

## DANOS OXIDATIVOS E NEURODEGENERAÇÃO: O QUÊ APRENDEMOS COM ANIMAIS TRANSGÊNICOS E NOCAUTES?

Lívea Fujita Barbosa\*, Marisa H.G. de Medeiros e Ohara Augusto

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, 05508-900, São Paulo - SP

Recebido em 6/6/05; aceito em 5/1/06; publicado na web em 11/8/06

OXIDATIVE DAMAGE AND NEURODEGENERATION. WHAT HAVE WE LEARNED FROM TRANSGENIC AND KNOCKOUT ANIMALS? Accumulated evidence indicates that oxidative stress plays a role in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer, Parkinson and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Here, we emphasize the results provided by the technology of genetically modified animals. Studies with transgenic and knockout mice have allowed great advances in the research of oxidative stress in general and in the central nervous system, and are pointing to potential targets for the development of new drugs and therapies to disrupt the cycle of events that lead to neuronal death. Thus, genetically modified animals are a valuable tool for the comprehension of human diseases, including neurodegenerative ones.

Keywords: oxidative damage; neurodegeneration; transgenic and knockout mice.

### INTRODUÇÃO

Atualmente, devido ao aumento da expectativa de vida da população, existe um crescente interesse no estudo de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). 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 de estresse oxidativo.

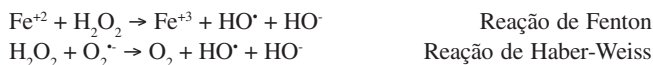
O estresse oxidativo é definido como a situação na qual a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a à morte por apoptose ou necrose<sup>1</sup>.

Marcadores de estresse oxidativo, como carbonilas protéicas, nitro-tirosina, produtos de peroxidação lipídica e bases de DNA oxidadas, são detectados em concentrações aumentadas em tecidos de pacientes e animais modelo de Alzheimer, Parkinson e ELA<sup>1-3</sup>. Além disso, diversos trabalhos relatam níveis alterados da expressão de enzimas antioxidantes, como tiorredoxina<sup>4,6</sup>, tiorredoxina redutase<sup>4</sup>, peroxirredoxina<sup>6,7</sup>, glutathione peroxidase<sup>7</sup>, CuZn-SOD<sup>6,8</sup> e, também, ferritina<sup>6</sup> e transferrina<sup>9</sup>.

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. Grandes avanços nesta área foram alcançados graças a uma valiosa ferramenta: a tecnologia de camundongos geneticamente modificados. As contribuições feitas por esta tecnologia são enfatizadas neste trabalho através de uma revisão dos resultados obtidos com grande número de camundongos transgênicos e nocautes no estudo da regulação do estresse oxidativo no SNC.

### Espécies reativas e defesas antioxidantes

O metabolismo aeróbio apresenta uma série de reações que podem formar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Elétrons podem vazar da cadeia de transporte de elétrons reduzindo o O<sub>2</sub> a ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). O superóxido também pode ser formado pela enzima NADPH oxidase, presente em diversas células. Em níveis elevados, o superóxido pode mobilizar o ferro da ferritina. A dismutação do O<sub>2</sub><sup>-</sup> catalisada pelas superóxidos dismutases (SOD) produz peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Níveis elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem liberar íons de ferro de heme proteínas, como hemoglobina e citocromo. O ferro (II) reduz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a radical hidroxila (HO<sup>•</sup>) (reação de Fenton) e catalisa a formação de HO<sup>•</sup> pela reação de Haber-Weiss. O HO<sup>•</sup> é o radical mais reativo encontrado *in vivo*. Ele é capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA.

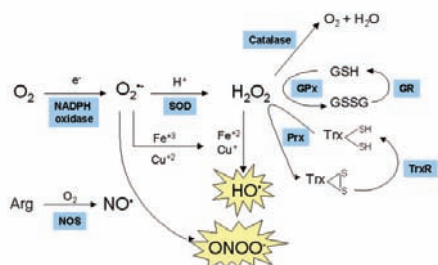


O óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) é um radical pouco reativo, essencial para a vasorregulação e neurotransmissão, formado pelas enzimas NO sintases (NOS). Em excesso, NO<sup>•</sup> pode inibir a citocromo oxidase, levando ao aumento de vazamento de elétrons e formação de superóxido. NO<sup>•</sup> pode reagir com O<sub>2</sub><sup>-</sup> formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). A geração de peroxinitrito *in vivo* pode levar à oxidação e nitração de lipídios, DNA e proteínas.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é eliminado pelas enzimas catalase, glutathione peroxidase e peroxirredoxinas, as quais atuam em conjunto com as SODs. A catalase dismuta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a água e oxigênio. A glutathione peroxidase (GPx) remove H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela oxidação de glutathione (GSH) ao dímero GSSG. Este processo é complementado pela enzima glutathione redutase (GR), a qual recicla GSSG a GSH. Já as peroxirredoxinas (Prx) utilizam a proteína tiorredoxina (Trx) (a qual contém dois grupos tióis) como substrato. A tiorredoxina redutase (TrxR), converte a tiorredoxina oxidada de volta a sua forma reduzida (Figura 1).

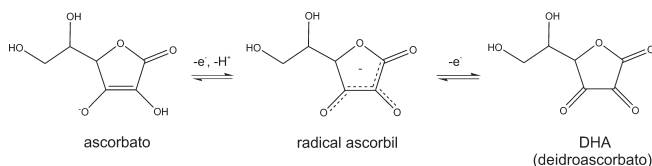
Ascorbato (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) são dois antioxidantes não protéicos obtidos da dieta. O ascorbato reage com espécies ferril e radicais de aminoácidos, inibindo lesões oxidativas

\*e-mail: livea@iq.usp.br

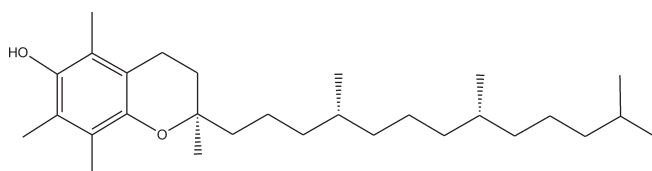


**Figura 1.** Esquema das reações e respectivas enzimas (em azul) envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. NOS: NO sintase; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutatona peroxidase; Prx: peroxirredoxinas; GR: glutatona redutase; TrxR: tiorredoxina redutase; Trx: tiorredoxina; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada (dímero)

induzidas por heme proteínas e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ele também seqüestra O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, LO<sup>•</sup>, LOO<sup>•</sup>, HO<sup>•</sup> e espécies derivadas de peroxinitrito<sup>1</sup> (Figura 2). O grupo -OH fenólico do α-tocoferol rapidamente seqüestra radicais LOO<sup>•</sup>, resultando na formação de radicais tocoferil, os quais têm uma capacidade muito menor de propagar a peroxidação lipídica. O radical tocoferil é reduzido *in vivo* pela reação direta com ascorbato ou ubiquinol, ou por mecanismos enzimáticos (Figura 3).



**Figura 2.** Mecanismo de oxidação do ascorbato por espécies radiculares



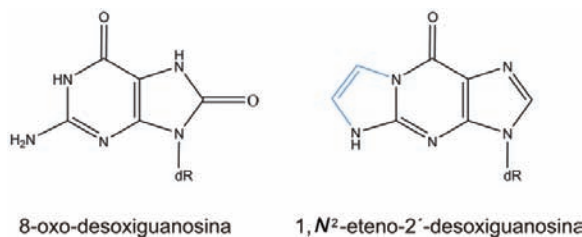
**Figura 3.** Estrutura do α-tocoferol

Existem diversos mecanismos biológicos para seqüestrar metais de transição como Fe<sup>+2</sup> e Cu<sup>+</sup>, prevenindo sua participação em reações redox indesejáveis. No plasma, todos os íons de ferro estão complexados a transferrinas, e os íons de cobre, a ceruloplasmina. Dentro das células, o excesso de íons de ferro está estocado em ferritina e o excesso de íons de cobre em metalotioneínas. Um estoque intracelular de íons de ferro e cobre livre existe no interior de vacúolos isolados do resto da célula<sup>10</sup>.

Como a extensa gama de defesas antioxidantes do corpo humano não é capaz de prevenir completamente as lesões a biomoléculas, tecidos e fluidos de indivíduos saudáveis apresentam níveis basais de produtos finais de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (como nitrotirosina e carbonilas protéicas)<sup>3</sup>. O DNA isolado de indivíduos saudáveis também contém níveis basais de bases modificadas como 8-oxo-desoxiguanosina (produto de reação com radical HO<sup>•</sup>)<sup>1</sup>, além de produtos de alquilação de bases como eteno adutos (ex: 1,N<sup>2</sup>-eteno-2'-desoxiguanosina), gerados pela reação de bases com aldeídos finais da peroxidação lipídica<sup>11</sup> (Figura 4).

**Cérebro, neurônio e excitotoxicidade**

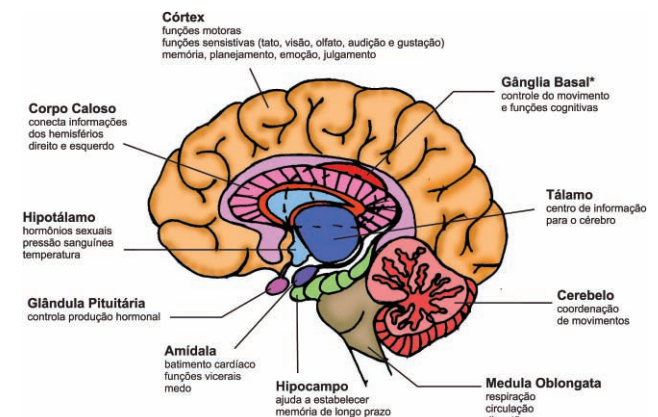
As principais estruturas do cérebro e um resumo de suas funções estão ilustrados na Figura 5. O cérebro adulto contém cerca de 10<sup>11</sup>-



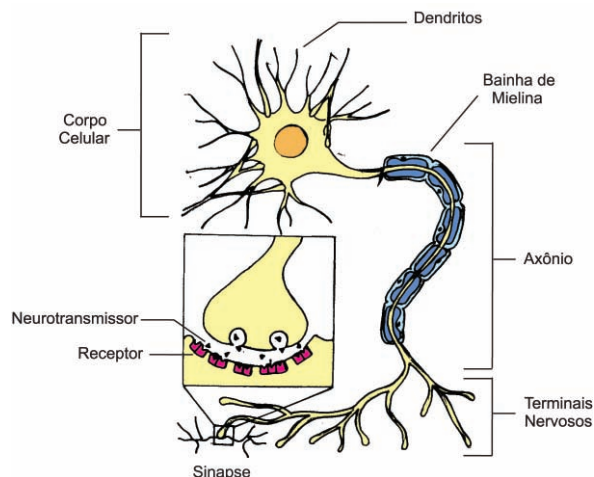
**Figura 4.** Estrutura de desoxiguanosina modificada por oxidação (8-oxo-desoxiguanosina) e por alquilação (1,N<sup>2</sup>-eteno-2'-desoxiguanosina)

10<sup>12</sup> neurônios e, no mínimo, o dobro de células da glia (microglia, astrócitos e oligodendrócitos) para suporte e proteção. Os oligodendrócitos sintetizam e mantêm a bainha de mielina que isola os axônios. Os astrócitos fornecem aos neurônios suporte estrutural para auxiliar no metabolismo e proteção. A microglia é composta por macrófagos residentes que atuam na defesa imune do cérebro.

Os neurônios consistem de um corpo celular, dendritos (pequenas ramificações do corpo celular), um axônio alongado e terminais nervosos - os quais formam parte de uma sinapse (Figura 6). A sinapse é a comunicação entre neurônios, mediada por neurotransmissores (dopamina, noradrenalina, acetilcolina, serotonina, glicina e



**Figura 5.** Principais estruturas do cérebro e suas funções. \*A gânglia basal é formada por: striatum, substância negra e núcleo subtalâmico



**Figura 6.** Estrutura do neurônio e, em destaque, a representação de uma sinapse

glutamato)<sup>12</sup>. Durante o processo fisiológico normal da transmissão sináptica, o neurônio que recebeu o estímulo inicial é despolarizado e libera neurotransmissores pelas terminações nervosas, os quais cruzam a fenda sináptica e se ligam a receptores no neurônio pós-sináptico, desencadeando sua despolarização e propagando o estímulo. A despolarização é transitória, sendo terminada rapidamente pela remoção do neurotransmissor pelos sistemas de captação das células da glia e terminações nervosas<sup>13</sup>.

O glutamato é o principal neurotransmissor no cérebro de mamíferos, responsável por um terço de todas as sinapses no SNC<sup>13</sup>. Sob certas condições, como insuficiência na captação de glutamato, introdução de glutamato por outra via, ou despolarização prolongada da terminação nervosa, o glutamato pode se acumular na fenda sináptica e desencadear um processo excitotóxico. Concentrações excitotóxicas de glutamato causam a despolarização excessiva do neurônio pós-sináptico e, conseqüentemente, distúrbios da homeostasia iônica e energética, ativação de enzimas líticas mediada por  $Ca^{+2}$ , geração de radicais livres, lesão mitocondrial e edema osmótico, podendo levar à lise celular e morte<sup>14,15</sup>.

### O risco de lesões oxidativas no sistema nervoso central

Todos os tecidos humanos sofrem lesões oxidativas, porém, por diversas razões, o sistema nervoso central é especialmente sensível. Primeiramente, o SNC tem capacidade reduzida de regeneração celular em comparação com outros órgãos. Isto porque os neurônios de um indivíduo adulto são células pós-mitóticas, ou seja, não se replicam mais<sup>2</sup>. Como a reposição de um neurônio é um processo muito mais lento que a regeneração de outros tipos celulares, a morte de neurônios induzida por toxinas ou pelo processo normal de envelhecimento pode causar sérios comprometimentos ao sistema nervoso. Em segundo lugar, características intrínsecas do SNC e de seu metabolismo, as quais serão abordadas abaixo, o tornam mais propenso a danos causados por espécies oxidantes.

O consumo de oxigênio ( $O_2$ ) pelo cérebro é muito elevado. Em humanos, o cérebro é responsável por cerca de 20% do consumo total de  $O_2$ . A grande demanda por  $O_2$  deve-se ao alto consumo de ATP pelos neurônios, para manter o potencial de membrana e o fluxo de neurotransmissores ( $4 \times 10^{21}$  ATP/min). Isto significa que os neurônios dependem muito da eficiência das mitocôndrias. Todavia, elétrons podem vazar da cadeia de transporte de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, podem danificar a mitocôndria. Em contrapartida, a mitocôndria lesada apresenta maior vazamento de elétrons e, conseqüentemente, produz mais EROs, gerando um ciclo vicioso<sup>12</sup>.

Os neurônios utilizam extensamente o glutamato como neurotransmissor. Morte celular e disfunções metabólicas podem causar aumento de glutamato extracelular, elevando a concentração de cálcio ( $Ca^{+2}$ ) intracelular a níveis patológicos. Isto resulta na superativação da fosfolipase  $A_2$  e da óxido nítrico sintase (NOS) neuronal, levando à liberação de ácidos graxos e produção elevada de óxido nítrico ( $NO$ )<sup>1</sup>.

Muitos neurotransmissores são oxidáveis. Dopamina, seu precursor levedopa e noradrenalina reagem com  $O_2$  gerando o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e quinonas e semiquinonas reativas, que podem depletar as reservas de glutatona (GSH) e se ligar em grupos  $-SH$  de proteínas. O nível de dopamina em neurônios estriatais é estimado em 50 mM, e o nível de noradrenalina em neurônios noradrenérgicos, em 0,6 mM. A oxidação dos neurotransmissores dopamina, serotonina e noradrenalina por monoamina oxidases (flavoproteínas localizadas na membrana mitocondrial externa) é um dos principais mecanismos de geração de  $H_2O_2$  no cérebro<sup>1</sup>.

Muitas áreas do cérebro possuem grande quantidade de íons de

ferro. A maior parte dele está estocada em ferritina e uma parte menor, no sítio ativo de enzimas. No fluido cérebro espinhal, os íons de ferro estão complexados a transferrina, a qual se encontra totalmente saturada. Lesões no cérebro prontamente resultam na liberação de íons ferro capazes de catalisar a formação de radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), a peroxidação lipídica e a oxidação de neurotransmissores.

Os lipídios das membranas neuronais contêm ácidos graxos altamente insaturados, especialmente ácido docosaenoico ( $C_{22:6}$ ). Estes ácidos graxos poliinsaturados são extremamente susceptíveis à peroxidação lipídica, a qual resulta no acúmulo de hidroperóxidos de lipídio (LOOH). Estes podem ser degradados na presença de íons de ferro ou cobre gerando radicais alcóxila ( $LO^{\cdot}$ ) e peróxila ( $LOO^{\cdot}$ ). Os radicais  $LO^{\cdot}$  e  $LOO^{\cdot}$  podem danificar proteínas de membrana e também atacar outras moléculas de lipídio, propagando a peroxidação lipídica. Os produtos finais da decomposição de LOOH são inúmeros e incluem aldeídos altamente citotóxicos, como dialdeído malônico (MDA), acroleína, 4-hidroxi-2-*trans*-nonenal (HNE)<sup>1</sup> e *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE)<sup>16</sup>. HNE parece especialmente citotóxico para células neuronais, já que em alguns animais modelo, a formação de HNE precede a morte destas células<sup>1</sup>.

Muitas evidências sugerem que a geração de oxidantes não resulta simplesmente de acidentes do metabolismo aeróbico, mas também do processo ativo de defesa imune do SNC. Embora essenciais para a sobrevivência, estes processos podem ser ativados impropriamente causando lesões aos neurônios e promovendo a neurodegeneração. Algumas das células da glia encontradas no cérebro são macrófagos residentes chamados microglia. Quando ativada, a microglia produz  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e  $NO^{\cdot}$ <sup>3</sup>.

Os níveis de catalase são baixos em todas as regiões do cérebro (11 unidades atividade/mg proteína no cérebro contra 1300 unidades atividade/mg proteína nos eritrócitos e no fígado), sendo um pouco mais elevados no hipotálamo e *substantia nigra* que no córtex ou no cerebelo<sup>12</sup>. No cérebro, a catalase está localizada em microperoxissomos e, provavelmente, não interage eficientemente com a  $H_2O_2$  gerada em outros compartimentos subcelulares, como por ex. na mitocôndria<sup>1</sup>.

Os baixos níveis de catalase podem não comprometer significativamente os mecanismos de defesa antioxidantes do cérebro, já que uma gama de outros sistemas de defesa antioxidante está presente. Todas as áreas do cérebro contêm as enzimas antioxidantes CuZn-superóxido dismutase (SOD), Mn-SOD, glutatona peroxidase, glutatona redutase, tioredoxinas e tioredoxina redutase. Antioxidantes de baixo peso molecular também são encontrados no cérebro: concentrações milimolares de GSH, concentrações de ascorbato maiores que no plasma ( $\sim 150 \mu M$  em humanos), e  $\alpha$ -tocoferol. Neurônios e glia possuem um sistema de transporte ativo que concentra o ascorbato intracelular em concentrações milimolares. O  $\alpha$ -tocoferol, por ser lipossolúvel, aloja-se nas membranas, atuando como um poderoso inibidor da peroxidação lipídica<sup>1</sup>.

O SNC também contém enzimas de reparo de biomoléculas lesadas, como fosfolipases, o sistema ubiquitina-proteassomo para degradar proteínas anormais (incluindo aquelas com lesões oxidativas) e todas as enzimas conhecidas de reparo do DNA. A barreira hemato-encefálica é outro importante mecanismo de defesa do cérebro. O endotélio dos pequenos vasos sanguíneos cerebrais é muito menos permeável a moléculas que outros endotélios, e mais resistente a estresse oxidativo que o resto do cérebro (a microvasculatura de ratos é rica em GSH, glutatona peroxidase, glutatona redutase e catalase)<sup>1</sup>.

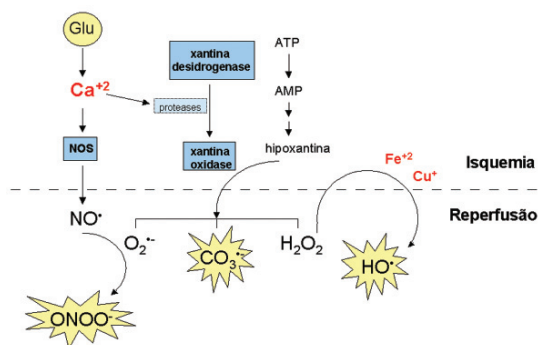
### Isquemia-reperusão e estresse oxidativo

Isquemia ou hipóxia é a interrupção no fornecimento de  $O_2$  às células. *In vivo*, a isquemia cerebral global ocorre quando o supri-

mento de  $O_2$  para todo o cérebro cessa, devido à asfixia, infarto do miocárdio ou envenenamento por CO. Já a isquemia local é causada *in vivo* pelo entupimento ou ruptura de artérias. Os métodos mais utilizados para provocar isquemia cerebral em camundongos baseiam-se na oclusão temporária de uma artéria cerebral por diferentes técnicas, como coagulação elétrica, sutura com nylon, oclusão com fio de nylon e constrição com “clips”.

Tecidos que sofreram isquemia sobrevivem por tempos variados, sendo o músculo esquelético o mais resistente e o cérebro, o mais sensível. Durante a isquemia, os níveis de ATP caem e o AMP é degradado causando o acúmulo de hipoxantina. Os níveis de  $Ca^{+2}$  intracelular aumentam, ativando proteases, fosfolipases e NOS. A enzima xantina desidrogenase pode ser convertida à xantina oxidase pela oxidação de grupos  $-SH$  ou pela ação de proteases.

Tecidos que sofreram isquemia por tempos relativamente curtos (no máximo 30 min para neurônios) podem ser recuperados pela reperfusão com sangue, reintroduzindo  $O_2$  e nutrientes. Porém, a reintrodução de  $O_2$  acaba causando insultos mediados por EROs. A NOS ativada pelo alto nível de  $Ca^{+2}$  resulta na formação de óxido nítrico e oxidantes dele derivados. A xantina oxidase gerada durante a hipóxia oxida a hipoxantina acumulada gerando radical  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ <sup>12</sup>, peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)<sup>17</sup> e ânion radical carbonato ( $CO_3^{\cdot-}$ )<sup>18</sup>. A isquemia também pode causar a liberação de metais de transição, promovendo a formação de HO<sup>•</sup>, e o dano de mitocôndrias, aumentando o “vazamento” de elétrons. No cérebro, ainda pode-se incluir como consequência da isquemia aumento do nível de glutamato (promovendo excitotoxicidade) e oxidação de neurotransmissores<sup>12</sup> (Figura 7).



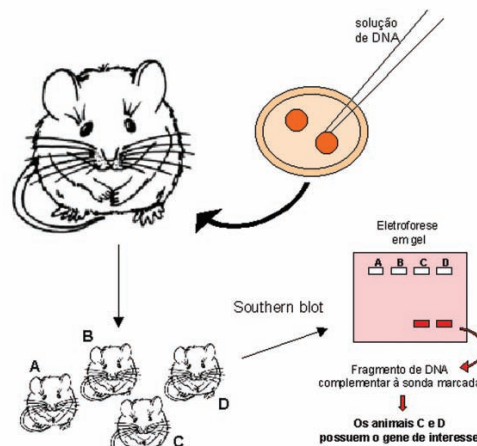
**Figura 7.** Mecanismo proposto para a formação de espécies reativas durante o processo de isquemia – reperfusão. Durante a isquemia, a NO sintase (NOS) é ativada, e a xantina desidrogenase é convertida à xantina oxidase. Com a reintrodução de  $O_2$  (reperfusão), estas duas enzimas produzem espécies reativas

### Camundongos transgênicos e nocautes

Animais transgênicos são aqueles que tiveram seu genoma alterado pelo recebimento de um gene de outra espécie. A tecnologia dos transgênicos permite inserir proteínas exógenas de interesse em camundongos e examinar as consequências. Em princípio, a tecnologia dos transgênicos pode ser aplicada a qualquer espécie. Contudo, os camundongos são os mais utilizados, por serem baratos, muito férteis, amadurecerem rápido e possuem curta gestação<sup>19</sup>.

A técnica mais comum consiste na microinjeção direta do gene de interesse no pró-núcleo de ovos fertilizados. Uma micropipeta de vidro contendo a solução de DNA (~2 pmol) é introduzida no pró-núcleo de um ovo fertilizado. Os embriões são cultivados e reimplantados em uma fêmea. Os filhotes que receberam o gene de interesse (no máximo 40% dos filhotes) são identificados por “Southern Blot”: o DNA dos animais é extraído e fragmentado; os

fragmentos de DNA são separados por eletroforese em gel, transferidos para uma membrana, e o gene de interesse é identificado por uma sonda marcada de RNA ou DNA complementar<sup>20</sup> (Figura 8).



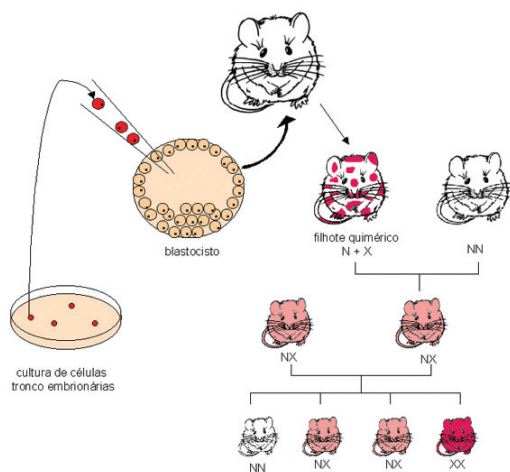
**Figura 8.** Técnica de transferência do gene de interesse por microinjeção. O DNA é introduzido em um ovo fertilizado, o qual é reimplantado na fêmea. Os filhotes transgênicos são identificados por “Southern blot”

Os genes de interesse podem ser preparados de maneira a se integrar ao cromossomo por recombinação ou permanecerem na forma de plasmídios, sendo replicados independentemente do DNA cromossomal. O DNA do gene de interesse deve estar acompanhado de um promotor e outros componentes necessários para uma expressão eficiente. O promotor pode ser inespecífico, promovendo a expressão do gene em todos ou na maioria dos tecidos. Ou pode-se utilizar um promotor específico para determinados tecidos<sup>19</sup>.

Vírus também podem ser usados para carregar o DNA para dentro da célula. Os retrovírus são os mais adequados para uma transformação estável de células de mamífero, já que o DNA viral é eficientemente integrado no genoma hospedeiro e não provoca a lise da célula<sup>20</sup>. Esta tecnologia permite a transferência direta de um gene a uma região selecionada do cérebro ou a um tipo específico de neurônio de camundongos, e permite induzir a expressão do gene em qualquer momento durante o desenvolvimento do sistema nervoso ou no animal completamente maduro. Durante os últimos anos, foram desenvolvidos dois vetores adequados: o adenovírus recombinante (rAAV) e o lentivírus recombinante (rLV)<sup>21</sup>. O vírus Herpes simplex também infeta neurônios e está sendo investigado para transferência de genes para estas células<sup>12</sup>.

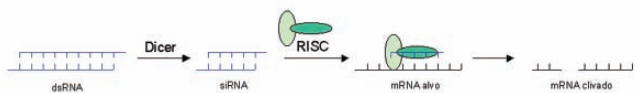
Uma variação da tecnologia dos animais transgênicos é o nocaute do gene de interesse. O nocaute é a interrupção do gene *in vitro* provocada por mutações, deleção ou inserção de um fragmento de DNA, o qual interfere na fase de leitura, resultando em uma proteína não funcional. O gene mutante é flanqueado por seqüências de DNA homólogas àquelas que flanqueiam o gene alvo no cromossomo, para favorecer a recombinação homóloga (recombinação precisa com a seqüência idêntica no genoma). O gene mutante é então inserido em um vetor e introduzido em células tronco embrionárias em cultura por microinjeção, transfecção ou eletroporação<sup>20</sup>. Recombinações resultando na substituição do gene normal ocorrem cerca de uma em cem vezes. As células recombinantes são selecionadas e injetadas em um blastocisto, o qual é introduzido em uma fêmea. Algumas das células do filhote possuirão o gene mutante. Se for o caso de células germinativas, o cruzamento deste camundongo com um nativo resultará em filhotes heterozigotos – expressando somente 50% da proteína. Do cruzamento de camundongos heterozigotos obtém-se ani-

mais homozigotos (com 25% de frequência) com as duas cópias do gene mutadas, ou seja, com expressão nula da proteína<sup>22</sup> (Figura 9).



**Figura 9.** Obtenção de camundongos nocautes. O gene mutante é inserido em células tronco embrionárias, as quais são injetadas em um blastocisto que, por sua vez, é introduzido em uma fêmea. O filhote quimérico origina animais heterozigotos que, por sua vez, podem originar animais nocautes homozigotos

Uma alternativa à técnica de nocaute é o silenciamento de um gene por interferência de RNA (RNAi). A RNAi consiste na degradação do RNA mensageiro induzida por um RNA dupla fita homólogo (dsRNA), impedindo a tradução da proteína de interesse. No citoplasma, o dsRNA é clivado pela enzima Dicer originando um fragmento de RNA menor (siRNA). siRNAs ligam-se ao complexo silenciador induzido por RNA (RISC), o qual separa as fitas do siRNA e cliva o mRNA alvo no local onde o RNA antissenso se liga. O dsRNA pode ser sintetizado quimicamente e introduzido na célula, ou pode ser gerado na célula por sistemas de expressão viral ou plasmidial. A técnica de RNAi já foi aplicada com sucesso a linhagens celulares neuronais, células tronco neurais, neurônios e astrócitos primários de mamíferos, além de ter sido utilizada *in vivo* em cérebro de camundongo<sup>23</sup> (Figura 10).



**Figura 10.** Mecanismo de silenciamento de um gene por RNAi. Um RNA dupla fita homólogo (dsRNA) é clivado pela enzima Dicer em um RNA menor (siRNA), o qual se liga ao complexo silenciador induzido por RNA (RISC). O complexo cliva o mRNA alvo no local onde o siRNA antissenso se liga

## O que aprendemos com camundongos transgênicos e nocautes

Pesquisas desde 1980 têm documentado claramente a importância de camundongos geneticamente modificados como uma ferramenta promissora para elucidar a importância de um gene de interesse<sup>24</sup>.

Nas duas últimas décadas, um grande número de ratos e camundongos transgênicos e nocautes foi desenvolvido para o estudo da importância da regulação do estresse oxidativo para o funcionamento normal do SNC. Camundongos apresentando alterações em genes envolvidos com a defesa antioxidante permitem o estudo direto em mamíferos sobre o papel destas proteínas no controle do estresse oxidativo no sistema nervoso. A importância do equilíbrio entre

oxidantes e antioxidantes é testada em animais basicamente por duas abordagens: eliminando e aumentando um mecanismo de defesa antioxidante.

A seguir será apresentada a descrição do fenótipo do sistema nervoso observado em camundongos transgênicos que super expressam ou apresentam expressão reduzida de genes envolvidos com defesas antioxidantes.

### Transgênicos super expressando enzimas antioxidantes

#### CuZn-SOD

O primeiro camundongo transgênico super expressando uma enzima antioxidante foi produzido, em 1987, por Epstein e Groners<sup>25</sup> utilizando um fragmento de 15 kb (kilo bases) contendo o gene humano SOD-1 de 10 kb, o qual codifica a forma citosólica da CuZn-SOD. O estudo inicial relatou que a expressão de CuZn-SOD foi dramaticamente aumentada no cérebro dos animais (2 a 10 vezes) e pouco aumentada em outros tecidos. Outras linhagens relataram aumento da expressão em todos os tecidos<sup>26</sup>.

Extensos estudos sobre resistência a estresse oxidativo foram realizados em diferentes linhagens de camundongos super expressando CuZn-SOD, indicando em geral maior resistência dos animais transgênicos. Com respeito ao sistema nervoso, pode-se citar proteção contra edema cerebral induzido por frio<sup>27</sup> e efeitos protetores durante isquemia-reperfusão cerebral<sup>28-30</sup>, incluindo liberação reduzida de citocromo c (sinalização para apoptose)<sup>31</sup>, menor rompimento da barreira hemato-encefálica e níveis reduzidos de 8-hidroxidesoxiguanosina<sup>32</sup>. Observou-se também diminuição de nitrações dependentes de NO<sup>•</sup><sup>33</sup> e redução de morte neuronal em resposta à formação de peroxinitrito<sup>34</sup>. Houve, ainda, maior resistência a toxinas, como MPTP<sup>35</sup>, ácido 3-nitropropiónico<sup>36</sup> (inibidores mitocondriais) e “Ecstasy” (metilendioxi-metanfetamina)<sup>37</sup>, além de proteção contra a excitotoxicidade do glutamato *in vitro*<sup>38</sup>.

Os experimentos citados acima demonstraram que o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é formado no cérebro em condições normais e em diferentes situações de estresse, como isquemia, inibição da cadeia de transporte de elétrons e neurotoxicidade do glutamato, e está envolvido na formação de lesões no tecido cerebral.

A super expressão de CuZn-SOD protegeu o sistema nervoso. Entretanto, muitos efeitos negativos também foram observados em diversas linhagens, como deficiências na memória espacial<sup>39</sup>, atrofia dos músculos do quadríceps, e comprometimento da função muscular<sup>40,41</sup>. Foram observadas junções neuromusculares anormais na língua e anormalidades no metabolismo de serotonina (similar a pacientes de Síndrome de Down)<sup>12</sup>. Relatou-se também produção aumentada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após isquemia cerebral<sup>42</sup>, nível aumentado de peroxidação lipídica<sup>43</sup> e susceptibilidade aumentada à excitotoxicidade mediada por ácido kaínico (análogo de glutamato)<sup>44</sup>. Além disso, a super expressão de CuZn-SOD não aumentou, e inclusive diminuiu, o tempo de vida de camundongos quando expostos a insultos patogênicos<sup>45</sup> e não preveniu morte neonatal em camundongos sem Mn-SOD<sup>46</sup>.

A super expressão de CuZn-SOD produz um desequilíbrio entre a formação e remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual provavelmente está associado aos efeitos negativos descritos acima. Além disso, a CuZn-SOD pode atuar como uma peroxidase na presença de concentrações elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, promovendo a formação de espécies reativas<sup>47,48</sup>. Tal quadro é associado à patologia da trissomia do 21, conhecida como Síndrome de Down (o gene *Sod-1* encontra-se no cromossomo 21), e à patologia de Esclerose Lateral Amiotrófica (20% dos casos familiares possuem mutações no gene da CuZn-SOD; acredita-se que estas SODs mutantes apresentam maior atividade peroxidásica<sup>49</sup>). A partir destes resultados pode-se concluir que CuZn-SOD em excesso também pode ser deletéria.

### Mn-SOD

Animais super expressando Mn-SOD (2 vezes no cérebro) também apresentaram maior resistência a estresse oxidativo em geral. Constatou-se proteção contra peroxidação lipídica<sup>50</sup>, aumento da resistência à isquemia/reperfusão<sup>51</sup>, maior sobrevivência após exposição a 90% de O<sub>2</sub><sup>52</sup> e diminuição de nitrações dependentes de NO<sup>•</sup><sup>33</sup>. Outros trabalhos indicaram prevenção de disfunções mitocondriais e apoptose neural, supressão da produção de peroxinitrito<sup>53</sup>, além de atenuação da toxicidade de MPTP<sup>54</sup>.

Estes trabalhos reforçam que o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> está envolvido na formação de lesões no tecido cerebral, e evidenciam que a geração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mitocondrial é um importante mecanismo de lesão *in vivo*<sup>55</sup>.

### SOD extracelular

O plasma sanguíneo e o fluido cérebro espinhal devem proteger a superfície das células do sistema nervoso e os constituintes essenciais presentes nestes fluidos. O nível de catalase destes fluidos é quase nulo, porém apresentam glutathione peroxidase e SOD extracelular. A SOD extracelular também contém cobre e zinco e está ligada à superfície das células<sup>12</sup>.

Camundongos super expressando SOD extracelular (5 vezes no cérebro) também apresentaram proteção a danos cerebrais globais causados por isquemia<sup>56</sup> e por traumas<sup>57</sup>.

A SOD extracelular tem o controle primário sobre a inativação do NO<sup>•</sup> (via reação com O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Por isso, a super expressão desta enzima anulou o efeito negativo na memória (teste do labirinto) causado pelo inibidor de NOS, L-NAME (éster de metil-NG-nitro-L-arginina)<sup>58</sup>, devido à diminuição do catabolismo do NO<sup>•</sup>. Entretanto, sérios comprometimentos da função cerebral foram observados<sup>59</sup>, incluindo dificuldades de aprendizagem espacial<sup>58</sup>.

Novamente, estes estudos demonstram efeitos benéficos e deletérios associados à super expressão de CuZn-SOD.

### Glutathione peroxidase

Camundongos expressando 4 vezes mais glutathione peroxidase no cérebro apresentaram proteção contra danos causados por isquemia/reperfusão cerebral focal<sup>60</sup>.

A super expressão de glutathione peroxidase também preveniu o comprometimento da transmissão sináptica causado por hipóxia transitente em fatias de hipocampo<sup>61</sup>. Os neurônios dopaminérgicos mostraram menor sensibilidade a danos causados por malonato (inibidor competitivo da succinato desidrogenase)<sup>62</sup> e proteção contra a toxicidade de 6-hidroxidopamina<sup>63</sup>.

Estes experimentos indicam que a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também está envolvida na formação das lesões causadas por isquemia e na inibição do ciclo de Krebs.

### Tiorredoxinas

As tiorredoxinas (Trx) são uma família de pequenas proteínas (12 kDa) que sofrem oxidações reversíveis em seu sítio catalítico conservado (-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-). As duas tiorredoxinas mais importantes são a Trx-1 (citossólica e nuclear) e a Trx-2 (mitocondrial). A propriedade antioxidante das tiorredoxinas é exercida através da enzima tiorredoxina peroxidase, da família das peroxirredoxinas. A forma reduzida da tiorredoxina peroxidase reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peróxidos de alquila, formando dímeros ligados por ponte dissulfeto.

A tiorredoxina reduz a tiorredoxina peroxidase de volta à forma monomérica; a enzima tiorredoxina redutase (TrxR) converte a tiorredoxina oxidada de volta a sua forma reduzida<sup>64</sup>.

Camundongos super expressando Trx-1 apresentam maior tempo de vida<sup>65</sup>. A super expressão de tiorredoxina também atenuou os danos oxidativos causados por MPTP<sup>66</sup> e os infartos causados por oclusão da artéria cerebral<sup>64</sup>, e tornou os animais mais resistentes à morte do teci-

do cerebral causado por isquemia focal<sup>67</sup>. Tais dados confirmam a participação de peróxidos na formação de danos ao tecido nervoso.

### Ferritina

A ferritina que sequestra íons de ferro impedindo-os de participar de reações de oxidação. A super expressão de ferritina preveniu estresse oxidativo induzido por MPTP, reduzindo a perda de neurônios dopaminérgicos e a disfunção motora<sup>68</sup>.

Sabe-se que a inibição da cadeia de transporte de elétrons aumenta a formação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, o qual promove a liberação de íons ferro que podem propagar o estresse oxidativo. O trabalho citado acima confirmou o envolvimento do ferro neste cenário.

### Nocautes com expressão reduzida de enzimas antioxidantes

Diversas linhagens mutantes foram geradas na década de 90 pela interrupção de um gene em camundongos. A maioria dos mutantes disponíveis tem alelos nulos (ou sem função) do gene. Surpreendentemente, muitos nocautes exibem um fenótipo aparentemente normal, provavelmente devido à redundância de genes compensando o produto do gene deletado<sup>24</sup>. Em outros casos, animais homocigotos para uma mutação nula não são viáveis – os fetos morrem durante o desenvolvimento embrionário ou sobrevivem por pouco tempo após o nascimento.

Animais com nocaute total dos genes da tiorredoxina, transferrina e Mn-SOD (gene *SOD-2*) não sobrevivem. Camundongos sem tiorredoxina citoplasmática (Trx1) ou mitocondrial (Trx2) morrem no estágio embrionário<sup>65,69</sup> e camundongos sintetizando menos que 1% da quantidade normal de transferrina morrem logo após o nascimento<sup>12</sup>. Camundongos sem Mn-SOD morrem dentro de 1 a 18 dias de cardiomiopatia dilatada ou neurodegeneração<sup>70</sup>, com severos danos mitocondriais, depósitos de lipídios oxidados em diversos tecidos<sup>71</sup> e níveis muito elevados de 8-hidroxiguanina, 8-hidroxiadenina e 5-hidroxicitosina no DNA genômico<sup>72</sup>. Animais nocautes homocigotos dos genes *SOD-1* (CuZn-SOD), *SOD-3* (SOD extracelular) e *GPx1* (glutathione peroxidase) conseguem sobreviver: os camundongos parecem normais exceto por maior sensibilidade a certos tipos de estresse oxidativo<sup>26</sup>.

### CuZn-SOD

A eliminação de CuZn-SOD em camundongos causou maior dano e morte neuronal, os quais se agravaram com a idade<sup>12</sup>. Os animais apresentaram inchamento cerebral, maior apoptose neuronal e déficits neurológicos 24 h após isquemia cerebral focal transitente<sup>73</sup>. Também exibiram grande vulnerabilidade à perda de neurônios motores após danos axonais<sup>74</sup>, produção aumentada de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> após isquemia global<sup>75</sup> e maior vulnerabilidade a MPTP<sup>76</sup> e à toxina paraquat (geradora de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)<sup>12</sup>.

Apesar da ausência de CuZn-SOD não ser letal, estes experimentos mostram que esta enzima é muito importante ao longo da vida do animal, tornando-o mais resistente a diferentes insultos envolvendo estresse oxidativo.

### Mn-SOD

A Mn-SOD, localizada na matriz mitocondrial, tem o importante papel de sequestrar radicais O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produzidos pela cadeia de transporte de elétrons. Íons O<sub>2</sub><sup>•-</sup> são moléculas carregadas que não atravessam membranas. Portanto, se não forem eliminados, acabam lesando moléculas da própria mitocôndria.

Camundongos nocautes de Mn-SOD heterocigotos mostraram funções mitocondriais alteradas (como respiração reduzida e maior sensibilidade a estresse oxidativo) e menor tempo de vida<sup>77</sup>. Apresentaram elevada neurodegeneração<sup>71</sup>, danos cerebrais maiores após isquemia<sup>78</sup> e elevado nível de nitração cerebral, consistente com formação aumentada de ONOO<sup>•</sup><sup>33</sup>. Observou-se também maior sensibilidade a MPTP, 3-nitropropionato e malonato<sup>79</sup>.

Como os camundongos nocautes homozigotos de Mn-SOD não são viáveis, foi necessário construir animais heterozigotos expressando somente metade da quantidade de Mn-SOD para a realização de estudos mais longos. De qualquer maneira, os camundongos heterozigotos confirmam que a Mn-SOD é uma enzima central no sistema de defesa antioxidante, apontando a mitocôndria como uma organela primordial para a saúde celular (é a fonte de energia da célula) e, também, um núcleo de ativação de apoptose.

#### SOD extracelular

Camundongos sem SOD extracelular pareceram normais, porém mais sensíveis à hiperóxia e à isquemia cerebral focal<sup>80</sup>, apresentando comprometimentos significativos da função cerebral, como dificuldade na aprendizagem espacial<sup>58</sup>. Tais fatos indicam a importância de proteger a superfície das células do sistema nervoso e os constituintes essenciais presentes no fluido cérebro espinhal.

#### Glutathione peroxidase

Camundongos com deleção da glutathione peroxidase desenvolveram-se normalmente, porém o cérebro se tornou mais susceptível a toxinas mitocondriais (MPTP, 3-nitropropionato e malonato<sup>81</sup>), ozônio (O<sub>3</sub>) e antracilinas<sup>24</sup>, e mais sensível a danos por isquemia/reperfusão<sup>76</sup>. Apesar da ausência de glutathione peroxidase também não ser letal, estes experimentos ilustram como o controle da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é importante para manter o bom funcionamento do cérebro quando submetido a insultos oxidativos.

#### Metalotioneínas

As metalotioneínas são o principal estoque intracelular de íons de cobre e zinco. O cérebro contém as metalotioneínas I, II e III, e inclusive uma isoforma específica de III. Camundongos transgênicos sem as metalotioneínas I e II mostraram dificuldades no reparo de lesões cerebrais após ferimento cortical<sup>82</sup>.

Sabe-se que existe um estoque intracelular de íons de ferro e cobre livres no interior de vacúolos isolados do resto da célula e que, quando as células são mecanicamente danificadas ou sofrem necrose, estes metais podem ser liberados. O trabalho citado acima indica que as metalotioneínas seriam responsáveis por quelar rapidamente o cobre livre, impedindo-o de catalisar a formação de radicais livres e, conseqüentemente, promover a formação de lesões cerebrais. Acredita-se que alterações no metabolismo de zinco também estejam envolvidas na patologia de doenças neurodegenerativas<sup>1</sup>.

#### Transportadores de vitaminas

Camundongos deficientes na proteína transportadora da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) desenvolveram ataxia tardia e neurodegeneração<sup>83</sup>. A deficiência do transportador da vitamina C (ascorbato) causou hemorragias cerebrais letais logo após o nascimento<sup>84</sup>. Estes trabalhos ilustram o importante papel desempenhado no sistema nervoso por estes antioxidantes obtidos da dieta.

#### Transportador vesicular de monoamina (VMAT2)

VMAT2 é responsável pela liberação de dopamina nas vesículas sinápticas. Camundongos heterozigotos nulos para VMAT2 apresentaram maior sensibilidade ao efeito de MPTP. Isto porque possuem elevado nível citosólico de dopamina, cuja auto-oxidação e oxidação por monoamina oxidases gera espécies reativas que desencadeiam o estresse oxidativo<sup>85</sup>.

#### NO<sup>•</sup> sintases (NOS)

Alguns neurônios contêm uma forma constitutiva de NOS, chamada de NOS neuronal (nNOS); as células da glia possuem uma forma indutível de NOS (iNOS) e as células endoteliais dos vasos sanguíneos cerebrais contêm NOS endotelial (eNOS)<sup>12</sup>.

Camundongos nocautes de iNOS apresentaram menor nível de nitrotirosina no córtex cerebral após isquemia-reperfusão<sup>86</sup>. Já os camundongos nocautes de nNOS mostraram maior resistência à toxicidade de malonato (inibidor da succinato desidrogenase)<sup>87</sup>, MPTP<sup>88</sup> e *N*-metil-D-aspartato<sup>89</sup>. Foram também mais resistentes a golpes<sup>90</sup> e a danos cerebrais por isquemia-reperfusão<sup>91,92</sup>.

Os trabalhos citados acima evidenciam a ação neurotóxica do NO<sup>•</sup> gerado pela nNOS e iNOS em situações de estresse. Estudos mostraram que a formação de NO<sup>•</sup> nos neurônios induzida por isquemia é responsável pela formação de peroxinitrito, pela liberação de íons de ferro, pelo aumento de lesões no DNA e inibição da síntese de DNA, sinalizando apoptose. Já o NO<sup>•</sup> gerado nos vasos sanguíneos pela eNOS promove proteção do tecido, aumentando o fluxo de sangue no cérebro, inibindo a agregação de plaquetas e capturando O<sub>2</sub><sup>-•</sup><sup>24</sup>.

Este é o único tópico deste trabalho que descreve a deleção de uma enzima que não faz parte do sistema de defesa antioxidante clássico, já que o NO<sup>•</sup> exerce ação pró-oxidante em determinadas situações. De qualquer maneira, animais transgênicos e nocautes de enzimas pró-oxidantes também auxiliam no entendimento de situações de estresse oxidativo no SNC.

Os estudos com animais transgênicos e nocautes corroboram a hipótese de que lesões oxidativas são componentes importantes no ciclo de eventos que levam à neurodegeneração, estando intimamente ligadas a diversos fenômenos celulares que contribuem para a lesão e morte neuronal.

Os diversos resultados obtidos com animais transgênicos ou nocautes revisados neste trabalho forneceram informações valiosas sobre a participação de determinadas espécies reativas como agentes de situações de estresse no SNC. Estes estudos também permitiram avaliar a importância de diferentes proteínas na proteção do tecido, indicando que enzimas antioxidantes, oxidantes de baixo peso molecular (vitaminas E e C) e quelantes de metais estão envolvidos na proteção do SNC, assim como a regulação da atividade de enzimas pró-oxidantes e da concentração de neurotransmissores.

Tais informações destacam alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas e terapias genéticas focalizadas que poderão inibir o estresse oxidativo, quebrando o ciclo de morte celular. O desenvolvimento de novas drogas para o sistema nervoso central apresenta algumas dificuldades particulares: os agentes devem ser capazes de penetrar a barreira hemato-encefálica e devem ser seguros para longos períodos de consumo. Neste aspecto, aponta-se outra grande utilidade dos transgênicos: a possibilidade de explorar intervenções terapêuticas promissoras nos animais, antes da realização de triagens clínicas.

## CONCLUSÃO

Muitos progressos no entendimento da patologia de doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) só foram alcançados graças ao estudo dos mecanismos de estresse oxidativo em animais transgênicos.

Apesar de existirem diferentes fatores genéticos de pré-disposição e vulnerabilidade regional à morte neuronal – mutações na  $\alpha$ -sinucleína atingindo neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra* em Parkinson; proteína precursora de  $\beta$ -amilóide mutante prejudicando neurônios colinérgicos do córtex e hipocampo em Alzheimer; repetições excessivas de glutamina na proteína huntingtina comprometendo neurônios estriatais em Huntington e, mutações na CuZn-SOD relacionadas a neurônios motores e células da glia em ELA<sup>3</sup> - o estresse oxidativo representa um mecanismo unificador de doenças neurodegenerativas. Espécies reativas podem causar disfunções mitocondriais, ativação das células da glia, modificação e agregação de proteínas específicas e mau funcionamento do sistema proteossomo, gerando um ciclo vicioso que acaba por desencadear a morte celular.

A tecnologia dos animais transgênicos permite identificar quais são as espécies reativas envolvidas em determinada situação de estresse, quais as principais fontes destas espécies reativas e quais as enzimas que podem inibir o estresse oxidativo, rompendo o ciclo de morte celular. Informações mais específicas de cada patologia têm sido obtidas graças a animais modelo de Parkinson, Alzheimer, Huntington e ELA, desenvolvidos a partir da super expressão das proteínas mutantes específicas de cada doença.

## AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq / Instituto do Milênio Redoxoma, Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo.

## REFERÊNCIAS

- Halliwell, B.; *Drugs Aging* **2001**, *18*, 685.
- Andersen, J. K.; *Nat. Med.* **2004**, *10 Suppl*, S18.
- Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S.; *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 163.
- Lovell, M. A.; Xie, C.; Gabbita, S. P.; Markesbery, W. R.; *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 418.
- Malaspina, A.; Kaushik, N.; de Bellerocche, J.; *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 132.
- Basso, M.; Giraudo, S.; Corpillo, D.; Bergamasco, B.; Lopiano, L.; Fasano, M.; *Proteomics* **2004**, *4*, 3943.
- Kirby, J.; Halligan, E.; Baptista, M. J.; Allen, S.; Heath, P. R.; Holden, H.; Barber, S. C.; Loynes, C. A.; Wood-Allum, C. A.; Lunec, J.; Shaw, P. J.; *Brain* **2005**, *128(Pt 7)*, 1686.
- Schonberger, S. J.; Edgar, P. F.; Kydd, R.; Faull, R. L.; Cooper, G. J.; *Proteomics* **2001**, *1*, 1519.
- Dangond, F.; Hwang, D.; Camelo, S.; Pasinelli, P.; Frosch, M. P.; Stephanopoulos, G.; Stephanopoulos, G.; Brown, R. H.; Guelans, S. R.; *Physiol. Genomics* **2004**, *16*, 229.
- Gutteridge, J. M.; Cao, W.; Chevon, M.; *Free Radical Res. Commun.* **1991**, *11*, 317.
- Loureiro, A. P. M.; Di Mascio, P.; Medeiros, M. H. G.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 777.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press: UK, 2002.
- Watkins, J. C.; Evans, R. H.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1981**, *21*, 165.
- Meldrum, B.; Garthwaite, J.; *Trends Pharmacol. Sci.* **1990**, *11*, 379.
- Lipton, S. A.; Rosenberg, P. A.; *N. Engl. J. Med.* **1994**, *330*, 613.
- Martinez, G. R.; Loureiro, A. P.; Marques, S. A.; Miyamoto, S.; Yamaguchi, L. F.; Onuki, J.; Almeida, E. A.; Garcia, C. C.; Barbosa, L. F.; Medeiros, M. H.; Di Mascio, P.; *Mutat. Res.* **2003**, *544*, 115.
- Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A.; *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 1620.
- Bonini, M. G.; Miyamoto, S.; Di Mascio, P.; Augusto, O.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 51836.
- Shuldiner, A. R.; *New Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 653.
- Watson, J. D.; Gilman, M.; Witkowski, J.; Zoller, M.; *Recombinant DNA*, 2<sup>nd</sup> ed., Scientific American Books: New York, 1992.
- Kirik, D.; Björklund, A.; *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 386.
- Majzoub, J. A.; Muglia, L. J.; *New Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 904.
- Genc, S.; Koroglu, T. F.; Genc, K.; *Brain Res. Mol. Brain. Res.* **2004**, *132*, 260.
- Dalkara, T.; Huang, P. L.; Moskowitz, M. A. Em *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*; Ignarro, L. J., ed.; Academic Press: California, 2000, cap. 42.
- Epstein, C. J.; Avraham, K. B.; Lovett, M.; Smith, S.; Elroy-Stein, O.; Rotman, G.; Bry, C.; Groner, Y.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 8044.
- Van Remmen, H.; Mele, J.; Chen, X.; Richardson, A. Em *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging*; Cutler, R. G.; Rodriguez, H., eds.; World Scientific: Singapore, 2003, vol. II, cap. 59.
- Chan, P. H.; Yang, G. Y.; Chen, S. F.; Carlson, E.; Epstein, C. J.; *Ann. Neurol.* **1991**, *29*, 482.
- Yang, G.; Chan, P. H.; Chen, J.; Carlson, E.; Chen, S. F.; Weinstein, P.; Epstein, C. J.; Kamii, H.; *Stroke* **1994**, *25*, 165.
- Chen, Y.; Ying, W.; Simma, V.; Copin, J. C.; Chan, P. H.; Swanson, R. A.; *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 939.
- Kinouchi, H.; Epstein, C. J.; Mizui, T.; Carlson, E.; Chen, S. F.; Chan, P. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 11158.
- Fujimura, M.; Morita-Fujimura, Y.; Noshita, N. Sugawara, T.; Kawase, M.; Chan, P. H.; *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 2817.
- Kim, G. W.; Lewen, A.; Copin, J.; Watson, B. D.; Chan, P. H.; *Neuroscience* **2001**, *105*, 1007.
- Radi, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 4003.
- Ying, W.; Anderson, C. M.; Chen, Y.; Stein, B. A.; Fahlman, C. S.; Copin, J. C.; Chan, P. H.; Swanson, R. A.; *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2000**, *20*, 359.
- Przedborski, S.; Kostic, V.; Jackson-Lewis, V.; Naini, A. B.; Simonetti, S.; Fahn, S.; Carlson, E.; Epstein, C. J.; Cadet, J. L.; *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 1658.
- Beal, M. F.; Ferrante, R. J.; Henshaw, R.; Matthews, R. T.; Chan, P. H.; Kowall, N. W.; Epstein, C. J.; Schulz, J. B.; *J. Neurochem.* **1995**, *65*, 919.
- Jayanthi, S.; Ladenheim, B.; Andrews, A. M.; Cadet, J. L.; *Neuroscience* **1999**, *91*, 1379.
- Chan, P. H.; Chu, L.; Chen, S. F.; Carlson, E. J.; Epstein, C. J.; *Stroke* **1990**, *21(11 Suppl)*, III80.
- Gahtan, E.; Auerbach, J. M.; Groner, Y.; Segal, M.; *Eur. J. Neurosci.* **1998**, *10*, 538.
- Rando, T. A.; Crowley, R. S.; Carlson, E. J.; Epstein, C. J.; Mohapatra, P. K.; *Ann. Neurol.* **1998**, *44*, 381.
- Peled-Kamar, M.; Lotem, J.; Wirguin, I.; Weiner, L.; Hermalin, A.; Groner, Y.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 3883.
- Fullerton, H. J.; Ditelberg, J. S.; Chen, S. F.; Sarco, D. P.; Chan, P. H.; Epstein, C. J.; Ferriero, D. M.; *Ann. Neurol.* **1998**, *44*, 357.
- Ceballos-Picot, I.; Nicole, A.; Briand, P.; Grimber, G.; Delacourte, A.; Defossez, A.; Javoy-Agid, F.; Lafon, M.; Blouin, J. L.; Sinet, P. M.; *Brain Res.* **1991**, *552*, 198.
- Bar-Peled, O.; Korkotian, E.; Segal, M.; Groner, Y.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 8530.
- Huang, T. T.; Carlson, E. J.; Gillespie, A. M.; Shi, Y.; Epstein, C. J.; *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **2000**, *55*, B5.
- Copin, J. C.; Gasche, Y.; Chan, P. H.; *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 1571.
- Bonini, M. G.; Fernandes, D. C.; Augusto, O.; *Biochemistry* **2004**, *43*, 344.
- Liochev, S. I.; Fridovich, I.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *421*, 255.
- Liochev, S. I.; Fridovich, I.; *Free Radical Biol. Med.* **2003**, *34*, 1383.
- Ibrahim, W.; Lee, U. S.; Yen, H. C.; St. Clair, D. K.; Chow, C. K.; *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 397.
- Chen, Z.; Siu, B.; Ho, Y. S.; Vincent, R.; Chua, C. C.; Hamdy, R. C.; Chua, B. H.; *J. Mol. Cell Cardiol.* **1998**, *30*, 2281.
- Ho, Y. S.; Vincent, R.; Dey, M. S.; Slot, J. W.; Crapo, J. D.; *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1998**, *18*, 538.
- Keller, J. N.; Kindy, M. S.; Holtsberg, F. W.; St. Clair, D. K.; Yen, H. C.; Germeyer, A.; Steiner, S. M.; Bruce-Keller, A. J.; Hutchins, J. B.; Mattson, M. P.; *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 687.
- Klivenyi, P.; St. Clair, D.; Wermer, M.; Yen, H. C.; Oberley, T.; Yang, L.; Flint Beal, M.; *Neurobiol. Dis.* **1998**, *5*, 253.
- Lebovitz, R. M.; Zhang, H.; Vogel, H.; Cartwright, J. Jr.; Dionne, L.; Lu, N.; Huang, S.; Matzuk, M. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 9782.
- Sheng, H.; Kudo, M.; Mackensen, G. B.; Pearlstein, R. D.; Crapo, J. D.; Warner, D. S.; *Exp. Neurol.* **2000**, *163*, 392.
- Pineda, J. A.; Aono, M.; Sheng, H.; Lynch, J.; Wellons, J. C.; Laskowitz, D. T.; Pearlstein, R. D.; Bowler, R.; Crapo, J.; Warner, D. S.; *J. Neurotrauma* **2001**, *18*, 625.
- Levin, E. D.; Brady, T. C.; Hochrein, E. C.; Oury, T. D.; Jonsson, L.M.; Marklund, S. L.; Crapo, J. D.; *Behav. Genet.* **1998**, *28*, 381.
- Thiels, E.; Urban, N. N.; Gonzalez-Burgos, G. R.; Kanterewicz, B. I.; Barrionuevo, G.; Chu, C. T.; Oury, T. D.; Klann, E.; *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 7631.
- Weisbrot-Lefkowitz, M.; Reuhl, K.; Perry, B.; Chan, P. H.; Inouye, M.; Mirochnitchenko, O.; *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1998**, *53*, 333.
- Furling, D.; Ghribi, O.; Lahsaini, A.; Mirault, M. E.; Massicotte, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 4351.
- Zeevalk, G. D.; Bernard, L. P.; Albers, D. S.; Mirochnitchenko, O.; Nicklas, W. J.; Sonsalla, P. K.; *J. Neurochem.* **1997**, *68*, 426.
- Bensadoun, J. C.; Mirochnitchenko, O.; Inouye, M.; Aebischer, P.; Zurn, A. D.; *Eur. J. Neurosci.* **1998**, *10*, 3231.
- Powis, G.; Montfort, W. R.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 261.
- Patenaude, A.; Murthy, M. R.; Mirault, M. E.; *Cell Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1063.
- Chiueh, C. C.; Andoh, T.; Chock, P. B.; *Ann. NY Acad. Sci.* **2005**, *1042*, 403.
- Takagi, Y.; Mitsui, A.; Nishiyama, A.; Nozaki, K.; Sono, H.; Gon, Y.; Hashimoto, N.; Yodoi, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 4131.



68. Kaur, D.; Yantiri, F.; Rajagopalan, S.; Kumar, J.; Mo, J. Q.; Boonplueang, R.; Viswanath, V.; Jacobs, R.; Yang, L.; Beal, M. F.; DiMonte, D.; Volitaskis, I.; Ellerby, L.; Cherny, R. A.; Bush, A. I.; Andersen, J. K.; *Neuron* **2003**, *37*, 899.
69. Matsui, M.; Oshima, M.; Oshima, H.; Takaku, K.; Maruyama, T.; Yodoi, J.; Taketo, M.M.; *Dev. Biol.* **1996**, *178*, 179.
70. Li, Y.; Huang, T. T.; Carlson, E. J.; Melov, S.; Ursell, P. C.; Olson, J. L.; Noble, L. J.; Yoshimura, M. P.; Berger, C.; Chan, P. H.; *Nat. Genet.* **1995**, *11*, 376.
71. Lebovitz, R. M.; Zhang, H.; Vogel, H.; Cartwright, J. Jr.; Dionne, L.; Lu, N.; Huang, S.; Matzuk, M. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 9782.
72. Melov, S.; Coskun, P.; Patel, M.; Tuinstra, R.; Cottrell, B.; Jun, A. S.; Zastawny, T. H.; Dizdaroglu, M.; Goodman, S. I.; Huang, T. T.; Miziorko, H.; Epstein, C. J.; Wallace, D. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 846.
73. Kondo, T.; Reaume, A. G.; Huang, T. T.; Murakami, K.; Carlson, E. J.; Chen, S.; Scott, R. W.; Epstein, C. J.; Chan, P. H.; *Acta Neurochir. Suppl.* **1997**, *70*, 62.
74. Reaume, A. G.; Elliott, J. L.; Hoffman, E. K.; Kowall, N. W.; Ferrante, R. J.; Siwek, D. F.; Wilcox, H. M.; Flood, D. G.; Beal, M. F.; Brown, R. H. Jr.; Scott, R. W.; Snider, W. D.; *Nat. Genet.* **1996**, *13*, 43.
75. Kawase, M.; Murakami, K.; Fujimura, M.; Morita-Fujimura, Y.; Gasche, Y.; Kondo, T.; Scout, R. W.; Chan, P. H.; *Stroke* **1999**, *30*, 1962.
76. Zhang, J.; Graham, D. G.; Montine, T. J.; Ho, Y. S.; *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2000**, *59*, 53.
77. Williams, M. D.; Van Remmen, H.; Conrad, C. C.; Huang, T. T.; Epstein, C. J.; Richardson, A.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28510.
78. Murakami, K.; Kondo, T.; Kawase, M.; Li, Y.; Sato, S.; Chen, S. F.; Chan, P. H.; *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 205.
79. Andreassen, O. A.; Ferrante, R. J.; Dedeoglu, A.; Albers, D. W.; Klivenyi, P.; Carlson, E. J.; Epstein, C. J.; Beal, M. F.; *Exp. Neurol.* **2001**, *167*, 189.
80. Sheng, H.; Brady, T. C.; Pearlstein, R. D.; Crapo, J. D.; Warner, D. S.; *Neurosci. Lett.* **1999**, *267*, 13.
81. Klivenyi, P.; Andreassen, O. A.; Ferrante, R. J.; Dedeoglu, A.; Mueller, G.; Lancelot, E.; Bogdanov, M.; Andersen, J. K.; Jiang, D.; Beal, M. F.; *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 1.
82. Penkowa, M.; Carrasco, J.; Giralto, M.; Moos, T.; Hidalgo, J.; *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 2535.
83. Yokota, T.; Igarashi, K.; Uchihara, T.; Jishage, K.; Tomita, H.; Inaba, A.; Li, Y.; Arita, M.; Suzuki, H.; Mizusawa, H.; Arai, H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 15185.
84. Sotiriou, S.; Gispert, S.; Cheng, J.; Wang, Y.; Chen, A.; Hoogstraten-Miller, S.; Miller, G. F.; Kwon, O.; Levine, M.; Guttentag, S. H.; Nussbaum, R. L.; *Nat. Med.* **2002**, *8*, 514.
85. Gainetdinov, R. R.; Fumagalli, F.; Wang, Y. M.; Jones, S. R.; Levey, A. I.; Miller, G. W.; Caron, M. G.; *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 1973.
86. Hirabayashi, H.; Takizawa, S.; Fukuyama, N.; Nakazawa, H.; Shinohara, Y.; *Brain Res.* **2000**, *852*, 319.
87. Schulz, J. B.; Huang, P. L.; Matthews, R. T.; Passov, D.; Fishman, M. C.; Beal, M. F.; *J. Neurochem.* **1996**, *67*, 430.
88. Molina, J. A.; Jimenez-Jimenez, F. J.; Orti-Pareja, M.; Navarro, J. A.; *Drugs Aging* **1998**, *12*, 251.
89. Ayata, C.; Ayata, G.; Hara, H.; Matthews, R. T.; Beal, M. F.; Ferrante, R. J.; Endres, M.; Kim, A.; Christie, R. H.; Waeber, C.; Huang, P. L.; Hyman, B. T.; Moskowitz, M. A.; *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 6908.
90. Eliasson, M. J.; Huang, Z.; Ferrante, R. J.; Sasamata, M.; Molliver, M. E.; Snyder, S. H.; Moskowitz, M. A.; *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 5910.
91. Schulz, J. B.; Matthews, R. T.; Klockgether, T.; Dichgans, J.; Beal, M. F.; *Mol. Cell Biochem.* **1997**, *174*, 193.
92. Dawson, V. L.; Kizushi, V. M.; Huang, P. L.; Snyder, S. H.; Dawson, T. M.; *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 2479.