

Sandra Carina Alves Lopes

# Análise do Impacto de Compostos Poluentes na Atividade Neuronal

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química, orientada pelas Professoras Doutoradas Rosa M. Quinta-Ferreira e M. Emília Quinta-Ferreira e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Sandra Carina Alves Lopes

# Análise do Impacto de Compostos Poluentes na Atividade Neuronal

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química, orientada pelas  
Professoras Doutoras Rosa M. Quinta-Ferreira e M. Emília Quinta-Ferreira e apresentada ao  
Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da  
Universidade de Coimbra.

## **Supervisores:**

Prof. Dra. Rosa M. Quinta-Ferreira

Prof. Dra. M. Emília Quinta-Ferreira

## **Instituição**

Departamento de Engenharia Química

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade de Coimbra

Rua Sílvio Lima, Polo II

3030-790 Coimbra

Portugal

Coimbra, 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



## **Agradecimentos**

*À Professora Doutora Rosa M. Quinta-Ferreira, minha orientadora, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo carinho e apoio ao longo deste período.*

*À orientadora, Professora Doutora M. Emília Quinta-Ferreira, pela dedicação em me orientar na realização desta dissertação, pela disponibilidade e por todo o apoio prestado ao longo deste percurso.*

*Ao Professor Doutor Carlos Matias, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo deste período.*

*Um agradecimento especial às colegas de laboratório Fátima Bastos e Vanessa Corceiro pela amizade, pelas palavras de incentivo e por todo apoio prestado ao longo de todas as etapas deste trabalho.*

*Ao grupo da Dra Ana Luísa Carvalho do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra pela disponibilização e à D. Elizabete Carvalho, pela preparação do material biológico.*

*A todos muito obrigada.*



## Resumo

O efeito de compostos poluentes na saúde humana é um tema de grande interesse científico a nível mundial. Devido ao aparente envolvimento de zinco e de espécies reativas de oxigénio (*reactive oxygen species*, ROS) em várias doenças neurodegenerativas, este trabalho centrou-se no estudo da influência de poluentes fenólicos em variações de zinco e na formação de espécies reativas de oxigénio durante a atividade neuronal. Os estudos foram realizados em fatias cerebrais de rato, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo, que têm uma das maiores concentrações de zinco no cérebro.

Variações de zinco e de ROS induzidas quimicamente ou pela adição de poluentes fenólicos foram medidas usando, respetivamente, os indicadores fluorescentes Newport Green e 2,7-diacetato-dicloro-dihidro-fluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA).

A introdução, no meio extracelular, de poluentes fenólicos (600 mg / L) fez aumentar, de modo reversível, tanto os sinais de zinco como os de ROS, o que está de acordo com a ideia de que existe uma relação entre eles.

Tanto nos estudos de zinco como de ROS, investigou-se o efeito de uma solução extracelular contendo Tetraetilamónio (TEA), um bloqueador de canais de potássio dependentes do potencial, e uma elevada concentração de cálcio, para a indução da potenciação de longa duração (*long term potentiation*, LTP) química. Em ambos os casos observou-se, neste meio, uma diminuição dos sinais em causa, em relação ao nível de fluorescência basal. Esta descida era revertida na presença da solução normal de perfusão, voltando os sinais a atingir aproximadamente o valor basal.

Foi também estudado o efeito dos poluentes fenólicos nos sinais de zinco e de ROS induzidos por meio da solução extracelular com TEA e mais cálcio, para a indução química da LTP. Verificou-se, em ambos os casos, que na presença dos compostos fenólicos, aqueles sinais sofrem pequenas alterações, exceto quando se volta à solução de perfusão normal, em cujo caso os sinais aumentam em relação à linha base, sugerindo a presença de maiores quantidades de zinco e de ROS.

Nas experiências de zinco foram analisadas várias situações, tais como a exposição das fatias do hipocampo a KCl (60 mM), composto que provoca a despolarização da membrana celular, permitindo a saída do zinco das vesículas pré-sinápticas e a sua consequente migração para a zona pós-sináptica, originando um aumento dos sinais de zinco que se consideram ser

pós-sinápticos. Foi também estudada a adição de zinco externo na presença de KCl, o que provocou um aumento maior do que na situação anterior. Isto sugere que o KCl ao despolarizar também a membrana pós-sináptica permite a entrada de zinco adicionado externamente, para a zona pós-sináptica.

Para os sinais de zinco, verificou-se que a adição do quelante de zinco N,N,N,N'-tetrakis (2-piridilmetil) etilenodiamina (TPEN) (100  $\mu$ M) diminuiu os valores de fluorescência até ao nível basal, confirmando que estes sinais representam variações de zinco.

A aplicação conjunta dos compostos nifedipina (10  $\mu$ M), 2, 3-di-hidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo quinoxalina-2,3-diona (NBQX) (10  $\mu$ M) e D - 2-amino-5-fosfonopentanóico ácido (D-APV) (50  $\mu$ M), respetivamente bloqueador de canais de cálcio dependentes do potencial (*voltage dependent calcium channels*, VDCCs) e antagonistas de recetores sensíveis a ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropiónico/kainato (AMPA/kainato) e ao N-metil-d-aspartato (NMDA), fez diminuir a amplitude dos sinais que não atingiram a linha base, sugerindo que eles têm origem pós-sináptica. O facto dos sinais não terem diminuído completamente pode ser devido à não utilização de um antagonista de bombas  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^+$ , que poderão também estar envolvidas nas variações de zinco pós-sinápticas.

A aplicação da mesma mistura de bloqueador e antagonistas nos estudos de ROS não originou qualquer variação, sugerindo que os sinais de ROS medidos são independentes da transmissão sináptica.



## Abstract

The effect of pollutant compounds on human health is a topic of great scientific interest worldwide. Due to the apparent involvement of zinc and reactive oxygen species (ROS) in various neurodegenerative diseases, this work has focused on the study of the influence of phenolic pollutants on zinc changes and on the formation of reactive oxygen species during neuronal activity. The studies were performed in rat brain slices, more specifically at the mossy fiber synapses of hippocampal CA3 area, which have one of the higher concentrations of zinc in the brain.

Zinc and ROS changes induced chemically or by the addition of phenolic pollutants were measured using as fluorescent indicators Newport Green and diacetate 2, 7-dichloro-dihydro-fluorescein (H<sub>2</sub>DCFDA), respectively.

The introduction of phenolic pollutants (600 mg / L) in the extracellular medium caused a reversible increase in both the zinc and the ROS signals, in agreement with the idea that there is a relationship between them.

In both the ROS and the zinc studies, it was investigated the effect of an extracellular solution containing TEA, a blocker of voltage dependent potassium channels, and a high concentration of calcium, for the chemical induction of long-term potentiation (LTP). In both cases it was observed, in this solution, a decrease of the signals in question in relation to the baseline fluorescence level. This decrease was reversed in the presence of the normal perfusion solution, in which the signals reached approximately the baseline.

The effect of the phenolic pollutants on both the zinc and the ROS signals evoked by the extracellular solution with TEA and more calcium, for the chemical induction of LTP, was also studied. In both cases, it was found that, in presence of the phenolic compounds, there are small changes in the signals except when returning to the normal perfusion solution, in which case the signals increase with respect to the baseline, suggesting the presence of higher amounts of zinc and ROS.

In the zinc experiments, several situations were evaluated, such as the exposure of hippocampal slices to KCl (60 mM) which causes a depolarization of the cell membrane, allowing the release of zinc from the presynaptic vesicles and its migration into the postsynaptic area, leading to increased zinc signals, which are believed to be postsynaptic. The addition of external zinc in the presence of KCl was also studied. This caused a greater increase than in the

previous situation suggesting that the postsynaptic depolarization caused by KCl allows the entry of externally added zinc in the postsynaptic region.

For the zinc signals, it was found that the addition of the zinc chelator, N, N, N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) (100  $\mu$ M) decreased the fluorescence values to the baseline level confirming that these signals represent zinc changes.

The combined application of the compounds nifedipine (10  $\mu$ M), 2, 3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo-2,3-dione (NBQX) (10  $\mu$ M) and D - 2-amino-5 -fosfonopentanóico acid (D-APV) (50  $\mu$ M), a voltage dependent calcium channel (VDCC) blocker and antagonists of the acid  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid / kainate (AMPA / kainate) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, respectively, decreased the amplitude of the signals, that did not reach the baseline, suggesting that they have a postsynaptic origin. The fact that the signals did not fully decrease may be due to not having used an antagonist of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>+</sup> pumps, that may also be involved in postsynaptic zinc changes.

In the ROS studies, the application of the same blocker and antagonists' mixture, did not cause any change, suggesting that the ROS signals are independent of synaptic transmission.

# Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Organização estrutural do hipocampo .....	1
1.2. Sinapses .....	4
1.3. O papel do zinco no sistema nervoso central.....	5
1.4. Espécies reativas de oxigénio (ROS).....	8
1.4.1. Tipos de ROS .....	9
1.4.2. Antioxidantes.....	10
1.5. Plasticidade sináptica e potenciação de longa duração (LTP).....	11
1.6. Compostos fenólicos.....	12
1.7. Objetivo do trabalho .....	14
1.8. Estrutura da tese.....	14
<b>2. Estado da arte.....</b>	<b>16</b>
2.1. Detecção de zinco no hipocampo .....	16
2.2. Detecção de ROS no hipocampo .....	23
2.3. Envolvimento de zinco na LTP .....	24
2.4. Envolvimento de ROS na LTP .....	27
2.5. LTP induzida quimicamente .....	29
2.6. Efeitos dos compostos fenólicos na saúde.....	30
<b>3. Procedimentos experimentais.....</b>	<b>33</b>
3.1. Preparação das fatias do hipocampo .....	33
3.2. Medição de sinais óticos .....	33
3.2.1. Medição de sinais óticos de zinco .....	34
3.2.2. Medição de sinais óticos de ROS .....	36
3.2.3. Efeito dos compostos fenólicos nos sinais de zinco e de ROS.....	38
3.3. Soluções.....	39

3.4. Produtos químicos utilizados.....	40
<b>4. Resultados.....</b>	<b>41</b>
4.1. Estado fisiológico das preparações.....	41
4.2. Autofluorescência.....	41
4.3. Sinais de zinco.....	43
4.3.1. Efeito de poluentes fenólicos em sinais de zinco.....	43
4.3.2. Variações de zinco associadas com a indução química de LTP .....	46
4.3.3. Efeito de poluentes fenólicos nas variações de zinco associadas com a indução química da LTP.....	48
4.3.4. Variações de zinco originadas por despolarização com KCl.....	49
4.3.5. Natureza iônica dos sinais de Newport Green .....	50
4.3.6. Natureza sináptica dos sinais de zinco .....	52
4.4. Sinais de ROS.....	53
4.4.1. Efeito dos poluentes na formação de ROS.....	53
4.4.2. Variações de ROS associadas com a indução química de LTP .....	54
4.4.3. Efeito de poluentes fenólicos nas variações de ROS associadas com a LTP química	55
4.4.4. Natureza dos sinais de ROS .....	56
<b>5. Discussão.....</b>	<b>59</b>
<b>6. Conclusões e Trabalhos Futuros .....</b>	<b>65</b>
6.1. Conclusões.....	65
6.2. Trabalhos Futuros.....	66
<b>7. Bibliografia.....</b>	<b>67</b>
<b>8. Netgrafia .....</b>	<b>74</b>

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Diferentes tipos de fontes de ROS.....	9
<b>Tabela 2.</b> Agrupamento dos compostos fenólicos em várias classes.....	13
<b>Tabela 3.</b> Antagonistas/Bloqueadores de vários tipos de recetores/canais sinápticos.....	20
<b>Tabela 4.</b> Resultados obtidos com quelantes de zinco para várias concentrações.....	22
<b>Tabela 5.</b> Resultados obtidos com diversos indicadores de ROS para diferentes concentrações.....	24
<b>Tabela 6.</b> Efeitos do zinco, de quelantes de zinco e de antagonistas de recetores de NMDA na LTP. ....	26
<b>Tabela 7.</b> Efeito de vários tipos de ROS na LTP.....	28
<b>Tabela 8.</b> Efeito de compostos fenólicos na saúde. ....	30

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Fatia transversal do hipocampo, onde se podem observar a fascia dentada e o corno de Amon, subdividido em quatro regiões distintas (CA1 a CA4). ....	2
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática das várias camadas que constituem as células piramidais da área CA3 (lado esquerdo) e da área CA1 (lado direito) do hipocampo.....	3
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática de uma sinapse elétrica (lado esquerdo) e de uma sinapse química (lado direito).....	4
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo de uma sinapse do hipocampo onde se podem ver os vários recetores e canais permeáveis ao zinco. ....	6
<b>Figura 5.</b> Estrutura química dos ácidos benzóicos e as várias substituições possíveis. ....	13
<b>Figura 6.</b> Arranjo experimental utilizado na medição de sinais óticos.....	34
<b>Figura 7.</b> Estrutura química do indicador de zinco Newport Green. ....	35
<b>Figura 8.</b> Espectro de excitação do indicador Newport Green.....	35
<b>Figura 9.</b> Estrutura química do indicador de ROS H <sub>2</sub> DCFDA.....	37
<b>Figura 10.</b> Espectro de excitação (curva do lado esquerdo) e de emissão (curva do lado direito) do indicador de ROS H <sub>2</sub> DCFDA. ....	37
<b>Figura 11.</b> Curso temporal da fluorescência basal nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo, na presença do indicador de ROS (H <sub>2</sub> DCFDA).....	41
<b>Figura 12.</b> Intensidade de fluorescência basal na área CA3 do hipocampo (n = 8). ....	43

<b>Figura 13.</b> Efeito de poluentes fenólicos em sinais de zinco obtidos com o indicador Newport Green nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. ....	45
<b>Figura 14.</b> Curso temporal de sinais de zinco obtidos na presença de solução ACSF modificada, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. ....	47
<b>Figura 15.</b> Efeito de poluentes fenólicos na indução química de LTP na área CA3 do hipocampo. ....	48
<b>Figura 16.</b> Efeito do KCl em sinais de zinco obtidos com o indicador Newport Green, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. ....	49
<b>Figura 17.</b> Curso temporal dos sinais de zinco na presença de KCl e do quelante de zinco TPEN, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. ....	50
<b>Figura 18.</b> Amplitude normalizada dos sinais de zinco medidos com Newport Green em meios com KCl, KCl e ZnCl <sub>2</sub> e TPEN, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. ....	51
<b>Figura 19.</b> Efeito do quelante de zinco TPEN nos sinais de zinco obtidos com Newport Green nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo, após a aplicação de Na <sup>+</sup> -piritiona e zinco. ....	52
<b>Figura 20.</b> Avaliação da natureza de sinais de zinco obtidos com Newport Green e induzidos por KCL nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo aplicando um bloqueador e antagonistas específicos. ....	53
<b>Figura 21.</b> Efeito de poluentes fenólicos em sinais de ROS obtidos com o indicador H <sub>2</sub> DCFDA em sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. ....	54
<b>Figura 22.</b> Curso temporal de sinais de ROS na ausência e na presença da solução ACSF modificada, obtidos com H <sub>2</sub> DCFDA em sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. ....	55
<b>Figura 23.</b> Efeito de poluentes fenólicos em sinais de ROS associados com a indução química da LTP, obtidos com o indicador H <sub>2</sub> DCFDA em sinapses fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. ....	56
<b>Figura 24.</b> Sinais de ROS induzidos por compostos fenólicos na ausência e na presença da mistura bloqueador + anatagonistas, obtidos com o indicador H <sub>2</sub> DCFDA em sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. ....	57
<b>Figura 25.</b> Curso temporal de sinais de ROS originados pela aplicação de bloqueadores e de poluentes fenólicos, obtidos com o indicador H <sub>2</sub> DCFDA em sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. ....	58

## Abreviaturas

6-CO<sub>2</sub>H-ZAP4: ácido 6-carboxílico ZinAlquilpyr-4

AAPH: 2, 2'-metil-2 -azobis- propanimidamide, dicloridrato

ACSF: solução cerebrospinal artificial

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

BNZ: benzamil amilorida

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina

CAT: catalase

CM-H<sub>2</sub>DCFDA: 5 (e-6) -clorometil-2', 7'-diacetato dicloro-dihidro-fluoresceína, éster de acetil

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona

D-APV: D - 2-amino-5-fosfonopentanóico ácido

DHR123: dihidrorhodamina 123

DMSO: dimetil sulfóxido

DCT: transportadores de catião divalente

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GO: glucose oxidase

GPx: glutationa peroxidase

GR: glutationa redutase

GSH: glutationa

GST:  $\alpha$ -glutationa-S-transferase

H<sub>2</sub>DCFDA: 2,7-diacetato-dicloro-dihidro-fluoresceína

HET: hidroetidina

LTP: potenciação de longa duração

MT: metalo tioninas

mGluR: recetor metabotrópico de glutamato

MK-801: dizocilpina

NADPH oxidase: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase

NBQX: 2, 3-di-hidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo quinoxalina-2,3-diona

NG: Newport Green

NMDA: N-metil-d-aspartato

NVP-AAM077: ((1S)-1-(4-bromofenil)etil)amino}-(2,3-dioxo-1,4-dihidroquinoxalin-5-il)metil)fosfónico

Óxido nítrico-cGMP: óxido nítrico guanosina monofosfato cíclico

PHN: o-fenantrolina

RB: “rose bengal”

ROS: espécies reativas de oxigênio

Ro25-6981: [R-(R,S)- $\alpha$ -(4-hidroxifenil)-metil-4-(fenilmetil)-1-piperidina propanol]

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TEA: tetraetilamónio

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

TR: tioredoxina redutase

TSQ: 6-metoxi-(8-p-toluenossulfonamida)quinolina

TTX: tetrodotoxina

XXC: xantina/xantina oxidase/catalase

Zinpyr: 4', 5'-bis[bis(2-piridilmetil)aminometil]-2', 7'-diclorofluoresceína

ZnT: transportadores de zinco



## 1. Introdução

A análise de compostos poluentes na saúde é um tema de grande interesse científico, havendo atualmente uma grande preocupação em entender os fenómenos associados aos danos celulares resultantes desses mesmos compostos.

Dentro desta temática, tem sido atribuída grande importância ao grupo dos compostos fenólicos, uma vez que estão presentes nos efluentes de várias indústrias. Considerando o aparente envolvimento de zinco endógeno e de espécies reativas de oxigénio em várias doenças neurodegenerativas, estudou-se a influência de compostos fenólicos em variações de zinco neuronal e a sua relação com alterações na formação de algumas daquelas espécies reactivas, na área CA3 do hipocampo de rato.

Neste capítulo, serão abordados os temas da homeostase de zinco em sinapses do sistema nervoso central muito ricas neste elemento, mais propriamente nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo, e das variações de espécies reativas de oxigénio induzidas por despolarização celular, na ausência e na presença de compostos fenólicos específicos. Para além disso, são também descritas, sumariamente, a estrutura do hipocampo e a transmissão sináptica, essenciais à compreensão dos estudos efectuados.

### 1.1. Organização estrutural do hipocampo

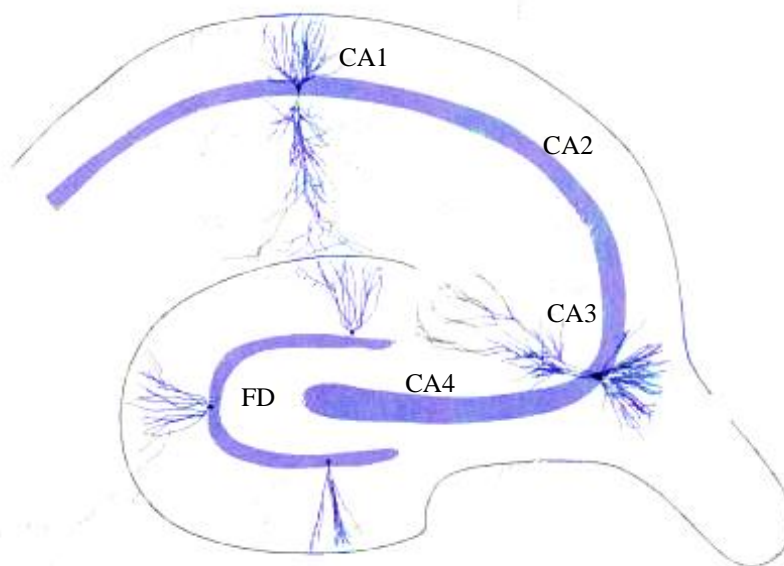
O hipocampo é uma estrutura complexa em forma de “C”, localizada no córtex límbico. Esta estrutura desempenha funções relacionadas com o processamento de memórias e parece desempenhar um papel importante na conversão de memórias de curta duração em memórias de longa duração (Fox, 1996).

O termo formação hipocampal é também comumente utilizado e refere-se ao hipocampo propriamente dito, ao *subiculum*, ao *presubiculum*, ao *parasubiculum* e ao córtex entorrinal. As regiões referidas anteriormente são incluídas nesta designação porque estão conectadas entre si através de um circuito de neurónios conhecido como circuito tri-sináptico (Andersen *et al.*, 2007).

O hipocampo propriamente dito encontra-se subdividido em duas regiões específicas designadas de fascia dentada (*dentate gyrus*) e corno de Amon, constituídos maioritariamente, respetivamente por células granulares e piramidais (Caeser *et al.*, 1991).

A fascia dentada é composta por três camadas principais: a camada granular, a camada molecular e a camada polimorfa. A primeira contém os somas das células granulares, a segunda é constituída pelas dendrites das mesmas células e suas aferentes e a última camada é composta por diferentes tipos de células (Andersen *et al.*, 2007).

O corno de Amon é subdividido em quatro áreas distintas: CA1, CA2, CA3 e CA4 (Lorente de Nó, 1934), que se encontram representadas na Figura 1.



**Figura 1.** Fatia transversal do hipocampo, onde se podem observar a fascia dentada e o corno de Amon, subdividido em quatro regiões distintas (CA1 a CA4).

(Adaptada de Andersen *et al.*, 2007)

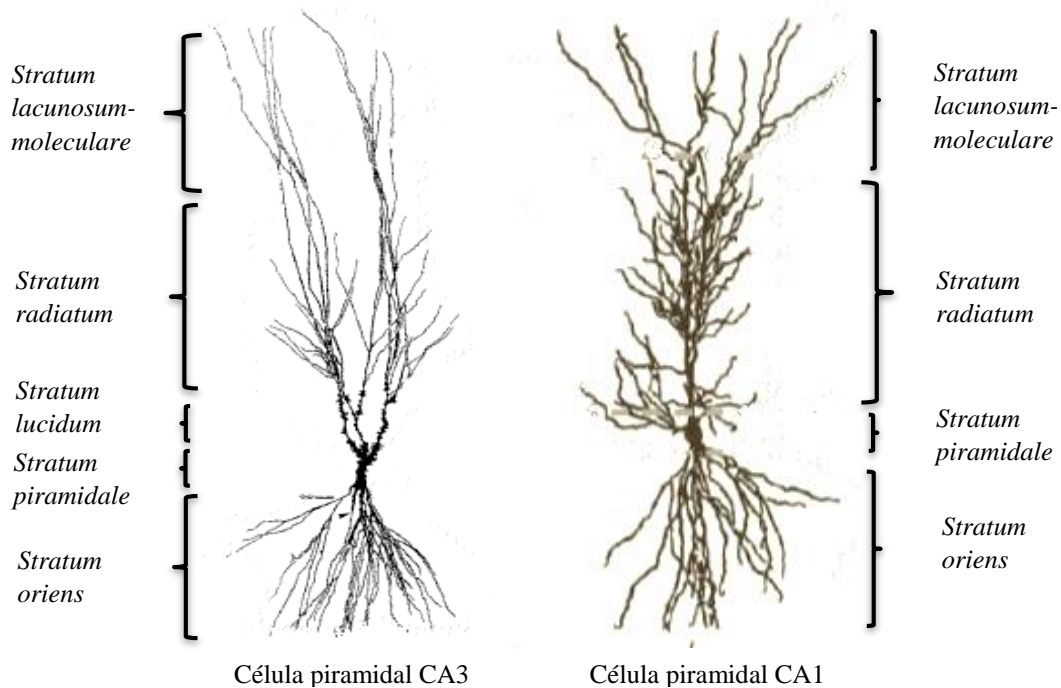
No âmbito deste projeto as áreas CA1 e CA3 são as que têm maior relevo, pelo que, lhes será dado um maior ênfase.

A área CA1 é constituída por várias camadas: o *alveus*, que contém os axónios das células piramidais; a *stratum oriens*, que contém as dendrites basais das células piramidais; a *stratum pyramidale* onde se encontram os somas das células piramidais; a *stratum radiatum* constituída pelas dendrites apicais das células piramidais e onde terminam as fibras colaterais de Schaffer provenientes da área CA3; e por fim, a camada *stratum lacunosum-moleculare* situada junto à fascia dentada (Andersen *et al.*, 2007).

À semelhança da área CA1, a área CA3 encontra-se organizada em várias camadas, contendo apenas mais uma que a anterior, designada de *stratum lucidum*, a qual está localizada

entre a camada *stratum pyramidale* e a *stratum radiatum* e contém as fibras musgosas (Andersen *et al.*, 2007).

Na Figura 2 podem ver-se representadas as várias camadas das células piramidais das áreas CA1 e CA3.



**Figura 2.** Representação esquemática das várias camadas que constituem as células piramidais da área CA3 (lado esquerdo) e da área CA1 (lado direito) do hipocampo.

(Adaptada de Andersen *et al.*, 2007)

Os neurónios do hipocampo transmitem informação através de várias conexões, por exemplo, os neurónios provenientes do córtex entorrinal projetam-se para a fascia dentada formando a via perfurante. Por sua vez, as fibras musgosas provenientes da fascia dentada projetam-se na direção das células piramidais da área CA3 que transmitem informação para a região CA1 através das fibras colaterais de Schaffer. Da região CA1 há transmissão de informação para o córtex entorrinal e para o *subiculum* que conecta com o *presubiculum* e *parasubiculum* (Langston *et al.*, 2010).

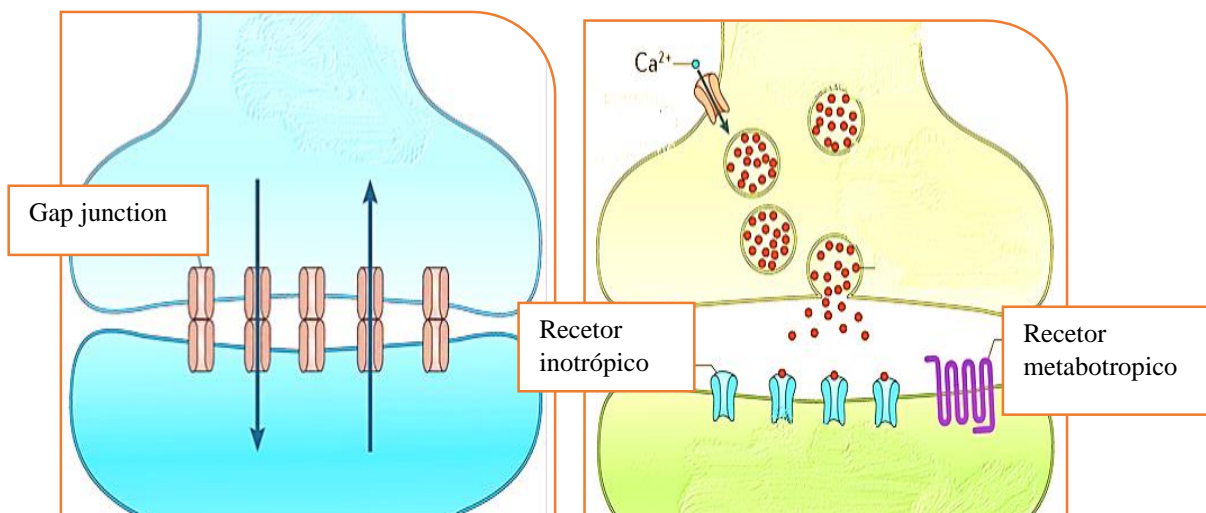
## 1.2. Sinapses

As sinapses são a zona de comunicação entre neurónios, assim definidas por Charles Sherrington (1897). Estas são compostas por dois terminais, um pré-sináptico e um pós-sináptico, separados entre si por uma região muito estreita designada de fenda sináptica.

No sistema nervoso central a região pré-sináptica encontra-se no terminal nervoso do axónio de um neurónio e a região pós-sináptica pode encontrar-se numa dendrite, corpo celular ou axónio doutro neurónio (Fox, 1996).

Existem dois tipos de sinapses: as químicas e as elétricas. Nas sinapses elétricas o sinal elétrico produzido por uma corrente iónica passa diretamente da região pré-sináptica para a pós-sináptica através de uma junção (*gap junction*).

Nas sinapses químicas a transmissão de informação é feita por meio de neurotransmissores que são libertados de vesículas existentes na região pré-sináptica e que se vão ligar a recetores específicos da região pós-sináptica, abrindo canais iónicos e provocando assim uma alteração do potencial da célula pós-sináptica (Figura 3).



**Figura 3.** Representação esquemática de uma sinapse elétrica (lado esquerdo) e de uma sinapse química (lado direito).

(Adaptada de Pereda, 2014)

Estas sinapses dividem-se em sinapses excitatórias e inibitórias, consoante facilitam ou impedem a transmissão do impulso nervoso. Os neurotransmissores excitatórios e inibitórios

mais abundantes no sistema nervoso central (CNS, *central nervous system*) são, respectivamente, o glutamato e o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA).

No hipocampo as sinapses excitatórias têm dois tipos de recetores de glutamato, os recetores ionotrópicos (*glutamate receptors*, GluRs), que contêm um canal permeável a determinados iões; e os metabotrópicos (*metabotropic glutamate receptors*, mGluRs), cuja activação desencadeia uma série de processos incluindo a libertação de cálcio de organelos intracelulares.

No grupo de recetores ionotrópicos de glutamato podem distinguir-se os recetores de N-metil-D-aspartato (NMDA), que são muito permeáveis ao cálcio e estão normalmente bloqueados por magnésio; e os recetores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropiónico/kainato (AMPA/kainato) que são essencialmente permeáveis ao sódio e ao potássio, podendo também deixar passar cálcio. Nas regiões pré e pós-sinápticas existem também canais de cálcio dependentes do potencial (*voltage dependent calcium channels*, VDCCs) e outros como canais de K-ATP (Bancila et al., 2004).

### **1.3. O papel do zinco no sistema nervoso central**

O zinco é um elemento essencial ao organismo onde atua como regulador de várias atividades celulares e desempenha um papel fundamental no funcionamento de várias enzimas. É o segundo elemento mais abundante no corpo humano, depois do ferro (Takeda *et al.*, 2000; Paoletti *et al.*, 2009) e desempenha funções de elevada importância incluindo expressão génica e modulação de neurotransmissores. É um nutriente indispensável para uma dieta saudável e a sua deficiência causa distúrbios de crescimento, maturação sexual e a nível neurológico (Choi *et al.*, 1998).

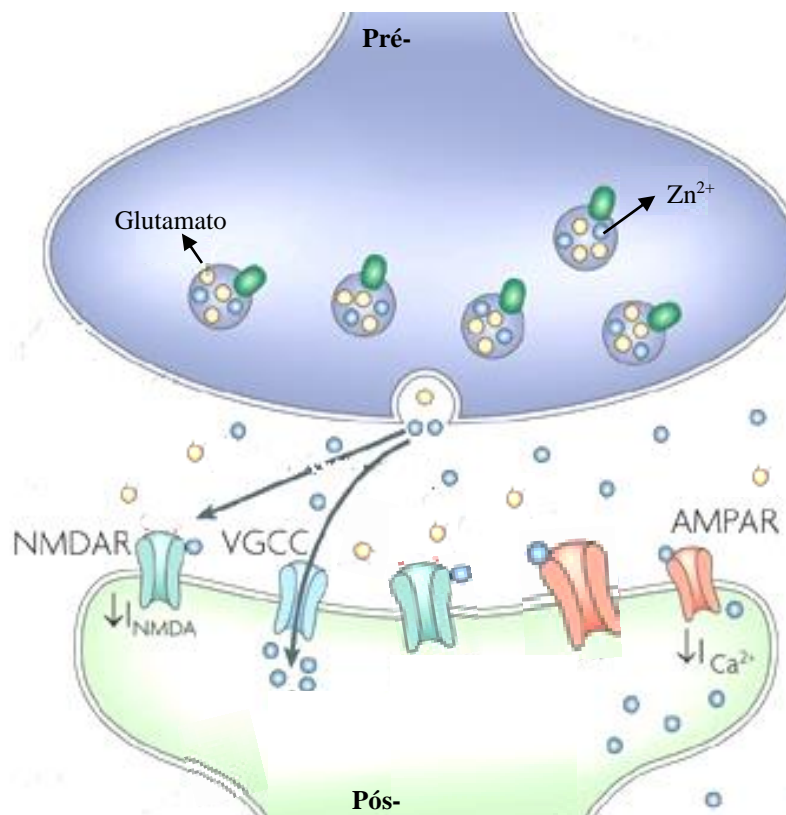
A concentração de zinco presente no cérebro é de aproximadamente 500 nM no meio extracelular e subnanomolar no citosol (Weiss *et al.*, 2000). Nas vesículas das sinapses das fibras musgosas do hipocampo, que contêm muito zinco, podem ser encontradas concentrações entre os 220 e os 300  $\mu$ M (Cuajungco *et al.*, 1997).

Quando presente em concentrações elevadas, o zinco pode ser tóxico e causar danos celulares associados com a epilepsia, isquemia, e doenças neurodegenerativas como as de Alzheimer e de Parkinson (Morris *et al.*, 2012). Foi demonstrado em culturas celulares, que uma exposição a concentrações de 300 a 600  $\mu$ M de zinco durante 15 minutos leva à morte

celular (Yokoyama *et al.*, 1986) e que durante convulsões a concentração de zinco no meio extracelular pode atingir uma concentração de 300  $\mu\text{M}$  (Cuajungco *et al.*, 1997).

Os primeiros depósitos de zinco no cérebro foram encontrados por Maske (Maske, 1955; Frederickson *et al.*, 2005) tendo a libertação deste metal nos terminais sinápticos, induzida por estimulação química sido demonstrada há muitos anos (Assaf *et al.*, 1984) Esta libertação, induzida por estimulação química ou eléctrica, tem sido observada tanto durante atividade neuronal intensa (Budde *et al.*, 1997; Varea *et al.*, 2001; Corceiro *et al.*, 2014) como na sequência de estímulos eléctricos individuais (Quinta-Ferreira *et al.* 2004; Vergnano *et al.*, 2014). Em diferentes estudos, com diferentes indicadores fluorescentes, foram libertadas quantidades de zinco que originaram concentrações de zinco na fenda sináptica entre 10 a 30  $\mu\text{M}$  (Ueno *et al.*, 2002). Usando técnicas de microdiálise no cérebro e aplicando estimulação no tecido cerebral observou-se que as concentrações de zinco eram da ordem dos 100 nM na fenda sináptica. (Frederickson *et al.*, 2005).

O zinco livre é armazenado nas vesículas pré-sinápticas e, em condições favoráveis, pode passar para a região pós-sináptica através da fenda sináptica, como indicado na Figura 4.



**Figura 4.** Esquema representativo de uma sinapse do hipocampo onde se podem ver os vários recetores e canais permeáveis ao zinco.

(Adaptada de Sensi *et al.*, 2009)

Diversos estudos revelam a existência de libertação de zinco de vesículas pré-sinápticas de sinapses específicas (glutamatérgicas), nas quais o zinco está co-localizado com o neurotransmissor glutamato (Frederickson *et al.*, 2005).

A entrada de zinco nos terminais pós-sinápticos ocorre através de canais de cálcio dependentes do potencial e de canais de recetores de NMDA e de AMPA/kainato (Weiss *et al.*, 1993; Koh *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1995; Canzoniero *et al.*, 1997), tendo sido demonstrada de várias formas, entre as quais ressonância magnética nuclear (Benters *et al.*, 1997) e medição de zinco intracelular com indicadores fluorescentes (Sensi *et al.*, 1997; Frederickson *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 2000).

No cérebro cerca de 90 % do zinco encontra-se ligado a proteínas conhecidas por metalo tioneinas encontrando-se os restantes 10%, sob a forma de zinco livre ou complexável, armazenado em vesículas sinápticas (Frederickson, 1989; Takeda *et al.*, 2000). O zinco está presente em concentrações mais elevadas no córtex cerebral e nas estruturas límbicas (Slomianka *et al.*, 1990), particularmente nas fibras musgosas do hipocampo. (Paoletti *et al.*, 2009).

As metalo tioneinas são proteínas que têm como função a regulação de zinco no meio intracelular. Estas proteínas, compostas principalmente por cisteína, são capazes de estabelecer até sete ligações com metais, incluindo o zinco (Frederickson *et al.*, 2005). O papel destas proteínas em relação ao zinco é ainda ambíguo, considerando-se a possibilidade de elas contribuírem para o aumento do zinco intracelular, actuando como reservatórios de zinco (Frederickson *et al.*, 2005). Verificou-se por exemplo que em ratos com deficiência de metalo tioneina 3 os danos celulares na zona CA1 do hipocampo são significativamente reduzidos (Lee *et al.*, 2003), enquanto que na zona CA3 são maiores (Ueno *et al.*, 2002).

Para além das metalo tioneinas, a regulação de zinco no meio intracelular, também é feita por transportadores de zinco sendo conhecidos dois tipos destes transportadores: os transportadores de catião divalente (*divalent cation transporter*, DCTs) e os transportadores de zinco (*zinc transporters*, ZnTs) (Palmiter *et al.*, 1996).

Demonstrou-se também que o zinco causa efeitos inibitórios tanto em recetores excitatórios como os de NMDA como em recetores inibitórios, como o de GABA. Os recetores excitatórios do tipo NMDA são inibidos pelo zinco por meio de dois mecanismos: um com elevada afinidade pelo zinco é dependente do potencial e ocorre no subtipo NR2A e o outro com menor afinidade é independente do potencial e observa-se no subtipo NR2B (Frederickson *et al.*, 2005). Pelo contrário, os recetores de AMPA são potenciados pelo zinco (Paoletti *et al.*, 2009).

#### 1.4. Espécies reativas de oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*- ROS) são espécies que contêm oxigênio com elétrons desemparelhados e portanto são altamente reativas. Elas podem receber ou fornecer elétrons atuando, respectivamente, como agentes oxidantes ou redutores. Por vezes, são também denominadas de radicais livres embora este termo não seja o mais apropriado pois as ROS também incluem espécies não radicalares, ou seja, espécies que não contêm elétrons desemparelhados (Andrade *et al.*, 2010).

As ROS são produzidas no organismo como consequência do metabolismo celular e desempenham papéis importantes em funções fisiológicas (Fox, 1996). Todavia, quando produzidos em excesso, podem danificar lípidos, proteínas e ADN (Uttara *et al.*, 2009). Em conjunto com uma deficiência de antioxidantes são responsáveis pelo *stress* oxidativo que por sua vez é responsável pela morte celular e está associado a várias doenças degenerativas e ao crescimento de tumores (Fox, 1996).

Aquelas espécies são produzidas no retículo endoplasmático, na membrana plasmática e no citoplasma mas o local principal onde se formam é nas mitocôndrias, através de processos de fosforilação oxidativa e de reações de oxidação-redução envolvidas em mecanismos de defesa contra agentes patogênicos. (Singh *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2013).

Nas mitocôndrias, a produção do radical superóxido ocorre no complexo I (Dinucleótido de nicotinamida e adenina ubiquinona oxireductase) e no complexo III (ubiquinol-citocromo c oxireductase). Por sua vez, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH oxidase) e a xantina oxidase são responsáveis pela produção deste radical, respectivamente no citosol e na membrana plasmática (Li *et al.*, 2013).

Para além de serem produzidas internamente, as ROS também podem provir de fontes externas. Na Tabela 1 apresenta-se um resumo de fontes de ROS.



**Tabela 1.** Diferentes tipos de fontes de ROS.

ROS	
Fontes externas	Fontes internas
Radiação UV	Mitocondria
Raios-X	NADPH oxidase
Raios gama	Outras enzimas
Metais pesados	
Poluentes atmosféricos	

(Adaptada de Li et al., 2013)

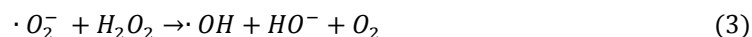
Como se referiu anteriormente, nos últimos anos, vários estudos têm associado a produção de espécies reativas de oxigénio ao crescimento de tumores e a doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla. Sabe-se que o cérebro é o órgão mais afetado pelo excesso de ROS pois, para além de conter níveis elevados de ácidos gordos, que consomem grandes quantidades de oxigénio, ele carece de defesas antioxidantes (Uttara *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013).

#### 1.4.1. Tipos de ROS

O oxigénio molecular, apesar de ter um eletrão desemparelhado na última camada de cada átomo, é uma molécula estável pois os electrões gravitam na mesma direção. No entanto, a entrada de um eletrão numa destas camadas leva à formação de ROS como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o oxigénio singlete ( $^1O_2$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o radical alcóxilo ( $RO\cdot$ ), o radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) e radical peróxilo ( $ROO\cdot$ ) (Kohen *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2004)

O peróxido de hidrogénio é uma espécie não radicalar que possui um número par de eletrões e é relativamente pequeno, o que permite a sua rápida migração através de membranas biológicas (Rhee *et al.*, 2003). Aparentemente está envolvido em vários fenómenos celulares como modulação da transmissão sináptica (Avshalumov *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001) e plasticidade sináptica (Auerbach *et al.*, 1997; Klann *et al.*, 1998), podendo ser formado diretamente por reações catalisadas por enzimas como a monoamina oxidase e a L-amino ácido oxidase (Singh *et al.*, 2004).

O peróxido de hidrogénio reage com o  $Fe^{2+}$  recebendo deste um eletrão e formando assim o radical hidroxilo numa reação conhecida como reação de Fenton, como se pode ver nas Equações 1, 2 e 3 seguintes (Roger *et al.*, 1997; Uttara *et al.*, 2009).



O radical superóxido é geralmente a primeira espécie a ser produzida e, posteriormente, pode ser convertido em peróxido de hidrogénio pela enzima superóxido dismutase (*superoxide dismutase*, SOD). É gerado essencialmente na cadeia de transporte de eletrões nas mitocondrias podendo também ser produzido pela auto-oxidação de semiquinonas (Singh *et al.*, 2004).

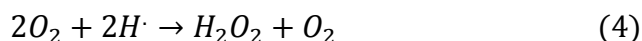
### 1.4.2. Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias responsáveis pela proteção do organismo contra o ataque de radicais livres e de ROS. Eles podem ser diretamente produzidas pelo organismo ou ingeridos através da alimentação e de suplementos (Uttara *et al.*, 2009).

De entre os antioxidantes gerados pelo organismo distinguem-se dois tipos: os antioxidantes enzimáticos dos quais fazem parte a superóxido dismutase (*superoxide dismutase*, SOD), a catalase (*catalase*, CAT), a glutathione reductase (*glutathione reductase*, GR), a glutathione peroxidase (*glutathione peroxidase*, GPx) e a tioredoxina reductase (*thioredoxine reductase*, TR); os antioxidantes não enzimáticos como o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selénio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, taurinas, hipotaurinas, glutathione (glutathione, GSH), e caroteno (Fox, 1996; Singh *et al.*, 2004; Uttara *et al.*, 2009).

Os mecanismos de defesa do organismo contra as ROS visam a eliminação direta destas espécies pelas enzimas SODs, catalases e glutathione peroxidase ou simplesmente a manutenção das defesas antioxidantes para desintoxicação de ROS, que é feita por espécies como a glutathione reductase, glucose-6-fosfato dehidrogenase e  $\alpha$ -glutathione-S-transferase citosólica ( $\alpha$ -glutathione-S-transferase, GST) (Singh *et al.*, 2004).

As enzimas catalases catalisam as reações que convertem peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, enquanto que as SODs convertem o superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio. Na reação 4 seguinte inicia-se a desintoxicação devida às ROS que é depois completada pela catalase, que através da reação 5 converte o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio.



A GPx, na presença de GSH, converte o peróxido em água, assim como a TR (Held, 2012; Wang *et al.*, 2013).

### 1.5. Plasticidade sináptica e potenciação de longa duração (LTP)

A plasticidade sináptica está relacionada com os processos de aprendizagem e formação de memórias e consiste na alteração funcional das sinapses durante a atividade neural. O aumento duradouro da eficiência da transmissão sináptica após estimulação intensa é uma forma de plasticidade sináptica designada de potenciação de longa duração (*long term potentiation, LTP*) (Fox, 1996).

A LTP foi primeiro observada no hipocampo de rato (Bliss *et al.*, 1973) tendo desde então vindo a ser muito estudada em várias regiões do cérebro de mamíferos.

A indução elétrica de LTP em preparações do hipocampo pode ser efectuada com vários protocolos de estimulação que consistem na aplicação de conjuntos de estímulos elétricos de alta frequência (denominados tétanos) separados por um determinado período de tempo. O protocolo mais utilizado consiste na aplicação de 100 estímulos durante 1 segundo (100 Hz) Foi ainda demonstrado que a LTP pode ser induzida por estimulação de baixa frequência (vários pulsos de 5 ou 10 Hz) (Kumar *et al.*, 2011).

Existem duas formas distintas de LTP no hipocampo, uma dependente da ativação dos recetores de NMDA, com origem pós-sináptica, e outra independente desta ativação, que se considera ter origem pré-sináptica. Esta última pode ser observada nas sinapses entre as fibras musgosas e as células piramidais do hipocampo na zona CA3, enquanto a primeira ocorre nas

sinapses entre as fibras colaterais de Schaffer e as células piramidais da área CA1 e também nas sinapses das fibras associacionais / comissurais com células piramidais da região CA3 (Zalutsky *et al*, 1990; Urban *et al*, 1996).

Na LTP dependente da ativação dos recetores de NMDA a estimulação elétrica de alta frequência origina uma libertação intensa de neurotransmissores como o glutamato que vão causar uma despolarização da célula pós-sináptica, mediada inicialmente pelos recetores de AMPA, que leva à entrada de cálcio através de recetores de NMDA e de VDCCs, resultando numa cadeia de eventos que levam à formação da LTP. Essa sequência de eventos não é ainda totalmente conhecida sabendo-se, no entanto, que consiste essencialmente na produção de várias moléculas mensageiras, como o monofosfato cíclico de adenosina (*cyclic adenosine monophosphate*, cAMP), o óxido nítrico guanosina monofosfato cíclico (*cyclic nitric oxide guanosine monophosphate*, cGMP) e o ácido aracónico que, por sua vez, vão ativar cinases proteicas que parecem estar envolvidas no fenómeno da LTP (Knap *et al.*, 2002).

No hipocampo a LTP pode ser induzida por meio de estimulação elétrica tetânica e também por aplicação de um composto bloqueador de canais de potássio dependentes do potencial, o tetraetilamónio (*tetraethylammonium*, TEA). Neste caso é designada de LTP química (Stewart *et al.*, 2005; Kumar, 2011), ou TEA-LTP (Song *et al.*, 2002) e será descrita mais à frente neste trabalho.

## **1.6. Compostos fenólicos**

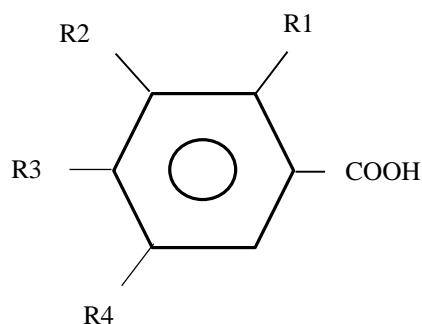
Os compostos fenólicos constituem uma grande preocupação no que diz respeito à poluição ambiental, principalmente de recursos hídricos. Estes compostos provêm de várias indústrias como refinarias, fábricas de pesticidas (Gonzalez-Rivera *et al.*, 2014) e, em grande parte, de efluentes de lagares de azeite. A sua toxicidade leva a dificuldades no seu tratamento, como por exemplo, a impossibilidade de tratamento pela via biológica pelo facto dos microrganismos não suportarem elevadas concentrações destes compostos (Souza *et al*, 2012). Por estes motivos, a sua presença nos recursos hídricos constitui também uma preocupação ao nível da saúde humana.

Os compostos fenólicos são compostos aromáticos constituídos por um anel benzénico ligado a um ou mais grupos hidroxilo. Estes compostos podem ser distinguidos em diferentes classes como mostra a Tabela 2 (Ocakoglu, 2008).

**Tabela 2.** Agrupamento dos compostos fenólicos em várias classes.

Categorias		
Ácidos fenólicos		Álcoois fenólicos
Ácido benzóico e derivados	Ácido cinâmico e derivados	
Benzóico	Cinâmico	Tirosol
p-Hidroxibenzóico	p-Cumarico	Hidroxitirosol
Protocatequínico	Cafeico	(3,4-Dihdroxifenil)
Vanílico	Ferulico	etanol-glucosido
Verátrico		
Gálico		
Siríngico		
3,4,5-trimethoxibenzoico		

Neste trabalho, os ácidos benzóicos são os compostos com maior interesse, estando portanto, a sua estrutura geral, bem como as várias substituições representadas na Figura 5.



Ácido vanílico: R2 = OCH<sub>3</sub>; R3 = OH

Ácido gálico: R2 = R3 = R4 = OH

Ácido p-hidroxibenzoico: R3 = OH

Ácido protocatequínico: R2 = R3 = OH

Ácido verátrico: R3=R4=OCH<sub>3</sub>

Ácido siríngico: R2 = R4 = OCH<sub>3</sub>; R3 = OH

Ácido 3,4,5-trimethoxibenzoico: R2=R3=R4=OCG<sub>3</sub>

**Figura 5.** Estrutura química dos ácidos benzóicos e as várias substituições possíveis.

(Adaptada de Soares, 2002)

Diversos estudos mencionam as propriedades antioxidantes dos ácidos fenólicos, propriedades que advêm do número e da posição dos grupos hidroxilo que reagem facilmente com espécies reativas de oxigênio. Além disso os compostos fenólicos têm a capacidade de atuarem como quelantes de íons metálicos envolvidos na produção de ROS como por exemplo o Fe<sup>2+</sup> utilizado na reação de Fenton (Pereira *et al.*, 2009).

No entanto, outros resultados sugerem que em concentrações elevadas os compostos fenólicos são tóxicos, nocivos e responsáveis por vários problemas de saúde, tendo sido classificados pela Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A (*US Environmental Protection Agency*) e pela União Europeia como poluentes prioritários (Gonzalez-Rivera *et al.*, 2014).

Os estudos realizados nos últimos anos foram mais direcionados para os benefícios daqueles compostos do que para os seus efeitos nefastos, considerando-se que, como qualquer composto presente em quantidades excessivas no organismo, eles podem tornar-se prejudiciais à saúde.

### **1.7. Objetivo do trabalho**

O objetivo deste trabalho consistiu na investigação de efeitos de compostos poluentes fenólicos na saúde através da análise das suas ações na libertação de zinco e na formação de espécies reativas de oxigénio nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo de rato.

### **1.8. Estrutura da tese**

Neste primeiro capítulo, a Introdução, foram descritas a estrutura do hipocampo, área cerebral em que se realizam os estudos e as características principais da transmissão sináptica, processo que está no centro deste estudo sobre o efeito dos poluentes fenólicos na actividade neuronal.

Depois foi feita uma abordagem à temática do zinco no sistema nervoso central, metal que existe em concentrações muito elevadas nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo e que pode originar a formação de espécies reativas de oxigénio. Consideraram-se a distribuição do zinco endógeno e as suas funções sinápticas e também os seus efeitos negativos na sequência de estimulações muito intensas. Seguidamente fez-se uma descrição das espécies reativas de oxigénio e também dos antioxidantes.

Por último descreveram-se compostos fenólicos, em especial os ácidos benzóicos, que são os compostos poluentes utilizados neste estudo.

O estado da arte é apresentado no segundo capítulo, onde são referidos estudos sobre os efeitos da libertação de zinco em neurónios do hipocampo e o envolvimento deste metal na LTP. São também abordadas as consequências da sua mobilidade intensiva na formação de

espécies reativas de oxigénio e a sua relação com a LTP. Por fim, são mencionados os efeitos dos compostos fenólicos na saúde.

No terceiro capítulo são apresentados os procedimentos experimentais usados neste trabalho de investigação, desde a obtenção de fatias cerebrais à instrumentação e metodologias utilizadas.

Segue-se a apresentação dos resultados obtidos, bem como a sua análise e discussão, que constituem os capítulos quatro e cinco.

Na última parte, no capítulo seis, são apresentadas as conclusões obtidas e as perspetivas para trabalho futuro.

## 2. Estado da arte

### 2.1. Detecção de zinco no hipocampo

Como já foi referido anteriormente, a influência da translocação do zinco em células nervosas é uma temática que tem vindo a ser muito estudada ao longo dos últimos anos, utilizando para isso, indicadores fluorescentes que permitem confirmar a libertação de zinco e procuram esclarecer os efeitos neurotóxicos do zinco.

Vários estudos revelam que o trauma cerebral está relacionado com a libertação sináptica de zinco. Em ratos sujeitos a trauma cerebral verifica-se a escassez de zinco na zona pré-sináptica e o aumento deste na zona pós-sináptica. Verifica-se ainda que a utilização de compostos com elevada afinidade pelo zinco tem um efeito protetor dos neurónios (Suh *et al.*, 2000).

Em neurónios e células de glia uma exposição a concentrações de zinco da ordem dos 600  $\mu\text{M}$  causa morte neuronal em curtos períodos de tempo (15 minutos). Para concentrações menores (300  $\mu\text{M}$ ) e passadas várias horas, as células de glia não resistem (Cuajungco *et al.*, 1997).

Foi demonstrado que durante isquemia simulada pela ausência de oxigénio e glucose, também se verificam aumentos do zinco extracelular e intracelular nas áreas CA1, CA3 e fascia dentada (Wei *et al.*, 2004). Este resultado está de acordo com outros estudos que sugerem a acumulação de zinco em várias regiões do hipocampo após isquemia (Koh *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 2002).

Estudos anteriores revelaram a existência de translocação de zinco dos terminais pré-sinápticos para os pós-sinápticos, após estimulação elétrica. Verificou-se que uma estimulação elétrica intensa induz uma libertação rápida de zinco dos terminais sinápticos das fibras musgosas para a fenda sináptica. Verificou-se também que a concentração de zinco na região pós-sináptica aumenta depois da estimulação elétrica (Li *et al.*, 2000).

Noutro tipo de estudos foi analisado o efeito da aplicação de zinco extracelular, na concentração de zinco intracelular. Para isso, aplicaram-se, para além do zinco, compostos que causam a despolarização de membrana, normalmente o cloreto de potássio (KCl). Utilizaram-se também antagonistas de vários tipos de recetores/canais sinápticos de forma a verificar qual o envolvimento desses recetores/canais na entrada de zinco que leva a um estado tóxico. Os



resultados apontam para uma maior contribuição dos canais de cálcio dependentes do potencial. (Canzoniero *et al.*, 1999).

Em experiências com o indicador de zinco mag-fura-5, nas quais se aplicam 100  $\mu\text{M}$  de zinco e 100  $\mu\text{M}$  de glutamato, a concentração de zinco intracelular aumenta aproximadamente 50 nM (Canzoniero *et al.*, 1997).

Aparentemente, o zinco está também envolvido na formação de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, pode ser responsável pelo *stress* oxidativo. Vários trabalhos sugerem isto e referem que o zinco pode interferir com o metabolismo da mitocôndria desencadeando a produção de ROS (Weiss *et al.*, 2000; Sensi *et al.*, 2011). O zinco em excesso pode também ser responsável pela ativação de moléculas como a NADPH, que participam na formação de ROS sendo a sua toxicidade atenuada na presença de antioxidantes, sugerindo uma vez mais a participação deste metal na produção de ROS (Frederickson *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2012).

Devido à potencial neurotoxicidade do zinco, têm sido desenvolvidos vários indicadores fluorescentes para medir o zinco intracelular. Na Tabela 3 apresentam-se resultados dos estudos realizados com vários indicadores de zinco fluorescentes.

**Tabela 3.** Resultados de estudos efetuados com diferentes indicadores de zinco e para diferentes concentrações dos mesmos.

<b>Indicador</b>	$\lambda$ excitação/emissão (nm)	<b>Concentração</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referências</b>
TSQ*	400 / 500	4.5 $\mu\text{M}$	Estudos feitos em secções de 10 $\mu\text{m}$ de cérebros de ratos sujeitos a trauma cerebral, apresentam elevada intensidade de fluorescência nas zonas da fascia dentada, 6 h após o trauma, indicando a presença de zinco. Nas zonas do corno de Amon e <i>subiculum</i> a fluorescência	Suh <i>et al.</i> , 2000

			com intensidade mais elevada observa-se passadas 24 h.	
NG sal dissódico (impermeante)	485 / 530	20 $\mu$ M	Após estimulação elétrica das sinapses das fibras musgosas em fatias do hipocampo, verifica-se a libertação de zinco na zona pré-sináptica daquelas fibras.	Li <i>et al.</i> , 2001
NG diacetato (permeante)	485 / 530	50 $\mu$ M	Observa-se, em fatias do hipocampo, um aumento das quantidades de zinco nos terminais pós-sinápticos, após estimulação elétrica.	Li <i>et al.</i> , 2001
TSQ*	400 / 500	4.5 $\mu$ M	Após estimulação elétrica das sinapses das fibras musgosas em fatias do hipocampo, verifica-se um aumento da fluorescência na zona pós-sináptica indicando um aumento da quantidade de zinco nesta zona.	Li <i>et al.</i> , 2001
NG diacetato ( $k_d = 1 \mu$ M)	485 / 530	5 $\mu$ M	O zinco intracelular foi medido em experiências com um meio extracelular contendo 300 $\mu$ M de zinco. Na presença de kainato e de KCl observa-se mais morte celular e aumento das concentrações de zinco intracelular do que, na presença de NMDA. Isto sugere que os recetores de NMDA são menos	Canzoniero <i>et al.</i> , 1999

			importantes para a entrada de zinco do que os VDCCs.	
NG diacetato	488 / 533	50 $\mu$ M	Após simulação de isquemia com ausência de oxigénio e de glucose em fatias do hipocampo, a fluorescência proveniente de zinco intracelular aumenta rapidamente atingindo um máximo ao fim de 30 minutos. Repondo o oxigénio e a glucose a fluorescência continuou a aumentar.	Wei <i>et al.</i> , 2004
NG sal dissódico	488 / 533	20 $\mu$ M	Após idêntica simulação de isquemia a fluorescência proveniente de zinco extracelular aumenta, continuando o aumento quando são introduzidos o oxigénio e a glucose.	Wei <i>et al.</i> , 2004
Zinpyr*	_____	20 $\mu$ M	Uma despolarização induzida com 60 mM de KCl causa uma diminuição da fluorescência indicando que o zinco é libertado da região pré-sináptica. Seguidamente observa-se um aumento da concentração de zinco na zona pós-sináptica.	Kettermen <i>et al.</i> , 2008
6-CO <sub>2</sub> H-ZAP4*	_____	5 $\mu$ M	A aplicação de 90 mM de KCl durante 90 segundos em fatias do hipocampo provoca uma redução significativa da	Khan <i>et al.</i> , 2014

			intensidade de fluorescência na zona pré-sináptica das fibras musgosas.	
Mag-fura-5	340 / 500	3 $\mu$ M	Em neurónios de cultura a adição de KCl (30-90 mM) e Zn <sup>2+</sup> (300 $\mu$ M) provoca um aumento da concentração de zinco intracelular que não se verifica adicionando apenas KCl (90 mM).	Sensi <i>et al.</i> , 1997

\* TSQ: 6-metoxi-(8-p-toluenossulfonamida) quinolina; Zinpyr: 4', 5'-bis [bis (2-piridilmetil) aminometil] -2', 7'-diclorofluoresceína; 6-CO<sub>2</sub>H-ZAP4: ácido 6-carboxílico ZinAlquilpyr-4

Para verificar a origem dos sinais obtidos são utilizados compostos que interferem com determinados recetores de glutamato e canais de cálcio dependentes do potencial, pós-sinápticos, que são permeáveis ao zinco. Estes compostos (antagonistas de recetores ou bloqueadores de VDCCs) ao impedirem a passagem de zinco pelos canais respetivos, permitem saber a origem dos sinais

Na Tabela 4 apresentam-se vários destes compostos com indicação dos recetores que bloqueiam e as concentrações utilizadas em vários estudos.

**Tabela 3.** Antagonistas/Bloqueadores de vários tipos de recetores/canais sinápticos.

<b>Composto</b>	<b>Recetores/Canais bloqueados</b>	<b>Concentração</b>	<b>Referências</b>
CNQX*	AMPA/Kainato	10 $\mu$ M	Li <i>et al.</i> , 2001
D-APV*	NMDA	50 $\mu$ M	Matias, 2001
NBQX*	AMPA/Kainato	10 $\mu$ M	Canzoniero <i>et al.</i> ,1999
Dizocilpina (MK-801)	NMDA	10 $\mu$ M	Canzoniero <i>et al.</i> ,1999

Tetrodotoxina (TTX)	Canais de Na <sup>+</sup>	0,5 µM	Sensi <i>et al.</i> , 1997
TEA	Canais de K <sup>+</sup>	5 mM	Sensi <i>et al.</i> , 1997
Nifedipina	Canais de Ca <sup>+</sup>	10 µM	Sensi <i>et al.</i> , 1997
Oubaina	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	20 µM	Sensi <i>et al.</i> , 1997
Benzamil amilorida (BNZ)	Bombas Na <sup>+</sup> -Ca <sup>+</sup>	100 µM	Sensi <i>et al.</i> , 1997

\*CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona; D-APV: D - 2-amino-5-fosfonopentanóico ácido; NBQX: 2, 3-di-hidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo quinoxalina-2,3-diona.

Em vários estudos, a utilização de compostos com elevada afinidade pelo zinco (quelantes) é também uma prática comum, para investigar a presença e os movimentos de zinco durante actividade neuronal. Normalmente, estes compostos, que se ligam fortemente ao zinco, reduzem os efeitos tóxicos provenientes deste metal (Suh *et al.*, 2000).

Os quelantes de zinco mais utilizados em estudos neuronais são o N,N,N,N'-tetrakis (2-piridilmetil) etilenodiamina (TPEN) e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) saturado com cálcio (Ca-EDTA). O EDTA tem uma elevada afinidade pelo zinco ( $k_d=10^{-15}$  M), e baixa afinidade por iões como o cálcio ( $k_d=10^{-7.3}$  M) e o magnésio ( $k_d=10^{-5.4}$  M), no entanto utiliza-se a forma saturada com cálcio para garantir que este se ligue apenas ao zinco (Suh *et al.*, 2000).

O TPEN é um quelante, permeável à membrana celular, com elevada afinidade pelo zinco e baixa afinidade pelo cálcio. Foi demonstrado que este composto diminui os efeitos tóxicos do zinco em experiências *in vivo* (Cuajungco *et al.*, 1997)

Os efeitos da aplicação de vários quelantes de zinco, em diferentes concentrações são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 4.** Resultados obtidos com quelantes de zinco para várias concentrações.

<b>Composto</b>	<b>Concentração</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referências</b>
Ca-EDTA	10 mM	A aplicação de Ca-EDTA reduz em 50 a 75% os neurónios danificados, por excesso de zinco libertado após trauma mecânico cerebral, em fatias do hipocampo	Suh <i>et al.</i> , 2000
Ca-EDTA	10 mM	Após estimulação elétrica ou química (com 50 mM de KCl), o Ca-EDTA impede o aumento dos sinais de zinco medidos com o indicador NG na zona pós-sinapticas de fatias do hipocampo.	Li <i>et al.</i> , 2001
Ca-EDTA	1 mM	O Ca-EDTA melhora a atividade dos recetores de NMDA nas fibras musgosas do hipocampo, ou seja na presença de zinco a função destes recetores é diminuída.	Molnár <i>et al.</i> , 2001
TPEN	100 µM	Na presença de TPEN a fluorescência dos sinais de zinco intracelular obtidos com o indicador NG desce para os níveis de referência.	Canzoniero <i>et al.</i> , 1999
TPEN	50 µM	Após despolarização com KCl (30-90 mM) e Zn <sup>2+</sup> (300 µM) em culturas de neurónios, a aplicação de TPEN traz os sinais ao nível da linha base.	Sensi <i>et al.</i> , 1997

## 2.2. Detecção de ROS no hipocampo

O papel desempenhado pelas espécies reativas de oxigênio no organismo permanece ainda desconhecido pois apesar de serem consideradas moléculas neurotóxicas, elas também estão envolvidas em vários processos envolvidos no normal desempenho da função cognitiva.

As ROS parecem estar envolvidas na regulação de vários canais e recetores, como recetores de NMDA, canais de cálcio e de potássio dependentes do potencial, e também na plasticidade sináptica, especialmente na LTP (Massaad *et al.*, 2011).

Excesso de ROS provocam *stress* oxidativo em todos os tipos de neurónios no entanto cada tipo de neurónio responde de forma diferente, ou seja, em diferentes zonas do cérebro há diferentes vulnerabilidades ao *stress* oxidativo. Por exemplo, nas zonas CA3 e CA1 do hipocampo que têm constituições muito parecidas, os efeitos dos ROS são bastante diferentes. Na área CA1 os neurónios morrem na presença de substâncias produtoras de ROS, como sulfato de ferro e duroquinona, enquanto que na área CA3 a maioria consegue sobreviver (Wilde *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010).

Freitas *et al.*, 2005 estudaram o envolvimento das espécies reativas de oxigênio na epilepsia. Para isso foi induzido um estado epilético em ratos através da aplicação do composto pilocarpina e verificou-se um aumento na peroxidação lipídica e uma diminuição do antioxidante GSH sugerindo um aumento na produção de ROS. Observou-se também um aumento da atividade da catálase e a atividade da SOD permaneceu inalterada.

Ultimamente têm sido desenvolvidas várias formas de medir a produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo métodos calorimétricos e luminescentes. Compostos como a dicloro-fluoresceína (DCFH) e dihidro-rodamina (DHR123) são frequentemente utilizados na quantificação destas espécies. Estes são seletivos ao peróxido de hidrogênio, radical hidroxilo e ao peroxinitrito, respetivamente. A hidroetidina (HET), é um indicador fluorescente permeável à membrana celular, também muito utilizado, o qual é oxidado pelo  $O_2^-$  (Bindokas *et al.*, 1996).

A Tabela 6 mostra os resultados de estudos da produção de ROS com vários indicadores.

**Tabela 5.** Resultados obtidos com diversos indicadores de ROS para diferentes concentrações.

Indicador	$\lambda$ excitação/emissão (nm)	Concentração	Resultados	Referências
Mito Tracker Red	488 / 530	10 $\mu$ g/ml	Induziu-se a produção de superóxido, peróxido e oxigénio singleto, em neurónios de cultura,	Valencia <i>et al.</i> , 2004
DHR123	488 / 515	2 $\mu$ g/ml	utilizando, respetivamente as substâncias GO, XXC e RB.	Valencia <i>et al.</i> , 2004
H <sub>2</sub> DCFDA	488 / 515	2 $\mu$ g/ml	Verificou-se que o oxigénio singleto e o superóxido causam morte celular por apoptose e o peróxido por necrose.	Valencia <i>et al.</i> , 2004
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	470 / 505	5 $\mu$ M	Em culturas de hipocampo as células de glia sofrem uma coloração mais intensa tornando-se difícil perceber se os sinais obtidos são exclusivamente de neurónios.	Funke <i>et al.</i> , 2011
HEt	485 / 536	10 $\mu$ M	O indicador acumula-se nas mitocôndrias ou liga-se a ácidos nucleicos podendo assim aumentar a intensidade de fluorescência nesses locais, não fornecendo o sítio exato da formação das ROS.	Funke <i>et al.</i> , 2011

### 2.3. Envolvimento de zinco na LTP

O papel do zinco na plasticidade sináptica permanece ainda incerto, no entanto tem vindo a ser muito estudado devido às elevadas quantidades deste metal presentes nos neurónios glutamatérgicos, o que sugere algum envolvimento deste composto no fenómeno da LTP.

A LTP tem sido estudada em várias sinapses do hipocampo, incluindo nas sinapses das fibras musgosas que são especialmente ricas em zinco. (Li *et al.*, 2001). Nestas sinapses há



estudos que mostram que a LTP não é afectada quando se aplica um quelante de zinco (Quinta-Ferreira *et al.*, 2004) enquanto outros indicam o contrário (Smart *et al.*, 1994; Izumi *et al.*, 2006). Também, estudos elaborados em ratos cujos neurónios não contêm os transportadores de zinco Zn-T3, que transportam o zinco para dentro das vesículas sinápticas, mostram que o zinco é importante na formação de LTP na fibras musgosas do hipocampo. De acordo com esta última hipótese, animais sujeitos a uma alimentação deficiente em zinco ficam com a aprendizagem e memória espacial prejudicada confirmando assim a importância do zinco em processos relacionados com a formação de memórias (Sindreu *et al.*, 2011).

Noutros estudos realizados em fatias do hipocampo verificou-se que 100  $\mu$ M de zinco extracelular bloqueiam a LTP em ambas as zonas, CA1 e CA3. Portanto a hipótese de que a inibição da LTP pode dever-se a mecanismos relacionados com os recetores de NMDA não é totalmente certa, visto que na área CA3 a LTP não depende deste tipo de recetores. No entanto na zona CA1 do hipocampo, como já referido anteriormente, a LTP é dependente da ativação de recetores de NMDA. De forma a entender melhor o papel destes recetores na LTP das sinapses da área CA1, ela foi induzida na presença de antagonistas específicos de dois subtipos de recetores de NMDA. Os subtipos considerados foram NR1/NR2A e NR1/NR2B e os antagonistas, respetivamente o ((1S)-1-(4-bromofenil)etil)amino-(2,3-dioxo-1,4-dihydroquinoxalin-5-il)metil)fosfónico (NVP-AAM077) e o ifenprofil e o [R-(R,S)- $\alpha$ -(4-hidroxifenil)-metil-4-(fenilmetil)-1-piperidina propanol] (Ro25-6981). Os resultados indicam que a formação desta forma de LTP requer a participação do subtipo NR1/NR2A mas não a do subtipo NR1/NR2B (Izumi *et al.*, 2006).

A LTP na área CA1 foi também estudada em fatias do hipocampo, na presença de 100 mM de KCl. Este composto despolariza os neurónios originando a libertação de zinco e o aumento da sua concentração no meio extracelular. Os resultados sugerem mais uma vez que o zinco é prejudicial para a LTP pois verificam-se défices na memória. No entanto, quando aplicados quelantes de zinco a LTP é inibida sugerindo isto que o zinco também é importante para a ocorrência deste fenómeno (Takeda *et al.*, 2011).

Na Tabela 7 é apresentado um resumo dos efeitos do zinco na LTP, bem como de vários quelantes de zinco e de antagonistas de recetores de NMDA.

**Tabela 6.** Efeitos do zinco, de quelantes de zinco e de antagonistas de recetores de NMDA na LTP.

<b>Composto</b>	<b>Concentração</b>	<b>Efeitos na LTP</b>	<b>Indução da LTP/ Resultados</b>	<b>Referências</b>
Zinco	100 $\mu$ M	Bloqueia	O zinco bloqueia a LTP nas áreas CA1 e CA3 de fatias do hipocampo.	Xie <i>et al.</i> , 1994
Zinco	10 $\mu$ M	Não Interfere	A LTP foi induzida eletricamente com uma	Izumi <i>et al.</i> , 2006
D-APV (antagonista de NMDARs)	5 $\mu$ M	Não Interfere	frequência de 100 Hz nas fibras colaterais de Schaffer.	Izumi <i>et al.</i> , 2006
D,L-APV (antagonista de NMDARs)	10 $\mu$ M	Não Interfere	O efeito do antagonista (10 $\mu$ M) foi estudado na presença de 10 $\mu$ M de zinco nas fibras colaterais de Schaffer	Izumi <i>et al.</i> , 2006
	50 $\mu$ M	Bloqueia	sendo que neste caso a indução de LTP é bloqueada.	Izumi <i>et al.</i> , 2006
Ifenprodil (antagonista de NR1/NR2B)	10 $\mu$ M	Não Interfere	Este composto sozinho não interfere na LTP, no entanto, na presença de 10 $\mu$ M de D,L-APV, a LTP é bloqueada.	Izumi <i>et al.</i> , 2006
NVP-AAM077 (antagonista de NR1/NR2A)	0,05 $\mu$ M	Enfraquece	Este composto, na presença de 10 $\mu$ M de zinco bloqueia a LTP.	Izumi <i>et al.</i> , 2006

Ca-EDTA (quelante de zinco)	2 Mm	Bloqueia		Izumi <i>et al.</i> , 2006
O-fenantrolina (PHN) (quelante de zinco)	200 $\mu$ M	Bloqueia	A LTP foi induzida eletricamente com uma frequência de 100 Hz nas fibras colaterais de Schaffer.	Izumi <i>et al.</i> , 2006
TPEN (quelante de zinco)	50 $\mu$ M	Bloqueia		Izumi <i>et al.</i> , 2006
Clioquinol (aumenta o zinco no citosol)	9,8 $\mu$ mol/kg	Atenua	A LTP foi induzida com tétanos de 100 Hz na área CA1 após 2 horas da aplicação do	Takeda <i>et al.</i> , 2011
ZnCl <sub>2</sub>	100 $\mu$ M	Atenua	clioquinol.	Takeda <i>et al.</i> , 2011
ZX1 (quelante de zinco)	$\geq$ 50 $\mu$ M	Atenua	A LTP foi induzida por estimulação de alta frequência nas fibras musgosas das células piramidais na área CA3.	Pan <i>et al.</i> , 2011

#### 2.4. Envolvimento de ROS na LTP

Como já foi referido anteriormente, as ROS estão normalmente associadas à neurotoxicidade, porém estudos recentes sugerem que estas espécies reativas desempenham um papel importante como moléculas “mensageiras” em vários processos celulares, inclusivé na LTP (Knapp *et al.*, 2002).

Espécies como o peróxido de hidrogénio e o radical hidróxilo, em concentrações elevadas enfraquecem a LTP induzida por estimulação elétrica com frequências elevadas. No entanto,

para concentrações baixas o peróxido de hidrogénio e o superóxido melhoram a formação de LTP (Wang *et al.*, 2010).

Noutro estudo verificou-se que a complexação do radical superóxido por compostos específicos, bloqueia ou atenua a formação de LTP na área CA1 (Klann, 1998).

Em fatias do hipocampo, a adição de antioxidantes como a SOD enfraquece a LTP, mas quando posteriormente se adiciona catalase esse enfraquecimento é parcialmente revertido. Como a SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogénio, este último vai inibir parcialmente a LTP. Quando se adiciona a catalase que é responsável pela conversão do peróxido de hidrogénio em água, aquele efeito é revertido sugerindo isto que o peróxido de hidrogénio é prejudicial na formação de LTP (Klann *et al.*, 2002).

Diversos tipos de ROS em diferentes concentrações originam efeitos distintos na LTP, como se indica na Tabela 8.

**Tabela 7.** Efeito de vários tipos de ROS na LTP.

<b>ROS</b>	<b>Concentração</b>	<b>Efeitos na LTP</b>	<b>Notas importantes</b>	<b>Referencias</b>
Superóxido	1-10 $\mu$ M	Potencia	Após ativação dos recetores de NMDA nas áreas CA1 e DG a produção de superóxido aumenta.	Serrano <i>et al.</i> , 2004
Peróxido de hidrogénio	1 $\mu$ M	Melhora	A ativação dos	Serrano <i>et al.</i> , 2004
Peróxido de hidrogénio	20 $\mu$ M-1 mM	Bloqueia	mecanismos que ocorrem durante a LTP na área	Pellmar <i>et al.</i> ,1991
Peróxido de hidrogénio	0.5-1 mM	Bloqueia	CA1 e DG dependem da concentração do peróxido de hidrogénio.	Pellmar <i>et al.</i> ,1991
Peróxido de hidrogénio	30 $\mu$ M	Bloqueia		Auerbach <i>et al.</i> , 1997

## 2.5. LTP induzida quimicamente

Como referido anteriormente, a LTP pode ser induzida quimicamente através da aplicação de um composto que bloqueia canais de potássio dependentes do potencial, o TEA, causando a aplicação deste composto uma despolarização elevada (Song *et al.*, 2002).

Verificou-se que a aplicação de TEA bloqueia diferentes subtipos de canais de potássio ( $I_K$ ,  $I_C$  e  $I_M$ ) e induz uma forma de LTP que não depende dos recetores de NMDA. A despolarização causada pelo TEA causa a libertação de glutamato que por sua vez vai ativar recetores de glutamato pós-sinápticos originando a despolarização da região pós-sináptica. Isto leva à abertura de canais de cálcio dependentes do potencial nesta zona, que permitem a entrada de mais cálcio e portanto uma maior despolarização (Aniksztejn *et al.*, 1991).

No mesmo estudo verificou-se que, na área CA1 do hipocampo uma concentração de 25 mM de TEA aumenta o potencial excitatório pós-sináptico em 50 % sendo este aumento mantido durante quatro horas, enquanto que uma concentração de 5 mM produz apenas um pequeno aumento daquele potencial com uma duração curta (apenas alguns minutos). Observou-se ainda que a adição de APV (50 ou 100  $\mu$ M), que é um antagonista dos recetores de NMDA, bloqueia a LTP induzida eletricamente mas não quimicamente. Pelo contrário, a adição de CNQX (10  $\mu$ M), um antagonista de recetores de AMPA, bloqueia a LTP química mas não a elétrica. Isto sugere que na área CA1 os recetores de AMPA estão envolvidos na indução da LTP química.

Foi também estudada a adição de flunarizina, um composto que bloqueia os canais de cálcio, após a adição de TEA. Verificou-se que a flunarizina reduz significativamente a LTP química o que aponta para a importância destes canais na indução da LTP química (Aniksztejn *et al.*, 1991).

Outros estudos mais recentes mostram que na área CA1 do hipocampo, a LTP induzida quimicamente depende tanto de recetores de NMDA como de canais VDCCs, defendendo que tal como a LTP induzida por estímulos elétricos, esta também é ativada pelo aumento da concentração de cálcio na zona pós-sináptica (Huber *et al.*, 1995; Song *et al.*, 2002).

O último grupo (Song *et al.*, 2002) estudou o efeito da adição de antagonistas de recetores de NMDA e de bloqueadores de VDCCs dos tipos L e T na LTP química. Verificou-se que tanto a adição de D-APV (50  $\mu$ M), antagonista de recetores de NMDA, como de  $Ni^{2+}$  (50  $\mu$ M), bloqueador de VDCCs do tipo T, bloqueiam parcialmente a LTP química. A nifedipina (20

$\mu\text{M}$ ), substância que bloqueia VDCCs do tipo L, não influencia a LTP química, sugerindo que ela é independente deste tipo de canais.

Outros autores (Huber *et al*, 1995) referem, pelo contrário, que a adição de nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), atenua a LTP química. Dizem ainda que este tipo de LTP pode ser bloqueado pelo quelante de cálcio, ácido bis- (aminofenoxi) -N, N, N', N'-tetra-acético.

## 2.6. Efeitos dos compostos fenólicos na saúde

A maioria dos estudos relacionados com compostos fenólicos estão relacionados com as suas propriedades antioxidantes e os seus benefícios para a saúde.

Os polifenóis são conhecidos pela sua capacidade antioxidante. Vários estudos referem mesmo que estes compostos atuam contra a oxidação de lipoproteínas e danos da membrana celular provenientes de ROS. Compostos como o ácido benzóico e o ácido siríngico são conhecidos pelos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Güven *et al.*, 2014)

O ácido protocatequínico é referenciado como tendo um grande potencial farmacológico. Possui propriedades antioxidantes, anti-cancerígenas, anti-diabéticas, e tem a capacidade de atuar como quelante de íons e de eliminar radicais livres doando elétrons ou um átomo de hidrogénio. Sabe-se ainda, que a sua capacidade antioxidante é proveniente da sua estrutura e dos substituintes presentes no anel aromático (Kakkar *et al.*, 2014).

Também o ácido cafeico é referido como um forte antioxidante que para além das suas propriedades antivirais, anti-inflamatórias e anticancerígenas é ainda conhecido pela sua atividade contra a peroxidação lipídica). Estudos recentes referem que este composto tem um poder antioxidante superior ao do ácido ferulico e ao ácido cumárico (Jayanthi *et al.*, 2010).

Na tabela 9 são apresentados resultados sobre a atividade antioxidante de vários ácidos fenólicos.

**Tabela 8.** Efeito de compostos fenólicos na saúde.

Composto	Resultados	Referencias
Ácido siríngico	Estudos efectuados em ratos, acerca do efeito deste composto no <i>stress</i> oxidativo provocado por isquémia mostram que	Güven <i>et al.</i> , 2014

	após isquemia os valores da SOD diminuem. Na presença de ácido siríngico esses valores aumentam.	
Ácido cafeico	<p>O efeito antioxidante do ácido cafeico foi estudado em ratos, na presença do antibiótico oxitetraciclina, composto que provoca danos no fígado.</p> <p>O ácido cafeico diminui os danos no fígado e a peroxidação lipídica e aumenta a atividade antioxidante da SOD, CAT, e GPx.</p>	Jayanthi <i>et al.</i> , 2010
Ácido protocatequínico (PCA)	A atividade antioxidante do PCA foi medida <i>in vitro</i> tendo como base de comparação o Troxol (composto antioxidante standard) e usando a razão entre o IC <sub>50</sub> (concentração que causa 50 % de inibição dos radicais) do troxol e o IC <sub>50</sub> do PCA. Para a neutralização dos radicais superóxido e hidroxilo obtiveram-se, respetivamente, os valores 4.2 e 1.	Kakkar <i>et al.</i> , 2014
Ácido vanílico	Os testes foram feitos <i>in vitro</i> em lipoproteínas de baixa densidade, que sofreram atividade oxidante através de dois métodos: adição de 5µM de CuCl <sub>2</sub> ou decomposição térmica de AAPH	Natella <i>et al.</i> , 1999
Ácido siríngico	(composto que produz radicais peróxilo).	Natella <i>et al.</i> , 1999
Ácido protocatequínico	As concentrações de ácidos fenólicos aplicadas foram na gama dos 6 a 30 µM.	Natella <i>et al.</i> , 1999
Ácido cafeico	No primeiro método os resultados obtidos mostram que o ácido hidroxibenzóico e o ácido ciamínico não têm atividade antioxidante. Os ácidos cafeico e sinápico	Natella <i>et al.</i> , 1999

---

Ácido sinápico	reduzem a oxidação mas o ácido siríntrico induz <i>stress</i> oxidativo.	Natella <i>et al.</i> , 1999
Ácido hidroxibenzóico	No segundo método há uma ação protetora de todos os compostos exceto do ácido hidroxibenzóico.	Natella <i>et al.</i> , 1999

---



### **3. Procedimentos experimentais**

Neste capítulo são apresentados todos os procedimentos utilizados ao longo do trabalho experimental. Mais concretamente, é feita uma descrição das metodologias utilizadas na preparação dos animais, bem como da instrumentação utilizada. São também apresentadas as metodologias seguidas na medição de sinais de zinco e sinais de ROS, na ausência e na presença de compostos fenólicos.

#### **3.1. Preparação das fatias do hipocampo**

Os animais utilizados foram ratos Wistar provenientes do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra. Utilizaram-se apenas fêmeas com idade compreendida entre 3 a 4 meses, as quais foram mortas por deslocamento cervical e decapitadas em seguida. O cérebro foi retirado e os hipocampos isolados rapidamente em condições de baixa temperatura e sob papel de filtro humedecido em líquido cefalorraqueal artificial (*artificial cerebrospinal fluid*, ACSF). Posteriormente, o hipocampo foi fatiado, em fatias com uma espessura de 400 µm, utilizando um conjunto de 5 lâminas separadas entre si por essa mesma distância. Seguidamente, as fatias foram submetidas a uma incubação numa solução contendo ACSF e o respetivo indicador de fluorescência de acordo com as medições pretendidas. As fatias foram mantidas na incubação durante 60 minutos à temperatura ambiente e posteriormente colocadas na solução ACSF onde permaneciam até serem transferidas para a câmara de perfusão. Durante todo o procedimento as fatias foram continuamente saturadas com carbogénio (95% Oxigénio e 5% Carbono).

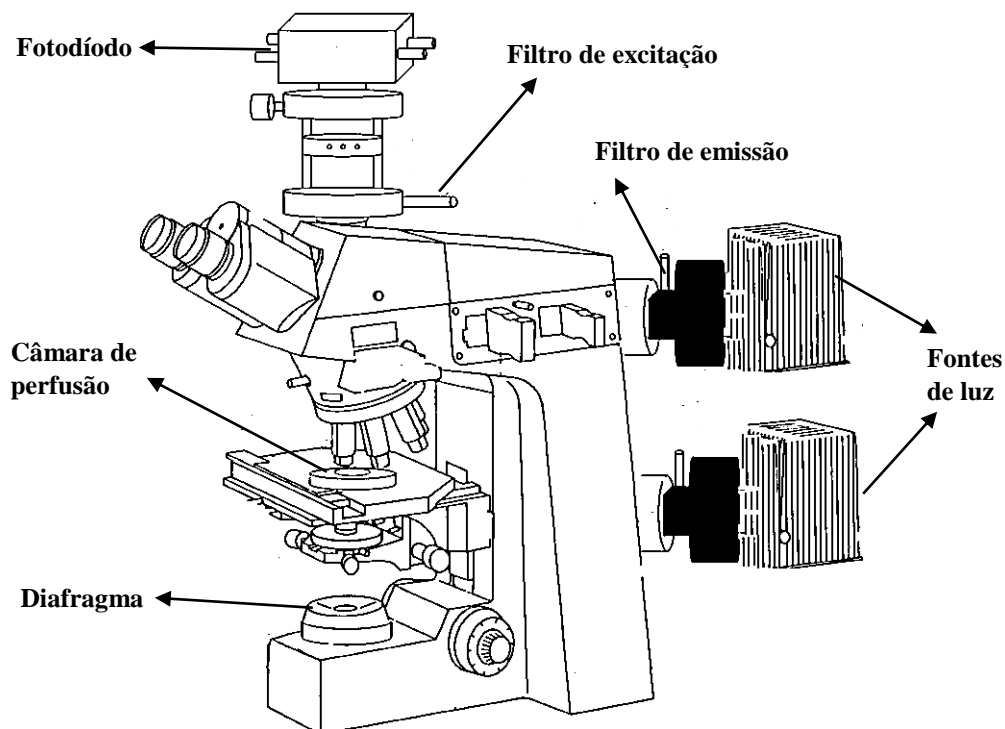
#### **3.2. Medição de sinais óticos**

A medição de sinais óticos foi feita através de um microscópio de fluorescência (Zeiss) com um arranjo de transfluorescência, ou seja, a luz, que neste caso era proveniente de uma fonte de halogéneo, situada na base do microscópio, incidia sob a preparação e atravessava-a sendo depois captada numa objetiva (40x, N. A., 0,75).

O microscópio utilizado continha um diafragma de campo que permitia ajustar a iluminação da preparação, um filtro de excitação de 490 nm, com 10 nm de largura de banda e um filtro de emissão passa-alto de 500 nm. Para a deteção dos sinais utilizou-se um fotodiodo de silício

(área 1 mm<sup>2</sup>, Hammamatsu). Por fim, o sinal foi convertido por um conversor analógico/digital de 16 bits e os dados foram processados na plataforma Signal Express<sup>®</sup>.

O esquema representativo do equipamento é apresentado na figura 6.



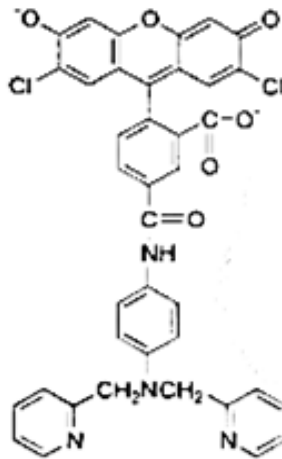
**Figura 6.** Arranjo experimental utilizado na medição de sinais óticos.

### 3.2.1. Medição de sinais óticos de zinco

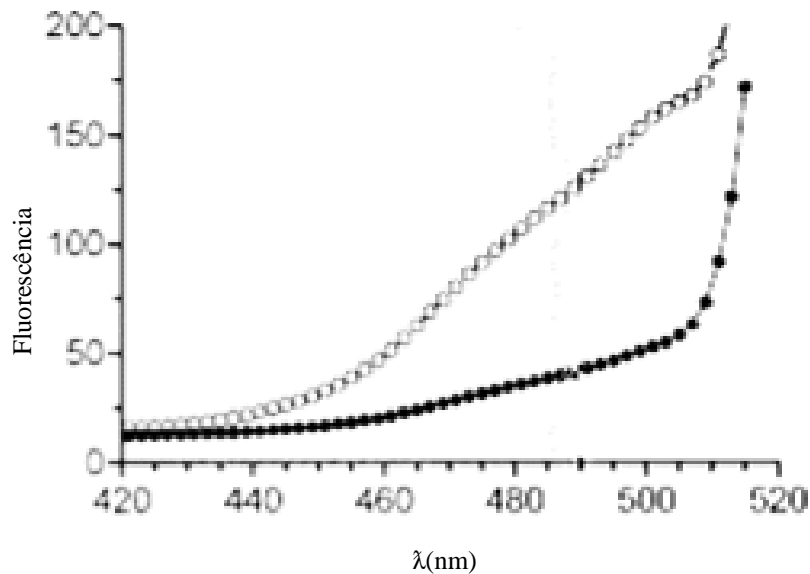
Para a medição dos sinais de zinco, as fatias do hipocampo foram incubadas, durante uma hora, numa solução contendo 5 mL de ACSF e 5  $\mu$ L de uma solução stock (5mM) do indicador Newport Green, ou seja, uma solução com 5  $\mu$ M de Newport Green. Os dados foram obtidos usando um comprimento de onda de excitação de 490 nm, e recolhendo a luz emitida acima de 500 nm.

Este indicador possui uma afinidade moderada pelo zinco ( $K_d \sim 1 \mu$ M) e relativamente baixa pelo cálcio ( $K_d > 100 \mu$ M) o que permite considerar que os sinais obtidos são provenientes de alterações nos níveis de zinco e não de cálcio (Molecular Probes, 2014)

A estrutura química do Newport Green e os espectros de absorção e excitação encontram-se representados, respetivamente, nas Figuras 7 e 8.



**Figura 7.** Estrutura química do indicador de zinco Newport Green. Adaptada de Dineley *et al.*, 2002



**Figura 8.** Espectro de excitação do indicador Newport Green em condições de baixo zinco intracelular (●) e em condições de elevada concentração de zinco (300  $\mu\text{M}$ ) na presença de piritona (20  $\mu\text{M}$ ) (○) Adaptada de Dineley *et al.*, 2002

Depois da incubação, as fatias eram transferidas para a câmara de perfusão e continuamente perfundidas a uma velocidade de 1,5 a 2 mL / min, por meio de uma bomba peristáltica. A solução de perfusão era mantida a 37 °C através de um banho térmico.

Os sinais foram obtidos nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo, em intervalos de 1 minuto, durante diferentes intervalos de tempo que dependiam da

composição da solução de perfusão e do protocolo experimental. Cada registo representa a média de 100 valores.

Nalgumas experiências foram detectadas variações de zinco associadas com a indução química de LTP, aplicando a solução ACSF modificada como meio de perfusão, que continha TEA (25 mM) e uma concentração elevada de cálcio (10 mM).

Noutras experiências o meio extracelular continha KCl, para despolarizar as membranas pré e pós-sinápticas, ZnCl<sub>2</sub>, para aumentar o influxo de zinco na região pós-sináptica e Na<sup>+</sup>-piritiona, uma substância que facilita a entrada de zinco através da membrana celular.

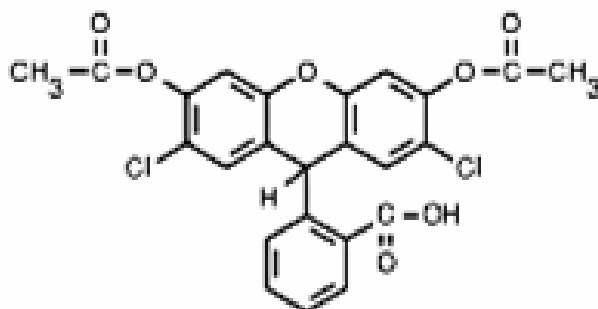
Foi também aplicado o quelante de zinco permeante N,N,N,N'-tetrakis (2-piridilmetil) etilenodiamina (TPEN), no meio de perfusão, para verificar se os sinais obtidos eram realmente de zinco. Esta solução foi normalmente perfundida durante mais de uma hora e aplicada sempre no final da experiência uma vez que não é lavável.

Os sinais de zinco foram ainda observados na presença de antagonistas dos recetores de glutamato de AMPA, de NMDA e de um bloqueador de canais de cálcio dependentes do potencial, do tipo L, respetivamente o NBQX, o D-APV e a nifedipina, para verificar a natureza pré ou pós-sináptica dos sinais. Esta solução foi preparada com 50 mL de ACSF, 50 µL de uma solução stock (10 mM) de NBQX, 50 µL de uma solução stock (50 mM) de D-APV e 50 µL de uma solução stock (10 mM) de nifedipina.

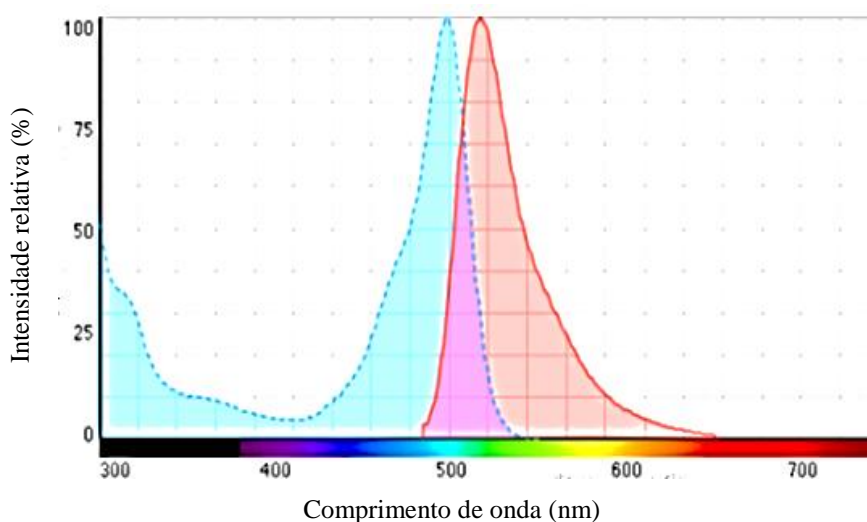
As soluções contendo TPEN e os antagonistas e bloqueadores foram quase sempre recirculadas com volumes de solução, respetivamente entre 20 a 30 mL e 50 a 100 mL, depois de eliminar os primeiros 10 mL da respetiva solução.

### **3.2.2. Medição de sinais óticos de ROS**

O indicador utilizado na medição de sinais de ROS foi o H<sub>2</sub>DCFDA que tem uma estrutura química e os espetros de absorção e de excitação representados nas Figuras 9 e 10.



**Figura 9.** Estrutura química do indicador de ROS H<sub>2</sub>DCFDA. Adaptada de Molecular Probes, 2014)



**Figura 10.** Espectro de excitação (curva do lado esquerdo) e de emissão (curva do lado direito) do indicador de ROS H<sub>2</sub>DCFDA.

Adaptada de Molecular Probes, 2014

O H<sub>2</sub>DCFDA é um composto não fluorescente e não polar, mas quando presente no meio intracelular sofre quebra dos grupos lipofílicos formando o H<sub>2</sub>DCF que na presença de ROS é oxidado a DCF, composto altamente fluorescente. O H<sub>2</sub>DCFDA é um indicador específico para o peróxido de hidrogénio, no entanto estudos recentes sugerem que este composto pode ser oxidado por outras espécies reativas de oxigénio (Held, 2012). Nestes estudos usou-se também um comprimento de onda de excitação de 490 nm, sendo a luz de emissão detectada acima de 500 nm.

O indicador H<sub>2</sub>DCFDA tem algumas limitações pelo facto da sua oxidação poder ser catalisada por outros compostos que não ROS e porque também reage com o oxigénio podendo assim, ele mesmo, dar origem a mais ROS (Wang *et al.*, 2013).

As fatias foram incubadas, durante uma hora, em 20 mL de solução ACSF contendo 2  $\mu$ L de uma solução stock (20 mM) do indicador H<sub>2</sub>DCFDA, ou seja numa solução com 20  $\mu$ M deste indicador. Posteriormente, foram mantidas numa solução ACSF até serem transferidas para a câmara de perfusão onde eram continuamente perfundidas com solução ACSF mantida à temperatura de 37 °C e a uma velocidade de 1,5 a 2 mL / min.

Analogamente às medições de zinco, os sinais de ROS foram recolhidos nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo, com intervalos de 1 minuto, durante diferentes períodos de tempo, sendo cada um dos sinais a média de 100 registos.

Os sinais de ROS foram também observados na presença da soluções ACSF modificada e dos meios de perfusão com KCl, ZnCl<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>-piritona e a mistura com antagonistas e bloqueador, conforme descrito na secção anterior.

### **3.2.3. Efeito dos compostos fenólicos nos sinais de zinco e de ROS**

A interação dos compostos fenólicos com o zinco e com as ROS foi estudada para diferentes situações em fatias incubadas com o respetivo indicador. A primeira consistiu na observação do efeito que os poluentes têm nos sinais de zinco e de ROS obtidos em ACSF. Em ambos os casos, primeiro foi perfundida a solução ACSF durante 10 minutos, depois a solução de poluentes durante 60 minutos, e de novo a solução ACSF por mais 60 minutos.

Posteriormente, verificou-se o efeito dos poluentes em variações de zinco e de ROS associadas com a indução química da LTP. Para o efeito, depois de 10 minutos em ACSF, foi circulada a solução de poluentes durante 60 minutos, seguida da perfusão da solução ACSF modificada por igual período de tempo. Um terceiro tipo de estudos consistiu na aplicação da mistura contendo os antagonistas dos recetores de AMPA e de NMDA e o bloqueador de canais de cálcio do tipo L, anteriormente mencionados. Estes compostos foram aplicados, durante 1 hora, depois da solução de KCl, no caso do zinco, e juntamente com a solução de poluentes, no caso das ROS.

### 3.3. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultra pura com uma resistividade de 18,2 MΩ.cm proveniente do sistema: Direct Pure water sistem UP 10, da Interlab.

**Solução ACSF:** A solução cerebrospinal artificial consiste numa mistura de 124 mM de NaCl; 24 mM de NaHCO<sub>3</sub>; 10 mM de glucose; 3.5 mM de KCl; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 1.25 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 2 mM de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. Adicionaram-se todos os compostos exceto o CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O e colocou-se a solução a saturar com carbogénio (95% oxigénio, 5% carbono) durante 10 minutos. Por fim adicionou-se o CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O.

**Solução ACSF modificada:** Esta solução consiste numa alteração da solução ACSF onde as concentrações dos compostos CaCl<sub>2</sub> e KCl foram alteradas, passando a ter uma concentração de 10 mM e 5 mM, respetivamente. Adicionou-se também o composto TEA com uma concentração de 25 mM e por fim a mistura foi colocada durante 10 minutos a saturar com carbogénio.

**Solução de H<sub>2</sub>DCFDA (20 μM):** Esta solução foi preparada dissolvendo 9,74 mg de H<sub>2</sub>DCFDA em 2 mL de DMSO e posteriormente adicionou-se 2 μL desta solução a 20 mL de solução ACSF.

**Solução de Newport Green (5 μM):** Dissolveu-se 1 mg de Newport Green em 0,25 ml de DMSO e em seguida adicionou-se 5 μL desta solução a 5 mL de solução ACSF e a 5 μL de Pluronic F-127.

**Solução de TPEN (20 μM):** Dissolveu-se 8,50 mg de TPEN em 1 mL de etanol e adicionou-se 20 μL desta solução a 20 mL de solução ACSF.

**Solução de NBQX (10 μM):** Dissolveu-se 5 mg de NBQX em 1, 3 mL de água ultra pura. A solução final foi preparada adicionando 50 μL desta solução a 50 mL de solução ACSF.

**Solução de D-AP5 (50 μM):** Dissolveu-se 5 mg de D-AP5 em 0,5 mL de água ultra pura e adicionou-se 20 μL desta solução a 20 mL de solução de ringer.

**Solução de nifedipina (10 μM):** Dissolveu-se 5 mg deste composto em 1,5 mL de DMSO e juntou-se 50 μL desta solução a 50 mL de solução de ringer.

**Solução de KCl (60 mM):** Dissolveram-se 14, 91 g de KCl em 100 mL de água ultrapura.e posteriormente adicionou-se 1,5 mL desta solução a 50 mLde solução ACSF.

**Solução de ZnCl<sub>2</sub> (1mM) e Na<sup>+</sup>-piritiona (1 mM):** Pesou-se 0,3407 g de ZnCl<sub>2</sub> e dissolveu-se em 25 mL de água ultra pura. Separadamente adicionou-se 2,8 mg de Na<sup>+</sup>-piritiona

a 10 mL de água ultra pura e em seguida, juntou-se 1ml de cada uma destas soluções a 100 mL de solução ACSF.

**Solução de Poluentes (600 mg / L):** A solução de poluentes consiste numa mistura de 100 mg/L de cada um dos seguintes compostos: ácido sirínico (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico), ácido vanílico (4-hidroxi-3-metoxibenzoico), ácido verátrico (3,4-demetoxibenzoico), ácido prototequinico (3,4-dihidroxibenzoico), ácido 4-hidroxibenzoico) e ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico. A solução final foi preparada adicionando 16 mL desta solução a 34 mL de solução ACSF.

### **3.4. Produtos químicos utilizados**

Newport Green DCF, H<sub>2</sub>DCFDA, Pluronic F-127 (Life Technologies, Carlsbad, Canadá)

TPEN, NBQX, D-AP5, Nifedipina, TEA, Glucose, NaCl, Na<sup>+</sup>-piritona (Sigma, Sintra, Portugal)

NaHCO<sub>3</sub>, KCl, ZnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Lisboa, Portugal)

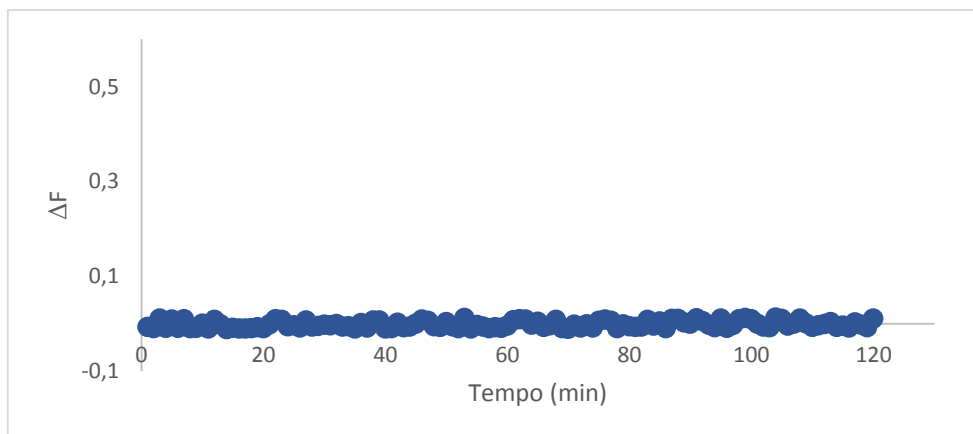


## 4. Resultados

### 4.1. Estado fisiológico das preparações

O estado fisiológico das fatias cerebrais usadas foi avaliado com base na estabilidade dos sinais da fluorescência basal de fatias incubadas com um indicador. O comportamento típico das fatias do hipocampo utilizadas nas experiências está ilustrado na Figura 11, onde a preparação foi incubada com o indicador de ROS ( $H_2DCFDA$ ) e os sinais de fluorescência basal foram medidos, durante duas horas, na presença de solução ACSF-

As fatias do hipocampo quando perfundidas com o meio de perfusão normal (ACSF) e estando em boas condições fisiológicas, apresentam valores de fluorescência estáveis e próximos de zero. Pelo contrário, se as fatias estiverem em condições de degradação a fluorescência basal apresenta um comportamento instável.



**Figura 11.** Curso temporal da fluorescência basal nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo, na presença do indicador de ROS ( $H_2DCFDA$ ).

### 4.2. Autofluorescência

A autofluorescência é a fluorescência natural da preparação na ausência de indicador. Esta fluorescência é proveniente de certas estruturas biológicas como a mitocôndria, moléculas NADPH e moléculas de colagênio presentes na membrana celular (Monici, 2005).

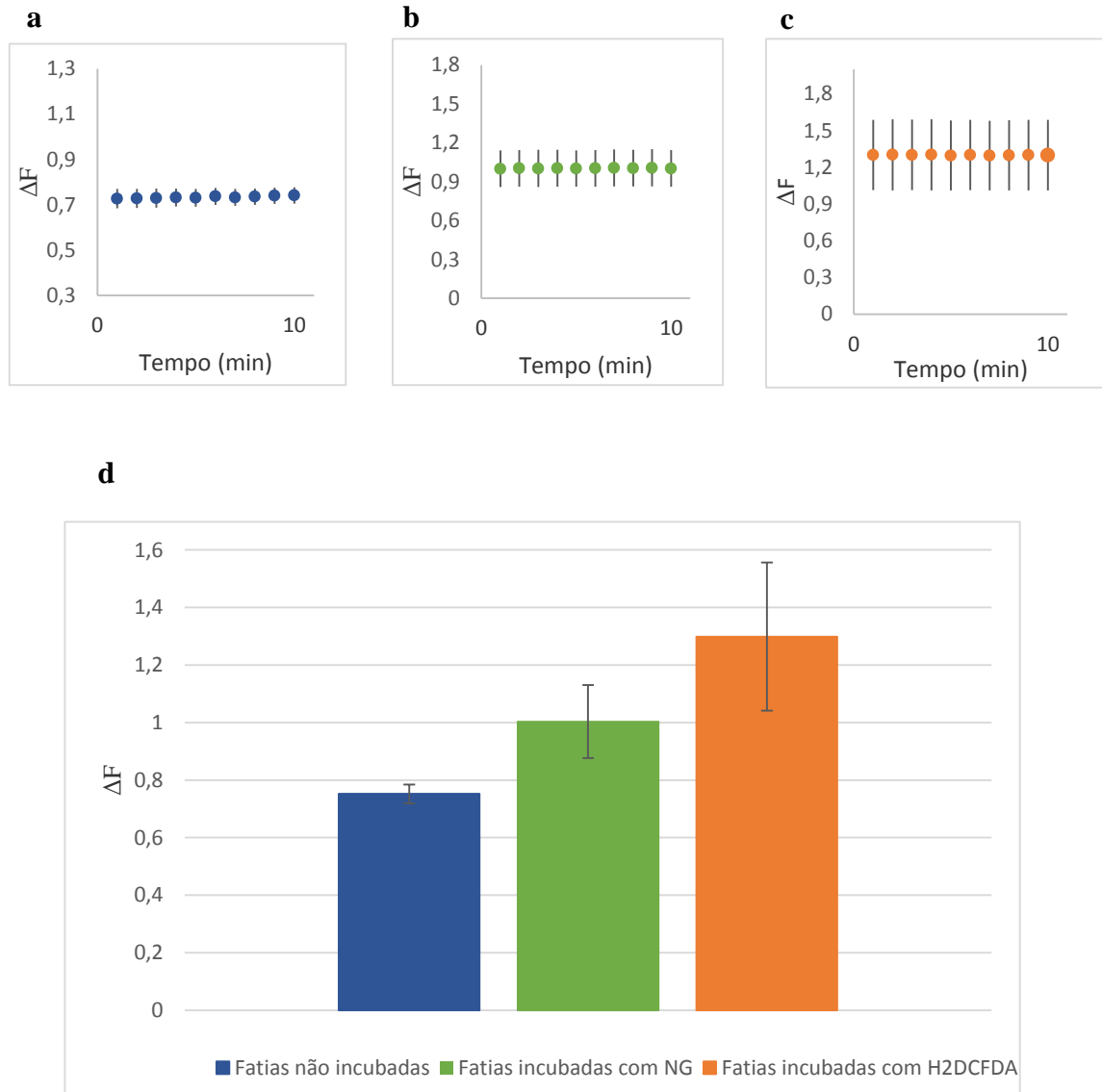
Neste trabalho, a autofluorescência foi medida em fatias não incubadas, na mesma zona em que se registraram os sinais obtidos por meio dos indicadores. A correção dos valores de fluorescência registrados em fatias incubadas foi feita subtraindo a autofluorescência de uma

fatia do hipocampo não incubada, ou o valor médio da autofluorescência de várias fatias, do mesmo animal. Nos casos em que não foi possível obter aqueles valores, foi subtraído o valor médio obtido em fatias não incubadas de vários animais.

Nalguns casos não se corrigiu a autofluorescência pois, como os valores eram obtidos de fatias diferentes das incubadas, podiam ter valores superiores, devido possivelmente a diferenças na espessura, na opacidade ou na região exacta de medição do sinal.

As Figuras 12a, 12b e 12c mostram os cursos temporais relativos, respetivamente, a experiências com fatias não incubadas, fatias incubadas com Newport Green e fatias incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA onde se pode verificar, mais uma vez, a estabilidade dos valores da fluorescência basal quer na presença do indicador de zinco, quer do indicador de ROS.

Na Figura 12d apresentam-se resultados médios obtidos de várias fatias não incubadas, bem como, a média dos valores da fluorescência basal medidos com o indicador de zinco na sua forma permeante (Newport Green) e o indicador de ROS (H<sub>2</sub>DCFDA). Como se pode verificar, os valores de fluorescência basal associados ao indicador de ROS são os mais elevados, seguindo-se os obtidos com o indicador de zinco, e por fim, os valores de autofluorescência que são os mais baixos, com uma amplitude 72,7 % inferior aos valores obtidos com o indicador H<sub>2</sub>DCFDA e 33,4 % inferior aos valores obtidos com o Newport Green.



**Figura 12.** Intensidade de fluorescência basal na área CA3 do hipocampo ( $n = 8$ ). **a** Curso temporal da autofluorescência. **b.** Curso temporal da fluorescência basal na presença do indicador de zinco (Newport Green). **c.** Curso temporal da fluorescência basal na presença do indicador de ROS (H<sub>2</sub>DCFDA). **d.** Comparação da autofluorescência com as fluorescências basais na presença dos indicadores de zinco (Newport Green) e de ROS (H<sub>2</sub>DCFDA). Os dados representam a média  $\pm$  s.e.m.

### 4.3. Sinais de zinco

#### 4.3.1. Efeito de poluentes fenólicos em sinais de zinco

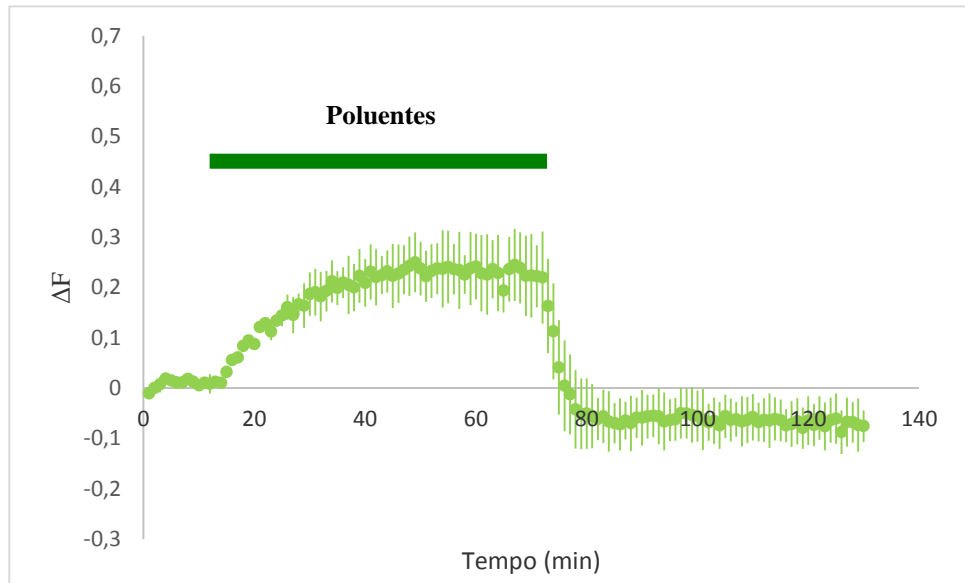
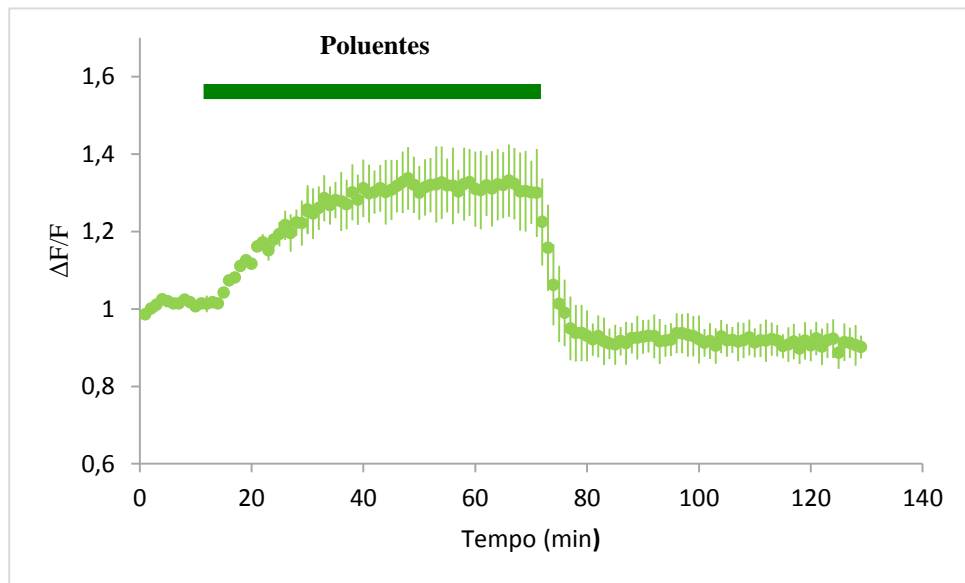
Um dos principais objetivos deste trabalho foi o estudo do efeito de poluentes fenólicos em variações de zinco neuronal. Nestas experiências, os sinais obtidos por meio do indicador de zinco Newport Gren foram recolhidos durante 10 minutos, durante os quais, as fatias do

hipocampo estiveram expostas à solução normal de perfusão (ACSF). A solução de poluentes (600 mg / L) foi depois aplicada por um período de 60 minutos. Por fim voltou a aplicar-se a solução ACSF durante mais 60 minutos.

A Figura 13 mostra o comportamento dos sinais ópticos de zinco na presença de poluentes fenólicos, tendo para a Figura 13a os valores registados sido subtraídos do valor médio dos 10 primeiros pontos. Na Figura 13.b, relativa às mesmas experiências, os sinais foram corrigidos da autofluorescência, subtraindo o valor médio dos sinais de fluorescência medidos na mesma região, de fatias não incubadas pertencentes ao mesmo hipocampo.

Como se pode ver na Figura 13b, após a introdução de poluentes fenólicos, os sinais de zinco aumentaram tendo atingido o valor de  $0,26 \pm 6 \%$ , calculado como a média dos valores obtidos entre os 30 e 40 minutos. No caso dos registos aos quais não foi subtraída a autofluorescência, observa-se um aumento com um curso temporal semelhante. Esta forma de correção dos sinais permite eliminar variáveis como a concentração do indicador nas células.

Na presença de poluentes fenólicos verifica-se um aumento imediato dos sinais que, ao voltar à solução de perfusão inicial (ACSF), é revertido rapidamente descendo o sinal abaixo do nível da fluorescência basal.

**a****b**

**Figura 13.** Efeito de poluentes fenólicos em sinais de zinco obtidos com o indicador Newport Green nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. **a.** Aumento dos sinais de zinco na presença de poluentes fenólicos (600 mg / L) normalizados pelo valor médio das 10 primeiras respostas (n = 2). **b.** Valores de fluorescência normalizados pelo valor médio anterior, mostrando também um aumento dos sinais de zinco na presença dos mesmos poluentes (n = 2). Os dados representam a média  $\pm$  s.e.m.

### **4.3.2. Variações de zinco associadas com a indução química de LTP**

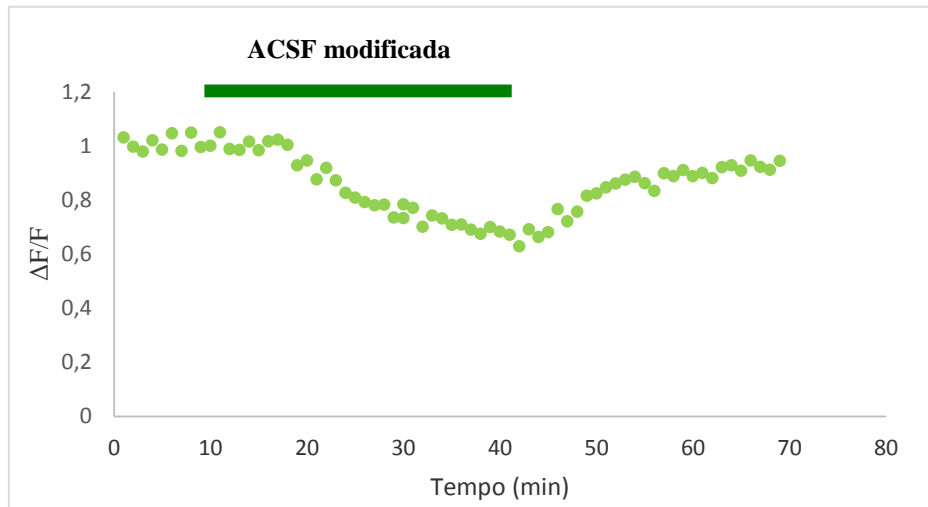
Nesta secção são apresentados os resultados relativos às variações de sinais de zinco associadas com a indução química da LTP das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. Como já foi referido anteriormente, a LTP pode ser induzida quimicamente através do bloqueio de canais de potássio dependentes do potencial pelo TEA.

A Figura 14 mostra sinais de zinco na presença da solução ACSF modificada (que inclui 25 mM de TEA e 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ), respetivamente durante 30 minutos (Figura 15a) e 60 minutos (Figura 15b). Nos 10 minutos iniciais e nos 30 minutos finais a solução de perfusão foi ACSF.

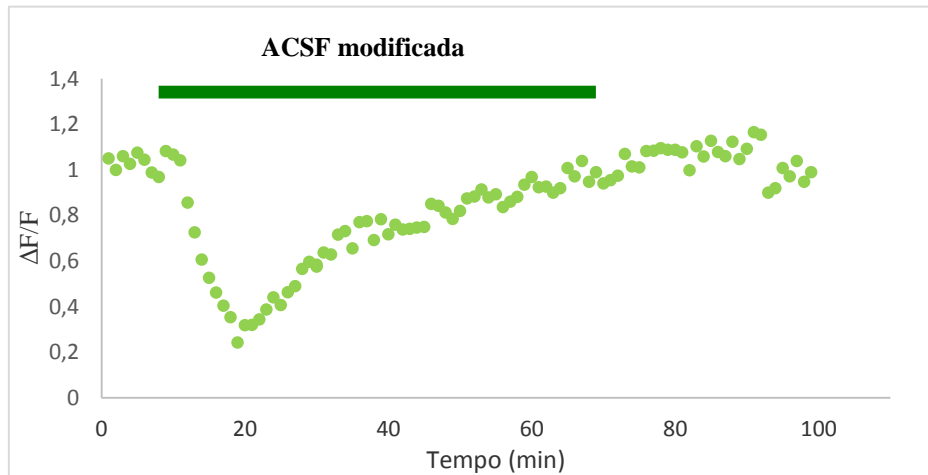
Como se pode verificar após a aplicação da solução ACSF modificada, os sinais de zinco, obtidos com o indicador Newport Green, diminuem nas duas situações (Figuras 14a e 14b).

No primeiro caso, a diminuição dos sinais de zinco atinge uma amplitude de 32,4 %, enquanto que, no segundo caso, a amplitude dessa diminuição em relação à fluorescência basal é maior, com um valor de 61,4 % (valores estes calculados com base nos 10 pontos mais baixos). No entanto, há uma recuperação gradual passados 10 minutos da introdução da solução ACSF modificada, que se mantem na presença da solução normal de perfusão que é colocada no final. Esta recuperação atinge o nível da fluorescência basal ultrapassando-o. No primeiro caso, essa recuperação não se verifica na presença da solução ACSF modificada, esta verifica-se apenas quando se volta a colocar solução ACSF e não chega a atingir os valores de fluorescência basal.

**a**



**b**



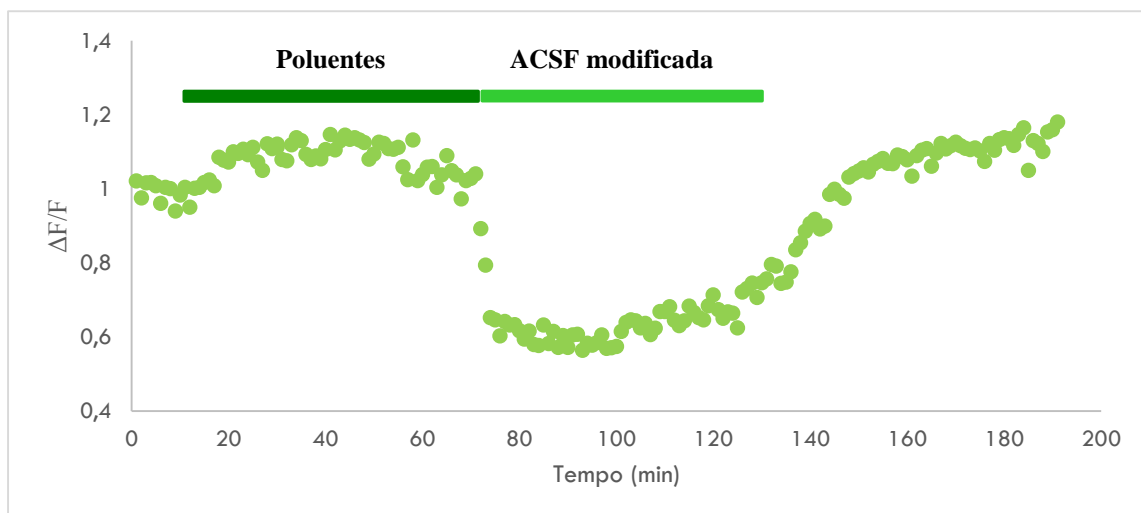
**Figura 14.** Curso temporal de sinais de zinco obtidos na presença de solução ACSF modificada, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. **a.** Diminuição dos sinais de zinco, normalizados pela média das 10 primeiras respostas em ACSF, quando se aplicou a solução ACSF modificada durante os 30 minutos indicados pela barra (parte superior do gráfico). **b.** Redução dos sinais de zinco na presença de solução ACSF modificada durante os 60 minutos indicados pela barra (parte superior do gráfico). Os sinais foram normalizados pela média das 10 primeiras respostas.

### 4.3.3. Efeito de poluentes fenólicos nas variações de zinco associadas com a indução química da LTP

Estes estudos consistiram na análise do efeito que os poluentes fenólicos têm nos sinais de zinco medidos na presença da solução (ACSF modificada) usada para a indução química da LTP. Para o efeito as fatias do hipocampo, após terem estado 10 minutos na solução normal de perfusão, foram expostas à solução de poluentes (600 mg / L) durante 60 minutos, e em seguida, por igual período de tempo à solução ACSF modificada.

Na Figura 15 pode verificar-se que a solução de poluentes, mais uma vez, originou um aumento dos sinais de zinco, de cerca de 12 %, para os valores compreendidos entre os 30 e os 50 minutos.

Após a aplicação da solução ACSF modificada, pode observar-se uma diminuição repentina dos sinais de zinco, que estabiliza, entre os 80 e os 100 minutos, subindo depois. Esta diminuição foi de cerca de 41 % relativamente aos valores da linha base. No período final, em que foi aplicada a solução normal de perfusão, os sinais de zinco continuam a aumentar ultrapassando um pouco os valores da fluorescência basal.



**Figura 15.** Efeito de poluentes fenólicos na indução química de LTP na área CA3 do hipocampo. Curso temporal dos valores normalizados pela média das 10 primeiras respostas onde se verifica o aumento dos sinais de zinco na presença de poluentes fenólicos (600 mg / L) e a diminuição dos mesmos, após aplicação da solução ACSF modificada.

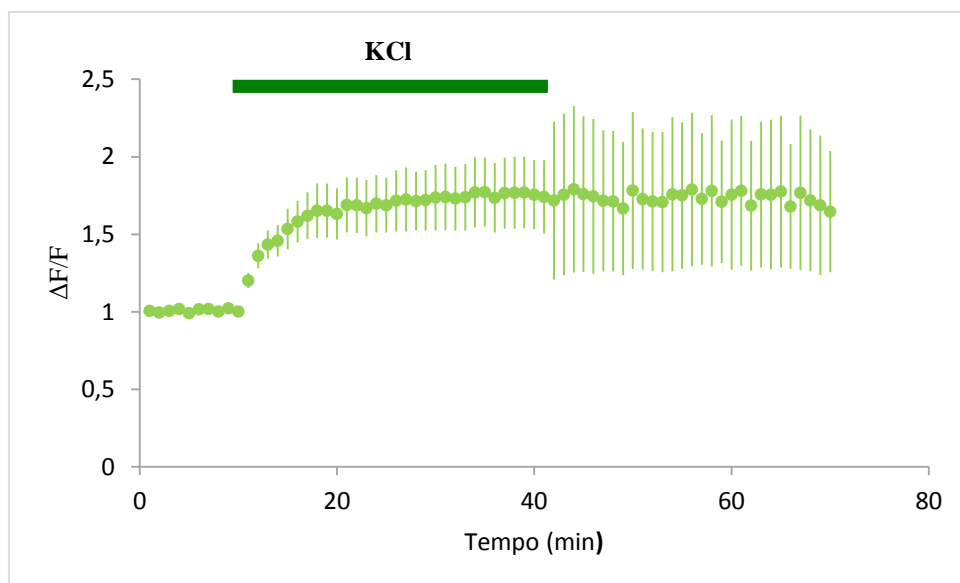


#### 4.3.4. Variações de zinco originadas por despolarização com KCl

O efeito de uma concentração elevada de KCl, para despolarizar a região das sinapses das fibras musgosas, foi também estudado na área CA3 do hipocampo na presença do indicador Newport Green.

Numa primeira fase, as fatias do hipocampo foram perfundidas com solução ACSF durante 10 minutos, tempo ao fim do qual se adicionou KCl (60 mM) (n = 5), provocando um aumento dos sinais de zinco, como mostra a Figura 16. Nos 30 minutos finais voltou a colocar-se como meio de perfusão a solução ACSF (n = 2), mantendo-se, nesta solução, os valores de fluorescência inalterados relativamente aos valores obtidos no meio com KCl.

O aumento provocado pelo KCl tem uma amplitude de  $71\% \pm 20\%$  superior ao valor da fluorescência basal e o seu efeito é irreversível, como se pode verificar nos últimos 30 minutos do gráfico.

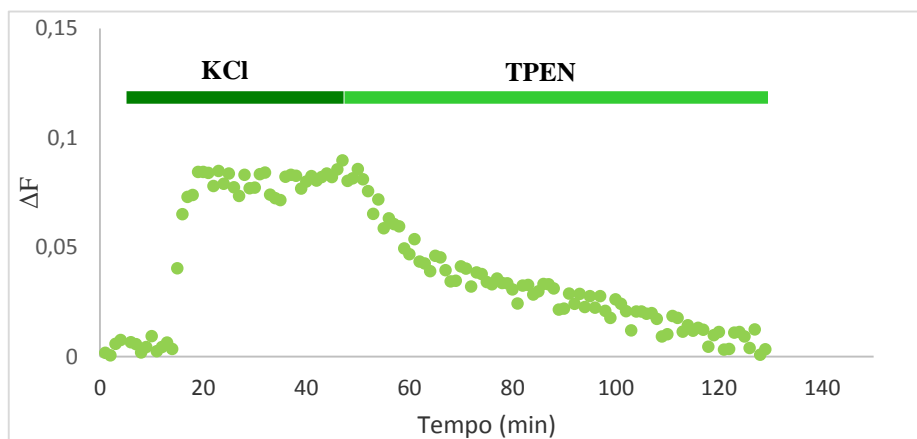


**Figura 16.** Efeito do KCl em sinais de zinco obtidos com o indicador Newport Green, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. Aumento irreversível dos sinais de zinco após aplicação de KCl (60 mM). Até ao minuto 40 os dados representam a média de 5 experiências. Depois são representativos apenas de duas experiências. Os valores foram normalizados pela média das 10 primeiras respostas e representam a média  $\pm$  s.e.m.

### 4.3.5. Natureza iônica dos sinais de Newport Green

Vários estudos indicam que os sinais ópticos medidos com o indicador Newport Green são bloqueados pelo quelante de zinco TPEN, o que confirma que eles são devidos à ligação de zinco com aquele indicador. Para a origem da natureza iônica dos sinais em causa elaboraram-se diferentes experiências. A primeira consistiu na aplicação de TPEN (100  $\mu\text{M}$ ) após a exposição das fatias do hipocampo a uma solução de KCl (20 mM) durante 40 minutos, precedida de 10 minutos de solução ACSF.

Como se pode observar na Figura 17, os sinais de zinco aumentam para valores próximos de 0,08, na presença de KCl. A solução de TPEN foi perfundida durante os últimos 80 minutos e, como era de esperar, reverteu o aumento dos sinais de zinco causado pelo KCl, fazendo-os regressar aos níveis de fluorescência basal.

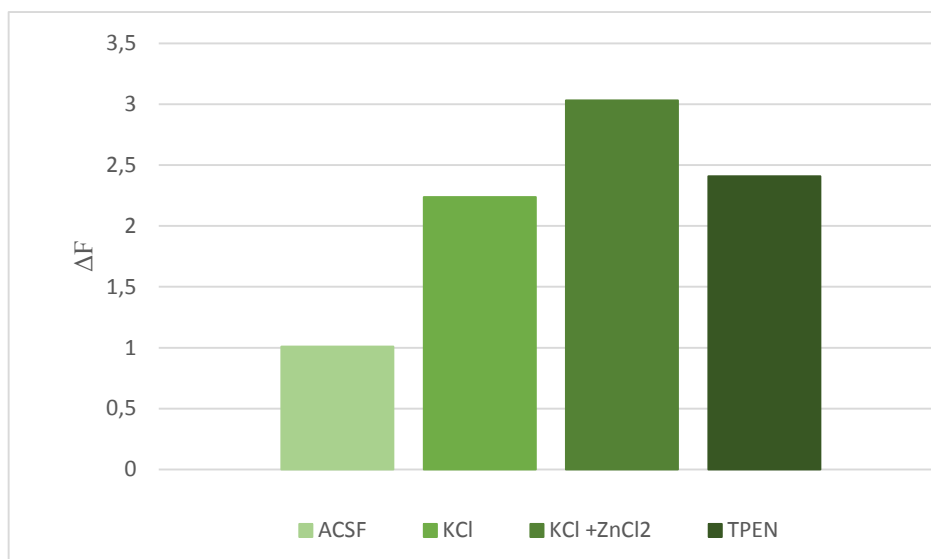


**Figura 17.** Curso temporal dos sinais de zinco na presença de KCl e do quelante de zinco TPEN, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. Após o aumento dos sinais de zinco, produzido por KCl (20 mM), o TPEN (100  $\mu\text{M}$ ) atua trazendo os sinais de zinco ao nível da fluorescência basal. Os dados foram subtraídos do valor médio dos 10 primeiros pontos.

A Figura 18 mostra o efeito do TPEN numa situação idêntica à anterior, onde após os 10 minutos iniciais na solução ACSF, se aplicou uma solução com KCl (60 mM). Depois aplicou-se uma solução de perfusão contendo KCl (60 mM) e  $\text{ZnCl}_2$  (1 mM), antes do TPEN. A adição de zinco em conjunto com a despolarização criada pelo KCl provoca um aumento de maior amplitude que o produzido apenas por KCl.

A aplicação de TPEN (100  $\mu\text{M}$ ) depois das soluções referidas anteriormente, causa uma diminuição dos sinais de zinco que, no entanto, está longe de atingir os níveis de fluorescência basal

Os valores representados por cada barra do gráfico foram obtidos como a média de 5 registos consecutivos na região final estável dos sinais de zinco.

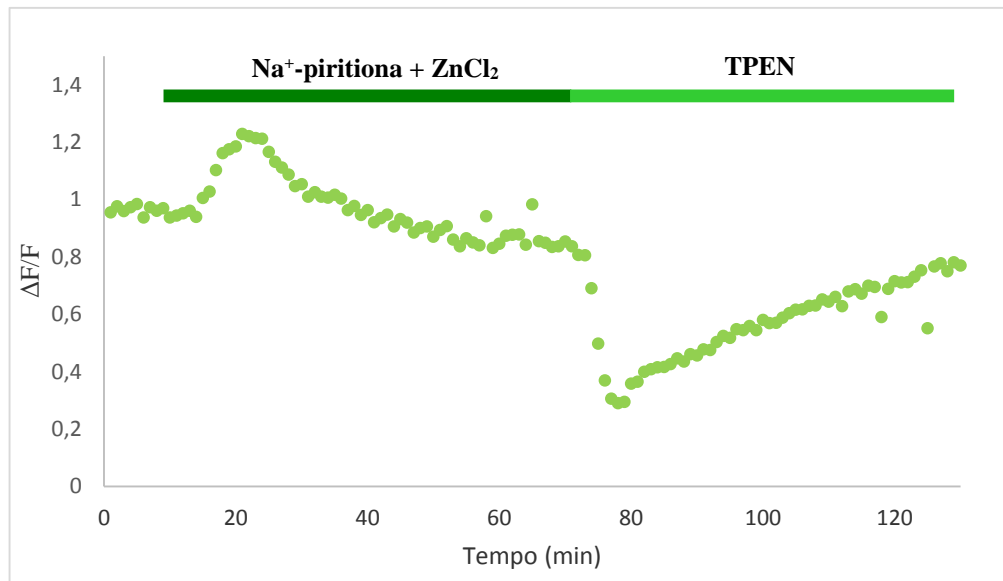


**Figura 18.** Amplitude normalizada dos sinais de zinco medidos com Newport Green em meios com KCl, KCl e ZnCl<sub>2</sub> e TPEN, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. Aumento dos sinais de zinco produzidos pela aplicação das soluções de KCl (60 mM) e KCl (60 mM) + ZnCl<sub>2</sub> (1 mM) e sinais na presença de TPEN. Os valores das barras do gráfico representam a média de 5 registos consecutivos.

Uma terceira experiência consistiu na aplicação de uma solução composta por ZnCl<sub>2</sub> (1 mM) e Na<sup>+</sup>-piritiona (20  $\mu\text{M}$ ) antes da exposição a TPEN (20  $\mu\text{M}$ ).

Na presença conjunta de Na<sup>+</sup>-piritiona, que facilita a entrada de zinco nas células, e de ZnCl<sub>2</sub>, verificou-se primeiro um aumento de 24 % nos sinais de zinco, em relação ao nível basal, sendo aquele valor a média dos últimos 5 registos do sinal de interesse. Depois os sinais diminuíram para além dos valores da fluorescência basal.

A aplicação de TPEN ocorreu a partir dos 70 minutos, podendo observar-se um comportamento inconstante. Numa primeira fase, os sinais de zinco diminuíram abruptamente voltando depois a aumentar até níveis próximos dos da linha base.



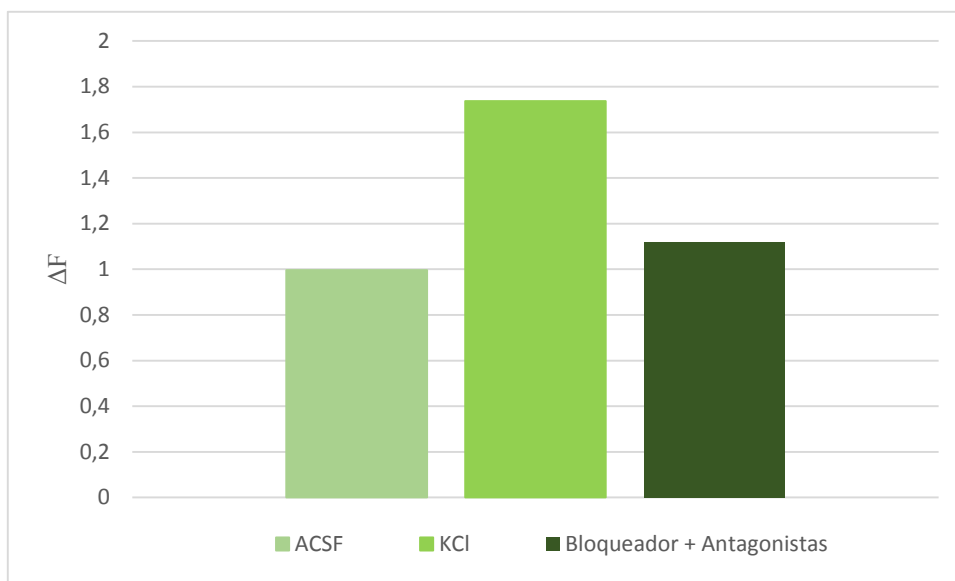
**Figura 19.** Efeito do quelante de zinco TPEN nos sinais de zinco obtidos com Newport Green nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo, após a aplicação de Na<sup>+</sup>-piritiona e zinco. A solução de Na<sup>+</sup>-piritiona (20 μM) + ZnCl<sub>2</sub> (1 mM) origina um aumento transitório nos sinais de zinco que depois diminuem temporariamente em TPEN (20 μM). Os valores foram normalizados pela média das 10 primeiras respostas.

#### 4.3.6. Natureza sináptica dos sinais de zinco

Nesta secção são apresentados os resultados obtidos relativos à aplicação, no meio de perfusão, de uma mistura de compostos antagonistas de recetores ionotrópicos de glutamato e de um canal de cálcio dependente do potencial, que também são permeáveis ao zinco.

Mais uma vez, utilizou-se o KCl para despolarizar as células e originar maior co-libertação de glutamato e de zinco e a entrada de zinco na zona pós-sináptica. Como se pode observar na Figura 20, após a circulação da solução normal de perfusão (ACSF), introduziu-se uma solução de KCl (60 mM) que resultou num aumento dos sinais comparativamente à linha base. A solução composta por nifedipina (10 μM), NBQX (10 μM) e D.APV (50 μM) respetivamente, bloqueador de canais de cálcio dependentes do potencial, do tipo L e antagonistas de recetores AMPA/kainato e NMDA, foi aplicada em seguida. Esta solução bloqueia a atividade sináptica, permitindo assim identificar a natureza dos sinais de zinco. Na presença da mistura referida estes sinais diminuíram significativamente, chegando praticamente a atingir o nível de fluorescência basal, o que sugere que eles têm origem na zona pós-sináptica.

Os valores representados pelas barras do gráfico foram obtidos como a média de 10 registos consecutivos, nos períodos finais, estáveis, dos registos correspondentes.



**Figura 20.** Avaliação da natureza de sinais de zinco obtidos com Newport Green e induzidos por KCl nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo aplicando um bloqueador e antagonistas específicos. Amplitude normalizada de sinais de zinco obtidos em ACSF e durante a aplicação de KCl e do bloqueador e antagonistas. Os sinais de zinco obtidos na solução de KCl diminuem na presença da mistura bloqueador + antagonistas contendo nifedipina (10  $\mu$ M), NBQX (10  $\mu$ M) e D.APV (50  $\mu$ M). Os dados foram normalizados pela média das 10 primeiras respostas.

## 4.4. Sinais de ROS

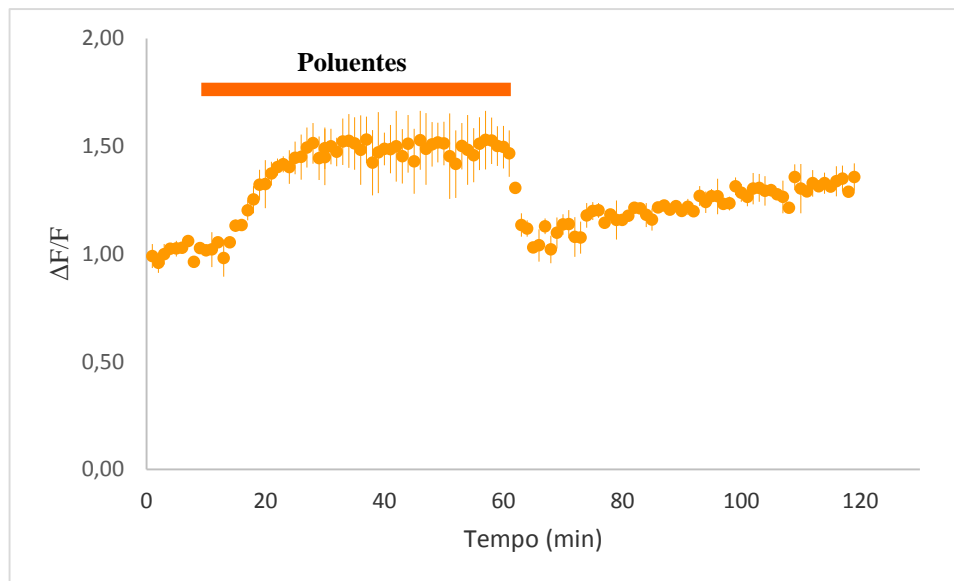
### 4.4.1. Efeito dos poluentes na formação de ROS

A aplicação de poluentes fenólicos foi estudada na presença do indicador de ROS ( $H_2DCFDA$ ), nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo.

A solução de poluentes (600 mg / L) foi aplicada como meio de perfusão durante 60 minutos, passados os 10 minutos iniciais, nos quais circulou a solução normal de perfusão (ACSF). Os poluentes originaram um aumento dos sinais de ROS, com uma amplitude máxima de 48 %  $\pm$  12% calculada entre os 40 e os 50 minutos, valor que se manteve até nova mudança de solução como se pode verificar na Figura 21.

Ao introduzir a solução ACSF, nos últimos 60 minutos, o efeito dos poluentes fenolicos nos sinais de ROS é revertido e os sinais voltam a aproximar-se dos valores de fluorescência

basal. Passado um curto período de tempo os sinais voltam a aumentar progressivamente até ao final da experiência.



**Figura 21.** Efeito de poluentes fenólicos em sinais de ROS obtidos com o indicador  $H_2DCFDA$  em sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. Valores de fluorescência normalizados pela média das 10 primeiras respostas, mostrando um aumento dos sinais de ROS na presença dos poluentes fenólicos (600 mg / L) ( $n = 2$ ). Os dados representam a média  $\pm$  s.e.m.

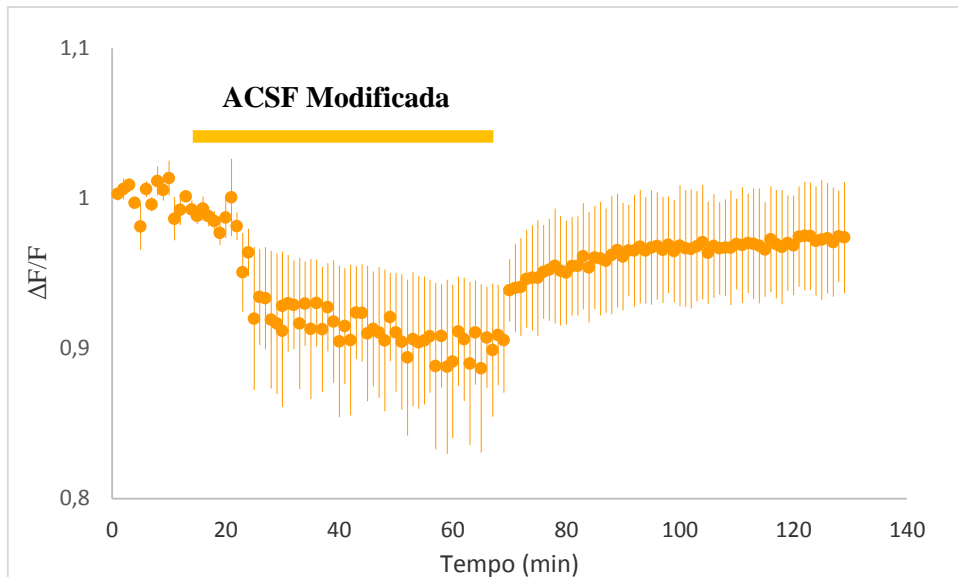
#### 4.4.2. Variações de ROS associadas com a indução química de LTP

A indução química da LTP consistiu na aplicação da solução ACSF modificada que contem o composto TEA, que bloqueia os canais de potássio dependentes do potencial, originando a despolarização das membranas celulares, como referido anteriormente.

Os sinais de ROS foram estudados na presença desta solução que foi introduzida como meio de perfusão durante 60 minutos, depois dos 10 minutos iniciais em ACSF

Como se pode observar na Figura 22, os sinais de ROS sofrem uma diminuição com uma amplitude de  $9,5 \% \pm 4,3\%$  relativamente à linha base voltando a aumentar instantaneamente nos últimos 60 minutos quando ocorreu a mudança de solução. Nestes últimos 60 minutos os sinais de ROS aproximam-se dos valores da fluorescência basal, recuperando quase completamente.

Os registos apresentados no gráfico são normalizados pela média das 10 primeiras respostas e pela subtração da autofluorescência e são representativos de 4 experiências até aos 70 minutos e apenas de duas, nos últimos 60 minutos



**Figura 22.** Curso temporal de sinais de ROS na ausência e na presença da solução ACSF modificada, obtidos com H<sub>2</sub>DCFDA em sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. Após aplicação da solução ACSF modificada verifica-se uma diminuição dos sinais de zinco, normalizados pela média das 10 primeiras respostas. Os sinais obtidos até ao minuto 70 representam a média de 4 experiências e a partir desse instante a média de 2 experiências.

#### 4.4.3. Efeito de poluentes fenólicos nas variações de ROS associadas com a LTP química

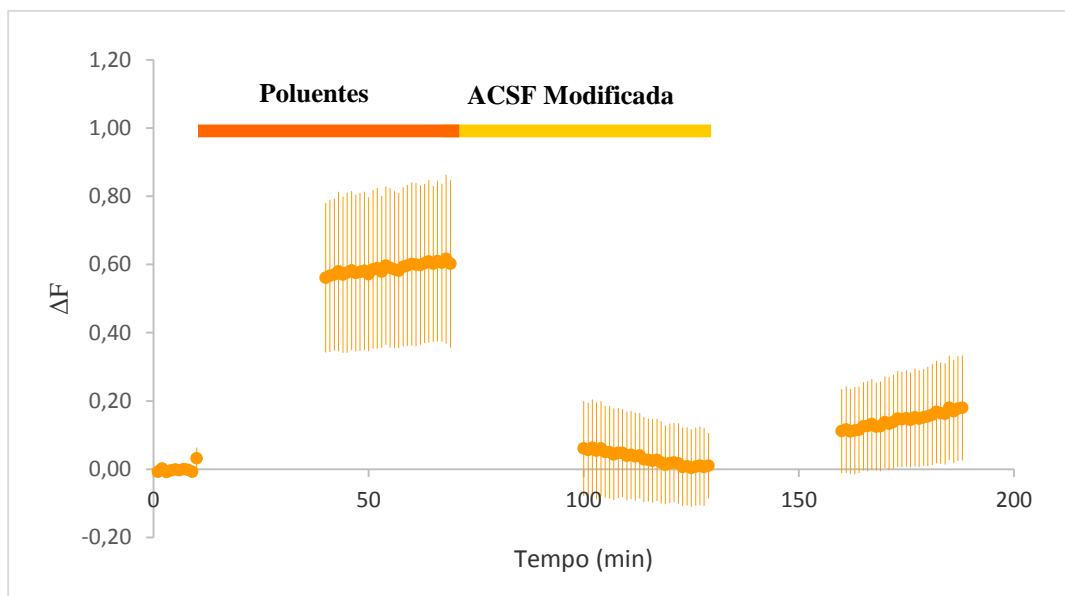
A Figura 23 mostra o efeito dos poluentes fenólicos nos sinais de ROS associados com a indução química da LTP. Para estudar este efeito aplicou-se a solução de poluentes (600 mg / L) antes da solução ACSF modificada, durante 60 minutos, embora só os últimos 30 tenham sido registados. A solução ACSF modificada, bem como a ACSF no final da experiência, também atuaram durante 60 minutos mas apenas foram registados os últimos 30.

Como em todas as outras experiências, os 10 primeiros minutos consistiram na medição de sinais de ROS na presença de ACSF.

Quando aplicada a solução de poluentes, os sinais de ROS aumentam relativamente à fluorescência basal e diminuem na presença de ACSF modificada atingindo os valores da linha

base mas não os ultrapassando, ao contrário do que se verificou na indução de LTP química sem a adição de poluentes fenólicos.

Os últimos minutos, na presença de ACSF aumentam ligeiramente acima do valor da fluorescência basal.



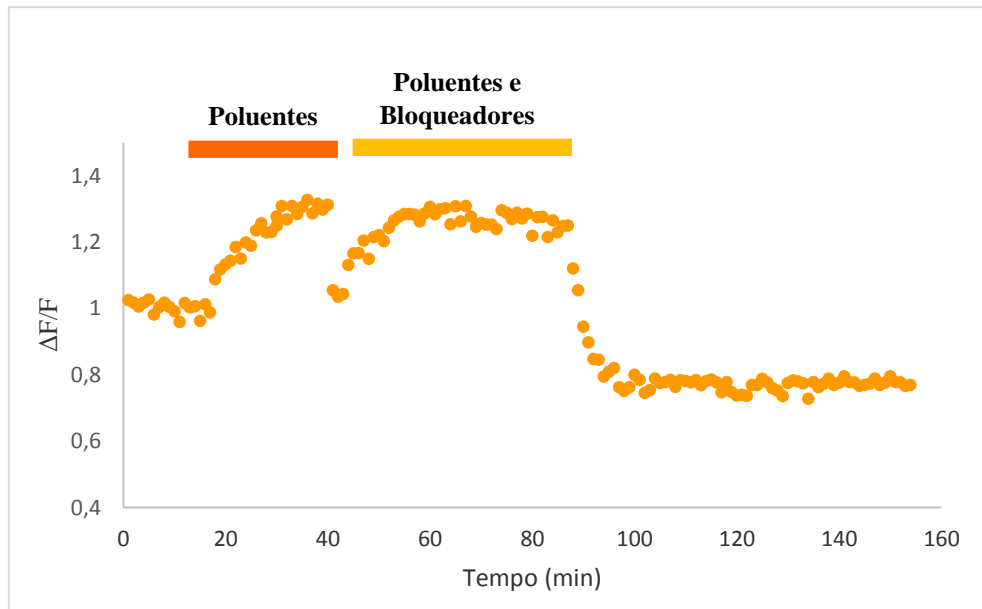
**Figura 23.** Efeito de poluentes fenólicos em sinais de ROS associados com a indução química da LTP, obtidos com o indicador  $H_2DCFDA$  em sinapses fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. Curso temporal dos valores medidos depois de subtraída a média das 10 primeiras respostas. Verifica-se um aumento dos sinais de ROS na presença de poluentes fenólicos (600 mg / L) e a diminuição dos mesmos na solução ACSF modificada (n = 3). Os dados representam a média  $\pm$  s.e.m.

#### 4.4.4. Natureza dos sinais de ROS

De forma idêntica ao estudo feito para os sinais de zinco, também se estudou o efeito da mistura bloqueador mais antagonistas nos sinais de ROS medidos com o indicador  $H_2DCFDA$ . Para isso, usou-se uma solução composta por nifedipina (10  $\mu M$ ), NBQX (10  $\mu M$ ) e D.APV (50  $\mu M$ ), respetivamente bloqueador de canais de cálcio dependentes do potencial, do tipo L, e antagonistas de recetores AMPA/kainato e NMDA. A esta solução adicionaram-se os poluentes fenólicos (600 mg / L), tendo-se depois perfundido a mistura durante 40 minutos. Antes disso os sinais de ROS foram medidos durante 10 minutos na solução ACSF e durante 30 minutos na presença dos poluentes fenólicos. Na transição da solução de poluentes simples para a solução de poluentes com o bloqueador e antagonistas fez-se circular a solução ACSF durante 3 a 4



minutos como se pode observar, pela descontinuidade no gráfico ao minuto 50, na Figura 24. Pode verificar-se também que, mais uma vez, a aplicação de poluentes aumenta os sinais de ROS e que esse aumento é mantido na presença da solução de bloqueador mais antagonistas, sugerindo este facto que estes sinais são independentes da atividade sináptica.

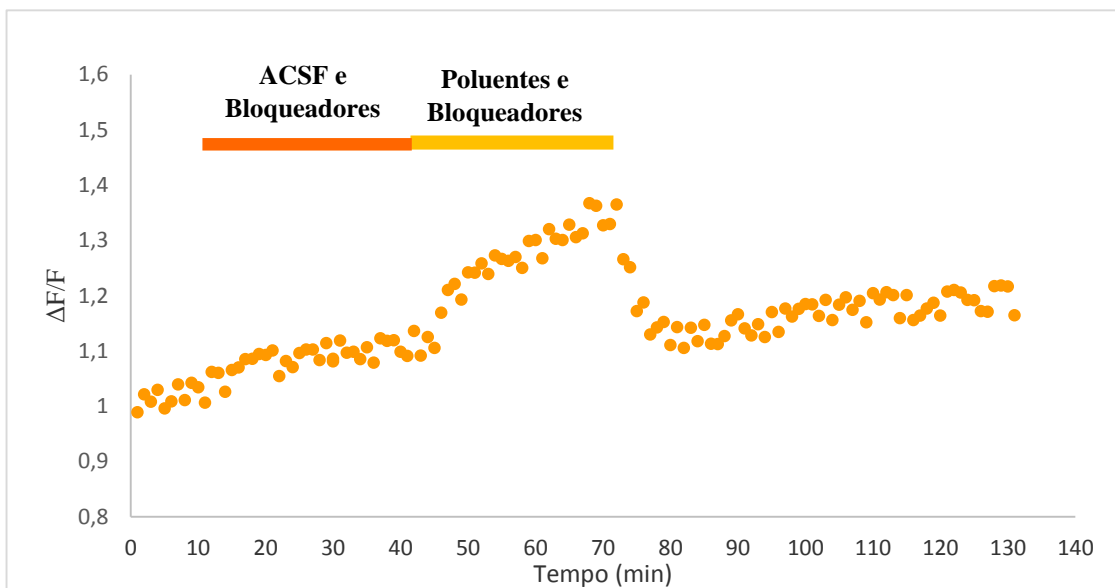


**Figura 24.** Sinais de ROS induzidos por compostos fenólicos na ausência e na presença da mistura bloqueador + antagonistas, obtidos com o indicador H<sub>2</sub>DCFDA em sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. Estes sinais não são afetados pela mistura contendo nifedipina (10 μM), NBQX (10 μM) e D.APV (50 μM). Os dados foram normalizados pela média das 10 primeiras respostas.

Outra forma de verificar a natureza dos sinais de ROS consistiu na aplicação da mistura composta por nifedipina (10 μM), NBQX (10 μM) e D.APV (50 μM), antes e durante a aplicação dos poluentes fenólicos.

A Figura 25 mostra que durante os 30 minutos em que se aplicou aquela mistura se verificou um aumento ligeiro dos sinais de ROS, que foi seguido de um aumento maior na presença dos poluentes e da mistura anteriormente referidos.

Introduzindo novamente a solução ACSF, durante os últimos 60 minutos, os sinais de ROS diminuíram sem atingirem os valores da linha base e voltaram a aumentar de novo, como se pode ver na mesma figura.



**Figura 25.** Curso temporal de sinais de ROS originados pela aplicação de bloqueadores e de poluentes fenólicos, obtidos com o indicador H<sub>2</sub>DCFDA em sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. O sinal induzido pelos poluentes é pouco afectado pela aplicação prévia e na presença da mistura de nifedipina (10 μM), NBQX (10μM) e D.APV (50 μM). Os dados foram normalizados pela média das 10 primeiras respostas.

## 5. Discussão

Os resultados obtidos para os sinais de zinco registados na presença de poluentes fenólicos (600 mg / L) aumentam gradualmente até atingirem um nível estável. Como o indicador de zinco Newport Green diacetato é um indicador permeante que pode atravessar as membranas celulares pré- e pós-sinápticas mas não consegue voltar a sair, devido à hidrolisação que sofre no meio interno, considera-se que os sinais medidos têm uma origem intracelular. Segundo Li *et al* (2001), este indicador não entra nas vesículas sinápticas, onde está armazenado o zinco pré-sináptico, pois ele é hidrolisado no citosol não conseguindo assim penetrar na membrana das vesículas e portanto no seu interior. Por este motivo considera-se que os sinais de zinco obtidos neste trabalho são devidos a interações do indicador Newport Green com zinco existente, ou que entra, na zona pós-sináptica.

Os estudos com os poluentes fenólicos sugerem que eles atuam de forma a ativar a libertação intensa de zinco da região pré-sináptica e a sua entrada na zona pós-sináptica traduzida pelo aumento que se observa nos sinais de zinco. Alguns minutos após a mudança para a solução com poluentes os sinais estabilizam, o que sugere que a ação dos poluentes para as concentrações utilizadas atingiu o valor máximo. O aumento inicial do sinal deve ser devido, pelo menos em parte, à mudança de solução que pode ser lenta nas zonas estreitas e tortuosas que caracterizam as sinapses das fibras musgosas do hipocampo onde se efectuaram os estudos. Outra hipótese para explicar a existência de um valor máximo no sinal é haver uma saturação na formação dos complexos indicador-zinco. Uma vez que o Newport Green tem uma afinidade média ( $K_d = 1 \mu\text{M}$ ), o que permite reações rápidas e também a sua acumulação em concentrações elevadas no meio interno, dado tornar-se noutra espécie química depois de hidrolisado e portanto não se atingir o equilíbrio de concentrações através da membrana celular, crê-se ser a primeira hipótese a verdadeira.

Depois de retirar a solução de poluentes e voltar à solução ACSF, os sinais de zinco diminuem abaixo da fluorescência basal sugerindo que os poluentes fenólicos têm um efeito parcialmente reversível na área CA3 do hipocampo, alterando de alguma forma a actividade naquela região sináptica. Tal facto pode ser devido a uma interação dos poluentes com mecanismos sinápticos que resultem numa diminuição do zinco basal libertado e da sua entrada na parte pós-sináptica e/ou com mecanismos pós-sinápticos de zinco. Outra possibilidade é os poluentes causarem uma variação na autofluorescência da região CA3, que é normalmente subtraída dos sinais de interesse.

Nos sinais de ROS obtidos na presença dos poluentes fenólicos o comportamento é idêntico, verificando-se um aumento progressivo daqueles sinais até atingirem um valor estável.

Como nestas experiências não se despolarizaram as membranas, e portanto não se induziu actividade sináptica, e a mistura de bloqueador e antagonistas não fez efeito, os poluentes fenólicos devem ser permeáveis às membranas celulares entrando para as zonas pré e pós-sinápticas e causando variações em ambas.

Apenas no final da experiência, quando se volta à solução normal de perfusão, o efeito difere dos sinais obtidos para o zinco, verificando-se neste caso, uma diminuição até ao nível de fluorescência basal, devido possivelmente à saída dos poluentes das células, seguida de um aumento que pode resultar da danificação dos tecidos. Apesar das diferenças os resultados obtidos, tanto nos sinais de ROS como nos de zinco, sugerem que os poluentes fenólicos danificam os tecidos celulares pois os sinais não recuperam a sua forma original.

O aumento dos sinais de ROS, embora possa ser induzido apenas pela interação dos poluentes fenólicos com algumas estruturas da célula, pode também estar associado à libertação e aumento do zinco pós-sináptico, que interfere com o metabolismo da mitocôndria e provoca a formação de ROS, como referido por vários autores (Sensi *et al.*, 2011; Frederickson *et al.*, 2005). Estudos em culturas de neurónios mostram peroxidação da membrana celular na presença de 30-35  $\mu\text{M}$  de zinco (Morris *et al.*, 2012), enquanto outros referem que os antioxidantes diminuem os efeitos tóxicos do zinco, confirmando o envolvimento do zinco na produção de ROS (Weiss *et al.*, 2000).

No estudo das variações de zinco associadas com a indução da LTP química verifica-se uma diminuição destes sinais na presença da solução ACSF modificada. Não foi possível aferir sobre a concretização da indução de LTP pois não foram medidos registos elétricos, no entanto, vários estudos afirmam que na presença de TEA (25 mM) e da solução ACSF modificada há uma potenciação do potencial excitatório pós-sináptico (Stewart *et al.*, 2005).

Durante a exposição a esta solução, os sinais de zinco sofreram uma diminuição significativa (Figura 14a.). Como foi referido anteriormente, o TEA origina uma despolarização das membranas celulares que ativa a entrada de cálcio nas células, estando este ião presente na solução ACSF modificada em grandes quantidades. Um aumentado elevado do cálcio pré-sináptico induz a fusão das vesículas sinápticas com a membrana celular produzindo a libertação de grandes quantidades de zinco. Sendo assim, deveria observar-se um aumento dos sinais pós-sinápticos de zinco e não uma diminuição. No entanto, os terminais sinápticos nesta

zona contém grandes quantidades de canais KATP que são ativados pela presença de zinco levando à hiperpolarização da célula que por sua vez inibe a transmissão sináptica e a libertação de zinco e de glutamato (Bancila *et al.*, 2004). Confirmando estes resultados, Matias *et al* (2010), verificaram que após estimulação tetânica das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo se observa uma depressão pós-tetânica da atividade sináptica e de zinco libertado, causada pela aplicação de seis tétanos. Na presença de tolbutamida, antagonista dos canais KATP, aquela depressão é diminuída. Ou seja, a ativação destes canais pela libertação de zinco durante os tétanos inibe a transmissão sináptica causando a depressão referida, enquanto que na presença de tolbutamida que bloqueia estes canais, a depressão pós-tetânica não é tao elevada.

Além disso o zinco também atua nos canais VDCCs inibindo-os, ou seja, diminuindo a entrada de cálcio através deles. Em consequência a fusão das vesículas com a membrana celular será menor havendo portanto menor libertação de zinco e de glutamato (Matias *et al.*,2010).

Esta inibição da transmissão sináptica através da ativação de canais KATP e da inibição de VDCCs reduz a libertação de zinco e a sua entrada para a zona pós-sináptica verificando-se por isso uma diminuição dos sinais de zinco medidos. O aumento inicial do zinco causado pela despolarização não foi detectado talvez porque o ciclo de transmissão sináptica é muito rápido, verificando-se que nas fibras musgosas o zinco permanece na fenda sináptica apenas 30 a 40 milissegundos (Vergano *et al.*, 2014) e os registos foram feitos apenas de um em um minuto.

No caso da Figura 14b, após a diminuição dos sinais de zinco observa-se um aumento ainda na presença da solução ACSF modificada. Este aumento pode dever-se à diminuição de zinco na fenda sináptica resultante da hiperpolarização, havendo assim menos zinco para interagir com os canais KATP e desta forma a célula vai despolarizar novamente resultando na libertação de zinco.

Na indução da LTP química os sinais de zinco diminuem na solução ACSF modificada, que contém muito TEA e cálcio, ao contrário do potencial excitatório pós-sináptico que sofre uma potenciação (Stewart *et al.*, 2005). Isto pode ser explicado, pela entrada de cálcio na zona pós-sináptica, através de VDCCs, originando a potenciação, apesar de entrar menos zinco na zona pós-sináptica pelo facto da sua libertação ser inibida e do zinco não ter sido adicionado externamente como o cálcio.

Voltando à solução normal de perfusão os sinais voltam a aumentar atingindo níveis próximos dos da fluorescência basal, ou seja as quantidades de zinco pós-sináptico atingem valores idênticos aos iniciais.

O estudo das variações dos sinais de ROS associados à indução da LTP mostram resultados idênticos aos obtidos para o zinco. A aplicação da solução ACSF modificada também atua de forma a provocar uma diminuição dos sinais de ROS, o que sugere mais uma vez o envolvimento de zinco na produção destas espécies.

O efeito dos poluentes fenólicos nas variações dos sinais de zinco e ROS associadas com a indução da LTP foi também alvo de estudo. Observou-se que tanto os sinais de zinco como os de ROS, na presença da solução ACSF modificada após exposição a poluentes, apresentam uma diminuição idêntica à observada sem a aplicação dos poluentes. Em ambos os casos, voltando à solução ACSF verifica-se um aumento da fluorescência em relação à linha base apontando para maiores quantidades de zinco e ROS na preparação.

Os sinais de zinco na presença de KCl (60 mM) aumentam devido à despolarização da membrana celular, tanto na zona pré-sináptica como na pós-sináptica, permitindo deste modo, a libertação de zinco e a sua passagem para a zona pós-sináptica. Ketterman *et al* (2007) estudaram o efeito da despolarização com KCl na presença do indicador Zinpyr-1, onde foi aplicada uma concentração de 60 mM, resultando numa diminuição dos sinais de fluorescência na zona pré-sináptica e seguidamente um aumento na zona pós-sináptica. Outros estudos comprovam estes resultados, por exemplo, a aplicação de 50 mM de KCl provoca um aumento dos sinais de fluorescência em fatias do hipocampo, na presença do indicador Newport Green (Li *et al.*, 2001). Na área CA1 do hipocampo, foi demonstrado, usando o indicador ZnAF-2, que 100 mM de KCl provoca um aumento na concentração de zinco extracelular sugerindo a libertação do zinco de vesículas pré-sinápticas (Takeda *et al.*, 2011).

O efeito do KCl é irreversível pois voltando a colocar a solução normal de perfusão os sinais de zinco mantêm-se não recuperando o valor inicial.

A aplicação de KCl (60 mM) em conjunto com ZnCl<sub>2</sub> (1 mM) provoca um aumento mais elevado do que apenas o KCl. Canzoniero *et al* (1999) estudaram o efeito de KCl (60 mM) e de KCl (60 mM) em conjunto com Zn<sup>2+</sup> (300 μM) em células de cultura tendo verificado que, ao contrário do que se obteve neste trabalho, o KCl por si só não altera os valores de fluorescência. No entanto, a solução com Zn<sup>2+</sup> resulta num aumento significativo dos sinais de zinco de acordo

com Sensi *et al* (1997) que obtiveram os mesmos resultados, confirmando assim o aumento nos sinais de zinco após aplicação do  $ZnCl_2$  em conjunto com KCl.

O efeito do quelante de zinco TPEN foi estudado em várias experiências com resultados diferentes dependendo da concentração utilizada.

Quando se utilizou o TPEN (100  $\mu M$ ) depois da aplicação do KCl (20 mM), ele fez diminuir os sinais até ao nível basal de fluorescência. Estes resultados estão de acordo com os de outros estudos nos quais a aplicação de TPEN (50  $\mu M$ ) após um aumento significativo da concentração de zinco intracelular, medido com o indicador mag-fura-5, diminuiu os sinais até à linha base (Sensi *et al.*,1997). Canzoniero *et al* (1999) também estudaram o efeito de TPEN (100  $\mu M$ ), usando o indicador Newport Green, e verificaram que na presença daquele quelante de zinco os sinais de zinco diminuíam até ao nível inicial de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Ao contrário do que era de esperar, utilizando a mesma concentração de TPEN (100  $\mu M$ ) numa experiência diferente, onde este foi aplicado depois duma solução composta por KCl (60 mM) e  $ZnCl_2$  (1 mM) os sinais de zinco diminuíram mas não atingiram os valores da fluorescência basal. Isto pode dever-se ao facto do zinco intracelular ser mais elevado neste caso e a quantidade de TPEN presente não ser suficiente para complexar todo o zinco livre. Como referido por Dineley *et al* (2002), a quantidade de complexo formado entre o indicador e o ião também é determinada pela concentração presente de indicador. Para concentrações mais elevadas de TPEN os sinais descem até ao nível da linha base. Portanto, apesar da concentração do indicador poder ser igual nas duas situações, a concentração de zinco é mais elevada no segundo caso, podendo requerer mais TPEN para a sua total complexação.

Portanto para as concentrações mais baixas de TPEN poderia haver saturação não sendo a concentração utilizada suficiente para se ligar a todo o zinco existente, não causando portanto a diminuição dos sinais até à linha base.

Numa terceira experiência onde se empregou o TPEN (20  $\mu M$ ) após a aplicação de  $ZnCl_2$  (1 mM) e  $Na^+$ -piritiona (1 mM) os sinais de zinco, após o aumento provocado pela solução de  $ZnCl_2$  (1 mM) e outra concentração de  $Na^+$ -piritiona (20  $\mu M$ ), diminuíram abaixo da linha base, aumentando logo em seguida e aproximando-se desta.

O aumento dos sinais de zinco na presença de  $ZnCl_2$  (1 mM) e  $Na^+$ -piritiona (20  $\mu M$ ) foi observado por Sensi *et al.* (1997) em neurónios de cultura. Neste trabalho, realizado em fatias

do hipocampo com sinapses intactas, registou-se um aumento bastante menor e com uma curta duração, uma vez que descia logo a seguir.

A adição de TPEN provocou uma diminuição dos sinais que ultrapassou os níveis basais de fluorescência e em seguida um aumento progressivo dos mesmos.

Estes resultados podem dever-se à baixa concentração de TPEN utilizado e também ao facto de que a mesma fatia do hipocampo esteve exposta a poluentes fenólicos antes da introdução das soluções acima referidas (dados não apresentados), podendo deste modo estar danificada não respondendo assim como esperado.

De modo a estudar a natureza sináptica dos sinais, tanto de zinco como de ROS, utilizou-se uma solução composta por nifedipina (10  $\mu$ M), NBQX (10  $\mu$ M) e D-APV (50  $\mu$ M), respetivamente bloqueadores dos canais de cálcio dependentes do potencial do tipo L e antagonistas dos recetores AMPA/kainato e NMDA, respetivamente.

Para os sinais de zinco, esta solução foi aplicada depois da de KCl, na presença da qual os sinais tiveram um aumento significativo. Este aumento foi reduzido na presença do bloqueador e antagonistas, embora não totalmente.

Canzoniero *et al* (1999) utilizaram o NBQX (10  $\mu$ M,) na presença de 300  $\mu$ M de NMDA e 300  $\mu$ M de zinco, para impedir a ativação dos recetores AMPA/kainato e NMDA e Sensi *et al* (1997) aplicaram a nifedipina, o NBQX, o D-APV e o BNZ (benzamil-amiloride) de modo a bloquear ou inibir a activação respetivamente de VDCCs, recetores de AMPA/kainato e de NMDA e bombas de  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ .

A diminuição dos sinais de zinco verificada neste trabalho após introdução da mistura do bloqueador e antagonistas sugere uma natureza pós-sináptica dos sinais. O facto de não diminuírem completamente até à linha base pode ser devido à ausência de um antagonista de bombas de  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  permitindo assim a entrada de zinco através deste mecanismo celular.

Nos sinais de ROS a aplicação da solução contendo o bloqueador e os compostos antagonistas referidos anteriormente, não produz nenhum efeito. A adição desta mistura impede a transmissão sináptica, mas nestas experiências ela não foi ativada pois não se induziu a despolarização das células. Sendo assim estas experiências mostram que a elevação dos sinais de ROS causada pela presença de poluentes fenólicos é independente da transmissão sináptica.



## 6. Conclusões e Trabalhos Futuros

### 6.1. Conclusões

Os estudos realizados na área CA3 do hipocampo permitiram obter várias informações sobre o efeito dos compostos poluentes em sinais neuronais de zinco e de ROS. A aplicação destes compostos faz aumentar ambos os sinais indicando que estes são responsáveis por gerar ROS e por causar libertação de zinco e a entrada deste ião na zona pós-sináptica. Quando se volta à solução normal de perfusão os sinais nunca recuperam a sua forma original o que sugere que os poluentes fenólicos interagem de forma negativa com as estruturas celulares provocando de alguma forma a sua degradação.

O estudo das variações de sinais de zinco e de ROS associadas com a indução da LTP química não permitiu concluir se há ou não indução da LTP por não se terem medido sinais elétricos. A diminuição dos sinais na presença da solução ACSF modificada pode ser devida à hiperpolarização da zona pré-sináptica resultante da ativação de canais KATP e pela inibição de canais VDCCs, pelo zinco.

Em relação ao efeito dos poluentes fenólicos nas variações dos sinais de zinco e ROS associadas com a LTP química, observou-se que estes compostos não interferiam naqueles sinais na presença da solução ACSF modificada. No entanto regressando à solução de ACSF os sinais aumentam em relação aos registados na ausência dos poluentes, indicando que estes compostos têm um efeito negativo na actividade neuronal.

Os sinais de zinco observados na presença de nifedipina (10  $\mu$ M), NBQX (10  $\mu$ M) e D.APV (50  $\mu$ M), respetivamente, bloqueador de canais de cálcio dependentes do potencial do tipo L e antagonistas de recetores de AMPA/kainato e de NMDA, diminuem confirmando a natureza pós-sináptica dos sinais.

A aplicação daqueles compostos na medição de sinais de ROS não produziu nenhum efeito, concluindo-se que estes sinais são independentes da transmissão sináptica.

## 6.2. Trabalhos Futuros

O estudo do efeito de poluentes fenólicos em sinais neuronais de zinco e de ROS constituiu o principal objetivo deste trabalho. Uma vez que este tema está ainda muito pouco desenvolvido, há muitas questões a serem esclarecidas.

O aparente aumento dos sinais de zinco e de ROS na presença de poluentes fenólicos merece um estudo mais aprofundado, podendo para isso estudarem-se os efeitos de diferentes concentrações daqueles compostos para verificar a partir de que concentrações se tornam prejudiciais.

Seria também interessante estudar o efeito dos poluentes fenólicos separadamente, já que neste trabalho não houve essa oportunidade tendo-se aplicado uma mistura dos poluentes. Como referido ao longo do trabalho, os compostos fenólicos utilizados são conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes, por isso seria pertinente analisar cada um deles isoladamente de modo a verificar se os resultados para um ou mais deles seriam diferentes dos obtidos com a mistura de todos.

Outra forma de dar continuidade a estes estudos seria a utilização de outro tipo de indicador de ROS visto que o utilizado neste trabalho é seletivo apenas a peróxido de hidrogénio e ao radical hidroxilo. Uma das hipóteses seria o indicador HEt uma vez que deteta o radical superóxido.

Seria também interessante estudar mais aprofundadamente a variação dos sinais de zinco e de ROS associados com a indução química da LTP. Para isso, poderia estudar-se o efeito da adição ao meio extracelular de tolbutamida, níquel e cádmio, que são compostos que afectam respectivamente canais de KATP, VDCCs do tipo N e T e do tipo L. Estas experiências, permitiriam estudar a contribuição relativa de cada um destes mecanismos nos movimentos de zinco e na formação de ROS associados com a LTP e com outras formas de actividade neuronal.

## 7. Bibliografia

Andersen, Per; Morris, Richard; Amaral, David; Bliss, Tim; O'Keefe, Jonh. (2007) *The Hippocampus Book*. New York, Oxford University Press.

Andrade, E.R.; Melo-Sterza, F. A.; Seneda, M.M.; Alfieri, A.A. (2010) *Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes*. Ver. Bras.Reprod.Anim., 34 (2):79-85.

Aniksztejn, L.; Ben-Ari, Y. (1991) *Novel form of long term potentiation produced by a K<sup>+</sup> channel blocker in the hippocampus*. Letters to Nature, 349:67-69.

Assaf, S. Y.; Chung, S. H. (1984). *Release of endogenous Zn<sup>2+</sup> from brain tissue during activity*. Nature, 308: 734-736.

Auerbach, J. M.; Segal M. (1997) *Peroxide modulation of slow onset potentiation in rat hippocampus*. J. Neuroscience, 17: 8695- 701.

Avshalumov, M.V.; Chen, B.T.; Rice, M. E.(2000) *Mechanisms underlying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated inhibition of synaptic transmission in rat hippocampal slices*. Brain Res., 882: 86-9.

Bancila, Victor; Nikonenko, Irina; Dunant, Yves; Bloc, Alain (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.

Benters, J. et al. (1997) *Study of the interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homeostasis using 19F-NMR spectroscopy*. Biochem., J. 322: 793–799.

Bindokas, Vytautas; Jordán, Joaquin; Lee, Chong C.; Miller, Richard J. (1996) *Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with Hydroethidine*. The Journal of Neuroscience, 16 (4):1324-1336.

Bliss, T.V.P.; T. Lomo (1973) *Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path*. J. Physiol., 232: 331-356.

Budde, T.; Minta, A.; White, J. A.; Kay, A. R. (1997) *Imaging free zinc in synaptic terminals in live hippocampal slices*. Neuroscience, 79: 347–358.

Caeser, Manfred; Aertsen, Ad. (1991) *Morphological Organization of Rat Hippocampal Slice Cultures*. The Journal of Comparative Neurology, 307: 87-106.

- 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*.
- Chen, B. T.; Avshalumov, M.V.; Rice, M.E. (2001) *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a novel endogenous modulator of synaptic dopamine release*. *J Neurophysiology*, 85: 2468-76.
- Choi, D.W.; Koh, J.Y. (1998) *Zinc and Brain Injury*. *Annu. Rev. Neuroscience*.
- Corceiro, V.; Bastos, F.M.C.; Matias, C.M.; Mendes, P.J.; Sampaio dos Aidos, F.D.S.; Dionísio, J.C.; Quinta-Ferreira, R.M.; Cardoso, F.J.A.; Quinta-Ferreira, M.E. (2014) *Study of postsynaptic and zinc changes in hippocampal CA3 area using the fluorescent indicator Newport Green*. 9th FENS Forum Abstr. Submitted.
- Cuajungco, Math P.; Lees, Gordon J. (1997) *Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders*. *Neurobiology of Disease*, 4: 137-169.
- Dineley, Kirk E.; Malaiyandi, Latha M.; Reynolds, Ian J. (2002) *A reevaluation of neuronal zinc measurements: artifacts associated with high intracellular dye concentration*. *Molecular Pharmacology*, 62: 618-627.
- Fox, Stuart Ira. (1996) *Human Physiology*. New York, Mc Graw Hill.
- Frederickson, C.J. (1989) *Neurobiology of zinc and zinc containing neurons*. *Int. Rev. Neurobiology*, 31:145-238.
- Frederickson, C. J.; Hernandez, M. D.; Goik, S. A.; Morton, J. D.; McGinty, J. F.(1998) *Loss of zinc staining from hippocampal mossy fibers during kainic acid induced seizures: a histofluorescence study*. *Brain Res.*, 446: 383–386.
- Frederickson, C.J.; Koh, J.Y.; Bush A.I. (2005) *The neurobiology of zinc in health and disease*. *Nature Reviews Neuroscience*.
- Freitas, Rivelilson M.; Vasconcelos, Silvânia M. M.; Souza, Francisca C. F.; Viana, Glauce S. B.; Fonteles, Marta M. F . (2005) *Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats*. *FEBS Journal* 272: 1307–1312.
- Funke, Frank; Gerich, Florian J.; Muller, Michael (2011) *Dynamic, semi-quantitative imaging of intracellular ROS levels and redox status in rat hippocampal neurons*. *NeuroImage*, 54: 2590-2602.

Gonzalez-Rivera, J.C.; Preciado, J.E.; Osmá, J.F. (2014). *Phenolic Compounds Determination in Water by Enzymatic-based Electrochemical Biosensors*. OmniaScience, pp 111-127.

Güven, Mustafa; Aras, Adem Bozkurt; Topaloğlu, Naci; Özkan, Adile; Sen, Halil Murat; Kalakan, Yildiray; Okuyucu, Ali; Akbal, Ayla; Gökmen, Ferhat; Cosar, Murat (2014) *The protective effect of syringic acid on ischemia injury in rat brain*. Faculty of Medicine, Department of Neurosurgery, Canakkale, Turkey.

Held, Paul (2012) *An introduction to reactive oxygen species. Measurement of ROS in cells*. Biotek Instruments Inc.

Huber, Kimberly M.; Mauk, Michael D.; Kelly, Paul T. (1995) *Distinct LTP induction mechanisms: contribution of NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels*. Journal of Neurophysiology, 73:270-279.

Izumi, Yukitoshi; Auberson, Yves P.; Zorumski, Charles F. (2006) *Zinc modulates bidirectional hippocampal plasticity by effects on NMDA receptors*. The Journal of Neuroscience, 26(27): 7181-7188.

Jayanthi, R.; Subash, P. (2010) *Antioxidant Effect of Caffeic Acid on Oxytetracycline Induced Lipid Peroxidation in Albino Rats*. Ind J Clin Biochem. 25(4):371-375.

Khana, Mustafa; Goldsmith, Christian R.; Huang, Zhen; Georgiou, John; Luyben, Thomas T.; Roder, John C.; Lippard, Stephen J.; Okamoto, Kenichi (2014) *Two-photon imaging of Zn<sup>2+</sup> dynamics in mossy fiber boutons of adult hippocampal slices*. PNAS, 111:6786-6791.

Ketterman, Joshua K.; Li, Yang V. (2008) *Presynaptic evidence for zinc release at the mossy fiber synapse of rat hippocampus*. J. Neuroscience Research, 86:422-434.

Klann, E.; Roberson, E. D.; Knapp, L. T.; Sweatt, J. D. (1998) *A role for superoxide in protein kinase C activation and induction of long-term potentiation*. J. Biol. Chem., 273: 4516-22.

Knapp, Laurent T.; Klann, Eric (2002) *Role of reactive species in hippocampal Long-Term Potentiation: Contributory or Inhibitory?*. Journal of Neuroscience Research, 70: 1-7.

Koh, J. Y.; Choi, D. W. (1994) *Zinc toxicity on cultured cortical neurons involvement of N-methyl-D-aspartate receptors*. Neuroscience, 60:1049-1057.

Koh, J.Y.; Suh, S.W.; Gwang, B.J.; He, Y.Y.; Hsu C.Y.; Choi, D.W. (1996) *The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia*. Science, 272: 1013-1016.

- Kohen R; Nyska A. (2002) *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena antioxidants redox reactions and methods for their quantification*. Toxicol. Pathol., 30: 620-50.
- Kumar, Ashok (2011) *Long-term potentiation at CA3–CA1 hippocampal synapses with special emphasis on aging, disease, and stress*. Aging Neuroscience, 3:1-20.
- Langston, R. F.; Stevenson, C. H.; Wilson, C. L., Saunders, I. (2010) *The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations*. Behav. Brain Res., 215:275-29.1
- Lee, J. Y.; Kim, J. H.; Palmiter, R. D.; Koh, J. Y. (2003) *Zinc released from metallothionein-III may contribute to hippocampal CA1 and thalamic neuronal death following acute brain injury*. Exp. Neurol., 184: 337–347.
- Li, Jie; O, Wuliji; Jiang, Zhi-Gang; Ghanbari, Hossein (2013) *Oxidative stress and neurodegenerative disorders*. Int. J. Mol. Sci.,14: 24438-24475.
- Li, Y.; Hough, C. J.; Frederickson, C. J.; Sarvey, J. M. (2001) *Induction of mossy fiber: CA3 long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn<sup>2+</sup>*. J. Neurosci., 21: 8015–8025.
- Li, Y.; Hough, C.J.; Suh, S.W.; Sarvey, J.M.; Frederickson, C.J. (2001) *Rapid translocation of Zn<sup>2+</sup> from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation*. The American Physiological Society.
- Lorente de Nó R. (1934) *Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study on the ammonic system*. J. Psychol. Neurol., 46: 113-177.
- Marin, P.; Israel, M.; Glowinski, J.; Premont, J. (2000) *Routes of zinc entry in mouse cortical neurons: role in zinc-induced neurotoxicity*. Eur. J. Neuroscience, 12: 8–18.
- Maske, H. (1955) *A new method for demonstrating A and B cells in the islands of Langerhans*. 33:1058.
- Massaad, Cynthia A.; Klann, Eric (2011) *Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory*. Antioxidants & Redox Signaling, 14:2013-2054.
- Matias, Carlos M.M. (2001) *Estudo de fluorescência de variações neurais de cálcio e de zinco associadas com a potenciação de longa duração no hipocampo*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

- Matias, C.M.; Saggaub 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, 320: 22-27.
- Molnár, P.; Nadler, J.V. (2001) *Synaptically released zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses*. Brain Research, 910: 205-207.
- Monici, M. (2005). *Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications*. Biotechnol Annu. Rev.11: 227–56.
- Morris, D.R.; Levenson, C.W. (2012) *Ion channels and zinc: mechanisms of neurotoxicity and neurodegeneration*. Journal of Toxicology.
- Ocakoglu, Derya (2008) *Classification of Turkish virgin olive oils based on their phenolic profile* Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology..
- Pan, Enhui; Zhang, Xiao-an; Huang, Zhen; Krezel, Artur;Zhao, Min; Tinberg, Christine E.; Lippard; McNamara, James O. (2011) *Vesicular zinc promotes presynaptic and inhibits postsynaptic Long-Term Potentiation of mossy fiber-CA3 synapse*. Neuron, 71:1116-1126.
- Paoletti, P.; Vergnano, A.M.; Barbour, B.; Casado, M. (2009) *Zinc at glutamatergic synapses*. Neuroscience, 158: 126-136.
- Pellmar, T.C.; Hollinden, G.E.; Sarvey, J.M. (1991) *Free radicals accelerate the decay of long-term potentiation in field CA1 of guinea-pig hippocampus*. Neuroscience, 44: 353-359.
- Pereda, E. Alberto (2014) *Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses*. Nature Reviews Neuroscience,15: 250–263.
- Pereira, David M.; Valentão, Patrícia; Pereira, José A.; Andrade, Paula B. (2009) *Phenolics: From Chemistry to Biology*. Molecules, 14: 2202-2211.
- Quinta-Ferreira, M. E.; Matias, C. M. (2004) *Hippocampal mossy fiber calcium transients are maintained during long-term potentiation and are inhibited by endogenous zinc*. Brain Res., 1004: 52–60.
- Quinta-Ferreira, M. E.; Matias, C. M.; Arif, M.; Dionísio, J.C. (2004) *Measurement of presynaptic zinc changes in hippocampal mossy fibers*. Brain Res., 1026: 1-10.
- Rhee, S.G.; Chang, T.S.; Bae, Y.S.; Lee S.R.; Kang S.W. (2003) *Cellular regulation by hydrogen peroxide*. J. Am. Soc. Nephrol., 14: S211-5.

Roger, V.; Lloyd, P. M. H.; Ronald, P. M. (1997) *The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton Reaction*. Free Rad. Bio. Med., 22(5): 885-888.

Sensi, S.L.; Canzoniero, L.M.T; Yu, S.P.; Ying, H.S.; Koh, J.Y.; Choi, D.W.(1997) *Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry*. The Journal of Neuroscience, 17: 9554-9564.

Sensi, Stefano L.; Paoletti, Pierre; Bush, Ashley I.; Sekler, Israel (2009) *Zinc in the physiology and pathology of the CNS*. Nature Reviews Neuroscience, 10: 780-791.

Serrano, Faridis; Klann, Eric (2004) *Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus*. Aging Research Reviews, 3: 431-443.

Sindreu, Carlos; Storm, Daniel (2011) *Modulation of neuronal signal transduction and memory formation by synaptic zinc*. Behavioral Neuroscience, 5:1-13.

Singh, Ravindra P.; Sharad, Shashwat; Kapur, Suman (2004) *Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants*, 5(3): 218-225.

Slomianka, L.; Danscher, G.; Frederickson, C. J. (1990) *Labeling of the neurons of origin of zinc-containing pathways by intraperitoneal injections of sodium selenite*. Neuroscience, 38: 843-854.

Smart, T. G.; Xie, X.; Krishek, B. J.(1994) *Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc*. Prog. Neurobiol., 42: 393-341.

Soares, Sergio E. (2002) *Ácidos fenólicos como antioxidantes*. Rev. Nutr., 15 (1):71-81.

Song, Dong; Wang, Zhuo; Berger, Theodore W. (2002) *Contribution of T-Type VDCC to TEA-Induced Long- Term Synaptic Modification in Hippocampal CA1 and Dentate Gyrus*. Hippocampus, 12:689-697.

Souza, Selene Maria de Arruda Guelli Ulson; Souza, Fernanda Batista; Souza, Antônio Augusto Ulson (2012) *Applications of individual and simultaneous ozonation and adsorption processes in batch and fixed-bed reactors for phenol removal*. Science and Engineering, 34: 259-268.

Stewart, M. G.; Medvedev, N. I.; Popov, V. I.; Schoepfer, R.; Davies, H. A.; Murphy, K.; Dallérac, G. M.; Kraev, I. V.; Rodriguez, J. J. (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.



- Suh, S.W.; Chen, J.W.; Motamedi, M.; Bell, B.; Listiak, K.; Pons, N.F.; Danscher, G.; Frederickson, C.J. (2000) *Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury*. Brain Research, 852: 268-273.
- Takeda, A. (2000) *Movement of zinc and its functional significance in the brain*. Brain Research Reviews, 34: 137-148.
- Takeda, Atsushi; Takada, Shunsuke; Nakamura, Masatoshi; Suzuki, Miki; Tamano, Haruna; Ando, Masaki; Oku, Naoto (2011) *Transient increase in Zn<sup>2+</sup> in hippocampal CA1 pyramidal neurons causes reversible memory deficit*. Plos one,6:1-10.
- Ueno, S. et al (2002) *Mossy fiber Zn<sup>2+</sup> spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits*. J. Cell Biol., 158: 215–220.
- Urban, N. N.; Henze, D.A.; Lewis, D.A.; Barrionuevo, G. (1996) *Properties of LTP induction in the CA3 region of the primate hippocampus*. Learn. Mem., 3: 86-95.
- Uttara, Bayani; Singh, Ajay V.; Zamboni, Paolo; Mahajan, R. T. (2009) *Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options*. Current Neuropharmacology, 7: 65-74.
- Valencia, Antonio; Morán, Julio (2004) *Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons*. Free Radical Biology & Medicine, 36:1112-1125.
- Varea, E.; Ponsoda, X.; Molowny, A.; Danscher, G.; Lopez-Garcia, C. (2001) *Imaging synaptic zinc release in living nervous tissue*. J. Neurosci. Methods. 110: 57–63.
- Vergnano, Angela Maria; Rebola, Nelson; Savtchenko, Leonid P., Pinheiro, Paulo S.; Casado, Mariano ; Kieffer, Brigitte L.; Rusakov, Dmitri A.; Mulle, Christophe; Paoletti, Pierre (2014) *Zinc dynamics and action at excitatory synapses*. Neuron Article, 82: 1101-1114.
- Wang, Xianhua; Fang, Huaquiang; Huang, Zhanglong; Shang, Wei; Hou, Tingting; Cheng, Aiwu; Cheng, Heping (2013) *Imaging ROS signaling cells and animals*. J. Mol. Med. 91: 917-927.
- Wang, Xinkun; Michaelis, Elias K. (2010) *Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain*. Aging Neuroscience, 2:1-13.
- Wei, G.; Hough, C.J.; Li, Y.; Sarvey, J.M. (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. H.; Hartley, D. M.; Koh, J. Y. ; Choi, D. W. (1993) *AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity*. *Neuron.*, 10:43-49.

Weiss, J.H.; Sensi, S.L.; Koh, J.Y. (2000) *Zn<sup>2+</sup>: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease*. *TIPS*, 21: 395-401.

Wilde, G. J.; Pringle, A. K.; Wright, P.; Iannotti, F. (1997) *Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro*. *J. Neurochem.*, 69: 883-886.

Yin, H. Z.; Sensi, S.L.; Ogoshi, F.; Weiss, J. H. (2002) *Blockade of Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA/kainate channels decreases oxygen-glucose deprivation-induced Zn<sup>2+</sup> accumulation and neuronal loss in hippocampal pyramidal neurons*. *J.Neurosci.*, 22: 1273-1279.

Yin, H. Z.; Weiss, J. H. (1995) *Zn<sup>2+</sup> permeates Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA/kainate channels and triggers selective neural injury*. *Neuroreport.*, 6:2553-2556.

Yokoyama, M.; Koh, J.; Choi, D. W (1986) *Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons*. *Neurosci. Lett.*, 71: 351–355.

Zalutsky, R.A.; R.A. Nicoll. (1990) *Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons*. *Science*, 248:1619-1624.

## **8. Netgrafia**

Molecular Probes®, H<sub>2</sub>DCFDA (H<sub>2</sub>-DCF, DCF) [Acedido a 27 de Agosto de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D399>