 2005) e inativação de PKC (Gopalakrishna e Gundimeda, 2002).

O estudo de compostos orgânicos de selênio sintéticos como agentes antitumorais em animais de laboratório foi primeiro demonstrado nos anos 80. Desde então, modificações em suas estruturas têm sido realizadas tornando estes compostos mais efetivos e menos tóxicos (El-Bayoumy, 1985; Reddy et al., 1985; Nogueira et al., 2004).

A modulação de vias de sinalização celular ocupa um papel importante nos mecanismos envolvidos na ação antitumoral de compostos de selênio. Foi demonstrado que tratamento de linhagem de células endoteliais humanas com MSeA (ácido metilselenínico), um precursor imediato do metilselenol, causou apoptose, diminuição da fosforilação de AKT, ERK e JNK1/2 e ativação de p38^{MAPK} (Wang et al., 2001). Em linhagem de câncer de próstata, MSeA aumentou a fosforilação de ERK1/2, sendo que a inibição desta proteína

estimulou a morte apoptótica destas células quanto submetidas ao tratamento com MSeA (Hu et al., 2005). Outro composto testado foi o benzilselenocianato, que inibiu a atividade de PKC e PKA em cultura de fibroblastos humanos (Foiles et al., 1995). O composto ebselen tem demonstrado ser capaz de modular vias de sinalização em diferentes modelos celulares. Em hepatocarcinoma humano, foi demonstrada ativação da transcrição de genes dependentes do fator NRF-2, sendo este processo dependente da ativação de ERK1/2 (Tamasi et al., 2004). Além disso, em células PC12, o ebselen estimulou a fosforilação de ERK1/2, sendo este efeito associado ao efeito citoprotetor do composto contra insulto com NO (Sarker et al., 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo expandir a pesquisa relacionada aos efeitos biológicos de compostos orgânicos sintéticos de Se no que diz respeito à neuroproteção, ação antidepressiva e atividade antitumoral. Dentro deste contexto, parâmetros como a modulação de MAPKs, estado redox celular e sistemas de neurotransmissores potencialmente envolvidos no mecanismo de ação destes compostos foram alvos de nossos estudos.

2.2. Objetivos específicos

- i) Padronizar um modelo de insulto oxidativo por H_2O_2 em fatias hipocâmpais de cérebro de rato e avaliar o possível efeito neuroprotetor do difenil disseleneto.
- ii) Avaliar o estado redox das fatias hipocâmpais após serem submetidas a tratamento com H_2O_2 e/ou difenil disseleneto com ênfase na concentração de tióis intracelular e atividade de enzimas antioxidantes, como a GPx;
- iii) Avaliar a modulação de MAPKs pelo tratamento com H_2O_2 e/ou difenil disseleneto;
- iv) Investigar o efeito da adição de tióis permeáveis e não permeáveis em relação à ação neuroprotetora do difenil disseleneto contra o H_2O_2 .
- v) Através de modelos animais preditivos da atividade antidepressiva de compostos, TNF e TSC, avaliar o efeito antidepressivo do composto ebselen.
- vi) Avaliar o envolvimento de sistemas monoaminérgicos (dopaminérgico, serotoninérgico, noradrenérgico) no efeito antidepressivo do ebselen pelo uso de antagonistas de receptores específicos.

- vii) Através do uso de linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y, investigar o possível efeito citotóxico do tratamento prolongado com difenil disseleneto através da análise de viabilidade celular e apoptose;
- viii) Avaliar a modulação de fosforilação de MAPKs e atividade de PKC pelo composto difenil disseleneto; Investigar o envolvimento de ERK1/2 no efeito antitumoral do composto através de inibidor específico desta proteína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com dois meses de idade, pesando aproximadamente 130 g. Os animais receberam água e comida *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas com temperatura entre 22 e 27 ° C.

Camundongos Swiss machos adultos pesando aproximadamente 40 g foram mantidos com livre acesso à água e comida, temperatura entre 22-27 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas. Estes eram mantidos em caixas com no máximo 20 camundongos, as quais eram colocadas no ambiente de experimentação 24 horas antes dos testes para climatização dos animais. A manipulação dos animais ocorreu entre 9:00 h e 17:00 h sendo cada animal testado apenas uma vez.

Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central (UFSC) e foram mantidos, manipulados e sacrificados em acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Processo 054/CEUA-UFSC).

3.2. Reagentes e drogas

β -mercaptoetanol, Ácido Bórico, Comassie Blue R-250, Glicina, Nitrocelulose, Persulfato de Amônia, SDS, Padrão de Peso Molecular, TEMED, Acrilamida, Bis-acrilamida, Tris, HEPES, MTT, anti-corpos secundários (IgG anti rabbit ou anti mouse) conjugados à peroxidase (HRP) e kit ECL foram obtidos da Amersham Pharmacia Bioscience[®]. Anti-PARP-1 foi obtido da Santa Cruz Biotechnology[®] Anti β -actina, NADPH, DTNB, GR (*S. cerevisiae*), DTT, GSH e anticorpos primários anti fosfo e total ERK1/2, tartarato de

cetanserina, 1-(2-metoxifenil)-4[-(2-ftalimido)butil]piperazina (NAN-190), *p*-clorofenilalanina metil ester (PCPA), sulpirida, prazosin, ioimbina, (R)-(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina hidrócloride (SCH23390) e fluoxetina foram obtidos da Sigma[®] (St. Louis, MO, USA). Anticorpo primário anti total JNK1/2 e GHS monoetil ester foram obtidos da Calbiochen[®] (U.S., Canada). Anti-corpos específicos para substratos fosforilados de PKA e PKC (Ser), anticorpo primário anti JNK1/2 e anti p38^{MAPK} total e fosforilada foram obtidos da Cell Signalling[®] (Beverly, MA, USA). A solução Fixadora e Reveladora e filme sensível à quimiluminescência Biomax foram obtidos da KODAK[®].

3.3. Equipamentos

Agitador Orbital BIOMIXER[®] modelo MOS-1, sistema de gel gradiente Amersham Pharmacia Biotech[®], balança analítica SCIEN TECH[®] modelo SA 12, espectrofotômetro MICRONAL[®] modelo B 382, fonte para eletroforese modelo EPS 301 e sistema de eletrotransferência semidry modelo TE70 da Amersham Pharmacia Biotech[®], leitor de Elisa WHITTAKER[®] modelo 2001, pH metro DIGIMED[®] modelo DM 20. Centrífuga Uniscience modelo Mikro 20, vortex FANEM[®], scanner Genius[®] modelo Color Page-Vivid III V2, sistema de captação de imagem Fuji[®] LAS 3000, espectrofotômetro Varian[®] modelo Cary 50.

3.4. Síntese de difenil disseleneto e ebselen

O composto difenil disseleneto foi sintetizado de acordo com Paulmier, 1986. Ebselen foi sintetizado de acordo com Engman (1989). A análise dos espectros de ¹H-NMR e ¹³C-NMR demonstraram que os compostos apresentaram dados analíticos e espectroscópicos de acordo com sua estrutura original. Estes compostos foram fornecidos pelo Prof. João Batista Rocha, Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.5. Preparação e tratamento de fatias hipocampais

Para a preparação de fatias hipocampais, os animais foram mortos por decapitação, em seguida os cérebros foram retirados a 4°C e os hipocampos dissecados e fatiados na espessura de 400 µm, utilizando um fatiador de tecidos de McIlwain. As fatias foram sempre mantidas em “cutting solution” (110 mM de sacarose, 60 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1,25 mM de KH₂PO₄, 0,5 mM de CaCl₂, 7 mM de MgSO₄, 5 mM de glicose, 25 mM de HEPES; pH 7.4).

As fatias hipocampais foram pré-incubadas individualmente em placa de ELISA durante 30 min em tampão HEPES-salina (124 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1.2 mM de MgSO₄, 12 mM de glucose, 1mM de CaCl₂ e 25 mM de HEPES; pH 7.4) previamente oxigenado por 30 min (300 µl/fatia).

Após o pré-tratamento, o tampão foi substituído por tampão fresco com ou sem H₂O₂ (2 mM) e difenil disseleneto (0-10 µM) e as fatias foram então incubadas por 1 h à 35 °C (figura 7; tratamento 1). Para outros ensaios, glutathione (GSH; 100 µM) ou ditioneitol (DTT; 100 µM) foi co-incubado com difenil disseleneto e H₂O₂ por 1 h (figura 7; tratamento 2). Em outra série de experimentos, GSH monoetilester (2 mM) foi adicionada durante o período de pré incubação. Após, o tampão foi removido e as fatias lavadas antes da adição de tampão contendo H₂O₂ (2 mM) e/ou difenil disseleneto (0,1, 1 ou 10 µM) (figura 7; tratamento 3). Difenil disseleneto foi solubilizado em etanol poucos minutos antes dos tratamentos, sendo a concentração final de etanol no tampão de incubação igual a 0,5 % e não alterando os parâmetros analisados neste estudo. Todos os demais reagentes foram dissolvidos no próprio tampão de incubação poucos minutos antes dos tratamentos.

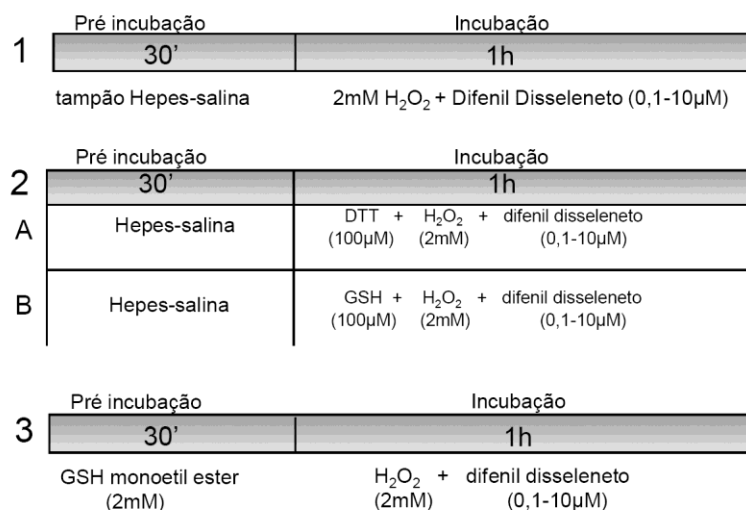


Figura 7. Diferentes tipos de tratamento aos quais foram submetidas as fatias hipocampais.

3.6. Viabilidade celular das fatias hipocampais

Finalizado os tratamentos, as fatias hipocampais ou culturas celulares foram incubadas com MTT (0,05 % em tampão HEPES-salina) por 30 min a 35 °C. O MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium = “Thiazolyl blue”) é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases (Liu et al., 1997). O formazam foi solubilizado com a adição de 200 μl de dimetil sulfóxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade óptica é medida em Leitor de ELISA ($\lambda=540$ nm).

3.7. Separação de proteínas das fatias hipocampais

Após os tratamentos, as fatias hipocampais foram transferidas para microtubos do tipo Eppendorf e solubilizadas em 100 μl de tampão de amostra (4% de SDS, 50 mM de Tris, 100 mM de EDTA, pH 6,8) e a seguir incubadas por 5 minutos à 90°C para completa solubilização. Após a retirada de 3μl de amostra para dosagem de proteína, foi adicionado β-mercaptoetanol (8% v/v). A seguir, foi adicionada a solução de diluição de amostra (40 % de

glicerol, 25 mM de Tris e Azul de Bromofenol; pH 6,8) na relação de 25:100 (solução de diluição: solução de solubilização). As proteínas (100 µg por poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), usando gel de separação 10% e gel de entrada com 4% de acrilamida/bis-acrilamida (Cordova *et al.*, 2004).

Para preparo dos géis foi utilizado um sistema de eletroforese em mini-gel utilizando espaçadores de 1 mm de espessura. Em cada placa adicionava-se a mistura de gel composta por 10% de acrilamida/bis-acrilamida na relação 37,5: 1(w/w), 375 mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,06% de TEMED e 0,036% de persulfato de amônia; pH 8,8). Após o preenchimento das placas, o gel permanecia em repouso durante 30 minutos para plena polimerização. Logo a seguir era adicionado o gel de entrada composto por 4% de acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1(w/w), 125mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,05% de TEMED e 0,1% de persulfato de amônia; pH 6,8. Sobre este gel foi colocado um pente de 10 dentes. Após 1 hora e 30 minutos eram aplicadas as amostras para separação. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 20 mA por placa e voltagem máxima de 140 V durante aproximadamente 2 horas, em temperatura ambiente, utilizando-se os tampões superior (190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% de SDS) e inferior (50 mM de Tris; pH 8.3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

3.8. Eletrotransferência

Após a eletroforese o gel foi incubado com tampão de equilíbrio (25 mM de Tris, 190 mM de glicina, 5 % de metanol e 0,1 % de SDS) por 30 minutos. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose através de um sistema semi-dry utilizando tampão de transferência (25 mM de Tris, 190 mM de glicina, 5 % de metanol) com uma corrente de 1,2 mA/cm² durante 1,5 h. Após a eletrotransferência, para controle da eficiência do processo de transferência os géis foram corados com solução de Comassie Blue [Comassie blue R-250 0,1% (p/v), metanol 50% (v/v), ácido acético 7% (v/v)]. As

membranas foram coradas com solução de Ponceau [Ponceau 0,5% (p/v) em ácido acético 1% (v/v)].

3.9. Imunodeteção

Após a eletrotransferência, as membranas foram lavadas com TBS (10 mM de Tris, 150 mM de NaCl; pH 7,5) por 5 minutos para retirar a marcação com Ponceau, e a seguir foram bloqueadas por 1 hora com 5 % de leite desnatado (Molico[®]) em TBS à temperatura ambiente. Após esse primeiro bloqueio, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05 %, 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl; pH 7,5) e submetidas a um segundo bloqueio de 1 hora usando uma solução de 2,5 % de gelatina (Royal[®] sem sabor) em TBS (Bobrovskaya *et al.*, 2001; Cordova *et al.*, 2004). As membranas foram novamente lavadas 3 vezes (5 minutos cada) com TBS-T, para finalmente serem incubadas com os anti-corpos primários: anti-ERK1/2 total (1:40.000), anti-p38^{MAPK} total (1:1.000), anti-JNK1/2 total (1:1.000) por um período de 2 horas a temperatura ambiente e com anti-fosfo-p38^{MAPK}(1:1000), anti-fosfo-ERK1/2 (1:10.000) e anti-fosfo-JNK1/2 (1:1.000) durante 12 horas a 4°C. Após as incubações, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T (3 vezes de 5 minutos) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anti-corpos secundários anti-rabbit (ligados à peroxidase). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas 3 vezes (5 minutos) com TBS-T e 2 vezes com TBS, sendo que as bandas correspondentes às respectivas proteínas foram reveladas através de kit ECL (quimiluminescência) (Cordova *et al.*, 2004), conforme demonstrado na figura 8. As medidas de fosforilação e imunoconteúdo das proteínas foram realizadas através de densitometria das bandas usando o programa Scion Image[®] versão Beta 3.

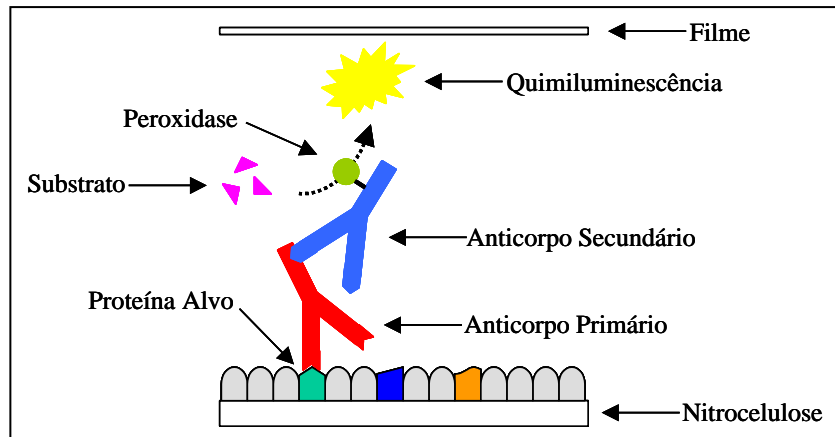


Figura 8. Imunodeteção de um polipeptídeo através de Quimiluminescência usando anticorpo específico.

3.10. Dosagem de proteínas

Para Western Blotting as proteínas foram dosadas através do método de Peterson (1977). Sobre alíquotas de 3 μ l das amostras foram adicionados 397 μ l de água e 400 μ l do reagente de Lowry (0,2 N de NaOH, 2,5 % de SDS, 5 % de Na₂CO₃, 0,2 % de CuSO₄ e 0,1 % de tartarato duplo de sódio e potássio). Após 10 minutos foram adicionados 200 μ l do reagente de Folin 0,4 N e as proteínas incubadas por 30 min. A leitura foi realizada em 750 nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA).

Para os demais experimentos a quantificação protéica foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

3.11. Peroxidação Lipídica

Os produtos finais da peroxidação lipídica foram determinados nas fatias hipocâmpais pelo método de Ohkawa et al., (1979) com algumas modificações o qual mede as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Após os tratamentos, um pool de 4 fatias hipocampais por grupo foi homogeneizado em tampão HEPES 20 mM, pH 7,0 e incubado com tampão ácido acético 450 mM/HCl; pH 3,4, 0,28 % de ácido tiobarbitúrico e 1,2 % de SDS por 60 min à 95°C levando à produção de cor, cuja leitura é feita em 532 nm. Foi utilizada uma curva de malonildialdeído (de zero a 3 nmol) como padrão. Os níveis de TBARS foram normalizados pela concentração protéica.

3.12. Níveis de Tióis

Os níveis de GSH foram dosados como tióis não protéicos de acordo com Ellman (1959), com algumas modificações (Franco et al., 2006). Ao término dos tratamentos, duas fatias por grupo experimental foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,5 mM e centrifugadas a 15.000 g por 2 min (4 °C). Uma alíquota do sobrenadante foi retirada e incubada por 20 min à temperatura ambiente em solução contendo 0,15 mM de DTNB e 0,5 M de Tris-HCl; pH 8,0 para a medida de GSH. O pellet foi lavado com 0,5 M de ácido perclórico e ressuspenso em 0,5 M de Tris-HCl/0,1 % de SDS; pH 8,0. Uma alíquota foi removida e incubada por 20 min à temperatura ambiente com 0,15 mM de DTNB, 0,5 M de Tris-HCl; pH 8,0 para a determinação dos tióis protéicos (PSH). Após a reação colorimétrica, foi medida a absorvância em 412 nm. A concentração de GSH e PSH foi estimada pelo coeficiente de extinção molar de $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.13. Atividade GPx

Para medir a atividade GPx, foram utilizadas 6 fatias por grupo experimental, as quais foram homogeneizadas em 20 mM de HEPES; pH 7,0. A atividade GPx foi determinada de acordo com método de Wendel (1981) que se baseia no consumo indireto de NADPH resultando na diminuição da absorvância em 340 nm, seguindo a degradação de tert butilhidroperóxido e consumo de GSH.

3.14. Preparação de cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e tratamentos

Utilizamos a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y (CRL-2266) proveniente do American Type Tissue Culture (<http://www.atcc.org>). As células foram crescidas em garrafas de 25cm² em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomicina, 4 mmol/l de L-glutamina, 15 mmol/l HEPES; pH 7.4. As células foram manipuladas esterilmente em fluxo laminar e mantidas em atmosfera com 95% de umidade, 5% de CO₂ e 37°C em meio completo trocado a cada 3-4 dias. Depois de atingir 80 % de confluência, as células foram incubadas (1 minuto, 25°C) em solução tripsina (0, 125% e EDTA 0,5mM) e tampão salina fosfato (PBS), pH 7,4 . A reação foi interrompida com a adição de meio de cultura contendo 5% de SFB. Após lavagem com PBS, as células foram contadas e semeadas na densidade de 40 × 10⁴ células (placas de 12 poços) ou 4 × 10⁴ células por poço em placa de 96 poços 48 horas antes dos tratamentos. O meio completo foi trocado por meio sem soro 1,5 h antes dos tratamentos. Para os tratamentos, foram utilizadas diferentes concentrações de difenil disseleneto (0,3, 3, 10 e 30 µM), que era diluído em etanol e aplicado diretamente sobre as células, de modo que a concentração final de etanol no meio não ultrapassasse 0,1 %. O inibidor da via de ERK1/2 (UO126; 10 µM) era adicionado 30 min antes da adição de difenil disseleneto e era diluído em DMSO. Quando o inibidor estava presente no meio de incubação das células, a concentração final de DMSO era de 0,2 %. Para cada condição de tratamento, foram feitos grupos controles apropriados.

3.15. Análise de apoptose e viabilidade celular

A indução de apoptose nas culturas de células SH-SY5Y submetidas ao tratamento com difenil disseleneto foi analisada pelos seguintes métodos: (1) *clivagem de PARP*: finalizados os tratamentos, as células foram solubilizadas com a adição de 2 % de SDS, 2 mM de EDTA, 1 % de ditioneitol, 10 mM de glicerol, 50 mM de Tris (pH 6,8). As proteínas

foram separadas por SDS-PAGE utilizando gel de separação 10 % e então eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram lavadas em tampão TBS-T e incubadas por 12 horas a 4 °C com anticorpo primário específico para PARP-1. Subsequentemente, as membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti rabbit (ligado à peroxidase). As bandas referentes à PARP-1 foram visualizadas no sistema de imagem Fuji LAS 3000, utilizando reagentes de detecção ECL-plus. O controle da quantidade de proteínas foi feito através do uso de anticorpo primário anti- β -actina. (2) *Iodeto de Propídio*: o ensaio para análise dos núcleos apoptóticos foi baseado no método de Nicoletti et al., 1991. Finalizados os tratamentos, as células foram lavadas com tampão salina e fosfato (PBS), ressuspendidas e coletadas para um tubo de poliestireno (12 × 75 mm) e centrifugadas a 200 × g. Posteriormente, 0,5 ml de tampão hipotônico (50 μ g/ml de iodeto de propídio em 0,1 % de citrato de sódio e 0,1 % de Triton X-100) foi adicionado ao pellet de células e os tubos mantidos no escuro, a 4 °C por 12 h antes de análise em citômetro de fluxo. A fluorescência do iodeto de propídio em núcleos individuais foi medida utilizando citômetro de fluxo FACscan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Foram analisadas no mínimo 10⁴ células por grupo de tratamento. Os núcleos apoptóticos são representados como um amplo pico de DNA hipodiplóide, distinguível do pico pontiagudo hiperdiploide representando o núcleo das células sem tratamento (controles).

3.16. Análise de fosforilação de proteínas em cultura de células

A análise de fosforilação e conteúdo de p38^{MAPK} e ERK1/2, bem como a fosforilação de substratos de PKC foi realizada pela técnica de Western Blotting. Ao término dos tratamentos, o meio foi removido e as células foram solubilizadas com a adição de 200 μ l de solução 2 % de SDS, 2 mM de EDTA, 1 % de ditioneitol, 10 mM de glicerol, 50 mM de Tris (pH 6,8) por poço. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE, em gel 10 % e então

eletrotransferida para membranas de nitrocelulose. As membranas foram lavadas em tampão TBS-T, submetidas ao bloqueio com BSA 0,5 % por 1 hora e incubadas por 12 horas a 4 °C com anticorpo primário específico para as formas fosforiladas e totais de p38^{MAPK} e ERK1/2 ou anticorpo primário específico para os substratos fosforilados de PKC. Subseqüentemente, as membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário (ligado à peroxidase). As proteínas foram visualizadas no sistema de imagem Fuji LAS 3000, utilizando reagentes de detecção ECL-plus. O controle da quantidade de proteínas foi feito através do uso de anticorpo primário anti-β-actina.

3.17. Tratamentos *in vivo*

Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) em um volume constante de 10 ml/kg de peso corporal, exceto o ebselen e SCH13390, que foram administrados por via subcutânea (s.c.), 10 ml/kg de peso corporal. As drogas foram dissolvidas em solução salina, exceto o ebselen, que foi dissolvido em óleo mineral, NAN-190 que foi diluído em salina contendo 1 % de Tween 80 e sulpirida que foi diluída em salina contendo 5 % de DMSO. Os animais controle receberam os veículos apropriados para cada tratamento. Com o intuito de investigar o possível efeito antidepressivo do ebselen, os animais foram tratados s.c. com ebselen (3-30 mg/kg) 30 min antes de serem submetidos aos testes. Para investigar o efeito antidepressivo do ebselen (10 mg/kg) ao longo do tempo, foi avaliado o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em grupos independentes de camundongos nos tempos 30, 60, 120 e 240 min após a administração de ebselen. Para avaliar o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do ebselen, os camundongos foram pré-tratados com PCPA (100 mg/kg; um inibidor da síntese de serotonina) ou veículo, uma vez por dia, durante 4 dias (Rodrigues et al., 2002; Kaster et al., 2005). Passado 24 horas da última administração de PCPA ou veículo, os animais foram tratados com ebselen (10 mg/kg), fluoxetina (32 mg/kg; como controle positivo) ou veículo e foram submetidos ao teste do nado forçado após 30 min. Foi também avaliado o envolvimento de diferentes

subtipos de receptores de serotonina (5-HT) no efeito do ebselen no teste do nado forçado. Para isto, camundongos foram pré-tratados com NAN-190 (0,5 mg/kg, um antagonista de receptor 5-HT_{1A}), cetanserina (5 mg/kg, um antagonista preferencial de receptor 5-HT_{2A}) ou veículo e após 30 min foi administrado ebselen (10 mg/kg) e após 30 min os animais foram submetidos ao teste do nado forçado. Para investigar o possível envolvimento dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico no efeito antidepressivo do ebselen no teste do nado forçado, os animais foram pré-tratados com prazosim (1 mg/kg, um antagonista do adrenoceptor α_1), ioimbina (1 mg/kg, um antagonista do adrenoceptor α_2), SCH23390 (0,05 mg/kg, um antagonista do receptor de dopamina, D1) ou sulpirida (50 mg/kg, um antagonista de receptor de dopamina D2) e após 30 min os animais receberam injeção de ebselen (10 mg/kg) ou veículo e foram submetidos ao teste do nado forçado após 30 min. As drogas e doses utilizadas neste estudo estiveram baseadas em estudos prévios (Redrobe e Bourin, 1997; O'Neill e Conway, 2001; Rodrigues et al., 2002; Yamada et al., 2004; Kaster et al., 2005, 2007) e não apresentaram efeito *per se* nos parâmetros comportamentais analisados.

3.18. Teste do nado forçado

O teste do nado forçado foi realizado em um cilindro plástico com 25 cm de altura e 10 cm de diâmetro, contendo 19 cm de água a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e é baseado na observação de roedores colocados dentro de um cilindro inescapável preenchido com água. Inicialmente o roedor demonstra movimentos vigorosos visando o escape, porém, dentro de minutos, o animal ficará imóvel. O tempo de imobilidade é cronometrado durante 6 minutos. O camundongo é considerado imóvel quando flutua ou faz movimentos necessários apenas para manter sua cabeça acima da água. Uma diminuição no tempo de imobilidade é indicativa de efeito antidepressivo (Porsolt et al., 1977).



Figura 9. Teste do nado forçado

3.19. Teste de suspensão da cauda

A avaliação do tempo de imobilidade pelo teste de suspensão da cauda foi feita conforme o método descrito por Steru et al., 1985, onde os animais foram isolados acusticamente e visualmente e suspensos 50 cm acima do chão por meio de fita adesiva colocada a 1 cm da ponta da cauda. O tempo de imobilidade foi cronometrado durante 6 min (Rodrigues et al., 2002; Machado et al., 2007).



Figura 10. Teste de suspensão da cauda

3.20. Teste do campo aberto

A ambulação dos animais foi avaliada no teste do campo aberto como foi previamente descrito (Rodrigues et al., 1996). O aparato do campo aberto consiste de uma caixa de madeira medindo 40×60×50 cm. O assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais. O

número de quadrados cruzados com todas as patas (cruzamentos) foi contado durante sessão de 6 min.



Teste do Campo Aberto

3.21. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como percentagem do controle (considerado 100 %) e foram apresentados como média \pm E.P de todos os experimentos. Os dados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de Duncan. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Os dados comportamentais são expressos como média \pm E.P. A análise dos dados foi realizada através de ANOVA de duas vias, exceto nos estudos de dose resposta e curva de tempo, nos quais foi aplicada ANOVA de uma via. Em todas as análises, o teste *post hoc* de Newman-Keuls foi aplicado quando apropriado. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da viabilidade celular e metabolismo redox celular em fatias hipocâmpais incubadas com H₂O₂ e proteção por difenil disseleneto

Baseado no fato de que EROs são mediadoras de muitos processos neurotóxicos (Finkel e Holbrook, 2000) neste estudo foi investigado os danos celulares causados pela exposição de fatias hipocâmpais ao H₂O₂ e a capacidade neuroprotetora do composto orgânico de Se, difenil disseleneto, bem como seu possível mecanismo de ação. Para isto, fatias hipocâmpais de ratos adultos foram incubadas por 1 hora com H₂O₂ (2 mM) na presença ou ausência do composto orgânico de selênio difenil disseleneto (0,1, 1,0 e 10 µM) ao longo do período de incubação. Ao término do tratamento, a viabilidade das fatias foi avaliada através do teste de redução do composto MTT. Além disso, a lipoperoxidação da fatias, medida através dos níveis de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), também foi analisada.

De acordo com a figura 11A, o tratamento com difenil disseleneto não alterou a viabilidade das fatias, mesmo quando incubado por até 2 horas e em concentrações mais elevadas (30 e 100 µM). Entretanto, o tratamento com 2 mM de H₂O₂ por 1 hora causou uma redução significativa (aproximadamente 25 %) na viabilidade das fatias, sendo que este efeito foi revertido quando as fatias foram co-incubadas com H₂O₂ e difenil disseleneto (10 µM) (figura 11B).

Quando avaliado os níveis de peroxidação lipídica, foi observado que as fatias hipocâmpais tratadas com H₂O₂ apresentaram um aumento de 60% nos níveis de TBARS (figura 11C), sendo que este efeito foi completamente evitado com a co-incubação com difenil disseleneto a partir de 1 µM.

Em ensaios paralelos (tabela 2), foi determinado o estado redox celular pela medida da atividade da enzima GPx, conteúdo de GSH e de tióis protéicos (PSH). Como pode ser

observado na tabela 2, o tratamento com H_2O_2 causou uma diminuição de 23% no conteúdo de glutathiona intracelular, sendo este efeito parcialmente revertido pela co-inubação com difenil disseleneto. Entretanto, não foi verificada alteração na atividade da enzima GPx, nem do conteúdo de tióis protéicos frente aos tratamentos.

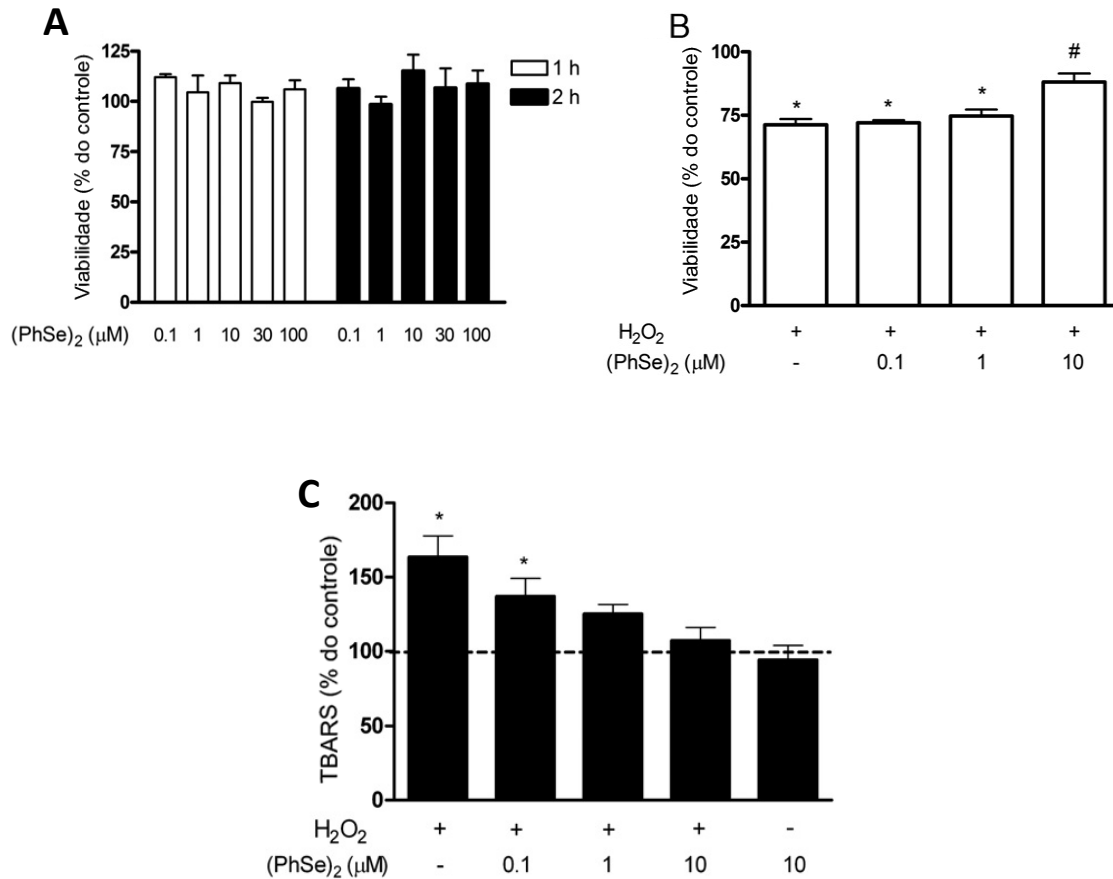


Figura 11. Efeito do difenil disseleneto sobre a viabilidade e seu papel protetor em fatias hipocâmpais submetidas ao insulto com H₂O₂. Fatias hipocâmpais foram incubadas somente com difenil disseleneto (0,1 -100 μM) por 1 ou 2 horas (A) ou pelo período de 1 hora com H₂O₂ (2mM) na presença ou não de difenil disseleneto (0,1, 1 ou 10 μM) (B e C) após os tratamentos a viabilidade das fatias foi avaliada através do teste do MTT e a lipoperoxidação pela medida dos níveis de TBARS. (A) Mostra o efeito do difenil disseleneto sobre a viabilidade celular. (B) Mostra a ação citotóxica do H₂O₂ e o efeito neuroprotetor de difenil disseleneto. (C) Mostra os níveis de lipoperoxidação em resposta à exposição ao H₂O₂ e o efeito protetor do difenil disseleneto. Os níveis de lipoperoxidação para o grupo controle foi 3,02 ± 0,18 nmol de TBARS/mg de proteína. Os dados estão representados em percentagem do controle (fatias não incubadas com difenil disseleneto) e expressam a média ± D.P. de todos os experimentos, n=8-12. *P<0,001 comparado com o grupo controle; # P<0,05 comparado com o grupo controle e P<0,01 comparado aos demais grupos.

<i>(PhSe)₂</i> μ M	<i>H₂O₂</i>	GSH	PSH	GPx
0	2mM	77.2 \pm 6.5*	100.7 \pm 5.4	91.1 \pm 4.5
0.1	2mM	81.5 \pm 7.2 [#]	96.99 \pm 14.4	95.2 \pm 19.5
1	2mM	86.0 \pm 9.0 [#]	102.9 \pm 16.7	101.5 \pm 10.6
10	2mM	86.0 \pm 9.0 [#]	102.9 \pm 16.7	101.5 \pm 10.6
10	0	93.56 \pm 0.05	94.52 \pm 13.83	116.65 \pm 15.31

Tabela 2. Efeito do tratamento com difenil disseleneto e H_2O_2 na atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) e conteúdo de tióis protéicos (PSH) e não protéicos (GSH total) em fatias hipocâmpais. Os resultados são expressos como percentagem em relação ao grupo controle (sem tratamento) e representa a média \pm D.P. de 5-8 experimentos independentes. Os valores de GSH total e PSH obtidos para o grupo controle foram $37,9 \pm 3,8 \mu$ M/fatia e $68,6 \pm 6,5 \mu$ M/fatia, respectivamente. O valor da atividade da enzima GPx obtido no grupo controle foi $11,06 \pm 3,9$ um/mg proteína. * $P < 0,0001$ em relação ao grupo controle. # $P < 0,0001$ em relação ao grupo H_2O_2 e grupo controle.

4.2. Estudo dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na proteção pelo composto difenil disseleneto

O composto difenil disseleneto exibe atividade mimética da GPx, através da qual, promove a degradação de peróxidos através do consumo de tióis, entre estes GSH e DTT (Nogueira et al., 2004).

Neste sentido, foi investigado o efeito da adição de compostos tiólicos juntamente com difenil disseleneto sobre a proteção de fatias hipocâmpais expostas a insulto com H₂O₂. Observou que a adição GSH (100 µM) juntamente com difenil disseleneto, reverteu a queda de viabilidade causada pelo H₂O₂ (2 mM) na concentração de 10 µM do composto. Adicionalmente, houve uma reversão parcial da queda de viabilidade na concentração de 1 µM de difenil disseleneto quando adicionado GSH ao meio, como pode ser observado na figura 12A. Paralelamente, quando adicionado o composto tiólico DTT (ditiotreitól; 100 µM) (figura 12B) junto ao tratamento de difenil disseleneto, foi observada uma proteção total da queda de viabilidade promovida pelo H₂O₂ a partir da concentração de 1 µM do organocalcogênio e uma proteção parcial pelo composto na concentração de 0,1 µM. Estes dados apontam para uma melhora no efeito protetor do composto ao insulto com H₂O₂ quando compostos tiólicos estão presentes no tampão de incubação.

Estudos prévios demonstraram que a utilização de forma esterificada de GSH aumentou significativamente os níveis intracelulares deste tiol em culturas celulares mesencefálicas e *in vivo*, enquanto que o tratamento com GSH não esterificada, não foi capaz de aumentar a concentração intracelular de GSH (Zeevalk et al., 2006). No presente trabalho, como forma de aumentar os níveis intracelulares de GSH, as fatias hipocâmpais foram pré-incubadas (30 min) com glutathione mono etil ester GSHEE, 2 mM e ao final deste período, o meio foi removido e substituído pelo meio com H₂O₂ e difenil disseleneto. O conteúdo intracelular de GSH foi medido, após a pré-incubação (figura 12D) e observou-se um substancial aumento na concentração intracelular de GSH. Apesar disso, os resultados

mostraram que o aumento dos níveis intracelulares de GSH não causou melhora no efeito protetor do difenil disseleneto (figura 12C) como observado com a GSH não esterificada e DTT adicionados juntamente com o composto.

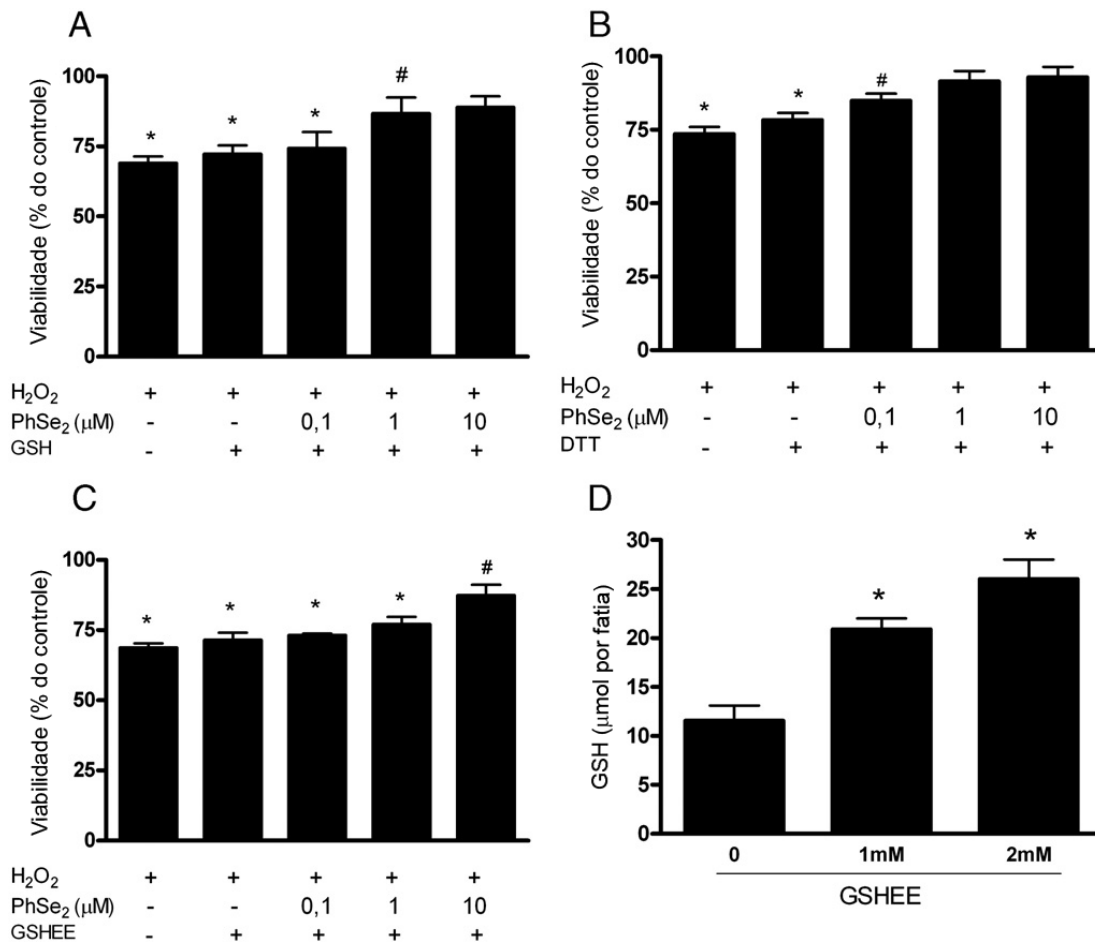


Figura 12. Efeito da adição de compostos tiólicos, DTT, GSH e GSH monoetil ester (GSHMEE), junto ao tratamento com difenil disseleneto e H₂O₂, sobre a viabilidade celular de fatias hipocâmpais. Fatias hipocâmpais foram incubadas com GSH (100 μM) (A) ou DTT (100 μM) (B) juntamente com difenil disseleneto e H₂O₂ por 1 hora. Alternativamente, fatias hipocâmpais foram pré-incubadas com 2 mM de GSHMEE por 30 min e após, submetidas ao tratamento com difenil disseleneto e H₂O₂ (C). Ao final dos tratamentos a viabilidade das fatias foi avaliada através do teste do MTT. (A, B, C) Mostra o efeito da adição de tióis ao tratamento com difenil disseleneto e H₂O₂ sobre a viabilidade das fatias hipocâmpais. Os resultados estão expressos como percentagem em relação ao controle (sem tratamento) e representam a média de 5-8 experimentos (média ± D.P.). *P<0,0001 em relação ao grupo controle. #P<0,0001 em relação ao grupo H₂O₂ e controle. O conteúdo intracelular de GSH foi medido (D) após o pré-tratamento das fatias com GSHMEE (30 min). Os resultados são expressos em μM GSH/slice e representam a média ± D.P. de 2 experimentos independentes em duplicata. *P<0,05 em relação ao grupo controle (sem tratamento).

4.3. Análise da fosforilação de MAPKs em resposta ao tratamento de fatias hipocâmpais com H₂O₂ e difenil disseleneto

A fosforilação de MAPKs em resposta ao estresse oxidativo foi demonstrada em uma variedade de estudos (Kamata e Hirata, 1999), além disso, a fosforilação de ERK parece estar diretamente relacionada à indução de morte celular por insultos oxidativos (Park et al., 2005; Seo et al., 2001; Chu et al., 2004).

Neste contexto, foi analisado o efeito do tratamento com H₂O₂ sobre o nível de fosforilação das MAPKs ERK1/2, JNK1/2 e p38^{MAPK} em três diferentes períodos de incubação (15, 30 e 60 min). A fosforilação de ERK1/2, p38 e JNK1/2 foram analisadas pela técnica de Western Blotting. H₂O₂ estimulou a fosforilação de ERK1/2 após 15 min de incubação (figura 13 A), mas este efeito não foi mais observado após 30 min ou 60 min de incubação. Por outro lado, o tratamento com H₂O₂ não alterou os níveis de fosforilação de JNK1/2 e p38^{MAPK} em nenhum dos períodos testados (figura 3A).

Foi então analisado o efeito da co-incubação de H₂O₂ com difenil disseleneto sobre a fosforilação de ERK1/2 após 15 min de tratamento. Conforme observado na figura 14B, a co-incubação com o organocalcogênio bloqueou o efeito do H₂O₂ sobre a fosforilação de ERK1/2. Difenil disseleneto isoladamente não alterou a fosforilação de ERK1/2 após 15 min de incubação, mesmo quando utilizado em concentrações mais elevadas (figura 13B). Além disso, com o intuito de verificar o possível efeito modulatório do difenil disseleneto sobre a fosforilação de MAPKs, fatias hipocâmpais também foram incubadas por 1 hora com diferentes concentrações do composto (10-100 µM). Entretanto, o tratamento com difenil disseleneto *per se* não alterou os níveis de fosforilação destas proteínas (figura 13C).

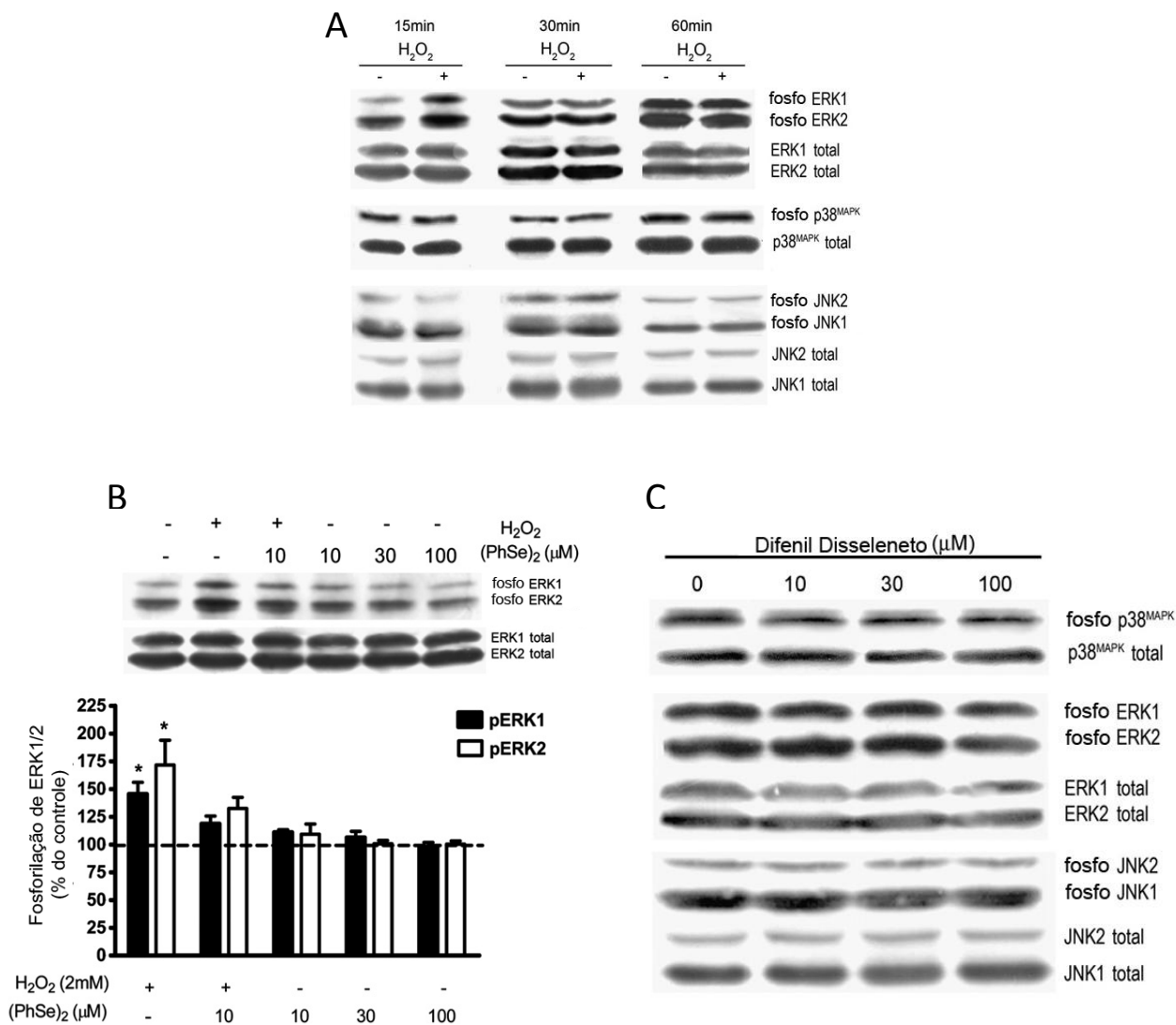


Figura 13. Efeito do tratamento com difenil disseleneto e/ou H₂O₂ sobre a fosforilação de MAPKs. Fatias hipocâmpais foram incubadas por 15, 30 e 60 min com H₂O₂ (2 mM) e/ou difenil disseleneto em diversas concentrações. Ao término de cada tratamento, as fatias foram solubilizadas em solução de lise para eletroforese. A fosforilação de p38^{MAPK}, ERK1/2 e JNK1/2, bem como suas respectivas formas totais, foram avaliadas por Western Blotting utilizando anti-corpos específicos. Cada figura é representativa de 4 experimentos independentes. (A) Mostra o efeito de H₂O₂ sobre a fosforilação de MAPKs em diferentes períodos de incubação. (B) Mostra que o difenil disseleneto reverteu o efeito de H₂O₂ sobre a fosforilação de ERK1/2. Neste caso, as fatias hipocâmpais foram incubadas por 15 min com H₂O₂ (2 mM) na presença de diferentes concentrações de difenil disseleneto (10-100 μM). (C) Avalia a ação do difenil disseleneto isoladamente sobre a fosforilação de MAPKs após 1h de incubação. Os resultados são expressos em percentagem em relação ao grupo controle (sem tratamento) e representam a média ± D.P. de 4 experimentos independentes. *P<0,01 em relação ao grupo controle.

4.4. Estudo do possível efeito antidepressivo do ebselen

A utilização de modelos animais foi de grande valia para o progresso das pesquisas relacionadas ao estudo da depressão. Dentre estes modelos, o teste do nado forçado (TNF) (Figura 10) é o mais utilizado. Outro teste relacionado é o teste de suspensão da cauda (TSC) (Figura 11). Estes modelos têm sido amplamente utilizados na descoberta de novos antidepressivos e são validados pelo fato de que, a administração de diversas classes de antidepressivos clinicamente efetivos leva a comportamentos dirigidos ao escape por períodos maiores do que quando administrado o respectivo veículo (Porsolt et al.,1977; Cryan et al., 2002; Petit-Demouliere et al., 2005; Cryan et al.,2005).

Através do TNF foi avaliado o possível efeito antidepressivo do ebselen após administração s.c. de 10-30 mg/kg do composto. Ebselen levou a uma diminuição significativa no tempo de imobilidade dos camundongos entre 10-20 mg/kg. Este efeito não foi observado nas doses mais baixas (3 e 5 mg/kg) e mais alta do composto (30 mg/kg) (Figura 14 A). Quando avaliado no teste de suspensão da cauda, ebselen (3-30 mg/kg) não afetou o tempo de imobilidade dos animais (Figura 14C). A administração de ebselen (3-30 mg/kg; s.c.) não alterou a ambulação dos camundongos quando avaliada no teste do campo aberto (figura 15B). Demonstrando que a diminuição no tempo de imobilidade causada pelo ebselen, não foi atribuída a uma alteração na locomoção destes animais. Como a dose de 10 mg/kg foi a mais efetiva, nós utilizamos esta dose para a realização dos demais experimentos.

O efeito antidepressivo do ebselen foi avaliado ao longo de diferentes períodos por meio de uma curva de tempo. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado 30, 60, 120 e 240 min após a administração de ebselen. O efeito antidepressivo do composto foi observado logo após 30 min da sua administração e manteve-se estatisticamente significativo até 120 min (Figura 14D).

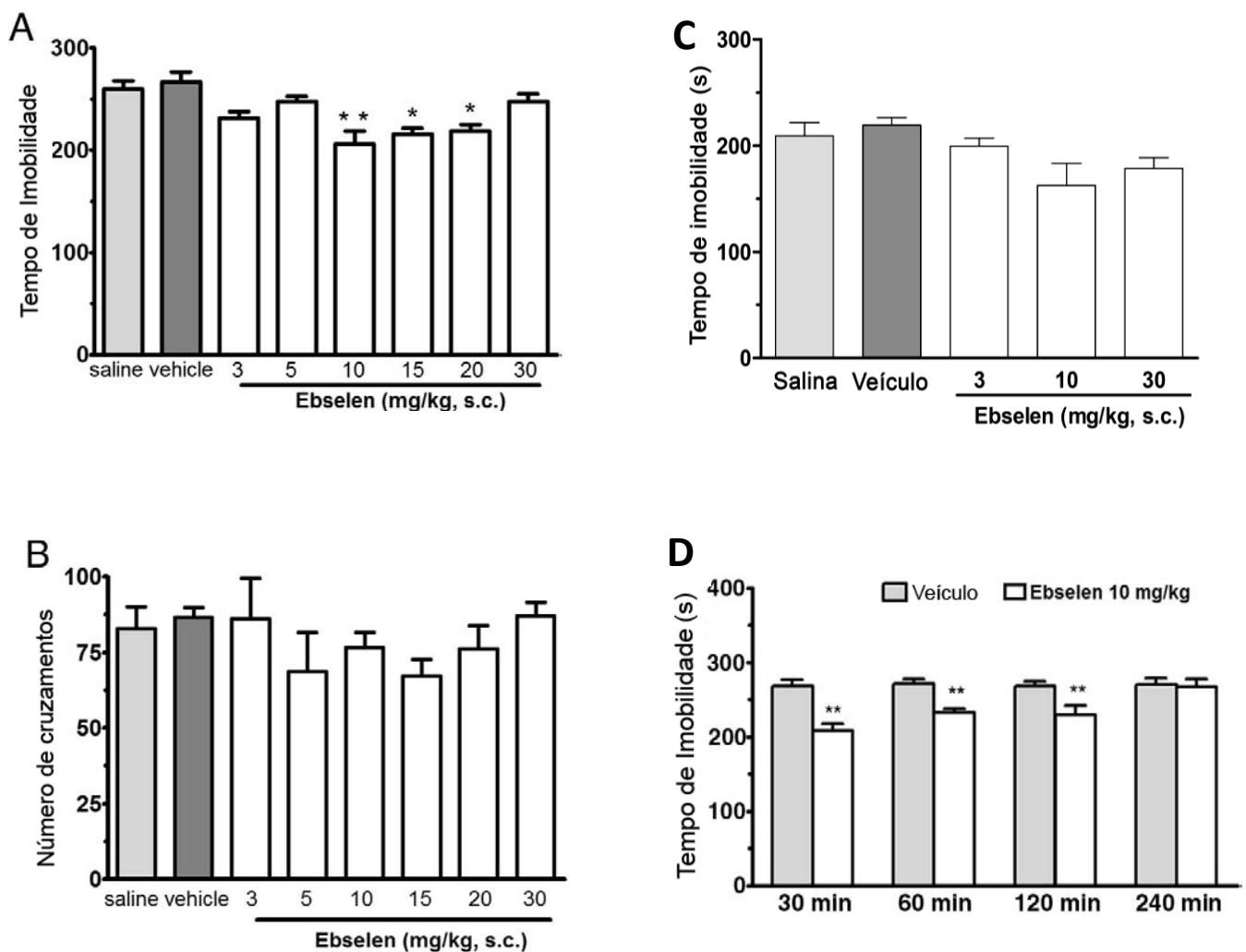


Figura 14. Efeito da administração do ebselen (3-30 mg/kg; s.c.) no TNF (A), campo aberto (B), TST (C) e curva de tempo do efeito anti-imobilidade do ebselen no TNF (D). Ebselen foi administrado 30 min antes dos testes. Para a realização da curva de tempo, ebselen (10 mg/kg; s.c.) foi administrado 30, 60, 120 e 240 min antes do TNF. Os valores são expressos como a média \pm E.P; $n=7-9$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo tratado com veículo.

4.5. Estudo de mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo do ebselen no teste do nado forçado

4.5.1. Estudo do envolvimento do sistema serotoninérgico

O sistema serotoninérgico ocupa um papel central na depressão e consiste no principal alvo da ação de antidepressivos (Millan, 2004; Ansorge et al., 2007).

Tendo isto em vista, para investigar o possível envolvimento deste sistema no efeito antidepressivo do ebselen, camundongos foram pré-tratados com um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, o PCPA, que depleta os níveis de serotonina endógena (Eckeli et al., 2000; Page et al., 1999). Como verificado na figura 15A, o pré-tratamento com PCPA não reverteu o a diminuição no tempo de imobilidade causada pelo tratamento com ebselen (10 mg/kg) no TNF. Entretanto, a inibição da síntese de serotonina com PCPA bloqueou completamente o efeito antidepressivo da fluoxetina (32 mg/kg), a qual foi utilizada como um controle positivo. Paralelamente, o pré-tratamento com antagonistas de receptores serotoninérgicos 5HT_{1A} (NAN-190) (figura 15B) ou 5HT_{2A} (cetanserina) (figura 15C) não reverteram o efeito antidepressivo do ebselen no TNF sugerindo um não envolvimento deste sistema na ação do ebselen.

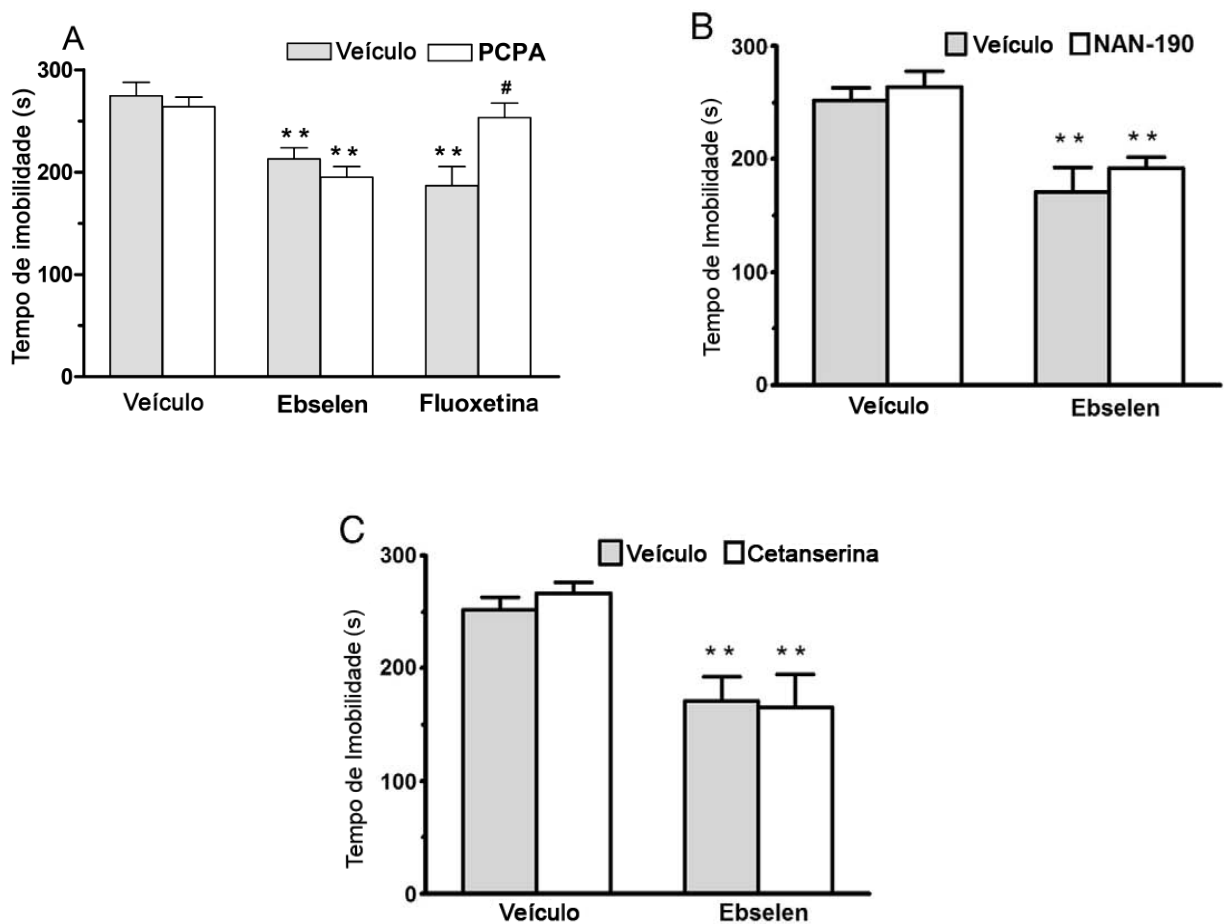


Figura 15. Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg; i.p; por 4 dias consecutivos) (A), NAN-190 (0,5 mg/kg; i.p.) (B) e cetanserina (5 mg/kg; i.p.) (C) sobre a diminuição do tempo de imobilidade causada pelo ebselen (10 mg/kg; s.c.) no TNF. Os valores são expressos como a média \pm E.P; n=5-8. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle tratado com veículo. # $p < 0,01$ em relação ao mesmo grupo pré-tratado com veículo.

4.5.2. Estudo do envolvimento do sistema noradrenérgico

Algumas drogas antidepressivas aumentam a concentração sináptica de noradrenalina ou atuam diretamente em receptores noradrenérgicos (Elhwuegi, 2004).

Com o intuito de investigar a participação do sistema noradrenérgico no efeito anti- imobilidade do ebselen, camundongos foram pré-tratados com antagonista do adrenoceptor α_1 , o qual causou reversão do efeito antidepressivo do ebselen (figura 16A). Paralelamente, o envolvimento do receptor α_2 foi também analisado, através do pré-tratamento com o antagonista deste receptor, ioimbina, que também reverteu o efeito antidepressivo causado pelo tratamento com ebselen no TNF (figura 16B), apontando para um envolvimento deste sistema no mecanismo de ação do ebselen.

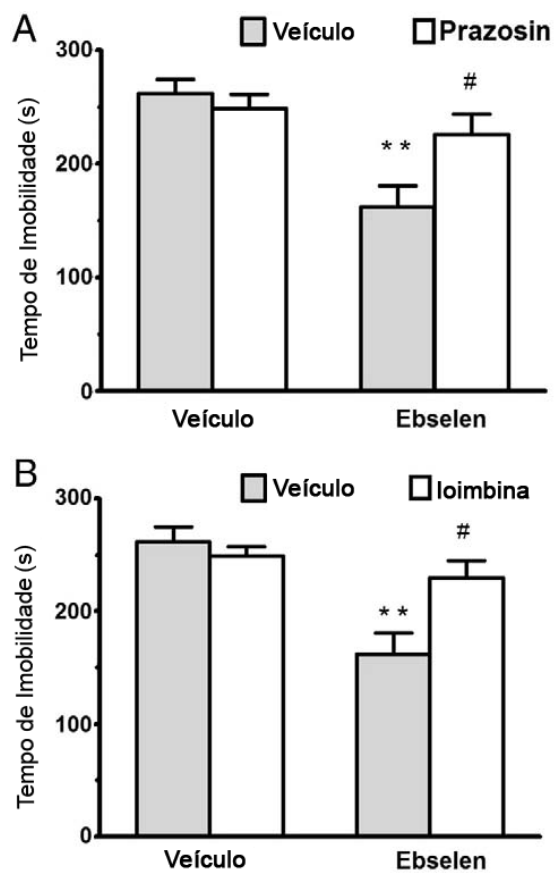


Figura 16. Efeito do pré-tratamento com prazosim (1 mg/kg; i.p.) (A) ou ioimbina (1 mg/kg; i.p.) (B) sobre a diminuição do tempo de imobilidade causada pelo ebselen (10 mg/kg; s.c.) no TNF. Os valores são expressos como a média \pm E.P; n=5-7. ** p < 0,01 em relação ao grupo controle tratado com veículo. # p < 0,01 em relação ao mesmo grupo pré-tratado com veículo.

4.5.3. Estudo do envolvimento do sistema dopaminérgico

Embora a maioria dos antidepressivos prescritos atue via neurotransmissão serotoninérgica ou noradrenérgica, um crescente número de estudos sugere que o sistema dopaminérgico representa um importante alvo terapêutico no tratamento da depressão (D'Aquila et al., 2000; Papakostas, 2006).

Neste estudo, nós avaliamos o envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito depressivo do ebselen através do pré-tratamento dos camundongos com antagonistas dos receptores D1 e D2. Conforme visualizado na figura 17A, o pré-tratamento com SCH23390, um antagonista do receptor D1, e sulpirida, um antagonista do receptor D2 (figura 17B), bloqueou o efeito antidepressivo causado pelo ebselen, sugerindo o envolvimento do sistema dopaminérgico no mecanismo de ação do calcogênio.

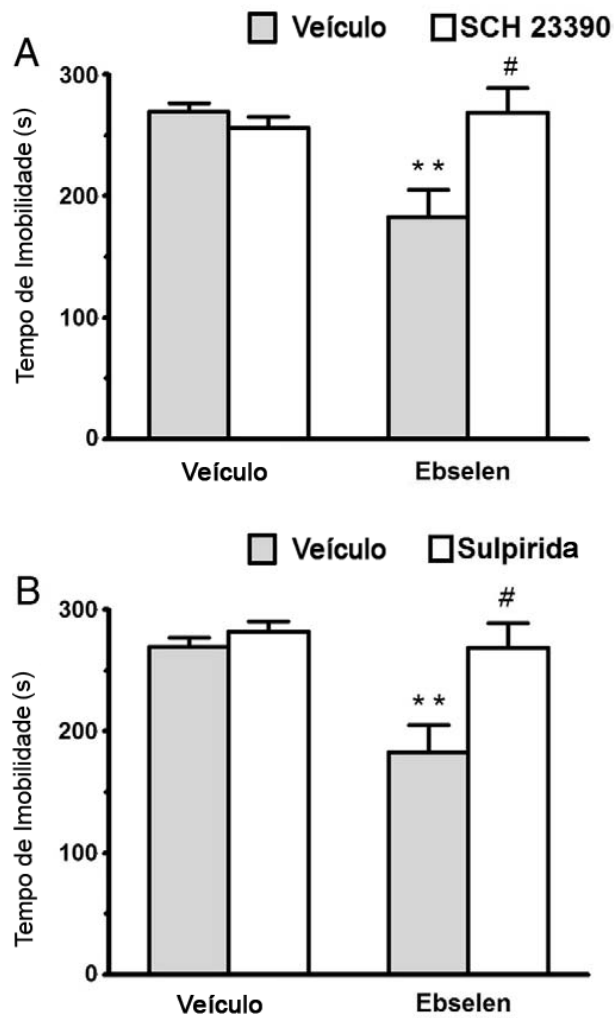


Figura 17. Efeito do pré-tratamento com SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c.) (A) ou sulpiride (50 mg/kg, i.p. (B) sobre a diminuição do tempo de imobilidade causada pelo ebselen (10 mg/kg; s.c.) no TNF. Os valores são expressos como a média \pm E.P; n=5-6. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle tratado com veículo. # $p < 0,01$ em relação ao mesmo grupo pré-tratado com veículo.

4.6. Efeito do difenil disseleneto sobre a viabilidade celular e clivagem de PARP em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Culturas celulares da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram incubadas por 24 horas na presença ou ausência de difenil disseleneto (0,3-30 μM) em meio sem soro fetal bovino. Após os tratamentos, foi avaliada a viabilidade celular por meio do teste do MTT. O tratamento com difenil disseleneto diminuiu em 25 % e 60 % a viabilidade celular quando nas concentrações de 10 μM e 30 μM , respectivamente (Figura 18A).

PARP, uma poli (ADP-ribose) polimerase nuclear de 116 kDa, está envolvida no reparo ao DNA em resposta ao estresse, ajudando a manter a viabilidade celular. Sendo um dos principais alvos de caspase-3, a clivagem de PARP em fragmento de 89 kDa é considerada marcador de células em processo apoptótico (Satoh e Lindahl, 1992). Neste estudo, foi verificado que o tratamento por 24 horas com difenil disseleneto causou clivagem de PARP, em fragmento de 89 kDa, a partir da concentração de 3 μM (Figura 18B).

Além disso, através da marcação com iodeto de propídio e análise em citômetro de fluxo, confirmou-se o dano apoptótico pelo aumento dependente de concentração no número de células apoptóticas (18C).

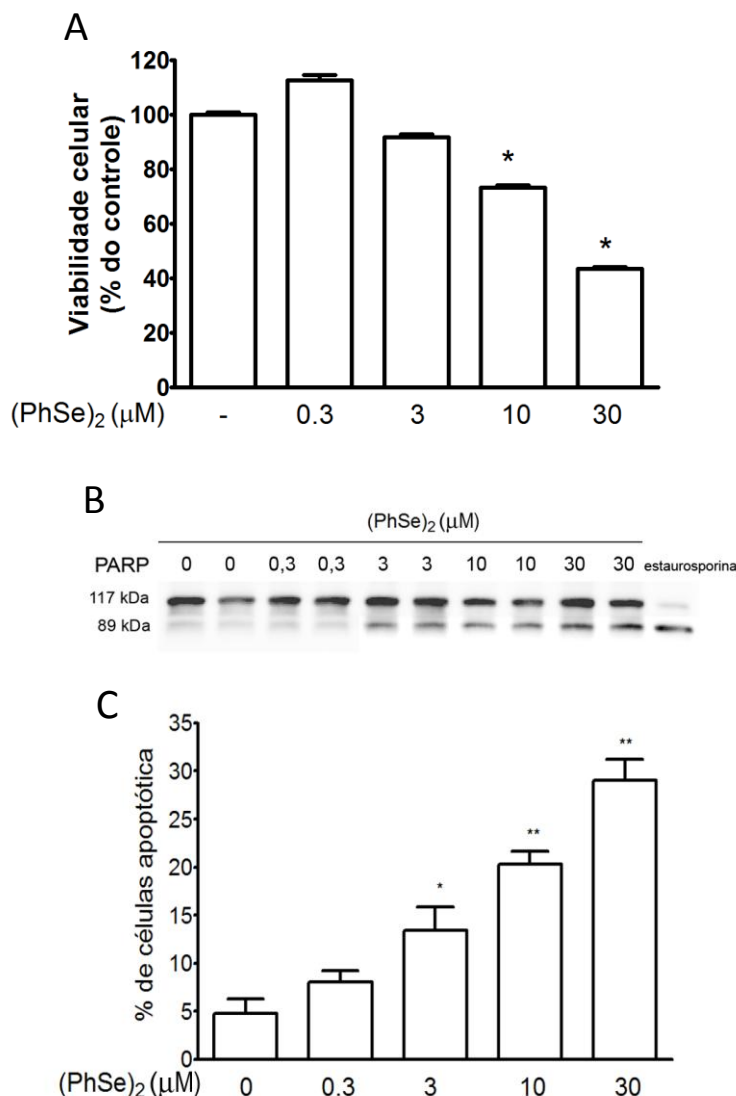


Figura 18. Efeito do tratamento com difenil disseleneto sobre a viabilidade celular. Culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de difenil disseleneto (0,3-30 μM). Ao término do tratamento, as células foram utilizadas para análise da viabilidade celular através do teste do MTT. Em paralelo a morte apoptótica foi avaliada através de incubação das células com iodeto de propídio e a análise em citometro de fluxo. A clivagem de PARP foi analisada através de Western Blotting, para isso, ao término do tratamento, as células foram solubilizadas em solução de lise para eletroforese e a clivagem de PARP foi avaliada pelo uso de anti-corpos específicos. (A) Mostra o efeito do tratamento com difenil disseleno sobre a redução do MTT, um índice de viabilidade celular. (B) Mostra a clivagem da proteína PARP após o tratamento com diferentes concentrações de difenil disseleneto; a figura é representativa de 4 experimentos realizados independentemente em duplicata. (C) Representa a percentagem de células apoptóticas após o tratamento com o calcogênio. (A,C) Os resultados são expressos em percentagem em relação ao grupo controle (sem tratamento) e representam a média ± E.P. de 4 experimentos independentes. * P<0,05 em relação ao grupo controle. ** P<0,01 em relação ao grupo controle.

4.7. Efeito do tratamento com difenil disseleneto na fosforilação das MAPKs ERK1/2 e p38^{MAPK} e substratos de PKC.

Culturas celulares da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram incubadas por 24 horas com ou sem difenil disseleneto (0,3-30 μ M) em meio sem soro fetal bovino. A fosforilação e conteúdo das proteínas da família MAPK, ERK1/2 e p38^{MAPK}, bem como fosforilação dos substratos de PKC, foi avaliada após os tratamentos, através da técnica de Western Blotting. Foi observado que o tratamento com 30 μ M de difenil disseleneto inibiu os níveis de fosforilação de p38^{MAPK} sem alterar o conteúdo desta proteína (Figura 19A).

Na concentração de 3 μ M, difenil disseleneto estimulou os níveis de fosforilação de ERK 2. Entretanto houve inibição na fosforilação desta enzima nas concentrações de 10 e 30 μ M do calcogênio, sem alterar, entretanto, a expressão desta proteína (figura 19B). Paralelamente, a fosforilação de substratos de PKC, como um índice da atividade da proteína, foi avaliada através do uso de anti-corpos específicos. Observou-se que o tratamento com difenil disseleneto (10-30 μ M) inibiu a fosforilação de substratos de PKC, entre eles, os de peso molecular 117, 90 e 35 kDa (figura 19C).

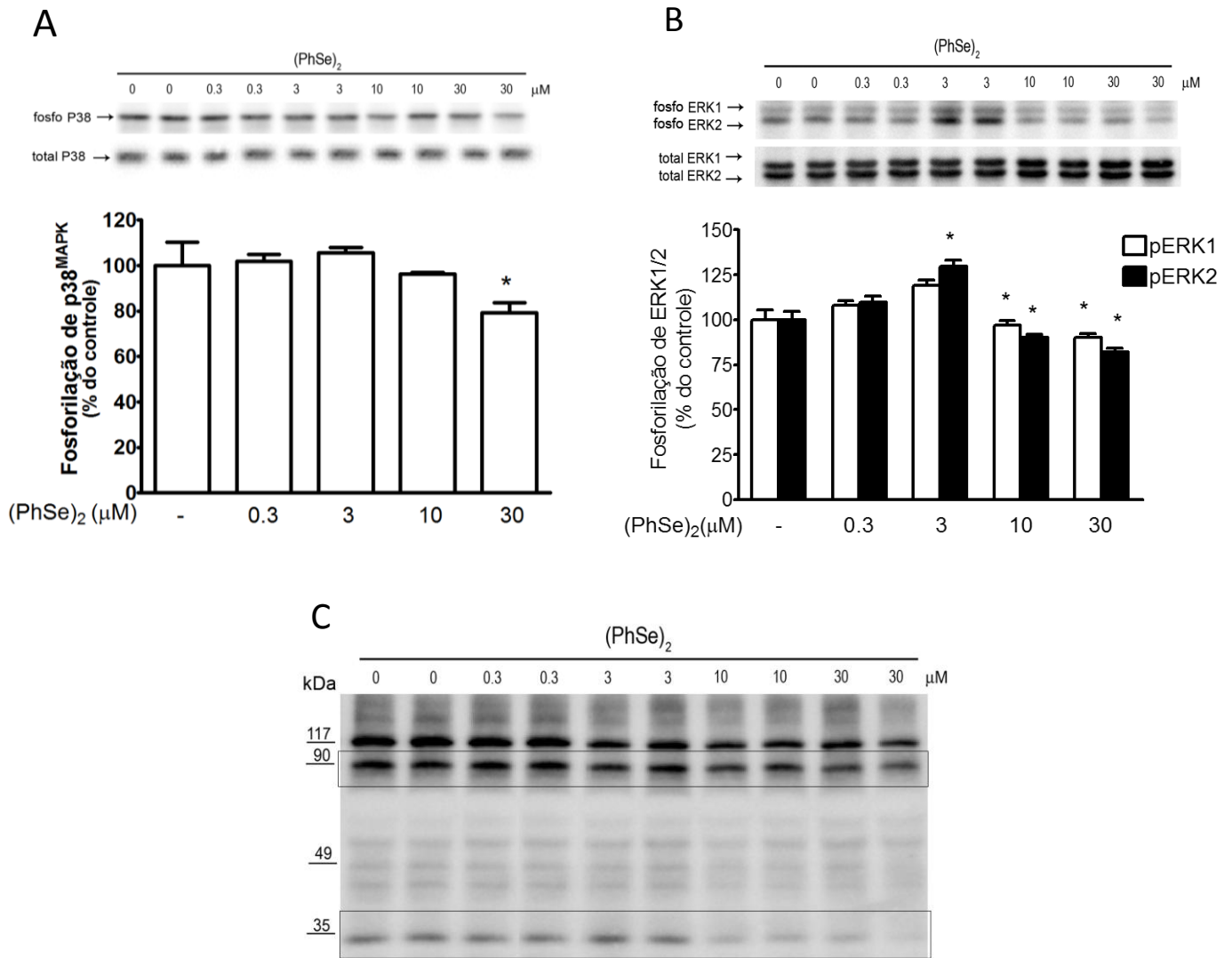


Figura 19. Efeito do tratamento com difenil disseleneto sobre a fosforilação de ERK1/2, p38^{MAPK} e substratos de PKC. Culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de difenil disseleneto (0,3-30 μM). Ao término do tratamento, as células foram solubilizadas em solução de lise para eletroforese. A fosforilação e expressão de p38^{MAPK}, ERK1/2, bem como fosforilação de substratos de PKC, foram avaliadas por Western Blotting utilizando anti-corpos específicos. Cada blotting é representativo de 4 experimentos realizados independentemente. (A) Mostra o nível de fosforilação de p38^{MAPK} que se demonstrou inibido nas concentrações mais elevadas do disseleneto. (B) Mostra o nível de fosforilação de ERK1/2, estimulado na concentração de 3 μM do disseleneto e inibido nas concentrações mais elevadas. (C) Blotting representativo da fosforilação de substratos de PKC entre 35 e 117 kDa. Os resultados são expressos em percentagem em relação ao grupo controle (sem tratamento) e representa a média ± E.P de 4 experimentos independentes. * P < 0,01 em relação ao controle.

4.8. Estudo do papel da fosforilação de ERK1/2 no efeito citotóxico do difenil disseleneto.

Tendo em vista que o tratamento de células SH-SY5Y com o composto difenil disseleneto (3 μ M) aumentou significativamente a fosforilação de ERK e causou clivagem de PARP, neste estudo foi avaliado o papel desta MAPK na viabilidade das células submetidas ao tratamento com difenil disseleneto. Para isto, culturas celulares foram incubadas com o difenil disseleneto na presença de um inibidor da via de fosforilação de ERK1/2, UO126, por 24 horas, em meio sem soro fetal bovino. Terminado o tratamento, a viabilidade celular foi avaliada através do teste do MTT. Paralelamente, a clivagem de PARP e fosforilação e expressão de ERK1/2 foram avaliadas através da técnica de Western Blotting após os tratamentos.

Como observado na figura 20A, o tratamento com difenil disseleneto 3 μ M, aumentou a fosforilação de ERK1/2 em relação ao controle, além disso, causou clivagem de PARP. O uso do inibidor da via de ERK1/2, UO126, associado ao tratamento com difenil disseleneto, impediu a indução da fosforilação de ERK1/2 e também aumentou a clivagem de PARP em relação ao grupo tratado apenas com difenil disseleneto. O grupo tratado apenas com UO126 demonstrou inibição da fosforilação de ERK1/2 em relação ao controle, comprovando a efetividade da concentração de inibidor utilizada no estudo, além disso, não demonstrou clivagem de PARP.

Quando a viabilidade das culturas celulares foi avaliada através do teste do MTT, foi observada uma significativa queda na viabilidade celular, em relação ao controle, nas células tratadas com difenil disseleneto associado ao inibidor de ERK1/2, UO126. O inibidor ou o difenil disseleneto não demonstraram efeito *per se* sobre a viabilidade (figura 20B).

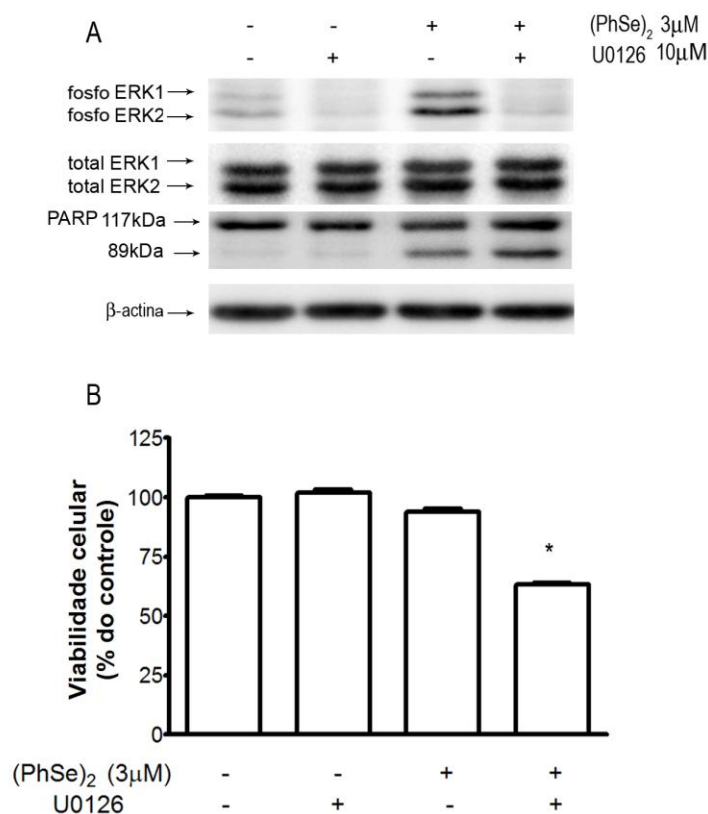


Figura 20. Efeito do difenil disseleneto e UO126 (inibidor de ERK1/2) sobre a viabilidade celular e clivagem de PARP em linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y. Culturas de células de neuroblastoma human SH-SY5Y foram incubadas por 24 horas com difenil disseleneto (3 μM) na presença ou ausência do inibidor de ERK1/2 UO126 (10 μM). Ao término do tratamento, as células foram solubilizadas em solução de lise para eletroforese. A fosforilação e expressão de ERK1/2, bem como clivagem de PARP foram avaliadas por Western Blotting utilizando anti-corpos específicos. (A) Blottings representativo da fosforilação e expressão de ERK1/2, clivagem de PARP e conteúdo de β-actina nas células após tratamento com difenil disseleneto e/ou UO126. Cada blotting é representativo de 4 experimentos realizados independentemente. (B) Mostra o efeito do tratamento com difenil disseleneto sobre a redução do MTT, um índice de viabilidade celular. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (sem tratamento) e representa a média ± E.P de 4 experimentos independentes. * P < 0,01 em relação ao controle.

5. DISCUSSÃO

Ação neuroprotetora de compostos de selênio

Neste estudo, foi primeiramente avaliado a capacidade neuroprotetora do composto difenil disseleneto contra o dano oxidativo promovido pelo tratamento de fatias hipocampais com H₂O₂ e os possíveis mecanismos moleculares envolvidos nesta ação. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o composto difenil disseleneto (10 µM) reverteu a queda de viabilidade das fatias hipocampais promovida pelo tratamento com H₂O₂. Além disso, as concentrações de 1 e 10 µM do composto reverteram totalmente a peroxidação lipídica induzida por H₂O₂.

O efeito antioxidante do difenil disseleneto já foi demonstrado contra danos oxidativos em diferentes tecidos como pulmões, sangue e fígado (Luchese et al., 2007; Posser et al., 2006; Borges et al., 2006). O cérebro é considerado um alvo especialmente suscetível ao estresse oxidativo quando comparado a outros tecidos devido a características como alta taxa de consumo de oxigênio, alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e baixa ou moderada atividade de enzimas antioxidantes (Dringen, 2000; Gilgun-Sherki et al., 2002). Apesar disso, há poucos estudos avaliando o potencial neuroprotetor deste composto.

No SNC, o hipocampo é uma região crítica para certas formas de aprendizado e memória e particularmente vulnerável a condições que levam ao aumento da produção de EROs como envelhecimento, isquemia e doenças neurodegenerativas (Serrano e Klann, 2004; Baloyannis, 2006). Dada a relevância desta estrutura, neste trabalho foi utilizando o modelo de fatias hipocampais de ratos adultos para avaliar o efeito antioxidante e neuroprotetor do difenil disseleneto contra dano oxidativo. Do ponto de vista metodológico, fatias cerebrais são consideradas um modelo apropriado para o estudo dos eventos bioquímicos no SNC, pois este modelo mantém parcialmente a organização da matriz extracelular, as conexões neuronais e as interações neuro-gliais (Rodnight et al., 1991; Cordova et al., 2004).

O mecanismo proposto para explicar o efeito neuroprotetor e antioxidante do difenil disseleneto observado neste estudo é similar ao da enzima GPx. De acordo com este mecanismo, o difenil disseleneto reage com tiois (passo 1), gerando uma molécula chamada selenenil sulfeto (passo 2), esta reage com um segundo equivalente de tiol produzindo o selenol, o qual reage com o H_2O_2 formando H_2O e ácido selenínico (passo 4) que produz espontaneamente outra molécula de H_2O e retorna à sua molécula original (figura 21) (Nogueira et al., 2004; Borges et al., 2006).

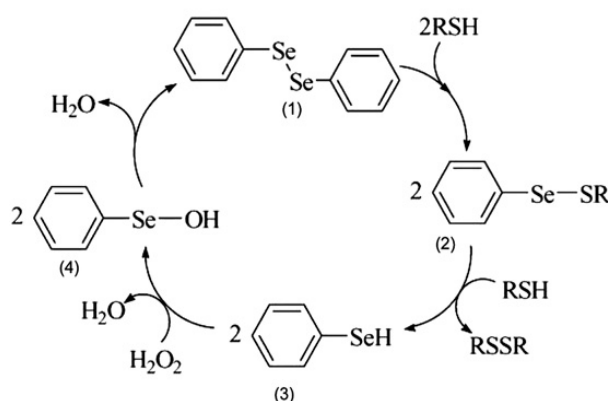


Figura 21. Ciclo catalítico do difenil disseleneto para a detoxificação de peróxidos.

Entretanto, é importante considerar que compostos de selênio que apresentam atividade tiol peroxidase, comportam-se diferentemente na presença de diferentes concentrações de peróxidos e tiois (Mugesh e Singh, 2000). Apesar de estar associado também ao seu mecanismo antioxidante, a oxidação de disselenetos pelo excesso de peróxidos pode gerar derivados oxidados como o ácido selenênico e ácido selenínico (Farina et al., 2002; Mugesh et al., 2001), os quais podem levar a oxidação de proteínas endógenas, causando toxicidade.

Em nosso estudo o composto difenil disseleneto protegeu contra a oxidação da glutathiona produzida pelo tratamento com H_2O_2 , sugerindo uma interação química direta entre o difenil disseleneto e o peróxido, deste modo evitando a oxidação de glutathiona pelos derivados oxidados que foram formados quando H_2O_2 esteve presente no meio de incubação. Entretanto mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese (Farina et al., 2002).

Neste trabalho, foi demonstrado que a co-incubação de GSH ou DTT com difenil disseleneto aumentou 10 e 100 vezes respectivamente o efeito neuroprotetor do calcogênio. Compostos orgânicos de selênio, ao contrário da reação catalisada pela GPx, podem utilizar como substrato outros compostos tiólicos, além da glutationa, para reduzir peróxidos (Muller et al., 1985; Cotgreave et al., 1987; Nogueira et al., 2004). Deste modo, o fato de a combinação de difenil disseleneto com compostos tiólicos GSH e DTT proteger mais efetivamente do dano oxidativo, reforça a idéia de que o efeito protetor do composto contra H_2O_2 está relacionado a sua atividade do tipo tiol-peroxidase.

Com o objetivo de melhorar o entendimento sobre a forma de ação do composto difenil disseleneto, foram realizados experimentos utilizando a forma permeável de GSH, a GSH mono etil ester (GSHEE). Nesta forma de GSH, o grupo carboxila do resíduo de glicina é esterificado (figura 22 B) e ao contrário da sua forma não esterificada (figura 22 A), a GSHEE pode ser transportada para o meio intracelular e ser então convertida em GSH, como já foi demonstrado em vários tipos celulares (Levine et al., 1993; Ceccon et al., 2000; Gabryel e Malecki, 2006; Zeevalk et al., 2007).

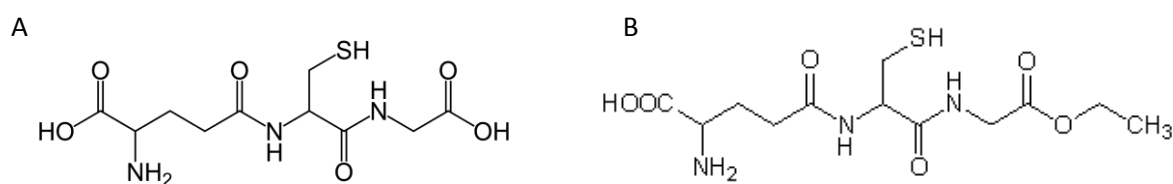


Figura 22. Estrutura química da GSH (A) e GSHEE (B).

Neste trabalho, o pré-tratamento com GSHEE (2 mM) aumentou significativamente os níveis intracelulares de GSH sem alterar o efeito neuroprotetor do difenil disseleneto contra H_2O_2 sugerindo que o composto esteja agindo de modo extracelular. Estudos prévios sugeriram que difenil disseleneto, um composto altamente lipofílico, é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica aumentando os níveis cerebrais de

selênio após tratamentos crônico ou agudo (Jacques-Silva et al., 2001; Maciel et al., 2003). No presente trabalho, não se observou atividade GPx intracelular nas fatias hipocâmpais após o tratamento com difenil disseleneto, fato que seria observado caso houvesse uma significativa entrada do composto para o meio intracelular, reforçando a hipótese de que o composto atuou de modo extracelular em nosso modelo experimental.

Um aumento transitório da fosforilação de ERK1/2 em resposta a H₂O₂ foi demonstrado em diversos modelos celulares, bem como fatias hipocâmpais (Guyton et al., 1996; Kanterewicz et al., 1998). No presente estudo, também foi observado um aumento transitório da fosforilação de ERK1/2 pelo tratamento com H₂O₂ sendo este efeito revertido pela co-incubação com difenil disseleneto, sugerindo que este mecanismo seja dependente de eventos oxidativos. Muitos receptores para fatores de crescimento possuem cisteínas, que quando oxidadas podem estimular a ativação destes receptores e assim a via de transdução de sinal de ERK1/2 (Heldin, 1995; Chu et al., 2004). Estudos em cultura de células demonstraram que a ativação transitória de ERK1/2 foi evitada, quando a ativação de receptores de fatores de crescimento foi inibida. Além disso, o uso de quelantes de ferro e antioxidantes também impediu a ativação de ERK, sugerindo que a formação de radicais hidroxila pela interação de H₂O₂ com íons metálicos pode levar a oxidação de receptores que por sua vez desencadeiam a cascata de ativação de ERK1/2 (Guyton et al., 1996). Adicionalmente, outros trabalhos associaram o aumento do estresse oxidativo em pacientes com mal de Alzheimer e Parkinson ao aumento da fosforilação de ERK1/2 (Zhu et al., 2002a; Zhu et al., 2002b; Chu et al., 2004).

Os membros da família das MAPKs, JNK e p38^{MAPK} são ativados preferencialmente em resposta a estresse ambiental como estresse oxidativo e citocinas pró inflamatórias (Mielke e Herdegen, 2000). Estudos prévios demonstraram que a fosforilação de JNK1/2 e p38^{MAPK} é aumentada em resposta ao estresse oxidativo em diferentes linhagens celulares (Ali et al., 2004; Park et al., 2005). Entretanto, neste estudo, a incubação de fatias hipocâmpais

com H₂O₂ não alterou os níveis de fosforilação destas cinases. Nossos resultados corroboram com Guyton et al., 1996, onde foi demonstrado um aumento modesto na ativação de JNK1 e p38^{MAPK} quando comparado com ERK1/2 em resposta ao H₂O₂ em diferentes tipos celulares. Adicionalmente, em outros estudos, o tratamento de linhagem de neuroblastoma com H₂O₂ não modificou os níveis de fosforilação de p38^{MAPK} (Ruffels et al., 2004).

Em resumo, nossos dados retrataram de uma forma inédita, o efeito neuroprotetor do composto difenil disseleneto em fatias hipocâmpais submetidas a insulto com H₂O₂. Este efeito neuroprotetor, caracterizado pela recuperação da viabilidade celular pode ser resultante da inibição da peroxidação lipídica e/ou inibição da fosforilação de ERK1/2 pelo composto. Além disso, foi proposto que a atividade mimética da GPx apresentada pelo calcogênio, agindo de modo extracelular, está associada a seu efeito neuroprotetor.

Ação antidepressiva de compostos de selênio

Ebselen é um composto orgânico sintético de Se, que compartilha algumas características químicas com o difenil disseleneto, entre elas atividade catalítica mimética da GPx. As propriedades biológicas do composto orgânico de selênio ebselen como antioxidante, antiinflamatório, antiarterosclerótico e neuroprotetor foram demonstradas em animais e humanos (Yamaguchi et al., 1998; Farina et al., 2003; Moretto et al., 2005; Xu et al., 2006). Entretanto o potencial antidepressivo deste composto não havia sido investigado até então.

Neste estudo, demonstramos que a administração do composto de selênio ebselen em camundongos diminuiu o tempo de imobilidade no TNF em doses de 10 e 20 mg/kg, sendo este efeito preditivo de uma ação antidepressiva do composto (Porsolt et al., 1977; Petit-Demouliere et al., 2005). Entretanto, não foi observada diminuição no tempo de imobilidade após administração de ebselen no TSC. A diminuição do tempo de imobilidade no TNF foi observada até 120 min após a administração do composto.

O TNF e o TSC são ferramentas utilizadas para testar a atividade antidepressiva de diferentes classes de drogas (Porsolt et al., 1977; Cryan et al., 2002; Petit-Demouliere et al., 2005; Cryan et al., 2005) e baseiam-se na observação do comportamento de roedores que após movimentos iniciais orientados para escapar da situação a que foram submetidos, adotam uma postura de imobilidade. Quando drogas antidepressivas são administradas, ao serem submetidos aos testes, os animais orientam suas ações para tentar escapar da situação estressante por períodos mais longos que os grupos tratados com os respectivos veículos (Cryan et al., 2005). Sabe-se que os sistemas serotoninérgicos, noradrenérgico e dopaminérgico entre outros estão envolvidos nos efeitos comportamentais causados por antidepressivos nestes modelos animais (Cryan et al., 2002; Cryan et al., 2005; O'Leary et al., 2007). Entretanto, diferenças de sensibilidade entre os testes (TNF e o TSC) podem ser observadas dependentemente do tipo de droga testada (Porsolt and Lenegre, 1992; Cryan et al., 2005).

No presente trabalho, a diminuição do tempo de imobilidade causada pelo tratamento com ebselen não foi acompanhada por alteração na atividade locomotora dos animais, como observado quando os mesmos foram submetidos ao teste do campo aberto posteriormente ao tratamento com ebselen. Este dado ressalta que a diminuição no tempo de imobilidade dos animais no TNF causada pelo tratamento com ebselen não pode ser atribuída a um efeito psicoestimulante do composto.

Considerando que o sistema monoaminérgico é considerado um dos alvos principais no tratamento e patofisiologia da depressão (Elhwuegi, 2004; Millan, 2004), neste estudo foi investigado a participação deste sistema no efeito antidepressivo do ebselen. Para isto, analisou-se o efeito de antagonistas e moduladores farmacológicos do sistema monoaminérgico sobre a ação antidepressiva do ebselen do TNF.

O sistema serotoninérgico ocupa um papel central na patofisiologia e etiologia da depressão, sendo o principal alvo da ação de antidepressivos (Millan, 2004; Ansorge et al., 2007). Tendo isto em vista, o envolvimento deste sistema no efeito antidepressivo do ebselen

foi avaliado no TNF através do tratamento com antagonistas dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} bem como com o inibidor da síntese de serotonina PCPA. Entretanto, ambos os tratamentos não reverteram o efeito antidepressivo do ebselen no TNF sugerindo que estes sistemas não estão envolvidos no efeito apresentado pelo composto. É importante ressaltar que o modelo de tratamento com PCPA (100 mg/kg; i.p.) por quatro dias consecutivos, como utilizado neste estudo, causa diminuição em 60 % nos níveis endógenos de serotonina em camundongos sem alterar os níveis de dopamina e noradrenalina (Redrobe et al., 1998). Neste estudo, a redução dos níveis de serotonina pela administração de PCPA não inibiu o efeito antidepressivo do ebselen, entretanto, preveniu o efeito antidepressivo da fluoxetina. Da mesma forma, o tratamento com antagonistas de receptores serotoninérgicos 5HT_{1A} e 5HT_{1B} não reverteram a diminuição do tempo de imobilidade causada pelo ebselen embora tenha sido demonstrado envolvimento destes receptores na ação de outras drogas antidepressivas (Middlemiss et al., 2002), sugerindo que o sistema serotoninérgico não está envolvido na ação apresentada pelo composto.

O papel da noradrenalina na patofisiologia da depressão tem sido alvo de estudos desde que foi demonstrado que drogas antidepressivas aumentam a disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica ou atuam diretamente nos receptores noradrenérgicos (Elhwuegi, 2004). Além disso, observou-se que camundongos deficientes de noradrenalina não respondem a certas drogas antidepressivas (Cryan et al., 2004). Neste estudo, a administração de antagonistas dos receptores noradrenérgicos α_1 e α_2 , prazosim e ioimbina, respectivamente, reverteram o efeito antidepressivo do ebselen, sugerindo que ambos os adrenoceptores estão envolvidos no efeito do composto. Estudos prévios demonstraram a participação destes receptores no mecanismo de ação de drogas antidepressivas desipramina e amitriptelina (Kitada et al., 1983; Danysz et al., 1986; Millan, 2004).

O sistema dopaminérgico está envolvido na regulação do humor (Dailly et al., 2004). Estudos clínicos demonstraram diminuição dos metabólitos de dopamina (ácido

homovanílico e ácido 3,4 dihidroxifenilacético) no plasma de pacientes deprimidos, sugerindo uma alteração no metabolismo dopaminérgico na depressão (Mitani et al., 2006; Sher et al., 2006). Além disso, em outros estudos, o tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos potencializou a neurotransmissão dopaminérgica, o que poderia contribuir para os efeitos terapêuticos destas drogas (Chiodo and Antelman, 1980; Serra et al., 1990; D'Aquila et al., 2000; Papakostas, 2006). Adicionalmente, o envolvimento de receptores dopaminérgicos D1 e D2 no efeito de drogas antidepressivas como imipramina e bupropion no TNF já foi verificado (Dziedzicka-Wasylewska et al., 2000; Renard et al., 2001; Yamada et al., 2004). No presente estudo, nós demonstramos que o antagonismo de receptores dopaminérgicos D1 e D2 com SCH23390 e sulpirida, respectivamente, antagonizaram significativamente o efeito anti-imobilidade do ebselen no TNF, sugerindo o envolvimento de ambos os receptores no efeito do composto.

Em estudos recentes, o tratamento de ratos com o composto orgânico de selênio difenil disseleneto diminuiu o tempo de imobilidade no TNF (Savegnago et al., 2007), sendo este efeito mediado pelos sistemas catecolaminérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos. Desta forma, apesar de apresentarem propriedades antioxidantes em diferentes modelos biológicos e atuarem como miméticos da enzima GPx (Nogueira et al., 2004), os alvos farmacológicos envolvidos no efeito anti-imobilidade do difenil disseleneto e do ebselen parecem ser diferentes.

Concluindo, os resultados obtidos neste estudo adicionam novos dados na literatura com relação às propriedades biológicas do ebselen, que apresentou efeito antidepressivo no TNF após administração aguda s.c. em camundongos. Este efeito não foi atribuído a uma ação psicoestimulante do ebselen e parece ser mediado pelos sistemas noradrenérgicos e dopaminérgicos sem envolvimento do sistema serotoninérgico.

Compostos de selênio e atividade antitumoral

Apesar da atividade antioxidante do composto difenil disseleneto ter sido largamente investigada, poucos estudos foram conduzidos com relação ao efeito do composto sobre a indução de morte em células tumorais. Estudos prévios demonstraram que a suplementação com difenil disseleneto diminuiu a incidência e a frequência de tumores de mama *in vivo* (Barbosa et al., 2008). No presente trabalho, foi demonstrada uma nova propriedade do composto difenil disseleneto como indutor de apoptose em linhagem de neuroblastoma human, SHSY5Y. Dentre os dados, observou-se queda da viabilidade celular após 24 h de tratamento com o calcogênio em concentrações de 10 e 30 μM . Além disso, através de marcação com iodeto de propídio e clivagem da proteína PARP, observou-se aumento no número de células apoptóticas por este composto a partir de 3 μM .

Associados ao estudo da viabilidade celular e apoptose foram investigados os níveis de fosforilação de ERK1/2 e p38^{MAPK}, bem como ativação de PKC. Observou-se estimulação da fosforilação de ERK1/2 pelo tratamento com 3 μM de difenil disseleneto, sem alterar a expressão desta proteína. A fosforilação de p38^{MAPK} e atividade de PKC não foram alteradas nesta concentração, entretanto, a partir de 10 μM , o composto inibiu a atividade de PKC e os níveis de fosforilação de ERK1/2 e p38^{MAPK}.

Interessantemente, o uso de inibidor de ERK1/2, UO126, juntamente com o calcogênio na concentração de 3 μM causou uma significativa queda na viabilidade, que não havia sido observada na ausência do inibidor. Este fato aponta para um papel da proteína ERK na sobrevivência destas células frente ao tratamento com difenil disseleneto, desde que a inibição desta proteína levou a morte destas células quando submetidas ao tratamento com o composto. Além disso, o uso de inibidor associado ao tratamento com difenil disseleneto levou a um aumento da clivagem de PARP, demonstrando que a morte apoptótica foi também aumentada pela inibição de ERK1/2.

A atividade antitumoral de outros compostos sintéticos de selênio foi já demonstrada. Como exemplo, o composto ebselen inibiu o crescimento de células de câncer de mama, de colon e linhagem de hepatoma humano em cultura (Engman et al., 1997; Yang et al., 2000). O efeito pró-apoptótico de compostos de selênio com atividade mimética de GPx, como o ebselen, está relacionado ao fato destes composto reagirem com grupos tiólicos, como GSH e tióis protéicos, levando a oxidação e inibição de importantes proteínas celulares, e assim desencadeando processos apoptóticos (Yang et al., 2000).

Dentre os mecanismos intracelulares potencialmente envolvidos na atividade antitumoral de compostos de selênio, está a inibição da enzima tioredoxina redutase (Shi et al., 2003), uma selenoproteína dependente de NADPH, que cataliza a redução de tioredoxina oxidada convertendo-a em tioredoxina reduzida, provendo equivalentes redutores para a redução de cisteínas oxidadas em proteínas como fatores de transcrição (NF- κ B e AP-1) entre outras. O sistema Trx (NADPH, TrxR/Trx) exerce importantes papéis na síntese de DNA e ativação de fatores de transcrição que regulam o crescimento celular, sendo que a expressão deste sistema parece ser aumentada em uma variedade de tumores humanos quando comparado ao tecido normal. Em relação a isso, elevação nos níveis de TrxR e/ou Trx em tumores, contribui para o crescimento celular e inibe os mecanismos que causam apoptose (Zhao et al., 2002; Shi et al., 2003).

Proteínas cinases C (PKC) exercem um papel crucial no crescimento, invasividade e metástase tumoral. Compostos de Se com atividade redox, demonstraram causar oxidação e inativação de PKC em culturas celulares e *in vitro* (figura 23), sendo que esta inibição foi revertida pela adição de tióis ao meio (Gopalakrishna et al., 1997; Cotgreave et al., 1989). As diferentes isoformas de PKC estão geralmente associadas a membranas e estruturas do citoesqueleto por meio de interações com proteínas e lipídios podendo representar um alvo importante para compostos lipofílicos como compostos orgânicos sintéticos de selênio ou

peróxidos (Gopalakrishna e Jaken, 2000). Sendo assim, a inativação de PKC por compostos de selênio pode ser um mecanismo envolvido no efeito antitumoral destes compostos.

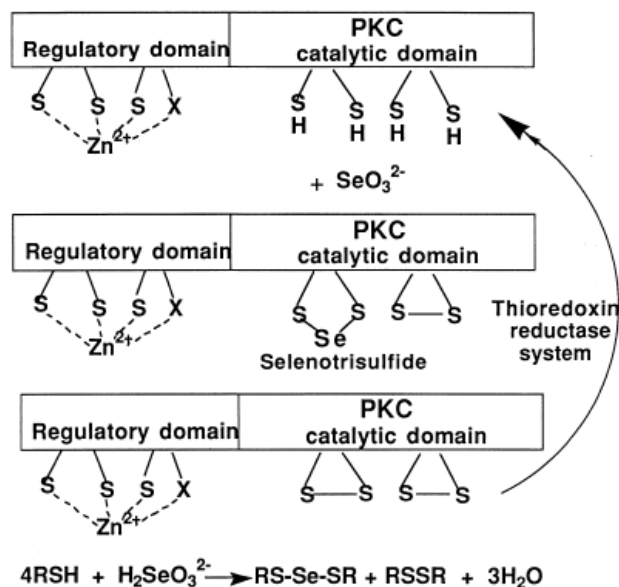


Figura 23. Reação de selenito com grupos sulfidrílicos no domínio catalítico de PKC. Selenito diminui a atividade de PKC e induz modificações nos quatro resíduos de cisteína resultando na formação de dois dissulfetos. Retirado de Gopalakrishna e Jaken, 2000.

Neste estudo, foi observada estimulação na fosforilação de ERK1/2 pelo tratamento com 3 μ M de difenil disseleneto. Sabe-se que alteração no estado redox da célula pode modular a via de sinalização de MAPKs (figura 24). A ativação de ERK1/2 em resposta ao estresse oxidativo já foi verificada em diferentes culturas celulares. Em linhagens tumorais, a ativação de ERK1/2 pode representar um mecanismo de sobrevivência celular desencadeando vias anti apoptóticas pela fosforilação e inativação da proteína pró apoptótica BAD (Zha et al., 1996) e caspase 9 (Allan et al., 2003). Além disso, a ativação de ERK1/2 pode levar à transcrição de genes para fatores de crescimento, entre eles VEGF (McCubrey et al., 2007). Deste modo, neste estudo, o aumento na fosforilação de ERK1/2 pelo composto difenil disseleneto pode ser resultado de alteração no estado redox celular resultante de interação do composto com compostos tiólicos livres como GSH ou associados a proteínas como receptores de fatores de crescimento, responsáveis pela ativação da via Raf/MEK/ERK. A

resultante deste processo seria o aumento da resistência celular frente ao composto de selênio. De acordo com esta hipótese está o fato de que o inibidor de MEK, U0126, causa queda na viabilidade celular e aumento na clivagem de PARP quando associado ao difenil disseleneto.

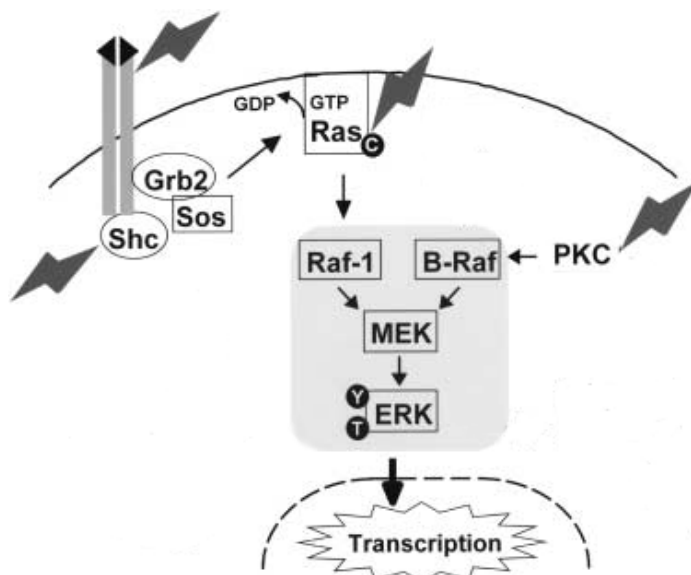


Figura 24. Ilustração de componentes sensíveis à modulação redox na via de ERK. Os três módulos de fosforilação de ERK incluindo a proteína Raf, MEK a ERK estão ilustrados no retângulo. Oxi-redução de cisteínas ao longo da via de ERK, incluindo receptores de fator de crescimento, proteínas adaptadora (Shc), proteínas G (Ras) ou PKC pode resultar na ativação de ERK. Modificado de Chu et al., 2004.

Concentrações mais altas do composto (10 e 30 μM) diminuíram significativamente a viabilidade celular e aumentaram a quantidade de células apoptóticas. Em paralelo a isto, estas concentrações também causaram inibição de MAPKs ERK1/2 e p38^{MAPK} e da proteína PKC. Sabe-se que a proteína Raf, que fosforila MEK é um alvo de PKC, sabendo que o difenil disseleneto pode inibir a atividade de PKC pela oxidação de cisteínas reativas do sítio catalítico da enzima, isso poderia levar a uma inibição da atividade de ERK e desencadear morte celular apoptótica, como observado no presente estudo.

Em sumário, este trabalho retrata de uma forma inédita o papel antitumoral do difenil disseleneto através do uso de células de neuroblastoma humano. Adicionalmente, a ativação de ERK1/2 pelo calcogênio, parece estar associada a uma resposta de sobrevivência das células à toxicidade do calcogênio.

6. REFERÊNCIAS

Ali N., Yoshizumi M., Tsuchiya K., Kyaw M., Fujita Y., Izawa Y., Abe S., Kanematsu Y., Kagami S. and Tamaki T. (2004) Ebselen inhibits p38 mitogen-activated protein kinase-mediated endothelial cell death by hydrogen peroxide. *Eur J Pharmacol* **485**, 127-135.

Allan L. A., Morrice N., Brady S., Magee G., Pathak S. and Clarke P. R. (2003) Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol* **5**, 647-654.

Ansorge M. S., Hen R. and Gingrich J. A. (2007) Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 8-17.

Aouadi M., Binetruy B., Caron L., Le Marchand-Brustel Y. and Bost F. (2006) Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* **88**, 1091-1098.

Arthur J. R. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1825-1835.

Baloyannis S. J. (2006) Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **9**, 119-126.

Barbosa N.B.V., Nogueira C.W., Guecheva T.N., Bellinaso M.L., Rocha J.B.T. (2008) Diphenyl diselenide supplementation delays the development of *N*-nitroso-*N*-methylurea-induced mammary tumors. *Arch.Toxicol.* **82**, 655-653.

de Freitas A. S., Funck V. R., Rotta M dos S., Bohrer D., Morschbacher V., Puntel R. L., Nogueira C. W., Farina M., Aschner, M., Rocha J. B. (2009) Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res Bull* **79**, 77-84.

Berton O. and Nestler E. J. (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* **7**, 137-151.

Bilici M., Efe H., Koroglu M. A., Uydu H. A., Bekaroglu M. and Deger O. (2001) Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* **64**, 43-51.

Bobrovskaya L., Odell A., Leal R. B. and Dunkley P. R. (2001) Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. *J Neurochem* **78**, 490-498.

Boldt S., Weidle U. H. and Kolch W. (2002) The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs. *Carcinogenesis* **23**, 1831-1838.

Borges L. P., Nogueira C. W., Panatieri R. B., Rocha J. B. and Zeni G. (2006) Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. *Chem Biol Interact* **160**, 99-107.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Brocardo P. S., Assini F., Franco J. L., Pandolfo P., Muller Y. M., Takahashi R. N., Dafre A. L. and Rodrigues A. L. (2007) Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. *Toxicol Sci* **97**, 140-148.

Ceccon M., Giusti P., Facci L., Borin G., Imbesi M., Floreani M. and Skaper S. D. (2000) Intracellular glutathione levels determine cerebellar granule neuron sensitivity to excitotoxic injury by kainic acid. *Brain Res* **862**, 83-89.

Centuriao F. B., Corte C. L., Paixao M. W., Braga A. L., Zeni G., Emanuelli T. and Rocha J. B. (2005) Effect of ebselen and organochalcogenides on excitotoxicity induced by glutamate in isolated chick retina. *Brain Res* **1039**, 146-152.

Chang L. and Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.

Chen B. T., Avshalumov M. V. and Rice M. E. (2001) H₂O₂ is a novel, endogenous modulator of synaptic dopamine release. *J Neurophysiol* **85**, 2468-2476.

Chen J. and Berry M. J. (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* **86**, 1-12.

Chiodo L. A. and Antelman S. M. (1980) Repeated tricyclics induce a progressive dopamine autoreceptor subsensitivity independent of daily drug treatment. *Nature* **287**, 451-454.

Chu C. T., Levinthal D. J., Kulich S. M., Chalovich E. M. and DeFranco D. B. (2004) Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem* **271**, 2060-2066.

Cordova F. M., Rodrigues A. L., Giacomelli M. B., Oliveira C. S., Posser T., Dunkley P. R. and Leal R. B. (2004) Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res* **998**, 65-72.

Cotgreave I. A., Sandy M. S., Berggren M., Moldeus P. W. and Smith M. T. (1987) N-acetylcysteine and glutathione-dependent protective effect of PZ51 (Ebselen) against diquat-induced cytotoxicity in isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **36**, 2899-2904.

Cotgreave I. A., Duddy S. K., Kass G. E., Thompson D. and Moldeus P. (1989) Studies on the anti-inflammatory activity of ebselen. Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C? *Biochem Pharmacol* **38**, 649-656.

Cryan J. F., Markou A. and Lucki I. (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 238-245.

Cryan J. F., O'Leary O. F., Jin S. H., Friedland J. C., Ouyang M., Hirsch B. R., Page M. E., Dalvi A., Thomas S. A. and Lucki I. (2004) Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8186-8191.

Cryan J. F., Mombereau C. and Vassout A. (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* **29**, 571-625.

Curry J. M., Eubank T. D., Roberts R. D., Wang Y., Pore N., Maity A. and Marsh C. B. (2008) M-CSF signals through the MAPK/ERK pathway via Sp1 to induce VEGF production and induces angiogenesis in vivo. *PLoS ONE* **3**, e3405.

- Dailly E., Chenu F., Renard C. E. and Bourin M. (2004) Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam Clin Pharmacol* **18**, 601-607.
- Danysz W., Kostowski W., Kozak W. and Hauptmann M. (1986) On the role of noradrenergic neurotransmission in the action of desipramine and amitriptyline in animal models of depression. *Pol J Pharmacol Pharm* **38**, 285-298.
- D'Aquila P. S., Collu M., Gessa G. L. and Serra G. (2000) The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol* **405**, 365-373.
- Davis R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252.
- Dawson D. A., Masayasu H., Graham D. I. and Macrae I. M. (1995) The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosci Lett* **185**, 65-69.
- Dong Z. and Bode A. M. (2003) Dialogue between ERKs and JNKs: friendly or antagonistic? *Mol Interv* **3**, 306-308.
- Dringen R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* **62**, 649-671.
- Dziedzicka-Wasylewska M., Kolasiewicz W., Rogoz Z., Margas W. and Maj J. (2000) The role of dopamine D2 receptor in the behavioral effects of imipramine--study with the use of antisense oligonucleotides. *J Physiol Pharmacol* **51**, 401-409.
- el-Bayoumy K. (1985) Effects of organoselenium compounds on induction of mouse forestomach tumors by benzo(a)pyrene. *Cancer Res* **45**, 3631-3635.
- Elhwuegi A. S. (2004) Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **28**, 435-451.
- Ellman G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**, 70-77.
- Engman L. (1989) Expedient synthesis of ebselen and related compounds. *J Org Chem* **54**, 2964-2966.
- Engman L., Cotgreave I., Angulo M., Taylor C. W., Paine-Murrieta G. D. and Powis G. (1997) Diaryl chalcogenides as selective inhibitors of thioredoxin reductase and potential antitumor agents. *Anticancer Res* **17**, 4599-4605.
- Eren I., Naziroglu M. and Demirdas A. (2007) Protective Effects of Lamotrigine, Aripiprazole and Escitalopram on Depression-induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Neurochem Res* **32**, 1188-1195.
- Fan M. and Chambers T. C. (2001) Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resist Updat* **4**, 253-267.
- Farina M., Barbosa N. B., Nogueira C. W., Folmer V., Zeni G., Andrade L. H., Braga A. L. and Rocha J. B. (2002) Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase from rat liver and cucumber leaves. *Braz J Med Biol Res* **35**, 623-631.

Farina M., Frizzo M. E., Soares F. A., Schwalm F. D., Dietrich M. O., Zeni G., Rocha J. B. and Souza D. O. (2003) Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicol Lett* **144**, 351-357.

Farina M., Soares F. A., Zeni G., Souza D. O. and Rocha J. B. (2004) Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. *Toxicol Lett* **146**, 227-235.

Finkel T. and Holbrook N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247.

Floyd R. A. and Hensley K. (2002) Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* **23**, 795-807.

Foiles P. G., Fujiki H., Suganuma M., Okabe S., Yatsunami J., Miglietta L. M., Upadhyaya P., El-Bayoumy K. and Ronai Z. (1995) Inhibition of PKC and PKA by chemopreventive organoselenium compounds. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* **7**, 685.

Forstrom J. W., Zakowski J. J. and Tappel A. L. (1978) Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* **17**, 2639-2644.

Franco J. L., Trivella D. B., Trevisan R., Dinslaken D. F., Marques M. R., Bainy A. C. and Dafre A. L. (2006) Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chem Biol Interact* **160**, 232-240.

Gabryel B. and Malecki A. (2006) Ebselen attenuates oxidative stress in ischemic astrocytes depleted of glutathione. Comparison with glutathione precursors. *Pharmacol Rep* **58**, 381-392.

Ghisleni G., Porciuncula L.O., Cimarosti H., Batista T Rocha J., Salbego C.G., Souza D.O. (2003). Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res.* 986, 196-9.

Gilgun-Sherki Y., Rosenbaum Z., Melamed E. and Offen D. (2002) Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* **54**, 271-284.

Gopalakrishna R., Chen Z. H. and Gundimeda U. (1997) Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion. *Arch Biochem Biophys* **348**, 37-48.

Gopalakrishna R. and Jaken S. (2000) Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **28**, 1349-1361.

Gopalakrishna R. and Gundimeda U. (2002) Antioxidant regulation of protein kinase C in cancer prevention. *J Nutr* **132**, 3819S-3823S.

Guyton K. Z., Liu Y., Gorospe M., Xu Q. and Holbrook N. J. (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* **271**, 4138-4142.

Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*, Fourth Edition, p 851, New York.

- Heldin C. H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**, 213-223.
- Herken H., Gurel A., Selek S., Armutcu F., Ozen M. E., Bulut M., Kap O., Yumru M., Savas H. A. and Akyol O. (2007) Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Arch Med Res* **38**, 247-252.
- Hu H., Jiang C., Li G. and Lu J. (2005) PKB/AKT and ERK regulation of caspase-mediated apoptosis by methylseleninic acid in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **26**, 1374-1381.
- Imai H., Graham D. I., Masayasu H. and Macrae I. M. (2003) Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* **34**, 56-63.
- Ip C. (1998) Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J Nutr* **128**, 1845-1854.
- Ip C., Birringer M., Block E., Kotrebai M., Tyson J. F., Uden P. C. and Lisk D. J. (2000) Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention. *J Agric Food Chem* **48**, 4452.
- Jacques-Silva M. C., Nogueira C. W., Broch L. C., Flores E. M. and Rocha J. B. (2001) Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* **88**, 119-125.
- Jiang C., Jiang W., Ip C., Ganther H. and Lu J. (1999) Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake. *Mol Carcinog* **26**, 213-225.
- Johnson G. L. and Lapadat R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912.
- Joseph J. A., Villalobos-Molina R., Denisova N., Erat S., Cutler R. and Strain J. (1996) Age differences in sensitivity to H₂O₂- or NO-induced reductions in K(+)-evoked dopamine release from superfused striatal slices: reversals by PBN or Trolox. *Free Radic Biol Med* **20**, 821-830.
- Kalayci M., Coskun O., Cagavi F., Kanter M., Armutcu F., Gul S. and Acikgoz B. (2005) Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats. *Neurochem Res* **30**, 403-410.
- Kamata H. and Hirata H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11**, 1-14.
- Kanterewicz B. I., Knapp L. T. and Klann E. (1998) Stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases by reactive oxygen species and nitric oxide in hippocampus. *J Neurochem* **70**, 1009-1016.
- Kaster M. P., Santos A. R. and Rodrigues A. L. (2005) Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Brain Res Bull* **67**, 53-61.
- Kaster M. P., Raupp I., Binfare R. W., Andreatini R. and Rodrigues A. L. (2007) Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. *Eur J Pharmacol* **565**, 119-124.

- Keyse S. M. (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 186-192.
- Kitada Y., Miyauchi T., Kanazawa Y., Nakamichi H. and Satoh S. (1983) Involvement of alpha- and beta 1-adrenergic mechanisms in the immobility-reducing action of desipramine in the forced swimming test. *Neuropharmacology* **22**, 1055-1060.
- Kolla N., Wei Z., Richardson J. S. and Li X. M. (2005) Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. *J Psychiatry Neurosci* **30**, 196-201.
- Kowalska E., Narod S. A., Huzarski T., Zajaczek S., Huzarska J., Gorski B. and Lubinski J. (2005) Increased rates of chromosome breakage in BRCA1 carriers are normalized by oral selenium supplementation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1302-1306.
- Krishnan V. and Nestler E. J. (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* **455**, 894-902.
- Levine E. S., Friedman H. S., Griffith O. W., Colvin O. M., Raynor J. H. and Lieberman M. (1993) Cardiac cell toxicity induced by 4-hydroperoxycyclophosphamide is modulated by glutathione. *Cardiovasc Res* **27**, 1248-1253.
- Li H., Stampfer M. J., Giovannucci E. L., Morris J. S., Willett W. C., Gaziano J. M. and Ma J. (2004) A prospective study of plasma selenium levels and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **96**, 696-703.
- Liu Y., Peterson D. A., Kimura H. and Schubert D. (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* **69**, 581-593.
- Luchese C., Stangherlin E. C., Ardais A. P., Nogueira C. W. and Santos F. W. (2007) Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. *Toxicology* **230**, 189-196.
- Luchese C., Stangherlin E. C., Gay B. M. and Nogueira C. W. (2009) Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: involvement of glutathione. *Ecotoxicol Environ Saf* **72**, 248-254.
- Machado D. G., Kaster M. P., Binfare R. W., Dias M., Santos A. R., Pizzolatti M. G., Brighente I. M. and Rodrigues A. L. (2007) Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**, 421-428.
- Maciel E. N., Flores E. M., Rocha J. B. and Folmer V. (2003) Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. *Bull Environ Contam Toxicol* **70**, 470-476.
- MacKeigan J. P., Collins T. S. and Ting J. P. (2000) MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 38953-38956.
- Martin-Blanco E. (2000) p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* **22**, 637-645.
- Masumoto H. and Sies H. (1996) The reaction of selenium with peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* **9**, 262-267.

McCubrey J. A., Lahair M. M. and Franklin R. A. (2006) Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* **8**, 1775-1789.

Meotti F. C., Borges V. C., Zeni G., Rocha J. B. and Nogueira C. W. (2003) Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* **143**, 9-16.

Michel T. M., Frangou S., Thiemeyer D., Camara S., Jecel J., Nara K., Brunklaus A., Zochling R. and Riederer P. (2007) Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder-a postmortem study. *Psychiatry Res* **151**, 145-150.

Middlemiss D. N., Price G. W. and Watson J. M. (2002) Serotonergic targets in depression. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 18-22.

Mielke K. and Herdegen T. (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* **61**, 45-60.

Millan M. J. (2004) The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. *Eur J Pharmacol* **500**, 371-384.

Mitani H., Shirayama Y., Yamada T. and Kawahara R. (2006) Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **30**, 531-534.

Mugesh G. and Singh H. B. (2000) Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity. *Chemical Society Reviews*.

Mugesh G., du Mont W. W. and Sies H. (2001) Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev* **101**, 2125-2179.

Mugesh G., Panda A., Singh H. B., Punekar N. S. and Butcher R. J. (2001) Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study. *J Am Chem Soc* **123**, 839-850.

Muller A., Cadenas E., Graf P. and Sies H. (1984) A novel biologically active selenoorganic compound--I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). *Biochem Pharmacol* **33**, 3235-3239.

Muller A., Gabriel H. and Sies H. (1985) A novel biologically active selenoorganic compound--IV. Protective glutathione-dependent effect of PZ 51 (ebselen) against ADP-Fe induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **34**, 1185-1189.

Namura S., Nagata I., Takami S., Masayasu H. and Kikuchi H. (2001) Ebselen reduces cytochrome c release from mitochondria and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* **32**, 1906-1911.

Navarro-Alarcon M. and Cabrera-Vique C. (2008) Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ* **400**, 115-141.

Nebreda A. R. and Porras A. (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* **25**, 257-260.

Nestler E. J., Barrot M., DiLeone R. J., Eisch A. J., Gold S. J. and Monteggia L. M. (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* **34**, 13-25.

Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M. C., Grignani F. and Riccardi C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**, 271-279.

Nogueira C. W., Zeni G. and Rocha J. B. (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* **104**, 6255-6285.

Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**, 351-358.

O'Leary O F., Bechtholt A. J., Crowley J. J., Hill T. E., Page M. E. and Lucki I. (2007) Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)* **192**, 357-371.

O'Neill M. F. and Conway M. W. (2001) Role of 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors in the mediation of behavior in the forced swim test in mice. *Neuropsychopharmacology* **24**, 391-398.

Owuor E. D. and Kong A. N. (2002) Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* **64**, 765-770.

Pandey G. N., Sharma R. P., Janicak P. G. and Davis J. M. (1992) Monoamine oxidase and cortisol response in depression and schizophrenia. *Psychiatry Res* **44**, 1-8.

Papakostas G. I. (2006) Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *Eur Neuropsychopharmacol* **16**, 391-402.

Papp L. V., Lu J., Holmgren A. and Khanna K. K. (2007) From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* **9**, 775-806.

Park B. G., Yoo C. I., Kim H. T., Kwon C. H. and Kim Y. K. (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells. *Toxicology* **215**, 115-125.

Paulmier C. (1986) *Selenoorganic functional groups*, pp 25–51, Oxford, England.

Peng Q., Masuda N., Jiang M., Li Q., Zhao M., Ross C. A. and Duan W. (2008) The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increases BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model. *Exp Neurol* **210**, 154-163.

Peterson G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-356.

Petit-Demouliere B., Chenu F. and Bourin M. (2005) Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* **177**, 245-255.

Porciuncula L. O., Rocha J. B., Boeck C. R., Vendite D. and Souza D. O. (2001) Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* **299**, 217-220.

Porsolt R. D., Bertin A. and Jalfre M. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **229**, 327-336.

Porsolt R. and Lenegre A. (1992) *Behavioral models of depression*. In: Elliott, J., Heal, D., Marsden, C. (Eds.), *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. Wiley, London, pp 73–85

Posser T., Moretto M. B., Dafre A. L., Farina M., da Rocha J. B., Nogueira C. W., Zeni G., Ferreira Jdos S., Leal R. B. and Franco J. L. (2006) Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: an in vitro evaluation. *Chem Biol Interact* **164**, 126-135.

Puntel R. L., Roos D. H., Paixao M. W., Braga A. L., Zeni G., Nogueira C. W. and Rocha J. B. (2007) Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Chem Biol Interact* **165**, 87-98.

Rayman M. P. (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* **356**, 233-241.

Reddy B. S., Tanaka T. and El-Bayoumy K. (1985) Inhibitory effect of dietary p-methoxybenzeneselenol on azoxymethane-induced colon and kidney carcinogenesis in female F344 rats. *J Natl Cancer Inst* **74**, 1325-1328.

Redrobe J. P. and Bourin M. (1997) Partial role of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol* **325**, 129-135.

Renard C. E., Fiocco A. J., Clenet F., Hascoet M. and Bourin M. (2001) Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? *Psychopharmacology (Berl)* **159**, 42-50.

Richardson J. S. (1991) Animal models of depression reflect changing views on the essence and etiology of depressive disorders in humans. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **15**, 199-204.

Robinson M. J. and Cobb M. H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 180-186.

Rodnight R., Goncalves C. A., Leal R., Rocha E., Salbego C. G. and Wofchuk S. T. (1991) Regional distribution and properties of an enzyme system in rat brain that phosphorylates ppH-47, an insoluble protein highly labelled in tissue slices from the hippocampus. *Prog Brain Res* **89**, 157-167.

Rodrigues A. L., da Silva G. L., Mateussi A. S., Fernandes E. S., Miguel O. G., Yunes R. A., Calixto J. B. and Santos A. R. (2002) Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci* **70**, 1347-1358.

Rossato J. I., Ketzer L. A., Centuriao F. B., Silva S. J., Ludtke D. S., Zeni G., Braga A. L., Rubin M. A. and Rocha J. B. (2002b) Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* **27**, 297-303.

Ruffels J., Griffin M. and Dickenson J. M. (2004) Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. *Eur J Pharmacol* **483**, 163-173.

Saito I., Asano T., Sano K., Takakura K., Abe H., Yoshimoto T., Kikuchi H., Ohta T. and Ishibashi S. (1998) Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **42**, 269-277; discussion 277-268.

Santos F. W., Zeni G., Rocha J. B., Weis S. N., Fachineto J. M., Favero A. M. and Nogueira C. W. (2005a) Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interact* **151**, 159-165.

Sarker K. P., Biswas K. K., Rosales J. L., Yamaji K., Hashiguchi T., Lee K. Y. and Maruyama I. (2003) Ebselen inhibits NO-induced apoptosis of differentiated PC12 cells via inhibition of ASK1-p38 MAPK-p53 and JNK signaling and activation of p44/42 MAPK and Bcl-2. *J Neurochem* **87**, 1345-1353.

Savegnago L., Jesse C. R., Pinto L. G., Rocha J. B., Nogueira C. W. and Zeni G. (2007) Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**, 1261-1269.

Schewe T. (1995) Molecular actions of ebselen--an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol* **26**, 1153-1169.

Schlessinger J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.

Seo S. R., Chong S. A., Lee S. I., Sung J. Y., Ahn Y. S., Chung K. C. and Seo J. T. (2001) Zn²⁺-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells. *J Neurochem* **78**, 600-610.

Serra G., Collu M., D'Aquila P. S., De Montis G. M. and Gessa G. L. (1990) Possible role of dopamine D1 receptor in the behavioural supersensitivity to dopamine agonists induced by chronic treatment with antidepressants. *Brain Res* **527**, 234-243.

Serrano F. and Klann E. (2004) Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev* **3**, 431-443.

Shamberger R. J. and Frost D. V. (1969) Possible protective effect of selenium against human cancer. *Can Med Assoc J* **100**, 682.

Sher L., Mann J. J., Traskman-Bendz L., Winchel R., Huang Y. Y., Fertuck E. and Stanley B. H. (2006) Lower cerebrospinal fluid homovanillic acid levels in depressed suicide attempters. *J Affect Disord* **90**, 83-89.

Shi C., Yu L., Yang F., Yan J. and Zeng H. (2003) A novel organoselenium compound induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 578-583.

Takuma K., Baba A. and Matsuda T. (2004) Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* **72**, 111-127.

Tamasi V., Jeffries J. M., Arteel G. E. and Falkner K. C. (2004) Ebselen augments its peroxidase activity by inducing NRF-2-dependent transcription. *Arch Biochem Biophys* **431**, 161-168.

Tibbles L. A. and Woodgett J. R. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1230-1254.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. and Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 44-84.

van den Brandt P. A., Zeegers M. P., Bode P. and Goldbohm R. A. (2003) Toenail selenium levels and the subsequent risk of prostate cancer: a prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**, 866-871.

Wang S., Wang Z., Boise L., Dent P. and Grant S. (1999) Loss of the bcl-2 phosphorylation loop domain increases resistance of human leukemia cells (U937) to paclitaxel-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 67-72.

Wang Z., Jiang C., Ganther H. and Lu J. (2001) Antimitogenic and proapoptotic activities of methylseleninic acid in vascular endothelial cells and associated effects on PI3K-AKT, ERK, JNK and p38 MAPK signaling. *Cancer Res* **61**, 7171-7178.

Wei W. Q., Abnet C. C., Qiao Y. L., Dawsey S. M., Dong Z. W., Sun X. D., Fan J. H., Gunter E. W., Taylor P. R. and Mark S. D. (2004) Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *Am J Clin Nutr* **79**, 80-85.

Wendel A. (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* **77**, 325-333.

Wendel A., Fausel M., Safayhi H., Tiegs G. and Otter R. (1984) A novel biologically active seleno-organic compound--II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochem Pharmacol* **33**, 3241-3245.

Wong M. L. and Licinio J. (2001) Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* **2**, 343-351.

Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R. J. and Greenberg M. E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**, 1326-1331.

Xu J. H., Hu H. T., Liu Y., Qian Y. H., Liu Z. H., Tan Q. R. and Zhang Z. J. (2006) Neuroprotective effects of ebselen are associated with the regulation of Bcl-2 and Bax proteins in cultured mouse cortical neurons. *Neurosci Lett* **399**, 210-214.

Yamada J., Sugimoto Y. and Yamada S. (2004) Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol* **504**, 207-211.

Yamaguchi T., Sano K., Takakura K., Saito I., Shinohara Y., Asano T. and Yasuhara H. (1998) Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke* **29**, 12-17.

Yang C. F., Shen H. M. and Ong C. N. (2000) Intracellular thiol depletion causes mitochondrial permeability transition in ebselen-induced apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **380**, 319-330.

Yang S. H., Sharrocks A. D. and Whitmarsh A. J. (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* **320**, 3-21.

Yu R., Lei W., Mandlekar S., Weber M. J., Der C. J., Wu J. and Kong A. N. (1999) Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* **274**, 27545-27552.

Yu R., Chen C., Mo Y. Y., Hebbar V., Owuor E. D., Tan T. H. and Kong A. N. (2000) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem* **275**, 39907-39913.

Yu R., Mandlekar S., Lei W., Fahl W. E., Tan T. H. and Kong A. N. (2000) p38 mitogen-activated protein kinase negatively regulates the induction of phase II drug-metabolizing enzymes that detoxify carcinogens. *J Biol Chem* **275**, 2322-2327.

Zeevalk G. D., Manzano L., Sonsalla P. K. and Bernard L. P. (2007) Characterization of intracellular elevation of glutathione (GSH) with glutathione monoethyl ester and GSH in brain and neuronal cultures: relevance to Parkinson's disease. *Exp Neurol* **203**, 512-520.

Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. and Korsmeyer S. J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-628.

Zhao R., Masayasu H. and Holmgren A. (2002) Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8579-8584.

Zhu X., Lee H. G., Raina A. K., Perry G. and Smith M. A. (2002a) The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* **11**, 270-281.

Zhu J. H., Kulich S. M., Oury T. D. and Chu C. T. (2002b) Cytoplasmic aggregates of phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases in Lewy body diseases. *Am J Pathol* **161**, 2087-2098.

Zhuo H., Smith A. H. and Steinmaus C. (2004) Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**, 771-778.

Zoccarato F., Valente M. and Alexandre A. (1995) Hydrogen peroxide induces a long-lasting inhibition of the Ca²⁺-dependent glutamate release in cerebrotal synaptosomes without interfering with cytosolic Ca²⁺. *J Neurochem* **64**, 2552-2558.

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contaminação por metais

A contaminação humana por metais sejam eles exógenos, ou seja, sem função fisiológica como cádmio, chumbo, arsênio ou dos que possuem função endógena como cobre, zinco ou manganês, consiste em um importante problema potencial de saúde pública. O processo de contaminação por metais pode ocorrer pela exposição ambiental através do solo, ar, água ou alimentos contaminados, ou exposição ocupacional, em atividades industriais e de mineração (Järup, 2003; Ashner et al., 2007).

A exposição prolongada a metais pesados é associada com carcinogênese, alteração da resposta imune e principalmente com efeitos neurotóxicos, resultante do acúmulo destes metais no SNC (NRC, 1999; Waalkes et al., 2000). Uma vez na corrente sanguínea, os metais podem atravessar a barreira hematoencefálica por mecanismos não específicos de captação, tais como: via transportador de metais divalentes (DCT); via transportadores ou canais de cálcio, resultando no acúmulo em sítios intracelulares como lisossomos, mitocôndria e núcleo (Roth et al., 2002; Waalkes et al., 2000). Embora os diferentes metais possuam seus próprios mecanismos de ação, a produção de EROs e a modulação de vias de sinalização intracelular parece ser um mecanismo de ação comum (Leonard et al., 2004).

1.1.1. Manganês

Manganês (Mn) é um dos metais de maior abundância na crosta terrestre, sendo amplamente distribuído no ambiente e podendo estar presente na água, solo e alimentos (Perl and Olanow, 2007). Nos organismos animais, é atribuído ao Mn o caráter de elemento essencial, sendo sua presença fundamental para o funcionamento normal de muitas enzimas,

bem como para o metabolismo de aminoácidos, lipídios, proteínas e carboidratos (Takeda, 2003; Aschner et al., 2007).

No cérebro o Mn está presente entre 1-2 $\mu\text{g/g}$ de peso seco sendo componente estrutural essencial da Mn-SOD (uma enzima essencialmente mitocondrial nos neurônios) e da glutamina sintetase (uma enzima localizada no citosol de astrócitos) (Takeda, 2003; Morello et al., 2008).

O cérebro é considerado um alvo importante da contaminação por Mn sendo que têm sido observados níveis elevados do metal em regiões como núcleo caudado e putamem, globo pálido, substância negra e núcleo subtalâmico (Takeda et al., 1998; Takeda et al., 2003).

Desta forma, apesar de elemento essencial, estudos pioneiros relataram sintomas similares ao da doença de Parkinson em trabalhadores industriais expostos ocupacionalmente ao Mn, sendo este quadro denominado manganismo (Couper, 1837). Nesta patologia o paciente apresenta sintomas extrapiramidais, como rigidez muscular e tremores e que parecem estar relacionados com alterações no metabolismo da dopamina no gânglio basal (Takeda et al., 1998). Inúmeros casos de intoxicação pelo Mn têm sido relatados principalmente em trabalhadores de atividade mineradora, industrial (fábrica de baterias e metalúrgicas) e agrícola (devido ao uso de agrotóxicos contendo Mn) (Emara et al., 1971; Mergler et al., 1997; Bowler et al., 2006). Além da contaminação de trabalhadores por exposição ocupacional, a população em geral também pode ser exposta a altos índices de Mn em consequência da contaminação ambiental via emissão de efluentes contaminados (a partir de indústrias metalúrgicas, por exemplo) e pelo uso de gasolina com o aditivo metilciclopentadienil Mn tricarbonil (MMT) (Aschner et al., 2007).

O Mn pode ter acesso ao cérebro a partir da corrente sanguínea por meio da barreira hematoencefálica ou do líquido cefalorraquidiano, sendo que em concentrações fisiológicas, a principal rota de acesso ao cérebro parece ser através do endotélio vascular. Os mecanismos envolvidos no transporte deste metal através da barreira hematoencefálica estão representados

na figura 26, e envolve principalmente a difusão facilitada, transporte ativo, transportador de metal divalente 1 (DMT-1), ZIP-8 e transporte dependente de transferrina (figura 25) (Roth et al., 2002; Aschner et al., 2007).

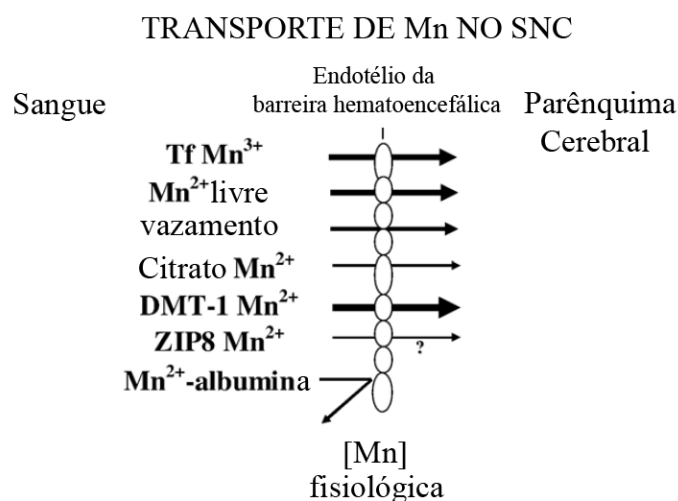


Figura 25. Mecanismos de transporte de Mn ao longo da Barreira Hematoencefálica quando em níveis plasmáticos fisiológicos. Os transportadores associados com o transporte de Mn (dependendo do estado de oxidação) estão indicados na figura. O Mn ligado à albumina é excluído do mecanismo de transporte ao longo do endotélio dado seu tamanho. A espessura das setas representa a importância relativa de cada tipo de transporte neste processo. Modificado de Aschner et al., 2007.

Quando o Mn alcança o parênquima cerebral a partir do endotélio da barreira hematoencefálica, ele pode ser conjugado à proteína transferrina (Tf), quando na forma Mn³⁺ a qual é secretada pelos oligodendrócitos e então ser transportado para o interior de neurônios ou células gliais por mecanismo dependente de transportador de transferrina (TfR) de maneira similar ao Fe. Neste caso, o Mn conjugado à Tf, se liga a TfR presentes na superfície celular. Após sofrer endocitose, ainda na vesícula endossomal o Mn³⁺ é liberado do complexo Tf-TfR, reduzido a sua forma divalente e posteriormente transportado através da membrana endossomal para o citoplasma celular por meio de transportadores do tipo DMT-1 (transportador de metal divalente-1). Além deste mecanismo, o transporte de Mn²⁺ também pode ocorrer de uma forma independente de Tf através de DMT-1. Em células

despolarizadas, foi também demonstrado um mecanismo de transporte de Mn^{2+} mediado por canais de Ca^{2+} , competindo assim com o Ca^{2+} (Roth et al., 2002) (figura 26).

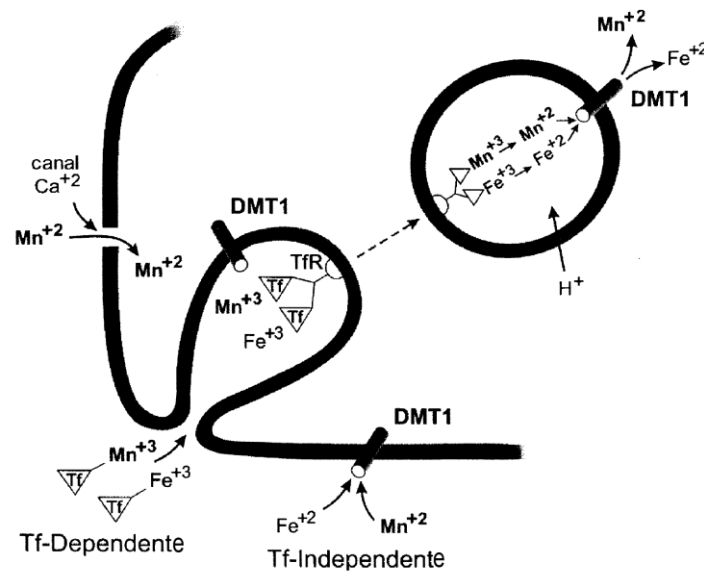


Figura 26. Transporte de Mn, similar ao do Fe, de modo dependente ou independente de Tf, em células PC12. Modificado de Roth et al., 2002.

Células PC12 consistem em uma linhagem celular de feocromocitoma de rato utilizadas principalmente como modelo de estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação neuronal e crescimento neurítico (Greene e Tischler, 1982). Este modelo de células catecolaminérgicas tem sido também amplamente utilizado como ferramenta para o estudo da neurotoxicidade do Mn (Roth et al., 2002; Hirata et al., 1998; Hussain et al., 2006), sendo que estas células compartilham mecanismos de transportes de Mn similar ao de células neuronais (Roth et al., 2002; Taketa, 2003), entretanto, ao contrário destas, podem ser cultivadas em larga escala, permitindo diversos tipos de análises bioquímicas, entre elas, estudo do metabolismo de catecolaminas.

1.2. Mecanismos moleculares de ação do Mn

Os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos neurotóxicos do Mn ainda não estão bem esclarecidos, entretanto, diversos estudos tem demonstrado que o tratamento com

Mn pode levar a inibição de complexos da cadeia respiratória, alteração do potencial de membrana mitocondrial e aumento da produção de EROs (Zhang et al., 2004). Em astrócitos, foi observado aumento na liberação de PGE₂ pela exposição *in vitro* ao metal (Liao et al., 2007). Em neurônios dopaminérgicos, o tratamento com Mn causa aumento da fosforilação de p38^{MAPK} e JNK1/2, ativação de caspase e clivagem de DNA (Hirata et al., 1998; Roth et al., 2000). Salienta-se que todos estes processos podem estar envolvidos na neurotoxicidade do Mn.

Quando administrado *in vivo*, o Mn causa importantes alterações comportamentais (Brenneman et al., 1999; Gwazida et al., 2002; Liu et al., 2006; Guilarte et al., 2006; Avila et al., 2008) que podem ser acompanhadas por várias alterações neuroquímicas no cérebro, como aumento da expressão de HSP70, alteração na concentração de outros metais como Zn, Cu e Fe (Zhang et al., 2002) e diminuição da expressão de GFAP e S-100B (Henriksson e Tjalve, 2000). Entretanto, a alteração do metabolismo da dopamina tem sido considerada um aspecto particularmente importante entre as ações moleculares do Mn (Guilarte et al., 2008). Neste sentido, regiões ricas em dopamina, como o corpo estriado, parecem acumular mais Mn quando comparada com outras regiões cerebrais (Fitsanakis et al., 2006; Erikson et al., 2007). Em estudos em ratos expostos ao Mn, foi observado acúmulo do metal nas mitocôndrias de astrócitos e de neurônios do corpo estriado e globo pálido (Morello et al., 2008); em modelos de macacos expostos ao metal outros estudos também demonstram acúmulo do Mn em estruturas do gânglio basal com disfunção de terminais dopaminérgicos e diminuição da liberação de dopamina (Guilarte et al., 2006), além de alteração na concentração de transportadores de dopamina (Chen et al., 2006). O acúmulo de Mn tem sido também associado com aumento do estresse oxidativo no cérebro, o qual pode ser resultado da alteração do funcionamento mitocondrial bem como da indução da oxidação de dopamina que leva à formação de ERO como H₂O₂ juntamente com semiquinonas reativas (Erikson et al., 2004).

1.3. Tirosina hidroxilase

Tirosina hidroxilase (TH), é a enzima limitante da síntese de dopamina (figura 27), esta enzima catalisa a conversão do aminoácido L-tirosina em dihidroxifenilalanina (L-DOPA), sendo que sua atividade pode ser regulada agudamente (horas) por fosforilação ou cronicamente (dias) por síntese protéica.

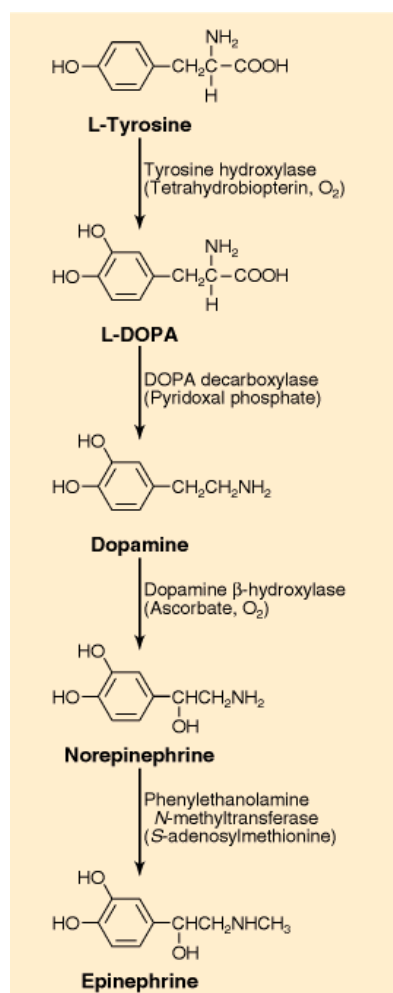


Figura 27. Biosíntese de catecolaminas. A TH catalisa a conversão do aminoácido L-tirosina em dihidroxifenilalanina (L-DOPA), sendo este um passo limitante para a síntese de catecolaminas. Retirado de Siegel et al., 1999.

A fosforilação de TH é importante para a regulação rápida de sua atividade, sendo fundamental para a manutenção dos níveis de dopamina nos tecidos após secreção. A fosforilação de TH pode ocorrer nos sítios de serina 8, 19, 31 e 40, sendo que a fosforilação do sítio Ser40 é considerado o principal mecanismo responsável pela ativação da enzima, levando a uma diminuição da inibição causada pela dopamina (Dunkley et al., 2004; Fitsanakis et al., 2006). Além disso, a fosforilação prolongada de TH em Ser40 consiste em

um importante mecanismo para a manutenção dos níveis de catecolamina nos tecidos, sem necessidade de síntese protéica (Bobrovskaya et al., 2007b). A fosforilação da enzima pode ser causada por diversas vias de sinalização como verificado na figura 28 e tem sido demonstrado ocorrer em resposta a diferentes estímulos, como nicotina, histamina, angiotensina II, muscarina e bradicinina (Bobrovskaya et al., 2007a,b).

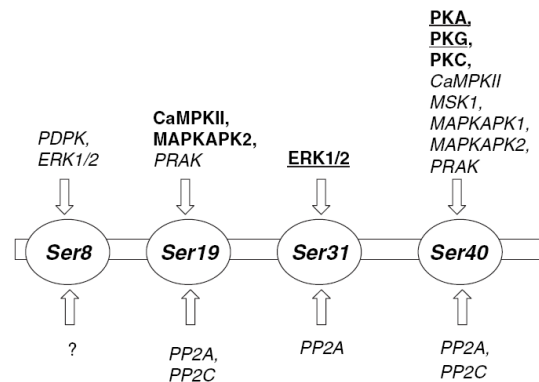


Figura 28. Proteínas cinases e fosfatases (PPs) capazes de modular a fosforilação de TH *in vitro* e *in situ*. CAMK, proteína cinase cálcio/calmodulina-dependente; ERK, proteína cinase regulada por sinal extracelular; MAPKAPK, proteína cinase ativada por MAPK; MSK, proteína cinase ativada por estresse e mitógenos; PDPK, proteína cinase dirigida por prolina; PKA, proteína cinase A; PKC, proteína cinase C; PKG, proteína cinase G; PRAK, proteína cinase ativada e ou regulada por p38^{MAPK}. Retirado de Dunkley et al., 2004.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Apesar de o metabolismo dopaminérgico ser considerado um importante alvo do Mn, até o momento não havia sido realizados estudos em relação à possível modulação da fosforilação e atividade da TH pelo metal. Neste sentido, no presente estudo tivemos por objetivo analisar a modulação da fosforilação e atividade da enzima TH em linhagem de neurônios catecolaminérgicos PC12, bem como analisar os mecanismos potencialmente envolvidos no efeito do Mn sobre esta enzima.

2.2. Objetivos Específicos

- i) Investigar a fosforilação da TH em sítios de Ser19, Ser31 e Ser40 e atividade da proteína em resposta ao tratamento prolongado com Mn;
- ii) Investigar o envolvimento de proteínas cinases (ERK1/2, p38^{MAPK}, PKA, PKC e CaMKII) no efeito do Mn sobre a fosforilação do sítio Ser40, dada a importância deste sítio na atividade de TH;
- iii) Investigar a participação de estresse oxidativo no efeito do Mn na fosforilação do sítio Ser40;
- iv) Analisar a viabilidade celular das culturas após o tratamento com diferentes concentrações de Mn;
- v) Avaliar a modulação de fosforilação de MAPKs e atividade de PKA e PKC pelo tratamento com Mn.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e drogas

Dodecil sulfato de sódio (SDS) e reagentes utilizados no sistema de eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) foram obtidos da Bio-Rad™ (Hercules, CA, USA). Padrões de peso molecular, membrana de nitrocelulose (Hybond ECL), kit de quimiluminescência ECL plus, anti-corpos secundários conjugado à peroxidase (anti mouse e anti rabbit) foram obtidos da GE Health Care™ (Little Chalfont, UK). Anti-corpos primários anti fosfo (Tre202/Tir204) e total ERK1/2, β -acti, Gö6983, peptídeo inibidor relacionado à autocamtida 2 (AIP), colágeno tipo I, N-acetil-cisteína (NAC), Ampliflu™ Red e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) bem como todos os demais reagentes utilizados nas culturas celulares foram obtidos da Sigma Chemical Co.™ (St Louis, MO, USA). H89 foi obtido da Biomol Research Laboratories™ (Plymouth Meeting, PA, USA). UO126 foi obtido da Promega Corporation™ (Madison, WI, USA). SB203580 foi obtido da Alexis™ (San Diego, CA, USA). Anti Sheep (anticorpo secundário conjugado à horseradish peroxidase) foi obtido da Chemicon™. Anti-corpos primários anti-fosfo e total p38^{MAPK}, anti-fosfo e total JNK1/2 e anti-PARP-1 foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology™ (CA, USA). Anti-corpos primários anti-substratos fosforilados (Ser) de PKA e PKC foram obtidos da Cell Signalling Technology™ (Beverly, MA, USA). Anti-corpos primários anti-Ser19, Ser31 e Ser40 e anti-total TH foram purificados e preparados como descrito em Gordon et al., 2008 (dados não publicados). (\pm)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox™) foi obtido da Fluka™ (Steinheim, Switzerland). Cloreto de Manganês foi obtido da Univar Analytical Reagents (Sydney, Australia).

3.2. Culturas celulares e tratamentos

As células PC-12, uma linhagem derivada de tumor da medula adrenal de rato (CRL-1721) foram obtidas do American Type Tissue Culture (ATCC - <http://www.atcc.org>). Esta linhagem é capaz de sintetizar e secretar dopamina, sendo que mais de 10 % do conteúdo protéico total destas células é atribuído à tirosina hidroxilase (TH) (Haycock, 1990). Neste estudo, as células PC12 foram cultivadas em garrafas de 25 cm² em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 5 % de soro fetal bovino e 10 % de soro de cavalo, 4 mmol/L L-glutamine, 15 mmol/L HEPES pH 7,4). As células foram mantidas e ambiente com 5 % de CO₂ à 37 °C, em meio completo, trocada a cada 3-4 dias. Após atingir 80 % de confluência, as células foram plaqueadas 48 horas antes dos tratamentos em placas de cultura de 6-12 poços cobertas com colágeno tipo I de cauda de rato na densidade de 2×10^5 células/poço (placa de 12 poços) ou 4×10^5 células/poço (placa de 6 poços). No dia do tratamento, o meio completo foi trocada por meio com baixa concentração de soro (1 % de soro fetal de bovino e 2 % de soro de cavalo) 1,5 h antes dos tratamentos. Inibidores de cinases (Gö6983, H89, UO126, SB203580, AIP) de antioxidantes (TroloxTM e NAC, quando presentes, foram adicionados 30 min antes da adição do Mn ao meio de incubação. A solução estoque de Mn foi preparada imediatamente antes dos tratamentos e adicionada às culturas de modo a atingir a concentração final desejada. Os inibidores de proteínas cinases e antioxidantes foram dissolvidos em DMSO. A concentração final de DMSO no meio de cultura não excedeu a concentração de 0,2 %. Foram feitos controles com veículos (DMSO) apropriados para todos os tipos de tratamento. Após os tratamentos serem concluídos, as células foram lisadas e utilizadas para a análise de fosforilação de proteínas, viabilidade celular, atividade de PP2A e TH.

3.3. Análise da fosforilação de proteínas

A análise da fosforilação de proteínas nas células PC12 foi realizada através da técnica de Western Blotting. Ao término dos tratamentos, o meio foi removido e as células foram solubilizadas com a adição de 200 µl de solução 2 % de SDS, 2 mM de EDTA, 1 % de ditiotreitol, 10 mM de glicerol, 50 mM de Tris (pH 6,8) por poço. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE, em gel 10 % e então eletrotransferida para membranas de nitrocelulose. As membranas foram lavadas em tampão TBS-T, submetidas ao bloqueio com BSA 0,5 % por 1 hora e incubadas por 12 horas à 4 °C com anticorpo primário específico para as diferentes proteínas analisadas. Subseqüentemente, as membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário (ligado à peroxidase). As proteínas foram visualizadas no sistema de imagem Fuji LAS 3000, utilizando reagentes de detecção ECL-plus. A densidade das bandas foi mensurada e expressa como vezes de aumento em relação ao controle. A correção da fosforilação por quantidade de proteína foi feita pela análise do conteúdo total de proteínas (TH total e MAPKs totais) e pelo uso de anticorpo primário anti β -actina.

3.4. Viabilidade celular das fatias hipocâmpais

A análise da viabilidade das células PC12 expostas por 24 h a diferentes concentrações de Mn foi realizada através do teste de redução do MTT. Finalizado os tratamentos, o meio foi aspirado e as células incubadas com MTT (3 mg/ml em tampão salina fosfato) por 60 min a 37 °C. Células viáveis convertem o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium = “Thiazolyl blue”) em um formazam púrpura após clivagem do anel tetrazólio por desidrogenases (Mosmann, 1983). O formazam foi solubilizado com a adição de 200 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade óptica é medida em Leitor de ELISA ($\lambda=540$ nm). Em estudos paralelos, após os tratamentos foram preparadas amostras de eletroforese para avaliação de

apoptose através da detecção da clivagem de PARP em fragmentos de 89 kDa por Western Blotting.

3.5. Medida da atividade da Tirosina Hidroxilase

Células PC12 foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços revestidas com colágeno a uma densidade de 40×10^4 células por poço e em seguida, tratadas com Mn $100 \mu\text{M}$ por 24 horas. Após o tratamento, o meio foi aspirado e $0,250 \text{ mL}$ de tampão de lise contendo 50 mmol / L Tris (pH 7,4), 1 mmol / L EGTA, 1 mmol / L EDTA, 1 mmol / L microcistina, 80 mmol / L molibdato de amônio, 2 mmol / L pirofosfato tetrassódico, 1 mmol / L DTT, 1 mmol / L de sódio vanadato, 1 mmol / L b-glicerofosfato e coquetel inibidor da protease (completo, 1 comprimido) foi adicionado às células. As células foram removidas e lisadas pela passagem através de uma agulha 26-G (Terumo Corporation, Tóquio, Japão). O lisado foi centrifugado a 15.000 g por 15 min a 4° C . O sobrenadante foi transferida para ependorfe no gelo e em seguida a atividade de TH foi analisada. A atividade de TH foi mensurada utilizando um método baseado na liberação da água tritiada (Reinhard et al. 1986). O mix de reação continha 60 mM de tampão fosfato e potássio (pH 7,2), $0,006\%$ (v / v) 2-mercaptoetanol, $36 \mu\text{g/ml}$ catalase, $24 \mu\text{M}$ tirosina, $4 \mu\text{Ci L-[3,5-}^3\text{H] -tirosine/mL}$ e 2 mM BH_4 . A atividade de TH foi medida à 25° C durante 9 min . O ensaio foi linear ao longo deste período. A alteração na atividade de TH foram expressas como vezes de aumento em relação à média das amostras controle (sem tratamento).

3.4. Análise da geração de H_2O_2

Para analisar a produção de H_2O_2 nas células PC12 em resposta ao tratamento com Mn, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços e incubadas por 24 horas com Mn ($100 \mu\text{M}$) na presença ou ausência de antioxidantes Trolox TM ou NAC. Após este período uma alíquota de meio ($20 \mu\text{l}$) foi retirada para análise da quantidade de H_2O_2 através do ensaio Ampliflu TM Red (conforme instruções do fabricante).

3.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Duncan quando necessário através do programa Statistic 6,0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da exposição prolongada ao Mn sobre a fosforilação e atividade da proteína

Tirosina Hidroxilase

Neste estudo, foi analisado o conteúdo total, atividade, bem como a fosforilação dos sítios Ser19, Ser31 e Ser40 da enzima tirosina hidroxilase (TH) em resposta ao tratamento prolongado (24 horas) de células catecolaminérgicas PC12 com Mn (MnCl_2 ; 10-1000 μM). Como verificado na figura 29A, o tratamento com Mn não alterou o conteúdo da proteína TH bem como os níveis de fosforilação do sítio Ser19 (29A e B) e Ser31 (29A e C) após 24 horas de incubação. Entretanto, o tratamento com Mn causou um substancial aumento, dependente de concentração, na fosforilação do sítio Ser40 (29A e 29D), este efeito foi estatisticamente significativo a partir da concentração de 100 μM . Considerando que a fosforilação do sítio Ser40 é o principal mecanismo responsável pela ativação de TH (Dunkley et al., 2004), a atividade desta enzima foi avaliada após 24 horas de tratamento com 100 μM de Mn. Esta concentração foi escolhida por causar um aumento de 2,5 vezes na fosforilação de TH e também por ser fisiologicamente relevante, desde que em células como astrócitos, o Mn pode ser encontrado em concentrações na ordem de 70 μM (Hazell, 2002). Como pode ser observado na figura 29E o tratamento com Mn causou um aumento de 1,4 vezes na atividade da enzima.

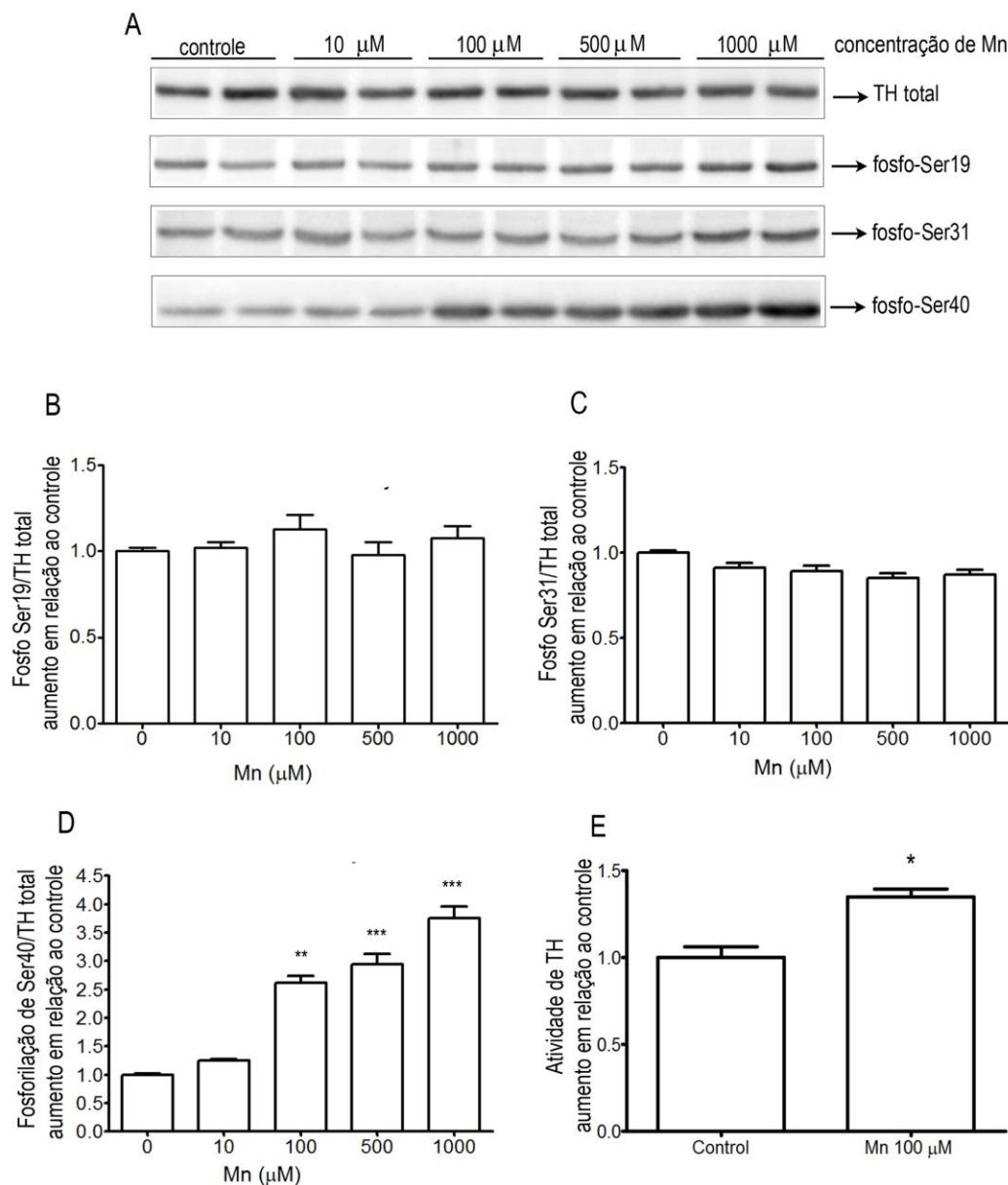


Figura 29. Efeitos da exposição prolongada ao Mn no conteúdo, fosforilação de Ser19, Ser31 e Ser40 e atividade de TH. Células PC12 foram incubadas por 24 horas com $MnCl_2$ (10-1000 μM) e a seguir foram lisadas para preparo de amostras para eletroforese e análise da fosforilação (Ser19, Ser31 e Ser40) e conteúdo de TH, pela técnica de Western Blotting. Os níveis de fosforilação dos sítios Ser19, Ser31 e Ser40 foram quantificados e expressos como razão da forma fosforilada/contéudo de TH. Paralelamente as células foram tratadas por 24 horas com Mn (100 μM) e então a atividade de TH foi avaliada. (A) Mostra os blottings referentes à expressão de TH e fosforilação de Ser19, Ser31 e Ser40. (B, C, D) Mostra a quantificação de Ser19 (B), Ser31 (C) e Ser40 (D). (E) Mostra o aumento da atividade de TH causada pelo tratamento com Mn. Os dados foram expressos como número de vezes de aumento em relação ao grupo controle. Os valores representam a média \pm E.P. de todos os experimentos. (A,B,C,D) $n=8$; (E) $n=6$. * $P<0,05$, ** $P<0,001$ em relação ao controle correspondente (sem Mn) utilizando a análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan.

4.2. Estudo do efeito do Manganês na viabilidade celular e fosforilação de proteínas cinase ativadas por estresse (SAPKs) JNK1/2 e p38^{MAPK}

Os efeitos citotóxicos do tratamento com Mn são bem demonstrados em modelos *in vivo* e em culturas celulares (Puli et al., 2006; Liu et al., 2006; Cai et al., 2007). Neste estudo, foi analisado o efeito do tratamento com Mn (10-1000 μ M) por 24 e 48 horas na viabilidade de células PC12 (figura 30A) através da técnica de redução do MTT. Após 24 horas de incubação, somente a concentração mais alta de Mn (1000 μ M) causou diminuição na viabilidade celular (aproximadamente 25%). Entretanto, após 48 horas de incubação, ocorreu uma diminuição de 20%, 75% e 80% na viabilidade celular observada nas concentrações de 100, 500 e 1000 μ M de Mn, respectivamente.

A clivagem de PARP [poli (ADP) ribose polimerase] em fragmento de 89 kDa é considerada um marcador apoptótico (Soldani e Scovassi, 2002). O tratamento com Mn não causou clivagem de PARP em nenhuma concentração analisada após 24 horas (figura 30B) ou 48 horas (dados não mostrados). O tratamento com estaurosporina (1 μ M) durante 24 horas (controle positivo) foi capaz de induzir a clivagem de PARP (figura 30B).

O nível de fosforilação e conteúdo de SAPKs (p38^{MAPK} e JNK1/2) foram também analisados nas células PC12 após 24 horas de incubação com diferentes concentrações de Mn (10-1000 μ M) (figura 30C e D) e foi observado um aumento significativo na fosforilação de p38 e JNK1/2 somente nas concentrações mais altas de Mn.

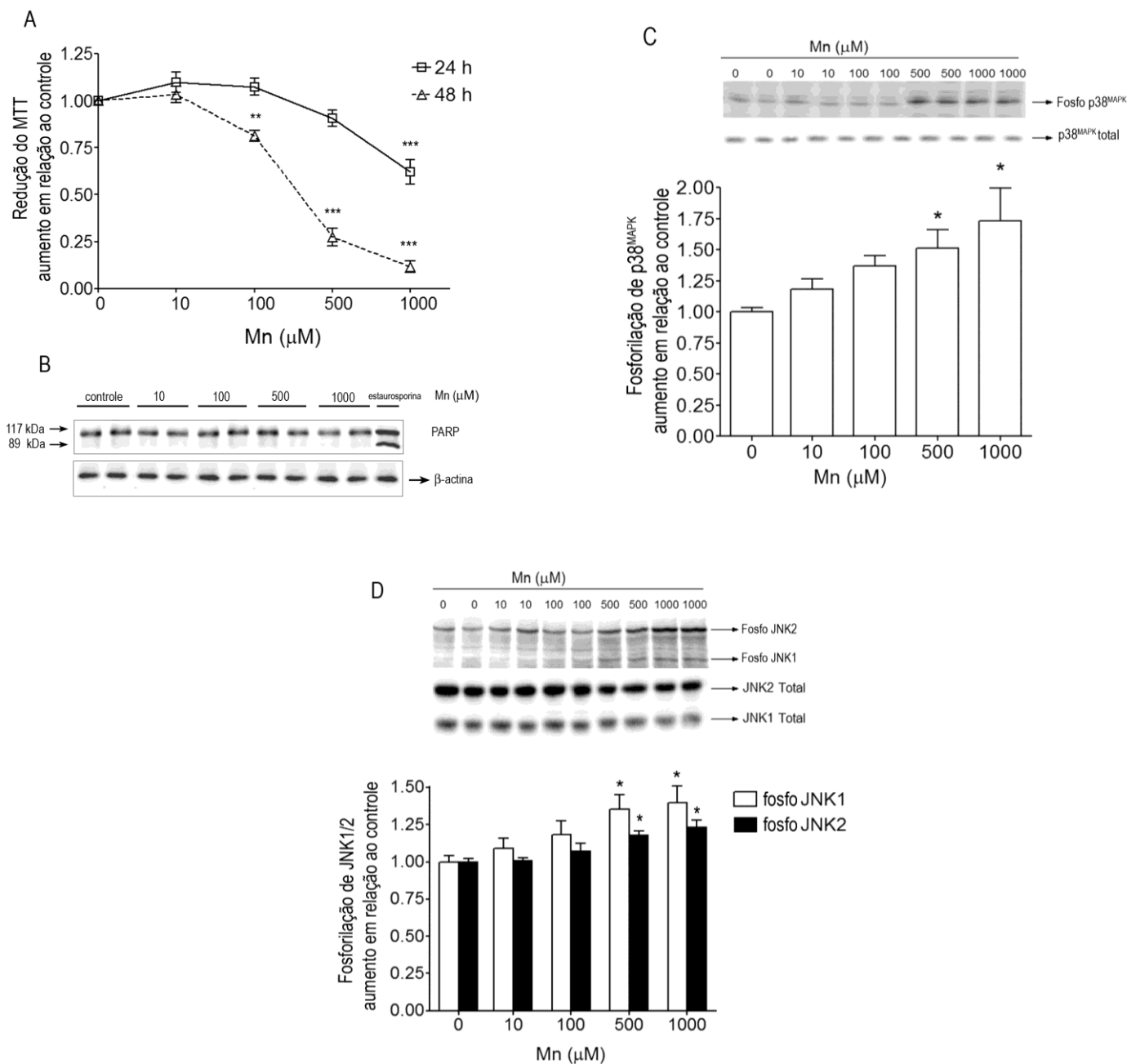


Figura 30. Efeitos do tratamento com Mn sobre a viabilidade, clivagem de PARP [poli (ADP) ribose polimerase] e conteúdo e fosforilação de p38^{MAPK} e JNK1/2. Células PC12 foram tratadas por 24 ou 48 horas com Mn (10-1000 μM), finalizado os tratamentos, a viabilidade celular foi medida pelo ensaio de redução do MTT. Além disso, após tratamento de 24 horas com Mn as células foram solubilizadas para a preparação de amostra de eletroforese para análise da clivagem de PARP, fosforilação e conteúdo de p38^{MAPK} e JNK1/2, a qual foi realizada pela técnica de Western Blotting, utilizando anti-corpos específicos. (A) Mostra a diminuição da viabilidade celular. (B) Mostra o blotting da análise da clivagem de PARP e conteúdo de β-actina. (C) Mostra a fosforilação de p38^{MAPK} e (D) a fosforilação de JNK1/2. Os dados estão expressos como número de vezes de aumento em relação ao grupo controle (sem Mn). Os valores representam média ± E.P. de todos os experimentos. (A) n=8-10; (B) n=3; (C,D) n=7-4.3. Efeitos do Mn sobre proteínas cinases capazes de fosforilar Ser40

A fosforilação de TH pode ser regulada por uma variedade de proteínas cinases e fosfatases, sendo PKA e PKC as principais cinases envolvidas na fosforilação sustentada de TH sobre o resíduo de Ser40 (Bobrovskaya et al., 2007 a, b). Neste trabalho, células PC12 foram tratadas com Mn 100 μ M por 24 horas. A atividade de PKA e PKC foi avaliada por Western Blotting utilizando anti-corpos específicos contra os substratos fosforilados de PKA e PKC (figura 31A e B). O tratamento com Mn 100 μ M aumentou a fosforilação dos substratos de PKA, esse efeito foi mais pronunciado nos substratos de 35 kDa, 60 kDa, 89 kDa e 117 kDa (figura 31A). Foi também observado aumento na fosforilação de um dos substratos de PKC, principalmente em 60 kDa (figura 31B). Tendo em vista que Mn aumentou a atividade de PKA e PKC, o possível envolvimento de ambas as enzimas no aumento de fosforilação de Ser40 por Mn foi investigado. Para isso, células PC12 foram pré incubadas com inibidores de PKA (H89; 5 μ M) e/ou PKC (Gö6983; 1 μ M) por 30 min seguido da adição de 100 μ M de Mn por 24 horas (figura 31C, D e E). O tratamento com inibidores não diminuiu o efeito do Mn sobre a fosforilação de Ser40. É importante ressaltar que os inibidores de PKA e PKC bloquearam os efeitos de forskolina (ativador de PKA) e dibutirado de forbol (PDB; ativador de PKC) nas concentrações utilizadas neste estudo (dados não mostrados).

Em experimentos paralelos, foram utilizados inibidores de ERK1/2 (UO126), p38^{MAPK} (SB203580) e CaMKII (AIP), os quais não bloquearam a estimulação de Ser40 por Mn, embora todos os inibidores estivessem ativos nas condições experimentais utilizadas, sendo capazes de inibir a fosforilação das respectivas proteínas cinases (dados não mostrados).

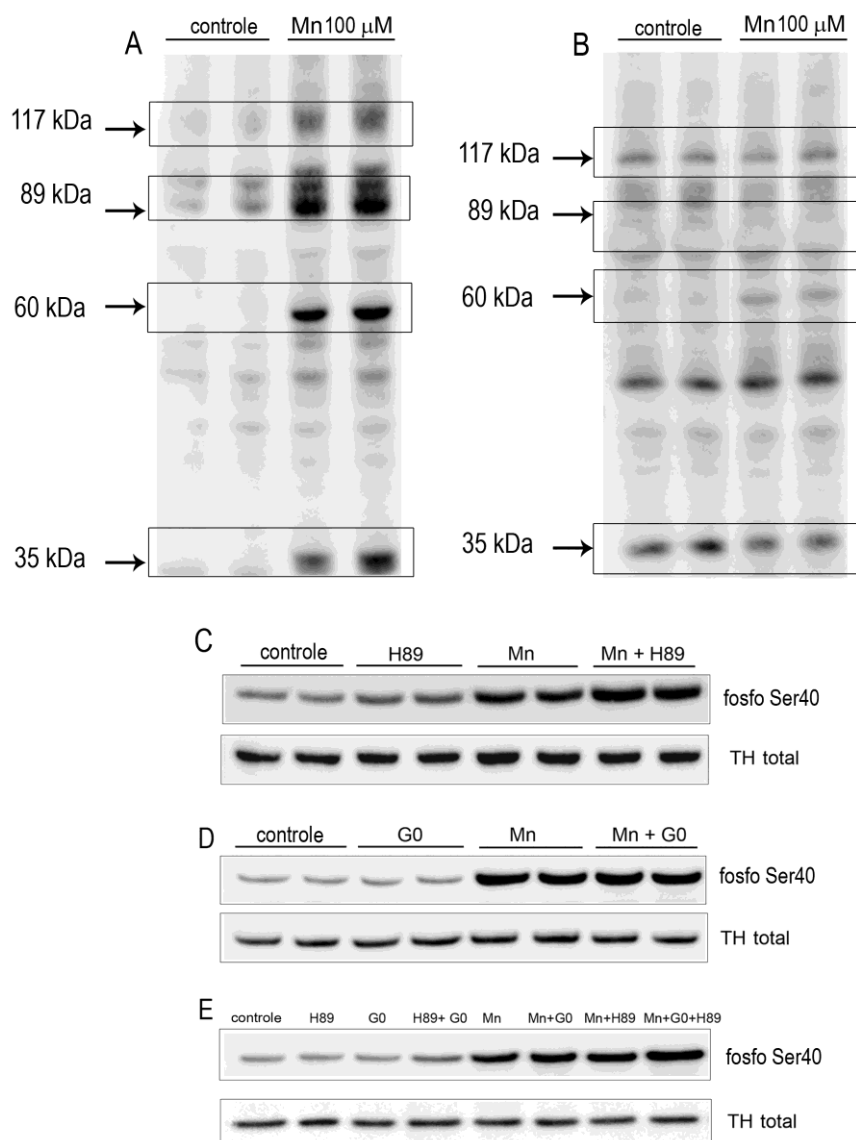


Figura 31. Efeito do tratamento com Mn sobre a atividade de PKA e PKC e fosforilação do sítio Ser40 de TH. Células PC12 foram incubadas por 24 horas com Mn (100 μM). Terminado o tratamento, as células foram solubilizadas para medida da atividade de PKA e PKC através análise por Western Blotting utilizando anti-corpos específicos contra substratos fosforilados destas proteínas cinases. Além disso, as células foram incubadas com Mn e inibidores de PKA (H89; 5 μM), PKC (Gö6983; 1 μM) ou ambos e então utilizadas para análise da fosforilação de Ser40. (A) Mostra o blotting representativo da fosforilação de substratos de PKA, os substratos de 117kDa, 89kDa, 60kDa e 35kDa estão selecionados. (B) Mostra o blotting representativo da fosforilação de substratos de PKC, os substratos de 117kDa, 89kDa, 60kDa e 35kDa estão selecionados. Os blottings representativos da fosforilação de Ser40 e conteúdo de TH após tratamento com Mn na presença de inibidores de PKA, PKC ou ambos estão demonstrados nas figuras C, D e E, respectivamente. As figuras são representativas de 6 experimentos.

4.4. Envolvimento do estresse oxidativo na fosforilação de TH

O estresse oxidativo tem sido implicado na citotoxicidade do Mn (Zhang et al., 2007; Prabhakaran et al., 2008). O envolvimento do estresse oxidativo na estimulação da fosforilação de Ser40 por 24 horas de tratamento com Mn 100 μ M, em células PC12 foi investigado. Inicialmente foi medida a concentração de H₂O₂ no meio de incubação das células submetidas ou não ao tratamento com Mn (figura 32A). O tratamento com Mn causou um aumento de 3 vezes na produção de H₂O₂ quando comparado ao grupo controle (sem tratamento). Este efeito foi completamente revertido por Trolox™ 100 μ M (figura 32A).

Entretanto, o aumento substancial na produção de H₂O₂ pelo tratamento com Mn não parece estar envolvido na estimulação da fosforilação de Ser40, pois a co-incubação de Mn com Trolox™ não reverteu este efeito (figura 32B), apesar de bloquear a produção de H₂O₂ por Mn. Resultados similares foram observados com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) (dados não mostrados).

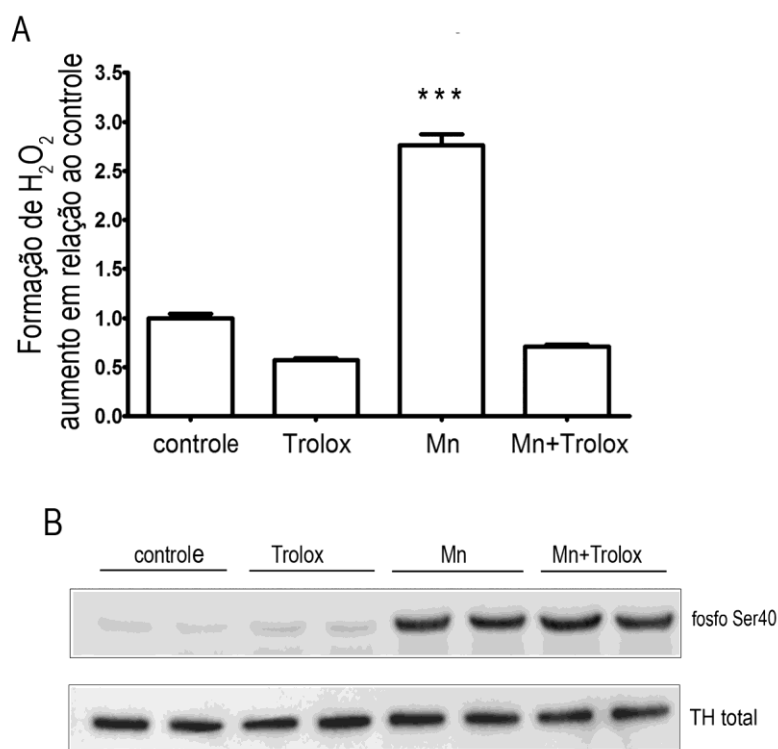


Figura 32. Estudo do envolvimento do estresse oxidativo na indução de fosforilação de Ser40 pelo tratamento com Mn. Células PC12 foram incubadas por 24 horas com Mn (100 μ M) e/ou antioxidante TroloxTM (100 μ M). Ao término dos tratamentos, o meio de incubação foi utilizado para a medida de produção de H₂O₂ através do ensaio de medida da fluorescência de AmplifuTMRed. Além disso, as células foram lisadas e a fosforilação de TH no sítio Ser40 e conteúdo total de TH analisado por Western Blotting. A formação de H₂O₂ pelas células após incubação com Mn e/ou TroloxTM está sendo mostrada em (A). (B) Mostra blotting representativo de fosforilação de Ser40 e conteúdo de TH nas células após tratamento com Mn e/ou TroloxTM. Os dados são expressos como número de vezes de aumento em relação ao grupo controle (sem tratamento). Os valores representam a média \pm E.P. de todos os experimentos. (A) n=8; (B) n=8. ***P<0,001 em relação ao grupo controle utilizando a análise ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan.

4.5. Estudo da fosforilação de TH em diferentes sítios (Ser19, Ser31 e Ser40) em resposta ao Mn ao longo do período de incubação.

O transporte e os níveis celulares de Mn são considerados fatores limitantes para o estabelecimento dos efeitos citotóxicos deste metal (Roth et al., 2002). Deste modo, através de uma curva de tempo de incubação com Mn 100 μ M, foi avaliado o nível de fosforilação dos diferentes sítios de TH (Ser19, Ser31 e Ser40) ao longo do período de tratamento (1-24 horas) (figura 33). Como pode ser observada na figura 33B, a fosforilação de Ser40 foi aumentada significativamente a partir de 6 horas de incubação (1,7 vezes de aumento). Este efeito foi potencializado com o decorrer do tempo, chegando a um aumento de 2,7 vezes após 24 horas de tratamento (figura 33A e B). A fosforilação de Ser31 apresentou um perfil diferente, desde que foi observado aumento significativo na fosforilação a partir de 2 horas de incubação com Mn e um efeito máximo ocorreu após 5 horas de tratamento (aumento de 2,5 vezes). A fosforilação do sítio Ser31 retornou ao nível basal após 7 horas de tratamento com Mn (figura 33C). Não foi observada alteração na fosforilação de Ser19 em nenhum período investigado (dados não mostrados).

Em experimentos paralelos células PC12 foram incubadas por 6 horas com Mn 100 μ M, um período que causa um forte aumento na fosforilação de Ser40 (figura 33B) e Ser31 (figura 33C). Após este período, o meio com Mn foi substituído por meio sem Mn, e assim permaneceu por mais 18 horas, quando o tratamento foi interrompido e a fosforilação de Ser40 e Ser31 foi avaliada. Nesta situação, não foi observado alteração na fosforilação de Ser40 e Ser31 (dados não mostrados). Este dado sugere que o aumento prolongado da fosforilação de Ser40 depende da presença continuada de Mn no meio de cultura e ainda aponta para ação de fosfatases atuando ativamente sobre Ser40.

ERK é a principal cinase responsável pela fosforilação do sítio de Ser31 em TH, sendo que a inibição da ativação de ERK1/2 por UO126 leva ao completo bloqueio da fosforilação de Ser31 (Bobrovskaya et al., 2001). Além disso, a fosforilação de ERK pode

ocorrer em resposta a agentes oxidantes e antioxidantes (Gelain et al., 2007). Neste sentido, o nível de fosforilação de ERK1 foi significativamente aumentado (2,2 vezes) após 6-7 horas de incubação com Mn, retornando aos níveis basais após 8 horas. Além disso, ocorreu um aumento na fosforilação de ERK2 (3,5 vezes) após 4 horas de incubação com Mn, este efeito manteve-se elevado por até 24 horas de incubação (figura 33D). Este resultado sugere envolvimento de ERK1 na fosforilação de TH em Ser31.

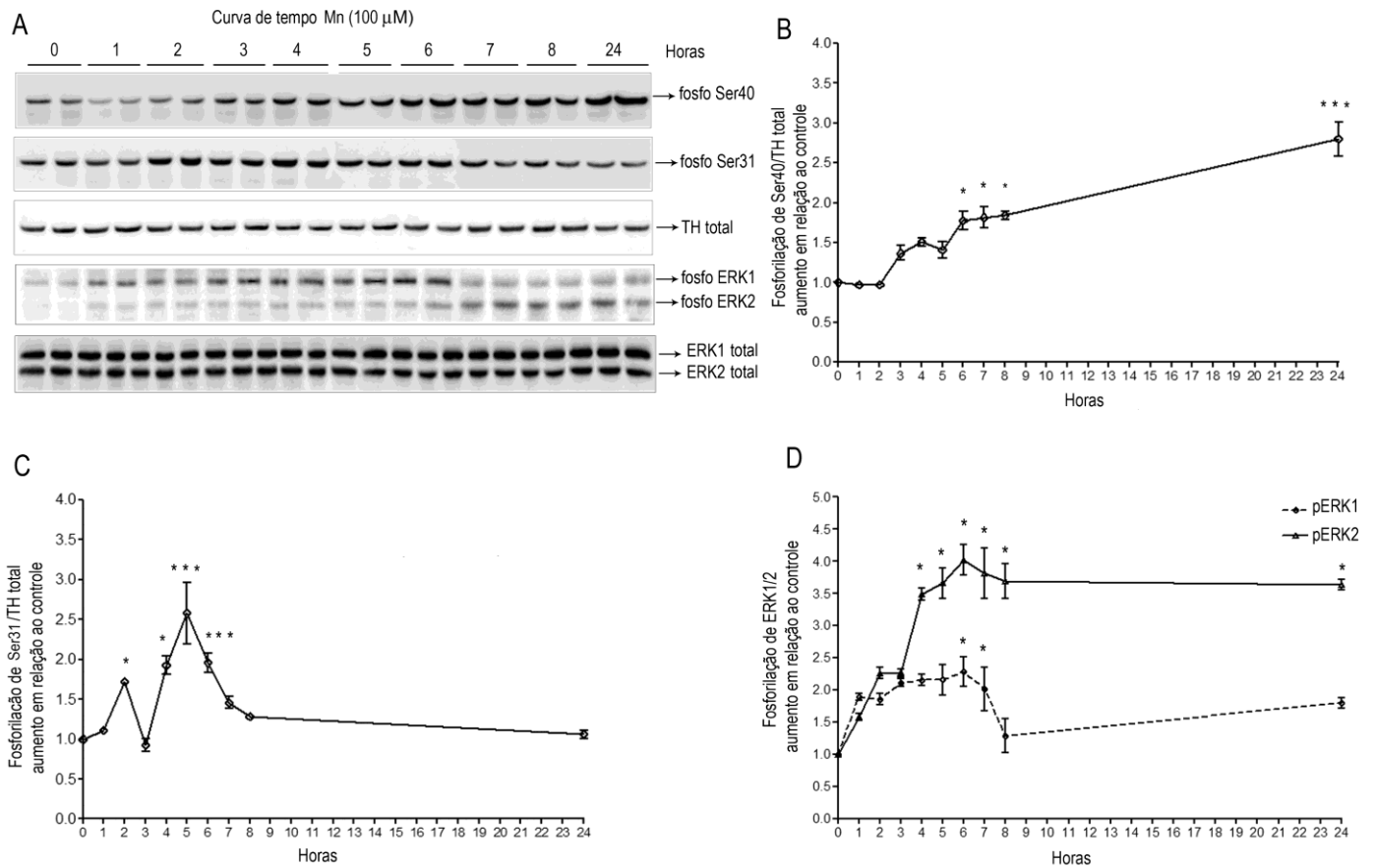


Figura 33. Curva de tempo da fosforilação dos sítios Ser31 e Ser40 e ERK1/2 em resposta a Mn. Células PC12 foram incubadas por diferentes períodos (1-24 h) com Mn 100 μ M. O nível de fosforilação de Ser40, Ser31 e conteúdo de TH em cada período de tratamento foram avaliados pela técnica de Western Blotting. A fosforilação e conteúdo de ERK1/2 foram também avaliados. (A) Mostra blottings representativos da fosforilação de Ser40, Ser31, conteúdo de TH, fosforilação e conteúdo de ERK1/2. (B, C, D) Mostra a quantificação da fosforilação de Ser40, Ser31 e ERK1/2 respectivamente em resposta a diversos períodos de incubação com Mn. Os dados estão expressos como número de vezes de aumento em relação ao grupo controle (não exposto ao Mn). Os valores representam a média \pm E.P. (B) n=8-10; (C) n=8-10 exceto para o tempo 3 h onde o n= 4; (D) n=5. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 em relação ao grupo controle utilizando a análise ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan.

5. DISCUSSÃO

Têm sido bem demonstrado que em altas concentrações Mn leva à morte celular acompanhada por aumento da produção de espécies oxidantes como H_2O_2 , O_2^- e quinonas reativas causando estresse oxidativo e ativação de SAPKs (Hirata et al., 1998; Takeda 2003; El Mchichi et al., 2007). Neste estudo, nós verificamos um aumento significativo na produção de H_2O_2 em resposta ao tratamento com baixa concentração de Mn (100 μM), entretanto este efeito não foi suficiente para causar a ativação de SAPKs ou alterar a viabilidade celular após 24 horas de incubação. Em 100 μM de Mn foi observada uma diminuição na viabilidade celular somente após 48 horas de incubação. Contrariamente, altas concentrações de Mn causaram aumento significativo na fosforilação de p38^{MAPK} e JNK1/2 e também causaram queda na viabilidade celular após 24 horas de incubação. Este fenômeno reforça a hipótese de que são os níveis intracelulares de Mn, dependentes da taxa de transporte deste metal pelas células, que controlam os efeitos citotóxicos deste metal (Roth et al., 2002).

Na concentração de 100 μM , Mn aumentou os níveis de fosforilação de ERK1 e Ser31 de uma maneira similar, causando um pico de fosforilação entre 6-8 horas após a exposição inicial ao metal. Este aumento tardio na fosforilação destas proteínas pode ser atribuído à taxa de captação de Mn e ao tempo necessário para causar uma produção substancial de pró oxidantes, como H_2O_2 . A fosforilação da proteína ERK pode se aumentada em resposta agentes oxidantes, como demonstrado em estudos prévios, onde o tratamento de células adrenais cromafins bovinas (BACC) com retinol aumentou a fosforilação de ERK, sendo este efeito revertido por antioxidantes (Gelain et al. 2007). É sabido que ERK é a principal cinase capaz de fosforilar TH no sítio Ser31, sendo que o uso de inibidor de ERK, como o UO126 bloqueia completamente a fosforilação de Ser31 (Bobrovskaya et al., 2001).

No presente estudo, observou-se aumento significativo na fosforilação de TH no sítio de Ser40 após 6 horas de tratamento com 100 μM de Mn, sendo que este efeito foi prolongado por pelo menos 24 horas. Este efeito não foi atribuído à aumentada produção de

H₂O₂, desde que o antioxidante TroloxTM, o qual bloqueou completamente o aumento na produção de H₂O₂, não afetou a fosforilação de Ser40 por Mn. Este resultado é especialmente importante, desde que o estresse oxidativo, considerado um dos principais mediadores dos efeitos tóxicos do Mn, parece não estar envolvido na estimulação de fosforilação de Ser40 por este metal. De acordo com nosso trabalho, estudos recentes demonstraram que o tratamento com Mn causou alterações comportamentais em ratos, em concentrações onde não foi observado indução de estresse oxidativo (Ávila et al., 2008). Todos estes dados sugerem que o estresse oxidativo não é o principal mediador da toxicidade do Mn. Por outro lado, o aumento da atividade de TH, que leva a uma aumentada síntese e liberação de dopamina poderia ser uma ação primária na cadeia de eventos que conduzem a neurotoxicidade do metal e afetam o funcionamento neural.

A fosforilação de TH no sítio Ser40 ocorre por um mecanismo hierárquico que envolve a fosforilação dos sítios de Ser19 e Ser40 (Lehman et al., 2006). No presente estudo, ao contrário do observado em Ser40, a fosforilação de Ser31 não foi prolongada além de 8 horas e a fosforilação de Ser40 não foi alterada por UO126, um inibidor de MEK reconhecido por bloquear a fosforilação de Ser31. Deste modo, estes dados sugerem um mecanismo não hierárquico mediando a fosforilação de Ser40. Estudos prévios demonstraram que a fosforilação prolongada de TH em Ser40 é atribuída à ativação de PKA e PKC (Bobrovskaya et al., 2007a, b). Neste estudo, a atividade de PKA e PKC permaneceu aumentada por 24 horas, como verificado pela análise da fosforilação de substratos de PKA e PKC, que se mantiveram fosforilados neste período. Entretanto, o uso de inibidores de PKA e PKC, embora tenha bloqueado a atividade destas cinases, não bloqueou a fosforilação de Ser40, sugerindo que estas cinases não estão envolvidas na fosforilação deste sítio. Além disso, não foi evidenciado envolvimento das proteínas cinases ERK1/2, p38^{MAPK} e CaMKII, bem como a fosfatase PP2A na indução de fosforilação de Ser40 por Mn (dados não mostrados).

A demora para que iniciasse aumento na fosforilação de Ser40 sugere um efeito não mediado pela ativação de receptores extracelulares por Mn, mas sim pela captação de Mn pelas células, que pode se ocorrer através de canais iônicos ou mecanismo de transporte de metais divalentes (Roth et al., 2002). Uma possível explicação para o efeito prolongado na fosforilação de Ser40 induzido por Mn pode ser a estimulação da secreção de dopamina pelas células, em resposta a entrada de Mn (Powis e Dunkley, 1996) com diminuição dos níveis citoplasmáticos de dopamina. Isto poderia diminuir a inibição de TH pela ligação a catecolaminas (Gordon et al., 2008) e portanto, permitiria um aumento na atividade de TH ocasionado por fosforilação da proteína.

Concluindo, os dados aqui apresentados demonstram que a fosforilação prolongada de TH no sítio de Ser40 causada por Mn leva também a uma ativação prolongada da enzima, que pode causar aumento na síntese e liberação de DA pelas células. Nossos achados poderiam ter uma implicação importante no mecanismo de neurotoxicidade que ocorre no manganismo. Neste sentido, tem sido demonstrado que um excessivo aumento na atividade de TH está associado com morte celular ao longo do tempo (Shen e Dryhurst 1998; Stathakis et al., 1999). Este processo poderia ser mediado por estresse oxidativo, resultante da oxidação de catecolaminas, o que contribuiria para a degeneração de células dopaminérgicas.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os dados apresentados nesta tese resultaram nas seguintes conclusões:

CAPÍTULO I

- i. O composto difenil disseleneto apresentou efeito neuroprotetor contra a toxicidade causada por H₂O₂ em modelo de fatias hipocâmpais de ratos. Isto foi evidenciado pela capacidade do composto em bloquear a perda de viabilidade celular e dano oxidativo;
- ii. O efeito neuroprotetor do composto difenil disseleneto ocorreu de maneira extracelular e foi atribuído a sua atividade do tipo tiol-peroxidase. Este dado foi atribuído ao fato de que a adição de tióis impermeáveis ao meio de incubação melhorou o efeito protetor do composto. O mesmo não foi observado quando as fatias hipocâmpais foram pré-incubadas com uma forma permeável de glutatona;
- iii. O composto foi capaz de reverter a fosforilação de ERK1/2 induzida pelo H₂O₂, possivelmente devido ao fato de o composto degradar o peróxido adicionado no meio de incubação;
- iv. O composto ebselen apresentou efeito antidepressivo no teste do nado forçado em camundongos, fato demonstrado por uma diminuição no tempo de imobilidade dos animais. Entretanto o mesmo não foi observado no teste de suspensão da cauda.
- v. O efeito antidepressivo do ebselen ocorreu independentemente do sistema serotoninérgico, porém, os sistemas dopaminérgicos e noradrenérgico aparentemente estão envolvidos no efeito antidepressivo do ebselen;
- vi. Neste trabalho demonstramos um efeito pró-apoptótico do composto difenil disseleneto em linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Isto foi demonstrado

por um aumento dependente de concentração no número de células apoptóticas e proteólise de polid(ADP-ribose) polimerase.

- vii. O efeito pró-apoptótico do organocalcogênio foi acompanhado por uma inibição na fosforilação de p38^{MAPK} e PKC e ativação de ERK.
- viii. A proteína cinase ERK1/2 aparentemente exerceu um papel citoprotetor contra a toxicidade induzida pelo difenil diseleneto, visto que sua inibição resultou em uma potencialização do efeito pró-apoptótico do organocalcogênio.
- ix. Em linhas gerais, nosso estudo demonstrou de forma inédita que compostos orgânicos de selênio exercem múltiplas ações biológicas, afetando diversos alvos moleculares e resultando em processos neuroprotetores, antidepressivos e antitumorais, ressaltando a versatilidade farmacológica destes compostos.

CAPÍTULO II

- i. O elemento manganês demonstrou causar citotoxicidade em células de feocromocitoma PC12 através de diminuição na viabilidade celular e estimulação da fosforilação de SAPKs;
- ii. Em faixas de concentração que não afetaram a viabilidade celular ou fosforilaram SAPKs, o manganês causou um aumento prolongado nos níveis de fosforilação do sítio Ser40 da proteína tirosina hidroxilase;
- iii. Este efeito resultou em um aumento na atividade desta enzima, tornando este resultado relevante do ponto de vista fisiológico;

- iv. O aumento na fosforilação do sítio Ser40 de tirosina hidroxilase ocorreu de maneira independente da ativação de PKA e PKC, as principais proteínas responsáveis pela fosforilação deste sítio *in situ* e *in vivo*.
- v. Apesar de o estresse oxidativo ser considerado um importante mediador dos efeitos citotóxicos do manganês, neste estudo, o estresse oxidativo não esteve implicado no aumento da fosforilação de Ser40 induzido pelo metal;
- vi. O aumento na fosforilação de Ser31 na tirosina hidroxilase foi correlacionado com um similar aumento na fosforilação de ERK, atribuindo a esta proteína cinase um importante papel na modulação da fosforilação de tirosina hidroxilase causada por manganês;
- vii. Estes dados propõem um novo mecanismo de ação mediando a neurotoxicidade induzida por manganês. Considerando que dados na literatura mostram que um aumento na atividade de tirosina hidroxilase pode resultar em morte neuronal em longo prazo, estes dados tornam-se relevantes do ponto de vista toxicológico.

7. REFERÊNCIAS

Aschner M., Guilarte T. R., Schneider J. S. and Zheng W. (2007) Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **221**, 131-147.

Avila D. S., Gubert P., Fachinetto R., Wagner C., Aschner M., Rocha J. B. and Soares F. A. (2008) Involvement of striatal lipid peroxidation and inhibition of calcium influx into brain slices in neurobehavioral alterations in a rat model of short-term oral exposure to manganese. *Neurotoxicology* **29**, 1062-1068.

Bae J. H., Jang B. C., Suh S. I., Ha E., Baik H. H., Kim S. S., Lee M. Y. and Shin D. H. (2006) Manganese induces inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via activation of both MAP kinase and PI3K/Akt pathways in BV2 microglial cells. *Neurosci Lett* **398**, 151-154.

Bobrovskaya L., Odell A., Leal R. B. and Dunkley P. R. (2001) Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. *J Neurochem* **78**, 490-498.

Bobrovskaya L., Gelain D. P., Gilligan C., Dickson P. W. and Dunkley P. R. (2007a) PACAP stimulates the sustained phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40. *Cell Signal* **19**, 1141-1149.

Bobrovskaya L., Gilligan C., Bolster E. K., Flaherty J. J., Dickson P. W. and Dunkley P. R. (2007b) Sustained phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40: a novel mechanism for maintenance of catecholamine synthesis. *J Neurochem* **100**, 479-489.

Bowler R. M., Gysens S., Diamond E., Nakagawa S., Drezgic M. and Roels H. A. (2006) Manganese exposure: neuropsychological and neurological symptoms and effects in welders. *Neurotoxicology* **27**, 315-326.

Brenneman K. A., Wong B. A., Buccellato M. A., Costa E. R., Gross E. A. and Dorman D. C. (2000) Direct olfactory transport of inhaled manganese ((⁵⁴MnCl₂) to the rat brain: toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model. *Toxicol Appl Pharmacol* **169**, 238-248.

Cai T., Yao T., Li Y., Chen Y., Du K., Chen J. and Luo W. (2007) Proteasome inhibition is associated with manganese-induced oxidative injury in PC12 cells. *Brain Res* **1185**, 359-365.

Chen M. K., Lee J. S., McGlothan J. L., Furukawa E., Adams R. J., Alexander M., Wong D. F. and Guilarte T. R. (2006) Acute manganese administration alters dopamine transporter levels in the non-human primate striatum. *Neurotoxicology* **27**, 229-236.

Couper J. (1837) On the effect of black oxide of manganese when inhaled in the lungs. *Br Ann Med Pharmacol* **1**, 41-42.

Dunkley P. R., Bobrovskaya L., Graham M. E., von Nagy-Felsobuki E. I. and Dickson P. W. (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* **91**, 1025-1043.

El Mchichi B., Hadji A., Vazquez A. and Leca G. (2007) p38 MAPK and MSK1 mediate caspase-8 activation in manganese-induced mitochondria-dependent cell death. *Cell Death Differ* **14**, 1826-1836.

- Emara A. M., el-Ghawabi S. H., Madkour O. I. and el-Samra G. H. (1971) Chronic manganese poisoning in the dry battery industry. *Br J Ind Med* **28**, 78-82.
- Erikson K. M., Dobson A. W., Dorman D. C. and Aschner M. (2004) Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. *Sci Total Environ* **334-335**, 409-416.
- Erikson K. M., Dorman D. C., Lash L. H. and Aschner M. (2007) Manganese inhalation by rhesus monkeys is associated with brain regional changes in biomarkers of neurotoxicity. *Toxicol Sci* **97**, 459-466.
- Fitsanakis V. A., Au C., Erikson K. M. and Aschner M. (2006) The effects of manganese on glutamate, dopamine and gamma-aminobutyric acid regulation. *Neurochem Int* **48**, 426-433.
- Gelain D. P., Moreira J. C., Bevilaqua L. R., Dickson P. W. and Dunkley P. R. (2007) Retinol activates tyrosine hydroxylase acutely by increasing the phosphorylation of serine40 and then serine31 in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* **103**, 2369-2379.
- Gordon S. L., Quinsey N. S., Dunkley P. R. and Dickson P. W. (2008) Tyrosine hydroxylase activity is regulated by two distinct dopamine-binding sites. *J Neurochem* **106**, 1614-1623.
- Greene L. A. and Tischler A. S. (1982) PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. *Adv Cell Neurobiol* **3**, 373-414.
- Guilarte T. R., Chen M. K., McGlothan J. L., Verina T., Wong D. F., Zhou Y., Alexander M., Rohde C. A., Syversen T., Decamp E., Koser A. J., Fritz S., Gonczi H., Anderson D. W. and Schneider J. S. (2006) Nigrostriatal dopamine system dysfunction and subtle motor deficits in manganese-exposed non-human primates. *Exp Neurol* **202**, 381-390.
- Guilarte T. R., Chen M. K., McGlothan J. L., Verina T., Wong D. F., Zhou Y., Alexander M., Rohde C. A., Syversen T., Decamp E., Koser A. J., Fritz S., Gonczi H., Anderson D. W. and Schneider J. S. (2006) Nigrostriatal dopamine system dysfunction and subtle motor deficits in manganese-exposed non-human primates. *Exp Neurol* **202**, 381-390.
- Gwiazda R. H., Lee D., Sheridan J. and Smith D. R. (2002) Low cumulative manganese exposure affects striatal GABA but not dopamine. *Neurotoxicology* **23**, 69-76.
- Haycock J. W. (1990) Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31, and 40. *J Biol Chem* **265**, 11682-11691.
- Henriksson J. and Tjalve H. (2000) Manganese taken up into the CNS via the olfactory pathway in rats affects astrocytes. *Toxicol Sci* **55**, 392-398.
- Hirata Y., Adachi K. and Kiuchi K. (1998) Activation of JNK pathway and induction of apoptosis by manganese in PC12 cells. *J Neurochem* **71**, 1607-1615.
- Hussain S. M., Javorina A. K., Schrand A. M., Duhart H. M., Ali S. F. and Schlager J. J. (2006) The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci* **92**, 456-463.
- Jarup L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* **68**, 167-182.
- Lehmann I. T., Bobrovskaya L., Gordon S. L., Dunkley P. R. and Dickson P. W. (2006) Differential regulation of the human tyrosine hydroxylase isoforms via hierarchical phosphorylation. *J Biol Chem* **281**, 17644-17651.

- Leonard S. S., Harris G. K. and Shi X. (2004) Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* **37**, 1921-1942.
- Liao S. L., Ou Y. C., Chen S. Y., Chiang A. N. and Chen C. J. (2007) Induction of cyclooxygenase-2 expression by manganese in cultured astrocytes. *Neurochem Int* **50**, 905-915.
- Liu X., Sullivan K. A., Madl J. E., Legare M. and Tjalkens R. B. (2006) Manganese-induced neurotoxicity: the role of astroglial-derived nitric oxide in striatal interneuron degeneration. *Toxicol Sci* **91**, 521-531.
- Mergler D. and Baldwin M. (1997) Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: an update. *Environ Res* **73**, 92-100.
- Morello M., Canini A., Mattioli P., Sorge R. P., Alimonti A., Bocca B., Forte G., Martorana A., Bernardi G. and Sancesario G. (2008) Sub-cellular localization of manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study. *Neurotoxicology* **29**, 60-72.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- NRC (1999) National research council report. Arsenic in drinking water. . *National Academy Press, Washington, DC*.
- Perl D. P. and Olanow C. W. (2007) The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 675-82.
- Powis D. A., O'Brien K. J., Harrison S. M., Jarvie P. E. and Dunkley P. R. (1996) Mn²⁺ can substitute for Ca²⁺ in causing catecholamine secretion but not for increasing tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium* **19**, 419-429.
- Prabhakaran K., Ghosh D., Chapman G. D. and Gunasekar P. G. (2008) Molecular mechanism of manganese exposure-induced dopaminergic toxicity. *Brain Res Bull* **76**, 361-367.
- Puli S., Lai J. C., Edgley K. L., Daniels C. K. and Bhushan A. (2006) Signaling pathways mediating manganese-induced toxicity in human glioblastoma cells (u87). *Neurochem Res* **31**, 1211-1218.
- Roth J. A., Horbinski C., Higgins D., Lein P. and Garrick M. D. (2002) Mechanisms of manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death and cell differentiation. *Neurotoxicology* **23**, 147-157.
- Shen X. M. and Dryhurst G. (1998) Iron- and manganese-catalyzed autoxidation of dopamine in the presence of L-cysteine: possible insights into iron- and manganese-mediated dopaminergic neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* **11**, 824-837.
- Siegel G. J., Agranoff B., Albers R. W., Fisher S. and Uhler M. (1999) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, Sixth Edition. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Soldani C. and Scovassi A. I. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* **7**, 321-328.

Stathakis D. G., Burton D. Y., McIvor W. E., Krishnakumar S., Wright T. R. and O'Donnell J. M. (1999) The catecholamines up (Catsup) protein of *Drosophila melanogaster* functions as a negative regulator of tyrosine hydroxylase activity. *Genetics* **153**, 361-382.

Takeda A., Kodama Y., Ishiwatari S. and Okada S. (1998) Manganese transport in the neural circuit of rat CNS. *Brain Res Bull* **45**, 149-152.

Takeda A. (2003) Manganese action in brain function. *Brain Res Brain Res Rev* **41**, 79-87.

Waalkes M. P., Fox D. A., States J. C., Patierno S. R. and McCabe M. J., Jr. (2000) Metals and disorders of cell accumulation: modulation of apoptosis and cell proliferation. *Toxicol Sci* **56**, 255-261.

Zhang B. Y., Chen S., Ye F. L., Zhu C. C., Zhang H. X., Wang R. B., Xiao C. F., Wu T. C. and Zhang G. G. (2002) Effect of manganese on heat stress protein synthesis of newborn rats. *World J Gastroenterol* **8**, 114-118.

Zhang S., Fu J. and Zhou Z. (2004) In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. *Toxicol In Vitro* **18**, 71-77.

Zhang P., Hatter A. and Liu B. (2007) Manganese chloride stimulates rat microglia to release hydrogen peroxide. *Toxicol Lett* **173**, 88-100.

8. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados apresentados nesta tese compõem os seguintes artigos científicos:

- ✓ Posser, T., Franco, J.L., Santos, D.A., Rigon, A.P., Farina, M., Dafré, A.L., Rocha, J.B.T., Leal, R.B. (2008) Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. *Brain Research* **1199**, 138-147.
- ✓ Posser, T., Kaster, M.P., Baraúna, S.C., Rocha, J.B.T., Rodrigues, A.L.S., Leal, R.B. (2009) Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Eur J Pharmacol* **602**, 85-91.
- ✓ Posser T, Franco JL, Bobrovkaya L, Leal RB, Dickson PW, Dunkley PR (2009) Sustained tyrosine hydroxylase phosphorylation in PC12 cells exposed to manganese. *Submetido ao Journal of Neurochemistry*.
- ✓ Posser T, Franco JL, Bobrovkaya L, Leal RB, Dickson PW, Dunkley PR (2009) Cytotoxic effects of diphenyl diselenide in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: protective role of ERK1/2. Em preparação.