

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO DUAL (ANTIOXIDANTE E/OU PRÓ-  
OXIDANTE) E AÇÃO NEUROPROTETORA DO EBSELEN, ÁCIDO CAFÉICO  
E MEMANTINA EM CÉLULAS NEURAIS (NEURO-2A) *IN VITRO*.**

PAULA ANDRADE DA FONSECA PRADO

Belo Horizonte – MG  
Fevereiro / 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO DUAL (ANTIOXIDANTE E/OU PRÓ-  
OXIDANTE) E AÇÃO NEUROPROTETORA DO EBSELEN, ÁCIDO CAFÉICO  
E MEMANTINA EM CÉLULAS NEURAIS (NEURO-2A) *IN VITRO*.**

PAULA ANDRADE DA FONSECA PRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Neurociências do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Míriam Chaves Schultz

Belo Horizonte – MG

Fevereiro / 2012

*Dedico esta dissertação aos amores da minha vida, Ricardo e Marina, por caminharem ao meu lado, SEMPRE.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter colocado em meu caminho pessoas especiais que de várias maneiras contribuíram para a realização deste sonho.

Ao Ricardo por ter sido meu porto seguro, meu conforto, a mão estendida, a palavra de confiança, o ombro amigo. Por nunca ter poupado esforços para que eu pudesse hoje estar concretizando esta etapa tão importante da minha vida.

À Marina, minha filhinha querida, pela paciência, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo carinho incondicional.

À Professora Míriam pela acolhida, pelos ensinamentos e pela contribuição para minha formação.

Aos amigos e colegas de laboratório, que de maneira mais, ou menos frequente, estiveram presentes em cada momento de angústia, de desânimo, de conquista, de descontração, de comemoração, de colaboração.

Meu agradecimento mais que especial à Clara pela amizade, paciência e ajuda incondicional; e à Gláucia pelo excelente trabalho, imprescindível para toda a equipe.

Agradeço à todos, que em algum momento fizeram parte desta história, possibilitando a consolidação deste sonho.

*"Há homens que lutam um dia e são bons; há outros que lutam um ano e são melhores; há aqueles que lutam muitos anos e são muito bons. Porém, há os que lutam toda a vida. Esses são imprescindíveis."*

*Bertolt Brecht*

## RESUMO

O envelhecimento é um processo que pode ser definido como o acúmulo progressivo de diversas alterações deletérias em células e tecidos, com o avançar da idade, que aumentam o risco de doença e morte. Tem sido passível de inúmeras especulações e as possibilidades sugeridas incluem: mudança no código de DNA, diminuição na acurácia de síntese protéica, ligação de macromoléculas, auto-ataque ao sistema imunológico e danos causados por reações oxidativas. Evidências indicam que o envelhecimento e as doenças crônicas/degenerativas são causados primariamente devido aos danos gerados por radicais livres, incluindo as espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo atacar todas as principais biomoléculas vitais ao organismo. Quando a geração de ROS ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, dá-se o nome de estresse oxidativo, que se refere, então, a um perigoso desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante. Este trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito dual (antioxidante e/ou pró-oxidante) e ação neuroprotetora do Ebselen, Ácido Caféico e Memantina em células neurais (Neuro-2A) *in vitro*. A metodologia empregada para quantificar a produção de ROS foi a quimioluminescência dependente de luminol; a viabilidade celular foi realizada pela incorporação do corante Vermelho Neutro; e o poder redutor mitocondrial pelo ensaio de MTT. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, sendo considerados significativos valores com  $p < 0,05$ . Os nossos resultados mostraram que as células tratadas com Ebselen na concentração 5  $\mu\text{M}$  apresentaram diminuição na produção de ROS induzida pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  e aumento no poder redutor mitocondrial. O Ácido Caféico, em todas as concentrações (25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ ), se mostrou eficaz como antioxidante e, com exceção da maior concentração (500  $\mu\text{M}$ ), também apresentou aumento no poder redutor. A Memantina, apesar de ter aumentado significativamente o poder redutor nas concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ , não se mostrou eficiente como antioxidante, se apresentando, entretanto, como pró-oxidante na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . No ensaio de viabilidade, nenhuma das substâncias causou prejuízo em nível lisossomal. Com base nestes resultados podemos concluir que os antioxidantes estudados possuem atividades anti- e/ou pró-oxidantes dependendo da concentração testada, ressaltando, portanto que devem ser utilizados com cautela por poderem trazer prejuízos para a saúde ao invés de melhoria.

**Palavras-chave:** envelhecimento, estresse oxidativo, ROS, Neuro-2A, antioxidantes, Ebselen, Ácido Caféico, Memantina

## ABSTRACT

Aging is defined by a progressive increase in many deleterious alterations in cells and tissues that enhance the risk of diseases and death. These may be due to changes in the DNA, diminution in protein synthesis, self-attack in the immune system and damage caused by oxidative reactions. Some evidences indicate that aging and chronic/degenerative diseases are primary caused by damage caused by the free radicals, including the reactive oxygen species (ROS). They may attack the most important body molecules. Oxidative stress occurs when ROS generation exceeds the antioxidant capacity of the cell. The aim of this work was to evaluate the possible dual effect (antioxidant and/or prooxidant) and the neuroprotector action of Ebselen, Caffeic Acid and Memantina in neural cells (Neuro-2A) *in vitro*. ROS generation was quantified by luminal-dependent chemiluminescence. Cell viability was performed by Neutral Red incorporation. The mitochondrial reductor power was made by the MTT assay. Statistical analyses was performed by non-parametric Mann-Whitney, where  $p < 0.05$  was considered significant. Our results showed that Ebselen-treated cells in the concentration 5  $\mu\text{M}$  had a decrease in ROS production induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  and an enhanced mitochondrial reductor power. Caffeic Acid, in all concentrations (25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ ) had an antioxidant effect and an enhanced reductor power except by the highest concentration (500  $\mu\text{M}$ ). Even though Memantine had an increase in the reductor power in the concentrations 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ , it was not efficient as an antioxidant. This drug presented a prooxidant effect in the concentration 50  $\mu\text{M}$ . In the viability test, none of the substances caused damage in the lysosomal level. Basing on these results, we conclude that the antioxidants studied have anti- and pro-oxidant activities depending on the concentration tested. Therefore, they should be used carefully because they may cause damage to health instead of progress.

**Palavras-chave:** aging, oxidative stress, ROS, Neuro-2A, antioxidants, Ebselen, Caffeic acid, Memantine

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$ -TH -  $\alpha$ -tocoferol

AC = Ácido Caféico

AL = ácido lipóico

Asc = ácido ascórbico

AU = ácido úrico

Ca<sup>2+</sup> = íon cálcio

CAR = carotenóides

CAT = catalase

CoQ = coenzima Q

DMSO = dimetilsulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucléico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

DO = densidade óptica

Ebs = Ebselen

EP = erro padrão

Fe<sup>2+</sup> = íon ferro

g = grama

GPx = glutationa peroxidase

GSH = glutationa reduzida

GSSG = glutationa oxidada

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio

HCl = ácido clorídrico

HClO = ácido hipocloroso

HO•<sub>2</sub> = radical hidroperoxila

LO• = radical alcoxila

LO•<sub>2</sub> = radical peroxila

•O<sub>2</sub><sup>-</sup> = radical superóxido

O<sub>3</sub> = ozônio

•OH = radical hidroxila

K<sup>+</sup> = íon potássio

KCl = cloreto de potássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = fosfato de potássio monobásico  
M = molar  
MeHg = metil mercúrio  
Mem = Memantina  
mm = milímetro  
mL = mililitro  
mg = miligrama  
mtDNA = DNA mitocondrial  
MTT = 3-(4,5 dimethylazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide)  
µg = micrograma  
µL = microlitro  
µM = micromolar  
N = normal  
N-2A = Neuro-2A  
nm = nanômetro  
Na<sup>+</sup> = íon sódio  
NaCl = cloreto de sódio  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = fosfato de sódio bibásico anidro  
NaOH = hidróxido de sódio  
NMDA = *N*-metil-D-aspartato  
NMDAr = receptor *N*-metil-D-aspartato  
NS = não significativo  
PBS = solução salina tamponada  
PRx = peroxirredoxinas  
RPM = rotações por minuto  
RPMI = meio de cultivo celular  
ROS = espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)  
RLU/min = unidade relativa de luz por minuto (do inglês *relative light units*)  
Se = selênio  
SeMet = selenometionina  
Sec = selenocisteína  
SNC = sistema nervoso central

SOD = superóxido dismutase

Trx = tiorredoxinas

v/v = volume por volume

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população brasileira. Em (A) 1983 e (B) a projeção para 2050

**Figura 2:** Demonstração esquemática da ação dos radicais livres na célula

**Figura 3:** Produção de ROS pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial

**Figura 4:** Esquema mostrando alguns dos fatores desencadeantes (estressores) de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as consequências biológicas ocasionando uma variedade de disfunções fisiológicas que podem levar à morte celular

**Figura 5:** Esquema demonstrativo de regulação fisiológica modulada pelo estado redox intracelular

**Figura 6:** Fórmula estrutural do Ebselen

**Figura 7:** Fórmula estrutural do Ácido Caféico

**Figura 8:** Fórmula estrutural da Memantina

**Figura 9:** Células Neuro-2A em cultura. À esquerda fotografia exibindo as células aderidas em monocamada. À direita imagem ampliada para mostrar detalhes da célula

**Figura 10:** Avaliação da produção de ROS induzida pelo  $H_2O_2$ . O painel (A) mostra a porcentagem de viabilidade celular pelo corante Azul de Trypan

**Figura 11:** Avaliação comparativa do (A) efeito antioxidante de diferentes concentrações de Ebselen utilizando a técnica de quimioluminescência e (B) viabilidade celular pelo Azul de Trypan

**Figura 12:** Avaliação comparativa do (A) efeito antioxidante de diferentes concentrações de Ácido Caféico utilizando a técnica de quimioluminescência e (B) viabilidade celular pelo Azul de Trypan

**Figura 13:** Avaliação comparativa do (A) efeito antioxidante de diferentes concentrações de Memantina utilizando a técnica de quimioluminescência e (B) viabilidade celular pelo Azul de Trypan

**Figura 14:** Avaliação do efeito de diferentes concentrações de Ebselen sobre a viabilidade celular em nível lisossomal pela incorporação do Vermelho Neutro

**Figura 15:** Avaliação do efeito de diferentes concentrações de Ácido Caféico sobre a viabilidade celular em nível lisossomal pela incorporação do Vermelho Neutro

**Figura 16:** Avaliação do efeito de diferentes concentrações de Memantina sobre a viabilidade celular em nível lisossomal pela incorporação do Vermelho Neutro

**Figura 17:** Avaliação comparativa do efeito de diferentes concentrações de Ebselen sobre o poder redutor mitocondrial utilizando MTT

**Figura 18:** Avaliação comparativa do efeito de diferentes concentrações do Ácido Caféico sobre o poder redutor mitocondrial utilizando MTT

**Figura 19:** Avaliação comparativa do efeito de diferentes concentrações da Memantina sobre o poder redutor mitocondrial utilizando MTT

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Espécies Reativas de Oxigênio

**Tabela 2:** Componentes do Sistema de Proteção Antioxidante

# SUMÁRIO

## 1 INTRODUÇÃO

1.1	Envelhecimento .....	16
1.2	Radicais livres .....	19
1.3	Estresse oxidativo e antioxidantes .....	23
1.4	Principais defesas antioxidantes .....	29
1.5	Estresse oxidativo mitocondrial .....	31
1.6	Ebselen .....	31
1.7	Ácido Caféico .....	34
1.8	Memantina .....	36
1.9	Cultura celular .....	39
1.10	Neuro-2A .....	40

## 2 OBJETIVOS

2.1	Objetivo geral .....	43
2.2	Objetivos específicos .....	43

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1	Equipamentos .....	44
3.2	Reagentes .....	44
3.3	Soluções .....	46
3.4	Metodologia .....	50

## 4 RESULTADOS

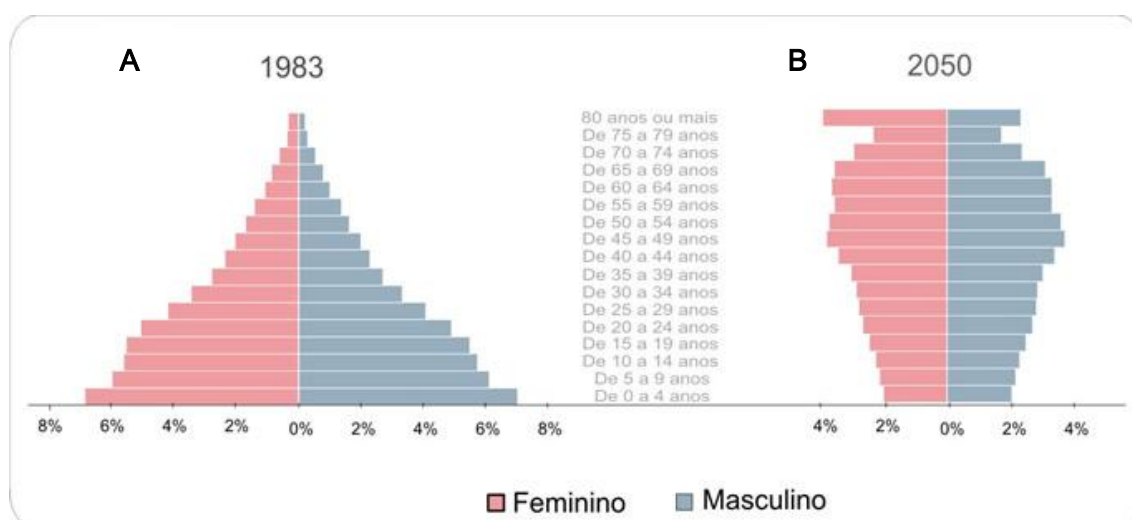
4.1	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em células da linhagem Neuro-2A .....	57
4.2	Avaliação da capacidade antioxidante através da técnica de quimioluminescência dependente de luminol e viabilidade celular pelo Azul de Trypan na linhagem Neuro-2A .....	58
4.3	Avaliação da viabilidade celular em nível lisossomal utilizando Vermelho Neutro em células Neuro-2A .....	65

4.4	Avaliação do poder redutor mitocondrial utilizando MTT em células Neuro-2A .....	68
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	
5.1	Poder antioxidante pelo ensaio de quimioluminescência .....	72
5.2	Viabilidade celular em nível lisossomal pela incorporação de Vermelho Neutro .....	82
5.3	Capacidade redutora mitocondrial pelo ensaio de MTT .....	84
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	92
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	93
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	94

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Envelhecimento

O envelhecimento populacional é um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea e ocorreu inicialmente em países desenvolvidos. Todavia, mais recentemente, é nos países em desenvolvimento que o envelhecimento da população tem ocorrido de forma mais acentuada (LIMA-COSTA & VERAS, 2003). Segundo Vendelbo & Nair (2011), dentro dos últimos cem anos, a expectativa de vida aumentou substancialmente em todo o mundo, e Lourenço (2010) mostrou um crescimento exponencial da população idosa também no Brasil. As estatísticas apontam que já há uma mudança no perfil etário da população brasileira, caracterizada por um aumento de idosos e declínio nos nascimentos (figura 1).



**Fig. 1:** Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população brasileira. Em (A) 1983 e (B) uma projeção para 2050. Fonte: IBGE 2008.

No mundo, o número de idosos ( $\geq 60$  anos de idade) passou de 3 milhões em 1960, para 7 milhões em 1975 e 14 milhões em 2002, e estima-se que alcançará 32 milhões em 2020. Em países como a Bélgica, por exemplo, foram necessários cem anos para que a população idosa dobrasse de tamanho (LIMA-COSTA & VERAS, 2003).

O processo de envelhecimento pode ser definido como o acúmulo progressivo de diversas alterações deletérias em células e tecidos, com o avançar da idade, que aumentam o risco de doença e morte (HARMAN, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VENDELBO & NAIR, 2011).

A natureza do processo de envelhecimento tem sido passível de inúmeras especulações. Possibilidades sugeridas incluem: mudança no código de DNA, diminuição na acurácia de síntese protéica, ligação de macromoléculas, auto-ataque ao sistema imunológico e danos causados por reações oxidativas. De acordo com Medvedev (1990), existem mais de 300 teorias sobre o envelhecimento e muitas delas coexistem porque não se contradizem ou porque tentam explicar formas diferentes e independentes de senescência. A maioria é mutuamente compatível. Na verdade, apesar de serem descritas como gerontológicas, são teorias de vários outros ramos da ciência aplicadas ao fenômeno do envelhecimento (McCLEARN, 1997).

Considerando este contexto, em genética molecular citamos alterações na expressão de proteínas, mutação somática e encurtamento telômero; em bioquímica, a teoria dos radicais livres e as taxas metabólicas; e na evolução,

teorias enfatizam não o envelhecimento como um fenômeno biológico em indivíduos, mas como um processo de evolução (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Para Viña *et al.* (2007), o envelhecimento pode ser postulado de quatro maneiras:

- *Universal*: um fenômeno associado à um processo de envelhecimento ocorre em diferentes graus em todas os indivíduos de uma espécie.
- *Intrínseca*: as causas que são a origem do envelhecimento são endógenas, não dependendo de fatores extrínsecos.
- *Progressivo*: as mudanças que levam ao envelhecimento ocorrem progressivamente ao longo do ciclo de vida
- *Deletério*: um fenômeno associado ao envelhecimento só será considerado como parte do processo se ele não for benéfico para o indivíduo.

Felizmente, os avanços recentes resultaram em significativa simplificação dos fundamentos teóricos da pesquisa do envelhecimento e isso, combinado com o desenvolvimento de técnicas experimentais para investigar as complexidades fenomenológicas do fenótipo senescentes, ajudou a abrir caminho para desvendar o funcionamento do processo de envelhecimento (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

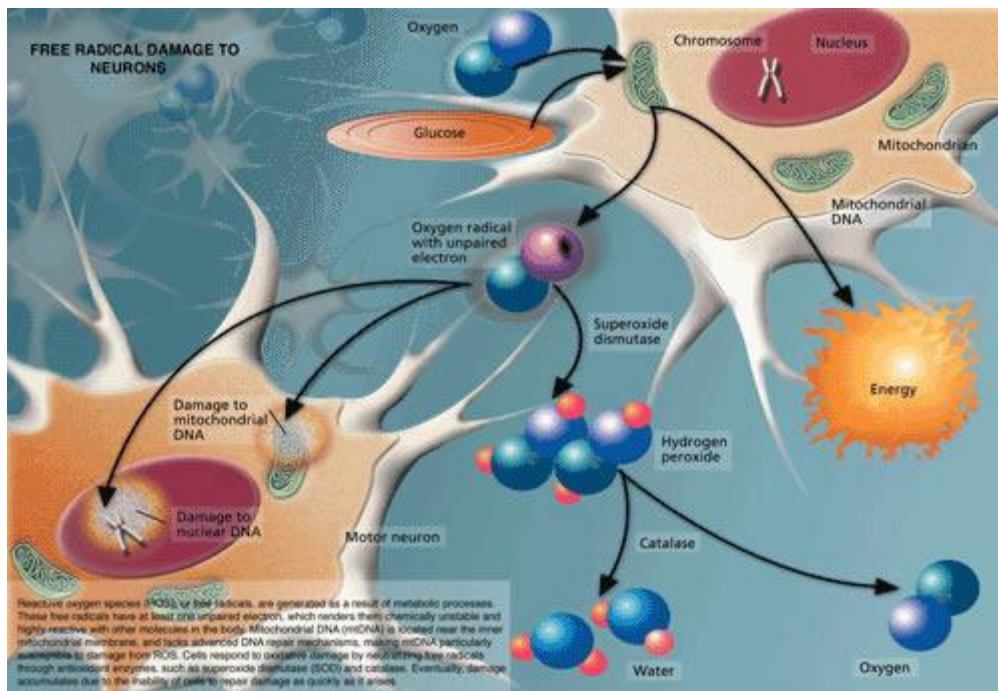
Evidências indicam que o envelhecimento e as doenças crônicas/degenerativas são causados primariamente devido ao dano gerado pelos radicais livres (HARMAN, 1981), todavia, todas as reações químicas que

se manifestam no envelhecimento estão sujeitas à influências ambientais (HARMAN, 2003; VENDELBO & NAIR, 2011).

## 1.2 Radicais livres

Organismos vivos estão constantemente expostos a agentes oxidantes provenientes tanto de fontes endógenas quanto exógenas capazes de modificar biomoléculas e induzir danos (RIZZO *et al.*, 2011). Os radicais livres são moléculas altamente reativas com um ou mais elétrons não pareados, com meia vida muito curta, altamente instável pela sua própria configuração e que se ligam rapidamente a moléculas vizinhas (HALLIWELL, 1994; GUTTERIDGE, 1987, OLIVEIRA *et al.*, 2010). O excesso desses radicais livres exerce um papel importante no desenvolvimento da lesão tecidual e envelhecimento (RIZZO *et al.*, 2011).

Dentre os radicais livres, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas contendo oxigênio que possuem ou não elétrons não pareados, mas são altamente reativas nos tecidos. Os radicais livres, incluindo ROS podem ser gerados nas mitocôndrias, membranas e no citoplasma, podendo atacar todas as principais biomoléculas vitais ao organismo (BIANCHI & ANTUNES, 1999; VENDELBO & NAIR, 2011) (Figura 2).



**Fig. 2:** Demonstração esquemática da ação dos radicais livres na célula. Fonte: <http://alzheimersweekly.com/content/oxidative-stress-alzheimers-basics>

Há apenas vinte anos os radicais livres na forma de espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido reconhecidos como importantes em inúmeros processos patológicos (KIRKHAM & RAHMAN, 2006). De acordo com os mesmos autores estas espécies reativas de oxigênio podem ser geradas endogenamente por reações metabólicas, na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou durante ativação de fagócitos ou células inflamatórias; e exogenamente através de poluentes e fumaça de cigarro (KIRKHAM & RAHMAN, 2006).

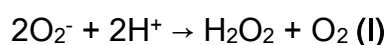
Na tabela 1, aparecem exemplos de espécies reativas de oxigênio (ROS):

**Tabela 1:** Espécies Reativas de Oxigênio

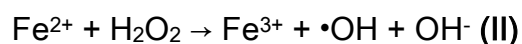
Radicais	Não Radicais
Superóxido $\bullet\text{O}_2^-$	Peróxido de Hidrogênio $\text{H}_2\text{O}_2$
Hidroxila $\bullet\text{OH}$	Ácido Hipocloroso $\text{HClO}$
Peroxila $\text{LO}\bullet_2$	Ozônio $\text{O}_3$
Alcoxila $\text{LO}\bullet$	Oxigênio “ <i>singlet</i> ”
Hidroperoxila $\text{HO}\bullet_2$	Peróxidos lipídicos

Fonte: Darley-Usmar *et al.*, 1995.

Dentre essas moléculas reativas inclui-se o átomo de hidrogênio, a maioria dos metais de transição e o próprio oxigênio. Dois estados *singlet* do oxigênio existem, sendo um deles reativo. Caso um elétron seja adquirido pelo  $\text{O}_2$ , ele se transforma em radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) o qual é formado em quase todas as células aeróbicas. Outro elétron adquirido pelo  $\bullet\text{O}_2^-$  o transforma em  $\text{O}_2^{2-}$ , que não é um radical, mas que em pH fisiológico é protonado e transforma em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o peróxido de hidrogênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984).

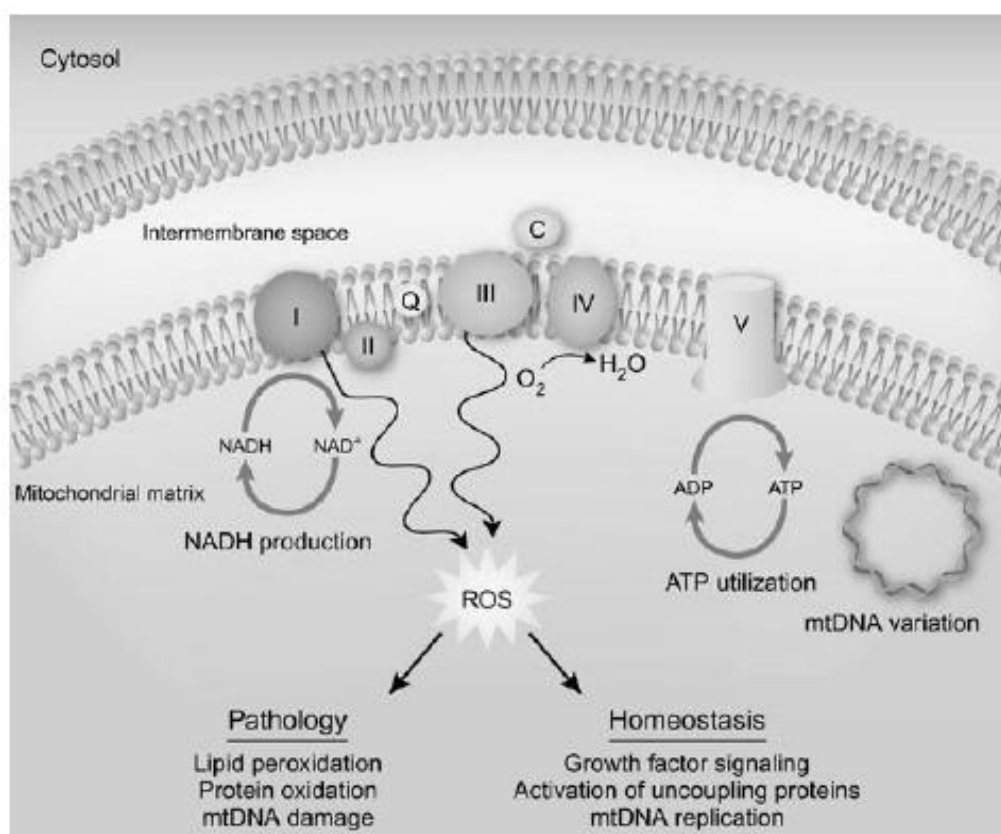


O peróxido de hidrogênio gera o radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) de duas maneiras: a) fusão de O-O e b) e mistura ao ferro (chamada reação de Fenton, descoberta por autor do mesmo nome em 1894); desencadeando várias outras reações, como por exemplo:



A mitocôndria é a maior fonte de origem de ROS tendo como função principal a geração de energia. Sabe-se que 1 a 5% do oxigênio nas mitocôndrias são convertidos a superóxido nos complexos I e III da cadeia transportadora de

elétrons (COSTA *et al.*, 2011). Quando a frequência de elétrons, que entram na cadeia transportadora mitocondrial, excede sua capacidade de controlar o fluxo dos elétrons, eles são liberados dos complexos I e III excedendo a capacidade doadora local, o que resulta em maior produção de superóxido com correspondente aumento do dano oxidativo (YAP *et al.*, 2009), como mostrado na figura 3. Evidências sugerem que um delicado equilíbrio nesse mecanismo é vital para o funcionamento da mitocôndria e que isso pode influenciar na produção de energia, produção de ROS, apoptose e senescência (WANG, *et al.*, 2009).



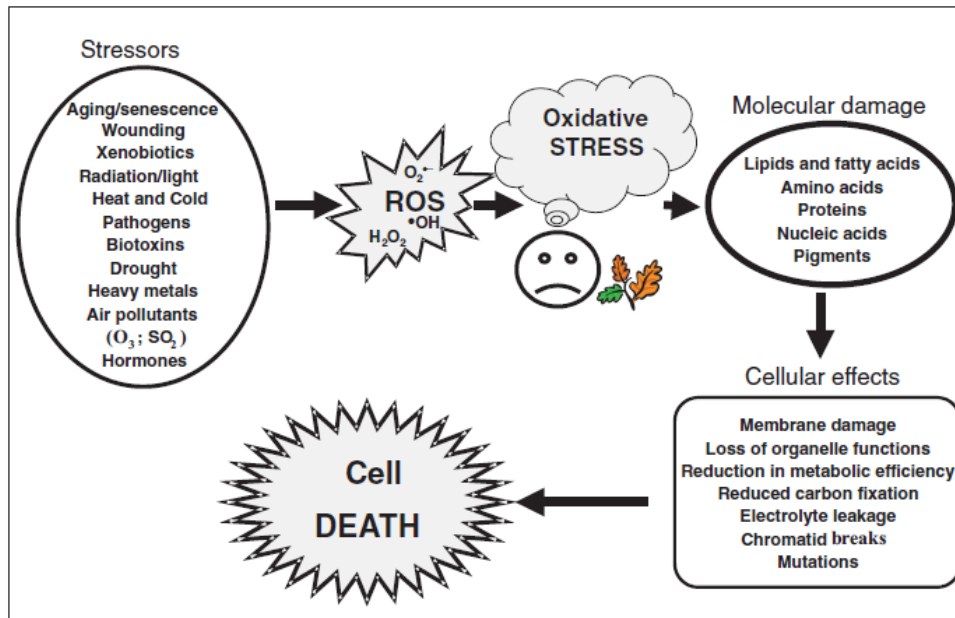
**Fig. 3:** Produção de ROS pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Fonte: MAGALHÃES & CHURCH, 2005.

A teoria dos radicais livres, e a constatação da presença destes em reações metabólicas endógenas foi proposta em 1956, onde se postula que o envelhecimento é desencadeado pelas reações dos radicais livres, que, uma vez iniciadas, podem ser responsáveis pela deteriorização progressiva dos sistemas biológicos a longo prazo. Como já foi descrito, esses radicais promovem dano mitocondrial, e uma vez não regenerada essa organela, o processo de envelhecimento se inicia. A injúria mitocondrial causada por radicais livres, aliada a uma perda da competência biomolecular, pode, então, levar ao envelhecimento, morte celular, e conseqüentemente morte do organismo (HARMAN, 1956). A estreita relação entre a produção de ROS mitocondrial e DNA mitocondrial (mtDNA) tem dado inspiração para a teoria do radical livre mitocondrial do envelhecimento (VENDELBO & NAIR, 2011).

### **1.3 Estresse oxidativo e antioxidantes**

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como descrito anteriormente, pode ter causa exógena ou endógena, sendo comum para vários tipos de células com perfil redutor deficitário. Quando a geração de ROS ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, dá-se o nome de estresse oxidativo. Os prejuízos causados por esse acúmulo são inúmeros, não se limitando às mitocôndrias (figura 4). Pode-se citar dano às estruturas celulares incluindo lipídeos de membrana, danos aos ácidos nucléicos e às proteínas

(COSTA *et al.*, 2011; COYLE & PUTTFARCKEN, 1993; RIZZO *et al.*, 2011; SATOH *et al.*, 2004; VALKO, *et al.*, 2006).



**Fig. 4:** Esquema mostrando alguns dos fatores desencadeantes (estressores) de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as consequências biológicas ocasionando uma variedade de disfunções fisiológicas que podem levar à morte celular. Fonte: SCANDALIOS, 2005.

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição, redução e reparação das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Uma estratégia preventiva antioxidante pode ser arquitetada

em canalizar as espécies para produtos menos reativos, diminuindo o risco de danos maiores (SIES, 1993).

Por outro lado, há autores que mencionam que uma proteção demasiada por parte destes antioxidantes pode ser conflituosa do ponto de vista evolutivo, já que esta defesa excessiva poderia prevenir alterações oxidativas do DNA as quais poderiam levar a mutações gênicas e eventualmente à outras estruturas celulares (HARMAN, 1981).

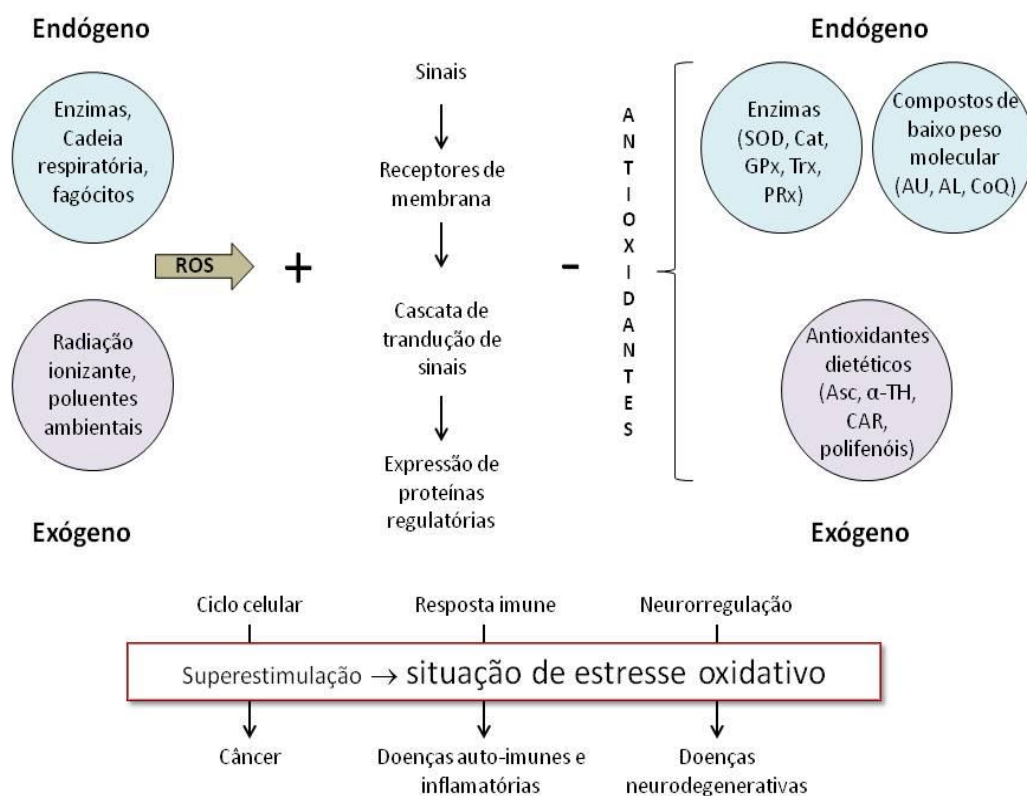
Os antioxidantes podem ser de origem endógena, quando produzidos no próprio organismo e dividem-se em enzimáticos (glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase) e não enzimáticos (glutathione, peptídeos de histidina, ubiquinona, bilirrubina e outros), ou podem ser de origem exógena como no caso das vitaminas C e E,  $\beta$ -carotenos, flavonóides, curcumina, polifenóis, tanino, entre outros, e são obtidos por meio da alimentação (BIANCHI & ANTUNES, 1999). A tabela 2 representa os componentes do sistema de proteção antioxidante.

**Tabela 2:** Componentes do Sistema de Proteção Antioxidante

Antioxidantes não enzimáticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glutationa</li> <li>• Ubiquinona (Coenzima Q)</li> <li>• Ácido úrico</li> <li>• Bilirrubina</li> <li>• NADPH e NADH</li> <li>• Flavonóides</li> <li>• Vitamina C</li> <li>• Vitamina E</li> <li>• <math>\beta</math>-caroteno</li> <li>• Licopeno</li> </ul>
Proteínas ligadoras de metais	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ceruloplasmina (cobre)</li> <li>• Metalotioneína (cobre)</li> <li>• Albumina (cobre)</li> <li>• Transferrina (ferro)</li> <li>• Ferritina (ferro)</li> <li>• Mioglobina (ferro)</li> </ul>
Antioxidantes enzimáticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Superóxido Dismutase (SOD)</li> <li>• Catalase (Cat)</li> <li>• Glutationa Peroxidase (GPx)</li> </ul>

Fonte: VANNUCCHI, *et al.*, 1998

O estresse oxidativo então como descreveu Halliwell (2007) e Novelli (2005), se refere a um perigoso desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante. É um distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante levando a um agravo potencial (CHAVES, *et al.*, 2008; NOGUEIRA-MACHADO, *et al.*, 2006; OLIVEIRA, *et al.*, 2010). É o dano biomolecular causado por espécies reativas nos constituintes do organismo vivo (JEONG, *et al.*, 2011). A figura 5 representa esquematicamente a regulação fisiológica modulada pelo estado redox intracelular.



**Fig. 5:** Esquema demonstrativo de regulação fisiológica modulada pelo estado redox intracelular. As espécies reativas geralmente se relacionam à estimulação da expressão de proteínas – envolvidas no controle de importantes processos fisiológicos (ciclo celular, resposta imune e neurorregulação). As espécies antioxidantes modulariam negativamente tais funções. O desequilíbrio entre as modulações positiva e negativa levaria ao surgimento de doenças . SOD - superóxido dismutase, CAT – catalase, GPx - glutathione peroxidase, PRx – peroxirredoxinas, Trx - tioredoxinas, AU - ácido úrico, AL - ácido lipóico, CoQ - Coenzima Q, Asc - ácido ascórbico, α-TH - α-tocoferol, CAR - carotenóides. Fonte: Adaptado de CERQUEIRA, *et al.*, 2007.

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito deletério dos radicais livres no organismo (VISIOLI, 2000; PIETTA, 2000). A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que muitas

vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (HALLIWELL *et al.*, 1995).

A utilização do antioxidante de forma excessiva ou com uma forma química inadequada pode transformá-lo numa molécula capaz de reagir com ROS, formando espécies com capacidade de exercer modificações toxicológicas a uma célula ou organismo, maiores que as induzidas pela espécie oxidada por si só (GAETKE & CHOW, 2003; MONTERA, 2007).

Patologias do sistema nervoso central (SNC) como doenças de Alzheimer e Parkinson, injúrias como isquemia seguida de reperfusão, exposição a metais pesados ou o próprio processo de envelhecimento podem levar a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) causando estresse oxidativo e consequentemente danos celulares irreversíveis (McKUBREY *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), elevado consumo de oxigênio (20% do oxigênio consumido pelo organismo) e presença de baixos níveis de defesas antioxidantes quando comparado a outros tecidos (FINKEL & HOLBROOK, 2000; FLOYD & HENSLEY, 2002; JEONG *et al.*, 2011).

## 1.4 Principais defesas antioxidantes

Para proteger o organismo do ataque de ROS, existe uma série de sistemas de defesas antioxidantes. Segundo Halliwell e Gutteridge (2000), estratégias incluem três níveis de proteção: (i) prevenção (evitar formação de ROS); (ii) interceptação das espécies reativas (neutralização de ROS geradas); e (iii) reparação dos danos (ocasionados por ROS). A interceptação das espécies reativas ocorreria através de substâncias enzimáticas ou não enzimáticas, como vitaminas, que desintoxicam ROS ou apresentam a capacidade de sequestrar radicais livres. O reparo aconteceria através de enzimas de reparo, as quais atuam em danos que ROS pode provocar ao DNA ou a proteínas, tentando repará-las. Os antioxidantes não-enzimáticos são moléculas que podem interceptar ROS, atuando num processo de desativação do poder lesivo que estas provocam nas biomoléculas. Há três mecanismos básicos da atividade antioxidante não-enzimática: (a) sequestradora; (b) estabilizadora e (c) quelante de metais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

### 1.4.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD foi a primeira enzima antioxidante a ser descoberta (revisado por Halliwell e Gutteridge, 2000) em células eucarióticas aeróbias. São metaloenzimas abundantes que agem sobre o radical  $\bullet\text{O}_2^-$ , dismutando-o a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que é menos reativo e pode ser degradado por outras duas enzimas, como catalase e glutathione peroxidase.

### 1.4.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma ferro-hemoenzima, que tem localização subcelular predominante no peroxissomo, onde existem muitas moléculas geradoras de  $H_2O_2$ . Sua função é dismutar especificamente o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (FRIDOVICH, 1998; NORDBERG & ARNÉR, 2001) e ajuda a regular a geração de  $H_2O_2$  pela ação de oxidases presentes nestas organelas (PICADA *et al.*, 2003). São enzimas que possuem uma afinidade relativamente baixa para  $H_2O_2$ , porém tem uma velocidade de reação muito alta. Por isso são defesas potentes para neutralizar especialmente concentrações altas de peróxido, possivelmente como as que são formadas por fagócitos ativos (FRIDOVICH, 1998).

### 1.4.3 Glutathione peroxidase (GPx)

Na mitocôndria de mamíferos, a GPx é a principal defesa contra o  $H_2O_2$  já que de maneira geral, estas organelas não possuem CAT, e peróxidos orgânicos. Ela é uma selenoenzima, cuja ação é baseada na oxidação da glutathione reduzida (GSH) ao dissulfeto correspondente glutathione oxidada (GSSG). (PICADA, *et al.*, 2003). Para sua atividade, a GPx necessita da presença de GSH.

### 1.5 Estresse oxidativo mitocondrial

Como já visto, a produção de ROS nas mitocôndrias é um evento fisiológico e contínuo, entretanto, o íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) parece ser o principal agente estimulador da geração de espécies reativas de oxigênio por essa organela por um processo eletroforético: o íon, positivo, é atraído pelo potencial interno negativo (devido à saída de prótons) (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001). Quando atinge alta concentração, o  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial liga-se, na face da membrana interna voltada para a matriz, ao fosfolípido cardiolipina (responsável pela fixação de várias proteínas da cadeia respiratória nessa membrana). Essa ligação causa alterações da cadeia respiratória que facilitam a produção de  $\text{O}_2^-$ , e, portanto de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ao mesmo tempo, o  $\text{Ca}^{2+}$  disponibiliza outro íon ( $\text{Fe}^{2+}$ ) na matriz (ao tomar o lugar dele em certos compostos), e o  $\text{Fe}^{2+}$  estimula a produção do radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), capaz de destruir proteínas, lipídeos e DNA mitocondriais. Os radicais de oxigênio peroxidam ácidos graxos poliinsaturados e componentes da membrana mitocondrial (GRIJALBA *et al.*, 1999).

### 1.6 Ebselen

O elemento não metálico selênio (Se) foi descoberto em 1817 e consiste em um micronutriente de fundamental importância para a saúde dos seres humanos, cuja principal fonte é a dieta, podendo ser encontrado sob diferentes estados de oxidação (PAPP *et al.*, 2007). Embora a história da toxicidade do

selênio seja extensa, o papel essencial deste elemento para a saúde animal e o seu uso na medicina, fizeram com que o estudo dos compostos orgânicos contendo selênio evoluísse (MUGEST *et al.*, 2001).

O selênio funciona como um centro redox, na redução de  $H_2O_2$  e peroxidação de lipídios e fosfolipídios para produtos inofensivos, por ação seleno-dependente de GPx. Essa função ajuda a manter a integridade da membrana, reduzindo a propagação de posterior dano oxidativo para biomoléculas (RAYMAN, 2000).

O selênio 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). O 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 (NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008). Grãos são boas fontes de selênio, dependendo da concentração de selênio no solo e água onde crescem. Outras fontes são frutos do mar, carne bovina e carnes de aves (TERRY, 2000).

Nas últimas décadas, o interesse pela síntese de compostos orgânicos de selênio aumentou consideravelmente devido ao fato de muitos destes compostos apresentarem propriedades antioxidantes (MUGEST *et al.*, 2001). O conceito de que moléculas contendo Se podem exercer função antioxidante melhor que antioxidantes clássicos, proporcionou o desenvolvimento de

compostos orgânicos de Se sintéticos. Há alguns anos, têm-se encontrado muitos trabalhos na literatura especializada acerca de compostos miméticos da enzima glutathiona peroxidase (GPx) (SATHEESHKUMAR & MUGESH, 2011), que assim como a enzima nativa devem a sua característica redox ao Se, que é capaz de prevenir efeitos neurotóxicos e bloquear a peroxidação lipídica em culturas de neurônios de ratos causada por exposição aguda a agonistas do glutamato (CENTURIÃO *et al.*, 2005; KOIZUMI *et al.* 2011).

A proteína glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de diferentes hidroperóxidos e juntamente com a glutathiona reduzida (GSH) constitui um poderoso sistema de defesa celular contra o estresse oxidativo. 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. Nas células, a GPx efetua a remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reduzindo-o a água pela oxidação de glutathiona reduzida (GSH) (ARTHUR, 2000; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

De particular interesse, o composto Ebselen (*2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3[2H]-one*) (figura 6) se apresenta um candidato promissor à proteção neural e apresenta também efeito citoprotetor (MULLER *et al.*, 1984; SATHEESHKUMAR & MUGESH, 2011). Em estudos com modelos humano e animal, Ebselen mostrou proteção neuronal contra a isquemia cerebral. Outros estudos esclareceram que Ebselen possui efeito citoprotetor em modelos *in vitro* (SATO, 2004; YOSHIZUMI, 2002).

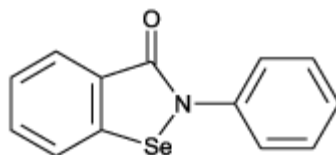


Fig. 6: Fórmula estrutural do Ebselen

Os efeitos neuroprotetores do Ebselen foram demonstrados tanto *in vivo* quanto *in vitro* em modelos de isquemia (DAWSON *et al.*, 1995; IMAI *et al.*, 2003), toxicidade glutamatérgica (XU *et al.*, 2006) e neurotoxicidade por exposição ao metil mercúrio (FARINA *et al.*, 2004).

### 1.7 Ácido Caféico

Os compostos fenólicos, ou simplesmente polifenóis, são geralmente descritos na literatura como aqueles pertencentes a um vasto grupo de compostos encontrados na natureza, os quais possuem como característica principal a presença de múltiplos grupos funcionais do tipo fenol (TUCKMANTEL, 1999). Têm sido alvo de estudos por seu papel na prevenção de várias doenças, sendo largamente encontrados nos alimentos de origem vegetal e compostos em sua maior parte pelos ácidos hidroxicinâmicos (KUMARAN & PRINCE, 2010). Segundo Halliwell (2007), a presença de polifenóis na dieta é de extrema importância, uma vez que podem diminuir a absorção excessiva de metais (como ferro e cobre) e proteger contra os danos oxidativos a eles associados.

O ácido caféico (AC) que possui fórmula molecular  $C_9H_8O_4$  (figura 7) é o maior representante destes, estando presente em vários alimentos. (GARAMBONE & ROSA, 2007; KUMARAN & PRINCE, 2010).

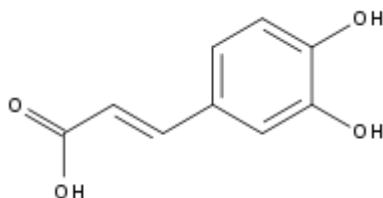


Fig. 7 - Fórmula estrutural do Ácido Caféico

Apesar do nome que o remete ao café, e este grão ser sua principal fonte, o Ácido Caféico (*3,4-dihydroxy cinnamic acid*) pode também ser encontrado em frutas e vegetais como maçã, ameixa, uvas e tomates, sendo possível isolá-lo das folhas de *Alsophila spinulosa*, uma pteridófita originária da China, com propriedades já descritas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, inflamatórias, câncer, diabetes envelhecimento, dentre outras (MAISTRO *et al.*, 2011). No entanto, independentemente da ingestão, as propriedades biológicas dos polifenóis somente serão aproveitadas se a biodisponibilidade dos mesmos for favorável. A estrutura química dos polifenóis e a composição da microflora intestinal determinam a taxa e a extensão da absorção e a natureza dos metabólitos circulantes no plasma (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

Nakayama (1994) já citava os efeitos fisiológicos do AC incluindo relatos sobre a sua capacidade de atuar como agente protetor contra citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio.

Os compostos polifenólicos são reconhecidos por possuir atividade antioxidante devido a sua habilidade em “sequestrar” radicais livres, interrompendo, por exemplo, a reação radicalar em cadeia da peroxidação lipídica (RICE-EVANS, 1996).

Entretanto, segundo Skibola (2000), os potenciais efeitos tóxicos decorrentes da excessiva ingestão de flavonóides são comumente ignorados. Em doses altas, podem agir como mutagênicos, geradores de radicais livres e inibidores de enzimas chave do metabolismo de hormônios.

## 1.8 Memantina

O receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDAr) é um receptor ionotrópico ativado pelo glutamato e seu agonista exógeno NMDA. A ativação dos receptores de glutamato resulta na abertura de um canal iônico não-seletivo para cátions. Isso permite o fluxo de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e de pequenas quantidade de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para dentro e de potássio ( $\text{K}^+$ ) para fora da célula (PATEL, 2011).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório cerebral, particularmente em regiões associadas às funções cognitivas e à memória, tais como o córtex temporal e o hipocampo. O glutamato também age como uma excitotoxina, causando a morte neuronal quando níveis elevados desse

neurotransmissor são liberados por períodos prolongados (FORLENZA, 2005; ROGAWSKI & WENK, 2003).

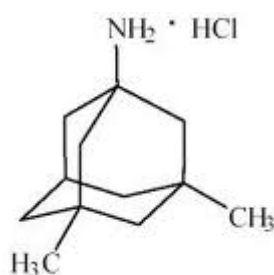
Para Rammsayer (2006), este evento é desencadeado pela atividade excessiva de receptores NMDA e pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos neurônios. Além disso, a neurotransmissão glutamatérgica anormal tem sido apontada como um mecanismo patológico em várias desordens neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, que por aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , pode iniciar uma cascata de sinalização intracelular, resultando no estresse oxidativo (FLORES *et al.*, 2011)

A ativação de receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDAr) eleva concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) citosólico que, em parte, se deve à transferência desses íons para a matriz mitocondrial carregada negativamente. Níveis elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial pode, por sua vez, influenciar a função dessa organela. Alterações no estado de fosforilação oxidativa, na cadeia transportadora de elétrons e na função mitocondrial, e ainda produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) são potenciais consequências (McALLISTER *et al.*, 2008).

É sabido que o estresse oxidativo tem papel importante no processo das doenças neurodegenerativas. Logo, os antagonistas de receptor NMDA podem minimizar ou bloquear a morte dos neurônios induzida pela ativação desses receptores e conseqüentemente da produção de espécies reativas de oxigênio

(ROS), sendo então, uma medida terapêutica considerada como neuroprotetora (DIAS *et al.*, 2007).

Dentro desse contexto, a Memantina (*1-amino-3,5 dimethyladamantane*) (figura 8), uma droga antagonista não competitiva de moderada afinidade aos receptores glutamatérgicos NMDA, obstrui parcialmente a neurotransmissão glutamatérgica no SNC, permitindo sua ativação fisiológica durante os processos de formação da memória, entretanto, bloqueando a abertura dos canais e sua ativação patológica (FORLENZA, 2005; MOTAWAJ *et al.*, 2011).



**Fig. 8:** Fórmula estrutural da memantina

Segundo relatos da literatura, a memantina possui propriedades neuroprotetoras, o que não reverte o quadro de doenças neurodegenerativas, mas seu efeito moderado se resume em proteger o cérebro dos níveis tóxicos do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (BLANCHARD *et al.*, 2008), permitindo uma sinalização normal entre os neurônios. Essa propriedade deve-se aos efeitos rápidos, voltagem-dependentes, das interações da memantina com os receptores NMDA. A memantina bloqueia estes receptores no estado de repouso e é deslocada de seu sítio de ligação em condições de ativação fisiológica; em contrapartida, não

se desprende do receptor na vigência de ativação patológica. Essas propriedades conferem à memantina uma ação neuroprotetora contra a ativação excitotóxica de receptores de glutamato (FORLENZA, 2005).

McAllister *et al.* (2008) afirmam que, por haver relações funcionais e estruturais entre os receptores NMDA e a mitocôndria, a memantina afeta também a função mitocondrial, mas diferente do previsto, os efeitos na mitocôndria são mediados em maior parte ou totalmente, independentemente da modulação dos receptores NMDA.

## 1.9 Cultura celular

Neste contexto, o estudo do equilíbrio oxidante/redutor vem sendo estudado com grande sucesso através de culturas de células *in vitro* (CHAVES, *et al.*, 2008; NOGUEIRA-MACHADO, *et al.*, 2006; OLIVEIRA, *et al.*, 2010).

A cultura de células foi inicialmente utilizada no início do século XX como um método para estudar o comportamento de células animais livres ou variações sistêmicas que podem surgir no animal durante a homeostase normal e sob estresse de um experimento. As vantagens da cultura de células residem no controle fisiológico do pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, além das condições fisiológicas que podem ser mantidas relativamente constantes (FRESHNEY, 1994). Mais adiante disso, a cada replicação celular as amostras serão idênticas e as características da linhagem irão se perpetuar por manter a homogeneidade dessas amostras. A cultura de células é menos dispendiosa que

testes *in vivo*, além de reduzir o uso de animais, evitando questões éticas e morais desses ensaios (FRESHNEY, 1994; ROGERO *et al.*, 2003).

Os métodos *in vitro* apresentam também outras vantagens comparadas aos testes *in vivo*, tais como, poder limitar o número de variáveis experimentais, são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente mais acessíveis (ROGERO *et al.*, 2003). Outra grande vantagem é a disponibilidade atual de uma variedade de linhagens em bancos de células, o que possibilita maior acesso e utilização de modelos *in vitro*.

Para avaliação de parâmetros de segurança de determinada substância, testes pré-clínicos (*in vitro* e em animais) e clínicos (seres humanos) devem ser realizados. A exigência da realização de testes pré-clínicos deve-se ao fato de que um produto potencialmente terapêutico deve ser intensamente avaliado, antes de ser submetido às pesquisas clínicas, conforme a Declaração de Helsinque (SPINDLER *et al.*, 2000).

### 1.10 Neuro-2A

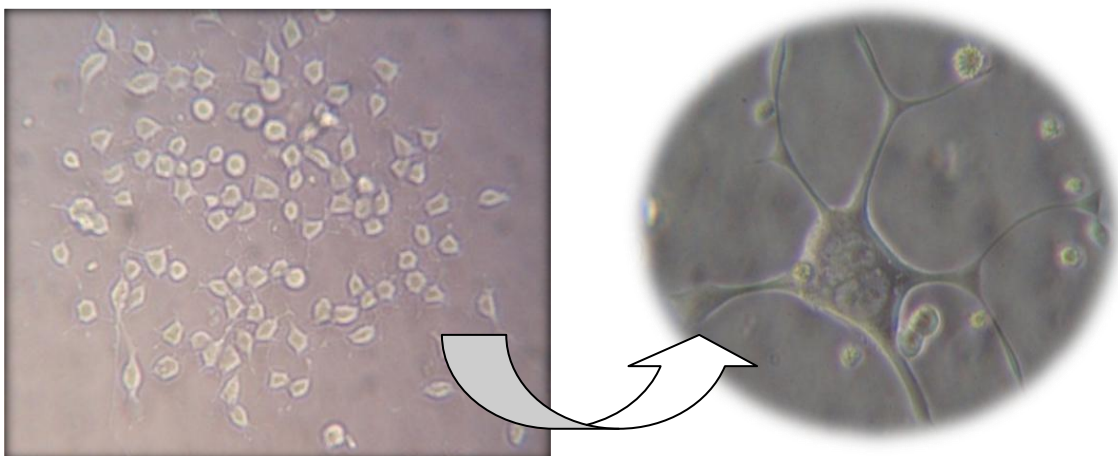
Clone de células Neuro-2A (N-2A) (ATCC CCL131) foi estabelecido por Klebe & Ruddle (1969) a partir de um neuroblastoma espontâneo em camundongo albino, originado de células da medula espinhal e é uma linhagem amplamente usada em modelos neuronais *in vitro* (CALDERÓN *et al.*, 1999) que exhibe fenótipo neuronal tanto morfológica quanto neuroquimicamente (BASTA-KAIM *et al.*, 2006). As células Neuro-2A produzem grande quantidade

de proteína microtubular, que acredita-se exercer função contrátil, sendo responsável pelo fluxo axoplasmático em células nervosas (OLMSTED *et al.*, 1970). Estes autores ao utilizarem vimblastina, substância que inibe a formação do fuso mitótico e interrompe a divisão celular em mitose, encontraram grande quantidade de microtúbulos nessas células. Os neurofilamentos são abundantes nos neurônios. São sintetizados no corpo celular e transportados pelo transporte axonal lento. Há evidências de seu acúmulo em diversas doenças neurodegenerativas (MILLER *et al.*, 2002).

Estudos realizados com células Neuro-2A (ZHOU *et al.*, 2010) sugerem que a proteína cinase dependente de ciclina-5 (Cdk5) exerce função importante na modificação da estrutura neuronal. O aumento de sua atividade pode elevar os níveis de fosforilação de neurofilamentos e da proteína tau, que estabiliza os microtúbulos e, portanto, desestabiliza o transporte axonal. Situações como essas são encontradas em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e demência fronto-temporal.

As células Neuro-2A tem sido objeto de estudo também para avaliação de antioxidantes, como o magiferin, substância extraída da manga (*Mangifera indica*), que protegeu essas células contra a toxicidade do MPTP (*1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina*), substância esta que induz síndrome parkinsoniana em humanos e em outros animais (AMAZZAL *et al.*, 2007). Em modelo experimental de células Neuro-2A infectadas com o vírus da encefalite japonesa (JEV), a minociclina, antibiótico do grupo das tetraciclinas, reduziu os

danos neuronais em parte pela inibição do estresse oxidativo (MISHRA *et al.*, 2009). É uma linhagem empregada também para estudos de atividade mitocondrial e estresse oxidativo. Rozas & Freitas (2008) descobriram que sob condições oxidativas basais, substâncias da alga vermelha *Galaxaura marginata* é capaz de modificar as concentrações intracelulares de glutamato, glutamina e alanina, sem alterar o equilíbrio oxidativo destas células. Essas substâncias também produziram uma atividade bifásica no metabolismo mitocondrial, inibindo em baixas concentrações e estimulando em altas concentrações o mecanismo celular de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol brometo (MTT), que indica atividade mitocondrial. Além das doenças neurodegenerativas, as células Neuro-2A têm sido utilizadas em pesquisas sobre envelhecimento no seu amplo sentido (SHIH *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2011; HIRONISHI *et al.*, 1996).



**Fig. 9:** Células Neuro-2A em cultura. À esquerda fotografia exibindo as células aderidas em monocamada. À direita imagem ampliada para mostrar detalhes da célula.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o possível efeito dual (antioxidante e/ou pró-oxidante) e ação neuroprotetora do Ebselen, Ácido Caféico e Memantina em célula Neuro-2A *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do Ebselen, Ácido Caféico e Memantina através da técnica de quimioluminescência dependente de luminol em células da linhagem Neuro-2A.
- Avaliar a viabilidade celular a nível lisossomal do Ebselen, Ácido Caféico e Memantina em células neurais da linhagem Neuro-2A através da técnica de Vermelho Neutro.
- Avaliar a capacidade redutora mitocondrial do Ebselen, Ácido Caféico e Memantina em células neurais da linhagem Neuro-2A através da técnica de MTT.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Equipamentos

- Autoclave vertical - PHOENIX
- Banho maria a 37° C - HEMOQUÍMICA
- Capela de fluxo laminar – Bio Seg 09 - VECO
- Centrífuga – LS – 3 Plus – CELM
- Estufa - Shel LAB
- Leitor de Micro Placas – THERMO PLATE
- Luminômetro – LUMAT LB 9501 - BERTOLD
- Microscópio biológico binocular - QUIMIS
- Microscópio invertido - MOTIC AE21

#### 3.2 Reagentes

- Ácido acético glacial – SYNTH
- Ácido Caféico - CALBIOCHEM
- Ácido clorídrico – SYNTH
- Ácido etileno diamino tetracético (EDTA) – SIGMA
- Álcool etílico absoluto – SYNTH
- Azul de Trypan – SIGMA
- Bicarbonato de sódio – VETEC
- Cloreto de cálcio – SYNTH

- Cloreto de potássio – SYNTH
- Cloreto de sódio – SYNTH
- Cloridrato de Memantina - APSEN
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – SIGMA
- Ebselen - CALBIOCHEM
- Formaldeído – ECIBRA
- Fosfato de sódio bifásico anidro – SYNTH
- Fosfato de potássio monobásico anidro – SYNTH
- Hidróxido de sódio – VETEC
- Luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione*) – SIGMA
- MTT – 3-(*4,5 dimethylazol-2yl*)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) – SIGMA
- RPMI – 1640 – SIGMA
- Soro fetal bovino – GIBCO
- Tripsina - SAFC
- Vermelho neutro – (*2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina*) - VETEC.

### 3.3 Soluções

#### 3.3.1 Solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBS)

Para o preparo de PBS, foram misturados os seguintes sais:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,15 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,20 g),  $\text{NaCl}$  (8,0 g),  $\text{KCl}$  (0,20 g), sendo o volume final completado para 1 litro com água MILLI-Q. O pH da solução (7,3) foi acertado utilizando-se  $\text{HCl}$  1N ou  $\text{NaOH}$  1N. A solução final foi autoclavada a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

#### 3.3.2. Solução de Tripsina 0,20% e EDTA 0,02%

A Tripsina 1:250 (2,0 g) foi dissolvida em aproximadamente 800 mL de PBS sob agitação constante e após 2 horas de agitação o EDTA foi adicionado (0,20 g) e volume completado para 1 litro com solução de PBS. O pH da solução foi acertado para 7,4 - 7,5 utilizando-se  $\text{HCl}$  1N ou  $\text{NaOH}$  1N e a solução filtrada em membrana de porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$  (MILLIPORE) e conservada sob congelamento.

#### 3.3.3 Solução estoque de Vermelho Neutro

Foram adicionados 0,4 g de Vermelho Neutro em 100 mL de água destilada. Após o preparo da solução a mesma foi armazenada em frasco âmbar e recoberta por papel alumínio.

### **3.3.4 Solução de trabalho de Vermelho Neutro**

*(40 mg/mL)* 1 mL da solução estoque de vermelho neutro foi adicionado a 79 mL de RPMI. Em seguida, a solução foi incubada a 37° C em banho-maria por 30 minutos para que ocorresse a solubilização dos cristais de vermelho neutro. Logo após a solução foi centrifugada por 15 minutos a 1500 RPM.

### **3.3.5 Solução de cloreto de cálcio**

*(1%)* 1 g de cloreto de cálcio foi dissolvido em 100 ml de água destilada

### **3.3.6 Solução de formaldeído**

*(0,5% v/v em Cloreto de Cálcio 1%)* Da solução de cloreto de cálcio 1% descrita no item 3.3.5 (100 mL) preparada previamente, foi retirado 0,5 mL, acrescentado 0,5 mL de formaldeído e homogeneizado.

### **3.3.7 Solução de álcool ácido**

*(1% v/v de ácido acético em 50% de álcool etílico absoluto)* 50 mL de água destilada e 50 mL de álcool etílico absoluto foram misturados. Desta solução retirou-se 1 mL acrescentando 1mL de ácido acético. O preparo foi homogeneizado.

### 3.3.8 Solução de Azul de Trypan

(0,3% em PBS) 0,3 g do corante Azul de Trypan foram diluídos em 100 mL de solução de PBS.

### 3.3.9 Meio de cultura RPMI

Um frasco de RPMI foi diluído em 900 mL de água destilada. Em seguida foram adicionados 2,0 g de bicarbonato de sódio e 1 ampola de 1,5 mL de antibiótico (garamicina 40 mg/mL). O pH foi ajustado para a faixa de 7,3 – 7,4, utilizando-se NaOH 0,5N. O volume final da solução foi ajustado para 1000 mL. Em seguida a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 microns, e colocada em recipiente estéril.

### 3.3.10 Solução de luminol

Luminol: 1,77 mg, Dimetilsulfóxido: 1,00 mL. Esta solução ( $10^{-2}$  M) foi estocada sem contato com a luz. Para uso, diluía-se 100 vezes (1:100) a solução estoque em solução salina de PBS.

### 3.3.11 MTT

A solução de MTT foi preparada com 5 mg de MTT para 1 mL de PBS a pH 7,3 e estocada em recipiente fechado, vedado de luz e ar sob refrigeração até 8° C.

### 3.3.12 Ebselen

Para a solução estoque, o conteúdo do frasco (5 mg) foi diluído em 10 mL de DMSO. Esta solução (0,0018 M) foi estocada refrigerada. Para uso, diluía-se em PBS (ensaio de quimioluminescência) ou RPMI (ensaio de Vermelho Neutro e MTT) para as concentrações de uso: 0,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{M}$  (BORGES, *et al.*, 2005; SATOH, *et al.*, 2004).

### 3.3.13 Ácido Caféico

Para solução estoque, o conteúdo do frasco (500 mg) foi diluído em 10 mL de DMSO. Esta solução (0,2774 M) foi estocada refrigerada. Para uso, diluía-se em PBS (ensaio de quimioluminescência) ou RPMI (ensaio de vermelho neutro e MTT) para as concentrações de uso: 25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$  (LEE & ZHU, 2006; MAISTRO, *et al.*, 2011).

### 3.3.14 Memantina

O comprimido comercial de cloridrato de memantina - 10 mg (APSEN) foi macerado em gral de porcelana, diluído em 2 mL de etanol e mantido sob refrigeração (solução estoque – 0,0231 M). Para uso, diluía-se em PBS (ensaio de quimioluminescência) ou RPMI (ensaios de vermelho neutro e MTT) para as concentrações de uso: 0,5; 1,0; 10 e 50  $\mu\text{M}$  (BLANCHARD *et al.*, 2008; McALLISTER, *et al.*, 2008).

## 3.4 Metodologia

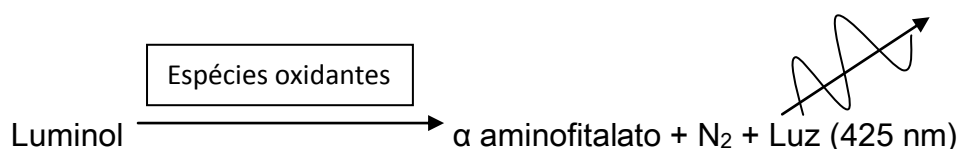
### 3.4.1 Cultivo celular

A linhagem celular Neuro-2A (ATCC CCL131) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro. Para o cultivo, as mesmas foram colocadas em frascos estéreis de crescimento de 75 cm<sup>2</sup> contendo o meio de cultura RPMI. Ao meio de cultura previamente preparado foram adicionados 10% (v/v) de soro fetal bovino. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C umidificada com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O meio foi substituído a cada dois ou três dias, de acordo com a confluência da monocamada celular (observada em microscópio invertido) e os subcultivos (passagens) realizados. Quando as garrafas atingiram 80% de confluência o meio foi aspirado e a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBS). Posteriormente, para o descolamento das monocamadas, utilizou-se 5 mL da solução de Tripsina (solução de tripsina 0,20% e EDTA 0,02%). Após o descolamento, as células foram retiradas do frasco, colocadas em tubo Falcon completando com 5 mL de RPMI, e centrifugadas à 1500 RPM por 10 minutos. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de RPMI. Em seguida, foi realizada a contagem das células com Azul de Trypan 0,3% na câmara de Neubauer (OPITIK LABOR), conforme descrito abaixo.

### 3.4.2 Ensaio de quimioluminescência

Esta técnica baseia-se na reação entre luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione*) e as espécies reativas geradas na ausência ou presença das diferentes concentrações das substâncias, individualmente.

As células produzem uma luminosidade natural definida como quimioluminescência nativa ou natural. Contudo, esta luminosidade pode ser amplificada, usando-se reagentes químicos que, ao reagirem com o ROS produzido, passam a emitir a luminescência amplificada, conforme a reação abaixo:



Um total  $1 \times 10^6$  de células Neuro-2A foram pré-incubadas por 20 minutos, à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , na presença ou não de Ebselen (0,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{M}$ ), Ácido Caféico (25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ ) ou Memantina (0,5; 1,0; 10 e 50  $\mu\text{M}$ ), e RPMI para perfazer um volume final de 2 mL. Em todas as amostras adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para mimetizar um ambiente de estresse oxidativo.

Decorridos os 20 minutos, as células foram centrifugadas por 3 minutos à 1500 RPM, todo o sobrenadante retirado, e o *pellet* de células ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Em tubos específicos para Luminômetro, foram, então, colocados os 200  $\mu\text{L}$  de células, 10  $\mu\text{L}$  de luminol  $10^{-4}\text{M}$  e PBS para completar

o volume final de 700 µL. Cada tubo foi colocado no Luminômetro e a leitura foi realizada em corridas de 15 minutos. Após o tempo decorrido, retirava-se o tubo e a fita de papel com os valores de RLU/minuto (*Relative Light Units* = Unidade Relativa de Luz), colocando novo tubo para leitura. O processo foi repetido para todos os tubos. Foi feita, então, a média dos minutos de cada tubo, excluindo os 5 primeiros minutos.

### 3.4.3 Teste de viabilidade celular por incorporação de Azul de Trypan

Para a realização dos experimentos de citotoxicidade, foi estimado o número de células viáveis com o uso do corante Azul de Trypan. O fundamento desse método baseia-se na observação microscópica de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento (KONOPKA *et al.*, 1996). Paralelamente ao ensaio de quimioluminescência, foi realizado o teste de viabilidade celular pela incorporação do Azul de Trypan. Para este teste, adicionou-se o corante Azul de Trypan (0,3%) e as células foram contadas em câmara de Neubauer. As células que incorporaram o corante foram consideradas como não viáveis. Para que o experimento de quimioluminescência fosse considerado válido, as amostras equivalentes deveriam apresentar pelo menos 75% de células viáveis.

#### 3.4.4 Ensaio de citotoxicidade utilizando Vermelho Neutro

O corante Vermelho Neutro (*2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina*) tem sido utilizado como indicador de citotoxicidade e viabilidade em várias linhagens celulares. Caracteriza-se por acumular nos lisossomas de células viáveis (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006) que incorporam esse corante vital, ligeiramente catiônico, que penetra na membrana celular por difusão passiva não-iônica e se concentra nos lisossomas, onde se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos inclusive fosfatos hidrofóbicos da matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. As espécies reativas de oxigênio danificam membranas lisossomais fazendo com que suas enzimas digestivas sejam liberadas no citosol, provocando a morte celular. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (ROGERO *et al.*, 2003; CIAPETTI *et al.*, 1996).

As células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células para cada poço, e um volume final de 200  $\mu$ L de células e meio de cultura RPMI (acrescido de 10% de soro fetal bovino). Foram incubadas em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para aderência. Decorrido esse tempo, o sobrenadante foi retirado e a cada pocinho foi acrescentada uma concentração de Ebselen (0,5; 5; 10 e 20  $\mu$ M), Ácido

Caféico (25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ ) ou Memantina (0,5; 1,0; 10 e 50  $\mu\text{M}$ ), com exceção do controle (somente células e RPMI).

A placa foi incubada novamente por 20 minutos, o sobrenadante retirado e 200  $\mu\text{L}$  de solução de Vermelho Neutro (40 mg/mL) foram adicionados. A placa foi colocada mais uma vez em estufa umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 1 hora. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de solução de formaldeído (0,5%, v/v) em  $\text{CaCl}_2$  (1%). Após cinco minutos retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de álcool ácido (BABICH & BOREUNFREUND, 1991). O potencial citotóxico foi quantificado colorimetricamente. A absorbância foi lida a 540 nm no leitor de microplacas.

### 3.4.5 Ensaio de redução do MTT

O teste MTT (*3-(4,5 dimethylazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide*) constitui-se em um modelo para avaliar a viabilidade celular, de forma rápida e objetiva, com base em uma reação colorimétrica.

Como citado anteriormente, a mitocôndria é uma organela de extrema importância neste estudo, pois é a maior fonte de origem de ROS através da cadeia transportadora de elétrons, e o MTT irá reagir com enzimas indicando assim a atividade da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, a viabilidade da célula.

O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais denominadas succinato-desidrogenases,

transformando um composto amarelo em um composto violeta (Formazan). A quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior é a viabilidade celular e a atividade da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983).

As células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células para cada poço, e um volume final de 200  $\mu\text{L}$  de células e meio de cultura RPMI (acrescido de 10% de soro fetal bovino). Foram incubadas em estufa umidificada à 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas para aderência. Após decorrido esse tempo, o sobrenadante foi retirado e a cada pocinho foi acrescentada uma concentração de Ebselen (0,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{M}$ ), Ácido Caféico (25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ ) ou Memantina (0,5; 1,0; 10 e 50  $\mu\text{M}$ ), com exceção do controle (somente células e RPMI).

A placa foi incubada novamente por 20 minutos e o sobrenadante retirado. Acrescentou-se 190  $\mu\text{L}$  de RPMI e 10  $\mu\text{L}$  da solução de MTT aos poços e a placa foi colocada mais uma vez em estufa umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C por 1 hora. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de DMSO homogeneizando para dissolução dos cristais de formazan gerados. A absorbância foi lida a 570 nm no leitor de microplacas.

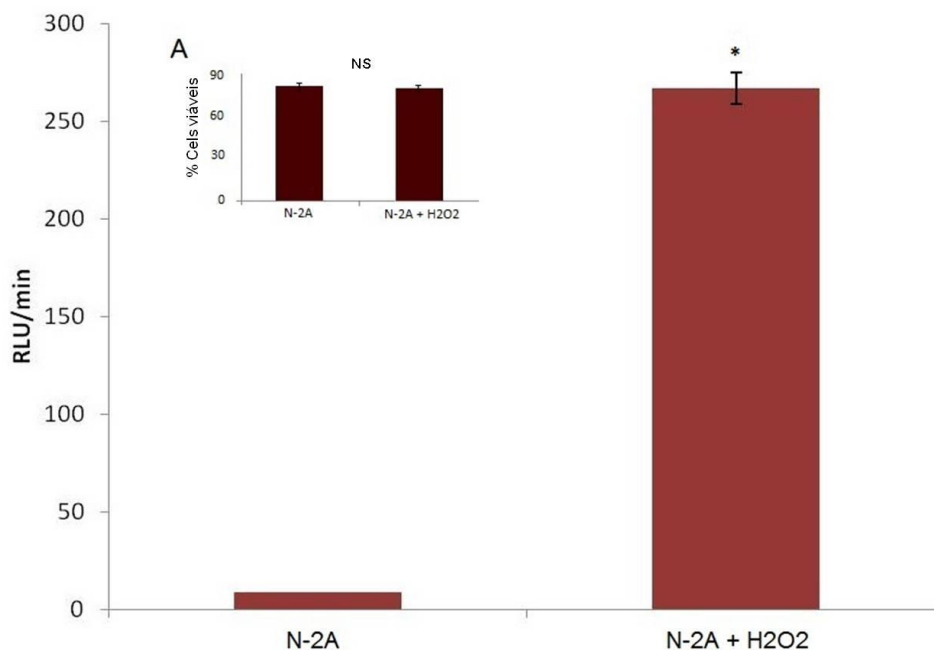
### 3.4.6 Análise estatística

O teste estatístico utilizado foi o não paramétrico de *Mann-Whitney*. Este teste corresponde ao teste “t” para amostras independentes no caso paramétrico e avalia se existe diferença significativa entre duas variáveis distintas. O nível de significância foi avaliado a partir de um p-valor e para valores com  $p < 0,05$  os resultados foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células da linhagem Neuro-2A

Para mimetizar um ambiente de estresse oxidativo, as células N-2A foram expostas ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A figura 10 demonstra que na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> há aumento ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *Mann-Whitney*, da produção de ROS quando comparado às células que não foram incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Embora haja este aumento na produção de ROS, o painel A da mesma figura mostra que não houve diminuição da viabilidade das células incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparadas ao controle pelo teste de viabilidade celular pela incorporação do Azul de Trypan.



**Fig. 10:** Avaliação da produção de ROS induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O painel (A) mostra a porcentagem de viabilidade celular pelo corante Azul de Trypan.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi expressa em RLU/min (*Relative Light Units* = Unidade Relativa de Luz, por minuto) durante 15 minutos; N-2A = células Neuro-2A; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio; NS = não significativo; Cels= células; \* = resultado significativo ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *Mann-Whitney* comparado às células que não foram expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 4.2 Avaliação da capacidade antioxidante através da técnica de quimioluminescência dependente de luminol e viabilidade celular pelo Azul de Trypan na linhagem Neuro-2A

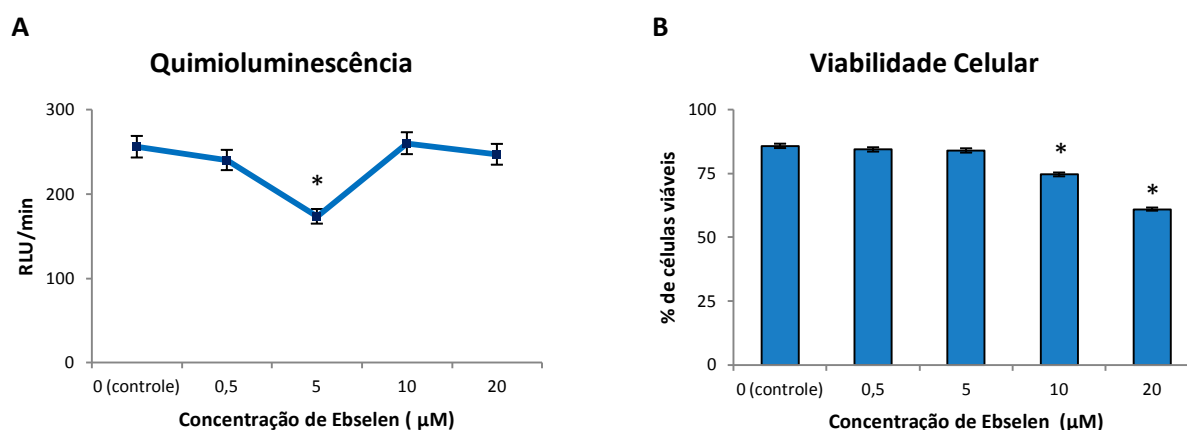
### 4.2.1 Poder antioxidante do Ebselen x viabilidade celular

Como pode ser observado na figura 11, somente na concentração de 5  $\mu$ M houve ação antioxidante do Ebselen considerada significativa pelo teste de *Mann-Whitney* ( $p < 0,05$ ) comparado ao controle (N-2A + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RPMI),

evidenciando então, a diminuição da produção de ROS nesta concentração, enquanto que nas concentrações de 0,5; 10 e 20  $\mu\text{M}$ , não obtivemos diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) comparadas ao controle (N-2A +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + RPMI). O painel A mostra os dados expressos em RLU/minuto (*Relative Light Units* = Unidade Relativa de Luz) evidenciando expressivo potencial antioxidante de Ebselen na concentração de 5  $\mu\text{M}$ .

Paralelamente, o teste de viabilidade celular pelo corante Azul de Trypan (painel B), mostra que na concentração de 5  $\mu\text{M}$  não ocorreu morte celular ( $p > 0,05$ ) diferente da encontrada no controle. Uma diminuição ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *Mann-Whitney*, na quantidade de células viáveis comparadas ao controle (N-2A +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + RPMI), foi observada nas concentrações 10 e 20  $\mu\text{M}$  de Ebselen, sem, entretanto ser suficiente em alterar a capacidade redutora celular.

Experimento	Quimioluminescência (RLU/min $\pm$ EP)	Significância
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + RPMI	256 $\pm$ 21	-
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0,5 $\mu$ M Ebs	240 $\pm$ 16	NS
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 5 $\mu$ M Ebs	173 $\pm$ 9 *	$p < 0,05$
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 $\mu$ M Ebs	260 $\pm$ 6	NS
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 20 $\mu$ M Ebs	247 $\pm$ 17	NS



**Fig. 11:** Avaliação comparativa do (A) efeito antioxidante de diferentes concentrações de Ebselen utilizando a técnica de quimioluminescência e (B) viabilidade celular pelo Azul de Trypan.

Os valores foram representados na tabela em média de 10 experimentos  $\pm$  EP.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi expressa em RLU/min (*Relative Light Units* = Unidade Relativa de Luz, por minuto) durante 15 minutos; N-2A = células Neuro-2A; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio; RPMI = meio de cultura; Ebs = Ebselen; EP = erro padrão; controle = N-2A + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RPMI.

NS = não significativo

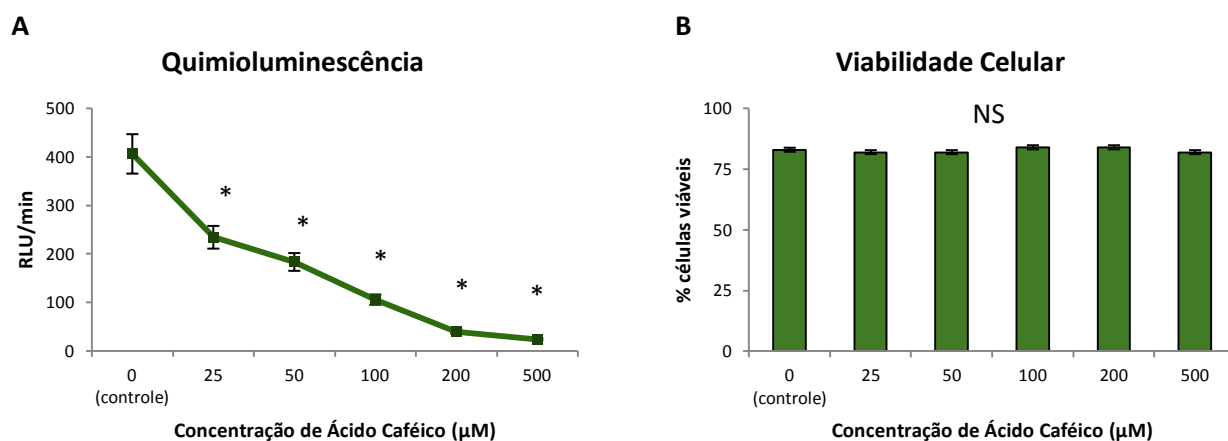
\* = resultado significativo ( $p < 0,05$ ) comparado ao controle (N-2A + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RPMI) pelo teste de *Mann-Whitney*

#### 4.2.2 Poder antioxidante do Ácido Caféico x viabilidade celular

Na figura 12 verificamos uma diminuição concentração-dependente da produção de ROS, significativa de acordo com o teste de *Mann-Whitney* ( $p < 0,05$ ), em todas as concentrações de Ácido Caféico analisadas (25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ ) comparadas ao controle (N-2A +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + RPMI). O painel A mostra os dados expressos em RLU/minuto (*Relative Light Units* = Unidade Relativa de Luz) pelo protocolo de quimioluminescência.

As mesmas amostras foram também comparadas ao controle pelo teste com o Azul de Trypan, para verificar quantidade de células que não incorporaram o corante, sendo consideradas, portanto, como células viáveis. Como representado no painel B da figura 12, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na viabilidade celular comparadas ao controle.

Experimento	Quimioluminescência (RLU/min $\pm$ EP)	Significância
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + RPMI	406 $\pm$ 54	-
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 25 $\mu$ M AC	234 $\pm$ 21*	$p < 0,05$
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 50 $\mu$ M AC	183 $\pm$ 22 *	$p < 0,05$
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 100 $\mu$ M AC	106 $\pm$ 13*	$p < 0,05$
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 200 $\mu$ M AC	40 $\pm$ 6*	$p < 0,05$
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 500 $\mu$ M AC	24 $\pm$ 1*	$p < 0,05$



**Fig. 12:** Avaliação comparativa do (A) efeito antioxidante de diferentes concentrações de Ácido Cafáico utilizando a técnica de quimioluminescência e (B) viabilidade celular pelo Azul de Trypan.

Os valores foram representados na tabela em média de 10 experimentos  $\pm$  EP.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi expressa em RLU/min (*Relative Light Units* = Unidade Relativa de Luz, por minuto) durante 15 minutos; N-2A = células Neuro-2A; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio; RPMI = meio de cultura; AC = ácido cafáico; EP = erro padrão; controle = N-2A + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RPMI.

NS = não significativo

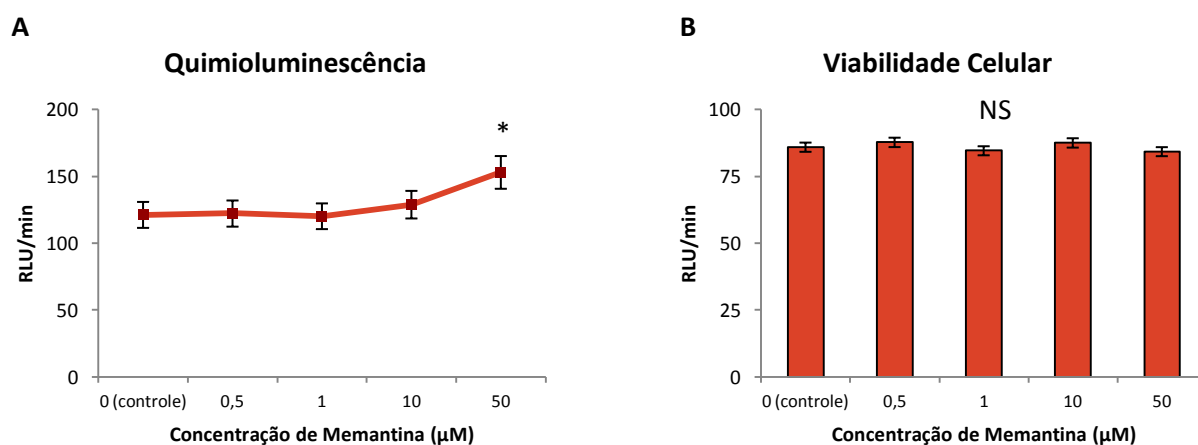
\* = resultado significativo ( $p < 0,05$ ) comparado ao controle (N-2A + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RPMI) pelo teste de *Mann-Whitney*

#### 4.2.3 Poder antioxidante da memantina x viabilidade celular

A Memantina, como visto na figura 13, nas concentrações de 0,5; 1 e 10  $\mu\text{M}$  não mostrou ação antioxidante, ou seja, não promoveu a diminuição na produção de ROS. Em contrapartida, na concentração de 50  $\mu\text{M}$  observamos um aumento na produção de ROS, que foi significativa ( $p < 0,05$ ), sendo esta concentração, portanto, pró-oxidante pelo ensaio de quimioluminescência. O painel A mostra os dados expressos em RLU/minuto (*Relative Light Units* = Unidade Relativa de Luz) evidenciando potencial pró-oxidante da Memantina na concentração de 50  $\mu\text{M}$ .

Nas mesmas concentrações, no ensaio de viabilidade celular com Azul de Trypan, não foram encontradas diferenças pelo teste de *Mann-Whitney* ( $p > 0,05$ ).

Experimento	Quimioluminescência (RLU/min $\pm$ EP)	Significância
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + RPMI	121 $\pm$ 7	-
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0,5 $\mu$ M Mem	122 $\pm$ 12	NS
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 1 $\mu$ M Mem	120 $\pm$ 10	NS
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 $\mu$ M Mem	124 $\pm$ 8	NS
N-2A + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 50 $\mu$ M Mem	153 $\pm$ 14 *	$p < 0,05$



**Fig. 13:** Avaliação comparativa do (A) efeito antioxidante de diferentes concentrações de Memantina utilizando a técnica de quimioluminescência e (B) viabilidade celular pelo Azul de Trypan.

Os valores foram representados na tabela em média de 10 experimentos  $\pm$  EP.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi expressa em RLU/min (*Relative Light Units* = Unidade Relativa de Luz, por minuto) durante 15 minutos; N-2A = células Neuro-2A; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio; RPMI = meio de cultura; Mem = memantina; EP = erro padrão; controle = N-2A + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RPMI.

NS = não significativo

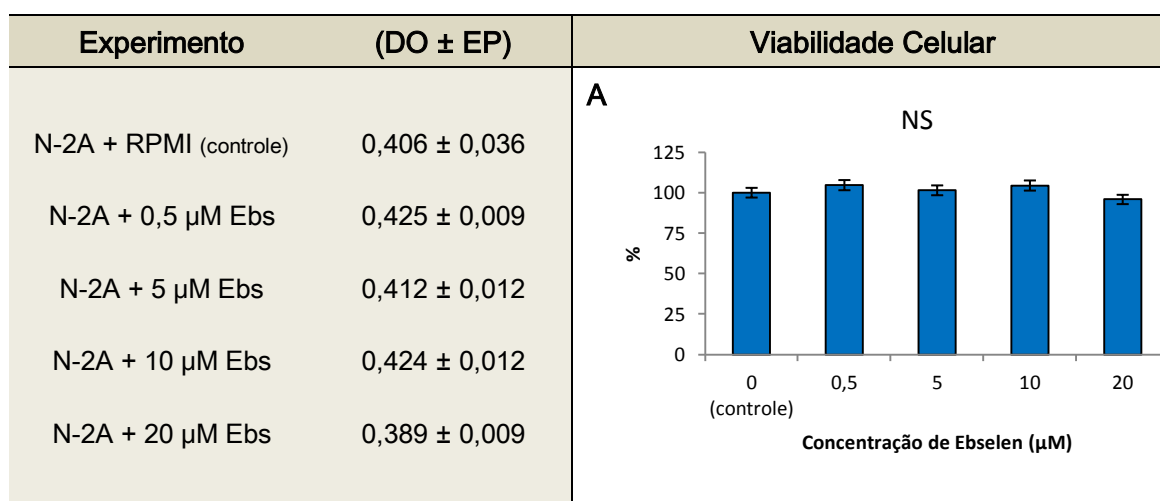
\* = resultado significativo ( $p < 0,05$ ) comparado ao controle (N-2A + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RPMI) pelo teste de *Mann-Whitney*

### 4.3 Avaliação da viabilidade celular em nível lisossomal utilizando Vermelho

#### Neutro em células Neuro-2A

##### 4.3.1 Ebselen

A figura 14 mostra que as células expostas a diversas concentrações de Ebselen (0,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) do controle (N-2A + RPMI) segundo sua viabilidade em nível lisossomal, isto é, por ser um corante vital, o vermelho neutro é permeável às membranas das células e se acumula em lisossomas de células viáveis. Em nenhuma das concentrações analisadas foram observados danos ou morte celular comparados ao controle.



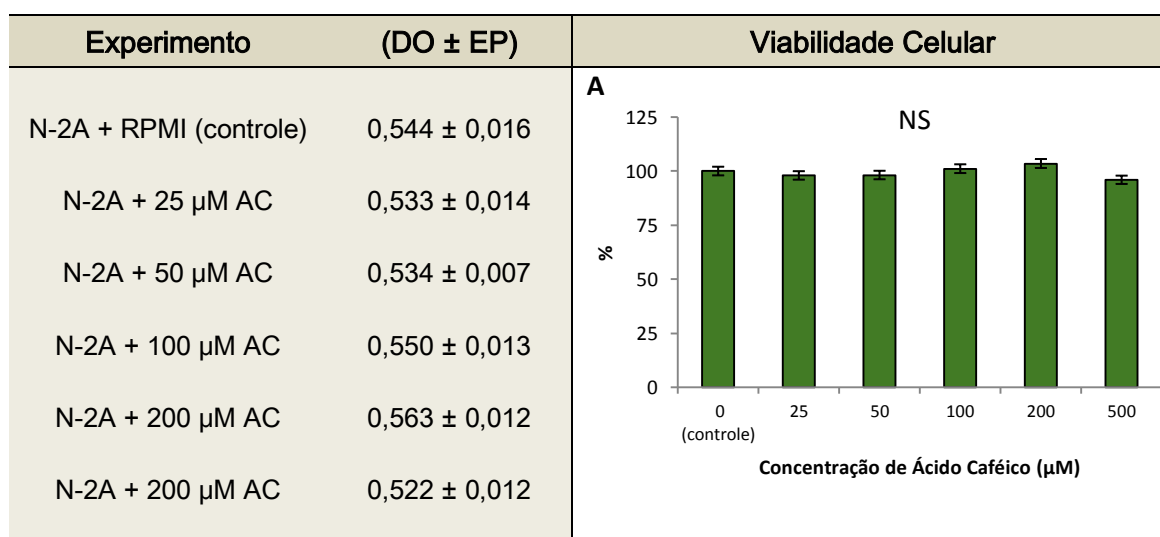
**Fig. 14.** Avaliação do efeito de diferentes concentrações de Ebselen sobre a viabilidade celular em nível lisossomal pela incorporação do Vermelho Neutro

A viabilidade celular foi expressa na tabela em densidade óptica (DO) pela média de 10 experimentos  $\pm$  EP; e no painel A pela porcentagem (%) dos valores sendo o controle considerado 100%

N-2A= células Neuro-2A; RPMI = meio de cultura; Ebs = Ebselen; EP = erro padrão; controle = N-2A + RPMI; NS = não significativo; DO = densidade óptica (540nm)

### 4.3.2 Ácido Caféico

O Ácido Caféico, como demonstrado anteriormente apresentou um efeito antioxidante em todas as concentrações (25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ ) ao ensaio de quimioluminescência, não mostrando alterações significativas ( $p < 0,05$ ) na viabilidade celular em nível lisossomal quando comparado ao controle (N-2A + RPMI), como pode ser constatado na figura 15.



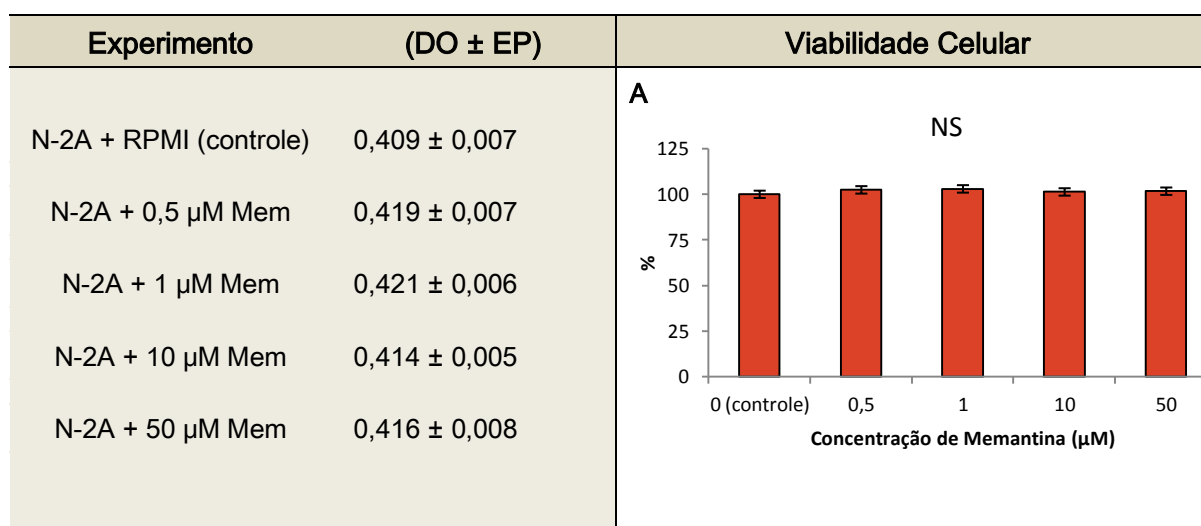
**Fig. 15:** Avaliação do efeito de diferentes concentrações de Ácido Caféico sobre a viabilidade celular em nível lisossomal pela incorporação do Vermelho Neutro

A viabilidade celular foi expressa na tabela em densidade óptica (DO) pela média de 10 experimentos  $\pm$  EP; e no painel A pela porcentagem (%) dos valores sendo o controle considerado 100%

N-2A= células Neuro-2A; RPMI = meio de cultura; AC = Ácido Caféico; EP = erro padrão; controle = N-2A + RPMI; NS = não significativo; DO = densidade óptica (540nm)

### 4.3.3 Memantina

Assim como as outras substâncias testadas (Ebselen e Ácido Caféico), a Memantina nas concentrações de 0,5; 1; 10 e 50  $\mu\text{M}$  não apresentou alterações significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *Mann-Whitney* na viabilidade celular em nível lisossomal comparado ao controle (N-2A + RPMI), apesar de manifestar efeito pró-oxidante na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ) ao ensaio de quimioluminescência, como pode ser constatado na figura 16.



**Fig. 16:** Avaliação do efeito de diferentes concentrações de Memantina sobre a viabilidade celular em nível lisossomal pela incorporação do Vermelho Neutro

A viabilidade celular foi expressa na tabela em densidade óptica (DO) pela média de 10 experimentos  $\pm$  EP; e no painel A pela porcentagem (%) dos valores sendo o controle considerado 100%

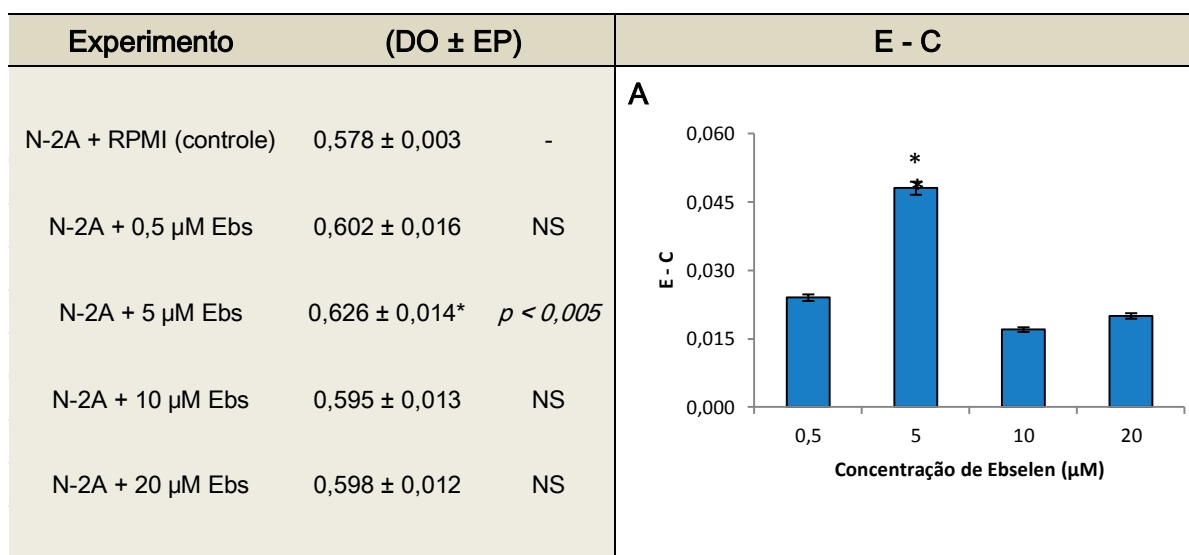
N-2A= células Neuro-2A; RPMI = meio de cultura; Mem = Memantina; EP = erro padrão; controle = N-2A + RPMI; NS = não significativo; DO = densidade óptica (540nm)

#### 4.4 Avaliação do poder redutor mitocondrial utilizando MTT em células

##### Neuro-2A

##### 4.4.1 Ebselen

O poder redutor do Ebselen observado foi significativo ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *Mann-Whitney* somente na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , evidenciando que nas demais concentrações não houve redução significativa ( $p > 0,05$ ) comparadas ao controle.



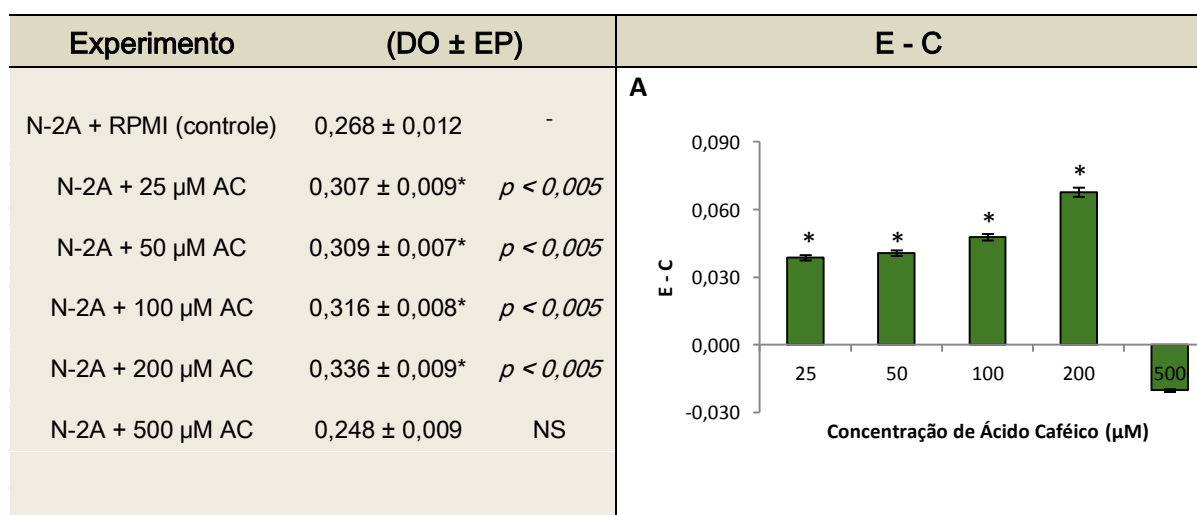
**Fig. 17:** Avaliação comparativa do efeito de diferentes concentrações de Ebselen sobre o poder redutor mitocondrial utilizando MTT

A viabilidade celular foi expressa na tabela em densidade óptica (DO) pela média de 10 experimentos  $\pm$  EP; e no painel A pelo E - C = experimento - controle

N-2A= células Neuro-2A; RPMI = meio de cultura; Ebs = Ebselen; EP = erro padrão; controle = N-2A + RPMI; NS = não significativo; DO = densidade óptica (570nm); \* = resultado significativo ( $p < 0,05$ ) comparado ao controle (N-2A + RPMI) pelo teste de *Mann-Whitney*

#### 4.4.2 Ácido Caféico

O Ácido Caféico apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do poder redutor mitocondrial, crescente de acordo com as concentrações utilizadas (25, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ) comparadas ao controle (N-2A + RPMI), com exceção da maior concentração (500  $\mu\text{M}$ ) que teve o poder redutor mitocondrial diminuído em relação ao controle, apesar de não ser significativo ( $p > 0,05$ ) pelo teste de *Mann-Whitney*.



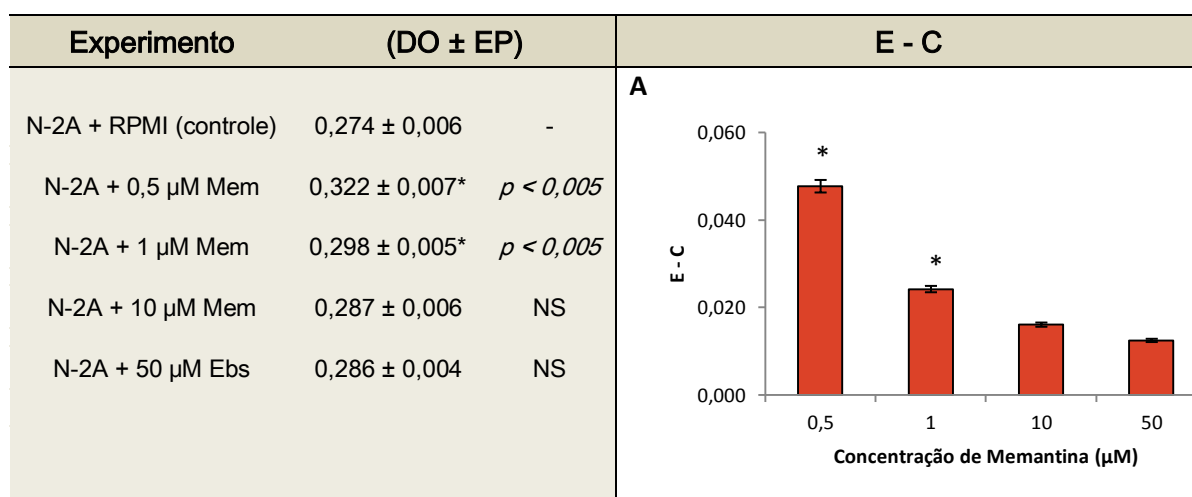
**Fig.18:** Avaliação comparativa do efeito de diferentes concentrações do Ácido Caféico sobre o poder redutor mitocondrial utilizando MTT

A viabilidade celular foi expressa na tabela em densidade óptica (DO) pela média de 10 experimentos  $\pm$  EP; e no painel A pelo E - C = experimento - controle

N-2A= células Neuro-2A; RPMI = meio de cultura; AC = Ácido Caféico; EP = erro padrão; controle = N-2A + RPMI; NS = não significativo; DO = densidade óptica (570nm); \* = resultado significativo ( $p < 0,05$ ) comparado ao controle (N-2A + RPMI) pelo teste de *Mann-Whitney*

#### 4.4.3 Memantina

Considerando as diferentes concentrações de Memantina (0,5; 1; 10 e 50  $\mu\text{M}$ ) utilizadas, foi constatado que as concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  apresentaram poder redutor mitocondrial ( $p < 0,05$ ) comparadas ao controle (N-2A + RPMI), sendo que a ação da memantina na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  mostrou maior aumento na função mitocondrial.



**Fig. 19:** Avaliação comparativa do efeito de diferentes concentrações da Memantina sobre o poder redutor mitocondrial utilizando MTT

A viabilidade celular foi expressa na tabela em densidade óptica (DO) pela média de 10 experimentos  $\pm$  EP; e no painel A pelo E - C = experimento - controle

N-2A= células Neuro-2A; RPMI = meio de cultura; Mem = Memantina; EP = erro padrão; controle = N-2A + RPMI; NS = não significativo; DO = densidade óptica (570nm); \* = resultado significativo ( $p < 0,05$ ) comparado ao controle (N-2A + RPMI) pelo teste de *Mann-Whitney*

## 5 DISCUSSÃO

O envelhecimento é uma experiência que todo ser humano compartilha, mas nem sempre compreende. Não apenas o entendimento do processo de envelhecimento é fundamental como também determinar as causas e intervenções necessárias para o seu adiamento. Do modo mais simples, o envelhecimento é o tempo cronológico de existência desde o nascimento até a morte, sendo tempo e idade relativos sob interpretação. Apesar de ser de fácil detecção a idade física, é quase imperceptível aos olhos a idade fisiológica (SPIRDUSO, *et al.*, 2005).

Dentre as várias teorias que tentam explicar o processo de envelhecimento, nos deparamos com a teoria dos radicais livres, onde reações são desencadeadas na célula, e uma vez iniciadas, podem ser responsáveis pela deteriorização progressiva dos sistemas biológicos a longo prazo. Como já foi descrito, esses radicais promovem dano mitocondrial, que aliado a uma perda da competência biomolecular, pode, então, levar ao envelhecimento, morte celular, e conseqüentemente morte do organismo (HARMAN, 1956). A produção de ROS mitocondrial, portanto, é fator preponderante neste processo, pois a vida aeróbica depende da combustão controlada de energia e esta é catalisada e regulada por uma maquinaria metabólica que pode ser danificada por reações oxidativas incontroláveis associadas com a produção de energia. Devido à extrema ameaça desta oxidação, seres aeróbios desenvolveram um

sistema antioxidante complexo para controlar essas reações e reparar ou substituir a maquinaria afetada (JONES, 2006).

### 5.1 Poder antioxidante pelo ensaio de quimioluminescência

Células Neuro-2A são utilizadas em trabalhos de estresse oxidativo *in vitro* (CALDERÓN *et al.*, 1999). Em um estudo estes pesquisadores compararam as linhagens N-2A e PC12 (feocromocitoma) e verificaram diferenças na susceptibilidade e resposta a diferentes estímulos que envolvem a produção e/ou aumento de ROS nestas células.

Começamos nossos estudos mimetizando um ambiente de estresse oxidativo nas células N-2A pela exposição ao  $H_2O_2$  e observamos aumento na produção de ROS. O fato se mostra condizente com estes estudos de Calderón *et al.* (1999). Estes autores indicam uma maior resistência ao estresse oxidativo causado pelo  $H_2O_2$  nas células N-2A comparadas às células PC12, que provavelmente está relacionado com um nível mais elevado de fatores antioxidantes em N-2A, que eles puderam evidenciar pelos maiores níveis de GSH encontrados nas mesmas, ou seja, as células N-2A são células que possuem uma maior defesa antioxidante (maior índice de GSH) comparadas às células PC12, entretanto são células sensíveis ao estímulo oxidativo, no caso do estudo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), pois como pode ser observado na figura 10, quando expostas ao  $H_2O_2$  as células mostraram um significativo aumento ( $p < 0,05$ ) na produção de ROS quando comparadas ao controle

(células que não foram submetidas à exposição com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). É importante ressaltar que, embora as células expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram aumento significativo nos níveis de ROS, o painel A da figura 10 nos mostra que não houve aumento do número de morte celular causado pela exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparadas ao controle (células que não foram expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pelo teste de viabilidade celular de Azul Trypan, onde o corante só é incorporado pelas células vivas. Portanto, o estresse oxidativo não se deve à morte celular.

A partir deste resultado então, prosseguimos com as etapas seguintes que foram verificar se as substâncias Ebselen, Ácido Caféico e Memantina, já descritas na literatura como substâncias antioxidantes, tinham efetivamente esse efeito na célula sem causar prejuízos às mesmas.

É sabido que várias substâncias têm o poder de neutralizar a ação deletéria dos radicais livres nas células, seja por prevenir, interceptar as espécies reativas ou por reparar os danos causados por estas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000) e dentre estas substâncias podemos citar o Ebselen (MULLER *et al.*, 1984; SATHEESHKUMAR & MUGESH, 2011, SATOH, 2004; YOSHIZUMI, 2002) e o Ácido Caféico (GARAMBONE & ROSA, 2007; KUMARAN & PRINCE, 2010; RICE-EVANS, 1996) que entram na classe das substâncias que interceptam ROS, e a Memantina (BLANCHARD *et al.*, 2008; FORLENZA, 2005; MOTAWAJ *et al.*, 2011) que age por prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio.

### 5.1.1 Ebselen

Um estudo da catálise da reação de GPx através do Ebselen, mostrou que o mecanismo se pareceu idêntico ao da reação da enzima (MAIORINO, *et al.*, 1988). A reação catalisada por este composto é similar à reação catalisada pela GPx, e é de particular significância para células vivas porque decompõe  $H_2O_2$ , um intermediário que pode dar origem a ROS, prevenindo assim a formação de radical hidroxila ( $HO\cdot$ ) e peroxidação de lipídios (NOGUEIRA *et al.*, 2004).

Como mostra amplamente a literatura, o Ebselen é um composto não-tóxico, com baixo peso molecular, dotado de potente atividade mimética da GPx (HERIN *et al.*, 2001; IMAI *et al.*, 2003; LI & CAO, 2002) e, portanto, um potente antioxidante, além de possuir diversas outras ações na célula, tais como, redução de um grande número de enzimas implicadas no processo inflamatório (FÜRSTENAU *et al.*, 2004), antiaterosclerótica e citoprotetora em diversos modelos biológicos (SCHEWE, 1995). Uma nova propriedade do Ebselen, como inibidor de apoptose, foi demonstrada em estudo realizado por Namura *et al.* (2001). O Ebselen e seus metabólitos reduzem hidroperóxidos orgânicos, protegendo lipoproteínas e membranas (SCHEWE, 1995; HERIN *et al.*, 2001).

Evidências de atividade neuroprotetora para este considerável antioxidante selenado também são extensas na literatura, principalmente em se tratando do processo de envelhecimento onde há implicações de doenças

neurodegenerativas como doença de Parkinson e Alzheimer (SCHEWE, 1995; ROSSATO *et al.*, 2002). Em pesquisas com animais *in vivo* foi investigada a ação antioxidante e eficácia neuroprotetora do Ebselen em vários modelos de derrame cerebral isquêmico (IMAI *et al.*, 2003; MORETTO *et al.*, 2005), prevenindo a peroxidação de lipídios provocada pela excessiva ação do sistema glutamatérgico (NOGUEIRA *et al.*, 2002; PORCIÚNCULA *et al.*, 2003). Além disso, o Ebselen também foi administrado com sucesso em humanos, diminuindo os déficits neurológicos provocados por aneurisma subaracnóide hemorrágico (SAITO *et al.*, 1998; ZHAO & HOLMGREN, 2002).

Tratamentos clínicos indicam que o Ebselen tem efeitos benéficos em situações patológicas quando há envolvimento com glutamato (PORCIÚNCULA *et al.*, 2001).

Nossos resultados mostraram que das concentrações de Ebselen estudadas (0,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{M}$ ), somente na concentração de 5  $\mu\text{M}$  constatamos realmente efeito antioxidante da substância, reduzindo ( $p < 0,05$ ) a quantidade de ROS produzidos nas células estimuladas por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , conforme mostra figura 11 (tabela e painel A).

Nossos resultados estão de acordo com Satoh *et al.* (2004) que demonstraram que nesta mesma concentração de 5  $\mu\text{M}$ , além de antioxidante, Ebselen também foi capaz de proteger contra morte, células expostas ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  (YOSHIZUMI *et al.*, 2002). Muller *et al.*, 1984 mostraram que Ebselen promove

ação protetora sobre células PC12, incluindo atividade da glutathiona peroxidase (GPx), resultado antioxidante e efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica.

Já Guérin & Gauthier (2003) questionaram que apesar da ação benéfica, já amplamente descrita, se faz necessária a avaliação da atividade mutagênica e/ou genotóxica do composto organoselenado Ebselen, pois, estudos já mostraram que o Ebselen induz morte celular por necrose.

### 5.1.2 Ácido Caféico

A maior parte dos constituintes do sistema de defesa não enzimático é obtida a partir da dieta, pois a maioria não é sintetizada pelos próprios animais (HERMES-LIMA, 2004).

Como já descrito anteriormente, o Ácido Caféico (AC) é um importante representante dos compostos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos) encontrados em diversos alimentos de origem vegetal (GARAMBONE & ROSA, 2007; KUMARAN & PRINCE, 2010). Segundo Manach *et al.* (2004), a absorção deste composto fenólico em seres humanos varia conforme a quantidade de alimentos que o contém (por exemplo, o café) são consumidos.

Exatamente por se constituírem em fundamentais contribuintes da dieta, os primeiros estudos dos polifenóis estavam em sua maioria relacionados aos efeitos antinutricionais destes compostos, como por exemplo, à diminuição na absorção e digestibilidade de alimentos devido à capacidade destes compostos

de se ligar e precipitar minerais e macromoléculas tais como proteínas e carboidratos (YANG, 2001).

Diversos estudos mostraram propriedades antioxidantes do AC (AMORATI *et al.*, 2006; KONO *et al.*, 1997). Nardini *et al.* (1995) evidenciaram que o AC inibiu, de maneira dose-dependente, a peroxidação lipídica induzida por íons cúpricos. Neste mesmo estudo os autores mostraram que o AC é capaz de reduzir radicais lipoperoxil (por meio da doação de um hidrogênio) e impedir a propagação da peroxidação lipídica. Outros estudos mostram que AC apresenta propriedades anti-inflamatórias (GAMARO *et al.*, 2011), antimutagênica (BIROSOVÁ *et al.*, 2005) e anticarcinogênicas (KANG, *et al.*, 2009).

O Ácido Caféico em nosso trabalho apresentou ação antioxidante em todas as concentrações testadas (25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ ), expondo um aumento na inibição de ROS concentração-dependente comparado ao controle, como pode ser visto na figura 12, tabela e painel A. No processo de envelhecimento, bem como na fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas do sistema nervoso, por haver o aumento de ROS e a diminuição das defesas antioxidantes, o AC se mostra então, um potente agente neuroprotetor.

Nakayama em 1994 já havia atribuído ao Ácido Caféico propriedade citoprotetora induzida por peróxido de hidrogênio e Jeong *et al.* (2011) concluíram em seus estudos que o Ácido Caféico inibe a peroxidação lipídica,

diminui o acúmulo de ROS intracelular e protege células PC12 contra neurotoxicidade induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Estudos anteriores com a planta *Erigeron Annuus*, amplamente usada na Coréia e China com vários efeitos medicinais, e que possui grandes concentrações de Ácido Caféico, indicaram que o mesmo teve excelente efeitos antioxidante e neuroprotetores (JEONG *et al.*, 2011). Estes resultados sugerem um potencial uso do extrato de *Erigeron Annuus* bruto, bem como os compostos isolados para tratar doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. Portanto, a ação antioxidante do AC pode fornecer neuroproteção contra toxicidade induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células neuronais .

Nossos resultados confirmam estudos recentes desses autores onde o pré-tratamento de células PC12 pelo ácido caféico impediu significativamente o acúmulo de ROS intracelular em comparação células tratadas apenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controle). Este resultado sugere que o Ácido Caféico isolado de *Erigeron Annuus* com atividade antioxidante pode desempenhar um papel importante na redução do estresse oxidativo, e conseqüentemente, retardando o envelhecimento e o aparecimento de doenças neurodegenerativas causadas pelo acúmulo de ROS.

É importante salientar que Skibola *et al.* (2000) alertam para os potenciais efeitos tóxicos decorrentes da excessiva ingestão de flavonóides que são comumente ignorados. Em doses altas (mas não citadas pelos autores), flavonóides podem agir como mutagênicos, geradores de radicais

livres, e inibidores de enzimas chave do metabolismo de hormônios. O nosso trabalho, todavia, não mostrou em nenhuma das concentrações uma ação pró-oxidante que corroborasse tais resultados dos autores supra citados.

### 5.1.3 Memantina

A neurotoxicidade induzida pela hiperativação do receptor de NMDA (receptores de glutamato) resulta em inúmeras condições patológicas que vão desde doenças neurodegenerativas agudas, como derrame e trauma, até doenças crônicas, como Huntington, mal de Parkinson e Alzheimer, que podem causar a morte neuronal (AHMED *et al.*, 2011; DIAS, *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2010; SAFT *et al.*, 2011)

O metabolismo de glutamato, gera espécies reativas de oxigênio (ROS) que são capazes de consumir as defesas antioxidantes, que se encontram em menor quantidade em regiões específicas do encéfalo. Já as membranas neuronais contêm baixo nível de lipídeos poliinsaturados, o que as torna mais suscetível a peroxidação lipídica. (FREENEY & STYS, 2005; GIBSON & HUANG, 2005).

Terapias disponíveis para doenças neurodegenerativas são limitadas ao tratamento sintomático, o que não altera a progressão da doença (BODNER *et al.*, 2006). A necessidade de tratamento destas patologias tem suscitado o desenvolvimento de antagonistas do receptor de NMDA, mas o emprego clínico não tem demonstrado êxito devido aos graves efeitos colaterais, que incluem

déficit motor, sedação e estados psicomiméticos, além de baixo índice terapêutico (DIAS *et al.*, 2007).

Na identificação de novos antagonistas do receptor de NMDA, o canal iônico deste receptor tem sido apontado como um alvo promissor, visto que apresenta sítios distintos de interação que são responsáveis por uma intensa modulação sináptica causando alteração no fluxo de íons sódio, potássio e cálcio. Atualmente quatro sítios do receptor são considerados possíveis alvos para ligantes endógenos e exógenos, um deles é o sítio de ligação de antagonistas não competitivos que bloqueiam o canal (PAOLETTI & NEYTON, 2007).

Sabendo então que o estresse oxidativo tem papel importante no processo das doenças neurodegenerativas, os antagonistas de receptor NMDA podem minimizar ou bloquear a morte dos neurônios induzida pela ativação desses receptores e conseqüentemente da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo assim, uma medida terapêutica considerada como neuroprotetora (DIAS *et al.*, 2007).

A ação da Memantina (substância ativa do medicamento de uso oral – cloridrato de Memantina que é utilizado como um adjuvante no tratamento de demências) pode ser descrita como um antagonista não-competitivo de moderada afinidade de receptores NMDA, permitindo sua ativação fisiológica durante os processos de formação da memória, porém bloqueando a abertura dos canais e sua ativação patológica. Em condições fisiológicas, a Memantina

bloqueia os receptores NMDA no estado de repouso e deslocada de seu sítio de ligação em condições de ativação fisiológica; em contrapartida, não se desprende do receptor na vigência de ativação patológica. Estas propriedades conferem a memantina uma ação neuroprotetora contra a ativação excitotóxica de receptores de glutamato (DIAS *et al.*, 2007).

Sabendo que o excesso de cálcio no interior da célula desencadeia eventos que levam ao aumento da produção de ROS, e que o aumento destes causa danos na função celular contribuindo para o processo de envelhecimento e das doenças neurodegenerativas, a Memantina tem sido amplamente estudada *in vivo* como antioxidante, tendo como mecanismo a diminuição da produção de ROS pela inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (ANDERSEN, 2004; FRIGUET, 2006; FLOYD & HENSLEY, 2002).

Em nosso estudo, das concentrações utilizadas (0,5; 1; 10 e 50  $\mu\text{M}$ ), nenhuma delas apresentou efeito antioxidante ao ensaio de quimioluminescência em culturas de células N-2A, ou seja, a produção de ROS das células tratadas com a Memantina não diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao controle (células sem tratamento com Memantina), o que difere dos estudos supra citados, entretanto estes foram realizados *in vivo*. Além disso, na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ) a Memantina apresentou um efeito pró-oxidante, ou seja, as células tratadas com Memantina nesta concentração apresentaram um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) na produção de ROS. Considerando que a Memantina age inibindo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , que por

sua vez causa danos celulares, inclusive por aumento na produção de ROS, podemos sugerir que nesta concentração ela não somente não foi eficaz na sua função de bloqueio temporário, (que reduziria a produção de ROS) como apresentou ação pró-oxidante (aumentando a produção de ROS). Estes resultados sugerem que a concentração da substância modifica a reação celular causando um estresse oxidativo. Portanto, apesar de vários estudos *in vivo* mostrarem efeitos benéficos pela ação neuroprotetora da Memantina, deve-se ter critério quanto à sua administração visto que ela pode trazer prejuízos no que se refere a aumentos de ROS em cultura celular de neurônios.

## **5.2 Viabilidade celular em nível lisossomal pela incorporação de Vermelho Neutro**

O método empregado para essa avaliação foi o teste de citotoxicidade do Vermelho Neutro, corante vital que se acumula em células viáveis. Os resultados dependem da viabilidade lisossomal das células ou função dessas. A incorporação do Vermelho Neutro por células viáveis pode ser modificada por alterações na superfície celular ou na membrana lisossomal. De acordo com a capacidade lisossomal de incorporar o corante é possível distinguir células viáveis das injuriadas ou mortas (MELO,1996). A avaliação da incorporação do corante pelas células é feita através dos valores de absorbância, sendo esses

proporcionais à viabilidade das células e dos lisossomas. Assim, esse ensaio é um indicador de danos provocados ao lisossoma.

Como os testes mostraram, para as três substâncias (Ebselen, Ácido Caféico e Memantina) em todas as concentrações estudadas não houve diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *Mann-Whitney*, da captação do corante Vermelho Neutro, indicando assim, que ambas não apresentaram potencial citotóxico em nível lisossomal (figuras 14, 15 e 16).

Podemos inferir que as substâncias, nas concentrações utilizadas, não interagiram de maneira lesiva com membranas celulares (inclusive lisossomais) causando danos e/ou morte às mesmas, pois estudos anteriores já relataram a importante participação dessa organela nos processos apoptóticos (ZHAO *et al.*, 2003). Tanto o Ebselen, o Ácido Caféico, quanto a Memantina, nas concentrações utilizadas, não diminuíram a viabilidade das células N-2A em nível lisossomal, embora, o Ebselen na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (figura 11, painel A) e o Ácido Caféico em todas as concentrações (25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ ) (figura 12, painel A) apresentaram de modo significativo ( $p < 0,05$ ) ação antioxidante, ou seja, ocorreu a redução na produção de ROS sem, no entanto, causar danos e/ou morte celulares que seriam constatados pelo incorporação do corante vital. Já a memantina, apesar de, em todas as concentrações testadas, não alterar a viabilidade lisossomal, na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , como pode ser visto na figura 13 (painel A) apresentou um perfil pró-oxidante, quer dizer, teve a capacidade de aumentar a produção de ROS comparada ao

controle sem, no entanto, causar qualquer prejuízo à célula no que se refere a danos lisossomais.

### **5.3 Capacidade redutora mitocondrial pelo ensaio de MTT**

O cérebro é um dos órgãos metabolicamente mais ativos, requerendo duas vezes mais energia que o coração em repouso. Este tecido representa 2% da massa corporal do homem adulto e consome em torno de 20% do total de O<sub>2</sub> disponível para o organismo. A grande demanda por O<sub>2</sub> deve-se ao alto consumo de ATP pelos neurônios, e tendo em vista que a fosforilação oxidativa é responsável pela quase totalidade do ATP produzido no SNC, a regulação da respiração mitocondrial se torna essencial para o correto metabolismo energético cerebral (BARBOSA *et al.*, 2006). Neste sentido, a disfunção mitocondrial tem sido apontada como o mecanismo-chave na neurodegeneração induzida por estímulos agudos e crônicos (BARBOSA *et al.*, 2006; LIN & BEAL, 2006).

As doenças neurodegenerativas crônicas podem ser definidas como um grupo de desordens heterogêneas caracterizadas por um início insidioso, de progressão lenta e com características neuropatológicas fortemente associadas a uma área específica do cérebro (LIN & BEAL, 2006). Apesar da heterogeneidade destas entidades a resposta adaptativa crônica aos diferentes fatores geradores de estresse e que comprometem a homeostase celular, parece estar relacionada com mudanças específicas na função mitocondrial.

Uma complexa rede de sinalização permite que a mitocôndria identifique as mudanças do meio provocando uma alteração nas respostas bioenergéticas, apoptóticas ou oxidativas. Estas alterações no funcionamento da mitocôndria têm sido reconhecidas como um componente-chave não só nesses processos neurodegenerativos crônicos, como também no processo de envelhecimento, neurotoxicidade aguda, incluindo as induzidas por agentes tóxicos endógenos como o glutamato, nos acidentes cérebro-vasculares, isquemia ou trauma (DIAS *et al.*, 2007) e erros inatos do metabolismo (LATINI *et al.*, 2007).

Luft *et al.* (1962) descreveram o primeiro caso clínico com disfunção mitocondrial, onde o defeito estava representado por um desacoplamento da respiração mitocondrial, o que significa que a transferência de elétrons através da cadeia respiratória não estava em sincronia com a síntese de ATP. Esta primeira documentação clínica permitiu abrir novos horizontes para melhor entender os mecanismos de toxicidade envolvidos em processos neurodegenerativos. Neste contexto, as principais consequências da disfunção mitocondrial parecem envolver indução de estresse oxidativo, alteração na homeostase do cálcio, apoptose e falha metabólica. Historicamente, a maior atenção tem sido dada ao estudo da expressão ou funcionamento dos componentes da cadeia respiratória. No entanto, o foco está atualmente sendo dirigido ao estudo dos efeitos do estresse oxidativo sobre a respiração mitocondrial.

A disfunção desta organela já foi demonstrada na fisiopatologia de processos neurodegenerativos crônicos, por exemplo, nas doenças de Parkinson, Huntington e de Alzheimer (LIN & BEAL, 2006).

Para mensurar a atividade das enzimas mitocondriais, utilizamos o (3-(4,5 dimethylazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide), conhecido como metiltiazol-tetrazólio (MTT), que permite medir o metabolismo celular. Baseia-se na redução deste sal por ação das succinato-desidrogenases mitocondriais, ocorrendo à formação dos cristais de formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). É um ensaio colorimétrico, onde o MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado transformando de um composto amarelo para um composto violeta (formazan). A quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior é viabilidade celular e a atividade da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983).

### 5.3.1 Ebselen

O composto Ebselen já foi relatado como agente de proteção neural apresentando ainda efeito citoprotetor em modelos *in vitro* (MULLER *et al.*, 1984; SATHEESHKUMAR & MUGESH, 2011), mostrando também proteção neuronal contra isquemia cerebral em trabalhos com humanos e animais (SATO, 2004; YOSHIKUNI, 2002). Os efeitos neuroprotetores do Ebselen

foram demonstrados em modelos de toxicidade glutamatérgica (XU *et al.*, 2006) e neurotoxicidade por exposição ao metil mercúrio (MeHg) (FARINA *et al.*, 2004).

Há demonstrações que a disfunção mitocondrial associada ao estresse oxidativo está envolvida em processos tóxicos induzidos pelo MeHg, e que o uso de compostos de Se previne estas alterações neuroquímicas (GLASER *et al.*, 2010).

Nosso trabalho mostra que o Ebselen, na concentração de 5  $\mu\text{M}$  apresenta um significativo aumento ( $p < 0,05$ ) no poder redutor mitocondrial, indicando que nesta concentração ele atuou de maneira a aumentar reações entre enzimas mitocondriais.

Sabendo que é alto o consumo de  $\text{O}_2$  pelo tecido nervoso, que a mitocôndria é a organela responsável pela respiração celular e consequentemente pela alta produção de ROS, podemos dizer de maneira hipotética que o Ebselen atuou de forma a diminuir a produção de ROS (figura 11, painel A) como já observado no ensaio de quimioluminescência deste trabalho e em conformidade com estudos de Satoh *et al.* (2004), possivelmente aumentando a ação de enzimas redutoras presentes na mitocôndria. Nas demais concentrações (0,5; 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) o Ebselen se mostrou incapaz de aumentar a atividade redutora mitocondrial.

Alterações no funcionamento desta organela têm papel importante nos processos de envelhecimento e neurodegeneração por induzir estresse

oxidativo (MARTIN, 2010), portanto Ebselen pode ser considerado um composto que protege células nervosas contra neurodegeneração e efeitos deletérios do envelhecimento.

### 5.3.2 Ácido Caféico

Diversos estudos recentes têm revelado que além da atividade antioxidante apresentada pelos polifenóis, estes compostos uma vez presentes em sistema biológicos, podem possuir outros mecanismos de ação. Galati & O'Brien (2004) relataram toxicidade mitocondrial associada a uma capacidade dos polifenóis em promover o colapso do potencial da membrana mitocondrial. Já Skibola (2000), descreve a habilidade de flavonóides em inibir enzimas associadas ao DNA, como por exemplo, a topoisomerase.

Apesar da toxicidade mitocondrial estar associada a uma atividade anticarcinogênica (alterações na permeabilização da membrana mitocondrial estão relacionadas à promoção de apoptose, sendo que a indução da apoptose por sua vez, suprime o desenvolvimento do câncer), os comportamentos acima descritos abrem espaço para uma melhor avaliação do potencial tóxico dos mesmos. Neste sentido, curiosamente compostos fenólicos podem ser ambos antioxidantes ou pró-oxidantes, visto que podem trazer prejuízos à mitocôndria, o que sugere que uma dieta rica em flavonóides e outros polifenóis pode se constituir tanto em um risco oxidativo quanto em benefício (DECKER, 1997).

Entretanto, como visto em nosso estudo de quimioluminescência com AC (figura 12, painel A), o mesmo mostrou comportamento antioxidante, havendo maior redução de ROS quanto maior a concentração empregada, embora, como citados acima, vários autores questionam a ação benéfica do AC em nível mitocondrial. Nosso trabalho mostrou que, em descontrao com o que foi exposto pela literatura, o AC apresentou ação antioxidante possivelmente por aumentar a atividade de enzimas mitocondriais nas concentrações de 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ , significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (células não tratadas com AC), em células Neuro-2A (figura 18). Na concentração de 500  $\mu\text{M}$  não apresentou poder redutor mitocondrial, o que poderia sugerir que nesta concentração o AC não reage de maneira eficiente com as enzimas mitocondriais, entretanto, sem causar prejuízos às células (compartimento mitocondrial) como também está em conformidade com os nossos resultados da ação do AC no teste de viabilidade pela incorporação do Vermelho Neutro, onde o mesmo não diminuiu a viabilidade, inferindo então que não foi lesivo em relação a membranas.

### **5.3.3 Memantina**

Influxo de cálcio mitocondrial é uma das causas mais comuns de danos à essa organela pela geração de ROS. Os níveis aumentados de cálcio mitocondrial podem inibir o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, ou ainda ativar enzimas chave responsáveis pela geração de ROS (KUMARAN &

PRINCE, 2010). Este fenômeno foi primeiramente caracterizado por Haworth & Hunter, em 1979, onde os autores sugerem que o fato poderia ser resultado da abertura de um poro na membrana mitocondrial externa.

O cálcio está envolvido em diversos processos celulares tais como: liberação pré-sináptica de neurotransmissores, ativação de enzimas, controle da abertura de canais e regulação da expressão gênica. Entretanto, em condições excessivas, o cálcio pode promover morte celular por apoptose. O aumento da concentração de cálcio citoplasmático, sustentada por uma abertura duradoura do canal de NMDA, deflagra o processo excitotóxico por diferentes vias intracelulares que podem envolver a ativação de lipases e proteases intracelulares, despolarização da membrana da mitocôndria e consequentemente aumento da geração de radicais livres (BEAR *et al.*, 2006; SEN *et al.*, 2008).

Nosso trabalho foi verificar se células N-2A quando pré-tratadas com Memantina nas concentrações 0,5; 1; 10 e 50  $\mu\text{M}$  apresentariam um aumento no poder redutor mitocondrial. O fato se confirma como pode ser observado na figura 19, onde nas concentrações 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na ativação de enzimas mitocondriais, conferindo à Memantina ação antioxidante nestas concentrações, entretanto, nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$ , apesar de haver uma tendência ao aumento, esta não se mostrou significativa quando comparadas ao controle (células N-2A não tratadas com Memantina). Podemos sugerir então, que a Memantina nas concentrações

mais baixas possivelmente pode ter agido de maneira a diminuir o excesso de influxo de cálcio e conseqüentemente aumentando o poder redutor mitocondrial.

Sabendo que o influxo de cálcio através de canais voltagem-dependentes não apresenta excitotoxicidade aos neurônios, mas sim o influxo deste íon através de receptores NMDA (ativados pelo excesso de glutamato), podemos aludir que a Memantina atuou de maneira a impedir o influxo em excesso de cálcio através destes receptores (NMDA), bloqueando então, o efeito nocivo deste íon ativado pelo excesso de glutamato, nas concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ . Na concentração de 10  $\mu\text{M}$  possivelmente não houve bloqueio do influxo excessivo (visto que o poder redutor mitocondrial não foi estatisticamente maior que o do controle), e na maior concentração utilizada no estudo (50  $\mu\text{M}$ ), embora também não tenha apresentado um aumento no poder redutor mitocondrial, mostrou uma ação pró-oxidante ao ensaio de quimioluminescência (figura 13, painel A). Nesta concentração (50  $\mu\text{M}$ ) a Memantina não apresentou aumento nem diminuição do poder redutor mitocondrial, embora tenha mostrado um aumento na produção de ROS.

## 6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que as substâncias Memantina, Ácido Caféico e Ebselen, apesar de apresentarem aumento do poder redutor mitocondrial, podem exercer, em culturas de células neuronais, tanto efeito antioxidante quanto pró-oxidante, dependendo da concentração empregada. Ressaltando que estas substâncias devem ser utilizados com cautela, pois, em alguns casos, podem trazer prejuízos causados pelo aumento na produção de ROS.

## 7 PERSPECTIVAS

Nosso trabalho abre um campo de estudo no sentido de verificarmos se este efeito dual observado em substâncias sabidamente antioxidantes é proveniente de alterações metabólicas. Neste contexto, temos como perspectivas :

- Aprofundar nossos estudos em nível molecular;
- Verificar se este efeito dual seria capaz de alterar o balanço anti e pró-inflamatório;
- Verificar a participação dos canais de cálcio no perfil antioxidante da Memantina;
- Verificar se este efeito antioxidante de Ácido Caféico envolveria a participação de óxido nítrico, constatando uma atividade neuroprotetora a esta molécula.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, I.; BOSE, S. K.; PAVESE, N.; RAMLACKHANSINGH, A.; TURKHEIMER, F.; HOTTON, G.; HAMMERS, A.; BROOKS, D. J. Glutamate NMDA receptor dysregulation in Parkinson's disease with dyskinesias. **Brain: A Journal of Neurology**. v. 134, p. 979–986, 2011.

AMAZZAL, L.; LAPOTRE, A.; QUIGNON, F.; BAGREL, D. Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2A cells. **Neuroscience Letters**. v. 418, p. 159-164, 2007.

AMORATI, R.; PEDULLI, G. F.; CABRINI, L.; ZAMBONIN, L.; LANDI, L. Solvent an pH effects on the antioxidants activity of caffeic and other phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2932-2937, 2006.

ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature**, v. 10, p. 18-25, 2004.

ARTHUR, J. R. The glutathione peroxidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 1825-1835, 2000.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2101-2103, 1991.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, p. 1352-1360, 2006.

BASTA-KAIM, A.; BUDZISZEWSKA, B. JAWORSKA-FEIL, L.; TETICH, M.; KUBERA, M.; LESKIEWIC, M.; OTCZYK, M.; LASON, W. Antipsychotic drugs inhibit the human corticotropin-releasing-hormone gene promoter activity in

Neuro-2A cells – an involvement of protein kinases. **Neuropsychopharmacology** v. 31, p. 853-865, 2006.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: Desvendando o sistema nervoso**. 2 ed. Artmed, Porto Alegre, 2006.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. p. 1114, 2008.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIROSOVÁ, L.; MIKULÁSOVÁ, M.; VAVERKOVÁ S. Antimutagenic effect of phenolic acids. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, v. 149, p. 489-491, 2005.

BLANCHARD, A. P.; GUILLEMETTE, G.; BOULAY, G. Memantine potentiates agonist-induced Ca<sup>2+</sup> Responses. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 22, p. 205-214, 2008.

BODNER, R. A.; HOUSMAN, D. E.; KAZANTSEV, A. G. New directions for neurodegenerative disease therapy: Using chemical compounds to boost the formation of mutant protein inclusions. **Cell Cycle**, v. 5, p. 1477-1480, 2006.

BORGES, V. C.; ROCHA, J. B. T.; NOGUEIRA, C. W. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rats. **Toxicology**, v. 25, p. 191-197, 2005.

CALDERÓN, F. H.; BONNEFONT, A.; MUÑOZ, F. J.; FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L. A.; INESTROSA, N. C. PC12 and Neuro 2A have different susceptibilities to acetylcholinesterase – amyloid complexes, amyloid fragment, glutamate and hydrogen peroxide. **Journal of Neuroscience Research**. v. 56, p. 620-631, 1999.

CENTURIÃO, F. B.; CORTE, C. L. D.; PAIXÃO, M. W.; BRAGA, A. L.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; ROCHA, J. B. T. Effect of ebselen and organochalcogenides on excitotoxicity induced by glutamate in isolated chick retina. **Brain Research**, v. 1039, p.146-152, 2005.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-1264, 1996.

CHAVES, M. M.; COSTA, D. C.; SOUZA, D. A. C.; LIMA e SILVA, F. C.; NOGUEIRA-MACHADO. Correlation between ros production and insp3 released by granulocytes from type 1 diabetic patients in a camp-dependent manner. **Current Aging Science**, v. 1, p. 51-55, 2008.

COSTA, R. A. P.; ROMAGNA, C. D.; PEREIRA, J. L.; SOUZA-PINTO, N. C. The role of mitochondrial DNA damage in the citotoxicity of reactive oxygen species. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 25-29, 2011.

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

DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Letters**. v. 369, p. 131-135, 1995.

DAWSON, D. A.; MASAYASU, H.; GRAHAM, D. I.; MACRAE I. M. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 185, p. 65-69, 1995.

DECKER, E. A. Phenolics: pro-oxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, p. 396-407, 1997.

DEMENTIA WEEKLY. Support & insight for the autumn of life. Disponível em: <http://alzheimersweekly.com/content/oxidative-stress-alzheimers-basics>. Acesso em: 26 dez 2011.

DIAS, C. P.; LIMA, M. N. M.; TORRES, J. P.; DORNELLES, A.; GARCIA, V. A.; SCALCO, S. F.; GUIMARÃES, M. R.; CONSTANTINO, L.; BUDNI, P.; DAL-PIZZOL, F.; SCHRÖDER, N. Memantine reduces oxidative damage and enhances Long-term recognition memory in aged rats. **Neuroscience**, v.146, p. 1719-1725, 2007.

FARINA, M.; SOARES, F. A.; ZENI, G.; SOUZA, D. O.; ROCHA J. B. Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. **Toxicology Letters**, v. 146, p. 227-235, 2004.

FERREIRA, I. L.; RESENDE, R.; FERREIRO, E.; REGO, A. C.; PEREIRA, C. F. Multiple defects in energy metabolism in Alzheimer's disease. **Current Drugs Targets**, v. 11, p. 1193-1206, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FLORES, E. M.; CAPPELARI, S. E.; PEREIRA, P.; PICADA, J. N. Effects of memantine, a non-competitive n-methyl-d-aspartate receptor antagonist, on genomic stability. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 413-417, 2011.

FLOYD, R. A.; HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiology Aging**, v. 23, p. 795-807, 2002.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico na doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.32, p. 137-148, 2005.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, p.171-177, 2006.

FREENEY, C. J.; STYS, P. K. Astrocyte injury. **Neuroglia**. Universuty Press, 2005.

FRESHNEY, I. R. Culture of animal cells. **A Manual of Basic Technique**, 3 ed, 1994.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p.1203-1209, 1998.

FRIGUET B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. **F. E. B. S. Letters**. v. 580, p. 2910-2916, 2006.

FÜRSTENAU, C. R.; SPIER, A. P.; RÜCKER, B.; BERTI, S. L.; BATTASTINI, A. M. O.; SARKIS, J. J. F. The effect of ebselen on adenine nucleotide hydrolysis by platelets from adult rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 30, p. 93-99, 2004.

GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**. v. 63, p.189, 2003.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. Potential toxicity of flavonoids and otyher dietary phenolics : significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, p. 287-303, 2004.

GAMARO, G. D.; SUYENAGA, E.; BORSOI, M.; LERMEN, J.; PEREIRA, P.; ARDENGHI, P. Effect of Rosmarinic and Caffeic Acids on Inflammatory and Nociception Process in Rats, **Pharmacology**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v.18, p. 229-235, 2007.

GLASER, V.; NAZARI, E. M.; MÜLLER, Y. M.; FEKSA, L.; WANNMACHER, C. M.; ROCHA, J. B.; DE BEM, A. F.; FARINA, M.; LATINI, A. Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, p. 631-637, 2010.

GIBSON, G. E.; HUANG, H. M. Oxidative stress in Alzheimer disease. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p. 575-578, 2005.

GRIJALBA, M. T.; VERCESI, A. E.; SCHEREIER, S. Ca<sup>2+</sup> -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanisms Ca<sup>2+</sup> -stimulated generation of reactive species by the respiratory chain. **Biochemistry**, v. 38. p 13279-13287, 1999.

GUÉRIN, P. J.; GAUTHIER, E. R. Induction of cellular necrosis by the glutathione peroxidase mimetic ebselen. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 89, p. 203-211, 2003.

GUPTA, A.; BISHT, B.; DEY, C. S. Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. **Neuropharmacology**. v. 60, p. 910-920, 2011.

GUTTERIDGE, J. M. Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increase effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. **Biochemical Journal**, v. 243, p. 709-714, 1987.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. **Nutrition Reviews**. v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**. v.16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemistry society transactions**. v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I.; **Food and Chemical Toxicology**. v.33, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemistry Journal**. v. 219, p. 1-14, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. Oxford University Press, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, 4 ed, p. 851, 2007.

HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **The Journal of Gerontology**. v.11, p. 298-300, 1956.

HARMAN, D. The aging process. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 78, p. 7124-7128, 1981.

HARMAN, D. The free radical theory of aging. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 5, p. 557-561, 2003.

HAWORTH, R. A.; HUNTER, D. R. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II: Nature of Ca<sup>2+</sup> trigger site. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 195, p. 460-467, 1979.

HERIN, G. A.; DU, S.; AIZENMAN, E. The neuroprotective agent ebselen modifies NMDA receptor function via the redox modulatory site. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, p. 1307-1314, 2001.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. **Funcional Metabolism: Regulation and Adaptation**, cap. 13, p. 369-382, 2004.

HIRONISHI, M.; KORDEK, R.; YANAGIHARA, R.; GARRUTO, R. M. Maltol (3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) toxicity in neuroblastoma cell lines and primary murine fetal hippocampal neuronal cultures. **Neurodegeneration**. v. 5, p. 325-329, 1996.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade, 1980 – 2050**, Rio de Janeiro, revisado em 2008.

IMAI, H.; GRAHAM, D. I.; MASAYASU, H.; MACRAE, I. M. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, p. 56-63, 2003.

JEONG, C. H.; JEONG, H. R.; CHOI, G. N.; KIM, D. O.; LEE, U.; HEO, H. J. Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. **Chinese Medicine**, v. 6, p. 1-9, 2011.

JONES, D. P. Extracellular Redox State: Refining the Definition of Oxidative Stress in Aging. **Rejuvenation Research**, v. 9, p. 169-181, 2006.

KANG, N. J.; LEE, K. W.; JUNG, S. K.; HWANG, M. K.; BODE, A. M. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. **Carcinogenesis**, v. 30, p. 321-330, 2009.

KIRKHAM, P.; RAHMAN, I. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p. 476-494, 2006.

KLEBE, R. J.; RUDDLE, F. H. Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. **The Journal of Cell Biology**, v. 43, p. 69, 1969.

KOIZUMI, H.; FUJISAWA, H.; SUEHIRO, E.; SHIRAO, S.; SUZUKI, M. Neuroprotective effects of Ebselen following forebrain ischemia: involvement of glutamate and nitric oxide. **Neurol Med Chir**, v. 51, p. 337-343, 2011.

KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A.; SAWA, Y. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1335, p. 335-342, 1997.

KONOPKA, K.; PRETZER, E.; FELGNER, P.L.; DUZQUNES, N. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1312, p.186-196, 1996.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 495, p. 15-15, 2001.

KUMARAN, K. S.; PRINCE, P. S. N. Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage. **Cells Stress and Chaperones**, v. 15, p. 791-806, 2010.

LATINI, A.; FERREIRA, G. C.; SCUSSIATO, K.; SCHUCK, P. F.; SOLANO, A. F.; DUTRA-FILHO, C. S.; VARGAS, C. R.; WAJNER, M. Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 27, p. 423-438, 2007.

LEE, W. J.; ZHU, B. T. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. **Carcinogenesis**, v, 27, p. 269-277, 2006.

LI, Y.; CAO, Z. The neuroprotectant ebselen inhibits oxidative DNA damage induced by dopamine in the presence of copper ions. **Neuroscience Letters**, v. 330, p. 69-73, 2002.

LIMA-COSTA, M. F.; VERAS, R. Envelhecimento e saúde pública. **Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro**, v. 19, p. 700-701, 2003.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 44, p. 787-795. 2006.

LOURENÇO, C. C. L. A escrita de narrativas autobiográficas no processo de envelhecimento. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 15, 2010.

LUFT, R.; IKKOS, D.; PALMIERI, G.; ERNSTER, L.; AFZELIUS, B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. **Journal of Clinical Investigation**, v. 41, p. 1776-1804, 1962.

MAIORINO, R. M.; WEBWR, G. L.; APOSHIAN, H. V. Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51). **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 2267-2271, 1988.

MAISTRO, E. L.; ANGELI, J. P. F.; ANDRADE, S. F.; MANTOVANI, M. S. *In vitro* genotoxicity assessment of caffeic, cinnamic and ferulic acids. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 1130-1140, 2011.

MAGALHÃES, J. P.; CHURCH, G. M. Cells discover fire: employing reactive oxygen species in development and consequences of aging. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 1-10, 2005.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MARTIN, L. J. Mitochondrial and cell death mechanisms neurodegenerative diseases. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 839-915, 2010.

McALLISTER, J.; GHOSH, S.; BERRY, D.; PARK, M.; SADEGHI, S.; WANG, K. X.; PARKER, W. D.; SWERDLOW, R. H. Effects of memantine on mitochondrial function. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 956-964, 2008.

McCLEARN, G. E. Biogerontologic Theories. **Experimental Gerontology**, v. 2, p. 3-10, 1997.

McKUBREY, J. A.; LAHAIR, M. M.; FRANKLIN, R. A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, 1775-1789, 2006.

MEDVEDEV, Z. A. An attempt at a rational classification of theories of aging. **Biological Reviews**, v. 65, p. 375-398, 1990.

MELO, P. S. **Pigmentos obtidos *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens*, propriedade tripanocida da prodigiosina e estudos toxicológicos.** 92 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

MILLER, C. C. J., ACKERLEY, S., BROWNLEES, J., GRIERSON, A. J., JACOBSEN, N. J. O. e THORNHILL, P. Axonal transport of neurofilaments in

normal and disease states. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 323-330, 2002.

MISHRA, M. K.; GHOSH, D.; DUSEJA, R.; BASU, A. Antioxidant potential of Minocycline in Japanese Encephalitis Virus infection in murine neuroblastoma cells: Correlation with membrane fluidity and cell death. **Neurochemistry International**, v. 54, p. 464-470, 2009.

MONTERA, V. S. P. Benefícios dos Nutrientes Antioxidantes e seus Cofatores no Controle do Estresse Oxidativo e Inflamação na Insuficiência Cardíaca. **Revista da SOCERJ**, v. 20, p. 19-27, 2007.

MORETTO, M. B.; FUNCHAL, C.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; PUREUR-PESSOA, R. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. **Toxicology**, v. 210, p. 213-222, 2005.

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

MOTAWAJ, M.; BURBAN, A.; DAVENAS, E.; ARRANG, J. M. Activation of brain histaminergic neurotransmission: A mechanism for cognitive effects of memantine in Alzheimer's disease. **The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**. v. 336, p. 479-487, 2011.

MUGESH, G.; DU MONT, Mont W. W.; SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 2125-2179, 2001.

MULLER, A., CADENAS, E.; GRAF, P.; SIES, H. A novel biologically active seleno-organic compound-I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and

antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). **Biochemical Pharmacology**, v. 33, p. 3235-3239, 1984.

NAKAYAMA, T. Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. **Cancer Research**, v. 54, p. 1991-1993, 1994.

NAMURA, S.; NAGATA, I.; TAKAMI, S.; MASAYASU, H.; KIKUCHI, H. Ebselen reduces cytochrome c release from mitochondria and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. **Stroke**, v. 32, p. 1906-1911, 2001.

NARDINI, M.; D'AQUINO, M.; TOMASSI, G.; GENTILI, V.; DI FELICE, M.; SCACCINI, C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, p. 541-542, 1995.

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: a review. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 115-141, 2008.

NOGUEIRA, C. W.; ROTTA, L. N.; ZENI, G.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. T. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. **Neurochemistry Research**, v. 27, p. 283-288, 2002.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 6255-6285, 2004.

NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; LIMA e SILVA, F. C.; CUNHA, E. P.; CALSOLARI, M. R.; COSTA, D. C.; PEROLO, C. S.; HORTA, B. C.; FERREIRA, I. C.; CHAVES, M. M. Modulation of the production of reactive oxygen species (ROS) by cAMP-elevating agents in granulocytes from diabetic

patients: na Akt/PKB-dependent phenomenon. **Diabetes & Metabolism**, v. 32, p. 331-335, 2006.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p.1287-1312, 2001.

NOVELLI, E. L. B. Nutrição e vida saudável: estresse oxidativo e metabolismo energético. **Tecmed**, p. 288, 2005.

OLIVEIRA, B. F.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CHAVES, M. M. The role of oxidative stress in the aging process. **The Scientific World Journal**, v. 10, p. 1121-1128, 2010.

OLMSTED, J. B.; CARLSON, K.; KLEBE, R.; RUDDLE, F.; ROSENBAUM, J. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 65, p. 129-136, 1970.

PAOLETTI, P.; NEYTON, J. NMDA receptor subunits: Function and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 39-47, 2007.

PAPP, L. V.; LU J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, p. 775-806, 2007.

PATEL, L.; GROSSBERG, G. T. Combination Therapy for Alzheimer's Disease. **Drugs Aging**, v. 28, p. 539-546, 2011.

PICADA, J. N.; KERN, A. L.; RAMOS, A. L. L. P.; SAFFI, J. O Estresse Oxidativo e as Defesas Antioxidantes. **Genética Toxicológica**, p. 251-268, 2003.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PORCIÚNCULA, L. O. **Derivados da guanina e ebselen: Mecanismos de neuroproteção envolvendo o sistema glutamatérgico.** Porto Alegre: UFRGS 2003, 112p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

PORCIÚNCULA, L. O.; ROCHA, J. B. T.; BOECK, D.; VENDITE, D.; SOUZA, D. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. **Neuroscience Letters**, v. 299, p. 217-220, 2001.

RAMMSAYER, T.H. Effects of pharmacologically induced changes in NMDA-receptor activity on long-term memory in humans. **Learn. Mem.** v. 8, p. 20-5, 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIZZO, A. M.; BERSELLI, P.; ZAVA, S.; MONTORFANO, G.; NEGRONI, M.; CORSETTO, P.; BERRA, B. Endogenous antioxidants and radical scavengers. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 698, p. 52-67, 2011.

ROGAWSKI, M.A.; WENK, G.L. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. **CNS Drug Rev**, v. 3, p. 275-308, 2003.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; TAMIKO, I. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.

ROSSATO, J.; KETZER, L.; CENTURIÃO, F.; SILVA, S.; LUDTKE, D.; ZENI, G.; BRAGA, A. L.; RUBIN, M.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochemical Research**, v. 27, p. 297-303, 2002.

ROZAS, E. E.; FREITAS, J. C. Intracellular Increase of Glutamate in Neuroblastoma Cells Induced by Polar Substances of *Galaxaura Arginata* (Rhodophyta, Nemaliales). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 53-62, 2008.

SAFT, C.; EPPLEN, J. T.; WIECZOREK, S.; LANDWEHRMEYER, G. B.; ROOS, R. A.; YEBENES, J. G.; DOSE, M.; TABRIZI, S. J.; CRAUFURD, D. NMDA receptor gene variations as modifiers in Huntington disease: a replication study. **PLoS Currents**. v. 3, 2011.

SAITO, L.; ASANO, T.; SANO, K.; TAKAKURA, K.; ABE, H.; YOSHIMOTO, T.; KIKUCHI, H.; OHTA, T.; ISHIBASHI, S. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurismal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery**, v. 42, p. 269-278, 1998.

SATOH, T.; ISHIGE, K.; SAGARA, Y. Protective effects on neuronal cells or mouse afforded by ebselen against oxidative stress at multiple steps. **Neuroscience Letters**, v. 371, p. 1-5, 2004.

SATHEESHKUMAR, K.; MUGESH, G. Synthesis and antioxidant activity of peptide-based ebselen analogues. **Chemistry – A European Journal**. v. 17, p. 4849-4857, 2011.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. Supplement, p. 2073-2085, 2000.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen – an antiinflammatory antioxidant. **General Pharmacology**, v. 26, p. 1153-1169, 1995.

SEN, I.; JOSHI, D. C.; JOSHI, P. G.; JOSHI, N. B. NMDA and non-NMDA receptor-mediated differential  $\text{Ca}^{2+}$  load and greater vulnerability of motor neurons in spinal cord cultures. **Neurochemistry International**, v. 52, p. 247-255, 2008.

SHIH, P. H.; WU, C. H.; YEH, C. T.; YEN, G. C. Protective effects of anthocyanins against amyloid  $\beta$ -peptide-induced damage in neuro-2A cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1683-1689, 2011.

SIES, H. Strategies of Antioxidant Defenses. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SKIBOLA, C. F. E.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 375-383, 2000.

SPINDLER, P.; SJOBERG, P.; KNUDSEN L. E. First exposure in man: toxicological considerations. **Pharmacology & Toxicology**, v. 86, p. 8-12, 2000.

SPIRDUSO, W. W., FRANCIS, K. L., MACRAE, P. G. Physical Dimensions of Aging. **Human Kinetics**, 2 ed. 2005.

TERRY, N.; ZAYED, A. M.; SOUZA, M. P.; TARUN, A. S. Selenium in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 51, p. 401-432, 2000.

TUCKMANTEL, W.; KOZIKOWSKI, A. P.; ROMANCZYK Jr., L. J. Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 1. Preparation of building blocks from (+)-catechin. Procyanidin formation. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor, 3-*O*-Galloyl-(2*R*,3*R*)-epicatechin-4 $\beta$ ,8-[3-*O*-galloyl-(2*R*,3*R*)-epicatechin]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 12073-12081, 1999.

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. Free radicals, metals, and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO-Jr, A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Nutrição Clínica**, cap. 3, p. 31-44, 1998.

VENDELBO, M. H.; NAIR, K. S. Mitochondrial longevity pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 634-644, 2011.

VIÑA, J.; BORRÁS, C.; MIQUEL, J. Theories of ageing. **IUBMB Life**, v. 59, p. 249-254, 2007.

VISIOLI, F.; KEANEY Jr., J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease: panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 409, 2000.

XU, J. H.; HU, H. T.; LIU, Y.; QIAN, Y. H.; LIU, Z. H.; TAN, Q. R.; ZHANG, Z. J. Neuroprotective effects of ebselen are associated with the regulation of Bcl-2 and Bax proteins in cultured mouse cortical neurons. **Neuroscience Letters**, v. 399, p. 210-214, 2006.

WANG, X.; SU, B.; ZHENG, L.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; ZHU, X. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, p. 153-159, 2009.

YANG, C. S. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review and Nutrition**, v. 21, p. 381-406, 2001.

YAP, L. P.; GARCIA, J. V.; HAN, D.; CADENAS, E. The energy-redox in aging and age-related neurodegeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1283-1298, 2009.

YOSHIZUMI, M.; KOGAME, T.; SUZAKI, Y.; FUJITA, Y.; KYAW, M.; KIRIMA, K.; ISHIZAWA, K.; TSUCHIYA, K.; KAGAMI, S. Ebselen attenuates oxidative stress-induced apoptosis via the inhibition of the c-Jun N-terminal kinase and activator protein-1 signalling pathway in PC12 cells. **British Journal of Pharmacology**. v. 136, p. 1023-1032, 2002.

ZHAO, M.; ANTUNES, F.; EATON, J. W.; BRUNK, U. T. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 18, p. 3778-3786, 2003.

ZHAO, R.; HOLMGREN, A. A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 39456-39462, 2002.

ZHOU, J.; WANG, H.; FENG, Y. e CHEN, J. Increased expression of cdk5/p25 in N2A cells leads to hyperphosphorylation and impaired axonal transport of neurofilament proteins. **Life Sciences**. v. 86, p. 532-537, 2010.