



Universidade Federal do ABC
Centro de Ciências Naturais e Humanas

Trabalho de Conclusão de Curso
Bacharelado em Química

VERIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E CONSEQUÊNCIA DA
VARIAÇÃO DA HOMEOSTASE DE COBRE E ZINCO EM
CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO
DE QUELANTES ESPECÍFICOS

Samantha dos Santos Cipriano

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giselle Cerchiaro

Santo André
Novembro/2014

Universidade Federal do ABC
Centro de Ciências Naturais e Humanas

Trabalho de Conclusão de Curso
Bacharelado em Química

VERIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E CONSEQUÊNCIA DA
VARIAÇÃO DA HOMEOSTASE DE COBRE E ZINCO EM CÉLULAS
DE NEUROBLASTOMA ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO DE
QUELANTES ESPECÍFICOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC para obtenção do título de Bacharel em Química. (Trabalho baseado nas disciplinas NH3910 Estágio Supervisionado I e NH3911 Estágio Supervisionado II; totalizando 300 (trezentas) horas, realizado no laboratório L203 – 2º andar – Bloco B na Universidade Federal do ABC sob orientação da Prof^a. Dr^a Giselle Cerchiaro).

Aluna: Samantha S. Cipriano

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giselle Cerchiaro

Santo André, Novembro de 2014

SUMÁRIO

RESUMO.....	PÁG. 3
1. INTRODUÇÃO.....	PÁG. 4
2. OBJETIVOS.....	PÁG. 7
3. METODOLOGIA.....	PÁG. 8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	PÁG. 9
5. CONCLUSÃO.....	PÁG. 22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	PÁG. 23

RESUMO

Elucidar os mecanismos pelos quais os radicais livres e espécies oxidantes atuam em processos fisiológicos torna-se cada vez mais necessário, especialmente aqueles envolvendo metais de transição com elevada atividade redox como o cobre, ou participante de muitas funções celulares como o zinco. Nesta área de pesquisa, moléculas capazes de sequestrar esses íons metálicos são frequentemente utilizadas a fim de conhecer o papel da homeostase dos metais de transição necessários ao metabolismo e sua participação em processos degenerativos pouco conhecidos, especialmente em nível molecular. Utilizando células de linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y, ATCC - CRL-2266™) como modelo celular, foi avaliada a forma de como quelantes específicos capazes de atravessar a membrana celular, como o TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine) e o DEDTC (dietilditiocarbamato de sódio) afetam a concentração de cobre e zinco intracelular ao longo do tempo e em diferentes concentrações.

Palavras-chave: radicais livres; metais de transição; dano oxidativo; neurodegeneração; TPEN; DEDTC.

1. INTRODUÇÃO

Espécies radicalares estão envolvidas em doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS), embora não se saiba exatamente se são causa ou consequência destas doenças^{1; 2}. Uma vertente destes estudos demonstra que o estresse oxidativo tem um papel importante e pode até mesmo desencadear o processo de neurodegeneração. Esta vertente é fortalecida pelo fato de que neurônios são altamente propensos a situações desse tipo.

O estresse oxidativo é definido como a situação na qual a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a a morte por apoptose ou necrose³.

A barreira hematoencefálica é relativamente impermeável a flutuações de concentração de íons de metais de transição, como íons de cobre, ferro e zinco⁴. Mesmo assim esses metais estão envolvidos diretamente na geração/"tamponamento" de espécies reativas nas células, e possivelmente com desordens neurodegenerativas tanto na forma de complexação do peptídeo envolvido em agregações proteicas como Cu^{II}- β -amilóide na doença de Alzheimer, quanto no sítio ativo da Cu,Zn-Superoxido dismutase (Cu,Zn-SOD) na ALS. Neste contexto, a investigação de situações de estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC) é primordial para compreender como espécies oxidativas contribuem para a patologia de doenças neurodegenerativas.

Estudar como quelantes ditos específicos como o TPEN para zinco e o DEDTC para cobre afetam a concentração destes metais no interior da célula, relacionando com o tempo de tratamento e concentração no meio de cultura, é de vital importância para o entendimento da relação entre o estresse oxidativo e a variação destes íons metálicos que já são amplamente utilizados em pesquisas com este foco.

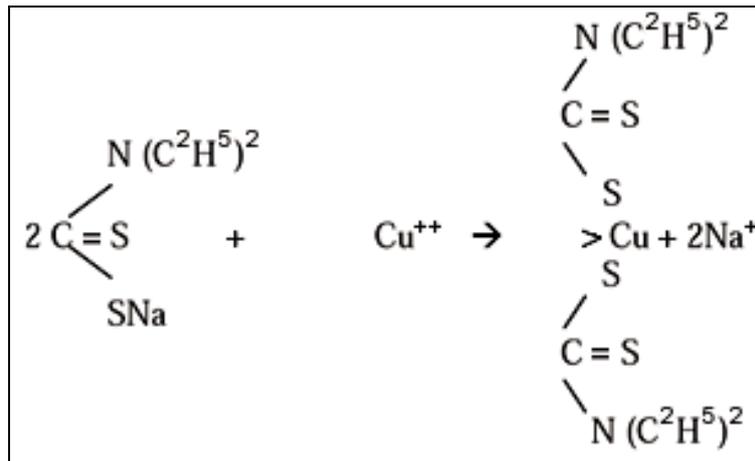


Figura 1: Estruturas do DEDTC (esquerda) e DEDTC complexando o Cu^{2+} (direita).

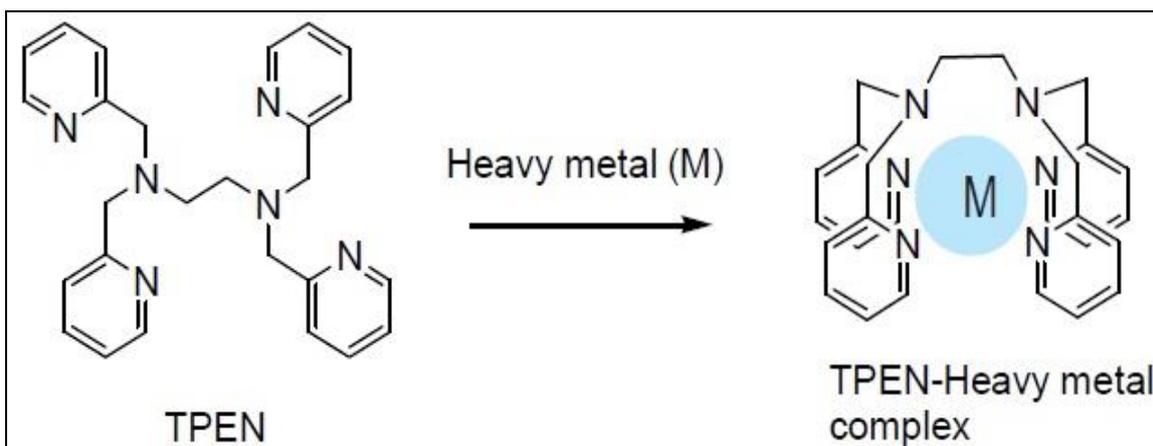


Figura 2: Estruturas do TPEN (esquerda) e TPEN complexando um íon metálico M (direita).

1.1. A toxicidade do zinco e sua essencialidade

O zinco II (Zn^{2+}) é um íon essencial para as células. Trata-se de um importante componente para os bioquímicos devido ao fato de estar ligado a enzimas e proteínas; um micronutriente para os nutricionistas, e um poluente tóxico para os ecologistas e biólogos marinhos⁵. Este íon pode estar localizado em sítios ativos de muitas metaloenzimas^{6; 7} em muitas regiões do sistema nervoso central (SNC), particularmente no córtex cerebral, glândula pineal, e hipocampo^{8; 9}.

Em pesquisas recentes, observou-se que metalochaperonas presentes em cianobactérias selecionam o íon metálico a ser transportado, armazenado ou inserido em outras proteínas – como o Cu^{II} , Zn^{II} ou Mn^{II} - de acordo com o ambiente em que foram dobradas: citoplasma ou periplasma, mostrando assim uma seletividade regulada pela localização¹⁰.

Além de exercer importante papel estrutural em centenas de enzimas e proteínas¹¹, o elemento zinco regula muitos processos bioquímicos na célula, incluindo a síntese de DNA, apoptose, proliferação e estresse oxidativo¹².

Neurocientistas têm sugerido que o Zn^{2+} é transportado através de membranas celulares por canais de sódio e cálcio e atua como sinalizador iônico¹³, mas esta função ainda é pobremente caracterizada e questionável. O zinco é muito provavelmente um neuromodulador do sistema nervoso central¹⁴ alterando a função de vários receptores e canais, inclusive receptores de N-metil D-Aspartato (NMDA), receptores de Ácido gama-aminobutírico (GABA), receptores de glicina, receptores de adenosina trifosfato (ATP) além dos canais de sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+})^{15; 16}.

Evidências experimentais sugerem que, dependendo da concentração local, o zinco pode causar alterações fisiológicas positivas ou negativas¹⁷. O excesso de zinco livre é tóxico para os tecidos do corpo¹⁸, sendo capaz de exacerbar a danificação neuronal, *in vivo e in vitro*^{19; 20; 21}. No cérebro, as alterações de homeostase de zinco são usadas para mediar danos neuronais que podem resultar em epilepsia, isquemia, e trauma cerebrais como nas doenças neurodegenerativas, e na doença de Alzheimer^{5; 22; 23; 24}.

Estudos relatam que dependendo da quantidade, o excesso de zinco pode induzir a morte celular, provavelmente pela geração de espécies reativas de oxigênio^{25; 26; 27}. Todavia o papel fisiológico do zinco neste caso não é bem estabelecido, já que não é um metal com ciclo redox ativo no ambiente celular. Assim, para evitar uma afluência tóxica de zinco, é importante que o nível de excitabilidade neuronal seja controlado firmemente. Em contraste, parece que o zinco é capaz de proteger as células contra processos oxidativos²⁸: Coudray e colaboradores (1991) informaram que a deficiência de zinco pode resultar em danificação oxidativa em várias macromoléculas e no aumento de produtos de lipoperoxidação²⁹. Evidências adicionais sugerem que zinco exógeno apresenta uma ação de neuroproteção no cérebro por antagonismo da ativação de N-metil D-Aspartato (NMDA)^{30; 31; 32}. Deste modo, conclui-se que o elemento zinco é capaz de induzir e também proteger a célula de danos oxidativos.

1.2. A toxicidade do cobre e sua essencialidade

Ainda que o cobre seja absolutamente necessário para a vida, participando de inúmeros processos de transferência eletrônica, atividade oxidase e oxigenase, e

detoxificação de espécies reativas³³, paradoxalmente é altamente tóxico. Este importante dado revela que a reatividade do cobre é controlada pelas proteínas e enzimas que o contém³⁴. Assim, a concentração deste metal deve ser rigorosamente controlada pelo organismo, de modo que este íon essencial seja provido às enzimas e proteínas específicas, mas não acumulado em níveis tóxicos^{35; 36; 37; 38; 39}. O cobre, assim como outros metais com atividade redox, é sequestrado da alimentação em formas não reativas, e absorvido na digestão como quelatos de aminoácidos, principalmente histidina. Há 10 anos os mecanismos de transporte e distribuição de íons de metais de transição, como o cobre, começaram a ser desvendados⁴⁰. Com a elucidação da rota de transporte desses íons, começou-se a entender o quanto e como alguns metais presentes naturalmente em enzimas e proteínas podem ser danosos ao organismo, levando a um grande número de doenças oriundas das falhas nestes sistemas de transporte e armazenamento.

Deste modo, certas anomalias relacionadas ao metabolismo e ao transporte do cobre, levam o tão benéfico metal a se tornar um poderoso catalisador de danos mediados por espécies reativas de oxigênio (radicais livres, ROS), convertendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a radicais hidroxila, e catalisando a oxidação de muitos substratos presentes no corpo, assim como danos ao DNA. Tão bem quanto cálcio e ferro, o estresse oxidativo causa um aumento na disponibilidade de íons cobre. Por exemplo, a ceruloplasmina é rapidamente degradada por proteases ou por exposição ao peroxinitrito ($ONOO^-$) (ou radicais livres derivados de $ONOO^-$) liberando cobre. Íons de cobre são liberados em excesso no cérebro e nas paredes das artérias¹.

Tendo em vista as expectativas bastante realistas de se obter terapias eficientes para as doenças causadas por desordens genéticas, duas doenças hereditárias relacionadas ao metabolismo do cobre têm atraído especial atenção dos pesquisadores: a doença de Wilson e a síndrome de Menkes^{41; 42}. Ambas são causadas por mutações da proteína transportadora de cobre ATPase (ATP7A para a síndrome de Menkes, e ATP7B para a doença de Wilson) que é seletivamente expressa em diferentes tecidos, envolvida no transporte intramembrana do cobre, e ocorrem em aproximadamente 1 nascimento a cada 100 mil.

A síndrome de Menkes envolve o armazenamento insuficiente de cobre, e é causada também por uma disfunção hereditária no seu transporte intracelular, gerando uma falta sistêmica deste elemento no organismo. O gene responsável pela síndrome foi

identificado e isolado, e está situado no cromossomo X, e induz um defeito no transporte do cobre pela ATP7A das células intestinais. A concentração de cobre no cérebro torna-se particularmente baixa⁴³, pois este órgão contém também a proteína mutante ATP7A, expressa na barreira do cérebro com a corrente sanguínea. Caso a síndrome não seja tratada a tempo por suplementação do elemento essencial, administrado como “cobre-histidina”, por exemplo, uma degradação rápida e eventualmente letal ocorre no sistema nervoso central⁴⁴. Outra doença originada em parte (cerca de 10%) por um defeito genético é a esclerose lateral amiotrófica (ou ALS), causada por mudanças na sequência de aminoácidos da enzima antioxidante Cu,Zn-SOD⁴⁵. Atualmente está sendo difundida a ideia de que a SOD mutante ou não madura, ou seja, ainda sem dobramento adequado, decorre da falta da inserção de metais (Cu e Zn) e da falta da ponte dissulfeto interna, levando a agregação fibrilar observada nos neurônios motores, característica da ALS⁴⁶. Isso indica que o desbalanço na homeostase dos metais do sítio ativo da SOD pode estar no papel central da agregação proteica observada na doença.

Já a doença de Wilson envolve uma acumulação patológica de cobre no fígado e no cérebro, e é letal caso não tratada⁴⁷. A sua terapia consiste na administração de agentes quelantes específicos ao cobre, em particular a D-penicilamina^{48; 49} (figura 1), ou em caso de sua intolerância, a trietilenotetramina ou derivados. A D-penicilamina é também conhecida quimicamente como β,β-dimetilcisteína, foi descoberta em 1953, de forma serendipitosa, como um metabólito da penicilina B, quando se analisava urina de pacientes com hepatopatia. Pode ser obtida a partir da hidrólise da penicilina e tem sido utilizada como agente terapêutico desde 1956. É também indicada no tratamento de dermoesclerose, que envolve uma superprodução de colágeno na pele. Esta doença demonstra a importância do cobre também no controle da síntese de tecidos conjuntivos, cujo mecanismo não foi totalmente decifrado⁵⁰.

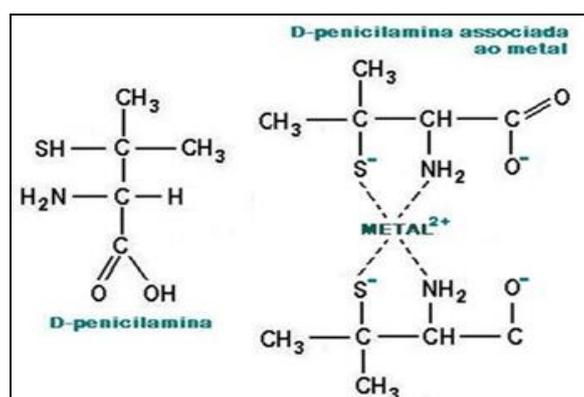


Figura 3: Estrutura da D-penicilamina livre e coordenada ou metal.

2. OBJETIVOS

- ▶ Verificar a especificidade dos quelantes DEDTC e TPEN para os íons cobre e zinco;
- ▶ Variar a homeostase de Cu^{2+} e Zn^{2+} intracelular e verificar seus efeitos em neuroblastoma;
- ▶ Correlacionar a concentração desses metais com a geração de espécies reativas.

3. METODOLOGIA

Cultivo celular – A linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC - CRL-2266™), foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com o nutriente F-12, estreptomicina e soro fetal bovino a 10% em volume, mantido em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Tratamentos com quelantes - As células cultivadas foram plaqueadas em garrafas para cultura celular com 25cm², em uma confluência de 1 x 10⁴ células/cm² e 24 horas foram aguardados para o início dos tratamentos. O meio de cultura foi substituído e os quelantes TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine) e DEDTC (dietilditiocarbamato de sódio) – diluídos em meio de cultura – adicionados nas concentrações 5µM e 25µM e os períodos de tratamento de 6, 24 e 48 horas foram aguardados. Finalizados os tratamentos, os mesmos foram avaliados e comparados com os controles (sem adição de quelantes) nos períodos de 0, 6, 24 e 48 horas (Tabela 1).

Tabela 1: Quantidade de amostras preparadas e os tratamentos a que foram submetidas. EI = Experimentos Independentes (afim de verificar reprodutibilidade dos dados).

Tratamento/Tempo (horas)	0	6	24	48
Controle	3 EI	3 EI	3 EI	3 EI
TPEN 5 µM		3 EI	3 EI	3 EI
TPEN 25 µM		3 EI	3 EI	3 EI
DEDTC 5 µm		3 EI	3 EI	3 EI
DEDTC 25 µm		3 EI	3 EI	3 EI

Preparo das amostras para análise – As células foram desaderidas com uma solução tampão Fosfato-Salina e ETDA (PBS-EDTA) e Tripsina (5:1) durante 3 minutos e então centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. O pellet foi lavado 3 vezes com solução tampão PBS (ressuspensão do pellet com PBS e centrifugação a 3000 rpm, processo repetido 3 vezes). O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet lavado com as soluções tampão PBS e PBS-EDTA sete vezes. As amostras permaneceram em estufa para secagem a 37°C durante sete dias e a quantificação de cobre total foi feita utilizando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. A quantificação de zinco total foi feita utilizando espectrometria de absorção atômica com chama (quantificações realizadas por alunos colaboradores da Universidade de São Paulo).

Análise estatística dos dados – Os dados foram submetidos ao teste t (para exclusão de determinados valores, se necessário). A variância e significância dos dados foram calculadas pelo método ANOVA com pós-teste Tukey, utilizando o software Origin 8.0. Nível de confiança empregado = 95%, com n= 3.

Testes de viabilidade celular por MTT – As células foram plaqueadas em uma confluência de 4×10^4 células/cm² em placas de 96 wells e tratadas como citado acima. Dado o fim do período de tratamento, 30 µL do sal de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foram adicionados e as células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 1 hora, protegidas da luz. Finalmente, a solução restante de MTT, meio e soro foi descartada, e 150 µL de DMSO foram adicionados; a placa foi mantida sob agitação protegida da luz por mais 15 minutos e a leitura de absorbância foi feita em 500 nm. Os valores de viabilidade obtidos foram expressos em relação ao controle.

Os testes de viabilidade celular foram realizados pela aluna Andreza C. Matias (Universidade Federal do ABC). Os resultados destes testes bem como de testes complementares, podem ser visualizados no artigo científico **Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in neuroblastoma cells by raising the intracellular copper level, triggering cytochrome c release and caspase activation**, publicado na revista *Toxicology in vitro*, resultado da junção dos trabalhos⁵¹.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras preparadas e secas em estufa conforme descrito previamente, foram submetidas à quantificação de cobre total através de espectroscopia de absorção atômica por forno de grafite com adição de padrão. Os resultados obtidos em cada tratamento e tempo, bem como os valores excluídos por teste t, suas médias e desvios padrões (calculados sem a consideração dos valores indicados pelo teste t) são apresentados na tabela 2 e graficamente nas figuras 4-7.

Tabela 2: Quantificação de Cu total em células SH-SY5Y (ng de Cu/g de amostra) – grupos Controle, TPEN 5µM e 25µM e DEDTC 5µM e 25µM.

Controles							
0 horas		6 horas		24 horas		48 horas	
0,30866		0,36911		1,25678		0,35281	
0,33		0,37009		1,10745		0,48194	
0,35064		0,93097		0,56934		0,52443	
0,50035		6,22		0,38		1,49	
0,51511		-		-		-	
0,53961		-		-		-	
0,58669		-		-		-	
Concentração Média (ng de Cu/g de amostra)							
0,447294		0,556723		0,828393		0,45306	
Valores Excluídos (Teste t)							
Nenhum		6,22		Nenhum		1,49	
Desvio Padrão							
0,113788		0,324107		0,42014		0,089381	
TPEN 5 µM			TPEN 25 µM				
6 horas	24 horas	48 horas	6 horas	24 horas	48 horas		
0,24	0,37295	1,10309	4,43	0,53876	0,44255		
0,52977	0,26432	1,57073	18,33	0,3627	0,37564		
0,69093	0,39493	5,09935	0,58084	0,90442	0,49		
0,72	1,64	0,84	0,42228	0,06	0,83		
0,89216	-	0,58	0,19023	0,27	-		
3,41	-	-	-	-	-		
Concentração Média (ng de Cu/g de amostra)							
0,614572	0,344067	1,023455	1,405838	0,427176	0,534548		
Valores Excluídos (Teste t)							
3,41	1,64	5,09935	18,33	Nenhum	Nenhum		
Desvio Padrão							
0,245711	0,069932	0,422753	2,022479	0,317763	0,202478		
DEDTC 5 µM			DEDTC 25 µM				
6 horas	24 horas	48 horas	6 horas	24 horas	48 horas		
11,40482	8,92	10,6	10,93	9,03	14,8		
11,80963	6,43	11,47	10,01	10,68	17,93		
12,37288	7,66	9,88	8,75	9,37	16,78		
Concentração Média (ng de Cu/g de amostra)							
11,86244	7,67	10,65	9,896667	9,693333	16,50333		

Valores Excluídos (Teste t)					
Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
Desvio Padrão					
0,486186	1,24503	0,796178	1,09441	0,871225	1,583235

Uma pequena variação da concentração de cobre ao longo do tempo foi visualizada tanto no grupo controle, como nos tratamentos com TPEN. Estes valores foram então submetidos ao teste ANOVA, de maneira separada (somente o grupo controle e somente os tratamentos com TPEN) e conjunta (comparando os grupos controle x TPEN), resultando em variações não significativas ($p > 0,05$). Isso demonstra a presença de níveis basais de cobre necessários para manutenção celular e enovelamento correto de algumas metaloproteínas, além de prováveis traços do metal imobilizados através de proteínas específicas para esta função como a da ceruloplasmina e vacúolos isolados do resto da célula para estoque⁵⁰ confirmando a falta de afinidade do TPEN pelo cobre e a provável alteração da concentração de zinco (considerando que o reagente em questão não complexa outros íons como o Fe^{2+} e Mn^{2+}). As visualizações das células antes do preparo das amostras revelaram perda da viabilidade celular nos tratamentos ao longo do tempo, e com o aumento da concentração, causada pelo efeito tóxico do próprio reagente e principalmente pela alteração da homeostase de zinco intracelular.

Os resultados obtidos para os tratamentos com DEDTC também foram submetidos ao teste ANOVA, comparando tanto os valores de concentração das amostras dos grupos tratados com o quelante, quanto os valores entre os grupos, inclusive o grupo controle; resultando em variações significativas ($p < 0,05$). Sendo assim, o mesmo teste estatístico foi aplicado entre os tratamentos com DEDTC em diferentes concentrações, mas nos mesmos intervalos de tempo, resultando em variações não significativas somente nos tempos 24 horas ($p > 0,05$).

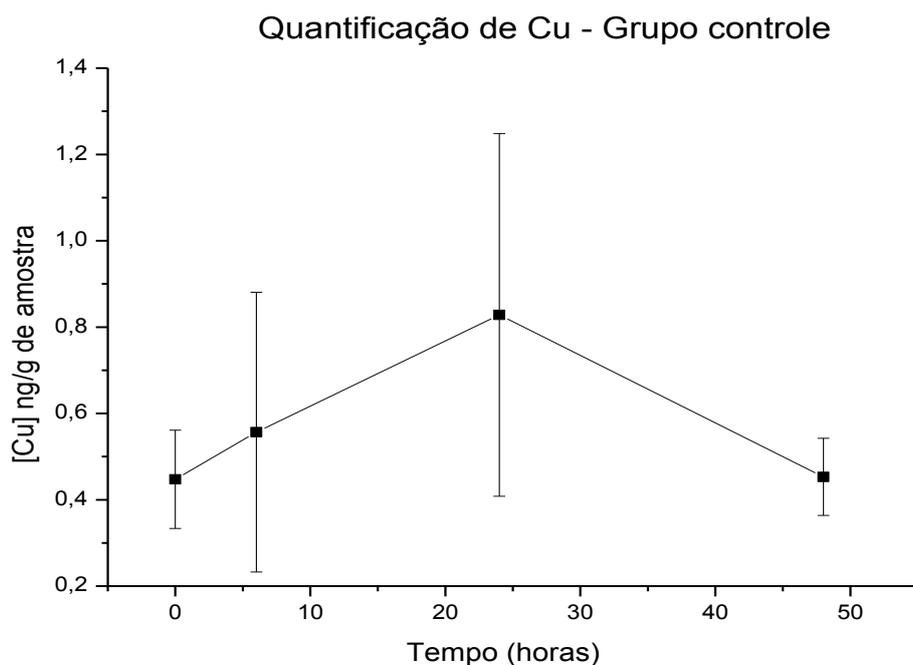


Figura 4: Quantificação de Cu total em células SH-SY5Y (ng de Cu/g de amostra) - Grupo Controle.

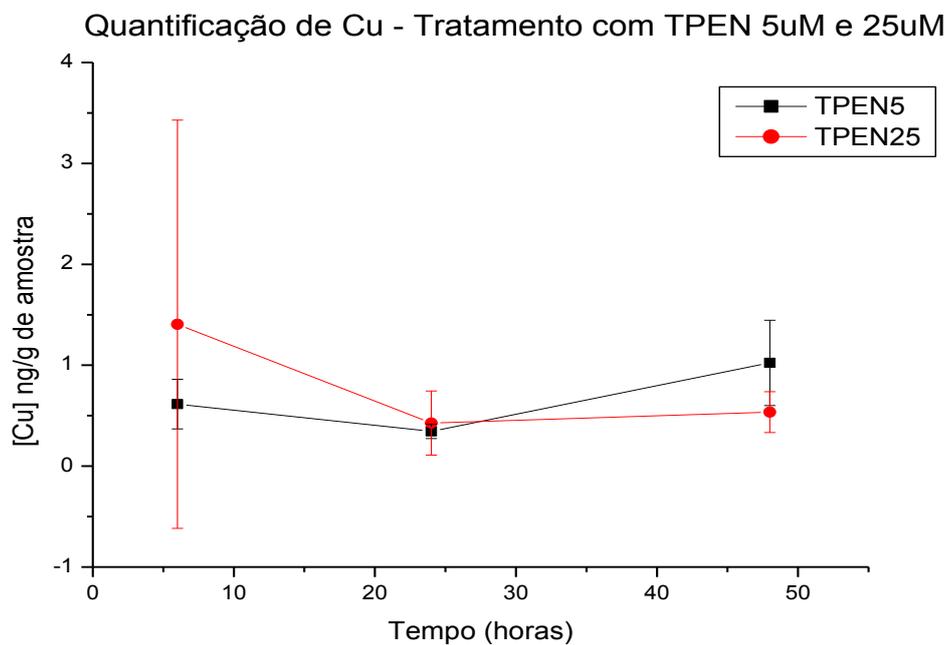


Figura 5: Quantificação de Cu total em células SH-SY5Y (ng de Cu/g de amostra) - Tratamentos TPEN 5 μ M e 25 μ M.

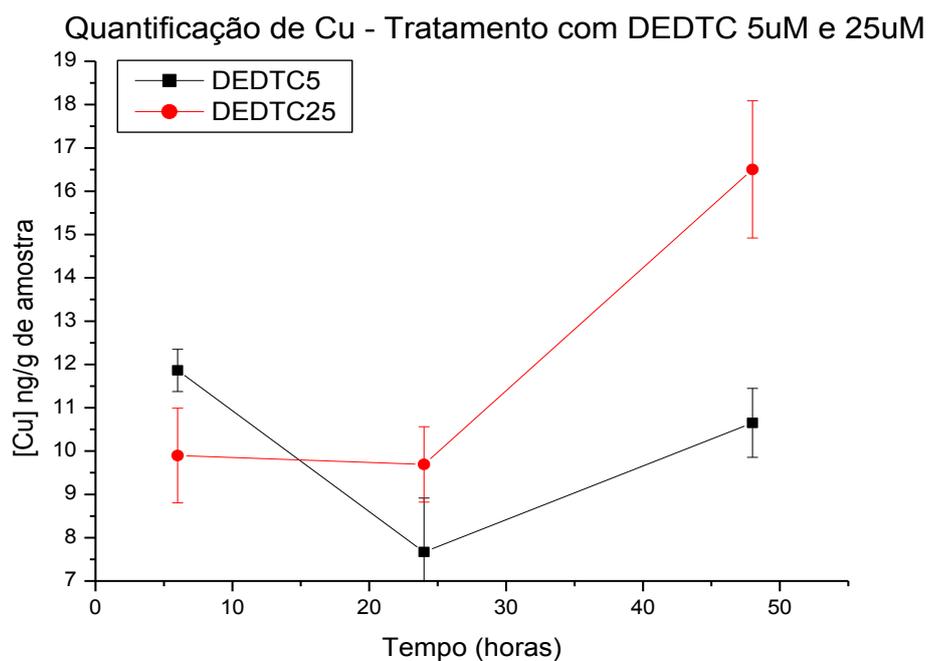


Figura 6: Quantificação de Cu total em células SH-SY5Y (ng de Cu/g de amostra) - Tratamentos DEDTC 5 μ M e 25 μ M.

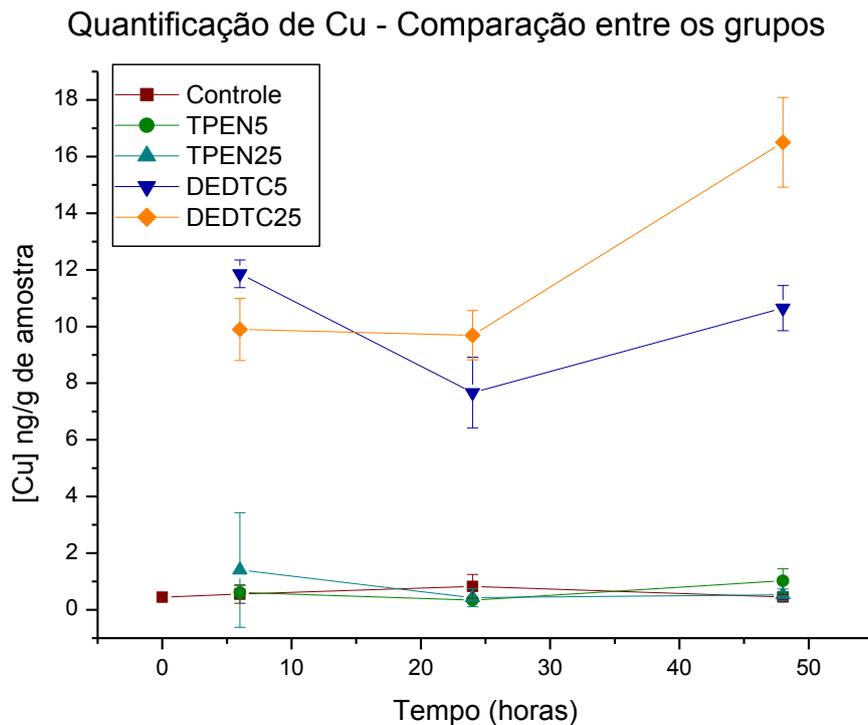
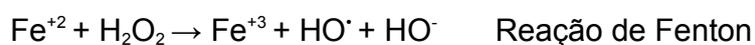


Figura 7: Quantificação de Cu total em células SH-SY5Y (ng de Cu/g de amostra) - Comparação entre os grupos.

Primeiramente nota-se a seletividade do reagente DEDTC para o cobre. Entretanto, ao contrário do que se esperava, a concentração do metal analisado aumenta em vez de diminuir, mostrando que o quelante se coordena a íons Cu presentes no meio de cultura e os leva para dentro da célula. As visualizações do cultivo celular feitas anteriormente ao preparo das amostras, também revelaram a perda da viabilidade celular ao longo do tempo e com o aumento da concentração, porém de uma forma mais significativa do que a vista nos tratamentos com TPEN.

Considerando as características do modelo celular SH-SY5Y, sua similaridade com células neuronais, e relevando o potencial tóxico do DEDTC, pode-se inferir que a perda da viabilidade celular deve-se principalmente à alta concentração de cobre intracelular. Como apresentado na figura 5, os níveis de cobre aumentam dentro de um intervalo de 6 horas, mas diminuem no intervalo de 24 horas; mostrando a tentativa de manter a homeostase desse elemento, bem como de controlar o estresse oxidativo causado pela presença de íons Cu^{2+} livres capazes de participar de reações redox e de quebras homolíticas similares às que os íons ferro participam (reação de Fenton, reação de Haber-Weiss), produzindo assim, espécies reativas de oxigênio (figura 8)^{52; 53}.

Sabe-se que o estresse oxidativo em níveis moderados, pode inibir ou ativar as vias apoptóticas; e níveis elevados à necrose⁵⁴, uma vez que o aumento excessivo da concentração destas espécies nocivas na mitocôndria leva ao seu rompimento⁵⁵, liberando seu conteúdo e permitindo que as mesmas destruam a membrana celular levando a morte por necrose⁵⁶.



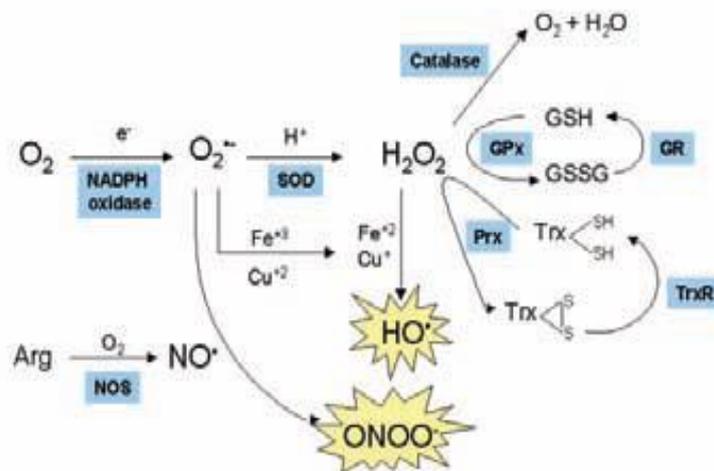


Figura 8: Esquema das principais reações e respectivas enzimas (em azul) envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio⁵⁷.

O aumento da concentração de cobre pode estar relacionado com a forma de tratar as células: a mistura quelante + meio de cultura é feita e em seguida adicionada ao cultivo celular, ou seja, o DEDTC se coordena ao cobre presente no meio e ao ter contato com o cultivo, atravessa sua membrana e o leva para dentro da célula. Sendo assim, a possibilidade de retirada do cobre intracelular por este composto, nas concentrações citadas não foi descartada. Testes similares foram feitos, porém substituindo o meio de cultura contendo cobre, por um meio de cultura “Cu-free”, revelando que de fato esses quelantes possuem a capacidade de permear a membrana celular e retirar o cobre intracelular, já que a quantificação resultou na concentração de Cu virtualmente igual a zero para todos os tratamentos (dados não apresentados).

Além disso, a análise da concentração de Zn também foi realizada e analisada de maneira minuciosa. No entanto, devido a limitações técnicas (facilidade de contaminação da amostra por Zn devido a sua alta disponibilidade no ambiente), os resultados não foram tão claros quanto para o cobre. Uma vez que o resultado da quantificação de zinco foi obtido em função da absorbância das amostras, os valores dos controles em 6, 24 e 48 horas foram adotados como referências em cada tempo e dando a eles o valor 100%, sendo assim, os valores de absorbância obtidos nos tratamentos foram calculados de forma proporcional aos controles. A Tabela 3 e gráficos, apresentam mais claramente a efetividade dos tratamentos na variação da homeostase de Zn. São apresentados os dados da quantificação do zinco total intracelular, em função do quelante utilizado, concentração do mesmo, e tempo de exposição.

Tabela 3: Valores de absorbância obtidos na quantificação de Zn total obtidos com espectrometria de absorção atômica por chama.

Amostra	Amostragem 1	Amostragem 2	Amostragem 3	Média	Desvio	Tempo (hs)	Valor proporcinal
Controle	0,054223	0,08515	0,13455	0,09130767	0,040516	6	100
Controle	0,038973	0,09705	0,14685	0,094291	0,053991	24	100
Controle	0,330423	0,2705	0,23198	0,27763433	0,049608	48	100
DEDTC 5 μ M	0,014663	0,10239	0,02104	0,046031	0,048912	6	50,4130723
DEDTC 5 μ M	0,003403	0,05979	0,03216	0,03178433	0,028195	24	33,7087668
DEDTC 5 μ M	0,258623	0,17019	0,15916	0,195991	0,054521	48	70,5932143
DEDTC 25 μ M	> Branco	0,02796	0,04606	0,03701	0,012799	6	40,5332886
DEDTC 25 μ M	>Branco	0,08695	0,19385	0,1404	0,07559	24	148,900743
DEDTC 25 μ M	0,316923	0,1	0,05416	0,15702767	0,140357	48	56,5591672
TPEN 5 μ M	0,007693	0,09475	0,0347	0,04571433	0,044561	6	50,0662595
TPEN 5 μ M	>Branco	0,13635	0,09025	0,1133	0,032598	24	120,15993
TPEN 5 μ M	0,359223	0,26598	0,17492	0,26670767	0,092154	48	96,0643676
TPEN 25 μ M	0,011913	0,02319	0,00484	0,01331433	0,009255	6	14,581835
TPEN 25 μ M	0,049123	0,01384	0,05955	0,04083767	0,023955	24	43,3102488
TPEN 25 μ M	0,026713	0,05122	0,2342	0,10404433	0,113382	48	37,4753123

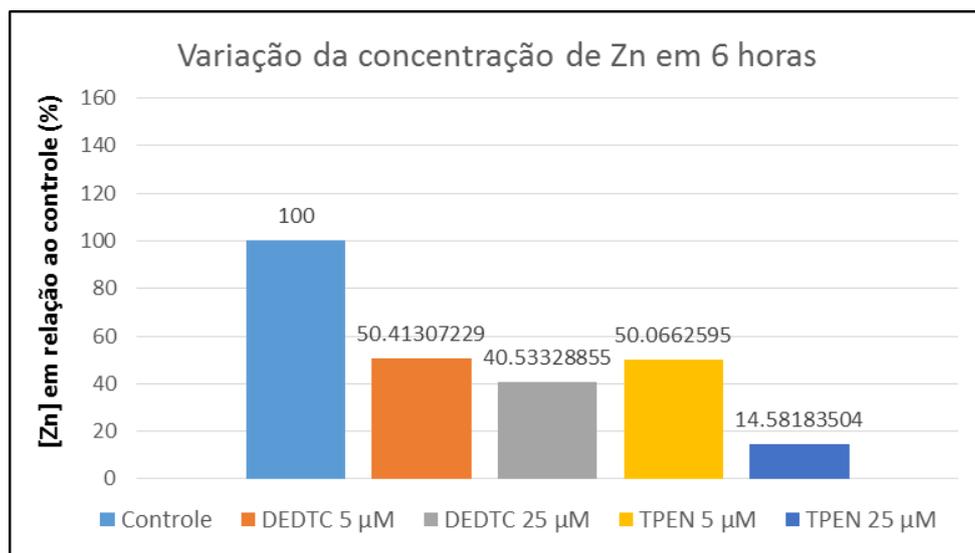


Figura 9: Quantificação de Zn total após 6 horas de tratamento.

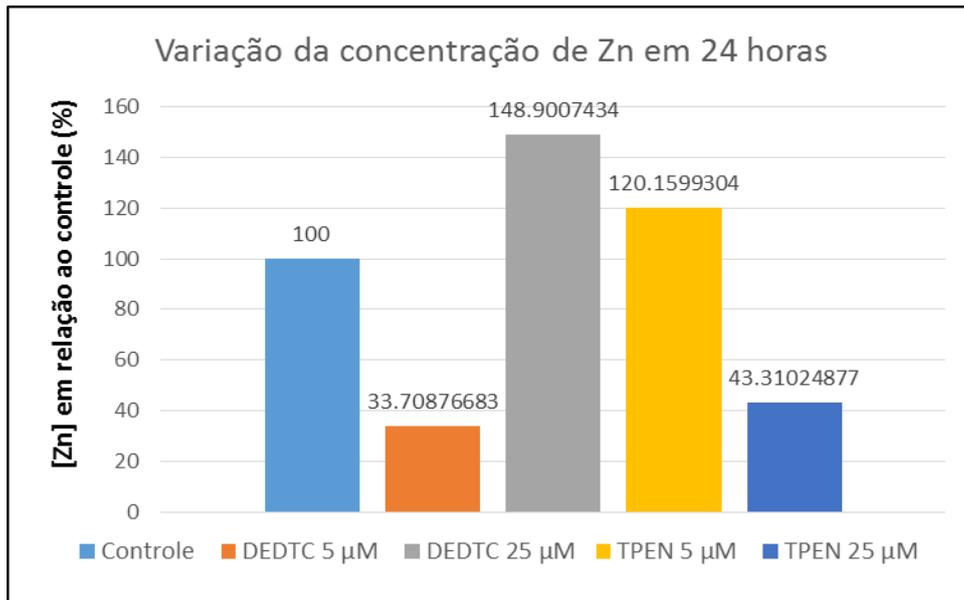


Figura 10: Quantificação de Zn total após 24 horas de tratamento.

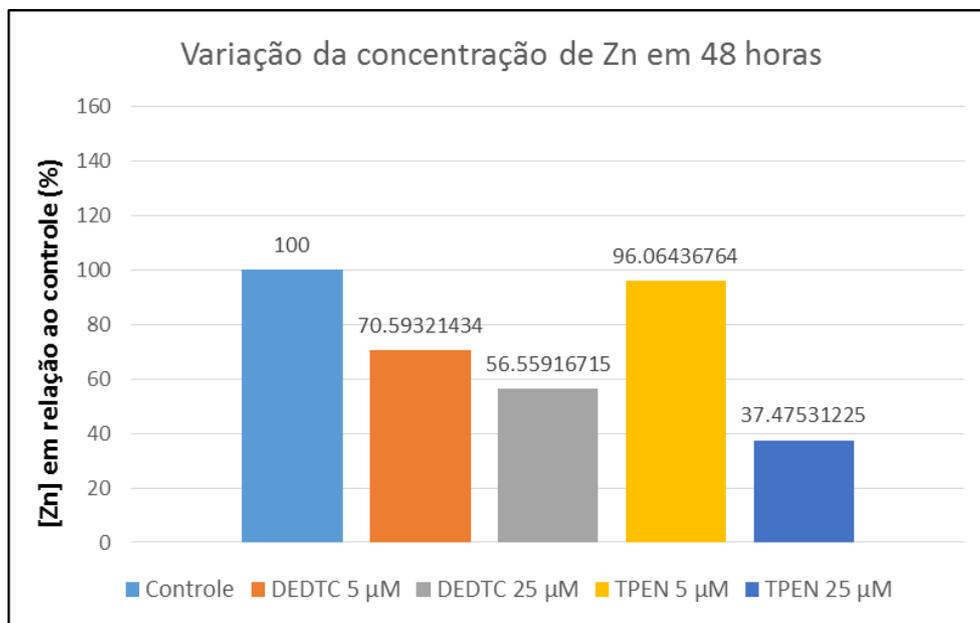


Figura 11: Quantificação de Zn total após 48 horas de tratamento.

Ao contrário do cobre, podemos observar que praticamente todos os tratamentos conseguiram diminuir a concentração de Zn total intracelular quando comparados com os controles nos respectivos períodos. Apenas nos tratamentos DEDTC 25 µM e TPEN 5 µM o efeito semelhante ao visto para o cobre é observado: a concentração aumenta em vez de diminuir. Esse efeito ocorre provavelmente da forma descrita previamente: os quelantes se coordenam ao Zn^{2+} do meio de cultura, e os levam para dentro da célula. Vemos também que o DEDTC também possui capacidade de modificar a homeostase de zinco, mesmo em baixas concentrações.

A oscilação da concentração de Zn ao longo do tempo se deve a tentativa celular, de atingir o equilíbrio metal-ligante dentro e fora das células, bem como o equilíbrio osmótico, a fim de manter a homeostase desse elemento. Além disso, o DEDTC apesar de ser capaz de se ligar ao Zn^{2+} , sua afinidade por esse íon é menor comparada com o Cu^{2+} . De forma que a dissociação do complexo DEDTC- Zn^{II} seja favorecida.

No caso do TPEN, apenas a maior concentração se mostrou eficiente para evitar estas oscilações. Concentrações baixas de TPEN, não são suficientes para evitar a dissociação do complexo TPEN- Zn^{II} ; uma vez que o TPEN também possui a capacidade de coordenar outros íons metálicos além do Zn^{2+} .

A perda de viabilidade celular relacionada ao zinco se deve principalmente à sua importância estrutural em diversas enzimas e proteínas, algumas envolvidas inclusive com o controle do estresse oxidativo^{58; 59; 60; 61}.

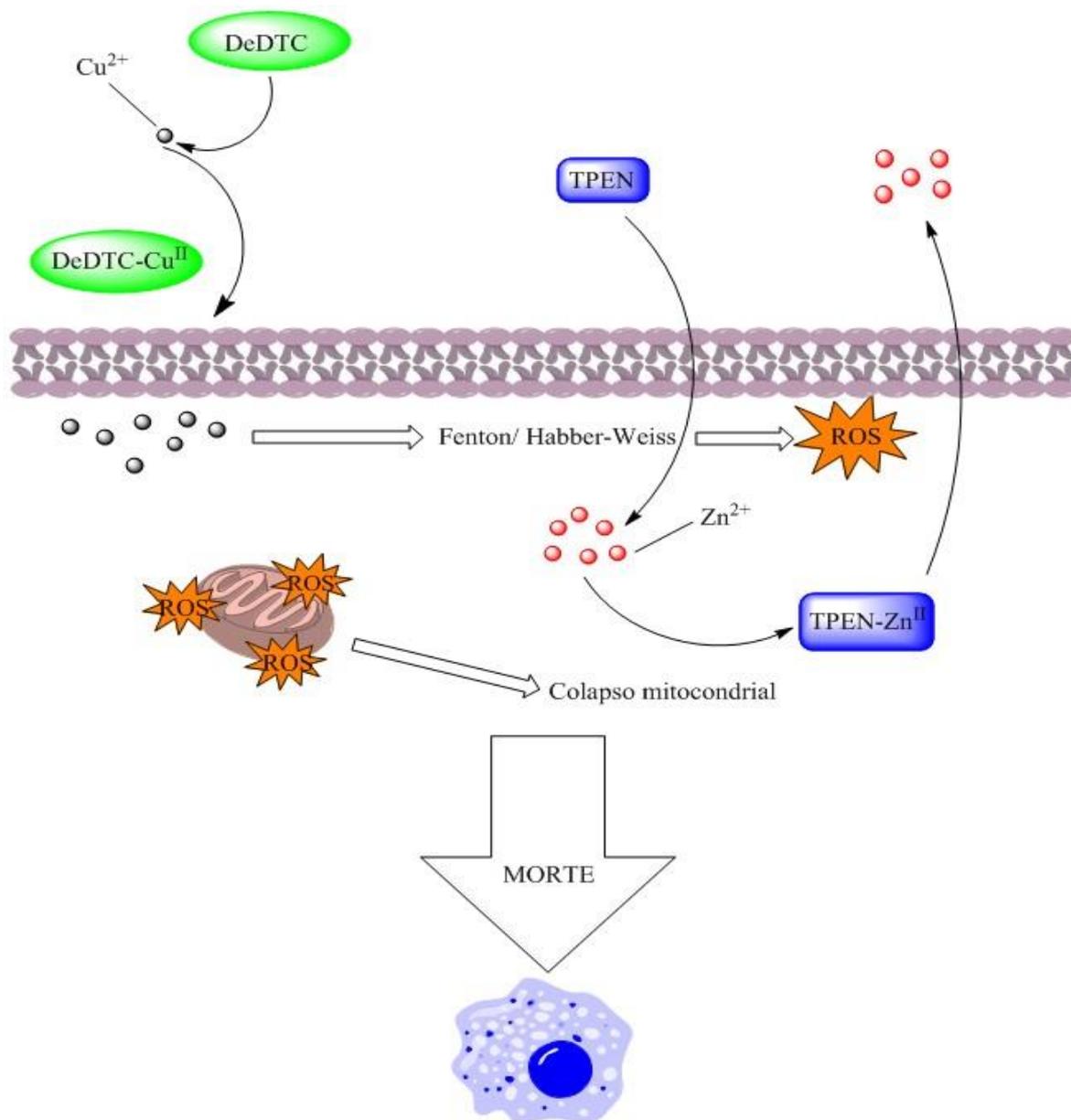


Figura 12: Esquemática da ação dos quelantes DEDTC e TPEN na variação da homeostase de Cu^{II} e Zn^{II} , e os mecanismos de morte celular ativados consequentemente.

5. CONCLUSÃO

Espécies reativas podem causar disfunções mitocondriais, ativação das células da glia, modificação e agregação de proteínas específicas, e mau funcionamento do sistema proteassomo; gerando um ciclo vicioso que acaba por desencadear a morte celular. Muitos destes processos estão envolvidos com o desenvolvimento e apresentados como sintomas das principais doenças neurodegenerativas. A alteração da homeostase de íon de metais de transição como o cobre podem participar do processo de formação dessas espécies oxidantes.

Foi possível verificar a capacidade que os quelantes selecionados possuem de variar a homeostase de Cu^{2+} e Zn^{2+} , bem como acompanhar para qual sentido o equilíbrio está sendo deslocado dependendo do quelante utilizado (DEDTC internaliza o cobre e o TPEN retira o zinco). A citotoxicidade do Cu vista em adição ao aumento da sua concentração, permite fortalecer a hipótese de que a morte celular foi resultado do estresse oxidativo, o que representa um passo na elucidação das causas/consequências da perda da estabilidade redox celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2007. xxxvi, 851 p., 8 p. of plates ISBN 019856869X (pbk.) 9780198568698 (pbk.) 0198568681 (hbk.) 9780198568681 (hbk.). Disponível em: <http://www.loc.gov/catdir/toc/ecip072/2006032592.html>.
- 2 BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 3, p. 205-14, Mar 2004. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031734> >.
- 3 HALLIWELL, B. *Drugs Aging*. n. 18, p. 685-716, 2001.
- 4 LEVIN, V. A. Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 682-684, 1980/06/01 1980. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jm00180a022> >.
- 5 FREDERICKSON, C. J.; KOH, J. Y.; BUSH, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 6, p. 449-62, Jun 2005. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15891778> >.
- 6 VALLEE, B. L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiol Rev**, v. 73, n. 1, p. 79-118, Jan 1993. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8419966> >.
- 7 BERG, J. M.; SHI, Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. **Science**, v. 271, n. 5252, p. 1081-5, Feb 23 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599083> >.
- 8 FREDERICKSON, C. J. et al. Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. **Brain Res**, v. 273, n. 2, p. 335-9, Aug 29 1983. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6616240> >.
- 9 FREDERICKSON, C. J. et al. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 20, n. 2, p. 91-103, 6// 1987. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165027087900422> >.
- 10 TOTTEY, S. et al. Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1138-42, Oct 23 2008. ISSN 0028-0836.
- 11 MACDONALD, R. S. The role of zinc in growth and cell proliferation. **J Nutr**, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1500s-8s, May 2000. ISSN 0022-3166.
- 12 OTEIZA, P. I.; MACKENZIE, G. G. Zinc, oxidant-triggered cell signaling, and human health. **Mol Aspects Med**, v. 26, n. 4-5, p. 245-55, Aug-Oct 2005. ISSN 0098-2997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115673> >.
- 13 SENSI, S. L.; YIN, H. Z.; WEISS, J. H. AMPA/kainate receptor-triggered Zn²⁺ entry into cortical neurons induces mitochondrial Zn²⁺ uptake and persistent mitochondrial dysfunction. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 10, p. 3813-8, Oct 2000. ISSN 0953-816X.

- 14 FREDERICKSON, C. J. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. **Int Rev Neurobiol**, v. 31, p. 145-238, 1989. ISSN 0074-7742.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2689380> >.
- 15 HARRISON, N. L.; GIBBONS, S. J. Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 8, p. 935-52, Aug 1994. ISSN 0028-3908.
- 16 SMART, T. G.; XIE, X.; KRISHEK, B. J. Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. **Prog Neurobiol**, v. 42, n. 3, p. 393-441, Feb 1994. ISSN 0301-0082.
- 17 BARCELOUX, D. G. Zinc. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 37, n. 2, p. 279-92, 1999. ISSN 0731-3810.
- 18 CHOI, D. W.; KOH, J. Y. Zinc and brain injury. **Annu Rev Neurosci**, v. 21, p. 347-75, 1998. ISSN 0147-006X.
- 19 YOKOYAMA, M.; KOH, J.; CHOI, D. W. Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons. **Neurosci Lett**, v. 71, n. 3, p. 351-5, Nov 21 1986. ISSN 0304-3940.
- 20 CHOI, D. W.; YOKOYAMA, M.; KOH, J. Zinc neurotoxicity in cortical cell culture. **Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 67-79, Jan 1988. ISSN 0306-4522.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3368058> >.
- 21 LEES, G. J. et al. The neurotoxicity of zinc in the rat hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 120, n. 2, p. 155-8, Dec 11 1990. ISSN 0304-3940.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705674> >.
- 22 CAPASSO, M. et al. Zinc dyshomeostasis: a key modulator of neuronal injury. **J Alzheimers Dis**, v. 8, n. 2, p. 93-108; discussion 209-15, Nov 2005. ISSN 1387-2877.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16308478> >.
- 23 MOCCHEGIANI, E. et al. Zinc homeostasis in aging: two elusive faces of the same "metal". **Rejuvenation Res**, v. 9, n. 2, p. 351-4, Summer 2006. ISSN 1549-1684.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16706668> >.
- 24 GALASSO, S. L.; DYCK, R. H. The role of zinc in cerebral ischemia. **Mol Med**, v. 13, n. 7-8, p. 380-7, Jul-Aug 2007. ISSN 1076-1551).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17622314> >.
- 25 NAKASHIMA, A. S.; DYCK, R. H. Zinc and cortical plasticity. **Brain Res Rev**, v. 59, n. 2, p. 347-73, Mar 2009. ISSN 0165-0173.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026685> >.
- 26 KOH, J. Y.; CHOI, D. W. Zinc toxicity on cultured cortical neurons: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. **Neuroscience**, v. 60, n. 4, p. 1049-57, Jun 1994. ISSN 0306-4522.
- 27 ZHANG, Y. et al. Intracellular zinc release, 12-lipoxygenase activation and MAPK dependent neuronal and oligodendroglial death. **Mol Med**, v. 13, n. 7-8, p. 350-5, Jul-Aug 2007. ISSN 1076-1551.

- 28 LECCIA, M. T. et al. Zinc protects against ultraviolet A1-induced DNA damage and apoptosis in cultured human fibroblasts. **Biol Trace Elem Res**, v. 69, n. 3, p. 177-90, Sep 1999. ISSN 0163-4984.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10468155> >.
- 29 RANA, U. et al. Zinc binding ligands and cellular zinc trafficking: apo-metallothionein, glutathione, TPEN, proteomic zinc, and Zn-Sp1. **J Inorg Biochem**, v. 102, n. 3, p. 489-99, Mar 2008. ISSN 0162-0134.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171589> >.
- 30 BRAY, T. M.; BETTGER, W. J. The physiological role of zinc as an antioxidant. **Free Radic Biol Med**, v. 8, n. 3, p. 281-91, 1990. ISSN 0891-5849.
- 31 CHRISTINE, C. W.; CHOI, D. W. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. **J Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 108-16, Jan 1990. ISSN 0270-6474.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1688929> >.
- 32 ZHAO, Y. J.; YANG, G. Y.; DOMINO, E. F. Zinc protoporphyrin, zinc ion, and protoporphyrin reduce focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 27, n. 12, p. 2299-303, Dec 1996. ISSN 0039-2499.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8969797> >.
- 33 HOLM, R. H.; KENNEPOHL, P.; SOLOMON, E. I. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. **Chem Rev**, v. 96, n. 7, p. 2239-2314, Nov 7 1996. ISSN 1520-6890.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848828> >.
- 34 VALENTINE, J. S.; GRALLA, E. B. Delivering copper inside yeast and human cells. **Science**, v. 278, n. 5339, p. 817-8, Oct 31 1997. ISSN 0036-8075.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9381192> >.
- 35 ROSSI, L. et al. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. **Neurochem Res**, v. 29, n. 3, p. 493-504, Mar 2004. ISSN 0364-3190.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15038597> >.
- 36 LAMB, A. L. et al. Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. **Nat Struct Biol**, v. 8, n. 9, p. 751-5, Sep 2001. ISSN 1072-8368.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11524675> >.
- 37 GLERUM, D. M.; SHTANKO, A.; TZAGOLOFF, A. SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 34, p. 20531-5, Aug 23 1996. ISSN 0021-9258.
- 38 KLOMP, L. W. et al. Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. **J Biol Chem**, v. 272, n. 14, p. 9221-6, Apr 4 1997. ISSN 0021-9258.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9083055> >.
- 39 DANIEL, K. G. et al. Copper storage diseases: Menkes, Wilsons, and cancer. **Front Biosci**, v. 9, p. 2652-62, Sep 1 2004. ISSN 1093-9946.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358588> >.

- 40 ROSENZWEIG, A. C. Copper delivery by metallochaperone proteins. **Acc Chem Res**, v. 34, n. 2, p. 119-28, Feb 2001. ISSN 0001-4842.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11263870> >.
- 41 MENKES, J. H. et al. A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. **Pediatrics**, v. 29, p. 764-79, May 1962. ISSN 0031-4005.
- 42 WILLIAMS, R. J. P. METAL IONS IN BIOLOGICAL SYSTEMS. **Biological Reviews**, v. 28, n. 4, p. 381-412, 1953. ISSN 1469-185X.
Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.1953.tb01384.x> >.
- 43 ROSSI, L. et al. Neurodegeneration in the animal model of Menkes' disease involves Bcl-2-linked apoptosis. **Neuroscience**, v. 103, n. 1, p. 181-8, 2001. ISSN 0306-4522.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311799> >.
- 44 SARKAR, B.; LINGERTAT-WALSH, K.; CLARKE, J. T. Copper-histidine therapy for Menkes disease. **J Pediatr**, v. 123, n. 5, p. 828-30, Nov 1993. ISSN 0022-3476.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229500> >.
- 45 CARRI, M. T. et al. Impaired copper binding by the H46R mutant of human Cu,Zn superoxide dismutase, involved in amyotrophic lateral sclerosis. **FEBS Lett**, v. 356, n. 2-3, p. 314-6, Dec 19 1994. ISSN 0014-5793.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7805862> >.
- 46 FURUKAWA, Y. et al. Complete loss of post-translational modifications triggers fibrillar aggregation of SOD1 in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. **J Biol Chem**, v. 283, n. 35, p. 24167-76, Aug 29 2008. ISSN 0021-9258.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552350> >.
- 47 BULL, P. C. et al. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. **Nat Genet**, v. 5, n. 4, p. 327-37, Dec 1993. ISSN 1061-4036.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8298639> >.
- 48 ROSSI, L. et al. Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase activity is higher in Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. **Neurosci Lett**, v. 329, n. 2, p. 137-40, Aug 30 2002. ISSN 0304-3940.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165396> >.
- 49 SQUITTI, R. et al. d-penicillamine reduces serum oxidative stress in Alzheimer's disease patients. **Eur J Clin Invest**, v. 32, n. 1, p. 51-9, Jan 2002. ISSN 0014-2972.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11851727> >.
- 50 BALIGA, R.; UEDA, N.; SHAH, S. V. Increase in bleomycin-detectable iron in ischaemia/reperfusion injury to rat kidneys. **Biochem J**, v. 291 (Pt 3), p. 901-5, May 1 1993. ISSN 0264-6021.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683877> >.
- 51 MATIAS, A. C. et al. Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in neuroblastoma cells by raising the intracellular copper level, triggering cytochrome c release and caspase activation. **Toxicol In Vitro**, v. 27, n. 1, p. 349-57, Feb 2013. ISSN 0887-2333.

- 52 CERCHIARO, G. et al. Isatin-Schiff base copper(II) complexes and their influence on cellular viability. **J Inorg Biochem**, v. 99, n. 7, p. 1433-40, Jul 2005. ISSN 0162-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878622> >.
- 53 FILOMENI, G. et al. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. **Cancer Res**, v. 63, n. 18, p. 5940-9, Sep 15 2003. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522920> >.
- 54 FERNANDES, R. S.; COTTER, T. G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. **Biochem Pharmacol**, v. 48, n. 4, p. 675-81, Aug 17 1994. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8080440> >.
- 55 FILOMENI, G. et al. Pro-apoptotic activity of novel Isatin-Schiff base copper(II) complexes depends on oxidative stress induction and organelle-selective damage. **J Biol Chem**, v. 282, n. 16, p. 12010-21, Apr 20 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17327230> >.
- 56 DE AVELLAR, I. G. et al. Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage. **Biochim Biophys Acta**, v. 1675, n. 1-3, p. 46-53, Nov 18 2004. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15535966> >.
- 57 BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G. D.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, p. 1352-1360, 2006. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000600034&nrm=iso >.
- 58 SORENSEN, M. B. et al. Chelation of intracellular zinc ions affects human sperm cell motility. **Mol Hum Reprod**, v. 5, n. 4, p. 338-41, Apr 1999. ISSN 1360-9947. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10321805> >.
- 59 CANZONIERO, L. M. et al. Membrane-permeant chelators can attenuate Zn²⁺-induced cortical neuronal death. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 3, p. 420-8, Sep 2003. ISSN 0028-3908.
- 60 COUDRAY, C. et al. Zinc deficiency, ethanol, and myocardial ischemia affect lipoperoxidation in rats. **Biol Trace Elem Res**, v. 30, n. 2, p. 103-18, Aug 1991. ISSN 0163-4984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1723883> >.
- 61 HASHEMI, M. et al. Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. **Eur J Pharmacol**, v. 557, n. 1, p. 9-19, Feb 14 2007. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169355> >.