



Vanessa Nobre Corceiro

# Study of the Impact of Pollutant Compounds and Oxidative Stress in Human Health

Dissertação de Mestrado em Química Farmacéutica Industrial orientada pelo Professor  
Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e pela Professora Doutora Rosa M. Quinta-Ferreira  
e apresentada na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Vanessa Nobre Corceiro

# Estudo do Impacto de compostos poluentes e do stress oxidativo na saúde humana

Dissertação de Mestrado em Química Farmacéutica Industrial orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e pela Professora Doutora Rosa M. Quinta-Ferreira e apresentada na Faculdade de Farmácia da  
Universidade de Coimbra

Setembro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



## **Agradecimentos**

A defesa da minha dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial representa uma conquista. Graças a mim e aos que me acompanharam dou por terminada mais uma fase essencial para o meu ser profissional e pessoal. Deste modo, agradeço a todos os que se cruzaram na minha vida ao longo destes anos.

Agradeço ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador, meu orientador da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade, apoio e críticas construtivas ao longo deste trabalho.

À Professora Doutora Rosa M. Quinta-Ferreira, minha orientadora da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, pela boa disposição, apoio e ensinamentos prestados, essenciais na realização deste projeto.

Um agradecimento especial à Professora Doutora M. Emília Quinta-Ferreira pelo acolhimento inigualável no seu grupo de trabalho. Agradeço ainda por todos os ensinamentos fundamentais prestados, pela paciência e dedicação ao longo deste ano.

Ao Professor Doutor Carlos Matias pela disponibilidade e apoio em todas as fases deste trabalho.

Aos Professor Doutor Paulo Mendes, Professor Doutor Fernando Sampaio dos Aídos pela colaboração essencial.

Um reconhecimento excecional às minhas colegas de laboratório, Fátima Bastos e Sandra Lopes pelo companheirismo, boa disposição e disponibilidade.

Aos meus pais e irmã, pelo apoio financeiro e emocional essenciais para o terminar desta fase.

Um último agradecimento, ao Hugo Ribeiro pela dedicação, paciência e amor que tornaram os dias árduos e intermináveis em fáceis conquistas.

## Resumo

Atualmente, as doenças neurodegenerativas como a isquemia cerebral, Alzheimer e Parkinson atacam em massa a população mundial. O acréscimo destas patologias crê-se estar relacionado com falhas na homeostase de zinco e de espécies reativas de oxigénio (ROS) no sistema nervoso central. Neste trabalho questões desta natureza foram investigadas nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo de rato.

Os estudos foram efetuados em fatias cerebrais utilizando sondas fluorescentes de zinco e de espécies reativas de oxigénio. Sinais intracelulares de zinco foram medidos utilizando o indicador Newport Green na forma permeante, que não complexa o zinco presente nas vesículas sinápticas e que é co-libertado com o glutamato. As variações de zinco foram induzidas por meio de despolarizações com KCl ou usando um meio extracelular com TEA e rico em cálcio. No primeiro caso verificou-se um aumento significativo dos sinais de fluorescência de zinco. Os resultados obtidos usando antagonistas de recetores de glutamato e um bloqueador de canais de cálcio dependentes do potencial, indicam que aqueles sinais têm origem na zona pós-sináptica.

No meio com TEA e muito cálcio, usado para induzir quimicamente a potenciação de longa duração, que se considera representar uma forma de memorização ao nível celular, verificou-se uma diminuição reversível da intensidade de fluorescência. Este facto pode ser devido à activação, pelo zinco libertado, de canais de K/ATP pré-sinápticos, o que origina a hiperpolarização da membrana e uma diminuição na libertação de zinco.

Alterações na formação de espécies reativas de oxigénio foram estudadas, por meio da sonda H<sub>2</sub>DCFDA permeante, que é sensível essencialmente aos radicais hidroxilo e peróxido de hidrogénio. Os resultados obtidos, induzidos de forma semelhante aos de zinco, têm dum modo geral um comportamento idêntico ao destes sinais

Inúmeros avanços na indústria e na medicina prometem melhorias ao nível das patologias anteriormente mencionadas e outras. No entanto, existe o reverso da moeda, o aumento da industrialização e de fármacos disponíveis provoca um aumento da poluição em efluentes e águas residuais, tendo em conta que os processos usados nas estações de tratamento não são totalmente eficazes.

O sulfametoxazole (SMX) é um antibiótico largamente utilizado, que não é totalmente metabolizado pelo organismo, tendo por isso vindo a ser detetado em águas residuais. Os sinais de zinco medidos aumentam quando as fatias são expostas a esta sulfonamida, voltando ao nível inicial após a mudança para o meio extracelular normal.

O efeito do sulfametoxazole nas espécies reativas de oxigénio também foi testado, tendo-se verificado um aumento daquelas espécies na presença de SMX. Os resultados mostram que a ação deste antibiótico não é reversível, por este motivo, as quantidades ambientais de SMX nas águas residuais assumem uma preocupação crescente. A observação de efeitos irreversíveis na formação de espécies reactivas de oxigénio durante actividade neuronal intensa, sugere que aquele fármaco pode contribuir para diversas patologias neurodegenerativas.

## **Abstract**

Currently, neurodegenerative diseases such as cerebral ischemia, Alzheimer's and Parkinson's mass attack the world population.

The increase of these diseases is believed to be related to failures in the homeostasis of zinc and of reactive oxygen species in the central nervous system. In this work such issues have been investigated in the mossy fiber synapses from area CA3 of the rat hippocampus.

The studies were performed in brain slices using fluorescent probes of zinc and of reactive oxygen species. Intracellular zinc signals were measured using the indicator Newport Green in the permeant form, that does not complex the zinc present in the synaptic vesicles which is co-released with glutamate.

The zinc changes were induced by KCl depolarization or applying an extracellular medium containing TEA and rich in calcium. In the first case a significant increase of the fluorescence zinc signals was observed. The results obtained using antagonists of glutamate receptors and one blocker of voltage-dependent calcium channels, indicate that those signals have a postsynaptic origin.

In the medium containing TEA and high calcium, used to chemically induce long-term potentiation, which is considered to represent a way of memory formation at the cellular level, a reversible decrease of the fluorescence intensity was observed. This fact may be due to the activation, by released zinc, of presynaptic K / ATP channels, which leads to membrane hyperpolarization and to a decrease in zinc release.

Changes in the formation of reactive oxygen species were studied by means of the permeant H<sub>2</sub>DCFDA probe, which is specially sensitive to the hydroxyl and hydrogen peroxide radicals. The results, induced in a similar way as for zinc, have in general an identical behaviour to that of these signals.

Numerous advances in industry and medicine promise improvements in the above mentioned pathologies and others. However, there is the reverse of the coin, the increasing industrialization and availability of drugs results in increased pollution in waste waters and effluents, since the processes used in water treatment plants are not entirely effective.

Sulfamethoxazole (SMX) is a widely used antibiotic, which is not fully metabolized by the organism and, for this reason, is being detected in wastewaters. The measured zinc signals increase when the slices are exposed to this sulfonamide, returning to the initial level after changing to the normal extracellular medium.

The effect of sulfamethoxazole in reactive oxygen species was also tested, having been observed an increase of those species in the presence of SMX. The results show that the action of this antibiotic is not reversible, therefore, their environmental quantities in wastewaters are of growing concern. The observation of irreversible effects on the formation of reactive oxygen species during intense neuronal activity, suggests that that pharmaceutical agent may contribute to various neurodegenerative pathologies.



## Índice

I. Introdução .....	1
I.1 Anatomia do hipocampo .....	1
I.2. Sinapses químicas .....	2
I.2.1 Neurotransmissores excitatórios .....	3
I.2.2 Neurotransmissores inibitórios.....	4
I.2.3. Características da LTP .....	4
I.3. Zinco.....	6
I.4. Oxigénio; propriedades físico-químicas .....	8
I.4.1 Espécies reactivas de oxigénio.....	9
I.4.2 Formação de especies reativas de oxigénio .....	13
I.4.3 Stress oxidativo .....	14
I.5. Stress oxidativo e zinco .....	15
I.6. Sulfametoxazol.....	16
I.7. Indicadores fluorescentes de ROS e de zinco.....	18
I.7.1 H <sub>2</sub> DCFDA.....	18
I.7.2 Newport Green DCF .....	18
2. Estado de Arte.....	20
2.1 O zinco a nível neuronal.....	20
2.2 O impacto do stress oxidativo no cérebro .....	23
2.3 Estudo da LTP no hipocampo.....	25
2.4 O antibiótico sulfametoxazole .....	30
3. Materiais e Métodos.....	33
3.1 Deteção dos sinais ópticos.....	33
3.1 Dissecção e obtenção das fatias do hipocampo.....	34
3.3.1 Medição de sinais de zinco.....	35
3.3.2 Obtenção de sinais de ROS.....	35
3.4 Análise de dados .....	36
3.5 Soluções .....	37
3.6 Produtos químicos utilizados.....	39
4. Resultados.....	40
4.1 Fluorescência basal na área CA3 do hipocampo .....	40

4.2 Sinais obtidos em fatias incubadas com Newport green .....	41
4.2.1. Efeito do KCl em sinais de zinco .....	41
4.2.2 Impacto de ACSF modificada em sinais de zinco .....	45
4.2.3 Efeito do antibiótico sulfametoxazole em sinais de zinco obtidos com NG.....	46
4.3 Sinais obtidos em fatias incubadas com o indicador de ROS H <sub>2</sub> DCFDA.....	47
4.3.1 Sinais de ROS obtidos com H <sub>2</sub> DCFDA em fatias não oxigenadas .....	47
4.3.2 Valores de fluorescência de ROS em fatias expostas a ACSF modificada .....	48
4.3.3 Efeito de sulfametoxazole em fatias incubadas com H <sub>2</sub> DCFDA .....	49
5. Discussão.....	51
6. Conclusões e Perspetivas futuras.....	55
6.1 Conclusões .....	55
6.2 Perspetivas futuras.....	55
7. Bibliografia.....	57

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1-</b> Anatomia do Hipocampo.....	1
<b>Figura 1.2-</b> Sinais elétricos associados com a LTP e a LTD.....	5
<b>Figura 1.3-</b> Sinapse química das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo.....	7
<b>Figura 1.4-</b> Representação da orbital molecular do oxigénio atmosférico.....	8
<b>Figura 1.5-</b> Formação dos radicais provenientes de O <sub>2</sub> .....	9
<b>Figura 1.6-</b> Estrutura molecular de PABA e SMX. Mecanismo de acção do SMX.....	17
<b>Figura 1.7-</b> Estrutura molecular de H <sub>2</sub> DCFDA.....	18
<b>Figura 1.8-</b> Estrutura molecular do Newport Green DCF.....	19
<b>Figura 3.1-</b> Microscópio de fluorescência usado na obtenção dos sinais ópticos.....	33
<b>Figura 3.2-</b> Espectro de emissão do Newport Green.....	35
<b>Figura 3.3-</b> Espectro de emissão/excitação de H <sub>2</sub> DCFDA.....	36
<b>Figura 4.1-</b> Intensidade de fluorescência em fatias não incubadas e incubadas com Newport green e H <sub>2</sub> DCFDA.....	40
<b>Figura 4.2-</b> Efeito de KCl em fatias incubadas com o indicador de zinco Newport Green.....	41

<b>Figura 4.3-</b> Decréscimo dos sinais de zinco em fatias incubadas com Newport Green, na presença do quelante de zinco TPEN.....	42
<b>Figura 4.4-</b> Efeitos de diferentes concentrações de KCl em sinais obtidos com Newport Green.....	43
<b>Figura 4.5-</b> Diminuição dos sinais de zinco na área CA3 do hipocampo, em fatias incubadas com o indicador Newport Green, expostas a uma solução de bloqueadores de canais de cálcio e recetores de glutamato.....	44
<b>Figura 4.6-</b> Decréscimo dos sinais de zinco obtidos com NG na solução ACSF modificada, em fatias do hipocampo de rato... ..	45
<b>Figura 4.7-</b> Aumento dos sinais de zinco medidos com NG, durante a aplicação de do antibiótico sulfametoxazole, em fatias de hipocampo de rato.....	46
<b>Figura 4.8-</b> Fatia incubada com o indicador de ROS H <sub>2</sub> DCFDA numa solução de ACSF.....	47
<b>Figura 4.9-</b> Aumento dos sinais de ROS em fatias não oxigenadas e incubadas com H <sub>2</sub> DCFDA.....	48
<b>Figura 4.10-</b> Diminuição dos sinais de ROS obtidos com H <sub>2</sub> DCFDA em fatias expostas a uma solução ACSF modificada.....	48
<b>Figura 4.11-</b> Aumento dos sinais de ROS em fatias expostas a sulfametoxazole, incubadas com H <sub>2</sub> DCFDA.....	49
<b>Figura 4.12-</b> Aumento dos sinais de ROS em fatias expostas a sulfametoxazole, incubadas com H <sub>2</sub> DCFDA.....	50

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Espécies Reativas de Oxigénio.....	9
<b>Tabela 2.1-</b> Sondas fluorescentes com elevada afinidade pelo zinco.....	20
<b>Tabela 2.2-</b> Quelantes utilizados em distintos estudos científicos.....	21
<b>Tabela 2.3-</b> Compostos utilizados como antagonistas/agonistas.....	22
<b>Tabela 2.4-</b> Sondas fluorescentes com elevada afinidade pelas ROS.....	24
<b>Tabela 2.5-</b> Tipo de LTP e zona do hipocampo usado na recolha de dados.....	26
<b>Tabela 2.6-</b> Efeito do zinco na LTP.....	28
<b>Tabela 2.7-</b> Concentração do antibiótico sulfametozaxole em distintas localizações.....	30

## Abreviaturas

ROS – Espécies reativas de oxigénio

CA1/CA2/CA3/CA4- *Cornu ammonis* 1/2/3/4

H<sub>2</sub>DCFDA- 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína

SMX- Sulfametoxazole

MF- Fibras musgosas

SCC- Colaterais de Schaffer

NMDA- N-metil D-Aspartato

AMPA-  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4- ácido isoxazolepropiónico

mGluR- Recetor metabotrópico de glutamato

D-APV- D – 2 amino-5-fosfonopentanoato

NBQX- 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione

IP3- Trifosfato de inositol

GABA - Ácido  $\gamma$ - aminobutírico

LTP- Potenciação de longa duração

LTD- Depressão de longa duração

TEA- Tetraetilamónio

VDCC- Canais de cálcio dependentes do potencial

DNA – Ácido desoxirribonucléico

SOD – Superóxido dismutase

GPx – Glutatião peroxidase

GST – Glutatião S- transferase

GSH – Glutatião reduzido

RNA – Ácido ribonucléico

ZnT3- Transportador de zinco do tipo III

ZnTs- Transportadores de zinco

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

ATP – Adenosina trifosfato

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

PABA - Ácido paraminobenzoico

Kd – Constante de dissociação

UQH<sub>2</sub>- Ubiquinona reduzida

PKC- Proteína cinase C

DCF- 2', 7'-diclorofluoresceína

NG- Newport Green

QZ2E- Ácido 2-(4,5-bis(((6-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)quinolin-8-yl)amino)methyl)-6-hydroxy-3-oxo-3H-8 xanthen-9-yl)benzóico

THF- Tetrahidrofurano

PVPDPY- 5-(Pyren-1-yl)-4,6-dipyrrin

TSQ- 6-metoxi-(8-p-toluenossulfonamido) quinolina

CQ- 5-cloro-7-iodo- 8-ihdroxiquinolina

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

TPEN- N,N,N,N'-tetrakis(2-piridilmetil)etilenodiamina

DCG-IV- (2S, 2R, 3'R)-2-2'-2'-3' dicarboxiciclopropilglicina

APV- Ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico

MK-801- 5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine

DNQX- 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione

BNZ- Benzamil amiloride

TTX- Tetrodotoxina

D-AP5- D-2-amino-5-fosfonopentanoato

DHE- Dihidroetídio

EUK-207- Superóxido dismutase/catalase sintética

CCD- Charge-coupled device

RAS- Sistema renina-angiotensina

OGD- Privação de oxigénio e glucose

ACSF- Solução cérebrospinal artificial.

DMSO- Dimetil-sulfóxido

PTP- Potenciação pós-tetânica

# I. Introdução

## I. I Anatomia do hipocampo

O hipocampo é uma estrutura com formato de feijão (formato “C”), situada no córtex límbico, que se estende desde o núcleo septal até ao lobo temporal, tal como se mostra na figura I.1. Juntamente com as estruturas acopladas (*fascia dentata*, *subiculum*, *presubiculum*, *parasubiculum* e córtex entorrinal) desempenham um papel fundamental na memória (Amaral e Witter, 1989; Deshmukh e Knierim, 2012).

Segundo Llorente de Nó, o hipocampo é segmentado em quatro zonas no sentido descendente da sua forma em “C”, segundo uma visão transversal (Llorente, 1934). Estas zonas são designadas por CA1, CA2, CA3 e CA4 (proveniente de *cornu ammonis*), contendo a zona CA3 as células piramidais de maior tamanho (Amaral e Witter, 1989; Deshmukh e Knierim, 2012). As fibras perforantes vindas do córtex entorrinal são uma das principais trajectórias das fibras aferentes presentes no hipocampo, tendo Lorent de Nó identificado também a trajectória das fibras musgosas (MF) e das fibras colaterais de Schaffer (SCC). Tal como demonstrado na figura I.1, as fibras musgosas são compostas pelos axónios das células granulares provenientes da *fascia dentata* e vão até à zona CA3. Por outro lado, as fibras colaterais de Schaffer são constituídas pelos axónios das células piramidais CA3 direccionando-se para as da zona CA1 (Andersen *et al.*, 2007).

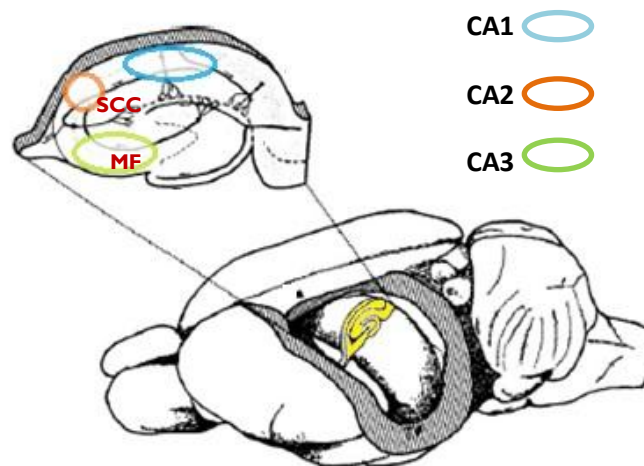


Figura I.1- Anatomia do Hipocampo. (Adaptada de Deshmukh e Knierim, 2012)

## 1.2. Sinapses químicas

O sistema nervoso central caracteriza-se pela capacidade que as suas células têm de comunicar e interagir entre elas. Esta propriedade inerente aos neurónios verifica-se graças a dois mecanismos de sinalização fundamentais: a condução axónica e a transmissão sináptica (Amaral e Witter, 1989; Deshmukh e Knierim, 2012).

Um neurónio forma até duzentas mil sinapses com outros, sendo em cada uma destas conexões a informação gerada ou processada entre as duas células, designadas por células pré-sináptica e pós-sináptica (Andersen, 2007).

No ambiente neuronal existem quatro iões fundamentais: o potássio ( $K^+$ ), o sódio ( $Na^+$ ), o cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e o cloro ( $Cl^-$ ), que estão em concentrações diferentes no interior e no exterior da célula, criando uma diferença de potencial essencial para o neurónio. Em situações normais a célula possui um potencial designado de repouso, que varia entre -40 e -100 mV, e que é mais negativo no interior. Existem diversos canais nas membranas dos neurónios, nomeadamente os canais iónicos controlados pelo potencial que incluem canais de cálcio. Além disso, ao longo do axónio existem bombas iónicas de sódio-potássio que são responsáveis por estabelecer o potencial de repouso da célula. Após estimulação química, mecânica ou eléctrica podem ocorrer alterações na permeabilidade da membrana celular dos neurónios, provocando a entrada em massa de  $Na^+$  e a saída de pequenas quantidades de  $K^+$ , originando a despolarização da membrana, que vai ocorrendo sequencialmente ao longo do axónio até à zona pré-sináptica. O potencial de acção no botão sináptico e a entrada de  $Ca^{2+}$  no terminal provocam a fusão das vesículas sinápticas com a membrana e a libertação dos transmissores químicos nelas contidos, para a fenda. Por último, os neurotransmissores ligam-se aos recetores presentes na membrana da célula pós-sináptica (Matias, 2001; Cravino, 1996, Cabrita, 1995).

Existem duas variedades de sinapses que se definem pelo tipo de neurotransmissores que libertam: as sinapses excitatórias e as inibitórias. Nas excitatórias a substância libertada provoca um aumento na permeabilidade da membrana pós-sináptica em relação ao sódio e ao potássio, causando assim uma despolarização no neurónio, que se tiver uma amplitude suficientemente grande pode atuar como um estímulo originando um impulso nervoso na célula pós-sináptica. Por outro lado, nas sinapses inibitórias o neurotransmissor vai originar um



acrécimo na permeabilidade da membrana pós-sináptica ao cloro. Como o potássio está presente em maiores quantidades no interior, tem tendência a sair da célula pós-sináptica, tornando assim o seu interior ainda mais negativo. Assim a célula sofre uma hiperpolarização, ou seja, o potencial transmembranar sofre um aumento em módulo, não desencadeando um impulso nervoso (Matias, 2001; Cravino, 1996, Cabrita, 1995).

Os neurotransmissores podem ser classificados em excitatórios ou inibitórios, consoante o tipo de acção que desencadeiam (Matias, 2001; Cravino, 1996, Cabrita, 1995).

### **1.2.1 Neurotransmissores excitatórios**

O neurotransmissor excitatório mais comum no sistema nervoso central é o glutamato, existindo dois tipos de recetores (Matias, 2001):

- Ionotrópicos (NMDA e não NMDA (AMPA e kainato).
- Metabotrópicos (mGluRs I, II, III);

Os recetores NMDA permitem essencialmente a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, e são controlados pela ligação de glutamato e também pela diferença de potencial da membrana. Na situação de repouso estes recetores encontram-se bloqueados por magnésio, sendo ativados não apenas pelo glutamato mas também pela despolarização da membrana pós-sináptica. Existem vários antagonistas para os recetores NMDA, tal como o D-APV (Matias, 2001; Weiss *et al.*, 2000; Sensi *et al.*, 2011; Sensi *et al.*, 1997).

Por sua vez, os recetores kainato e AMPA estão associados ao fluxo de iões sódio e potássio, sendo permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . O antagonista NBQX funciona como bloqueador para ambos os recetores (Matias, 2001; Cho *et al.*, 2003; Canzoniero *et al.*, 1997).

Quanto aos receptores metabotrópicos, existem três grupos que estão acoplados a uma proteína G. No caso do grupo I a ligação dos recetores ao glutamato promove a formação de um segundo mensageiro, o trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) que por sua vez origina a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático. Por outro lado, os grupos II e III promovem a inibição da enzima adenilil-ciclase que afeta a atividade ao nível da sinapse (Matias, 2001).

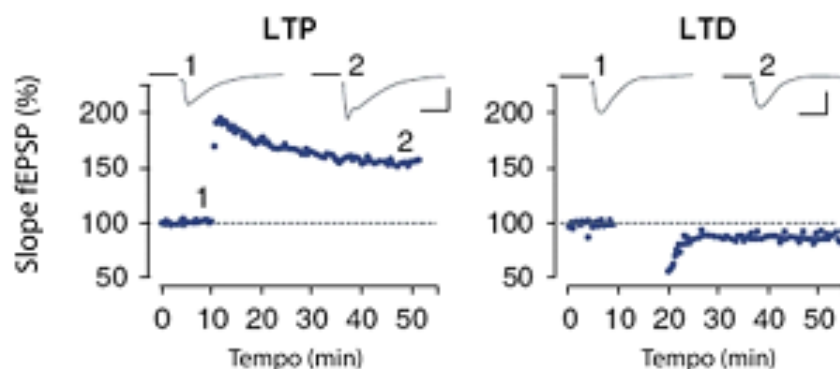
## **1.2.2 Neurotransmissores inibitórios**

A principal substância inibitória em sinapses químicas é o GABA, que assume um papel importante no controlo da excitabilidade celular provocada por estimulações demasiado intensas em sinapses excitatórias (Matias, 2001; Sensi *et al.*, 2011).

## **1.2.3. Características da LTP**

Ao longo de toda a vida o nosso cérebro tem a capacidade de mudar, característica designada por plasticidade. O estudo da plasticidade sináptica visa compreender como os neurónios alteram a capacidade de comunicação entre si. A atividade elétrica provocada pela libertação do neurotransmissor é chamada força sináptica, podendo ocorrer variações prolongadas da mesma após estimulações específicas da actividade neuronal. Existem dois processos diferentes, a potenciação de longa duração (*long term potentiation*, LTP) que provoca um aumento da força sináptica, e a depressão de longa duração (*long term depression*, LTD) que origina o seu enfraquecimento, como demonstrado na figura 1.2 (Cravino, 1996; Pires, 1996).

Ao nível celular, a LTP melhora a capacidade de duas células neuronais (pré- e pós-sináptica) comunicarem entre si. Os estímulos recebidos pela célula pré-sináptica, são transmitidos à célula pós-sináptica por meio da ligação dos neurotransmissores libertados aos recetores na membrana pós-sináptica. Estimulações intensas como tétanos de frequência elevada (ex. 100 Hz, 1 s), provocam um aumento da sensibilidade e/ou do número de certos recetores pós-sinápticos na superfície da célula. A ativação dos recetores de NMDA causada por uma maior libertação de glutamato, e o aumento dos níveis intracelulares de cálcio são dois fatores essenciais para a indução da LTP, que é caracterizada por duas fases, indução e manutenção ( Cravino, 1996; Pires, 1996).



**Figura 1.2- Comportamento dos sinais elétricos associados com a LTP e a LTD (Adaptada de Ruggiero et al., 2011)**

No hipocampo de rato existem duas formas diferentes de LTP induzidas eletricamente, a LTP que depende da ativação dos receptores de NMDA e da entrada de cálcio na região pós-sináptica e a LTP das fibras musgosas, que não depende da ativação destes receptores. Na área CA1 (nas fibras colaterais de Schaffer) ocorre a primeira forma de LTP enquanto que na zona CA3 (nas fibras musgosas) existe a LTP independente da activação dos recetores de NMDA (Matias, 2001; Cravino, 1996; Pires, 1996). Alguns estudos referem que a complexação de zinco endógeno não tem efeitos significativos na formação da LTP das fibras musgosas. No entanto, quando são libertadas elevadas concentrações deste metal observa-se um decréscimo da eficácia das sinapses excitatórias o que impossibilita a indução daquela forma de LTP (Xie e Smart, 1994).

A LTP também pode ser induzida quimicamente, através do bloqueador de canais de potássio tetraetilamónio (TEA). A TEA-LTP é dependente da elevação da concentração do cálcio intracelular pós-sináptico, tendo uma componente induzida por meio de canais de cálcio dependentes do potencial (VDCCs) e outra mediada pelos receptores de NMDA (Song et al., 2002; Aniksztejn e Ben-Ari, 1991; Huber et al., 1995). É ainda possível induzir LTP através de uma solução com elevadas concentrações de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ , que também originam uma potenciação sináptica (Makhinson et al., 1999; Chotiner et al., 2003).

### I.3. Zinco

O zinco é um metal de transição essencial para a vida: participa no metabolismo de ácidos nucleicos e de proteínas, estimula a atividade de inúmeras enzimas e modula a função de diversas proteínas necessárias para diferentes atividades celulares (Eom *et al.*, 2001). Ao nível fisiológico e em baixas quantidades, o zinco assume um papel importante em diferentes processos biológicos, tais como, a expressão génica, catálise enzimática, síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA), sinalização celular e neurotransmissão, estando presente em concentrações intracelulares de cerca de 150  $\mu\text{M}$  (Frederickson *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 1998).

A barreira hematoencefálica é atravessada pelo zinco através da sua ligação à albumina, ou a aminoácidos específicos, como a cisteína e a histidina (Takeda, 2000). Ao nível cerebral o zinco encontra-se em maiores quantidades no córtex, hipocampo e amígdala, estando cerca de 90% do zinco fortemente associado a metalotioneínas e os restantes 10% como zinco livre ou levemente ligado em vesículas sinápticas ( Paoletti *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2003).

O zinco citoplasmático é transportado para vesículas sinápticas através dum transportador específico designado por ZnT3. Este péptido pertence a uma família de transportadores de zinco (ZnTs) que é responsável por manter o fluxo de  $\text{Zn}^{2+}$  para compartimentos intracelulares e através da membrana plasmática (Palmiter, 2004; Cho *et al.*, 2003; Sensi *et al.*, 2011). Em determinadas sinapses excitatórias, na sequência de estímulos químicos ou eléctricos, o  $\text{Zn}^{2+}$  é libertado juntamente com o glutamato para a fenda sináptica, originando diferentes efeitos neuromoduladores que variam consoante o alvo (figura 1.3):

- **Recetores de NMDA** - existem nestes receptores dois sítios de ligação para o zinco, um de alta afinidade e outro de baixa afinidade. A ligação do zinco a um destes sítios provoca uma inibição não-competitiva da corrente através do canal dos recetores, independente do potencial, diminuindo a probabilidade de abertura do canal. Estes canais são essencialmente permeáveis ao cálcio, permitindo também a passagem de zinco através deles.
- **Recetores de AMPA/Kainato** – o zinco potencia a atividade destes recetores que são também permeáveis ao cálcio e ao zinco, permitindo assim a passagem deste ião para a zona pós-sináptica;

- **Canais de cálcio dependentes do potencial** – o zinco tem neles um papel inibitório. Para além da permeabilidade ao cálcio alguns destes canais como os do tipo L, são também permeáveis ao zinco;
- **Bomba de sódio/cálcio** - também transporta, bidirecionalmente zinco através da membrana;
- **Transportador de zinco do tipo I (ZnTI)** – transporta zinco para o exterior do citoplasma, mantendo a homeostase da concentração citoplasmática de zinco (Weiss et al., 2000; Palmiter et al., 2004; Cho et al., 2003; Sensi et al., 2011; Sensi et al., 1997; Canzoniero et al., 1997; Li et al., 2001; Morris e Levenson, 2012).

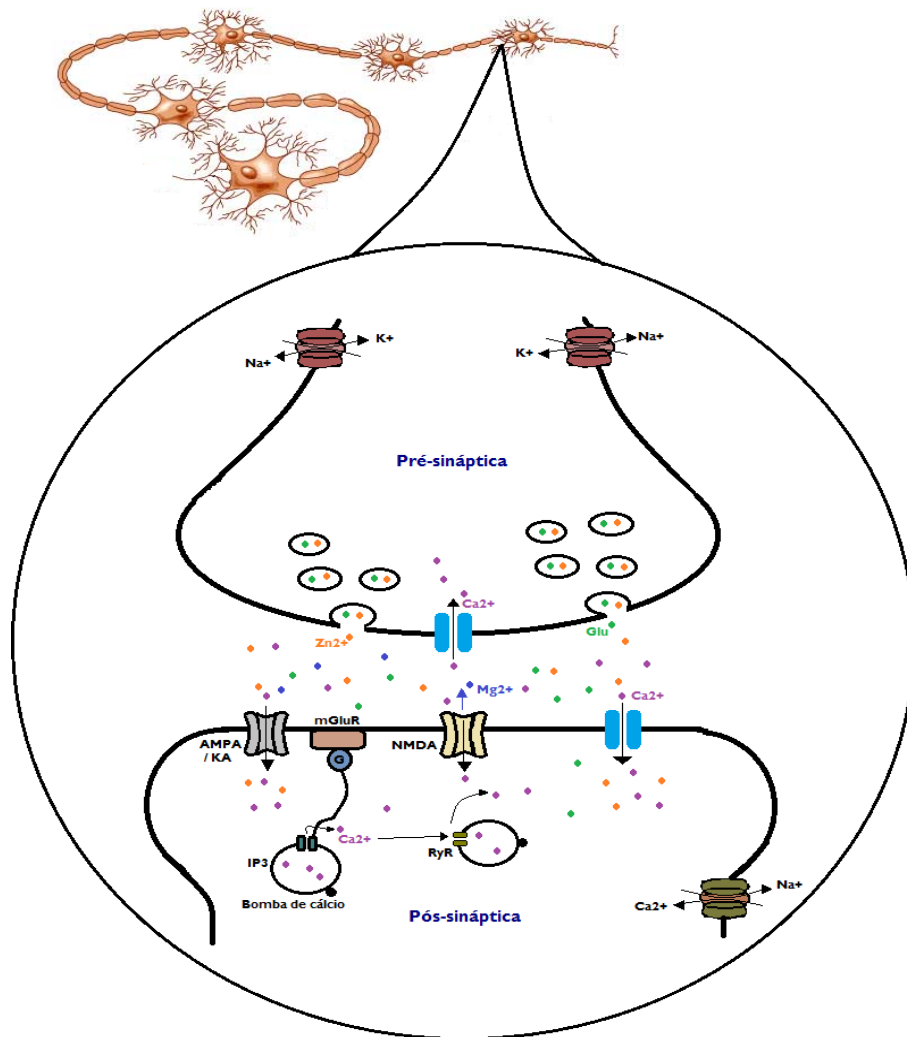


Figura I.3 - Sinapse química das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo.

Em elevadas concentrações o zinco surge como mediador da morte celular dos neurónios em diferentes patologias, como a isquemia, a epilepsia e traumas cerebrais. Em situações patológicas, nas sinapses excitatórias o zinco é considerado uma neurotoxina sendo intensamente libertado, podendo atingir-se na fenda sináptica concentrações que variam de 100 a 300 $\mu$ M (Choi *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2003; Sensi *et al.*, 2011; Sensi *et al.*, 1997; Canzoniero *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001).

#### I.4. Oxigénio; propriedades físico-químicas

O oxigénio presente na atmosfera, no seu estado fundamental, existe no estado tripleto, com dois eletrões não emparelhados e com números quânticos de spin pararelos. Assim, a sua reação com moléculas orgânicas ocorre com dificuldade, sendo necessária a sua “ativação”, dado que a redução divalente tem diversas limitações impostas pelos números quânticos de spin (Santos e Peixoto, 2007).

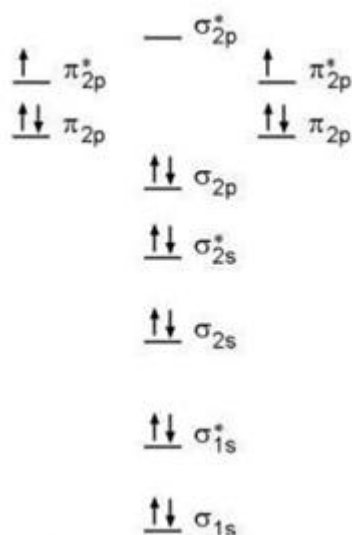


Figura I.4 - Representação da orbital molecular do oxigénio atmosférico. (Adaptada de Santos e Peixoto, 2007)

Segundo o Princípio de Exclusão de Pauli a reação entre moléculas orgânicas e outras, como no caso do oxigénio atmosférico, pode ocorrer somente quando o agente redutor possui também dois eletrões desemparelhados com números quânticos de spin pararelos, mas opostos

aos do oxigénio (figura 1.4), um acontecimento raro. Assim, o oxigénio atmosférico, no seu estado fundamental, é considerado uma molécula pouco reativa, porém dado as restrições estabelecidas pelos números de spin, os processos mais comuns da sua redução, por reações bioquímicas, envolvem a transferência de um único eletrão. Deste modo, esta molécula está apta a formar radicais livres altamente reativos (Santos e Peixoto, 2007).

A molécula de  $O_2$  possui vários estados de oxidação, originando a transferência de eletrões uma formação sequencial de dois radicais não reativos, entre os quais o anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Posteriormente, forma-se o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), altamente reativo, considerado o mais nocivo nos sistemas biológicos (figura 1.5) (Santos e Peixoto, 2007; Freinbichler *et al.*, 2011).

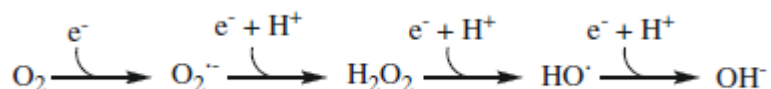


Figura 1.5 - Formação dos radicais provenientes de  $O_2$ . (Adaptada de Santos e Peixoto, 2007).

#### 1.4.1 Espécies reactivas de oxigénio

As espécies reativas de oxigénio referem-se aos metabolitos de oxigénio que sejam mais reactivos que o  $O_2$ . (Santos e Peixoto, 2007; Freinbichler *et al.*, 2011; Kennedy e Sandiford, 2012). Este termo envolve não só espécies radicalares como as não radicalares derivadas do oxigénio, tal como indicado na tabela 1 (Santos e Peixoto, 2007).

Tabela 1- Espécies reativas de oxigénio (Adaptada de Santos e Peixoto, 2007).

Radicais	Não Radicais
Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	Peróxido de Hidrogénio ( $H_2O_2$ )
Hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ )	Ácido Hipocloroso ( $HOCl$ )
Peroxilo ( $LO_2^{\bullet}$ )	Ozono ( $O_3$ )
Alquilo ( $L^{\bullet}$ )	Oxigénio Singleto
Alcoxilo ( $LO^{\bullet}$ )	Peróxidos Lipídicos
Hidroperoxilo ( $HO_2^{\bullet}$ )	

## Radical hidroxilo

Nos sistemas biológicos os radicais hidroxilo têm origem, fundamentalmente, em dois mecanismos:

- homólise da água por exposição à radiação ionizante;



- reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com metais de transição, reação de Fenton, em que o íão ferro catalisa a formação do radical a partir do peróxido de hidrogénio (Santos e Peixoto, 2007; Freinbichler *et al.*, 2011; Barreiros e David, 2006).



O radical  $\text{HO}\cdot$  é o mais reactivo e nocivo dos ROS conhecidos, dado que induz a peroxidação lipídica e modificações ao nível do DNA, do ácido ribonucléico (RNA) e das proteínas, provocando assim inactivação enzimática, dificuldade no transporte activo através das membranas celulares e morte celular. O seu tempo de meia vida é significativamente pequeno, conferindo-lhe uma capacidade de difusão muito baixa (Santos e Peixoto, 2007; Freinbichler *et al.*, 2011; Barreiros e David, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007).

## Radical superóxido

O radical superóxido é formado constantemente em diversos processos celulares, entre os quais, por redução da molécula de  $\text{O}_2$  por um único eletrão, na cadeia de transporte de eletrões na mitocôndria, e através de algumas enzimas. Em comparação ao  $\text{HO}\cdot$  é considerado pouco reativo, por exemplo, no caso dos aminoácidos, reage simplesmente com a cisteína (Santos e Peixoto, 2007).

Por outro lado, o  $\text{O}_2\cdot^-$  é capaz de agir como base de Brönsted, originando o radical hidroperóxido, cuja reactividade é mais elevada, tornando assim possível a reação com moléculas biológicas (Santos e Peixoto, 2007; Barreiros e David, 2006).

Deste modo, o  $\text{O}_2\cdot^-$  produz efeitos directa ou indirectamente. Apesar dos seus efeitos nocivos, o superóxido assume um papel importante nos sistemas biológicos, por exemplo:

- é produzido pelos fagócitos para defender o organismo de bactérias, fungos e vírus;
- é gerado por linfócitos durante o processo de inflamação;



- funciona como sinalizador molecular, dado que é capaz de oxidar grupos –SH em ligações dissulfeto, podendo então activar/desactivar enzimas que possuam metionina;
- em alguns casos assume um papel de antioxidante, reduzindo semiquinonas, para que elas possam recuperar as suas actividades metabólicas (Santos e Peixoto, 2007; Barreiros e David, 2006).
- Funciona como neurotransmissor, originando LTP em sinapses de fatias do hipocampo (Knapp e Klan, 2002).

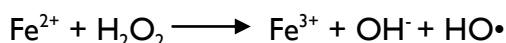
### **Radical peroxilo e alcoxilo**

Os radicais peroxilo e alcoxilo têm origem na decomposição de peróxidos orgânicos e em reações de carbono radicalar com O<sub>2</sub>, como acontece na peroxidação lipídica. São considerados bons agentes oxidantes, no entanto, em sistemas biológicos o alcoxilo sofre um rápido rearranjo molecular que origina novas espécies com radicais (Santos e Peixoto, 2007; Barreiros e David, 2006).

### **Peróxido de hidrogénio**

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na célula é formado no citoplasma, nas mitocôndrias e nos peroxissomas, respetivamente pela xantina oxidase, succinato desidrogenase e urato oxidase. Pode ainda ter origem na dismutação do O<sub>2</sub>, catalisada pela enzima superóxido dismutase. Possui um papel fundamental no stress oxidativo dado que é capaz de atravessar membranas celulares com facilidade e de gerar o radical hidroxilo. Apesar de não ser considerado um radical livre é tóxico para os sistemas biológicos quando presente num intervalo de concentrações de 10-100 µM (Santos e Peixoto, 2007; Barreiros e David, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007; Wijk *et al.*, 2008).

O peróxido de hidrogénio é um fraco agente oxidante e redutor, no entanto, é capaz de inactivar algumas enzimas, através da oxidação de grupos sulfidriilo do centro activo, provocando alterações nas rotas metabólicas. Por outro lado, na presença de metais de transição na célula, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reage através da reação de Fenton, dando origem a radicais mais poderosos, como é o caso do radical hidroxilo (Santos e Peixoto, 2007; Barreiros e David, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007; Wijk *et al.*, 2008).



## Oxigénio singleto

O oxigénio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) não é considerado um radical, no entanto, apresenta maior reatividade que no seu estado fundamental. Interage com outras moléculas por dois mecanismos:

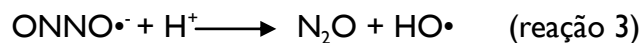
- reação directa com a outra espécie;
- transferência da energia de excitação para a outra molécula, ficando o oxigénio no seu estado fundamental, e a outra espécie no estado excitado ( “quenching”) (Santos e Peixoto, 2007; Barreiros e David, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007).

As biomoléculas carotenóides são as que apresentam maior reatividade com  $\text{O}_2$ , devido às suas várias insaturações conjugadas. O oxigénio singleto reage ainda com os aminoácidos metionina, cisteína, triptofano, tirosina e histidina. Por outro lado, ao nível dos ácidos nucleicos, a sua reação só é relevante com as bases guaninas (Santos e Peixoto, 2007; Barreiros e David, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007).

## Óxido nítrico

Nos sistemas biológicos, o óxido nítrico é sintetizado por um grupo de enzimas designadas óxido nítrico sintases, a partir da arginina, oxigénio e fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH). Por outro lado, é removido pela sua reação com os grupos hemo da hemoglobina, dado que forma complexos estáveis com o ião ferroso. Está envolvido em diversos processos biológicos, como relaxação muscular, regulação imune, neurotransmissão e vasodilatação (Santos e Peixoto, 2007; Barreiros e David, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007).

O óxido nítrico é considerado um radical livre devido ao eletrão desemparelhado numa orbital  $\pi$  antiligante. É uma espécie muito versátil, pois reage com  $\text{NO}^-$  dando origem ao ião nitroxilo ( $\text{ONNO}^{\bullet-}$ ), como observado na reação 1. Por sua vez,  $\text{ONNO}^{\bullet-}$  reage de novo com o óxido nítrico dando origem ao óxido nitroso (reação 2), ou por captura dum próton originando o radical hidroxilo (reação 3) (Santos e Peixoto, 2007; Barreiros e David, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007).



#### I.4.2 Forma\c{c}\~ao de esp\c{e}cies reativas de oxig\c{e}nio

A mitoc\~ondria \c{e} um dos organelos celulares com maior import\~ancia, dado que funciona como a principal fonte de energia das c\~elulas. Est\~a presente na maioria das c\~elulas eucari\~oticas, sendo respons\~avel por armazenar a energia conservada na glicose, sob a forma de adenosina trifosfato (ATP). Esta energia qu\~imica \c{e} usada pelas respectivas c\~elulas em rea\c{c}\~oes que dela necessitem. Ao n\~ivel deste organelo ocorre a forma\c{c}\~ao cont\~inua das esp\c{e}cies respectivas de oxig\c{e}nio, na cadeia transportadora de electr\~oes (Santos e Peixoto, 2007).

Nos sistemas biol\~ogicos, as esp\c{e}cies reativas de oxig\c{e}nio s\~ao ainda formadas em diversos organelos celulares, entre os quais, os peroxissomas, n\~ucleo, lisossomas, ret\~iculo endoplasm\~atico, citoplasma e na membrana plasm\~atica. Nestes compartimentos a forma\c{c}\~ao de ROS \c{e} acompanhada por outras rea\c{c}\~oes, como a auto-oxida\c{c}\~ao de componentes da c\~elula e conseq\~uente inactiva\c{c}\~ao de biomol\~eculas, a actividade das oxidases, desidrogenases, cicloxygenases e peroxidases (Santos e Peixoto, 2007; Barreiros e David, 2006; Wijk *et al.*, 2008).

O  $\text{O}_2$  \c{e} o receptor final dos electr\~oes provenientes de esp\c{e}cies como o NADH e a ubiquinona reduzida ( $\text{UQH}_2$ ), ao estabelecer contacto com a citocromo oxidase (Complexo IV) da cadeia transportadora de electr\~oes. O citocromo  $\text{aa}_3$  incorporado no Complexo IV \c{e} respons\~avel por “prender” o oxig\c{e}nio at\~e que ele esteja totalmente reduzido, ou seja, quando adicionados 4 electr\~oes, sendo ent\~ao libertada na forma de \c{a}gua. No entanto, alguns electr\~oes podem ser transferidos diretamente para outros compostos da cadeia respirat\~oria, dando origem aos radicais livres de oxig\c{e}nio. Em situa\c{c}\~oes patol\~ogicas a forma\c{c}\~ao de radicais livres \c{e} mais intensa do que em condi\c{c}\~oes normais (Santos e Peixoto, 2007).

Boveris e Chance verificaram a forma\c{c}\~ao do radical super\~oxido no Complexo I, sendo estimulada pela antimicina e rotenona (Boveris e Chance, 1973). A s\~intese do p\~eroxido de hidrog\c{e}nio precede a do super\~oxido, existindo uma enzima respons\~avel pela elimina\c{c}\~ao do \c{u}ltimo, a super\~oxido dismutase (Boveris *et al.*, 1976). Estes dois radicais reagem em conjunto de

modo a originar outras espécies radicalares mais poderosas, nomeadamente o HO• (Santos e Peixoto, 2007). Por outro lado, no Complexo III foi identificada a formação de ROS, especificamente na ubisemiquinona (composto radicalar intermediário do ciclo da ubiquinona) (Boveris *et al.*, 1976).

### **I.4.3 Stress oxidativo**

O oxigénio é um elemento essencial para a sobrevivência dos sistemas biológicos, no entanto, tem sérios riscos devido às espécies reativas de oxigénio. Deste modo, é essencial o equilíbrio entre estas espécies e os antioxidantes. No caso duma deficiência na habilidade do sistema biológico em desintoxicar-se, no aumento anormal da produção de ROS, ou mesmo no acréscimo das biomoléculas mais susceptíveis à oxidação, o organismo encontra-se num estado designado por stress oxidativo (Santos e Peixoto, 2007; Freinbichler *et al.*, 2011; Barreiros e David, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007; Wijk *et al.*, 2008; Prasad e Pospíšil, 2011).

As defesas dos organismos podem ser divididas em (Santos e Peixoto, 2007):

- antioxidantes enzimáticos:
  - Superóxido dismutase;
  - Catalase;
  - Glutatião peroxidase;
  - Glutatião transferase;
  - Glutatião redutase;
- não enzimáticos:
  - Vitamina E;
  - Vitamina A;
  - Vitamina C;
  - Glutatião;
  - Coenzima Q;
  - Ácido úrico.

Alguns estudos afirmam que os ROS assumem um papel importante na coordenação da sinalização celular, isto é, estimula uma elevada variabilidade de vias de transdução de sinal, que

por sua vez, são fundamentais para manter a homeostase celular neuronal ( Borg e London, 2002).

### **1.5. Stress oxidativo e zinco**

Várias doenças, como a epilepsia e a isquemia global, estão relacionadas com a morte celular causada pelo zinco. Em situações normais, o zinco ao entrar na zona pós-sináptica é capturado pelas proteínas metalotioneínas, ou é transportado para fora da célula através dum transportador específico (Zn-T), sendo assim mantidas as concentrações de zinco em níveis homeostáticos (Colvin *et al.*, 2003; Oteiza *et al.*, 2004).

Existem vários estudos que demonstram que o zinco em elevadas concentrações influencia o funcionamento mitocondrial, de distintas maneiras, por:

- inibição da cadeia transportadora de eletrões (Oteiza, *et al.*, 2004);
- indução da despolarização da mitocôndria e de um decréscimo na produção de energia, através da inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), essencial na glicólise (Sensi *et al.*, 1999);
- inibição reversível do complexo bcl da cadeia transportadora de eletrões (Lorusso *et al.*, 1991);
- decréscimo do consumo de O<sub>2</sub> e do potencial transmembranar em mitocôndrias de cérebro isoladas (Dineley *et al.*, 2003);
- regulação da proteína cinase C (PKC) que provoca um acréscimo na expressão da enzima NADPH oxidase (Morris e Levenson, 2012).

Apesar de não agir como oxidante, o zinco interage com mecanismos que, por si só, aumentam o stress oxidativo, tais como:

- a diminuição da eficácia do ciclo do ácido tricarboxílico através da inibição do complexo  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (Gazaryan *et al.*, 2002);
- a diminuição da atividade da glutatona redutase *in vitro*, um importante antioxidante enzimático (Mize e Langdon, 1962);

- o aumento da produção do superóxido ( $O_2 \cdot^-$ ) através da enzima NADPH oxidase ( Noh e Koh, 2000).

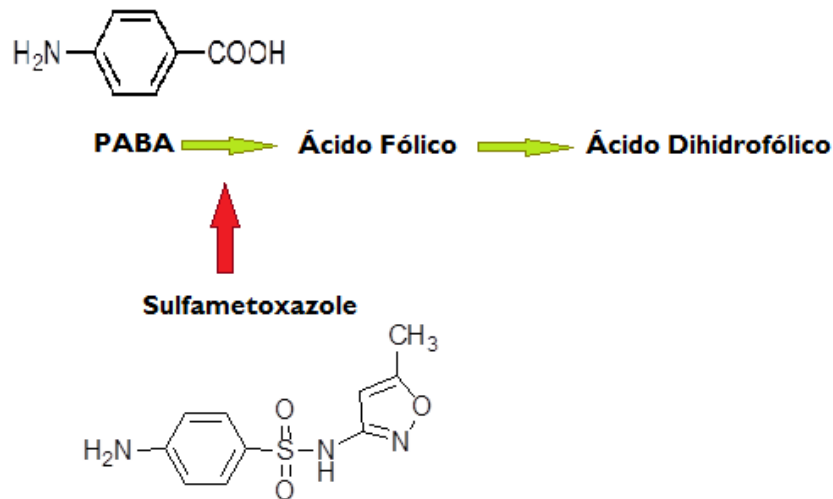
Vários estudos apontam o aumento do zinco como um dos factores envolvidos na produção de espécies reativas de oxigénio, conduzindo assim ao dano e morte neuronal. A neurotoxicidade do zinco mediada pela formação de ROS é acompanhada pela peroxidação lipídica ( Cho *et al.*, 2003; Sensi *et al.*, 2011; Noh e Koh, 2000; Morris e Levenson, 2012).

No entanto, em situações não patológicas o zinco assume um papel neuromodulador e de antioxidante, agindo neste caso como cofator da enzima superóxido dismutase. Vários estudos revelam que a deficiência de zinco induz lesões oxidativas provocadas por ROS (Erdeve *et al.*, 2004; Beltramini *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006).

## **1.6. Sulfametoxazol**

O uso de antibióticos é um assunto com elevado interesse nas questões da recuperação da saúde. A sua utilização tem sofrido um acréscimo elevado nos últimos anos e o facto de não serem totalmente metabolizados pelo organismo e de haver compostos cuja validade expira leva a que sejam inevitavelmente libertados para o ambiente, para as águas residuais (Kemper, 2008). Deste modo, surge um problema de saúde pública, o desenvolvimento de resistência de diferentes bactérias a antibióticos existentes ( Shcmitt *et al.*, 2005).

O sulfametoxazole (SMX), um antibiótico do tipo sulfonamida, é usado para tratar infeções ao nível do trato urinário, sinusite e toxoplasmose. É um dos antibióticos encontrados com maior frequência no ambiente, sendo caracterizado como pouco reativo para os solos mas com elevada mobilidade nos mesmos (Chen *et al.*, 2011). Os tratamentos de águas residuais, que se encontram implantados nas instalações responsáveis, não são eficazes na remoção do SMX. Deste modo, devido ainda ao facto deste antibiótico ser mutagénico é fundamental encontrar um método de remoção das águas residuais eficaz ( Isidori *et al.*, 2005).



**Figura 1.6 - Estrutura molecular de PABA e SMX. Mecanismo de acção do SMX. ( Adaptada de Sulfamethoxazole, Product Information Sigma).**

O SMX interfere com a síntese de ácidos nucleicos, nomeadamente, de ácido fólico em bactérias. Tendo em conta que as células humanas não são capazes de o produzir, este antibiótico é específico para as bactérias sensíveis. Como se mostra na figura 1.6, as sulfonamidas são estruturalmente semelhantes ao ácido p-amino benzóico, um precursor do ácido fólico. Os compostos deste grupo atuam sobre a síntese de ácidos nucleicos nas bactérias, ou seja, impedem a conversão do ácido paraminobenzoico (PABA) em ácido di-hidrofólico (Sulfamethoxazole, Product Information, Sigma).

Dado o aumento da concentração do SMX no ambiente, as bactérias ganham resistência através de mutações ou da aquisição de genes de resistência, como é o caso dos genes *sul1*, *sul2*, e *sul3*. Por outro lado, podem ainda sofrer alterações fisiológicas ao nível das membranas ou do metabolismo, tornando-as assim tolerantes ao antibiótico (Sheridan *et al.*, 2012).

## I.7. Indicadores fluorescentes de ROS e de zinco

### I.7.1 H<sub>2</sub>DCFDA

A detecção de ROS em sistemas biológicos é um processo exigente devido à sensibilidade necessária do método e à especificidade da sonda. O indicador permeante H<sub>2</sub>DCFDA (figura 1.7) é comumente utilizado porque reage com diferentes espécies reativas de oxigênio, sendo, no entanto, mais específico para os radicais hidroxilo e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes®).

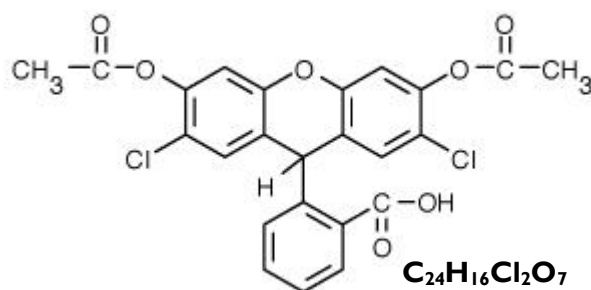


Figura 1.7- Estrutura molecular de H<sub>2</sub>DCFDA. (Adaptada de H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes®)

2'-7'-diacetato dicloro-dihidro-fluoresceína é uma forma reduzida da fluoresceína. Esta forma inicial não é fluorescente, no entanto, ao sofrer hidrólise dos grupos acetatos, representados na figura 1.7, por esterases intracelulares ou por oxidação origina um composto altamente fluorescente, a 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) (H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes®).

### I.7.2 Newport Green DCF

O *Newport Green* (NG) DCF (figura 1.8) tem uma afinidade moderada pelo zinco (constante de dissociação,  $k_D \approx 1 \mu\text{M}$ ), e é praticamente insensível ao cálcio ( $k_D \approx 100 \mu\text{M}$ ). Deste modo, é considerado uma sonda bastante útil na detecção do fluxo de Zn<sup>2+</sup> através de canais dependentes do potencial ou de canais de recetores de glutamato, em estudos neuronais (Meagher *et al.*, 2006; Newport Green™ DCF diacetate, cell permeant. Molecular Probes).



NG-DCF existe na forma permeante, ou seja, penetra através das membranas celulares, sendo hidrolisado no interior tornando-se assim uma molécula carregada, que fica impedida de sair da célula. Esta sua última forma permite que se formem complexos proteína-metal carregados, que são fluorescentes ( Meagher *et al.*, 2006; Newport Green™ DCF diacetate, cell permeant. Molecular Probes; Wei *et al.*, 2004 ).

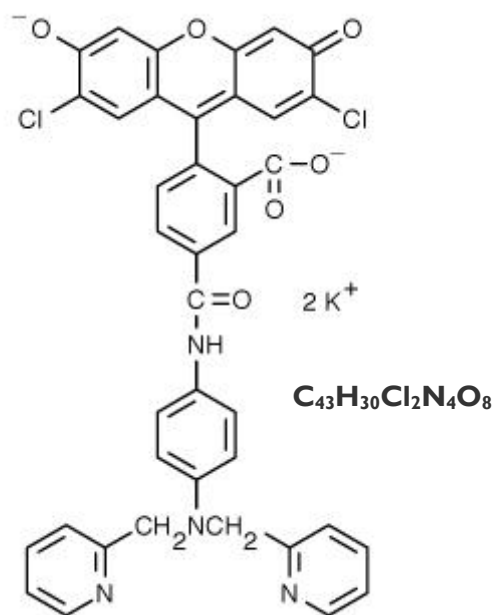


Figura 1.8 - Estrutura molecular do Newport Green DCF. (Adaptada de Newport Green™ DCF diacetate, cell permeant. Molecular Probes)

## 2. Estado de Arte

### 2.1 O zinco a nível neuronal

Atualmente o zinco celular é largamente estudado, tendo em conta que alterações na sua homeostase estão associadas a doenças graves como Alzheimer, cancro da próstata, isquemia e outras (Lindsey e Stephen, 2010; Sensi *et al.*, 2011). De modo a entender as suas funções e rotas biológicas têm sido desenvolvidas várias ferramentas de deteção.

A técnica de deteção de fluorescência por microscopia tem ganho terreno dado que as sondas são concebidas de modo a serem biologicamente compatíveis, ou seja, são:

- permeáveis em relação à membrana celular;
- não tóxicas;
- excitáveis em comprimentos de onda de baixa energia, não afetando a autofluorescência;
- solúveis em água (Lindsey e Stephen, 2010; Tarun *et al.*, 2012).

Têm sido aplicadas diversas sondas fluorescentes em neurobiologia, com sucesso, no estudo de variações de zinco, como se mostra na tabela 2.1.

**Tabela 2.1 - Sondas fluorescentes com elevada afinidade pelo zinco, concentrações, constantes de dissociação e sistemas biológicos usados.**

Sonda Fluorescente	Concentração	K <sub>D</sub>	Sistema Biológico	Referência
Mag-fura-5	3 µM	20 nM	Cultura celular	Sensi <i>et al.</i> , 1997
TSQ	0,001%	1 µM	Cultura celular	Marin <i>et al.</i> , 2000
NG	5 µM	1 µM		
Mag-fura-2	5 µM	0,02 µM		
FuraZin-1	5 µM	3 µM	Cultura celular	Dineley <i>et al.</i> , 2002
FluoZin-2	5 µM	2 µM		
NG dipotassium salt	20 µM			
		1 µM	Fatias do hipocampo	Wei <i>et al.</i> , 2004
NG diacetate	50 µM			
NG dipotassium salt	10 µM	1 µM		
			Fatias do hipocampo	Stork e Li, 2006
Zinpyr-4	10 µM	1 nM		

FluoZin-3	10 $\mu$ M	15 nM		
FluoZin-3	1 mM	15 nM	Fatias do hipocampo	Yuliya <i>et al.</i> , 2009
TSQ	4.5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	Fatias do hipocampo	Won <i>et al.</i> , 2010
PYPDPYI	-	20 $\mu$ M	Fatias do hipocampo	Yujiang <i>et al.</i> , 2011
THF	-	< 1 $\mu$ M <sup>2</sup>	Cultura celular	Tarun <i>et al.</i> , 2012
Zinpyr-1	1 $\mu$ M	0,7 nM	Fatias do hipocampo	Beltrán <i>et al.</i> , 2012

De modo a calibrar compostos fluorescentes sensíveis ao zinco, vários estudos aplicaram diferentes quelantes, com elevada afinidade pelo  $Zn^{2+}$ , em preparações biológicas. A diminuição dos sinais de fluorescência demonstra que realmente é a concentração de zinco que a sonda reflete. Na tabela 2.2 são apresentados diversos estudos com os respetivos quelantes.

**Tabela 2.2 - Quelantes de zinco utilizados em estudos científicos, concentrações e efeitos.**

Tipo de Quelante	Concentração	Preparação biológica	Efeito	Referência
Ditizona	10 $\mu$ M		Ditizona e TPEN diminuem rapidamente a fluorescência de TSQ. EDTA reduz 53%.	Marin <i>et al.</i> , 2000
TPEN	10 $\mu$ M	Cultura celular		
EDTA	200 $\mu$ M			
Ca-EDTA	1 mM	Fatias do hipocampo	Diminuição dos sinais de zinco	Chang <i>et al.</i> , 2004
Ca-EDTA	500 $\mu$ M	Sinaptossomas	Aumento da morte celular por isquemia	Bancila <i>et al.</i> , 2004
TPEN	50 $\mu$ M	Fatias do hipocampo	Diminuição dos sinais de $Zn^{2+}$ intracelular	Komatsu <i>et al.</i> , 2005
TPEN	20 $\mu$ M	Fatias do hipocampo	Bloqueio das depressões pós-tetânicas	Quinta-Ferreira e Matias, 2005
Ca-EDTA	2,5 mM			
Ca-EDTA	100 $\mu$ M	Fatias de hipocampo	Diminuição dos sinais de zinco pré-sináptico	Ketterman e Li, 2008
Ca-EDTA	5 mM			
TPEN	40 $\mu$ M	Fatias do hipocampo	Os sinais diminuem cerca de 80%.	Yuliya <i>et al.</i> , 2009
CQ	30 mg/kg	Fatias do	CQ reduz sinais de zinco	Won <i>et al.</i> , 2010

Ca-EDTA                      100 mM                      hipocampo                      intra- e extracelular. Ca-EDTA reduz apenas sinais de zinco extracelular.

De modo a definir a origem pré ou pós-sináptica dos sinais, e a impedir a entrada de zinco na região pós-sináptica através de diversos canais, aplicam-se no meio de perfusão antagonistas de recetores de glutamato e bloqueadores de canais dependentes ou independentes de potencial (Cho *et al.*, 2003; Beltrán *et al.*, 2012). A tabela 2.3 refere vários estudos nos quais se utilizaram diferentes substâncias deste tipo.

**Tabela 2.3- Compostos utilizados como antagonistas/agonistas, concentrações e efeitos.**

Composto	Efeito	Alvo	Concentração	Referência
BNZ	Antagonista	Bombas Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	100 µM	
D-APV	Antagonista	Recetor NMDA	100 µM	
MK-801	Antagonista	Recetor NMDA	10 µM	Sensi <i>et al.</i> , 1997
NBQX	Antagonista	Recetor AMPA/KA	10 µM	
TTX	Bloqueador	Canais de Sódio	0,5 µM	
Oubaína	Inibidor	Bomba Na/KATP	20 µM	
APV	Antagonista	Recetor NMDA	100 µM	
MK-801	Antagonista	Recetor NMDA	2 µM	Marin <i>et al.</i> , 2000
Nifedipina	Bloqueador	Canais de Cálcio	10 µM	
DNQX	Antagonista	Recetor AMPA/KA	100 µM	
MK-801	Antagonista	Recetor NMDA	10-15 µM	
D-APV	Antagonista	Recetor NMDA	25 µM	Calixto <i>et al.</i> , 2003
DCG-IV	Agonista	mGluR2	0,5-1 µM	
Tolbutamida	Antagonista	KATP	300 µM	Bancila <i>et al.</i> , 2004
CNQX	Antagonista	Recetor AMPA/KA	10 µM	Quinta-Ferreira e Matias, 2005
D-APV	Antagonista	Recetor NMDA	50 µM	
DCG-IV	Agonista	mGluR2	1 µM	
Tolbutamida	Bloqueador	KATP	250 µM	Matias <i>et al.</i> , 2010
DCG-IV	Agonista	mGluR2,3	1 µM	
D-AP5	Antagonista	Recetor NMDA	10 mM	Aiba e
MK-801	Antagonista	Recetor NMDA	100 mM	Shuttleworth, 2013
DNQX	Antagonista	Recetor AMPA/KA	20 µM	

Oubaína	Inibidor	Bomba Na/KATP	30 $\mu$ M	
APV	Antagonista	Recetor NMDA	30 $\mu$ M	
DCG-IV	Agonista	mGluR2	1 $\mu$ M	Beltrán <i>et al.</i> , 2012
NBQX	Antagonista	AMPA/KA	10 $\mu$ M	

Após a despolarização da membrana por indução química ou eléctrica ocorre a saída de zinco das vesículas presentes na zona pré-sináptica, a sua difusão até à zona pós-sináptica e a entrada nesta zona quando a estimulação é intensa (Frederickson, 2000; Colvin, 2003). Por este motivo os sinais de fluorescência de zinco sofrem um acréscimo significativo e se a aplicação de antagonistas e bloqueadores de receptores e canais pós-sinápticos eliminar os sinais de zinco, conclui-se que eles têm origem pós-sináptica. Caso contrário, são de natureza pré-sináptica. Matias (2001) induziu variações de zinco por meio de estimulação eléctrica tendo, posteriormente, adicionado antagonistas de recetores de AMPA/kainato e de NMDA, respetivamente CNQX (10  $\mu$ M) e D-APV (50  $\mu$ M). Os sinais de fluorescência de zinco não sofreram qualquer alteração o que demonstra a sua natureza pré-sináptica.

O zinco além de ser armazenado nas vesículas sinápticas é retido ao nível das mitocôndrias e ligado a proteínas. Deste modo, concentrações elevadas de zinco induzem a produção excessiva de ROS através da mitocôndria. Vários estudos apontam este metal como um precursor de doenças como isquemia, epilepsia, alzheimer, entre outras (Sensi *et al.*, 2011; Mocchegiani *et al.*, 2005; Morris e Levenson, 2012)

## 2.2 O impacto do stress oxidativo no cérebro

As espécies reativas de oxigénio assumem um papel fundamental nos sistemas biológicos, dado que quando presentes em concentrações normais assumem um papel de protecção celular. No entanto, quando se encontram em elevadas quantidades funcionam como precursores de várias doenças neurodegenerativas, nomeadamente isquemia.

Vários estudos utilizaram diversas sondas fluorescentes sensíveis a ROS, como se mostra na Tabela 2.4, de modo, a investigar as lesões e origens de diferentes patologias.

**Table 2.4- Sondas fluorescentes com elevada afinidade por ROS, concentrações e sistemas biológicos usados.**

Sonda Fluorescente	Concentração	Sistema Biológico	Referência
H <sub>2</sub> DCFDA	10 µM	Cultura celular	Liu <i>et al.</i> , 2003
H <sub>2</sub> DCFDA	0.5 mM	Sinaptossomas	Chalimoniuk <i>et al.</i> , 2006
H <sub>2</sub> DCFDA	45 µM	Fatias de Hipocampo	Fekete <i>et al.</i> , 2008
DCFH-DA	10 µM	Cultura celular	Zhou e Baudry, 2009
H <sub>2</sub> DCFDA	5 µM	Cultura celular	Funke <i>et al.</i> , 2011
Het	10 µM		
H <sub>2</sub> DCFDA	10 µM	Cultura celular	Jiang <i>et al.</i> , 2011
DHE	10 µM	Fatias de hipocampo e córtex	Zheng <i>et al.</i> , 2014
DHE	2.5 µM	Fatias medulares	Matott <i>et al.</i> , 2014

Segundo Zhou e Baudry (2009) a sonda fluorescente DCF é amplamente utilizada como indicador de stress oxidativo, tendo em conta a sua elevada sensibilidade. No entanto, em condições aeróbicas a produção do composto fluorescente DCFH origina radicais livres que, por sua vez, podem produzir os radicais superóxido e peróxido de hidrogénio, aumentando a fluorescência do DCF, pelo que deve ser usado em condições anaeróbicas. Nestas experiências foram testados os efeitos de EUK-207, uma enzima que funciona como antioxidante, em culturas privadas de glucose e de oxigénio (*oxygen and glucose deprivation, OGD*). Apenas 5 minutos de OGD provocam o aumento de ROS, verificando-se, no entanto, que no caso de culturas tratadas previamente com EUK-207 a formação de ROS é menor.

O efeito de outros metais na formação de ROS, nomeadamente do ferro, foi estudado por Liu *et al.* (2006). Estes investigadores avaliaram o papel do ferro nos danos neuronais, nomeadamente na formação de ROS e na apoptose. Foi aplicada durante 3, 6 e 24 horas uma solução de FeSO<sub>4</sub> (200 µM) e utilizando a sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA e uma câmara CCD, observaram um aumento na quantidade de ROS formado com o tempo de aplicação da solução. No entanto, a aplicação de EUK-134, uma enzima mimética da SOD/catalase que funciona como antioxidante, provocou uma diminuição nos danos provocados pelo ferro.

Funke *et al.* (2011), usando uma câmara CCD, demonstraram que H<sub>2</sub>DCFDA marca principalmente células de glia, o que torna medições exclusivamente em neurónios mais difíceis. Por outro lado, medições de fluorescência em culturas de fatias do hipocampo demonstram que a linha base sofre um aumento constante, provavelmente devido à foto-oxidação e auto-oxidação da sonda. Concluíram por isso que esta sonda é adequada para testes qualitativos mas não quantitativos.

Matott *et al.* (2014) aplicaram a fatias medulares diferentes fluxos de oxigénio, com 95% e 40% de O<sub>2</sub>. Através da sonda DHE e outros métodos, concluíram que o fluxo de 40% de O<sub>2</sub> não diminuía a viabilidade celular, e que pelo contrário, 95% de O<sub>2</sub> tornava as fatias hiperóxicas, ou seja a quantidade de ROS e NOS intracelulares eram mais elevadas. Deste modo, estudos com fatias de 300-400 µm deveriam ser feitos com um fluxo de O<sub>2</sub> inferior a 95%, diminuindo assim os danos provocados por ROS e NOS.

Com o objetivo de avaliar a morte celular, diversos estudos utilizaram iodeto de propídio (PI), tal como como ZHENG *et al.* (2014) que incubaram fatias de hipocampo em 20 µg/ml de PI de modo a complementar os resultados obtidos com a sonda fluorescente DHE sensível a ROS. Avaliaram os efeitos de OGD com um fluxo de 35% de O<sub>2</sub> e privadas de glucose em ratos alterados geneticamente ao nível do sistema renina-angiotensina (RAS), que estando presente no sistema nervoso central, assume um papel na aprendizagem, desenvolvimento, regulação da pressão sanguínea, apoptose e neurodegeneração, entre outras. Assim avaliaram as interações de diferentes componentes de RAS no cérebro em condições isquémicas (OGD) em animais hipertensos.

### **2.3 Estudo da LTP no hipocampo**

A LTP tem sido estudada essencialmente em dois tipos de sinapses do hipocampo:

- nas sinapses das fibras musgosas na zona CA3;
- nas sinapses d colaterais de Schaffer na área CA1.

As sinapses MF-CA3 são independentes da ativação dos recetores de NMDA e, aparentemente, dependem de mecanismos pré-sinápticos para que a LTP se mantenha (Harris and Cotman, 1986; Xiang *et al.*, 1994; Calixto *et al.*, 2003) (Tabela 2.5).

**Tabela 2.5- Tipo de LTP e zona do hipocampo de recolha de dados.**

LTP		Indução	Zona do hipocampo	Referência
Química	Elétrica			
✓	-	4 mM Ca <sup>2+</sup>	CA1	Turner <i>et al.</i> , 1982
✓	-	5/25 mM TEA	CA1	Aniksztejn e Ben-Ari, 1991
✓	.	25 mM TEA	CA1	Huber <i>et al.</i> , 1995
✓	-	5/10 mM Ca <sup>2+</sup>	CA1	Makhinson <i>et al.</i> , 1999
✓	-	25 mM TEA	CA1	Song <i>et al.</i> , 2002
✓	-	Método chemLTP	CA1	Chotiner <i>et al.</i> , 2003
-	✓	Método HFS	CA3	Calixto <i>et al.</i> , 2003
✓	-	25 mM TEA 10 mM Ca <sup>2+</sup>	CA1	Stewart <i>et al.</i> , 2005
✓	.	Indução tetânica	CA3	Quinta-Ferreira <i>et al.</i> , 2005
-	✓	Indução tetânica	CA3	Matias <i>et al.</i> , 2010
-	✓	Método HFS	CA1	Ma <i>et al.</i> , 2011

Segundo Calixto *et al.*, (2003) a LTP das fibras musgosas pode ser induzida eletricamente aplicando uma estimulação de elevada frequência (*high frequency stimulation*, HFS), por exemplo 100 pulsos a 100 Hz, repetidos 3 vezes com intervalos de 10 segundos. Após os pulsos observa-



se uma fase de potenciação pós-tetânica (*posttetanic potentiation*, PTP), formando-se, de seguida, a LTP. Através da utilização de dois bloqueadores, D-APV e MK-80, provou-se que a LTP das MF é independente dos recetores de NMDA, dado que o sinal da LTP não sofreu alterações. Por outro lado, a adição de inibidores de síntese proteica demonstrou que a LTP das sinapses MF-CA3 é dependente das proteínas e da síntese de RNA mensageiro.

A LTP na área CA1, por sua vez, é dependente da ativação dos recetores de NMDA, como demonstraram Makhinson *et al.* (1999) ao adicionar o bloqueador D-APV a sinais de cálcio. Ao expor fatias do hipocampo a uma solução de ACSF com 5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  surgiu uma pequena potenciação transitória dos sinais de cálcio, enquanto que 10 mM de cálcio originaram uma grande potenciação dos sinais, também transitória. Elevadas concentrações de cálcio provocaram a ativação de proteínas fosfatases que impediram uma potenciação permanente tendo-se, no caso de fatias tratadas previamente com inibidores destas proteínas, observado uma potenciação duradoura, provocada pelo cálcio. Vários estudos utilizaram o mesmo método de indução da LTP, designado chemLTP, que consiste na aplicação durante 10 minutos de 50  $\mu\text{M}$  de forskolina seguidos de 5 minutos de elevadas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$  (10 mM/30 mM) (Chotiner *et al.*, 2003).

A LTP induzida através de TEA, um bloqueador de canais de  $\text{K}^+$  dependentes do potencial, tem comportamentos diferentes consoante a concentração utilizada. Segundo Anikstzjen e Ben-Ari (1991) a utilização de 5 mM de TEA bloqueia apenas os canais de potássio tipo  $I_C$  e  $I_M$ , originando assim uma potenciação transitória dos sinais de cálcio. Por outro lado, a adição de 25 mM de TEA origina um aumento duradouro dos sinais, dado que bloqueia os canais dos tipos  $I_C$ ,  $I_M$  e  $I_K$ . A exposição de fatias a bloqueadores dos restantes subtipos de canais de potássio ( $I_Q$ ,  $I_A$  e  $I_D$ ) provoca uma depressão dos sinais que dura até 45-75 minutos após a remoção destes compostos do meio de perfusão. Song *et al.* (2002) designaram esta LTP induzida quimicamente por TEA-LTP, e os seus estudos na zona CA1 do hipocampo, em células piramidais CA1 e células granulares da fascia dentada, revelam a importância dos canais L-VDCCs para a formação da LTP, verificando-se que os canais T-VDCCs não são essenciais.

A LTP é um assunto largamente estudado não só em ratos, mas também noutros animais. Urban *et al.* (1996) estudaram estes mecanismos na zona CA3 de fatias de hipocampo de primatas, dado que a comparação com o organismo humano é mais fidedigna. Verificaram

que os mecanismos de indução que participam na LTP em ratos são semelhantes aos dos macacos.

## O papel do zinco na LTP

O papel do zinco nas sinapses é um assunto controverso, apontando alguns estudos para o seu efeito positivo na LTP e outros para a sua ação inibitória (tabela 2.6).

Tabela 2.6- Efeito do zinco na LTP.

LTP		Concentração de zinco	Efeito	Referência
Indução	Inibição			
-	✓	100 $\mu$ M	Bloqueio da LTP/LTD nas zonas CA3 e CA1	Xie e Smart, 1994
-	✓	Valores na gama dos $\mu$ M	Bloqueio da LTP/LTD na zona CA1	Izumi <i>et al.</i> , 2006
✓	-	Valores na gama dos nM	Promoção da LTP na zona CA1	Izumi <i>et al.</i> , 2006
✓	-	< 1 $\mu$ M	Facilita a produção de LTP na área CA1	Takeda <i>et al.</i> , 2009
✓	-	5 $\mu$ M	Potenciação da LTP após a sua indução tetânica	Takeda <i>et al.</i> , 2009
-	-	30 $\mu$ M	Não tem efeito após a indução tetânica da LTP	Takeda <i>et al.</i> , 2009
-	✓	100 $\mu$ M	Atenua a LTP na área CA1	Takeda <i>et al.</i> , 2010

Alguns estudos revelam que o zinco não é necessário para a formação da LTP das fibras musgosas, induzida pela aplicação de 2 tétanos, porque a LTP foi induzida na presença de quelantes de zinco (Quinta-Ferreira *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2011; Xie e Smart, 1994; Vog *et al.*, 2000). Por outro lado, Liu *et al.* (2000) e Li *et al.* (2001) mostraram que o uso de diferentes quelantes de zinco provocou o bloqueio da LTP.

Segundo Quinta-Ferreira *et al.* (2005) a aplicação de 6 e 4 tétanos provoca uma libertação massiva de zinco, o que causa uma inibição transitória da LTP. Isto é, elevadas

concentrações de  $Zn^{2+}$  interferem negativamente com a formação da potenciação de longa duração.

Izumi *et al.* (2006) referem o zinco como um antagonista endógeno para os recetores de NMDA. O zinco em concentrações baixas, na gama de  $\mu M$ , bloqueou o recetor NR1/NR2B (subtipo do recetor de NMDA) provocando o bloqueio da LTD. Por outro lado, 100  $\mu M$  de zinco impediram a formação da LTP, através da combinação de efeitos nos dois sítios de ligação, NR1/NR2A e NR1/NR2B. Em concentrações nanomolares, presentes no fluido extracelular cerebral,  $Zn^{2+}$  promoveu a LTP. Takeda *et al.* (2009) apresentaram resultados semelhantes, tendo baixas concentrações de zinco (1 e 5  $\mu M$ ) permitido a formação da LTP após indução tetânica.

Elevadas concentrações de zinco (100  $\mu M$ ) provocam a atenuação da LTP, induzida por tétanos, no entanto, a adição de 10  $\mu M$  de CNQX, reverteu aquela diminuição (Takeda *et al.*, 2010; Takeda *et al.*, 2011), considerando-se que este antagonista de recetores de AMPA/KA diminui o fluxo de entrada de zinco na zona pós-sináptica.

Jiang *et al.* 2011 submeteram um grupo de ratos a uma dieta pobre em zinco, durante 4 semanas. Posteriormente, estudos realizados em fatias do hipocampo dos mesmos ratos demonstraram que a LTP sofreu uma diminuição significativa em relação ao grupo de controlo, com uma alimentação normal em zinco. Dos estudos referidos conclui-se que a libertação de elevadas concentrações de zinco produz efeitos negativos na LTP e que quantidades “normais” são essenciais para a LTP e para o bom funcionamento cerebral.

### **Espécies reativas de oxigénio e LTP**

Pellmar *et al.*, (1991) foi pioneiro na descoberta do bloqueio da LTP na presença de ROS. A exposição prolongada de fatias de hipocampo a 0.5-1.5 mM de peróxido de hidrogénio impediu a formação da LTP. No entanto, 30  $\mu M$  de  $H_2O_2$  já são suficientes para bloquearem a LTP (Auerbach e Segal, 1997). A inserção de um “scavenger” de peróxido de hidrogénio (a catalase) permitiu uma recuperação parcial da LTP (Klann *et al.*, 1998).

Ma *et al.*, (2011) estudaram o efeito de antioxidantes em fatias do hipocampo de ratos modificados geneticamente, com acumulações anormais de  $\beta$ -amilóide, que é característico da

doença de Alzheimer. A LTP nas fatias assumia um comportamento instável, diminuindo os sinais eléctricos após a potenciação sendo, na presença de antioxidantes a diminuição dos sinais eléctricos mais lenta, o que sugere que as espécies reativas de oxigénio têm um efeito negativo na LTP.

No entanto, o radical superóxido parece ser necessário para a formação da LTP, pois segundo Bindokas *et al.*, (1998) a ativação dos recetores de NMDA em fatias do hipocampo resulta na produção de superóxido dependente do cálcio.

## 2.4 O antibiótico sulfametoxazole

Geralmente, os fármacos são absorvidos no organismo após a ingestão, onde são sujeitos a várias reações metabólicas. Contudo, uma fração não metabolizada dessas substâncias originais sai dos organismos humanos por via urinária e/ou fecal. Assim, vários antibióticos da classe das sulfonamidas têm sido encontrados em águas residuais de todo o mundo, como é o caso do sulfametoxazole SMX). No caso do SMX cerca de 15% deste composto é excretado pelo organismo humano, sem sofrer qualquer metabolismo (Hirsch *et al.*, 1999). Vários estudos recolheram amostras de distintas localizações mundiais, em águas subterrâneas, profundas e em águas residuais, após o uso doméstico, industrial ou comercial (tabela 2.7). Por outro lado, as amostras de efluentes foram recolhidas após uma estação de tratamento aleatória. Deste modo, têm sido feitos diversos esforços para a obtenção de métodos eficazes no tratamento destas águas residuais.

**Tabela 2.7 - Concentração do antibiótico sulfametoxazole em distintas localizações.**

Concentração	Localização	Tipo de águas	Referência
0,40 µg/L		Águas residuais	
0,03 µg/L	Alemanha	Águas de superfície	Hirsch <i>et al.</i> , 1999
não detetado		Águas subterrâneas	
0,09 µg/L	Nordeste de Lion, França		
0,07 µg/L	Sul de Lion, França	Águas residuais	Andreozzi <i>et al.</i> , 2003
0,09 µg/L	Creta, Grécia		

0,01 µg/L	Latina, Itália		
0,03 µg/L	Nápoles, Itália		
0,02 µg/L	Gotemburgo, Suécia		
0,4 µg/L	Alemanha		
2,0 µg/L	Suíça		
0,58 µg/L	Galiza, Espanha	Águas residuais	Carballa <i>et al.</i> , 2004
0,25 µg/L		Efluentes	
0,2 nM	Ontário, Canadá	Efluentes	Gagné <i>et al.</i> , 2006

As sulfonamidas são amplamente usadas ao nível humano e veterinário, ocorrendo por isso um acréscimo na bioacumulação no ambiente, o que origina efeitos tóxicos a longo prazo. A exposição prolongada a águas contaminadas provoca a resistência a estes antibióticos, surgindo assim um problema de saúde pública (Tian *et al.*, 2013). Vários processos físico-químicos têm sido desenvolvidos com o intuito de tratar as águas eficazmente, tais como:

- oxidação;
- resinas de troca iónica;
- osmose reversa;
- adsorção.

Apesar das bactérias serem o alvo dos antibióticos, as algas eucarióticas sofrem danos ao nível dos cloroplastos e mitocôndrias quando expostas aos mesmos. As algas fotossintéticas constituem a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos, por isso, efeitos ao nível destas algas provocam danos em organismos superiores na cadeia alimentar. Alguns estudos apontam os antibióticos como inibidores da fotossíntese, provocando a sobreexcitação da clorofila, o que pode induzir a formação de ROS nas células de algas (Nie *et al.*, 2013). Segundo Nie *et al.* (2013) algas *Pseudokirchneriella subcapitata*, expostas a quantidades entre 0 e 2.5 mg/L de SMX provocam vários danos celulares. A peroxidação lipídica das membranas sofreu um aumento de 329% com a concentração máxima de SMX, indicando um acréscimo acentuado de stress oxidativo, dado que a peroxidação lipídica é induzida por ROS e afeta a viabilidade celular. No entanto, promove um aumento na capacidade total de antioxidantes das células,

nomeadamente ao nível da enzima GST, uma ferramenta fundamental no combate aos danos provocados por xenobióticos e stress oxidativo.

Segundo Jesùs *et al.* (2011) em 14 amostras de águas de estações de tratamento, recolhidas ao longo do rio Ebro em Espanha, a classe de antibióticos sulfonamidas é dos compostos encontrados com maior frequência, tendo numa área sido recolhidas amostras com 596 ng/L e 650 ng/L de SMX em 2007 e 2008, respetivamente.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Detecção dos sinais ópticos

O equipamento usado na aquisição dos sinais ópticos, por transfluorescência, é constituído por um microscópio não invertido (Zeiss Axioskop), que contém uma fonte de luz de halogéneo como mostra a figura 3.1. Foram ainda usados dois diafragmas:

- diafragma de campo – para ajustar a iluminação da preparação;
- diafragma de abertura – para limitar a área da qual são recolhidos os dados.

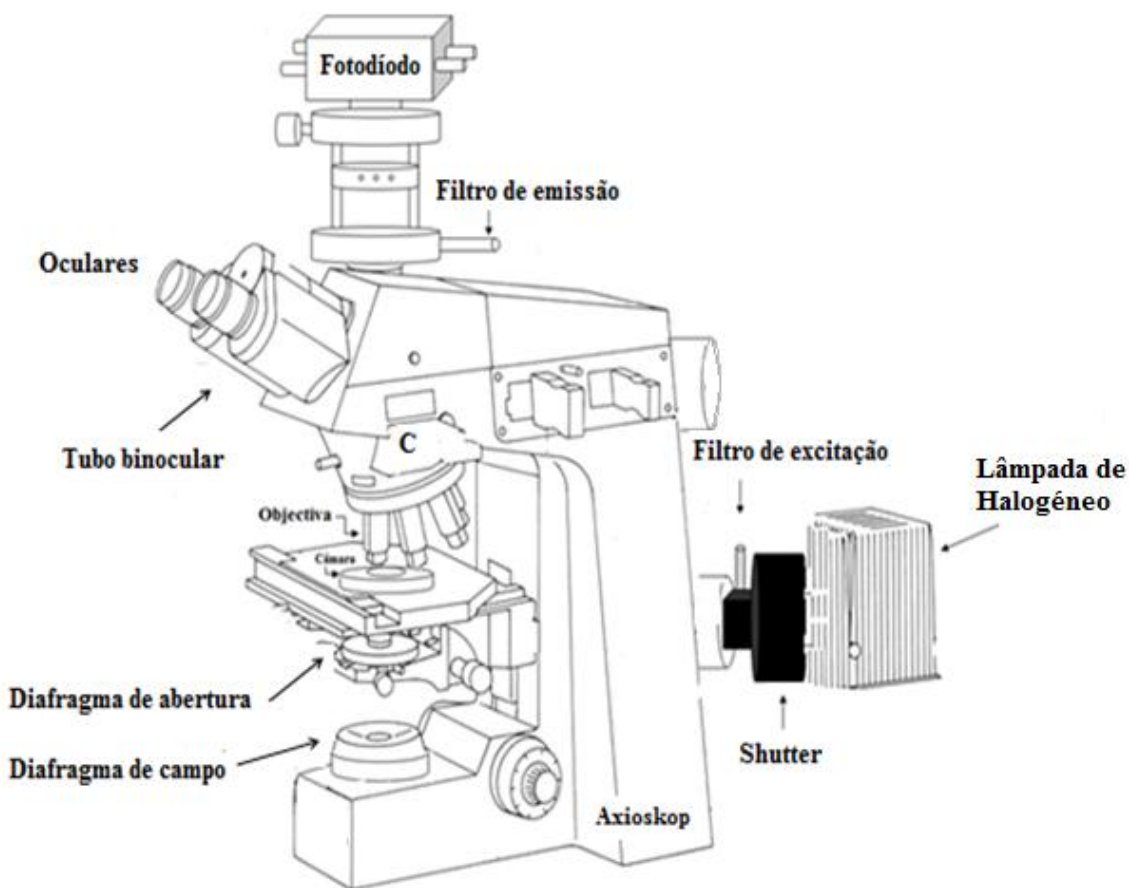


Figura 3.1- Microscópio de fluorescência usado na obtenção dos sinais ópticos.

A luz foi focada na preparação utilizando uma objetiva de imersão em água (40x, N.A., 0,75). Com o intuito de seleccionar a luz emitida e remover a contaminação provocada pela luz incidente

, utilizou-se um filtro passa-alto de 500 nm. Os sinais de fluorescência foram registados usando um fotodíodo de silício (Hamamatsu, com área de 1 mm<sup>2</sup>). O sinal oriundo do fotodíodo era conduzido através dum conversor corrente/tensão (I/V) com uma resistência de realimentação de 1 GΩ, com a saída ligada a um amplificador AC (com ganho 1000) e uma baixa frequência de corte (1 Hz). Por último, os sinais foram processados digitalmente usando um conversor analógico/digital de 16 bits , a uma frequência de 0,03 Hz.

### **3.1 Dissecção e obtenção das fatias do hipocampo**

Nas experiências foram usadas fêmeas de ratos Wistar com 12 a 16 semanas, sacrificadas por deslocamento cervical. Após a remoção da pele da cabeça, retiraram-se os ossos do crânio com a ajuda de uma tesoura, tendo este processo início na zona occipital até á frente, ao longo das suturas dos ossos parietais. Durante todo o processo seguinte, o cérebro foi irrigado com solução ACSF gelada. Deste modo, com a ajuda duma espátula, e utilizando um movimento circundante, procedeu-se á separação do córtex dos nervos cranianos e dos nervos ópticos. Assim, o córtex foi retirado e colocado em solução ACSF gelada.

Posteriormente, o cérebro foi colocado sobre uma caixa de Petri gelada forrada com papel de filtro embebida em solução ACSF. De seguida, fez-se um corte entre os dois hemisférios, procedendo-se assim à dissecção do hipocampo. Fez-se um corte na fímbria e outro no córtex entorrinal, com a ajuda duma espátula o hipocampo foi cuidadosamente separado dos restantes tecidos. Todo o procedimento anterior foi repetido para o outro hemisfério.

O hipocampo foi colocado sobre a mesma caixa de Petri, ficando o *alveus* situado dorsalmente. Fizeram-se várias fatias transversais na zona do terço médio do hipocampo, com a ajuda dum instrumento com 5 lâminas e 6 separadores, originando fatias com 400 µm de espessura. As fatias, removidas cuidadosamente com a ajuda de um pincel, eram colocadas num



recipiente de incubação com solução ACSF oxigenada (95% O<sub>2</sub> , 5% CO<sub>2</sub>), à temperatura ambiente.

### 3.3.1 Medição de sinais de zinco

As medições fluorimétricas de zinco foram obtidas através da forma permeante do indicador Newport Green (NG). O espectro de emissão do NG está representado na figura 3.2, tendo sido utilizado um comprimento de onda de excitação de 480 nm e recolhida luz emitida acima de 500 nm.

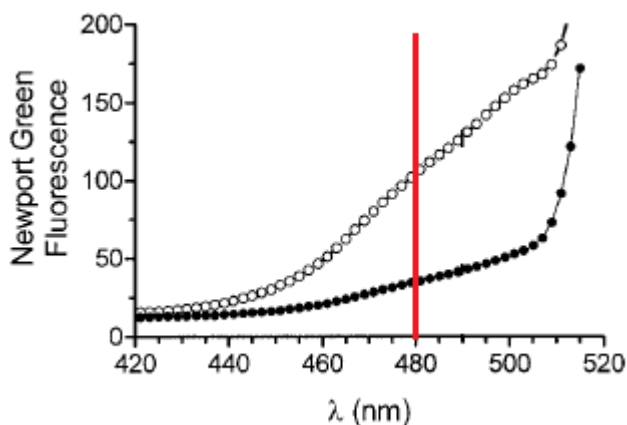


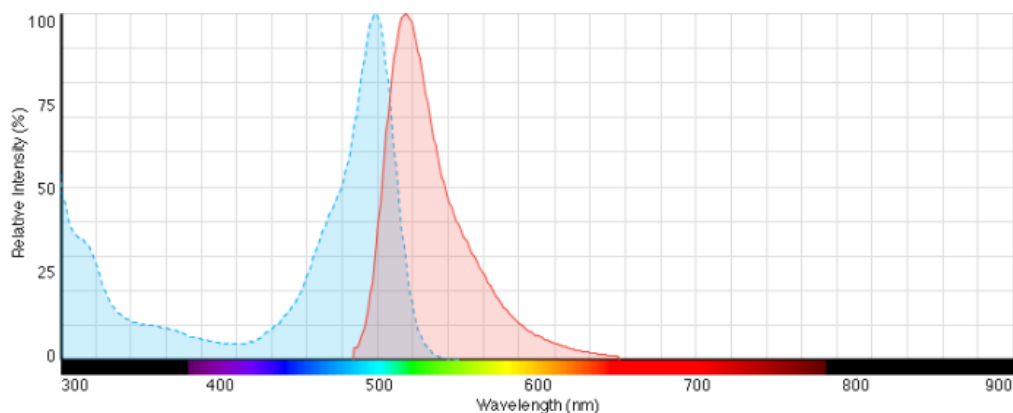
Figura 3.2 - Espectro de emissão do Newport Green (Adaptado de Dineley *et al.*, 2002).

As fatias foram incubadas com o indicador numa concentração final de 5 μM, durante 60 minutos, à temperatura ambiente, sendo constantemente oxigenadas (5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub>). Esta solução de NG foi obtida dissolvendo 1 mg em 250 μl de DMSO e diluindo, posteriormente, 5 μl desta mistura (DMSO + NG) em 5 ml de ACSF e 5 μl de ácido plurónico F-127.

### 3.3.2 Obtenção de sinais de ROS

Para o registo de sinais de espécies reativas de oxigénio utilizou-se a forma permeante do indicador H<sub>2</sub>DCFDA. Os espectros de excitação e de emissão deste indicador estão

representados na figura 3.3, tendo sido usado o comprimento de onda de excitação de 480 nm e detectada a luz emitida por meio de um filtro passa alto de 500 nm.



**Figura 3.3 - Espectro de emissão/excitação de H<sub>2</sub>DCFDA (Adaptado de H<sub>2</sub>DCFDA (H<sub>2</sub>-DCF, DCF) Molecular Probes).**

As fatias foram incubadas com uma concentração de H<sub>2</sub>DCFDA de 20 mM, durante 60 minutos, à temperatura ambiente, numa solução oxigenada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. Aquela concentração foi obtida dissolvendo 9,74 mg do indicador em 2 ml de DMSO. Posteriormente, foram diluídos 20 µl desta mistura em 20 ml de solução ACSF.

### 3.4 Análise de dados

Os sinais ópticos foram tratados por meio do software Signal Express™ da National Instruments. Os sinais medidos representam variações de fluorescência ( $\Delta F$ ), ou seja, a diferença entre o valor F e o valor basal, obtido depois de ter sido subtraído o valor da autofluorescência da fatia do hipocampo, medida numa fatia não incubada. Em alguns casos, os dados ópticos foram representados graficamente por meio da média e do desvio padrão.

### 3.5 Soluções

Todas as soluções eram constantemente oxigenadas com 5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub> e aquecidas em banho maria, a uma temperatura de 37 °C. Uma bomba de perfusão controlava o nível de líquido na câmara experimental onde permanecia a fatia do hipocampo, com um caudal de 1.5-2 ml/min.

**Solução ACSF:** a solução cérebroespinal artificial, como o nome indica, imita o meio extracelular, e era composta por:

- 124 mM de NaCl
- 3,5 mM de KCl;
- 24 mM de NaHCO<sub>3</sub>;
- 1,25 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- 2 mM de CaCl<sub>2</sub>;
- 2 mM de MgCl<sub>2</sub>;
- 10 mM de D-glucose.

Após a preparação, a solução era oxigenada durante 10 minutos, sendo posteriormente armazenada a 5°C até ser utilizada.

**Solução ACSF Modificada:** com o intuito de induzir quimicamente a LTP, preparou-se uma solução com:

- 124 mM de NaCl
- 3,5 mM de KCl;
- 24 mM de NaHCO<sub>3</sub>;
- 1,25 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- 2 mM de MgCl<sub>2</sub>;
- 10 mM de D-glucose;
- 10 mM de CaCl<sub>2</sub>;
- 25 mM de TEACl.

A solução foi preparada adicionando todos os compostos exceptuando  $\text{CaCl}_2$ , sendo necessário saturar a solução com carbogénio durante dez minutos. Após esse intervalo de tempo, adicionava-se então o cloreto de cálcio.

**Solução de sulfametoxazole (SMX):** preparou-se uma solução stock de SMX dissolvendo 11,25 mg do composto em 25 ml de etanol, obtendo-se uma concentração de 0,12 M. Nas experiências foram usadas as seguintes concentrações:

- [45 mg/L]- diluíram-se 50  $\mu\text{l}$  de solução stock em 50 ml de solução ACSF;
- [135 mg/L]- diluíram-se 150  $\mu\text{l}$  de solução stock em 50 ml de solução ACSF;

**Solução de TPEN [20  $\mu\text{M}$ ]:** preparou-se dissolvendo 8,5 mM de TPEN em 1 ml de etanol, originando uma solução stock de 20 mM. De seguida, diluíram-se 100  $\mu\text{l}$  em 100 ml de ACSF, obtendo-se uma solução com uma concentração final de 20  $\mu\text{M}$ .

**Solução de cloreto de zinco [1 mM]:** para se obter uma solução stock de 0,1 M dissolveram-se 0,3407 g de  $\text{ZnCl}_2$  em 25 ml de água ultra pura. Retirou-se 1 ml desta solução stock e juntou-se a solução ACSF de modo a obter 100 ml da mistura com uma concentração de 1 mM.

**Solução de cloreto de potássio:** foi preparada uma solução stock de 2 M, obtida através da dissolução de 14,91 g em 100 ml de água ultra pura. Nas experiências foram utilizadas diferentes concentrações:

- [6 mM]- diluindo 150  $\mu\text{l}$  da solução stock em 50 ml de ACSF;
- [10 mM]- diluindo 0,25 ml da solução stock em 50 ml de ACSF;
- [20 mM]- diluindo 0,5 ml da solução stock em 50 ml de ACSF;
- [60 mM] – diluindo 1,5 ml da solução stock em 50 ml de ACSF.

**Solução de nifedipina [10  $\mu\text{M}$ ]:** dissolveram-se 5 mg deste composto em 1,5 ml de DMSO, obtendo-se uma solução stock de 10 mM. A solução final com uma concentração de 10  $\mu\text{M}$  foi obtida adicionando 100  $\mu\text{l}$  da solução inicial a 100 ml de ACSF.

**Solução de D-AP5 [50  $\mu\text{M}$ ]:** adicionaram-se 5 mg de D-AP5 a 0,5 ml de água ultra pura ([50 mM]). Para a solução final, com uma concentração de 50  $\mu\text{M}$ , juntaram-se 100  $\mu\text{l}$  da solução stock a 100 ml de ACSF.

**Solução NBQX [10  $\mu\text{M}$ ]:** de modo a obter uma concentração de 10 mM para a solução stock dissolveram-se 5 mg do respetivo composto em 1,3 ml de água ultra pura. Assim para a solução usada, com uma concentração de 10  $\mu\text{M}$ , adicionaram-se 100  $\mu\text{l}$  da solução stock a 100 ml de ACSF.

### 3.6 Produtos químicos utilizados

Os produtos foram obtidos em:

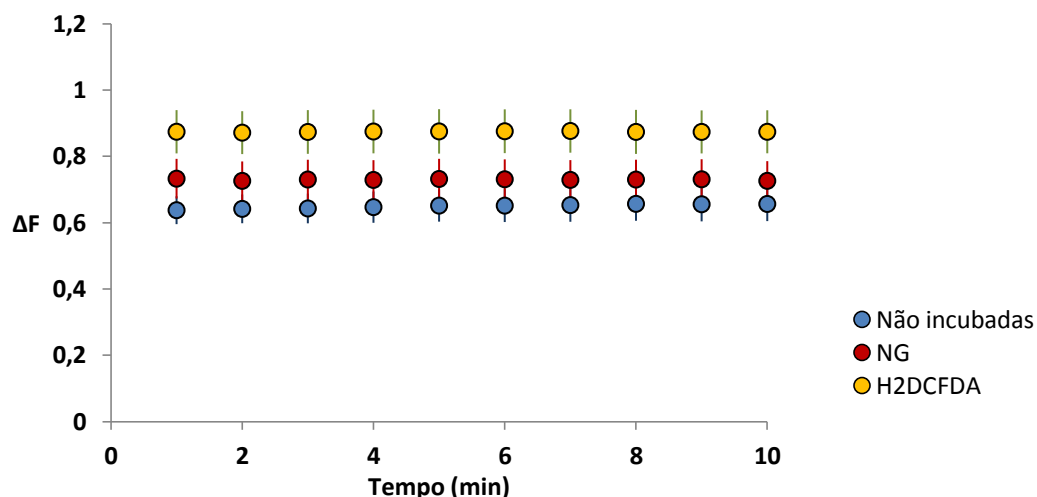
- Sigma – Aldrich (Sintra-Portugal):
  - ⇒ NaCl;
  - ⇒ D-Glucose;
  - ⇒ TEACl;
  - ⇒ SMX;
  - ⇒ NBQX;
  - ⇒ D-AP5;
  - ⇒ Nifedipina;
  - ⇒ TPEN.
- Merck (Lisboa, Portugal):
  - ⇒  $\text{NaHCO}_3$ ;
  - ⇒ KCl;
  - ⇒  $\text{ZnCl}_2$ ;
  - ⇒  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;
- Molecular Probes by Life Technologies (Carlsbad, Canadá):
  - ⇒ Pluronic-F-127;
  - ⇒ NG;
  - ⇒  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Fluorescência basal na área CA3 do hipocampo

As experiências foram efetuadas em fatias do hipocampo, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3, sendo obtidos valores de emissão de fluorescência acima de 500 nm, usando um comprimento de onda de excitação de 480 nm. Os sinais foram recolhidos em grupos de 100 pontos por minuto e calculada a sua média, obtendo-se assim um valor médio por minuto.

De cada hipocampo eram recolhidos 10 sinais, de minuto a minuto, de fatias não incubadas, obtendo-se valores de fluorescência utilizados posteriormente na correção da autofluorescência das fatias incubadas com indicadores. A figura 4.1, representa valores de fluorescência obtidos durante 10 minutos em fatias não incubadas e em fatias incubadas com o indicador de zinco Newport Green e com o indicador de ROS H<sub>2</sub>DCFDA. Os resultados das fatias não incubadas provêm de 7 experiências (n = 7), enquanto que os das fatias incubadas são de 8 experiências cada (n = 8). Pela análise da figura 4.1 conclui-se que as fatias não incubadas possuem os valores de fluorescência mais baixos, sendo seguidos pelas fatias incubadas com o indicador Newport green. As fatias incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA têm os valores de fluorescência mais elevados.



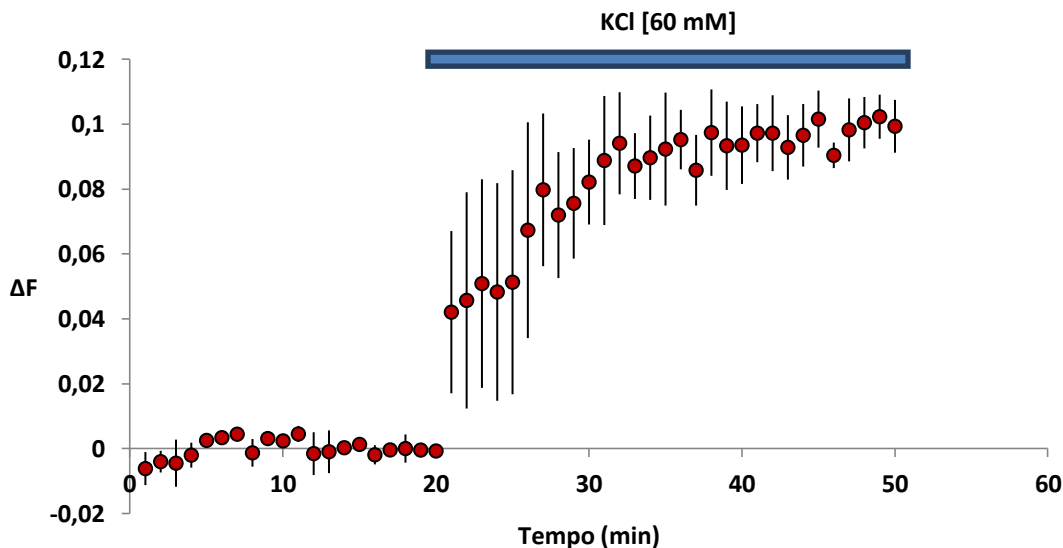
**Figura 4.1 - Intensidade de fluorescência em fatias não incubadas e incubadas com Newport green e com H<sub>2</sub>DCFDA, na área CA3 do hipocampo.** Os sinais das fatias não incubadas foram registados durante 10 minutos em solução ACSF (n = 7). Os sinais de fluorescência das fatias do hipocampo incubadas com NG (n = 8) e com H<sub>2</sub>DCFDA (n = 8) foram medidos durante o mesmo período de tempo.

## 4.2 Sinais obtidos em fatias incubadas com Newport green

Fatias do hipocampo foram incubadas com o indicador Newport Green na forma permeante, com uma concentração de 5  $\mu\text{M}$ . A incubação ocorreu durante 60 minutos, com constante oxigenação. Após esse período de tempo as fatias foram colocadas na solução ACSF oxigenada até serem transferidas para a câmara experimental, para a realização de uma experiência.

### 4.2.1. Efeito do KCl em sinais de zinco

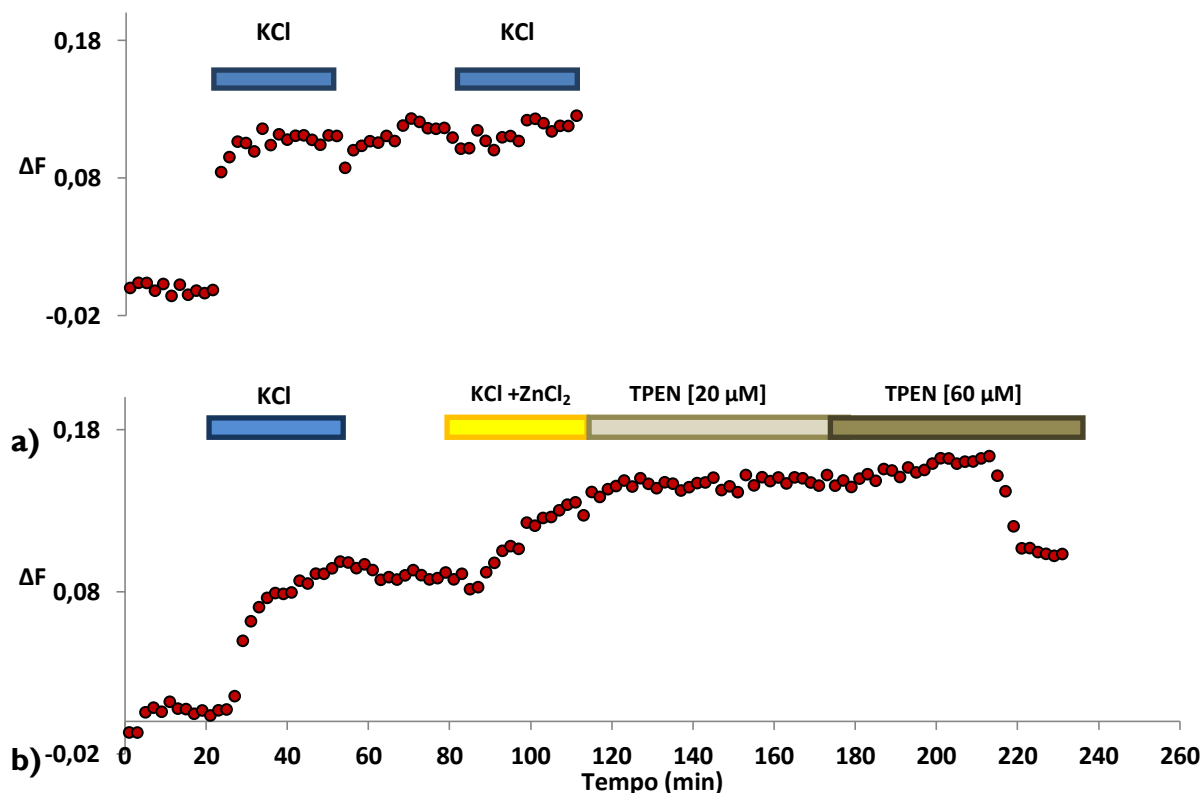
Inicialmente, as fatias foram colocadas na câmara de registo e presas nas extremidades com pequenos arame de cobre. Nos primeiros 20 minutos, as fatias eram expostas à solução ACSF, à temperatura de 37 °C. Posteriormente, adicionou-se cloreto de potássio, com uma concentração de 60 mM, às fatias durante 30 minutos (figura 4.2). Na figura podem observar-se variações de sinais de zinco medidas com o indicador NG em duas experiências (n=2). A mesma figura mostra que o cloreto de potássio provoca um aumento daqueles sinais.



**Figura 4.2-** Efeito de KCl em sinais de fatias incubadas com o indicador de zinco Newport Green, obtidos na zona CA3 do hipocampo. Durante o período de 30 minutos abrangido pela barra azul as fatias estiveram expostas a uma solução de KCl (60 mM) (n = 2). Os dados representam a média  $\pm$  s.e.m.

Existem diversas formas de investigar os movimentos de zinco na região sináptica, incluindo a adição de zinco no meio extracelular. Para garantir que o zinco é o responsável pelos sinais de fluorescência obtidos com o indicador NG aplicou-se o quelante de zinco TPEN. Como mostra a figura 4.3, após a despolarização da fatia com KCl (60 mM) voltou-se à solução ACSF, não tendo os valores de fluorescência de zinco regressado à linha base. Estes valores mantiveram-se em ACSF o que indica que o KCl origina uma potenciação do sinal, não sendo portanto o seu efeito reversível no período da observação. Na figura 4.3a repetiu-se um ciclo de KCl com a mesma concentração, no entanto, a fatia não respondeu como inicialmente, mantendo-se os níveis de fluorescência constantes, de acordo com a ideia da potenciação induzida por KCl.

Deste modo, é possível afirmar que o valor medido a cerca de 80 minutos na figura 4.3b se deve à adição de  $ZnCl_2$  com uma concentração de 1 mM. Posteriormente, a fatia foi sujeita a TPEN, um quelante com elevada afinidade pelo zinco. Inicialmente, utilizou-se uma concentração de 20  $\mu M$  de TPEN, no entanto, não se registando qualquer alteração nos valores de fluorescência, aumentou-se a concentração para 60  $\mu M$ . Com esta concentração, é possível observar nos últimos 60 minutos um decréscimo acentuado nos valores de fluorescência.

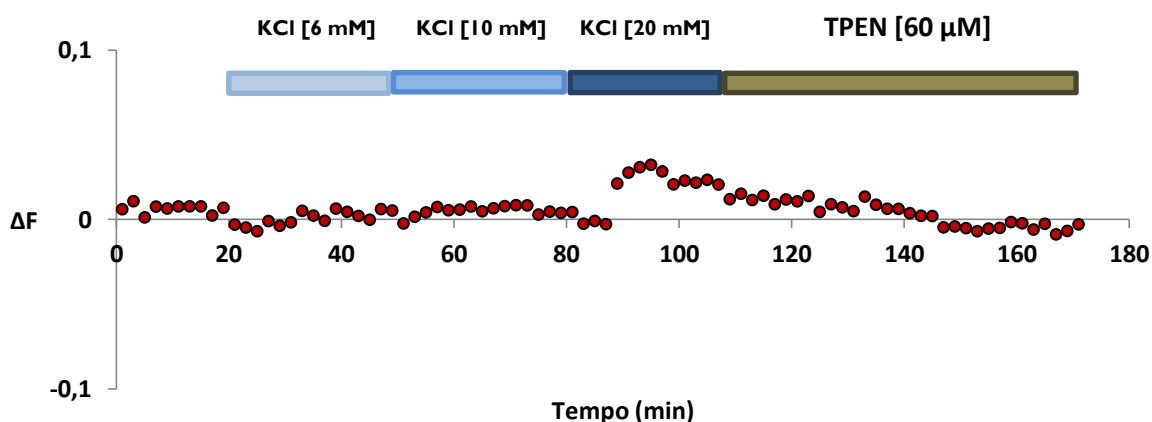




**Figura 4.3- Variações de sinais obtidos com Newport Green na área CA3 do hipocampo, induzidos com KCl, zinco exógeno e efeito do quelante de zinco TPEN.** a) fatias sujeitas duas vezes a KCl [60mM]. b) fatias expostas a KCl [60mM] durante 30 minutos e depois a uma mistura de KCl [60mM] e ZnCl<sub>2</sub> [1 mM], Por último, perfundiui-se uma solução de TPEN [20 mM] nos primeiros 60 minutos e [60 mM] no restante tempo. Cada ponto representa a média de 2 pontos consecutivos.

Com o intuito de entender qual a concentração necessária de KCl para provocar alterações nos sinais de zinco foram preparadas três soluções com diferentes concentrações de cloreto de potássio. Todos os sinais de zinco das fatias foram inicialmente medidos durante 20 minutos na solução ACSF, para se aferir se a fatia estava em boas condições e ter uma linha base. Na figura 4.4 os primeiros 20 minutos mantêm-se estáveis, portanto aplicou-se uma solução de KCl (6 mM) durante 30 minutos. Esta concentração não provocou qualquer alteração nos sinais de zinco.

De seguida, adicionou-se uma solução um pouco mais concentrada, com 10 mM de KCl. Na figura 4.4 observa-se que esta concentração também não causou variações de fluorescência. Por último, aumentou-se a concentração para 20 mM, durante 30 minutos. Neste caso os sinais de fluorescência do zinco sofreram um aumento com um valor máximo aos 90 minutos.. De modo a confirmar a origem iônica dos sinais medidos, aplicou-se uma solução de 60 μM do quelante de zinco TPEN. Verificou-se que neste meio os sinais de fluorescência diminuíram até ao nível base, como era de esperar pois o TPEN deve complexar a maior parte do zinco presente no sistema.



**Figura 4.4 – Efeitos de diferentes concentrações de KCl em sinais obtidos com Newport Green, na área CA3 do hipocampo.** Após 20 minutos em ACSF as fatias foram expostas a diferentes concentrações de KCl: nos primeiros 30 minutos

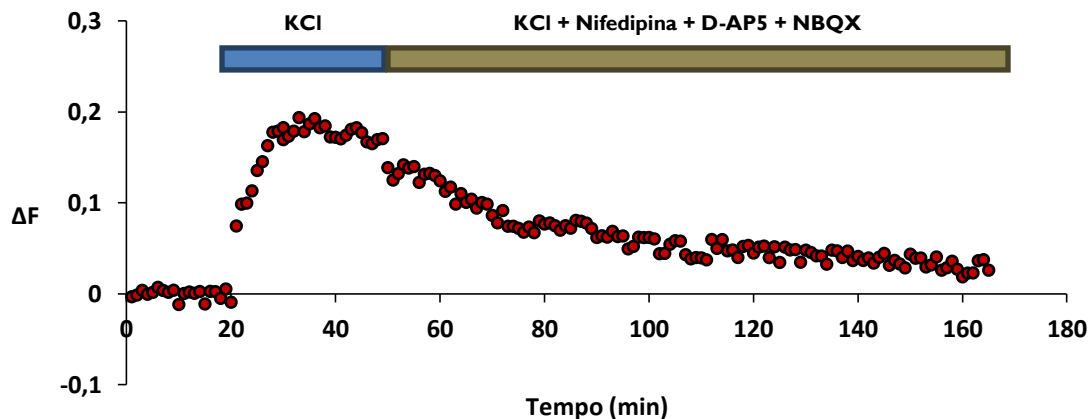
foi inserido KCl [6 mM], de seguida KCl [10 mM] e por fim, KCl [20 mM]. Os sinais diminuíram em TPEN [60  $\mu$ M], aplicado durante 60 minutos. Cada ponto representa uma média de 2 pontos consecutivos.

De modo a avaliar a natureza pré- ou pós-sináptica dos sinais de fluorescência de zinco, registados em fatias do hipocampo, adicionou-se ao meio de perfusão normal (ACSF) um conjunto de substâncias que são antagonistas de recetores de glutamato ou bloqueadores de VDCCs presentes na membrana plasmática da célula pós-sináptica.

Como observado na figura 4.5 foi induzido um aumento da fluorescência de zinco através duma solução de KCl (20 mM), aplicada durante 30 minutos. Posteriormente, durante 130 minutos acrescentaram-se os seguintes compostos:

- nifedipina- [10  $\mu$ M], bloqueador de L-VDCCs;
- D-AP5- [50  $\mu$ M], antagonista de recetores de NMDA;
- NBQX- [10  $\mu$ M], antagonista de recetores de AMPA.

A inserção destas substâncias provocou uma diminuição quase total dos sinais de zinco.



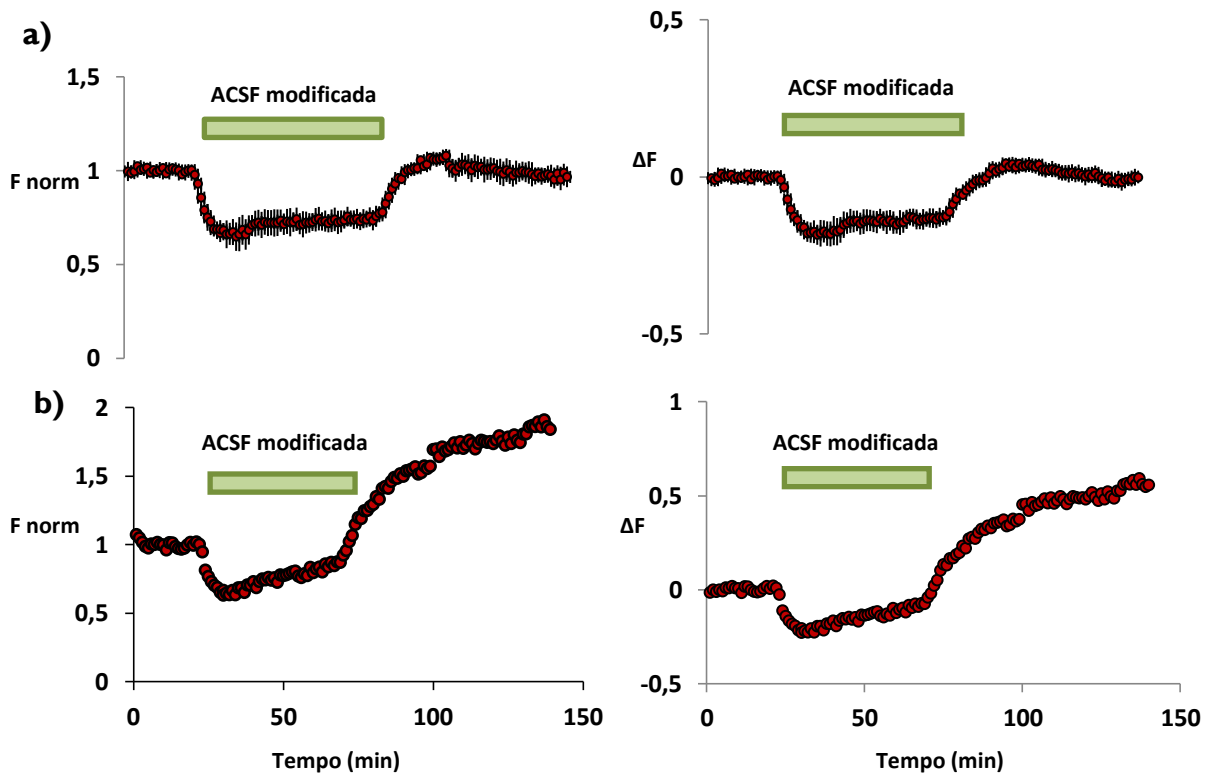
**Figura 4.5 – Diminuição dos sinais de zinco na área CA3 do hipocampo, em fatias incubadas com o indicador Newport Green, expostas a uma solução de bloqueadores de canais de cálcio e recetores de glutamato.** As fatias foram sujeitas a uma solução de 20 mM de KCl durante 30 minutos, de seguida, adicionou-se uma mistura de KCl ([20 mM]), nifedipina ([10  $\mu$ M]), D-AP5 ([50  $\mu$ M]) e NBQX ([10  $\mu$ M]) durante 130 minutos. Os pontos representam uma média de 2 pontos consecutivos.

#### 4.2.2 Impacto de ACSF modificada em sinais de zinco

Com o objetivo de avaliar o comportamento dos sinais de fluorescência de zinco quando aplicada a solução ACSF modificada, ou seja, além dos componentes presentes na solução dita “normal” de ACSF adicionou-se 25 mM de TEACl, que bloqueia os canais de potássio, e [10 mM] de  $\text{CaCl}_2$ . Conforme demonstrado na figura 4.6, os dados foram avaliados de duas formas:

- normalizados pela média das 10 primeiras respostas em ACSF (F norm);
- subtraídos da linha base ( $\Delta F$ ), que consiste na média dos primeiros 20 pontos.

Os cursos temporais das variações são semelhantes nos dois casos, tendo-se usado a última essencialmente quando não se tinham valores de autofluorescência do mesmo conjunto de fatias.

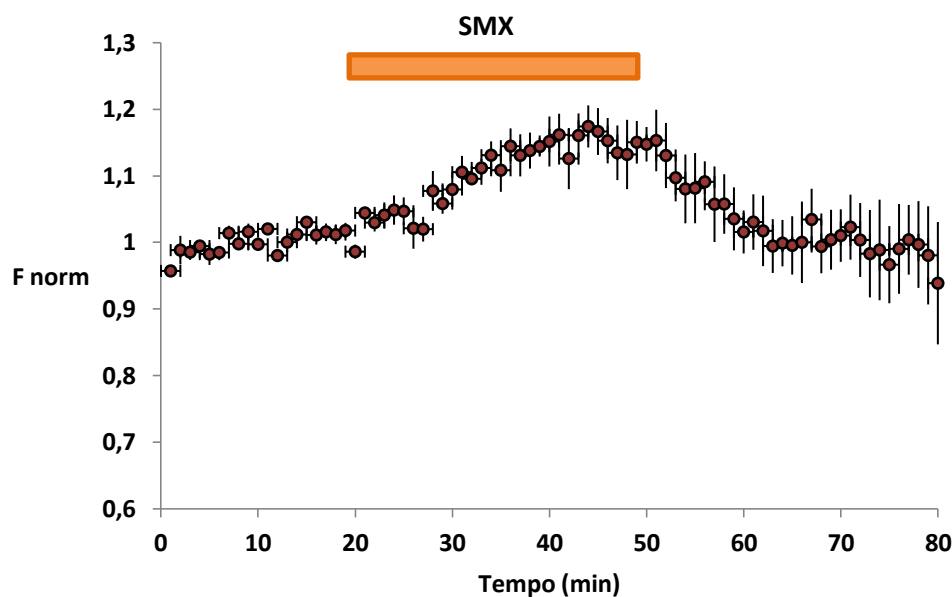


**Figura 4.6 – Decréscimo dos sinais de zinco obtidos com NG na solução ACSF modificada, em fatias do hipocampo de rato.** As fatias foram expostas durante 60 minutos a uma solução ACSF com mais cálcio [10 mM] e TEACl [25 mM]. Após 50 minutos da solução ACSF modificada voltou-se à solução ACSF, a) os sinais regressam ao valor inicial (n=3). b) voltando a ACSF os sinais aumentam sempre.

Na figura 4.6 observa-se que os valores de fluorescência de NG diminuem nos 50 minutos em que a solução ACSF modificada é adicionada às fatias. No entanto, quando se adiciona novamente a solução normal de ACSF em a) os níveis de zinco aumentam até um valor próximo da linha base, mantendo-se estáveis ao longo do tempo (n=3). Em b) os sinais aumentam sem estabilizarem em qualquer valor.

#### 4.2.3 Efeito do antibiótico sulfametoxazole em sinais de zinco obtidos com NG

De modo a avaliar o efeito do antibiótico SMX em fatias de hipocampo incubadas com NG, elas foram expostas durante 30 minutos a uma solução de sulfametoxazole [45 mg/l]. Durante esse intervalo de tempo os níveis de zinco aumentaram cerca de 15 %. No entanto, quando se colocaram as fatias novamente em ACSF os valores de fluorescência retornaram aos iniciais.



**Figura 4.7 - Aumento dos sinais de zinco medidos com NG, durante a aplicação do antibiótico sulfametoxazole, em fatias do hipocampo de rato.** Durante 30 minutos foram recolhidos sinais da zona CA3 em fatias sujeitas a 45 mg/L de SMX (n=3). Os dados representam a média  $\pm$  s.e.m.

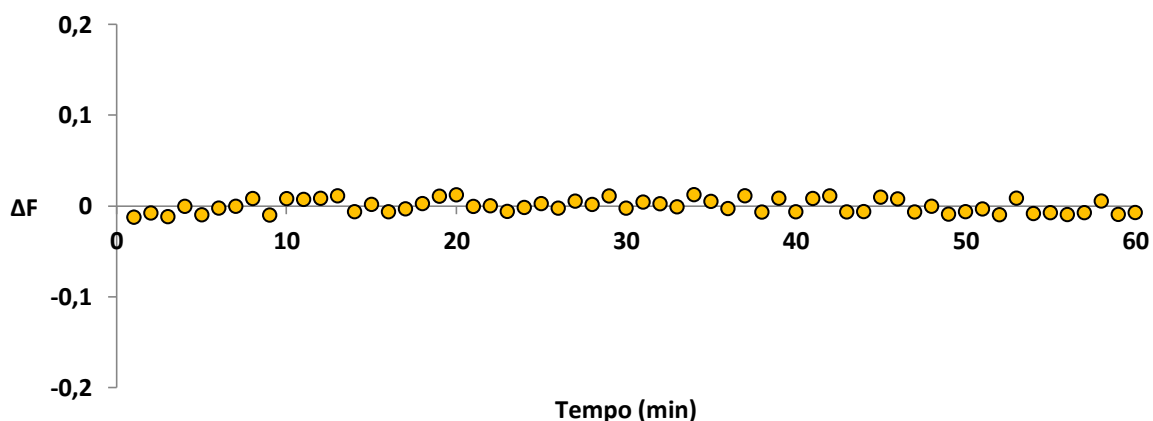
### 4.3 Sinais obtidos em fatias incubadas com o indicador de ROS $H_2DCFDA$

Fatias do hipocampo de rato foram incubadas com o indicador  $H_2DCFDA$ , na forma permeante, com uma concentração de  $20 \mu M$ , durante 60 minutos, com constante oxigenação (95%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ ). Posteriormente, as fatias foram colocadas na solução ACSF, também oxigenada, até serem transferidas para a câmara experimental.

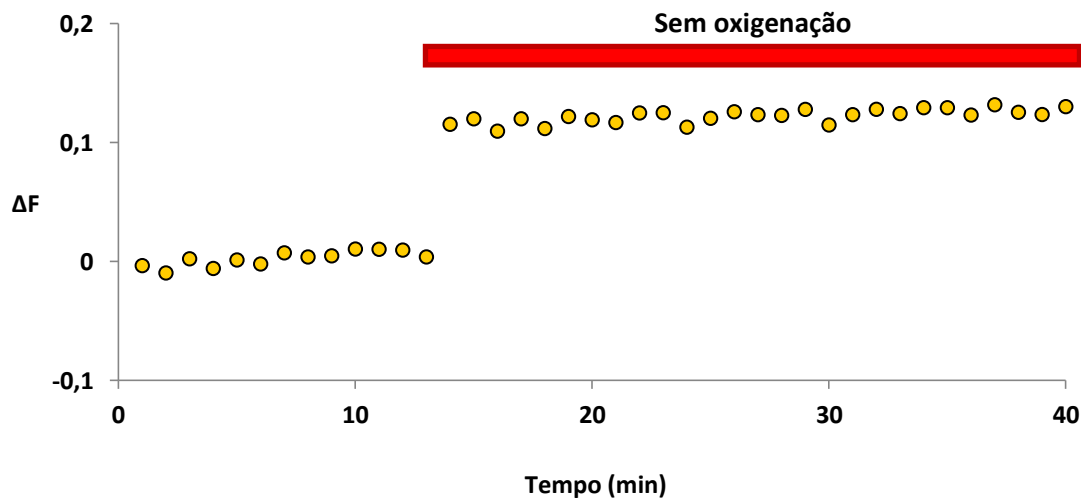
#### 4.3.1 Sinais de ROS obtidos com $H_2DCFDA$ em fatias não oxigenadas

Em situações normais, ou seja, na ausência de stress, os valores de fluorescência dos sinais de ROS mantêm-se no nível basal. A figura 4.8 permite observar que fatias no meio fisiológico e com uma oxigenação normal se mantêm “saudáveis” por um longo período de tempo, neste caso de 60 minutos.

Com o intuito de definir o comportamento de espécies reativas de oxigênio em fatias de hipocampo privadas de oxigênio, sujeitaram-se as mesmas a uma solução de ACSF normal oxigenada durante os 13 minutos iniciais. De seguida, manteve-se esta solução mas retirou-se o oxigênio à preparação. A figura 4.9 mostra que os valores de fluorescência aumentam assim que o oxigênio é retirado.



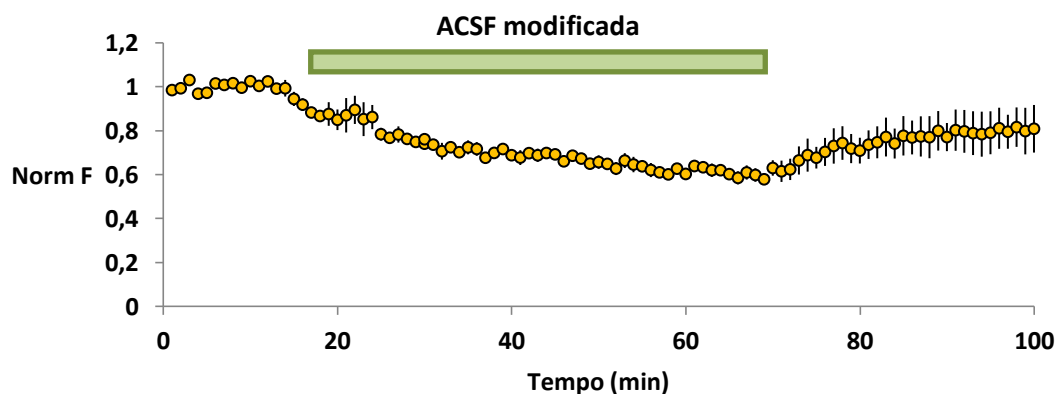
**Figura 4.8-** Fatia incubada com o indicador de ROS  $H_2DCFDA$  numa solução de ACSF. Os sinais foram obtidos nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo, em ACSF e com oxigenação. Os valores representam a média de dois valores consecutivos.



**Figura 4.9 - Aumento dos sinais de ROS em fatias não oxigenadas e incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA.** Valores obtidos nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. Durante os primeiros 13 minutos mantiveram-se as fatias na solução ACSF oxigenada, tendo-se retirado o oxigênio nos últimos 30 minutos.

#### 4.3.2 Valores de fluorescência de ROS em fatias expostas a ACSF modificada

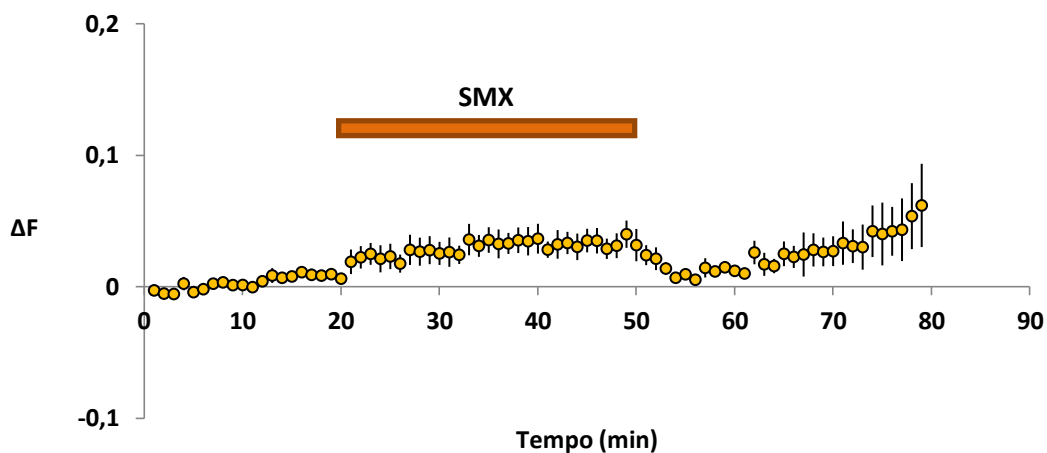
Com o objetivo de caracterizar variações de ROS associadas com a LTP induzida quimicamente, perfundiram-se as fatias com uma solução ACSF com uma elevada concentração de cálcio [10 mM] e de TEACl [25 mM], durante 60 minutos. Tal como ocorre com fatias incubadas com o indicador de zinco NG, a solução ACSF modificada provoca uma diminuição do sinal de ROS. Voltando à solução ACSF normal, verifica-se um aumento da fluorescência para valores próximos do inicial (figura 4.10)



**Figura 4.10 - Diminuição dos sinais de ROS obtidos com H<sub>2</sub>DCFDA em fatias expostas a uma solução ACSF modificada.** As fatias foram expostas durante 60 minutos a ACSF modificada contendo CaCl<sub>2</sub> [10 mM] e TEACl [25 mM] (n=3). Os dados representam a média ± s.e.m.

### 4.3.3 Efeito de sulfametoxazole em fatias incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA

O efeito de SMX em fatias do hipocampo de rato, incubadas com o indicador H<sub>2</sub>DCFDA, foi testado adicionando uma solução de 135 mg/L durante 30 minutos. Como se pode ver na figura 4.11 os níveis de ROS aumentaram, regressando aos valores iniciais quando se voltou à solução ACSF. No entanto, após cerca de 10 minutos a fluorescência passou a aumentar até ao final da experiência.

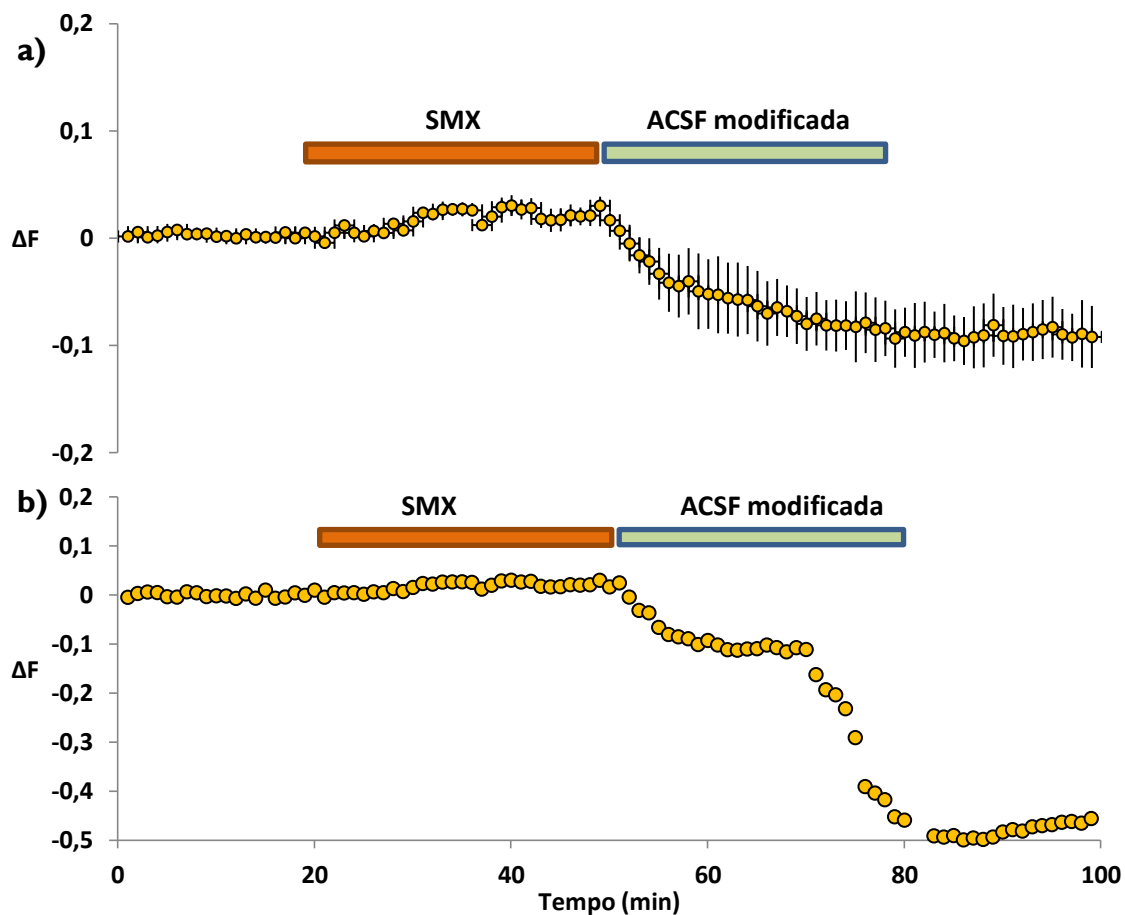


**Figura 4.11 - Aumento dos sinais de ROS em fatias expostas a sulfametoxazole, incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA.** Dados recolhidos na zona CA3 de fatias do hipocampo de rato incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA. As fatias foram expostas durante 30 minutos a uma solução de sulfametoxazole [135 mg/L], que provocou um aumento de ROS (n = 3). Os dados representam a média ± s.e.m.

Após o estudo do efeito de SMX em fatias do hipocampo em situações normais, investigou-se o efeito do SMX na LTP induzida quimicamente. Para tal, depois da exposição ao SMX descrita nas figuras 4.11 e 4.12 as fatias foram perfundidas com a solução ACSF modificada.

Esta solução originou o decréscimo dos sinais de ROS obtidos com H<sub>2</sub>DCFDA, em ambos os painéis da figura 4.12. Na parte a) nos últimos 20 minutos adicionou-se novamente uma solução ACSF normal, no entanto, os valores não voltaram ao valor inicial, como acontecia com NG (ver figura 4.6). Noutra experiência, mostrada na figura 4.12b, o sinal medido na presença da solução ACSF modificada apresenta, aos 68 minutos, uma quebra acentuada nos

valores de fluorescência. Assim que a solução foi mudada novamente para ACSF normal os sinais de ROS estabilizaram, com uma pequena tendência para aumentarem depois.



**Figura 4.12 - Efeito do SMX em sinais de ROS associados com a LTP induzida quimicamente, em fatias incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA.** As fatias foram expostas à solução de SMX [135mg/L] e depois a ACSF modificada durante 30 minutos. a) Diminuição dos sinais de ROS que não voltaram aos valores iniciais na solução ACSF (n=3). Os dados representam a média  $\pm$  s.e.m. b) descidaquebra nos sinais de ROS na presença de ACSF modificada e estabilização dos sinais em ACSF.



## 5. Discussão

Neste trabalho verificou-se que a utilização de concentrações elevadas de KCl, que provoca a despolarização das membranas celulares, originou um aumento dos sinais de fluorescência obtidos com o indicador de zinco NG (figuras 4.2 a 4.5). A despolarização causada pela adição de potássio ao meio extracelular, leva à entrada de cálcio para a região pré-sináptica. Isto resulta na fusão de vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica e na co-libertação de glutamato e de zinco para a fenda onde difundem até à célula pós-sináptica. Segundo Li et al. (2000) o NG permeante não permite obter sinais de zinco vesicular, pelo facto de ser hidrolisado por enzimas no citoplasma o que o torna impermeante nas membranas vesiculares. Por isso considera-se que o aumento dos sinais de zinco na presença de KCl é proveniente da entrada de zinco na zona pós-sináptica. Vários estudos demonstram uma relação semelhante entre KCl e a passagem de  $Zn^{2+}$  da zona pré- para a pós-sináptica ( Li et al., 2000; Ketterman et al., 2008). Noutros trabalhos, realizados em neurónios de cultura, não se observaram aumentos com a aplicação de KCl no meio de perfusão, talvez porque nesta preparação biológica não há sinapses e portanto não há libertação de zinco (Canzoniero et al., 1999; Sensi et al., 1997).

Com o intuito de verificar se os sinais de fluorescência de NG medidos refletem variações de concentrações de zinco, introduziu-se o quelante de zinco TPEN ( $K_D = 2.6 \times 10^{-16}$  M). Após o aumento do sinal de NG, por aplicação de 20 mM de KCl, a fluorescência diminuiu até ao nível basal na presença de TPEN (Fig. 4.4) confirmando que são sinais devidos ao zinco. De notar que na figura 4.3, em que se usou uma concentração tripla de KCl (ou seja 60 mM) e também se adicionou  $ZnCl_2$ , aquele quelante só reduziu o sinal cerca de 35% em relação ao seu valor máximo. Segundo Dineley et al., (2002) a formação do complexo entre o quelante e o ião depende da concentração dos mesmos. Como na experiência da figura 4.3 a despolarização das células foi induzida através de uma concentração de KCl mais elevada, a quantidade de zinco libertada também deve ter sido maior. É pois admissível que a concentração de TPEN usada (100 mM) não fosse suficiente para complexar todo o zinco livre, em cujo caso o restante se poderia ligar ao NG originando o sinal que se observou. Diversos estudos usaram também quelantes de zinco para averiguar se os sinais de fluorescência medidos eram devidos ao zinco, uma verificação necessária para fornecer credibilidade aos resultados ( Sensi et al., 1997; Li et al., 2001; Canzoniero et al., 1997; Canzoniero et al., 1999).

Uma outra questão importante era conhecer a origem, pré- ou pós sináptica, dos sinais de zinco, o que foi feito bloqueando a transmissão sináptica usando um bloqueador de VDCCs do tipo L e antagonistas de receptores de NMDA e AMPA/kainato, presentes na membrana pós-sináptica (figura 4.5). Assim, após uma despolarização com KCL (20 mM), que originou um aumento claro do sinal, perfundiu-se uma mistura contendo nifedipina, D-APV e NBQX, que provocou uma diminuição quase completa do sinal de fluorescência de NG. Este facto indica que aqueles sinais têm essencialmente uma natureza pós-sináptica. Com a adição de um bloqueador das bombas  $\text{Na}^*/\text{Ca}^{2+}$ , existentes nas membranas pós-sinápticas, talvez fosse possível eliminar a parte que restou do sinal induzido com KCl.

A solução utilizada para a indução química da LTP, ACSF modificada, caracteriza-se por uma concentração de  $\text{CaCl}_2$  cinco vezes maior e pela adição de TEA, que bloqueia os canais de  $\text{K}^+$  dependentes de potencial. O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular provoca a sua entrada para a zona pré-sináptica através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes do potencial. Por sua vez, o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provoca a libertação de glutamato e de zinco das vesículas para a fenda sináptica. Uma elevada concentração de  $\text{Zn}^{2+}$  no espaço extracelular resulta na ativação de canais de K/ATP pré-sinápticos, muito abundantes nas sinapses das fibras musgosas (Bancila *et al.*, 2004), e na saída de  $\text{K}^+$  provocando uma hiperpolarização da região pré-sináptica. Isto leva ao fecho de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes do potencial e de canais de K/ATP, e conseqüentemente à entrada de menos  $\text{Ca}^{2+}$  e à libertação de menos glutamato e zinco. Por este motivo a quantidade de zinco na região pós-sináptica deve diminuir como indicam os resultados na figura 4.6. O aumento inicial de  $\text{Zn}^{2+}$  que deve ocorrer antes da activação dos canais de K/ATP, não foi observado provavelmente porque os sinais foram registados de minuto a minuto, e um ciclo de glutamato, que é co-libertado com zinco, crê-se que dura menos de um minuto. Segundo Matias *et al.* (2010), uma aplicação de seis tétanos nas mesmas sinapses, origina também uma diminuição dos sinais de zinco pré-sinápticos, detectados por meio do indicador TSQ, Estes autores consideram que aquela diminuição é em parte devida à ativação dos canais K/ATP, pelo facto de ela ser parcialmente reduzida aplicando tolbutamida, um bloqueador destes canais ( Fellows *et al.*, 1993; Matias *et al.*, 2010)

Neste estudo a remoção da solução ACSF modificada deu dois tipos de resultados:

- os níveis de zinco aumentaram até ao nível inicial, mantendo-se estáveis. Como em ACSF a concentração de cálcio é menor deve ocorrer menos libertação de zinco das vesículas sinápticas, não ficando na fenda zinco suficiente para ativar os canais de K-ATP e originar uma hiperpolarização.
- os sinais de zinco aumentaram de forma gradual, sem estabilizarem. Segundo Huber *et al.* (1995), Song *et al.* (2002) e Stewart *et al.* (2005), na área CA1 existe uma forma de LTP induzida por TEA, a TEA-LTP, verificando-se nova potenciação após a remoção deste composto. Esta forma de LTP considera-se devida ao influxo de  $Ca^{2+}$  tanto através de canais L-VDCCs como de receptores de NMDA, pelo facto da potenciação diminuir na presença de APV e nifedipina, que bloqueiam a transmissão sináptica. Por estes motivos a potenciação provocada pelo TEA pode estar associada ao aumento dos sinais de zinco da figura 4.6, quando é removida a solução de ACSF modificada.

Em condições normais os níveis de zinco e de ROS mantêm-se em valores basais, não provocando qualquer neurotoxicidade aos sistemas, sendo a quantidade de espécie reativas de oxigénio produzidas equivalente à sua eliminação, mantendo-se assim a homeostase a nível celular. Tal como se mostrou inicialmente, nas sinapses estudadas os valores da fluorescência basal de NG e H<sub>2</sub>DCFDA eram estáveis, o que significa que as preparações estavam bem fisiologicamente.

Em vários estudos realizados em diferentes sistemas neuronais retiraram-se o oxigénio e a glucose, de modo a imitar lesões provocadas por patologias, como a isquemia. Em fatias do hipocampo incubadas com um indicador de ROS, a falta de oxigénio provoca um aumento significativo dos sinais de fluorescência, como se observou na experiência da figura 4.9. A remoção de oxigénio provoca um acréscimo na produção de ROS através da cadeia transportadora de eletrões na mitocôndria, e um aumento na produção de ROS. Zhou e Baudry (2009) obtiveram resultados concordantes, pois células sem oxigénio e glucose no meio de perfusão, durante 10, 30 e 60 minutos, tinham um aumento crescente dos sinais de fluorescência de ROS.

A utilização de ACSF modificada em fatias do hipocampo incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA originou uma diminuição no sinal da fluorescência, tal como mostra a figura 4.10. Como referido anteriormente, o TEA e elevadas concentrações de  $Ca^{2+}$  provocam a despolarização da célula.

O radical superóxido funciona como neurotransmissor necessário para a LTP, diminuindo, numa célula hiperpolarizada os níveis de ROS (Knapp e Klan, 2002; Ma *et al.*, 2011). Após a remoção da solução de ACSF modificada os níveis de fluorescência aumentam, provavelmente, devido à abertura de canais pré-sinápticos.

A aplicação de um antibiótico nas sinapses estudadas em fatias do hipocampo promoveu o aumento de zinco e de ROS, ou seja, um acréscimo, respetivamente das fluorescências de NG e H<sub>2</sub>DCFDA. Alguns estudos inseriram SMX em diversas concentrações, numa cultura de bactérias (*Caenorhabditis elegans* e *Pseudokirchneriella subcapitata*). Segundo Liu *et al.* (2013) o antibiótico diminui as capacidades antioxidantes das bactérias, no entanto, Nie *et al.*, (2013) demonstraram que o SMX provoca um aumento das capacidades antioxidantes da célula, mas induz a peroxidação lipídica. Apesar de se ter utilizado uma preparação biológica distinta, o aumento dos sinais de ROS obtidos em fatias expostas ao SMX, é semelhante. Crê-se que o antibiótico promoveu a produção de ROS através da diminuição da eficácia/concentração dos antioxidantes, ou através da peroxidação lipídica (figura 4.11). No entanto, supõe-se que o SMX provoca danos irreversíveis, dado que, após a remoção do antibiótico os sinais de fluorescência de H<sub>2</sub>DCFDA voltam a ter o valor basal mas, passados alguns minutos, os valores aumentam novamente. Na figura 4.12 introduziu-se a solução de ACSF modificada, após a exposição das fatias a SMX, tendo-se obtido uma resposta diferente (figura 4.10). Os níveis de ROS diminuíram constantemente tendo tido uma queda abrupta, julgando-se por isso que o antibiótico provoca danos celulares como a peroxidação lipídica da membrana plasmática das células sinápticas.

O stress oxidativo promove a libertação de zinco das metalotioneínas, ou seja, ocorre um aumento de zinco independente da transmissão sináptica, da fusão das vesículas ou da despolarização das membranas (Wei *et al.*, 2004; Mocchegiani *et al.*, 2005). Deste modo, o aumento dos sinais de fluorescência de NG, nas sinapses consideradas (figura 4.7), quando expostas a SMX poderá ser proveniente do aumento do stress oxidativo.

## **6. Conclusões e Perspetivas futuras**

### **6.1 Conclusões**

Os sinais de zinco e de ROS medidos em fatias expostas a ACSF modificada demonstram uma depressão característica da libertação excessiva de zinco, que bloqueia os canais de K/ATP. Por outro lado, os sinais de zinco recolhidos com elevadas concentrações de potássio extracelular aumentam. Considera-se que os sinais de zinco medidos são de natureza pós-sináptica, pelo facto de utilizando antagonistas de recetores de NMDA, AMPA/Kainato e um bloqueador de L- VDCCs, os sinais de zinco desaparecerem quase completamente.

O sulfametoxazole provocou um aumento de zinco e de ROS nas sinapses consideradas de fatias do hipocampo, provavelmente, devido à indução da peroxidação lipídica de membranas neuronais. O acréscimo de ROS no meio intracelular provoca a clivagem de  $Zn^{2+}$  das metalotioneínas. Crê-se que SMX provoca danos celulares irreversíveis, dado o comportamento instável dos sinais após a remoção do antibiótico, tanto em ACSF como em ACSF modificado.

### **6.2 Perspetivas futuras**

Os resultados obtidos sugerem várias experiências que seria interessante realizar para obter mais informação sobre questões abordadas neste estudo. Futuramente, poder-se-ia estudar, por exemplo, o mecanismo de acção do antibiótico utilizando indicadores de viabilidade celular e da peroxidação lipídica. Seria importante também usar indicadores de ROS distintos, específicos para os radicais superóxido e peróxido de hidrogénio, dada a influência destes radicais em particular na LTP e portanto em mecanismos associados com a aprendizagem e a memorização ao nível celular.

A utilização de outros compostos bloqueadores como a tolbutamida, que interfere com os canais de K/ATP, poderia esclarecer a causa da depressão dos sinais obtidos em ACSF modificada, para a indução química da LTP. Outros agentes farmacológicos como bloqueadores

de canais ou bombas iónicas permitiriam obter mais informação sobre a natureza e componentes tanto de sinais de zinco como de ROS. Especialmente importante seria caracterizar com elevada resolução espacial, por meio de uma câmara CCD, eventos sinápticos localizados e determinar a sua natureza pré- ou pós-sináptica. A combinação de registos eléctricos extracelulares seria também muito útil principalmente nos estudos da LTP, para verificar a formação desta forma de plasticidade sináptica.

## 7. Bibliografia

AIBA, I. & Shuttleworth, W., (2013). **Hypoxia limits inhibitory effects of Zn<sup>2+</sup> on spreading depolarizations.** PLOS ONE 8: 1-12.

ANDERSEN, P. & *et al.*, (2007). **The hippocampus book.** New York, Oxford University Press.

ANDREOZZI, R., Raffaele, M. & Nicklas, P. (2003). **Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment.** Chemosphere 50: 1319–1330.

ANIKSZTEJN, I. & Ben-Ari, Y. (1991). **Novel Form of long-term potentiation produced by a K<sup>+</sup> channel blocker in the hippocampus.** Nature 349: 67-69.

AMARAL, D.G. & Witter, M.P. (1989). **The three-dimensional organization of the hippocampal formation a review of anatomical data.** *Neuroscience* 31: 571-591.

AUERBACH, J. & Segal, M. (1997). **Peroxide modulation of slow onset of potentiation in rat hippocampus.** *J Neurosci* 17: 8695–8701.

BANCILA, V. & *et al.* (2004). **Zinc inhibits glutamate release via activation of pre-synaptic KATP channels and reduces ischaemic damage in rat hippocampus.** *Journal of Neurochemistry*, 90: 1243 – 1250.

BAREA-RODRÍGUEZ, E.J. & *et al.* (2000). **Protein synthesis inhibition blocks the induction of mossy fiber long-term potentiation in vivo.** *J Neurosci* 20: 8528–8532.

BARREIROS, A. & David, J. (2006). **Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** *Química Nova*: 113-123.

BELTRAMINI, M. *et al.*, (2006). **The effect of Zn(II) and streptozotocin administration in the mouse brain.** *Brain Res, Amsterdam Elsevier*, 1109: 207-218.

BELTRÁN, Q.J., & *et al.* (2012). **Dissociation of CA3 pyramidal cells with attached, functional, identified mossy fiber and interneuronal boutons for studying**

**glutamergic and GABAergic synaptic transmission.** *Journal of Neuroscience Methods* 208, 155-160.

BORG, J. & London, J. (2002). **Copper/zinc superoxide dismutase overexpression promotes survival of cortical neurons exposed to neurotoxins in vitro.** *J. Neurosci. Res.* 70: 180– 9.

BOVERIS, A. *et al.* (1972). **The Cellular Production of Hydrogen Peroxide.** *Biochem. J.* , 617-630.

BOVERIS, A. & Chance, B. (1973). **The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide, General Properties and Effect of Hyperbaric Oxygen.** *Biochem.J.*, 707-716.

BOVERIS, A. *et al.* (1976). **Evaluation of the Horseradish Peroxidase-Scopoletin Method for the Measurement Hydrogen Peroxide Formation in Biological Systems.** *Anal. Biochem.*, 145-158.

CABRITA, P. (1995). **Actividade neural na area CA1 do hipocampo.** Trabalho de Seminário. Departamento de Física, Universidade de Coimbra.

CALIXTO, E. & *et al.*, (2003). **Early Maintenance of Hippocampal Mossy Fiber–Long-Term Potentiation Depends on Protein and RNA Synthesis and Presynaptic Granule Cell Integrity.** *The Journal of Neuroscience* 23: 4842– 4849.

CANZONIERO, L.M.T., Sensi, S.L & Choi, D.W.. (1997) **Measurement of Intracellular Free Zinc in Living Neurons.** *Neurobiology of Disease* 4: 275-279.

CANZONIERO, L.M.T., Turetsky, D.M. & Choi, D.W. (1999) **Measurement of intracellular free zinc concentrations accompanying zinc- induced neuronal death.** *The Journal of Neuroscience* 19: 1-6.

CARBALLA, M. & *et al.*, (2004). **Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant.** *Water Research* 38: 2918–2926.

CHALIMONIUK, M. & *et al.*, (2006). **Nitric oxide alters arachidonic acid turnover in brain cortex synaptoneuroosomes.** *Neurochemistry International* 48: 1- 8.



CHANG, C.J. & *et al.* (2004). **ZP8, a Neuronal Zinc Sensor with Improved Dynamic Range; Imaging Zinc in Hippocampal Slices with Two-Photon Microscopy.** *Inorg. Chem.* 43, 6774 - 6779.

CHEN, W.Q. *et al.* (2006). **Effects of zinc on the induction isoforms in hippocampus in stress rats.** *Exp Biol Med*, 231: 1564-1568.

CHEN, H & *et al.* (2011). **Effects of pH and ionic strength on sulfamethoxazole and ciprofloxacin transport in saturated porous media.** *J. Contam. Hydrol.* 126: 29–36.

CHO, H. I. & *et al.* (2003). **Protective Effects of Extracellular Glutathione Against Zn<sup>2+</sup> - Induced Cell Death in Vitro and in Vivo.** *Journal of Neuroscience Research* 74: 736-743.

CHOI, D. & *et al.* (1998). **Zinc and brain injury.** *Annual Review of Neuroscience*, 347- 375.

CHOTINER, J.K. & *et al.* (2003). **Adenylyl cyclase-dependent form of chemical long-term potentiation triggers translational regulation at the elongation step.** *Neuroscience*, 116: 743 – 752.

COLVIN, R.A. & *et al.* (2003). **Zn<sup>2+</sup> transporters and Zn<sup>2+</sup> homeostasis in neurons.** *European Journal of Pharmacology* 479, 171-185.

CRAVINO, J. (1996). **Mecanismos electroquímicos da plasticidade sináptica neuronal.** Trabalho de Seminário. Departamento de Física, Universidade de Coimbra.

DESHMUKH, S.S. e Knierim JJ (2012) **Hippocampus.** John Wiley & Sons, Ltd 3: 231-251.

DINELEY, K.E., Malaiyandi, L.M. & Reynolds, I.J. (2002). **A reevaluation of neuronal zinc measurements: artifacts associated with high intracellular dye concentration.** *Molecular Pharmacology*, 62: 618-627.

DINELEY, K.E. & *et al.* (2003). **Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration.** *J. Neurochem.* 85: 563–570.

DITTMER, P.J. & *et al.* (2009). **Genetically encoded sensors to elucidate spatial distribution of cellular zinc.** *J. Biol.Chem.* 284: 16289–16297.

ERDEVE, O. & *et al.* (2004). **Antioxidant Superoxide Dismutase Activity in Obese Children.** *Biol Trace Elem Res* 98: 219-228.

EOM, S. & *et al.* (2001). **Zn(2+) induces stimulation of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway through.** *Molecular Pharmacology*: 981-986.

FEKETE, A. & *et al.*, (2008). **Layer-specific differences in reactive oxygen species levels after oxygen–glucose deprivation in acute hippocampal slices.** *Free Radical Biology & Medicine* 44: 1010–1022.

FELLOWS, L.K., Boutelle, M.G & Fillenz, M. (1993). **ATP-Sensitive Potassium Channels and Local Energy Demands in the Rat Hippocampus: An In Vivo Study.** *J Neurochem.* 61: 949-954.

FREDERICKSON, C. & *et al.* (2000). **Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron.** *The Journal of Nutritional*: 1471-1483.

FREINBICHLER, W. & *et al.* (2011). **Highly reactive oxygen species: detection, formation and possible functions.** *Cellular and Molecular Life Sciences*: 2067-2079.

FUNKE, F., Gerich, F.J. & Müller, M. (2011). **Dynamic, semi-quantitative imaging of intracellular ROS levels and redox status in rat hippocampal neurons.** *NeuroImage* 54: 2590- 2602.

GAGNÉ, F., Blaise, C. & André, G. (2006). **Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 329–336.

GAZARYAN, I. & *et al.* (2002). **Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase.** *J. Biol. Chem.* 277(12): 10064-10072.

**H2DCFDA (H2-DCF, DCF) Molecular Probes®.** [Acedido a 10 de Agosto de 2014].

Disponível na Internet:

<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D399>

HARRIS, E.W. & Cotman, C.W., (1986). **Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl-D-aspartate antagonists.** *Neurosci Lett* 70:132–137.

HIRSCH, R. & *et al.*, (1999). **Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.** *The Science of the Total Environment* 225: 109- 118.

HUANG Y.Y. & *et al.* (1994). **cAPM contributes to mossy fibers LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase.** *Cell* 79: 69–79.

HUANG, Y.Y. & Kandel, E.R. (1996). **Modulation of both the early and the late phase of mossy fiber LTP by the activation of  $\beta$ -adrenergic receptors.** *Neuron* 16: 611–617.

HUBER, K.M., Mauk, M.D. & Kelly, P.T. (1995). **Distinct LTP Induction Mechanisms: Contribution of NMDA Receptors and Voltage-Dependent Calcium Channels.** *Journal of Neurophysiology* 73: 270-279.

ISIDORI, M. *et al.* (2005). **Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms.** *Sci. Total Environ.* 346, 87–98.

IZUMI, Y., Auberson, Y.P. & Zorumzki, C.F. (2006). **Zinc Modulates Bidirectional Hippocampal Plasticity by Effects on NMDA Receptors.** *The Journal of Neuroscience* 26:7181–7188.

JIANG, J. & *et al.*, (2011). **Biochemical and Biophysical Research Communications.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412: 55- 60.

JIANG, Y. & *et al* (2011). **Depressed hippocampal MEK/ERK phosphorylation correlates with impaired cognitive and synaptic function in zinc-deficient rats.** *Nutritional Research* 14: 45-50.

KEMPER, N., (2008). **Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment.** *Ecol. Indicat.* 8, 1–13.

KENNEDY, K. A. & Sandiford, S. D. (2012). **Reactive oxygen species and the neuronal fate.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 215-221.

KETTERMAN, J.L. & Yang, V.L. (2008). **Presynaptic evidence for zinc release at the mossy fiber synapse of rat hippocampus.** *Journal of Neuroscience Research* 86:422 - 434.

KLANN, E. (1998). **Cell-permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area CA1.** *J Neurophysiol* 80: 452–457.

KNAPP, L.T. & Klan, E. (2002). **Role of Reactive Oxygen Species in Hippocampal Long-Term Potentiation: Contributory or Inhibitory.** *Journal of Neuroscience Research* 70:1-7.

KOMATSU, K. & *et al.* (2005). **Selective Zinc Sensor Molecules with Various Affinities for Zn<sup>2+</sup>, Revealing Dynamics and Regional Distribution of Synaptically Released Zn<sup>2+</sup> in Hippocampal Slices.** *J. AM. CHEM. SOC.* 2005, 127, 10197-10204.

LI, Y. & *et al.* (2000). **Rapid Translocation of Zn<sup>2+</sup> from Presynaptic terminals into Postsynaptic Hippocampal Neurons after Physiological Stimulation.** *The Journal of Neurophysiological* 86, 2597- 2604.

LI, Y. & *et al.*, (2001). **Induction of mossy fiber - CA3 long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn<sup>2+</sup>.** *J. Neurosci.* 21: 8015–8025.

LINDSEY, E.M. & Stephen, J.L., (2010). **Cell-trappable Quinoline-Derivatized Fluoresceins for selective and reversible biological Zn(II) detection.** *Inorg. Chem.* 49, 9535-9545.

LIU, R. & *et al.*, (2014). **Iron toxicity in organotypic cultures of hippocampal slices: role of reactive oxygen species.** *Journal of Neurochemistry* 85: 492- 502.

LIU, S. & *et al.* (2013). **The non-target organism *Caenorhabditis elegans* withstands the impact of sulfamethoxazole.** *Chemosphere*, 93: 2373–2380.

LLORENTE de Nó, R. (1934). **Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system.** *J. Psychol. Neurol.* 46, 113-177.

LORUSSO, M. & *et al.* (1991). **Interaction of Zn<sup>2+</sup> with the bovine-heart mitochondrial bcI complex.** Eur. J. Biochem. 197, 555–561.

LU, M.Y. & *et al.*, (2000). **Endogenous Zn(2+) is required for the induction of long-term potentiation at rat hippocampal mossy fiber-CA3 synapses.** Synapse 38: 187–197.

MA, T. & *et al.* (2011). **Amyloid  $\beta$ -Induced Impairments in Hippocampal Synaptic Plasticity Are Rescued by Decreasing Mitochondrial Superoxide.** The Journal of Neuroscience, 31: 5589 - 5595.

MAKHINSON, M. & *et al.* (1999). **Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation.** J. Neurosci. 19: 2500 -2510.

MARIN, P. & *et al.*, (2000). **Routes of zinc entry in mouse cortical neurons: role in zinc-induced neurotoxicity.** European Journal of Neuroscience 12: 8 – 18.

MATIAS, C. (2001). **Estudo de fluorescência de variações neurais de cálcio e de zinco associadas com a potenciação de longa duração no hipocampo.** Tese de doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

MATIAS, C.M. & *et al.* (2006). **Effect of the zinc chelator N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) on hippocampal mossy fiber calcium signals and on synaptic transmission.** Biol Res 39: 521 – 530.

MATIAS, C.M., Saggau, P. & Quinta-Ferreira, M.E. (2010). **Blockade of presynaptic K ATP channels reduces the zinc-mediated posttetanic depression at hippocampal mossy fiber synapses.** Brain research 132: 22 – 27

MATOT, M.P. & *et al.*, (2014). **Normobaric hyperoxia (95% O<sub>2</sub>) stimulates CO<sub>2</sub>-sensitive and CO<sub>2</sub>-insensitive neurons in the caudal solitary complex of rat medullary tissue slices maintained in 40% O<sub>2</sub>.** Neuroscience 270: 98-122.

MEAGHER, B. & *et al.* (2006). **Newport Green TM DCF diacetate ester in use as a fluorescent probe for various metal ions taken up by invitro cultured human immune cells.** [Acedido a 10 de Agosto de 2014]. Disponível na Internet:

[http://www.focusonmicroscopy.org/2006/PDF/002\\_Meagher.pdf](http://www.focusonmicroscopy.org/2006/PDF/002_Meagher.pdf)

MIZE, C. E. & Langdon, R. G. (1962). **Hepatic glutathione reductase. I. Purification and general kinetic properties.** *J. Biol. Chem.* 237: 1589–95.

MOCHEGANI, E. & *et al.* (2005). **Brain, aging and neurodegeneration: Role of zinc ion availability.** *Progress in Neurobiology* 75: 367 – 390.

MORRIS, D.R. & Levenson, C.W., (2012). **Ions Channel and Zinc: Mechanisms of Neurotoxicity and Neurodegeneration.** *Journal of Toxicology.*

**Newport Green™ DCF diacetate, cell permeant. Molecular Probes®.** [Acedido a 10 de Agosto de 2014]. Disponível na Internet:

<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/N7991?ICID=search-product>

NIE, X. & *et al.* (2013) **Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*.** *Environmental Pollution* 172: 23-32.

NOH, K. M. & Koh, J. Y. (2000). **Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes.** *J. Neurosci.* 20: RC111.

OTEIZA, P.I. *et al.* (2004). **Metals in neurodegeneration: involvement of oxidants and oxidant-sensitive transcription factors.** *Molecular Aspects of Medicine* 25, 103–115.

PALMITER, R., & *et al.* (2004). **Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers.** *Pflugers Arch*, 744-751.

PAN, E. & *et al.*, (2011). **Vesicular Zinc Promotes Presynaptic and Inhibits Postsynaptic Long-Term Potentiation of Mossy Fiber-CA3 Synapse.** *Neuron* 71: 1116–1126.

PAOLETTI, P. & *et al.* (2009). **Zinc at Glutamatergic Synapses.** *Journal of Neuroscience*, 126-136.

PELLMAR, T.C. & *et al.* (1991). **Free radicals accelerate the decay of long-term potentiation in field CA1 of guinea pig hippocampus.** *Neuroscience* 44: 353–359.

PIRES, C. (1996). **Estudos Eléctricos e Ópticos da Potenciação de longa duração na área CA3 do hipocampo.** Trabalho de Seminário. Departamento de Física, Universidade de Coimbra.

PRASAD, A. & Pospíšil, P. (2011). **Linoleic Acid-Induced Ultra-Weak Photon Emission from *Clamydomonas reinhardtii* as a Tool for Monitoring of Lipid Peroxidation in the Cell Membranes.** *PLOS ONE*.

QUINTA-FERREIRA, M.E. & Matias, C. (2005). **Tetanically released zinc inhibits hippocampal mossy fiber calcium, zinc and synaptic responses.** *Brain Res* 1047: 1– 9.

RUGGIERO, R. N. & *et al.*, (2011). **Glutamatergic neurotransmission and synaptic plasticity: molecular, clinical, and phylogenetic aspects.** *Medicina (Ribeirão Preto)* 44 (2): 143-56.

SANTOS, D.F. & Peixoto, F. (2007). **Stresse oxidativo em sistemas biológicos.** Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

SCHMITT, H. *et al.* (2005). **Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance.** *Soil Biol. Biochem.* 37, 1882–1892.

SENSI, S.L. & *et al.* (1997). **Measurement of Intracellular Free Zinc in Living Cortical Neurons: Routes of Entry.** *The Journal of Neuroscience* 15, 9554- 9564.

SENSI, S.L. & *et al.* (1999). **Preferential  $Zn^{2+}$  influx through  $Ca^{2+}$  permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2414–2419.

SENSI, S.L. & *et al.* (2011). **The Neurophysiology and Pathology of Brain Zinc.** *The Journal of Neuroscience* 9, 16076- 16085.

SHERIDAN, K.H. & *et al.* (2012). **Effects on Groundwater Microbial Communities of an Engineered 30- Day In Situ Exposure to the Antibiotic Sulfamethoxazole.** *Environmental Science & Technology* 46, 7478- 7486.

SINDREU, C. & Storm, D.R. (2011). **Modulation of neuronal signal transduction and memory formation by synaptic zinc.** *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5:1- 14.

SONG, D., Wang, Z. & Berger, T.W. (2002). **Contribution of T-Type VDCC to TEA-Induced Long-Term Synaptic Modification in Hippocampal CA1 and Dentate Gyrus.** *HIPPOCAMPUS* 12: 689–697.

STEWART, M.G. & *et al.*, (2005). **Chemically induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices.** *European Journal of Neuroscience* 21: 3368–3378.

STORK, C.J. & Yang, V.L. (2006). **Measuring cell viability with membrane impermeable zinc fluorescent indicator.** *Journal of Neuroscience Methods* 155, 180–186.

**sulfamethoxazole, Product Information.** [Acedido a 10 de Agosto de 2014]. Disponível na Internet:

<http://www.readbag.com/sigmaaldrich-etc-medialib-docs-fluka-product-information-sheet-s7507pis-par-0001-file-tmp-s7507pis>

TAKEDA, A. (2000). **Movement of zinc and its functional significance in the brain.** *Brain Res*, 137-148.

TAKEDA, A., Fuke, S. & Oku, N. (2009). **Positive modulation of long-term potentiation at hippocampal ca1 synapses by low micromolar concentrations of zinc.** *Neuroscience* 158: 585–591.

TAKEDA, A. *et al.* (2010). **Differential effects of zinc influx via AMPA/kainate receptor activation on subsequent induction of hippocampal CA1 LTP components.** *Brain research* 1354: 188–195.

TAKEDA, A. *et al.* (2011). **Transient Increase in Zn<sup>2+</sup> in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons Causes Reversible Memory Deficit.** *Plos One* 6: 1-10.



TARUN, M., Baimbridge, K.G & Miller, J.J. (2012). **A highly selective and sensitive in vivo fluorosensor for zinc(n) without cytotoxicity.** *Org. Biomol. Chem.* 10, 2380-2384.

TURNER, R. W. & *et al.*, (1982). **Calcium-induced long-term potentiation in the hippocampus.** *Neuroscience* 7: 1411- 1416.

URBAN, N.N. & *et al.*, (1996). **Properties of LTP Induction in the CA3 region of the primate hippocampus.** *Learn. Mem.* 3: 86-95.

VASCONCELOS, S. & *et al.* (2007). **Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação.** *Química Nova*, 1323-1338.

VOG, T, K. & *et al.*, (2000). **The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses.** *Neuron* 26: 187– 196.

WEI, G. & *et al.* (2004). **Characterization of extracellular accumulation of zn<sup>2+</sup> during ischemia and reperfusion of hippocampus slices in rat.** *Neuroscience* 125, 867-877.

WEISS, J., Sensi, S.L. & Koh, J.Y.. (2000). **Zn<sup>2+</sup>: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease.** *Elsevier Science*, 395- 400.

WIJK, R. & *et al.* (2008). **Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: State of the art.** *Indian Journal of Experimental Biology*, 273-309.

WON, S.J. & *et al.* (2010). **EAAC1 gene deletion alters zinc homeostasis and exacerbates neuronal injury after transient cerebral ischemia.** *The Journal of the Neuroscience* 30, 15409-15418.

XIANG, Z. & *et al.*, (1994). **Quantal mechanism of long-term potentiation in hippocampal mossy-fiber synapses.** *J Neurophysiol* 71: 2552–2556.

XIE, X. e Smart T. G. (1994). **Modulation of long-term potentiation in rat hippocampal pyramidal neurons by zinc.** *Eur. J. Physiol.* 427, 481-486.

YUJIANG, M., & *et al.* (2011). **Sensitive and selective detection of zinc ions in neuronal vesicles using PYDPYI, a simple turn-on dipyrin.** *Chem. Commun.* 47, 7107-7109.

YULIYA, V. M. & *et al.* (2009). **Intracellular Zn<sup>2+</sup> Accumulation Contributes to Synaptic Failure, Mitochondrial Depolarization, and Cell Death in an Acute Slice Oxygen–Glucose Deprivation Model of Ischemia.** *The Journal of the Neuroscience* 29, 1105–1114.

ZHENG, J. & *et al.*, (2014). **Activation of the ace2/ang-(1–7)/mas pathway reduces oxygen–glucose deprivation-induced tissue swelling, ros production, and cell death in mouse brain with angiotensin ii overproduction.** *Neuroscience* 273: 39–51.

ZHOU, M & Baudry, M., (2009). **EUK-207, a superoxide dismutase/catalase mimetic, is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation-induced neuronal death in cultured hippocampal slices.** *Brain Research* 1247: 28–37.