



Universidade Federal do Pará

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

ALDANETE SANTOS ROSÁRIO

**AÇÃO DA HIDROXICLOROQUINA SOBRE NEURÔNIOS DA RETINA
DE EMBRIÃO DE GALINHA**

Belém

2017

ALDANETE SANTOS ROSÁRIO

**AÇÃO DA HIDROXICLOROQUINA SOBRE NEURÔNIOS DA RETINA
DE EMBRIÃO DE GALINHA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

Belém

2017

ALDANETE SANTOS ROSÁRIO

**AÇÃO DA HIDROXICLOROQUINA SOBRE NEURÔNIOS DA RETINA
DE EMBRIÃO DE GALINHA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento (Orientador)

Profa. Dra. Edilene Oliveira da Silva (Avaliadora)

Profa. Dra. Maria Elena Crespo López (Avaliadora)

Belém

2017

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Rosário, Aldanete Santos

Ação da hidroxicloroquina sobre neurônios da retina de embrião de galinha / Aldanete Santos Rosário ; Orientador, José Luiz Martins do Nascimento. - 2017.

47 f. : il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2017.

1. Retina. 2. Cultura de células. 3. Cloroquina. 4. Stress oxidativo. I. Nascimento, José Luiz Martins do, orientador. II. Título.

CDD – 22 ed. 612.843

A meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades que me concedeu. Por ser meu *'refúgio e fortaleza, socorro bem presente na angústia (Salmos 46:1)'*.

Agradeço a meus pais que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em tudo. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço ao meu orientador, professor doutor José Luiz Martins do Nascimento, por ter aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho. Por todas as informações no âmbito científico compartilhadas, pelo exemplo de pesquisador realmente comprometido com a produção do conhecimento científico, e pelo exemplo de professor formador de opinião, que valoriza mais a construção do conhecimento que a memorização de conceitos pré-estabelecidos.

À professora doutora Barbarella de Matos Macchi agradeço imensamente todo apoio que recebi durante esses anos como integrante do Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular. Apendi a admirar sua dedicação e todo o seu esforço, para que todos tenham sempre o necessário para realização de suas tarefas da melhor maneira possível.

Ao professor doutor Chubert Bernardo Castro de Sena, por abrir as portas do Laboratório de Biologia Estrutural sempre que se vez necessário. A professora doutora Edilene Oliveira da Silva por abrir as portas do laboratório de Parasitologia e por toda contribuição no decorrer desse trabalho.

Aos membros dos Laboratórios de Neuroquímica Molecular e Celular, Biologia Estrutural e Parasitologia, agradeço por todo auxílio que recebi e principalmente pela amizade construída durante esses anos.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Hidroxicloroquina (HCQ), classicamente empregado no tratamento da malária e de doenças autoimunes, tem sido proposta como fármaco de escolha para outros fins terapêuticos. Entretanto, este fármaco é conhecido por causar efeitos colaterais, como distúrbios visuais, que podem ser irreversíveis, sendo que os mecanismos que levam a essas desordens não são completamente conhecidos. A toxicidade produzida na retina pelo uso da HCQ pode ser devida a sua alta taxa metabólica, sendo o tecido muito susceptível à ação de xenobióticos e danos oxidativos. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do fármaco HCQ sobre células da retina, bem como seus possíveis mecanismos de citotoxicidade. Como modelo de estudo, utilizamos culturas de células da retina de embrião de galinha. Para avaliar a viabilidade celular foi usado o ensaio de medida de atividade mitocondrial por MTT. A função lisossomal foi avaliada pela taxa de incorporação do corante vermelho neutro. Os níveis de espécies reativas de oxigênio geral e de ânion superóxido foram avaliados pela sonda CellROX e por *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT), e os níveis de glutatona total foram quantificados usando o reagente de Ellman. A viabilidade foi testada em culturas mistas (glia e neurônios), ou culturas enriquecidas com neurônios ou glia, após tratamento com HCQ. Para comparação foi utilizado a cloroquina (CQ), fármaco da qual a HCQ é derivada. As células foram expostas às concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M por 24 horas. Os resultados demonstram que culturas mistas tratadas com CQ apresentaram redução na viabilidade de 36 e 61% para as concentrações de 50 μ M e 75 μ M, respectivamente, enquanto HCQ não altera a viabilidade em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, quando culturas enriquecidas com células gliais foram expostas a HCQ por 24 horas, a concentração de 75 μ M teve uma pequena redução na viabilidade das células, sendo as reduções nas células neuronais mais acentuadas, 20, 33 e 56% para as concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M, respectivamente. Mesmo um tempo menor de tratamento (6 horas) causou perda de viabilidade em neurônios retinianos. A capacidade de incorporação do corante supravital vermelho neutro, também foi alterada em culturas neuronais tratadas com HCQ por 24 horas, tendo redução de 19 e 32%, comparadas ao controle, para as concentrações de 50 μ M e 75 μ M, respectivamente. HCQ reduziu significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células neuronais, principalmente ânion superóxido, 43, 52 e 61% para as concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M de HCQ em 24 horas de tratamento, respectivamente. Os níveis de glutatona total em células neuronais apresentaram redução de 37 e 53% quando tratados com 50 μ M e 75 μ M de HCQ por 24 horas, respectivamente, comparado ao controle. Quando o meio condicionado de células gliais foi utilizado em células neuronais tratadas com HCQ por 6 horas, este reverteu completamente o processo de citotoxicidade causado pelo fármaco. E quando os níveis de glutatona total foram mensurados em culturas enriquecidas com glia, tratadas com HCQ por 24 horas, não foram observadas quaisquer alterações. Estes resultados sugerem ação citotóxica de CQ em cultura mista de células da retina de embrião de galinha, o que não é observado no tratamento com HCQ. Entretanto, HCQ mostrou ação citotóxica quando as células são cultivadas separadamente, principalmente sobre neurônios, que é revertida por algum fator liberado pelas células gliais no ambiente extracelular, sendo a glutatona uma possível candidata a exercer essa função neuroprotetora.

Palavras chaves: RETINA, CULTURA DE CÉLULAS, CLOROQUINA, HIDROXICLOROQUINA E ESTRESSE OXIDATIVO.

ABSTRACT

Hydroxychloroquine (HCQ) is currently used in the treatment of malaria and autoimmune diseases and others therapeutic purposes. However, this drug is known to cause side effects, including producing visual disturbances, which may be irreversible. The mechanisms that produce these visual disorders are not completely known. HCQ - related retinal toxicity may be due to high metabolic rate, being very susceptible to the action of xenobiotics and oxidative damages. Thus, this work aims to evaluate the effects of the HCQ on retinal cells, as well as their possible mechanisms of cytotoxicity. The model used in this work was of cultures of retina cells from chicken embryo. To evaluate cell viability, mitochondrial activity was measured by MTT. The lysosomal function was evaluated by the incorporation rate of the neutral red dye. The levels of reactive species of general oxygen and superoxide anion were evaluated by the CellROX probe and by Nitro Blue Tetrazolium (NBT) and total glutathione levels were quantified using the Ellman reagent. Viability was tested in mixed cultures (glia and neurons) or enriched cultures of neurons and glia after treatment with HCQ and compared with chloroquine (CQ). Cells were exposed to concentrations of 25 μ M, 50 μ M and 75 μ M for 24 hours. The results show that mixed cultures treated with CQ presented a reduction in viability of 36 and 61% at concentrations of 50 μ M and 75 μ M, respectively, whereas HCQ did not alter viability at any of the concentrations tested. However, when cultures enriched with glial cells were exposed to HCQ for 24 hours, the concentration of 75 μ M had a small reduction in cell viability, while that the reduction in neuronal cells was of 20, 33 and 56% at the concentrations of 25 μ M, 50 μ M and 75 μ M, respectively. Even a shorter treatment time (6 hours) there was loss of viability in retinal neurons. The incorporation of neutral red supravital dye was also altered in neuronal cultures treated with HCQ for 24 hours, with reduction of 19 and 32%, compared to the control for the concentrations of 50 μ M and 75 μ M, respectively. HCQ significantly reduced the levels of reactive oxygen species produced by the neuronal cells, mainly superoxide anion, 43, 52 and 61% for the concentrations of 25 μ M, 50 μ M and 75 μ M of HCQ in 24 hours of treatment, respectively. In concentrations of 50 μ M and 75 μ M of HCQ for 24 for hours, the levels of total glutathione in neuronal cells presented a reduction of 37 and 53%, respectively. When the glial cell conditioned medium was used in neuronal cells for 6 hours after treatment with HCQ, it completely reversed the drug-induced cytotoxicity. When total glutathione levels were measured in culture of glia treated with HCQ for 24 hours no changes were observed. These results suggest cytotoxic action of CQ in mixed culture of chicken embryo retina cells which is not observed in HCQ treatment. However, HCQ showed cytotoxic action when cells are cultured separately, mainly on neurons, which is reversed by some factor released by glial cells in the extracellular environment, and glutathione is a possible candidate to exert this neuroprotective function.

Key words: RETINA, CELL CULTURE, CHLOROQUINE, HYDROXYCHLOROQUINE AND OXIDATIVE STRESS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura molecular da cloroquina.....	2
Figura 02: Estrutura molecular da hidroxicloroquina.....	3
Figura 03: Diferentes efeitos da hidroxicloroquina.....	5
Figura 04: Estrutura laminar da retina.....	7
Figura 05: Desenho esquemático do globo ocular de aves.....	8
Figura 06: Equação da reação catalisada pelas superóxido dismutases.....	11
Figura 07: Equação da reação catalisada pelas catalases.....	12
Figura 08: Equação da reação catalisada pelas glutations peroxidases.....	13
Figura 09: Representação do ciclo catalítico da glutationa.....	14
Figura 10: Teste de viabilidade por MTT para tratamento com cloroquina ou hidroxicloroquina em cultura mista.....	24
Figura 11: Viabilidade em cultura enriquecida com glia ou neurônios após tratamento com hidroxicloroquina.....	26
Figura 12: Captação de vermelho neutro em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina.....	28
Figura 13: Níveis de espécies reativas de oxigênio em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina.....	29
Figura 14: Níveis intracelulares de ânions superóxidos em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina.....	31
Figura 15: Níveis intracelulares de glutationa total em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina.....	32
Figura 16: Viabilidade em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina por 6 horas.....	33
Figura 17: Captação de vermelho neutro em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina em breve período de exposição.....	34
Figura 18: Níveis intracelulares de ânions superóxidos em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina em breve período de exposição.....	35
Figura 19: Níveis intracelulares de glutationa total em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina em breve período de exposição.....	36
Figura 20: Viabilidade em cultura enriquecida com neurônios exposta a meio condicionado de glia e tratamento com hidroxicloroquina em breve período de exposição.....	37

Figura 21: Níveis intracelulares de glutathiona total em cultura enriquecida com glia após tratamento com hidroxicloroquina.....38

LISTA DE ABREVIACOES

CAT: Catalase

CMF: *Calcium Magnesium-Free medium*

CQ: Cloroquina

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfoxido

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

GSH: Glutationa Reduzida

GSH-Px: Glutationa Peroxidase

GSSG: Glutationa Oxidada

HCQ: Hidroxicloroquina

HClO: cido Hipocloroso

H₂O₂: Peróxido de Hidrognio

KOH: Hidróxido de Potássio

MTT: 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2-5-difenil-2H-tetrazolium bromídrico

mM: Milimolar

NBT: *Nitro Blue Tetrazolium*

µM: Micromolar

µg/mL: Micrograma por mililitro

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reduzida

•OH: Radical Hidroxil

•O₂⁻: nion Superóxido

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

ROO•: Radicais Peroxis

rpm: Rotação por Minuto

SOD: Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Antimaláricos cloroquina e hidroxiclороquina.....	1
1.2 Retina.....	5
1.3 Estresse oxidativo.....	9
1.4 Sistema de defesa antioxidante.....	10
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Obtenção e preparo da cloroquina e da hidroxiclороquina.....	17
3.2 Cultivo das células.....	17
3.2.1 <i>Cultura mista de células da retina (células gliais e neuronais)</i>	17
3.2.2 <i>Cultura enriquecida de glia</i>	17
3.2.3 <i>Cultura enriquecida de neurônios</i>	18
3.3 Ensaio de viabilidade celular.	18
3.4 Análise de função lisossomal.....	18
3.5 Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio.....	19
3.5.1 <i>Níveis totais de espécies reativas de oxigênio</i>	19
3.5.2 <i>Níveis de ânions superóxidos</i>	20
3.6 Obtenção das amostras para análises dos níveis de glutathione total.....	20
3.7 Quantificação dos níveis de glutathione total.....	21
3.8 Quantificação dos níveis de proteína.....	21
3.9 Obtenção e utilização de meio condicionado.....	22
3.10 Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Cloroquina tem maior citotoxicidade sobre cultura mista de células da retina quando comparada a hidroxiclороquina.....	23
4.2 Hidroxiclороquina é mais citotóxica para neurônios que para glia da retina.....	25
4.3 Hidroxiclороquina altera pH de organelas ácidas em células neuronais.....	27
4.4 Hidroxiclороquina altera os níveis de espécies reativas de oxigênio em cultura enriquecida com neurônios.....	28

4.5 Hidroxicloroquina reduz os níveis intracelulares de ânions superóxidos em cultura enriquecida com neurônios.....	30
4.6 Os níveis intracelulares de glutathione total são reduzidos em cultura enriquecida com neurônios.....	31
4.7 Hidroxicloroquina altera viabilidade neuronal mesmo em breve período de exposição.....	32
4.8 Hidroxicloroquina não altera pH de organelas ácidas de neurônios em breve período de exposição.....	33
4.9 Hidroxicloroquina reduz os níveis intracelulares de ânions superóxidos em neurônios em breve exposição.....	34
4.10 Hidroxicloroquina não altera os níveis de glutathione total em neurônios em breve exposição.....	35
4.11 Glia induz neuroproteção contra ação citotóxica da hidroxicloroquina por meio de fatores liberados no ambiente extracelular.....	36
4.12 Hidroxicloroquina não altera os níveis de glutathione total em células gliais.....	38
5. CONCLUSÃO.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 Antimaláricos cloroquina e hidroxicloroquina

No ano de 1934, em seu trabalho em busca de novos agentes antimaláricos na Alemanha, Hans Andersags sintetizou alguns compostos 4-aminoquinolinas. Um dos compostos sintetizados apresentou excelente atividade antimalárica no modelo aviário, no qual os testes foram realizados. Esse composto recebeu o nome de resoquina, mas o responsável pela realização dos ensaios *in vivo* considerou o composto mais tóxico que outros compostos que tinham sido sintetizados juntamente com ele, como a atebrina, por exemplo, como resultado o composto foi abandonado e os pesquisadores dedicaram-se ao estudo de outras substâncias (JENSEN & MEHLHORN, 2009).

Alguns anos mais tarde os dados dos compostos sintetizados por Andersags foram obtidos pelo exército dos Estados Unidos, o que levou à reavaliação das propriedades antimaláricas dos compostos da categoria das 4-aminoquinolinas. A resoquina foi então novamente sintetizada e provou ser mais eficiente no tratamento da malária humana que outras drogas, sendo que nenhum problema envolvendo toxicidade foi atribuído a seu uso nos novos testes realizados, por conseguinte esta foi considerada bem tolerada e altamente efetiva (SLATER, 1993).

Após ter tido resultados satisfatórios no tratamento da malária em militares, a resoquina rapidamente se tornou a droga antimalárica de maior utilização entre a população civil (SLATER, 1993). No entanto, como inicialmente a resoquina havia sido considerada tóxica uma imagem negativa foi atrelada ao seu nome, em decorrência disso, a substância foi lançada no mercado com o novo nome de cloroquina (CQ) (figura 01) (SOLOMON & LEE, 2009).

Além de ser utilizada como droga de primeira escolha na terapêutica da malária, a cloroquina também passou a ser administrada como agente profilático (GINSBURG, 2005). Em uma tentativa de erradicar a malária, o fármaco passou a ser inserido no sal de cozinha em países da América do Sul, África e Ásia (WIESNER *et al*, 2003).

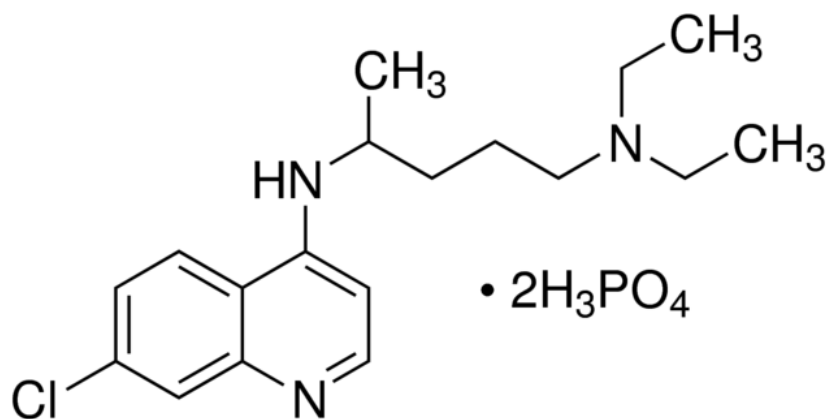


Figura 01: Estrutura molecular da cloroquina.

Fonte: <<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c6628?lang=pt®ion=BR>>>.

O uso massivo da cloroquina resultou no surgimento de resistência nas cepas de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, espécies responsáveis pela maioria dos casos de malária (WELLEMS & PLOWE, 2001). Além da ocorrência de resistência, surgiram registros de complicações nos usuários do fármaco tais como: alterações gastrointestinais, prurido e distúrbios visuais (SHICHIRI *et al*, 2012).

Devido ao surgimento dos casos de resistência e aos efeitos colaterais decorrentes do tratamento com cloroquina, novos fármacos foram desenvolvidos na tentativa de substituir a cloroquina, como o proguanil, pirimetamina, trimetoprima, sulfadoxina (FAROOQ & MAHAJAN, 2004), além da hidroxicloroquina (HCQ) (SAMES *et al*, 2016).

A hidroxicloroquina é um derivado hidroxilado da cloroquina sintetizado no ano de 1946 (figura 02). O fármaco se apresenta como uma base fraca com propriedades anfifílicas que exibe mais dificuldades que a cloroquina para atravessar a membrana plasmática das células (BROWNING, 2014). Estudos revelaram que a hidroxicloroquina apresenta metade da eficácia e também da toxicidade da cloroquina (MOSCHOS *et al*, 2015).

O fármaco é absorvido cerca de 2 a 4 horas após administração por via oral. A determinação das concentrações plasmáticas da hidroxicloroquina não é precisa, pelo alto nível de sequestro tecidual sofrido pela mesma, mas estima-se que para uma dose de hidroxicloroquina de 6,0-6,5 mg/kg/dia atinja-se a concentração plasmática de 1,4 a 1,5. 10⁻⁶ M/L (BROWNING, 2014).

Com relação à distribuição o fármaco atinge todas as áreas do corpo, sendo que estruturas como olhos, fígado, pele, pulmões e outras áreas ricas em melanina, apresentam capacidade de reter prolongadamente o mesmo (FERRAZ *et al*, 2014). As concentrações teciduais de hidroxicloroquina podem variar muito, sendo que as diferenças refletem a taxa de

sequestro do fármaco pelos lisossomos e pela melanina, pelos quais ele tem afinidade, visto que concentrações na ordem de milimolar podem ser encontradas no lúmen dos lisossomos, e a melanina pode se ligar a uma quantidade de fármaco de mais de 3% do seu próprio peso (BROWNING, 2014).

A principal via de excreção do fármaco é renal, 23 a 25% do composto excretado apresenta-se em sua forma inalterada, sendo o restante constituído por seus metabólitos (FERRAZ *et al*, 2014). Contudo pelo fato da hidroxicloroquina apresentar capacidade de se acumular em muitos tecidos, ela pode ser encontrada na urina de pacientes vários anos após o fim do tratamento (BROWNING, 2014).

Durante o período da segunda guerra mundial, observou-se que soldados tratados com o antimalárico quinacrina, como medida profilática contra malária, apresentavam melhora em quadros de doenças como artrite inflamatória e erupções cutâneas. Pouco tempo depois, a cloroquina e a hidroxicloroquina também mostraram ter resultados benéficos no tratamento destas e outras séries de doenças, como lúpus eritematoso sistêmico, urticária solar entre outras (BROWNING, 2014).

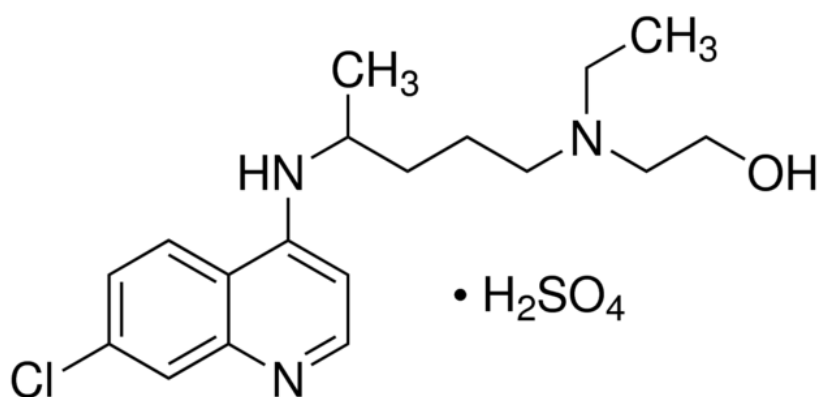


Figura 02: Estrutura molecular da hidroxicloroquina.

Fonte: <<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h0915?lang=pt®ion=BR>>>.

O uso da cloroquina e da hidroxicloroquina então se expandiu muito, proporcionalmente ao número de condições patológicas as quais estas passaram a ser empregadas. Contudo, devido a casos de efeitos colaterais graves relacionados ao uso da cloroquina que geraram múltiplos processos judiciais no Japão, a utilização dos derivados de

4-aminoquinolinas foi proibida para uso clínico de rotina neste país, sendo também a utilização de cloroquina restringida nos Estados Unidos devido aos mesmos incidentes. Entretanto, a utilização da hidroxicloroquina foi mantida nos Estados Unidos, e em países como Canadá, México, Brasil e países europeus a venda dos dois fármacos é liberada para uso clínico (BROWNING, 2014).

Por ser menos tóxica a hidroxicloroquina passou a figurar como medicamento de primeira linha para o tratamento de várias doenças, substituindo a cloroquina em várias partes do mundo (PASADHIKA & FISHMAN, 2010). E juntamente com o crescente entendimento dos mecanismos de ação desse fármaco, tem se expandido as perspectivas terapêuticas para sua utilização no tratamento de várias doenças, além das já citadas (SILVA *et al*, 2013).

Apesar de seu maior perfil de segurança a hidroxicloroquina tem efeitos colaterais registrados, dentre os quais se incluem cardiopatia, miopatia vascular, hipoglicemia em pacientes com diabetes tipo 2 e necrose de células hepáticas (MOSCHOS *et al*, 2015). Não obstante, os efeitos mais preocupantes decorrentes do tratamento com este fármaco são os danos ao tecido retiniano, parte integrante do sistema nervoso central, que apesar de não terem alta frequência, não regredem com a descontinuidade do tratamento, podendo até progredir para perda visual total (MARMOR *et al*, 2002).

Com o crescente interesse pela hidroxicloroquina novos estudos foram realizados e atualmente sabe-se que a hidroxicloroquina atua em vários mecanismos celulares dentre os quais destacam-se: sua interferência com a acidificação lisossomal, inibição da proteólise e processamento de antígenos; diminuição na produção de citocinas em células de defesa; inibição da enzima fosfolipase A2; inibição na sinalização de cálcio mediada por receptores de células B e T e inibição do sinal de receptores *toll-like* (figura 03) (BEN-ZVI *et al*, 2012). Contudo apesar do aumento no conhecimento a respeito do modo como a hidroxicloroquina atua em vários mecanismos celulares, e mesmo em tipos celulares diferentes, a via pela qual esse fármaco exerce seus efeitos nocivos sobre o tecido retiniano não é completamente conhecida.

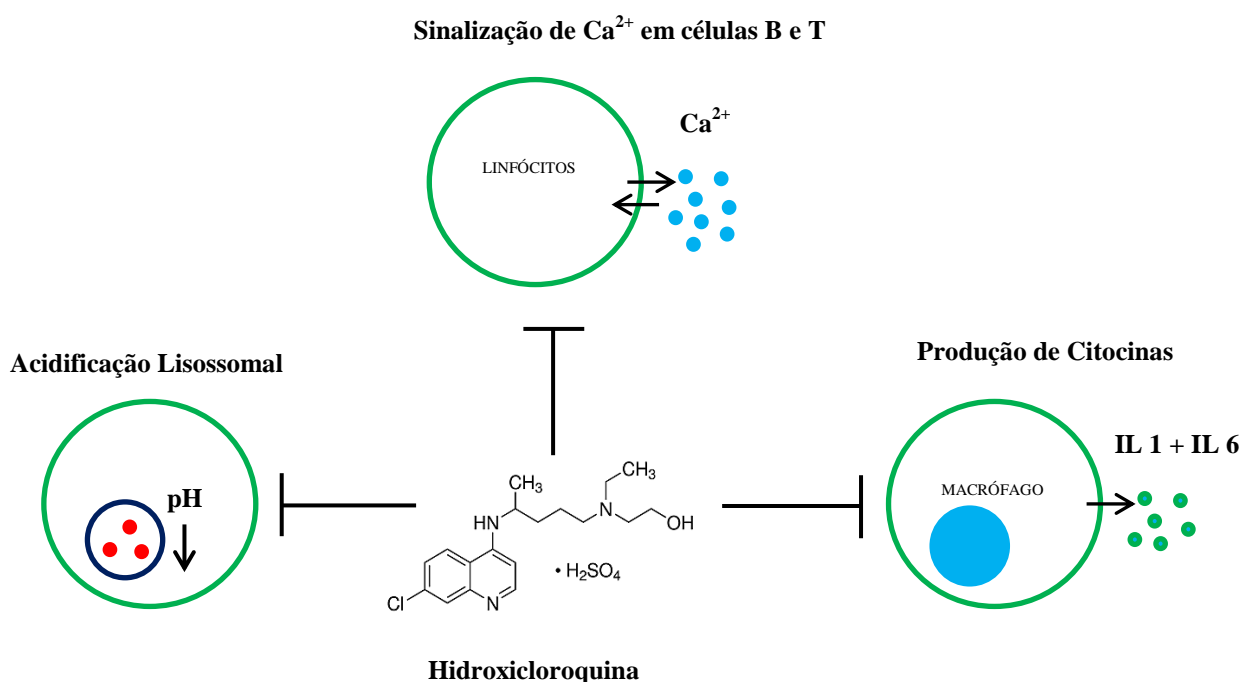


Figura 03: Diferentes efeitos da hidroxicloroquina. O fármaco tem distintas ações sobre tipos celulares diferentes, dentre elas destacam-se: inibição da sinalização de íons cálcio em linfócitos B e T, interferência na acidificação de compartimentos ácidos das células (lisossomos) e diminuição da produção de citocinas em macrófagos. Fonte: (Adaptado de BEN-ZVI *et al*, 2012).

Desta forma, com base no crescente interesse na utilização de agentes antimaláricos clássicos, como a hidroxicloroquina, para vários fins terapêuticos, e tendo em vista seus efeitos sobre a retina, cujos mecanismos não são de todo elucidados, justifica-se a necessidade de trabalhos que objetivem ampliar os conhecimentos sobre os efeitos desse fármaco na fisiologia de células do tecido retiniano.

1.2 Retina

O olho é uma das estruturas mais complexas do corpo humano, ele é protegido no interior de uma cavidade óssea chamada órbita, formada pelos ossos faciais do crânio, contando com uma série de estruturas acessórias que atuam para sua movimentação (músculos extrínsecos), proteção (as pálpebras) e limpeza (aparelho lacrimal) (SILVERTHORN, 2010).

O globo ocular, como também é denominado o olho, é constituído por três camadas bem distintas entre si. A camada mais externa é formada pela esclera e pela córnea. A esclera é constituída por tecido conectivo que confere proteção e auxilia na manutenção da forma de bulbo do olho, já a córnea refrata a luz para o interior do espaço ocular. A camada mediana é formada pela íris, corpo ciliar e coroide. A íris, o disco colorido do olho, controla o diâmetro da pupila que corresponde a sua abertura central, permitindo controlar a quantidade de luz que adentra o olho, o corpo ciliar sustenta e controla o formato da lente, e a coroide, que é uma camada vascularizada, fornece nutrientes e oxigênio para a camada subsequente do globo ocular. A porção mais interna do olho é a retina, uma estrutura complexa formada por neurônios que se dispõem em camadas, que captam e processam a luz incidida sobre eles (WILLOUGHBY *et al*, 2010).

O plano fundamental de arquitetura da retina é altamente conservado entre os vertebrados. A retina é o tecido fotossensível do olho sendo formada por células interconectadas que se organizam formando camadas bem definidas. São reconhecidas cinco classes principais de células neuronais compondo a retina, a saber, fotorreceptores, células bipolares, amácrinas, horizontais e células ganglionares, além de um tipo de célula glial conhecida como glia de Müller (HOON *et al*, 2014).

As células que formam o tecido retiniano são agrupadas formando três camadas. A primeira camada é chamada de camada nuclear externa, onde residem os corpos celulares das células fotorreceptoras, a segunda é a camada nuclear interna onde se encontram os corpos celulares das células bipolares, amácrinas e horizontais e, por fim, a camada de células ganglionares onde estão os corpos celulares das células ganglionares (GOLDMAN, 2014). Os locais onde estas células realizam contatos sinápticos são chamados de camadas plexiformes. Na camada plexiforme externa estão os terminais sinápticos das células fotorreceptores, horizontais e das células bipolares, enquanto na camada plexiforme interna, os contatos entre as células bipolares, amácrinas e ganglionares (figura 04) (HOON *et al*, 2014).

Fotorreceptores, cones e bastonetes, são células fotossensíveis que recebem o estímulo luminoso e o convertem em sinal elétrico, processo conhecido como fototransdução. Após esse processo, o sinal elétrico é modulado por uma série de células até chegar às células ganglionares cujos axônios se unem formando o nervo óptico, este então deixa a retina e se encaminha para as vias visuais superiores (CUENCA *et al*, 2014).

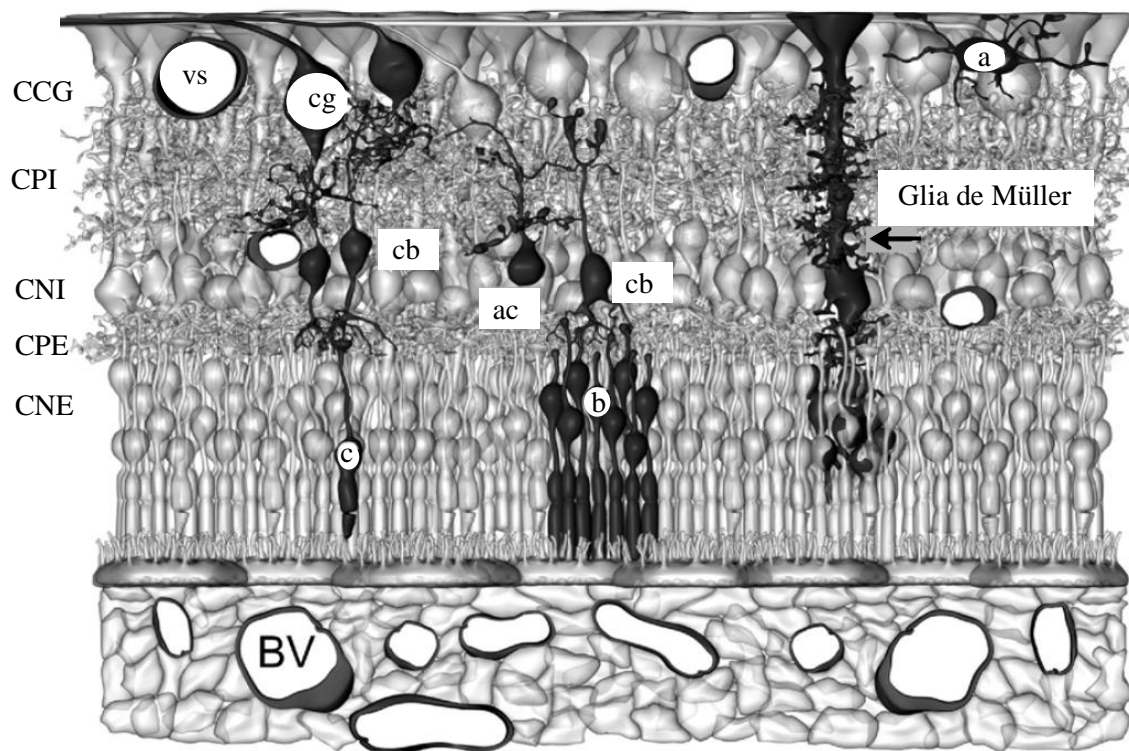


Figura 04: Desenho esquemático da retina. Camada de células ganglionares (CCG); camada plexiforme interna (CPI); camada nuclear interna (CNI); camada plexiforme externa (CPE); camada nuclear externa (CNE); vasos sanguíneos (vs); astrócitos (a); cones (c); bastonetes (b); célula ganglionar (cg); célula amácrina (ac) e célula bipolar (cb). Fonte: (Adaptado de BRINGMANN *et al*, 2013).

Um tipo celular não neuronal de fundamental importância para a homeostase do tecido retiniano é a glia de Müller. Esse tipo celular é a principal célula macrogliial presente na retina, estendendo-se por quase toda a extensão do tecido (MCGILLEM *et al*, 1998). Em situações em que há injúria na retina a glia de Müller pode proliferar, alterar sua forma, mudar o transporte de íons e secretar moléculas sinalizadoras, atuando para a proteção e reparo de células neuronais, mantendo assim a funcionalidade do tecido (DYER & CEPKO, 2000).

Por sua estrutura e função complexa o tecido retiniano se torna susceptível a muitas injúrias (CUENCA *et al*, 2014). Podemos destacar as alterações decorrentes da produção de espécies reativas de oxigênio, onde vários fatores contribuem para a sua formação, entre eles a alta taxa de consumo de oxigênio da retina, exposição a altos níveis de radiação, presença de células com membranas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, que são facilmente oxidados, e processo de fagocitose, que por si só é fonte de produtos que podem vir a danificar o tecido (BEATTY *et al*, 2000).

Neste trabalho o modelo experimental escolhido para realização dos ensaios foi o de cultura de células da retina de embrião de galinha. Embriões de galinha figuram como um dos modelos de estudo animal mais utilizado por várias características, dentre as quais se destacam: seu rápido desenvolvimento e seu fácil acesso para manipulação experimental. Sendo um dos modelos preferidos para análise de desenvolvimento, mas contribui também para os campos da biologia celular, imunologia, biologia do câncer e para as neurociências (VERGARA & CANTO-SOLER, 2012, do Nascimento et al 1985, 1998).

Com relação à estrutura visual dos embriões de galinha, estes apresentam globos oculares com crescimento rápido, crescendo cerca de 100µm por dia, o que facilita o estudo com este modelo animal (BUENO *et al*, 2011). E o fato da estrutura da retina ser conservada entre os vertebrados é outro fator que favorece a utilização deste tecido como modelo experimental (JOSELEVITCH, 2008).

Uma das principais diferenças entre a retina de aves e a de mamíferos é o fato da primeira ser um tecido avascular, que conta com uma estrutura característica chamada pecten ocular para atender as necessidades de nutrientes e oxigênio das células da retina. O pecten ocular é um tecido em forma de folheto que se estende para dentro da cavidade ocular, sendo embebida pelo corpo vítreo. Ele é rico em tecido conectivo, pigmentos e vasos sanguíneos (figura 05) (LI & SHEFFIELD, 2016).

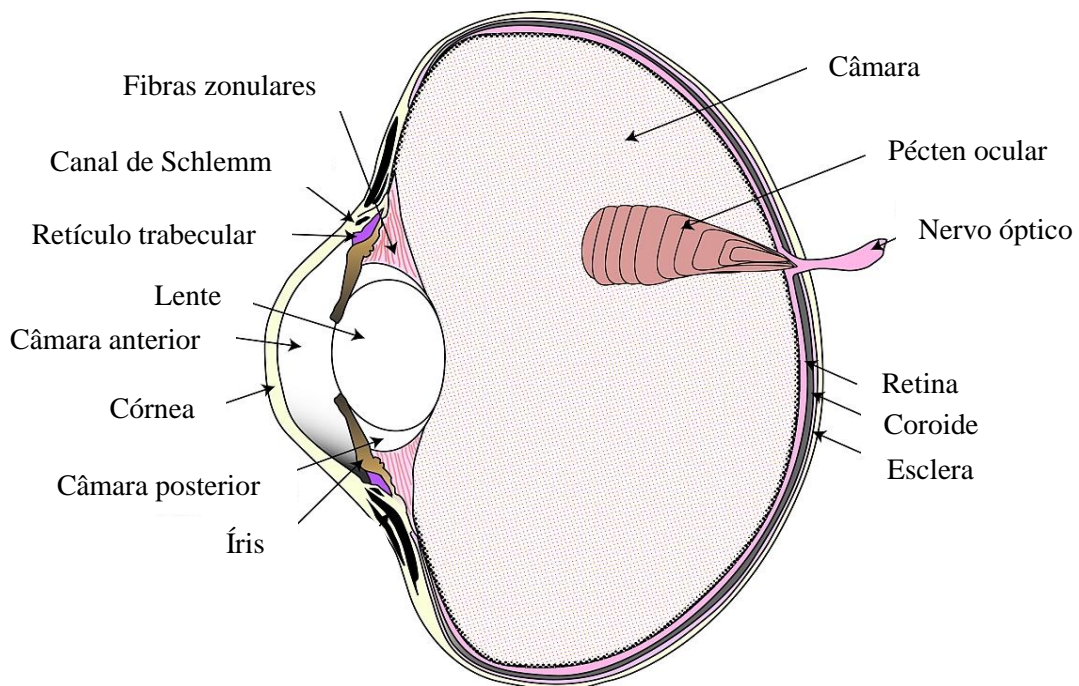


Figura 05: Desenho esquemático do globo ocular de aves. A figura mostra várias estruturas do globo ocular comum entre vertebrados, contudo destaca-se uma estrutura exclusivamente encontrada

em aves, o pecten ocular que se projeta para o interior do corpo vítreo. Adaptado da fonte: [>>](http://www.poultryhub.org/physiology/body-systems/nervous-systems-important-sensory-organs/).

Apesar de suas peculiaridades, a retina de ave é um modelo experimental eficiente e amplamente utilizado para fins experimentais, nos mais diferentes campos de pesquisas.

1.3 Estresse oxidativo

Durante a atividade metabólica normal dos organismos aeróbicos, o oxigênio atua comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória que ocorre na membrana mitocondrial das células, sendo posteriormente convertido em água. Durante esse processo uma pequena porcentagem dos elétrons escapa e reage com o oxigênio no início da cadeia respiratória, gerando ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). Alguns estudos demonstram que 1 a 2% dos elétrons que escapam da cadeia respiratória reagem com oxigênio molecular formando $\cdot\text{O}_2^-$. Além dos elementos da cadeia respiratória outros componentes celulares passaram a utilizar o oxigênio, como é o caso das enzimas do complexo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida oxidase (NADPH oxidase), da xantina oxidase, das enzimas que metabolizam ácido araquidônico, entre outras, o que acarreta o aumento na produção de superóxido (ALZOGHAIBI, 2013).

O ânion superóxido gerado pode ser convertido em compostos ionizantes como radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), radicais peroxis ($\text{ROO}\cdot$), e em oxidantes moleculares como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO) (KUNWAR & PRIYADARSINI 2011). Estes compostos são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) e podem ser classificados em dois grandes grupos, os radicais livres e os não-radicalares. As moléculas que apresentam um ou mais elétrons não pareado têm grande reatividade e são denominadas de radicais livres, como o $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ e $\text{ROO}\cdot$, quando dois radicais livres compartilham seus elétrons não pareados são formados compostos não-radicalares, como H_2O_2 e o HClO (BIRBEN *et al*, 2012).

O aumento dos níveis de EROs podem desempenhar uma série de efeitos danosos nas células como a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, inativação enzimática, ativação excessiva de genes pró-inflamatórios e danos ao material genético (SILVA & FERRARI, 2011). Para minimizar o potencial nocivo das EROs sobre as biomoléculas, as células possuem um complexo de moléculas conhecidas como antioxidantes, que controlam os níveis

de EROs e, desta forma, impedem que elas exerçam seus efeitos potencialmente danosos às células (HALLIWELL, 2007). Entretanto, as EROs não são de todo prejudiciais no ambiente celular, uma vez que vários eventos fisiológicos importantes envolvem sua participação. Em baixas concentrações, as EROs são reconhecidas por atuarem na proliferação, diferenciação e migração celular, além de participarem da estimulação da síntese de proteínas (GORRINI *et al*, 2013), apoptose (WEYDERT & CULLEN, 2010) e da defesa contra microorganismos invasores (FILIPPIN *et al*, 2008).

O desequilíbrio entre a produção de espécies pró-oxidantes, entre elas as EROs, e os antioxidantes, estabelece uma condição denominada estresse oxidativo (SYSLOVÁ *et al*, 2014). Muitos quadros patológicos parecem envolver o estresse oxidativo como; arteriosclerose, artrite reumatoide, pancreatite aguda, (THANAN *et al*, 2015), hipertensão, diabetes mellitus (YOSHIKAWA & NAITO, 2002), câncer e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (BREITENBACH & ECKL, 2015). Medicamentos usados no tratamento de certas doenças podem favorecer a produção de EROs e assim, contribuir para o desenvolvimento do estresse oxidativo (DEAVALL *et al*, 2012). Sendo a hidroxicloroquina relatada como causadora de estresse oxidativo em estruturas como nervo ciático e tecido muscular (UZAR *et al*, 2012).

1.4 Sistema de defesa antioxidante

Todos os organismos que fazem uso do oxigênio necessitam de um mecanismo celular de defesa, para minimizar os efeitos dos seus subprodutos tóxicos. Esse mecanismo, denominado de sistema de defesa antioxidante, é formado por compostos que podem ser exógenos, são adquiridos de fontes externas ao organismo, ou endógenos, que são sintetizados pelo próprio organismo (GARCÍA, 2002). Antioxidantes são definidos como substâncias que quando presentes, mesmo em pequenas concentrações, têm a capacidade de retardar ou prevenir significativamente a oxidação de um substrato (HALLIWELL *et al*, 2007). Essas substâncias podem atuar de diferentes modos para proteger as células de danos oxidativos. Elas podem impedir a formação de radicais livres ou espécies não-radicalares (sistema de prevenção), evitar a ação desses (sistema varredor) ou favorecer o reparo de estruturas celulares danificadas (sistema de reparo) (BARBOSA *et al*, 2010).

Os antioxidantes podem também ser classificados como enzimáticos e não-enzimáticos dependendo de sua atividade biológica. Os antioxidantes não-enzimáticos incluem as moléculas exógenas vitaminas E e C, betacarotenóides e flavonoides, que são incorporados ao organismo por meio da dieta, e a molécula endógena glutathione, rica em grupamentos sulfidrilas (ROHENKOHL *et al*, 2011; GARCÍA, 2002). Entre os antioxidantes enzimáticos destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSHPx), sintetizadas pelo próprio organismo (HO *et al*, 1998).

A superóxido dismutase é uma enzima conhecida por catalisar a conversão de dois $\cdot\text{O}_2^-$ em peróxido de hidrogênio e oxigênio (figura 06) (MCCORDS & FRIDOVICH, 1969).



Figura 06: Equação da reação catalisada pelas superóxido dismutases.

Atualmente é conhecido um conjunto de superóxido dismutases (SODs) que pertence a família de metaloenzimas, utilizam metais de transição em seu sítio ativo, encontradas desde bactérias até mamíferos, com pequenas diferenças entre si. Nas bactérias as SODs apresentam duas isoformas, um dependente de ferro (Fe-SOD) e a outra dependente de manganês (Mn-SOD). Em mamíferos três isoformas da enzima podem ser reconhecidas (DAVIES, 2000).

Em humanos as três isoformas de SOD são encontradas em diferentes espaços celulares. A SOD1 ou SOD dependente de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD) se localiza no citoplasma celular, a SOD2 ou SOD dependente de manganês (Mn-SOD) se localiza na mitocôndria, e a SOD3 também dependente de cobre e zinco é encontrada no espaço extracelular. Elas são codificadas por seus próprios genes em cromossomos diferentes e atuam contra injúrias oxidativas no local onde são residentes, protegendo a célula como um todo (SHIBATA *et al*, 1998).

As SODs atuam como primeira linha de defesa enzimática contra o estresse oxidativo. Quando, por alguma causa, há diminuição da expressão dos genes relacionados às SODs ou alteração em sua função, condições patológicas podem ser observadas. Por exemplo, mutações na SOD1 têm sido relacionadas com esclerose lateral amiotrófica, enquanto que perda de SOD2 tem sido associada com morte neonatal (FATTMAN *et al*, 2003). No tecido

retiniano alterações na expressão de SODs têm sido relacionadas com retinopatia diabética, demonstrando que estas enzimas são de fundamental importância para a homeostase no ambiente celular (KOWLURU & ABBAS, 2003).

Outra enzima antioxidante, a catalase foi descoberta inicialmente em plantas por catalisar a decomposição de H₂O₂. Atualmente são conhecidas três classes de proteínas, que exibem atividades similares e são classificadas como catalases. Estas proteínas são agrupadas da seguinte forma: catalases monofuncionais, catalases bifuncionais e catalases contendo manganês. As catalases monofuncionais possuem um grupo heme em sua constituição, são as mais abundantes na natureza e as melhores estudadas. As catalases bifuncionais também contêm um grupo heme e são estrutural e funcionalmente relacionadas às peroxidases de plantas. O último grupo, as catalases contendo manganês, não contêm grupo heme em sua estrutura e sim íons de manganês em seu sítio ativo, de onde deriva seu nome, são as menos abundantes sendo encontradas, até então, somente em bactérias (CHELIKANI *et al*, 2004).

No que diz respeito à estrutura da catalase encontrada em mamíferos, esta é uma enzima tetramérica formada por quatro subunidades idênticas, com quatro grupos de ferriprotoporfirina e uma massa molar total de 249 KDa, sendo considerada uma das mais eficientes enzimas conhecidas (MATÉS, 2000). A enzima catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular sem gerar outras EROs nesse processo, contribuindo para manter o ambiente intracelular redutor adequado as necessidades metabólicas das células (figura 07) (MARTINS & ENGLISH, 2015).



Figura 07: Equação da reação catalisada pelas catalases.

Em humanos a enzima é expressa em todos os tecidos, atingindo altas concentrações no fígado, rins e nos eritrócitos (NISHIKAWA *et al*, 2009). A catalase é encontrada dentro dos peroxissomos das células, onde exerce sua função catalítica sobre o H₂O₂ gerado por meio da atividade de oxidases (SCHAD *et al*, 2003). Em concentrações fisiológicas, na ordem de micromolar, o H₂O₂ exerce funções importantes como, por exemplo, a modulação da liberação de dopamina. Contudo, em altos níveis no organismo ele é relacionado com uma

série de condições patológicas (CHEN *et al*, 2001). Nesse sentido torna-se notável a importância de mecanismos que regulem os níveis de H₂O₂ no ambiente celular, como os exercidos pela enzima catalase.

Além da superóxido dismutase e da catalase, outra enzima importante no sistema de defesa antioxidante é a glutathiona peroxidase, que foi descoberta inicialmente em eritrócitos de mamíferos e possui a função de proteger as células de hemólise por danos oxidativos, visto que esta enzima promove a redução de peróxido de hidrogênio em água (DAYER, 2008). Existe um conjunto de enzimas que pertencem à família das glutathionas peroxidases. Em mamíferos, várias isoformas da enzima são distinguidas como base na sequência de aminoácidos, substrato específico e localização subcelular (MATAMOROS *et al*, 2015).

As glutathionas peroxidases podem ser divididas em duas categorias, a primeira formada pelas enzimas que contêm resíduos de selenocisteína em seu sítio ativo e a segunda, formada pelas que contêm apenas cisteína em seu sítio ativo. Pelo fato dos resíduos de selenocisteína serem mais reativos que a cisteína sozinha, o grupo de glutathionas peroxidases que o contêm são mais eficientes em sua ação de reduzir EROs (MATAMOROS *et al*, 2015).

Dentre as glutathionas peroxidases contendo selenocisteína podem ser destacadas em mamíferos as isoformas de glutathiona peroxidase citoplasmática (GSH-Px1), gastrointestinal (GSH-Px2), plasmática (GSH-Px3) e hidroperóxido de fosfolípídeo (GSH-Px4) (VÍTOVÁ *et al*, 2011). Apesar de suas peculiaridades estas enzimas atuam, de forma geral, em catalisar o processo de redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos em água e seus álcoois correspondentes, usando glutathiona reduzida como cosubstrato (figura 08) (GUO *et al*, 2014).



Figura 08: Equação da reação catalisada pelas glutathionas peroxidases.

Compondo o sistema antioxidante endógeno não-enzimático, a molécula de glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo formado pela ação consecutiva de duas enzimas. Primeiro a enzima γ -glutamylcisteina sintetase catalisa a união dos aminoácidos ácido glutâmico e cisteína. Estes são posteriormente ligados à glicina por meio da ação enzimática da glutathiona

sintetase, formando o tripeptídeo γ -glutamilcisteinilglicina, também chamado de glutatona reduzida. Após a utilização da GSH pela glutatona peroxidase esta passa para sua forma oxidada (GSSG), onde duas moléculas de GSH são unidas por uma ponte dissulfeto. Para que a GSSG retorne a sua forma reduzida, forma útil para as glutatonas peroxidases, ocorre um ciclo catalítico onde a enzima glutatona redutase utilizando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH), reduz a molécula de GSSG a GSH (figura 09) (HUBER & ALMEIDA, 2008).

Em condições fisiológicas normais tanto GSH como GSSG então presentes na célula, sendo a forma reduzida predominante sobre a forma oxidada. A proporção de GSH/GSSG em condições normais é da ordem de 100, e a manutenção desta proporção é fundamental para conservar o ambiente celular redutor e, conseqüente, a sobrevivência das células (ABDALLA, 2011). Além de servir como cosubstrato para GSH-Px na redução de EROs a GSH por si só pode reagir diretamente com eletrófilos e xenobióticos para proteger a célula de danos (WU, 2004).

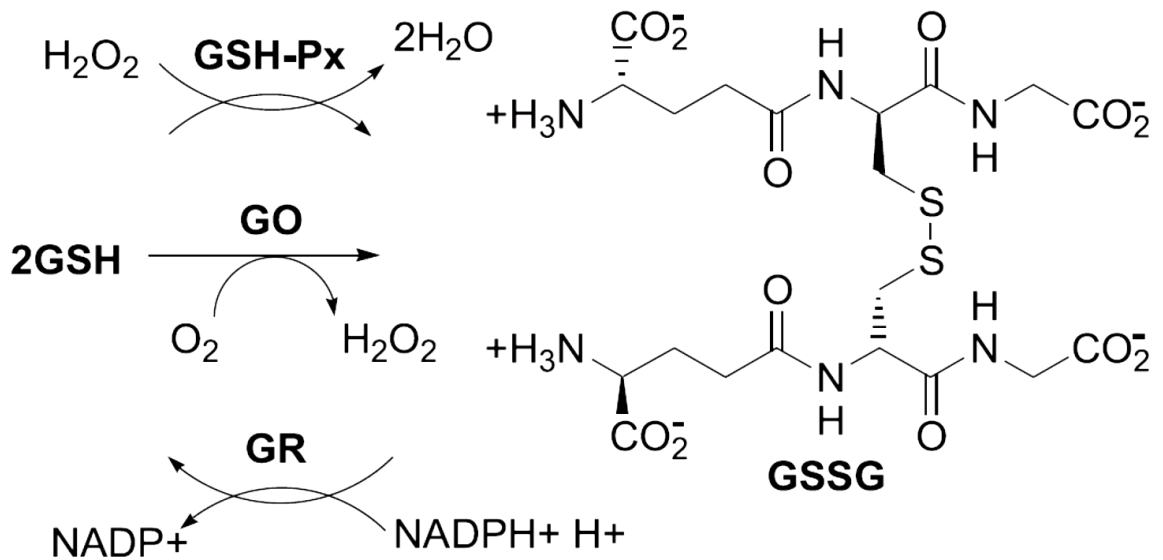


Figura 09: Representação do ciclo catalítico da glutatona. A glutatona oxidase (GO) e a glutatona peroxidase (GSH-Px) convertem moléculas de glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG) e a glutatona redutase (GR) restabelece o estado reduzido da glutatona usando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH). Fonte: (HUBER & ALMEIDA, 2008).

Tanto a atividade de GSH-Px como a manutenção das taxas de GSH são importantes para manter a integridade dos sistemas biológicos, sendo que alterações nas mesmas pode acarretar em várias desordens (TOWNSEND *et al*, 2003).

Tendo em vista o amplo interesse pela utilização de fármacos usados classicamente como agentes antimaláricos, tais como a cloroquina e seu derivado hidroxicloroquina, para os mais variados fins terapêuticos na atualidade, e tendo ciência de seus efeitos sobre o tecido retiniano, cujos mecanismos não são de todo compreendidos. Este trabalho busca esclarecer os possíveis efeitos que o fármaco hidroxicloroquina pode exercer sobre células do tecido retiniano, que uma vez alteradas podem acarretar em perda visual.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos citotóxicos do fármaco antimalárico hidroxiclороquina sobre células da retina usando modelo de cultura de células da retina de embrião de galinha.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar os efeitos citotóxicos dos fármacos cloroquina e hidroxiclороquina sobre a viabilidade de culturas mistas (glia e neurônios) da retina de embrião de galinha;
- Avaliar os efeitos da hidroxiclороquina sobre a viabilidade de culturas enriquecidas com glia ou neurônios;
- Avaliar os efeitos da hidroxiclороquina sobre lisossomos de células neuronais.
- Quantificar a produção de EROs em culturas de células enriquecidas com neurônios após tratamento com hidroxiclороquina;
- Determinar os efeitos da hidroxiclороquina sobre os níveis totais de glutathiona em culturas enriquecidas com neurônios.
- Verificar os efeitos do meio condicionado de células da glia sobre a viabilidade de culturas enriquecidas com células neuronais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e preparo da cloroquina e da hidroxicloroquina

Os fármacos difosfato de cloroquina ($C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$) e sulfato de hidroxicloroquina ($C_{18}H_{26}ClN_3O \cdot H_2SO_4$) foram obtidos da Sigma-Aldrich (C 6628 e H0915). Os mesmos foram usados para preparar as soluções estoques de 20 mM para CQ e 5 mM para HCQ, sendo solubilizados em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e mantidos a $-20^\circ C$ até quando se fez necessário o descongelamento para preparo das concentrações de trabalho.

3.2 Cultivo das células

3.2.1 Cultura mista de células da retina (células gliais e neuronais)

Para realização das culturas mistas foram utilizados ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus* (galinha), fornecidos pela empresa MAKARÚ LTDA, localizada na cidade de Ananindeua-PA.

Os globos oculares dos embriões com oito dias de desenvolvimento (E8) foram retirados da órbita ocular e depositados em placas de Petri contendo meio livre de cálcio e Magnésio (CMF do inglês *Calcium Magnesium-Free medium*), onde foram dissecados para obtenção do tecido retiniano livre de outros tecidos. Uma vez obtidas, as retinas foram dissociadas quimicamente com tripsina (0,05%) por 10 minutos, seguida de ciclos de dissociação mecânica realizadas com o auxílio de pipetador, sendo as células, em seguida, distribuídas em placas de 24 poços. As culturas foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, e mantidas em estufa a $37^\circ C$ com 5% de CO_2 e 95% de O_2 . O meio foi trocado regularmente até a utilização das mesmas para seus respectivos testes (DO NASCIMENTO *et al*,1998).

3.2.2 Cultura enriquecida de glia

Para as culturas enriquecidas com células gliais, o tecido retiniano foi dissecado de embriões de galinha com onze dias de desenvolvimento embrionário (E11), a retina foi dissecada em CMF, sendo realizada dissociação enzimática, com tripsina 0,05% por 10 minutos, seguida de dissociação mecânica sobre fragmentos de tecido ainda existentes. As células, uma vez segregadas, foram semeadas em placas de cultura de 24 poços. As culturas foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, e mantidas em

estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂. O meio foi trocado uma vez por semana, até que fosse possível observar uma população majoritária de células gliais, o que foi obtido entre três ou quatro semanas de cultivo, quando foram utilizadas para os seus respectivos testes (Adaptado de REIS *et al*, 2002).

3.2.3 Cultura enriquecida de neurônios

Para realizar o cultivo enriquecido com células neuronais foram usadas placas de cultura de células de 24 poços. Cada poço das placas de cultura foi tratado com 300 µL de Poli-L-Lisina (10 µg/mL) ou Poli-L-Ornitina (10 µg/mL) por uma hora, e posteriormente foi lavado com 500 µL de tampão fosfato salino (PBS do inglês *Phosphate Buffered Saline*). As células foram obtidas a partir de tecido retiniano de embriões E8. As culturas foram preparadas de modo similar ao que foi descrito para as culturas mistas (Adaptado de GARCÍAS *et al*, 2007).

3.3 Ensaio de viabilidade celular

Com o objetivo de verificar a viabilidade das culturas expostas à cloroquina ou hidroxicloroquina foi utilizado o método fotolorimétrico baseado no composto 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2-5-difenil-2H-tetrazolium bromídrico (MTT). O método consiste na redução do composto MTT, de coloração amarelada, ao composto formazan, somente por células viáveis, originando um produto de coloração azul que precipita no interior das mitocôndrias e que pode ser solubilizado utilizando-se solução de dimetilsulfóxido (DMSO).

Após os tratamentos, as culturas foram incubadas por 2 horas em solução 0,5 mg/mL de MTT em DMEM sem soro. Após este período o meio de cultura contendo o MTT foi removido e foi adicionado cerca de 500 µL da solução de DMSO em cada poço, em seguida 200 µL do produto resultante de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e lido em leitor de microplaca com a utilização de um feixe de luz com comprimento de 570nm (RODRIGUES *et al*, 2011). Os resultados obtidos foram plotados utilizando à média e o desvio padrão das amostras, expressos em porcentagem do controle.

3.4 Análise de função lisossomal

Este ensaio é baseado na capacidade que células vivas apresentam de incorporar o corante supravital vermelho neutro em compartimentos ácidos, como lisossomos. A captação do corante depende do gradiente de pH mantido pelas células. Em condições homeostáticas,

o corante vermelho neutro, que apresenta carga líquida próxima a zero, em pH fisiológico, penetra as membranas celulares sem dificuldade. Uma vez dentro da célula, o corante tende a se acumular no interior dos lisossomos, visto que há um gradiente de prótons na membrana dos lisossomos que mantém o pH do lúmen dessa organela mais baixo que o do citoplasma. Quando o vermelho neutro entra no lisossomo o ambiente ácido faz com que o corante protone, impossibilitando sua saída da organela. Quando a célula sofre algum tipo de injúria, o gradiente de pH é reduzido, e o corante não é captado (REPETTO *et al*, 2008).

Para realização do ensaio as células foram tratadas com diferentes concentrações do fármaco, por um tempo determinado e após esse período foram incubadas com o corante vermelho neutro (100 µg/mL) preparado em DMEM. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂ por 2 horas. Após o tempo de incubação as células foram lavadas com 500 µL de PBS para remoção do corante não captado, sendo adicionado 500 µL de solução de revelação (acetona e ácido acético - 50%/1%) em cada poço da placa de cultura. Uma vez que o corante foi completamente extraído das células, uma alíquota de 200 µL da solução resultante foi transferida para uma placa de 96 poços, e lida em leitor de microplaca com comprimento de onda de 540nm. Os resultados obtidos foram plotados utilizando à média e o desvio padrão das amostras, expressos em porcentagem do controle.

3.5 Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio

3.5.1 Níveis totais de espécies reativas de oxigênio

Para avaliar os níveis citoplasmáticos de espécies reativas de oxigênio as células foram tratadas com HCQ e posteriormente incubadas com 5µM da sonda CellROX Deep Red por 30 minutos. O controle positivo para a produção de EROs nas células foi feita utilizando peróxido de hidrogênio a 0,01% por 30 minutos. A sonda CellROX é um reagente permeável a membrana das células que quando reduzido apresenta-se não fluorescente, contudo quando a sonda é oxidada, esta passa a exibir forte sinal fluorescente. Os níveis de fluorescência foram mensurados por citometria de fluxo (FACS Canto II), com comprimento de onda de absorção e emissão de 644/665 nm (Adaptado de HUANG *et al*, 2013). Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência de 10.000 eventos contados para cada grupo experimental.

3.5.2 Níveis de ânions superóxidos

Para quantificar a produção intracelular de ânion superóxido após o tratamento das culturas de células, realizou-se o teste quantitativo que tem como composto base o *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) (adaptado de CHOI *et al*, 2006).

O princípio do ensaio se baseia no fato do NBT ser uma substância de coloração amarela, que ao reagir com ânion superóxido forma cristais de formazan de NBT de coloração púrpura, que precipitam no interior da célula. Os depósitos intracelulares de formazan de NBT podem ser solubilizados com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) e DMSO a 99,5%, e posteriormente lidos em leitor espectrofotometricamente indicando assim os níveis de ânion superóxido presentes no ambiente intracelular.

Após os tratamentos, com diferentes concentrações do fármaco por 24 horas, o meio de cultura foi removido e substituído por um novo meio DMEM sem soro contendo 1mg/ml de NBT solubilizado. As células permaneceram com a solução de NBT por duas horas, período no qual foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂. Posteriormente, ao período de incubação as células foram lavadas com 500 µL de PBS e em seguida foi adicionado 200 µL de metanol em cada poço da placa de cultura, retirando rapidamente o mesmo. Seguiu-se a adição de 120 µL de KOH a 2M e de 140 µL de DMSO, obtendo-se a completa solubilização dos depósitos de cristais de formazan de NBT. Em seguida, 200 µL da solução de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços. O branco da reação foi feito utilizando 100 µL de KOH e 100 µL de DMSO. O conteúdo da placa foi lido em leitor de microplaca utilizando-se o comprimento de onda de 570nm. A produção de $\cdot\text{O}_2^-$ foi calculada levando em consideração a absorbância produzida, e os valores foram expressos em porcentagem do controle.

3.6 Obtenção das amostras para análises dos níveis de glutathiona total

Para mensurar os níveis de glutathiona total as células foram lavadas com 300 µL de PBS e posteriormente foi adicionado 300 µL de tampão de lise (20 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA e 1% de Triton) em cada poço, então as amostras foram coletadas por raspagem do fundo da placa e em seguida lisadas por vibração sônica por 10 segundos. As amostras foram então centrifugadas a 10000 rotação por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e separado para quantificação de proteína e para o ensaio de glutathiona total.

3.7 Quantificação dos níveis de glutathiona total

As amostras reservadas para dosar glutathiona total foram desproteinizadas imediatamente após a coleta. Para tal foi utilizado 100 µL de amostra nas quais foi adicionado 41 µL de ácido tricloroacético a 15%. As amostras foram agitadas a 1500 rpm por 1 minuto a 4°C e foram mantidas em repouso por 20 minutos, sendo então submetidas a nova centrifugação de 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Cerca de 100 µL do sobrenadante foi coletado para ser utilizado no teste de dosagem de glutathiona total.

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços nos quais foram adicionados 10 µL de amostra e 150 µL de mistura de trabalho (KH₂PO₄ 100 mM, 1mM de EDTA, 1U/mL de glutathiona redutase e 1 mM de [5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)] (DTNB) pH 7,0). A placa foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida foi adicionado 50 µL de NADPH (0,84 mM) em todos os poços. A placa foi então lida 5 vezes em intervalos de 1 minuto em comprimento de onda de 412nm. Como curva padrão foi utilizada concentrações de glutathiona reduzida que variaram de 3,125 a 50µM.

Para avaliar os níveis de glutathiona total (GSH e GSSG) nas células foi utilizado um ensaio cinético, que tem por base a capacidade que duas molécula de glutathiona reduzida (GSH) possuem de reagir com o composto DTNB, gerando uma molécula de glutathiona oxidada (GSSG) e duas moléculas de 5-tio-2 ácido nitrobenzóico (TNB). Na presença da enzima glutathiona redutase e de NADPH há a redução da forma oxidada e a oxidação do NADPH, formando um ciclo catalítico de GSH-GSSG. A taxa da reação é proporcional à concentração de glutathiona total presente no meio. O TNB formado durante a reação possui coloração amarelada e pode ser medido espectrofotometricamente a 412nm (Adaptado de NAIR *et al*, 1991).

Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados foram expressos considerando a média e o desvio padrão das mesmas, sendo estas corrigidas por quantidade de proteína presente nas amostras.

3.8 Quantificação dos níveis de proteína

Para expressar os valores encontrados nos ensaios concretizados, foi realizada a quantificação de proteínas das amostras, expressando os valores dos ensaios por micrograma (µg) de proteína, sempre que possível.

Para realização do ensaio de determinação da quantidade de proteína nas amostras foi utilizado o teste de BRADFORD (1976). O teste consiste na utilização do cromógeno

composto de 0,1 mg/mL de azul de coomassie G, diluído em 5% de metanol e 8,5% de ácido fosfórico, que reagem com 5 µL das amostras. Para determinar os valores desconhecidos de proteínas nas amostras utiliza-se uma curva padrão de albumina de soro bovino, com as seguintes concentrações, 5, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL. Quando o corante se liga a proteína há a mudança na coloração do mesmo que adquire uma coloração azulada, que será mais intensa quando maior a concentração de proteína.

Após preparada a curva padrão e obtida às amostras, 5 µL de cada um dos elementos tanto da curva quanto das amostras foi transferido para uma placa de 96 poços, em duplicata, e foi adicionado em seguida 250 µL do corante em cada poço utilizado. O produto da reação foi lido em leitor de microplaca em comprimento de onda de 570nm.

3.9 Obtenção e utilização de meio condicionado

Para obtenção do meio condicionado de células gliais as culturas enriquecidas com glia foram preparadas como descrito previamente, após estas apresentarem majoritariamente células gliais o meio de cultivo foi removido sendo substituído por meio DMEM sem soro bovino. As células foram mantidas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂, com meio desprovido de soro. Após este período o meio foi coletado e utilizado para preparo das soluções contendo hidroxicloroquina que foram utilizadas para tratar culturas enriquecidas com células neuronais.

3.10 Análise estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão das amostras com número amostral de 6 usando o programa *Microsoft Excel* 2010. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *Biostat* 5.0, verificando a análise de variância ANOVA, seguida do pós-teste de *Tukey*. Todos os testes estatísticos consideraram probabilidade (valor de p) significativa quando $\leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cloroquina tem maior citotoxicidade sobre cultura mista de células da retina quando comparada a hidroxiclороquina

Inicialmente ambos os fármacos foram testados em culturas mistas de retina de embrião de galinha, nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M por 24 horas, e posteriormente foi realizado teste de viabilidade celular pelo método de MTT. Os resultados mostraram uma redução na viabilidade das células tratadas com CQ, 36 e 61% para as concentrações de 50 μ M e 75 μ M, respectivamente. As células tratadas com HCQ, não apresentaram redução na viabilidade, quando tratadas com as mesmas concentrações (figura 10). Somente com altas concentrações de HCQ (100 μ M e 200 μ M), foram observadas reduções na viabilidade das células, que foram na ordem de 10 e 63%, respectivamente (dados não mostrados).

Os achados citados acima corroboram com descrições encontradas na literatura, sobre o perfil de citotoxicidade dos dois fármacos. PASADHIKA & FISHMAN (2010), descrevem que a cloroquina foi substituída em várias partes do mundo por seu análogo hidroxilado, exatamente por este apresentar maior margem de segurança, sendo tolerado mesmo em altas doses. Contudo, apesar da HCQ ser considerada mais segura, alguns estudos tem apontado o fármaco como causador de efeitos nocivos sobre certos tipos celulares. RAMSER e colaboradores (2009), ao estudarem os efeitos de HCQ sobre fibroblastos da pele de humanos, demonstraram que a concentração de 27 μ M reduz a atividade metabólica das células, e a de 30 μ M inibe a proliferação dos fibroblastos dermais.

Ainda que os testes de viabilidade não indicassem alteração das culturas mistas tratadas com HCQ, a exposição a concentração de 75 μ M mostrou células com alterações morfológicas, quando comparadas ao grupo controle. Então, foi verificado a diferença de resposta a HCQ quando as células eram cultivadas separadamente, em culturas enriquecidas com células gliais ou neuronais.

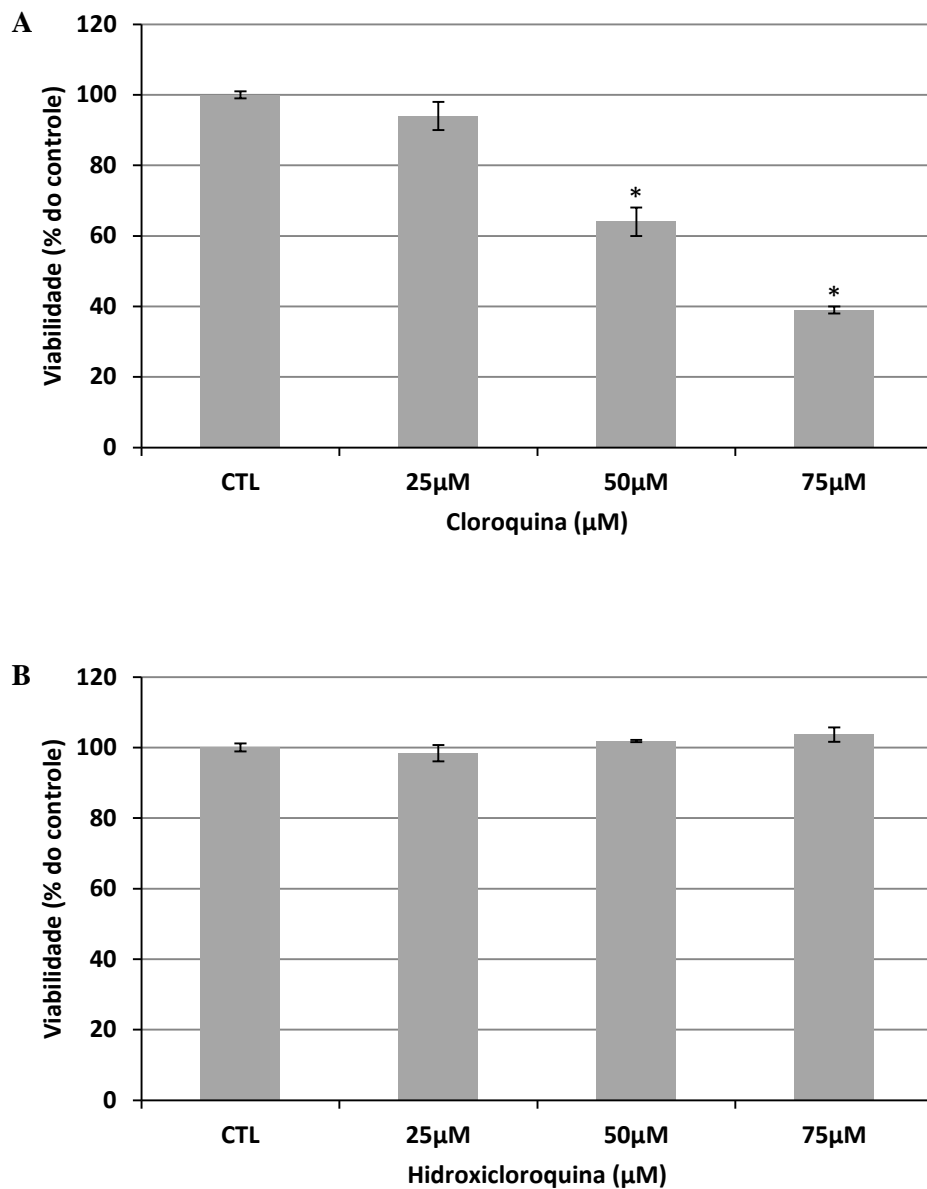


Figura 10: Teste de viabilidade por MTT para tratamento com cloroquina ou hidroxicloroquina em cultura mista. As células de cultura mista de retina de embrião de galinha foram tratadas com diferentes concentrações de cloroquina (A) ou hidroxicloroquina (B) por 24 horas, valores expressos em porcentagem do controle, tendo um número de amostras igual a 3. Análise estatística ANOVA e pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

4.2 Hidroxicloroquina é mais citotóxica para neurônios do que para glia da retina

Culturas de células enriquecidas com glia ou neurônios foram tratadas com HCQ nas concentrações de 25µM, 50µM ou 75µM por 24 horas e, posteriormente, foram realizados testes de viabilidade pelo método de MTT. Os resultados demonstraram que as células da retina, quando cultivadas separadamente, apresentam sensibilidade diferente a HCQ. Em culturas enriquecidas com células gliais a concentração de 75µM diminuiu a viabilidade das células, em torno de 10%, quando comparada ao grupo controle. Enquanto as culturas enriquecidas com neurônios mostraram ser mais sensíveis ainda à ação da HCQ, apresentando redução na viabilidade das células para todas as concentrações testadas (figura 11).

WANG e colaboradores (2015) demonstraram que as linhagens A549 - células de carcinoma do epitélio de pulmão humano, Hepa1-6 - células de hepatoma e WS1 - fibroblastos normais da pele de humanos, tratadas com diferentes concentrações de HCQ por 24 horas, não apresentaram alterações significativas na viabilidade, diferentemente dos dados obtidos neste trabalho. Por outro lado, LEE e colaboradores (2015), ao avaliarem os efeitos de HCQ sobre linhagens de células derivadas de carcinoma renal, demonstraram seu efeito inibidor sobre o crescimento destas linhagens, que mostrou ser dose-dependente, evidenciando ainda que HCQ causa morte celular por apoptose nas células tratadas.

KOCH e colaboradores (2015), ao testarem a ação de HCQ sobre células microgлияis humanas mostraram que não houve ação citotóxica do fármaco, para a concentração máxima testada *in vitro* de 50µM. Este resultado corrobora com o apresentado neste trabalho, uma vez que para culturas enriquecidas com células gliais, concentrações de até 50µM não alteraram a viabilidade das células, somente concentração mais elevada, de 75µM, provou ter ação citotóxica em células gliais da retina.

No que diz respeito às células neuronais, estas apresentaram maior sensibilidade aos efeitos da hidroxicloroquina, sendo que quando expostas a 25µM, menor concentração utilizada no estudo, por um período de 24 horas, apresentaram redução de 20% na viabilidade, quando comparadas ao grupo controle. PIVTORAIKO e colaboradores (2010) descreveram a ação citotóxica da HCQ mesmo em células cancerígenas, como neuroblastoma onde o fármaco reduz a viabilidade destas células na concentração mínima de 20µM, em 48 horas de exposição.

Esses resultados sugerem que há uma resposta particular e diferente de cada tipo celular quando expostas ao fármaco hidroxicloroquina, e no que diz respeito ao ambiente retiniano, os neurônios parecem ser mais severamente afetados do que as células gliais.

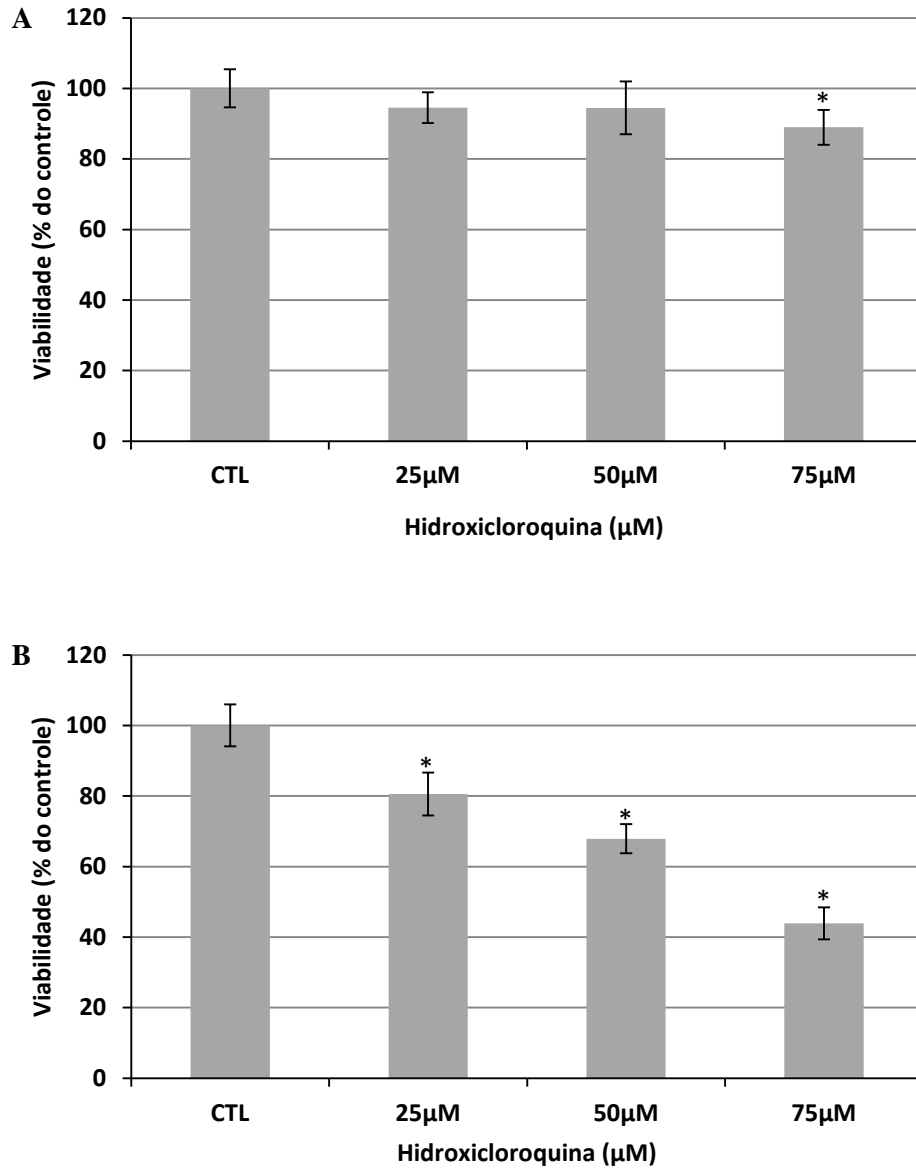


Figura 11: Viabilidade em cultura enriquecida com glia ou neurônios após tratamento com hidroxicloroquina. As células foram expostas a diferentes concentrações de HCQ por 24 horas, e posteriormente tiveram a viabilidade avaliada. Cultura enriquecida com células gliais (A) e cultura enriquecida com neurônios (B). N= 6. (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

4.3 Hidroxicloroquina altera pH de organelas ácidas em células neuronais

Foram realizados testes para avaliar a capacidade das células neuronais de incorporarem o corante supravital vermelho neutro, após tratamento com diferentes concentrações de HCQ por 24 horas. Os resultados mostraram que a concentração mínima testada de HCQ, 25µM, não altera essa função nas células neuronais, contudo, as concentrações de 50µM e 75µM reduziram a captação de vermelho neutro em 19 e 32%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle (figura 12). Como a incorporação de vermelho neutro depende da manutenção da diferença de pH entre os compartimentos celulares, esses dados indicam que HCQ altera o pH de compartimentos ácidos das células neuronais, como lisossomos e endossomos, onde preferencialmente o corante é incorporado.

BOYA e colaboradores (2003), ao expor células HeLa a HCQ, observaram eventos que caracterizam a permeabilização da membrana lisossomal, alteração de pH no lúmen da organela e liberação de hidrolases, como a catepsina B. Segundo BOYA & KROEMER (2008), alterações desta natureza podem desencadear a ativação de vias de morte celular.

Nas células neuronais, a importância do sistema lisossomal para a função celular pode ser evidenciada pelas mais de 30 doenças que envolvem defeitos na síntese, no transporte ou na função de enzimas lisossomais, e acarretam retardo mental, perda progressiva da função cognitiva e outras desordens neurodegenerativas (NIXON *et al*, 2001).

No sistema retiniano, estudos como de RODRÍGUEZ-MUELA e colaboradores (2015), demonstram que a perda da função lisossomal adequada, está relacionada à morte de células fotorreceptoras em modelo de retinite pigmentosa. Neste contexto, alterações nos compartimentos lisossomais das células neuronais da retina, desencadeadas por HCQ, poderiam levar a ativação de cascatas de sinalização que direcionassem as células para um processo de morte.

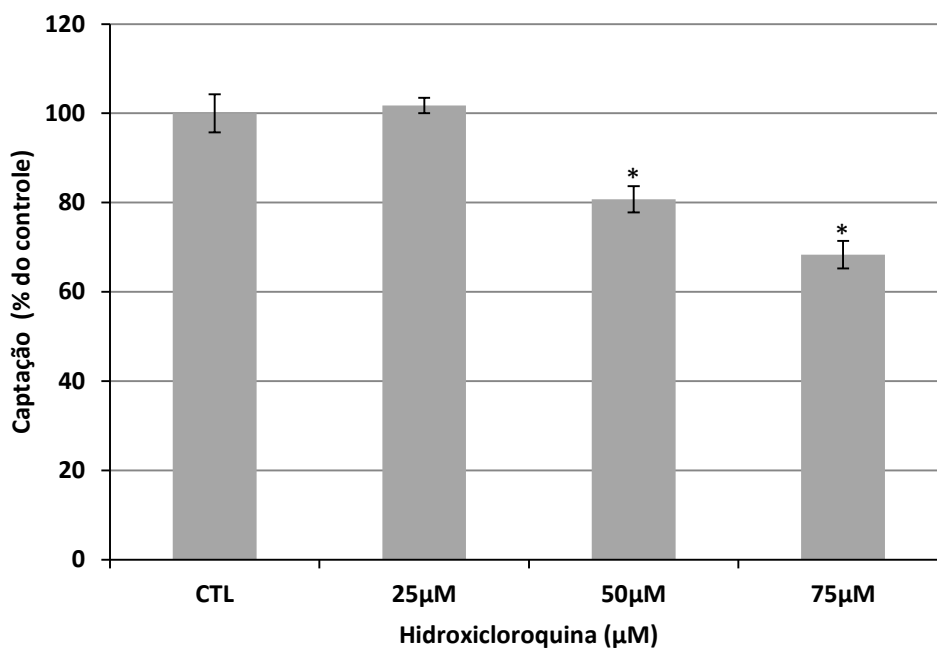


Figura 12: Captação de vermelho neutro em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxiquinona. As células foram expostas a diferentes concentrações de HCQ por 24 horas e posteriormente foram testadas quanto à capacidade de captação. N=6 (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

4.4 Hidroxiquinona altera os níveis de espécies reativas de oxigênio em cultura enriquecida com neurônios

Para avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio nas culturas enriquecidas com neurônios, após tratamento com diferentes concentrações de HCQ por 24 horas, foi utilizado a sonda CellROX. As células tratadas com concentrações de 50µM e 75µM de HCQ mostraram redução no espectro geral de espécies reativas produzidas, quando comparadas ao grupo controle (figura 13).

As espécies reativas de oxigênio são conhecidas por exercerem influência em uma série de doenças, particularmente as relacionadas com processo de envelhecimento como câncer, doenças neurodegenerativas e diabetes. Contudo, recentemente descobriu-se que elas também desempenham papel importante no funcionamento celular, inclusive participando como segundos mensageiros em várias vias de sinalização intracelular (BÓRQUEZ *et al*, 2016).

O fato de HCQ reduzir os níveis de EROs em células neuronais, pode estar relacionada com a redução da atividade mitocondrial, observada nos testes de MTT, visto que a mitocôndria é uma fonte conhecida da produção de EROs. Este efeito pode estar também relacionado à inibição de uma série de enzimas que têm como produto/subproduto de sua atividade a produção de EROs.

Em seguida foi realizado um ensaio para avaliar exclusivamente os níveis de ânion superóxido nas células, que é uma das EROs mais reativas no ambiente intracelular.

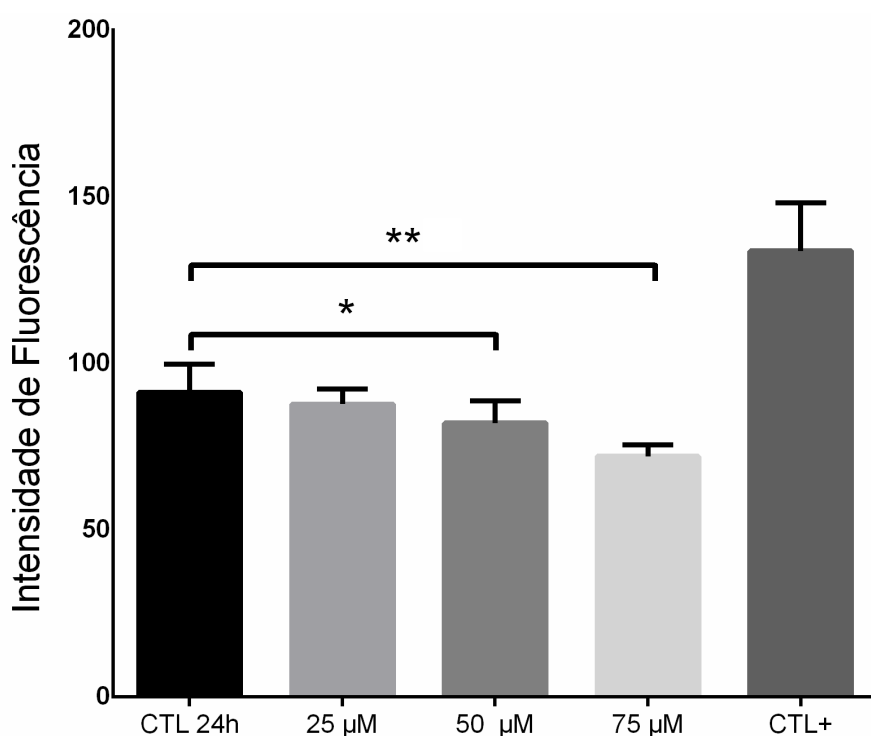


Figura 13: Níveis de espécies reativas de oxigênio em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina. As células foram expostas a diferentes concentrações de HCQ por 24 horas, e posteriormente foram avaliados os níveis de espécies reativas de oxigênio produzido pelas células neuronais. Controle positivo (CTL+) 0,001% de H₂O₂ (ANOVA, pós-teste de Tukey, * p= 0,05; ** p=0,01).

4.5 Hidroxicloroquina reduz os níveis intracelulares de ânions superóxidos em cultura enriquecida com neurônios

Como a sonda CellROX não é específico para uma espécie reativa de oxigênio mas abrange um largo espectro, foi realizado um ensaio para avaliar exclusivamente os níveis de ânion superóxido intracelular. As culturas enriquecidas com células neuronais foram tratadas com HCQ por 24 horas e em seguida o ensaio foi realizado. Nos resultados foi possível observar uma diminuição da produção de ânion superóxido, sendo registadas reduções de 43, 52 e 61% para as concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M de HCQ, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle (figura 14).

GÓMEZ-GUZMÁN e colaboradores (2014) ao estudarem a ação da HCQ no tratamento de disfunção endotelial, mostraram que este fármaco reduz a produção de ânion superóxido em células da aorta de murinos, o que corrobora com os dados obtidos neste trabalho. Já WANG e colaboradores (2015) mostraram um aumento dos níveis de EROs em células de carcinoma de pulmão humano após estas terem sido tratadas com HCQ.

MÜLLER-CALLEJA e colaboradores (2016), ao estudarem os efeitos de HCQ sobre a linhagem celular MM1, mieloma múltiplo humano, demonstraram a redução na produção de ânion superóxido nesta linhagem, sendo que monócitos primários humanos apresentaram resposta similar sobre a produção deste tipo de ERO quando expostos ao fármaco. Este trabalho comprovou ainda, que a redução na produção de ânion superóxido desencadeada por HCQ, se deve a ação desta sobre a atividade da enzima NADPH oxidase endossomal.

A redução na produção de ânion superóxido nas células neuronais pode estar relacionada com alterações na função mitocodrial, confirmadas pelos testes de MTT, e uma possível inibição enzimática tanto da NADPH oxidase, como de outras enzimas que participam do processo de formação deste tipo de ERO.

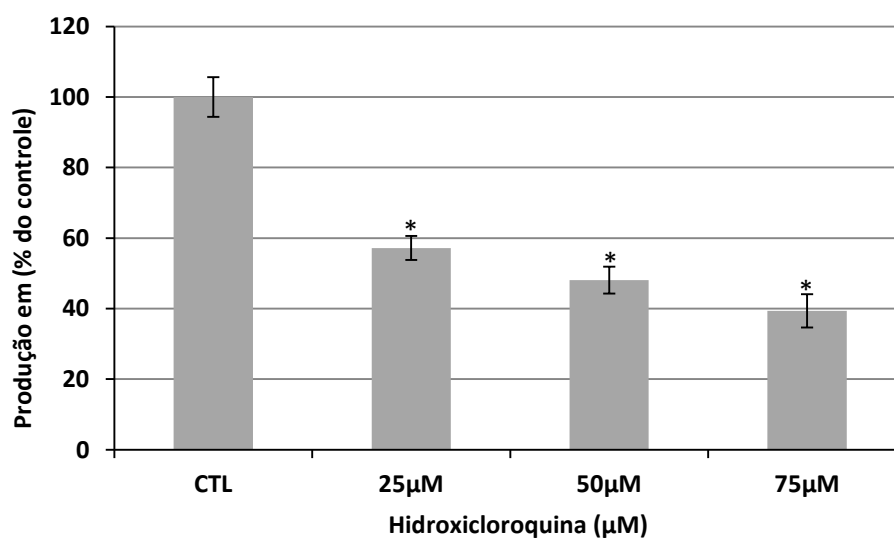


Figura 14: Níveis intracelulares de ânions superóxidos em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina. As células foram expostas a diferentes concentrações de HCQ por 24 horas e os níveis de ânion superóxido foram quantificados. N=6 (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

4.6 Os níveis intracelulares de glutathiona total são reduzidos em cultura enriquecida com neurônios

Níveis de glutathiona total foram mensurados nas culturas de células neuronais. Foram observadas reduções de aproximadamente 37 e 53% dos níveis de glutathiona total, nas concentrações de 50µM e 75µM de hidroxicloroquina, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (figura 15).

PARK e colaboradores (2008) demonstraram que a cloroquina, da qual o hidroxicloroquina deriva, tem ação similar sobre os níveis de glutathiona intracelular em cultura de células, sendo que essa depleção pode alterar várias enzimas do sistema redox que dependem de glutathiona para sua ação antioxidante.

Segundo DRINGEN e colaboradores (1999) a deficiência de glutathiona parece estar associada com uma série de doenças relacionadas à perda de neurônios. No tecido retiniano a perda de neurônios pode levar a uma alteração na informação visual, o que deve prejudicar o

processamento da formação da imagem. A depleção de glutathiona nas células neuronais pode ser uma das causas da morte deste tipo celular.

Como as células neuronais mostraram-se muito sensíveis aos efeitos da HCQ em todos os testes realizados, para o período de 24 horas de tratamento, foi avaliado como estas células respondiam a um tempo mais curto de exposição ao fármaco, avaliando inicialmente a atividade mitocondrial das mesmas.

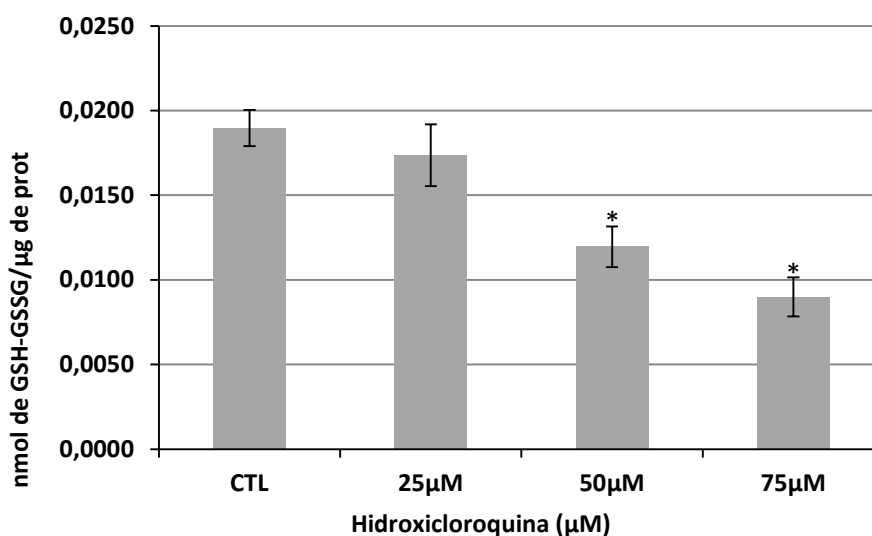


Figura 15: Níveis intracelulares de glutathiona total em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina. As células foram expostas a diferentes concentrações de HCQ por 24 horas e os níveis de glutathiona foram quantificados e comparados ao grupo controle, sendo corrigidos por quantidade de proteína presente nas amostras. N=6 (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

4.7 Hidroxicloroquina altera viabilidade neuronal mesmo em breve período de exposição

Para avaliar a viabilidade das culturas de células neuronais a períodos mais curtos de exposição à HCQ, realizamos testes com 6 horas de tratamento, nas concentrações já estabelecidas (25µM, 50µM e 75µM). Os resultados obtidos apontam para uma ação citotóxica da HCQ que se mostrou tempo-dependente. As células expostas a HCQ por 6 horas mostraram redução na viabilidade de 15 e 26% em concentrações de 50µM e 75µM,

respectivamente, quando comparadas ao grupo controle, sendo que a concentração de 25 μ M não apresentou ação citotóxica nos neurônios para esse período de tratamento. Esses resultados sugerem que mesmos tempos mais curtos que 24 horas de tratamento, são suficientes para causar morte em neurônios retinianos *in vitro* (figura 16).

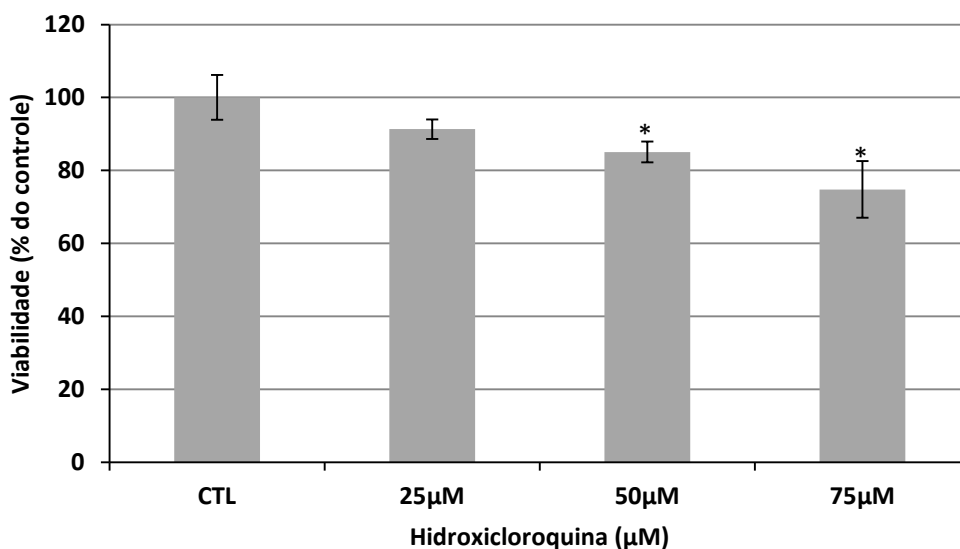


Figura 16: Viabilidade em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxicloroquina por 6 horas. As células foram expostas a diferentes concentrações de HCQ por 6 e posteriormente tiveram a viabilidade avaliada. N= 6 (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

4.8 Hidroxicloroquina não altera pH de organelas ácidas de neurônios em breve período de exposição

Quando as células neuronais foram expostas a HCQ por 6 horas, e em seguida foi realizado teste de incorporação de vermelho neutro, não foram observadas mudanças significativas no padrão de incorporação do corante, quando comparado ao grupo controle (figura 17). Estes dados apontam que em um período de exposição mais curto, como o de 6 horas, o fármaco aparentemente não tem capacidade de interferir no pH das organelas ácidas de células neuronais.

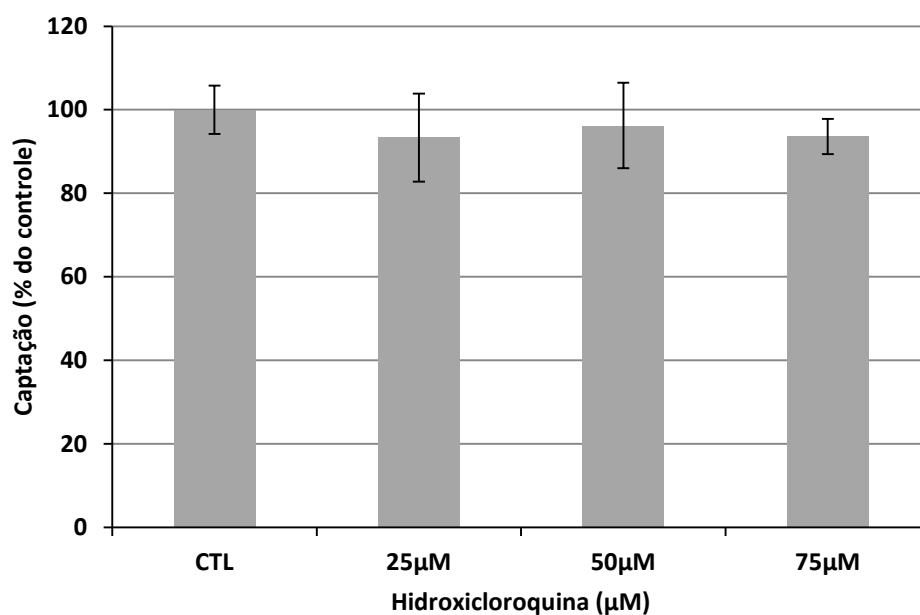


Figura 17: Captação de vermelho neutro em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxycloroquina em breve período de exposição. As células foram expostas a diferentes concentrações de HCQ por 6 horas e posteriormente foram testadas quanto à capacidade de captação. N=6 (ANOVA).

4.9 Hidroxycloroquina reduz os níveis intracelulares de ânions superóxidos em neurônios em breve exposição

As culturas de células neuronais foram tratadas com HCQ nas concentrações de 25µM, 50µM e 75µM por 6 horas, e os níveis de ânion superóxido foram quantificados. Os resultados demonstram redução na produção desse tipo de espécie reativa de oxigênio em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao grupo controle (figura 18). É interessante observar que mesmo a concentração de 25µM, que não causa alterações na viabilidade das células, diminui expressivamente a carga de ânion superóxido produzida pelos neurônios. Esse dado sugere que a HCQ estaria levando a inibição de enzimas envolvidas na produção de $\cdot\text{O}_2^-$, visto que a função mitocondrial foi preservada com uso desta concentração do fármaco.

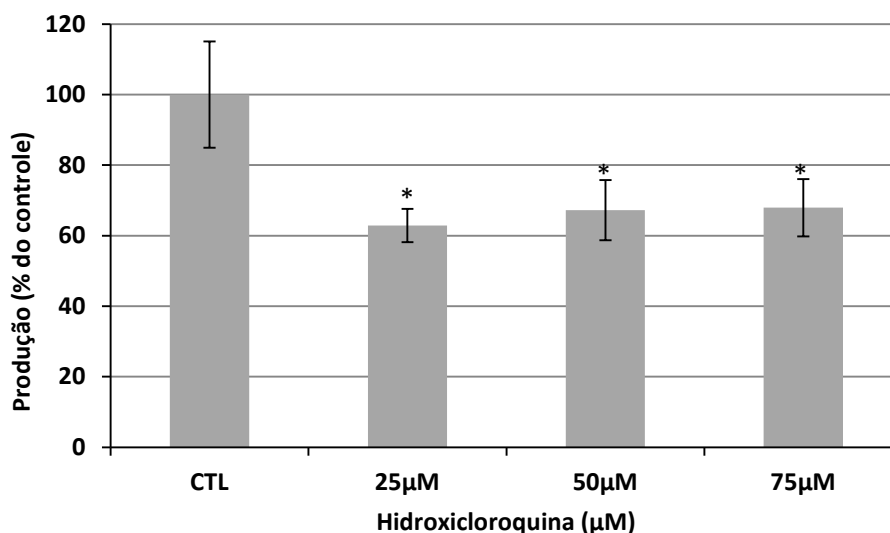


Figura 18: Níveis intracelulares de ânions superóxidos em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxiquinona em breve período de exposição. As células foram expostas a diferentes concentrações de HCQ por 6 horas e os níveis de ânion superóxido foram quantificados. N=6 (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

4.10 Hidroxiquinona não altera os níveis de glutathiona total em neurônios em breve exposição

Após o tratamento de 6 horas com HCQ, as células foram coletadas e os níveis de glutathiona total foram avaliados. Observamos que quando as células neuronais são expostas por um breve período à HCQ, não há alterações significativas nos níveis de glutathiona total (figura 19). A depleção deste antioxidante provavelmente se dá em um momento mais tardio do processo de morte neuronal, visto que mesmo para as concentrações que causam alteração na viabilidade das células (50µM e 75µM) não registramos mudanças significativas na concentração intracelular de glutathiona total. Contudo, mesmo não sendo registradas mudanças nos níveis totais, pode estar ocorrendo alterações na proporção GSH/GSSG, o que deixa as células mais susceptíveis a danos por estresses oxidativos.

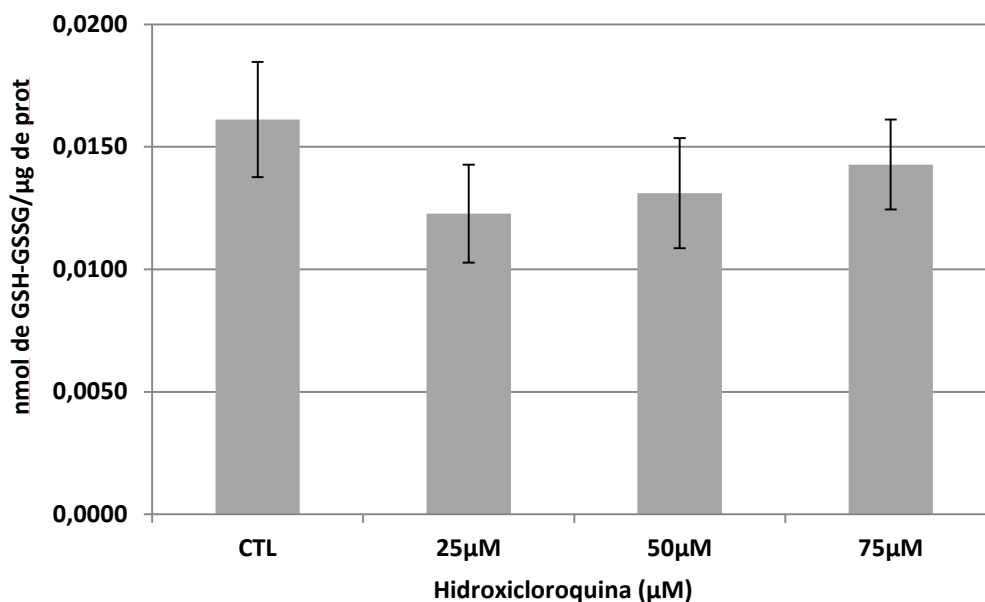


Figura 19: Níveis intracelulares de glutatona total em cultura enriquecida com neurônios após tratamento com hidroxiclороquina em breve período de exposição. As células foram expostas a diferentes concentrações de HCQ por 6 horas e os níveis de glutatona foram quantificados e corrigidos por quantidade de proteína presente nas amostras. N=6 (ANOVA).

4.11 Glia induz neuroproteção contra ação citotóxica da hidroxiclороquina por meio de fatores liberados no ambiente extracelular

Um resultado importante mostrado no decorrer do trabalho diz respeito às células gliais, que se mostraram mais resistentes que os neurônios aos efeitos causados pela hidroxiclороquina, e quando estes dois tipos celulares são cultivados em conjunto, as células gliais parecem proteger os neurônios da ação citotóxica da HCQ. Para tentar compreender como a ação neuroprotetora das células gliais poderia influenciar na sobrevivência dos neurônios, obtivemos meio condicionado de culturas enriquecidas com células gliais e cultivamos células neuronais, a fim de avaliar se a ação neuroprotetora da glia contra HCQ é dependente do contato célula-célula, ou ocorre por meio de fatores liberados no espaço extracelular.

Os resultados mostraram que o meio condicionado das células gliais foi capaz de reverter completamente a morte dos neurônios, induzida por HCQ, em todas as concentrações testadas, por um período de 6 horas (figura 20). Isso sugere que as células gliais liberam algum fator capaz de proteger as células neuronais do efeito citotóxico da HCQ.

NICOLE e colaboradores (2001) descrevem em seu trabalho que fatores liberados por células gliais, como o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF - do inglês *glial cell line-derived neurotrophic fator*) podem proteger células neuronais de morte por excitotoxicidade. ABDO e colaboradores (2010) ao avaliarem a ação protetora que células gliais entéricas exerciam sobre neurônios descrevem que essas células exercem essa função por meio da liberação da molécula glutatona reduzida, que protege os neurônios entéricos de morte desencadeada por estresse oxidativo. Segundo os autores, os possíveis mecanismos para explicar a ação protetora da GHS liberada por células gliais sobre neurônios entéricos seriam a redução na produção de espécies oxidantes na presença de algumas enzimas específicas, como, por exemplo, a glutatona peroxidase, e a glutatona reduzida seria fonte de grupamentos sulfidrilas, que serviriam para a síntese de glutatona pelas próprias células neuronais, tornando estas mais resistentes a danos oxidativos.

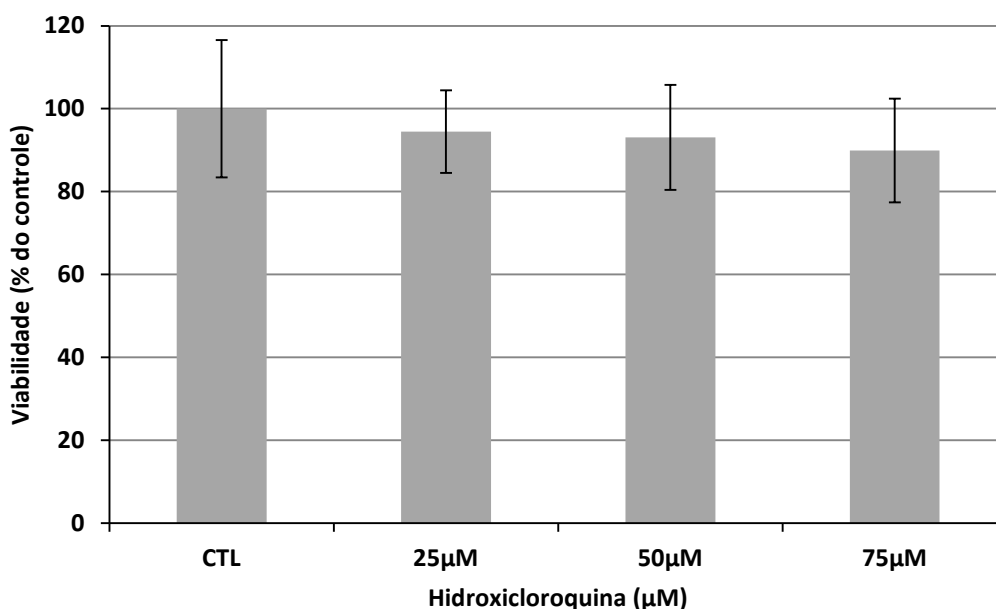


Figura 20: Viabilidade em cultura enriquecida com neurônios exposta a meio condicionado de glia e tratamento com hidroxicloroquina em breve período de exposição. As células foram expostas a diferentes concentrações de HCQ preparadas em meio condicionado de glia por 6 horas, e posteriormente tiveram a viabilidade avaliada pelo método de MTT. N=6 (ANOVA).

4.12 Hidroxicloroquina não altera os níveis de glutathiona total em células gliais

Como as células gliais mostraram-se mais resistentes à ação de HCQ, e sabendo que os níveis de glutathiona contribuem para um estado de homeostasia no ambiente celular, avaliamos as concentrações de glutathiona total em culturas enriquecidas com células gliais, após estas serem tratadas com diferentes concentrações HCQ por 24 horas. Os resultados dos ensaios demonstraram que quando as células gliais são expostas a HCQ, não há redução dos níveis de glutathiona total nas células (figura 21), o que sugere que a glutathiona pode ser determinante para sobrevivência das células mediante a ação do xenobiótico HCQ.

Como a glutathiona pode ser lançada no espaço extracelular por meio de transportadores de membrana, esta é uma possível candidata a mediadora da ação neuroprotetora exercida por glia em neurônios expostos ao fármaco HCQ.

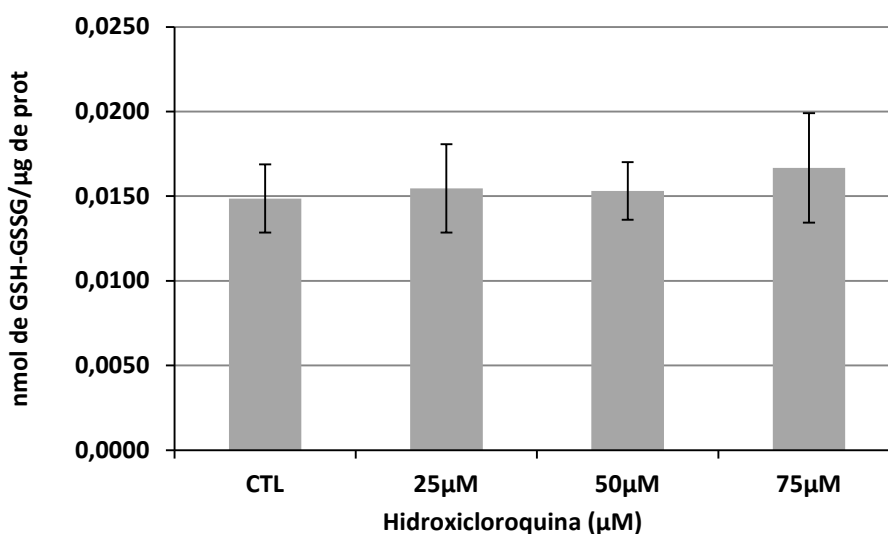


Figura 21: Níveis intracelulares de glutathiona total em cultura enriquecida com glia após tratamento com hidroxicloroquina. As células gliais foram expostas a diferentes concentrações de HCQ por 24 horas e os níveis de glutathiona foram quantificados e corrigidos por quantidade de proteína presente nas amostras. N=6 (ANOVA).

5. CONCLUSÃO

Os achados deste trabalho revelam que CQ apresenta citotoxicidade sobre culturas mistas de células da retina, enquanto nas mesmas concentrações HCQ não mostra qualquer efeito citotóxico. Contudo, quando as células da retina são isoladas em culturas enriquecidas com células gliais ou neuronais, o fármaco HCQ mostra-se citotóxico principalmente em células neuronais.

HCQ reduz a produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente ânions superóxidos e também reduz as concentrações intracelulares de glutathione total em culturas enriquecidas com células neuronais, contudo os níveis desta molécula antioxidante não são alterados em células gliais, o que sugere uma ação protetora da glutathione contra ação citotóxica de HCQ nas células gliais.

Meio condicionado de glia foi capaz de inibir completamente a ação neurotóxica de HCQ em culturas enriquecidas com neurônios, por meio de moléculas liberadas por células gliais no ambiente extracelular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, M. Y. Glutathione as potential target for cancer therapy; more or less is good? **Jordan Journal of Biological Sciences**, Vol. 4, No. 3, pp. 119-124, 2011,
- ABDO, H., DERKINDEREN, P., GOMES, P., CHEVALIER, J., AUBERT, P., MASSON, D., GALMICHE, J. P., BERGHE, P. V., NEUNLIST, M., LARDEUX, B. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. **The FASEB Journal**, Vol. 24, No. 4, pp. 1082-1094, 2010.
- ALZOGHAIBI, M. A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology**, Vol. 19, No. 39, 2013.
- BARBOSA, K. B. R., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Vol. 23, No. 4, pp. 629-643, 2010.
- BEATTY, S., KOH, H. H., HENSON, D., BOULTON, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Survey of Ophthalmology**, Vol. 45, No. 2, 2000.
- BEN-ZVI, I., KIVITY, S., LANGEVITZ, P. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, Vol. 42, No.2, pp. 145-153, 2012.
- BIRBEN, E., SAHINER, U. M., SACKESEN, C., ERZURUM, S., KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, Vol. 5, No. 1, pp. 9-19, 2012.
- BÓRQUEZ, D. A., URRUTIA, P. J., WILSON, C., ZUNDERT, B. V., NÚÑEZ, M. T., GONZÁLEZ-BILLAULT, C. Dissecting the role of redox signaling in neuronal development. **Journal of Neurochemistry**, Vol. 137, pp. 506-517, 2016.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, Vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- BREITENBACH, M., ECKL, P. Introduction to oxidative stress in biomedical and biological research. **Biomolecules**, 5, pp. 1169-1177, 2015.
- BRINGMANN, A., GROSCHE, A., ANNICKE, T., REICHENBACH, A. GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal glial (Müller) cells. **Frontiers Endocrinology**, Vol. 4, No. 48, 2013.
- BROWNING, D. J. Pharmacology of Chloroquine and Hydroxychloroquine. **Springer**, pp 35-63, 2014.
- BOYA, P., GONZALEZ-POLO, R. A., PONCET, D., ANDREAU, K., LA VIEIRA, H., ROUMIER, T., PERFETTINI, J. L., KROEMER, G. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. **Oncogene**, Vol. 22, pp. 3927–3936, 2003.

- BOYA, P., KROEMER, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. **Oncogene**, Vol. 27, pp. 6434–6451, 2008.
- BUENO, J. M., GIAKOUMAKI, A., GUALDA, E. J., SCHAEFFEL, F., ARTAL, P. Analysis of the chicken retina with an adaptive optics multiphoton microscope. **Biomedical Optics Express**, Vol. 2, No. 6, pp. 1637-1648, 2011.
- CHELIKANI, P., FITA, I., LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Vol. 61, pp. 192–208, 2004.
- CHEN, B. T., AVSHALUMOV, M. V., RICE, M. E. H₂O₂ is a novel, endogenous modulator of synaptic dopamine release. **Journal of Neurophysiology**, Vol. 85, No. 6, 2001.
- CHOI, H. S., KIM, J. W., CHA, Y. N., KIM, C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, Vol. 27, No. 1, 2006.
- CUENCA, N., SÁNCHEZ, L.F., CAMPELLO, L., MANEU, V., VILLA, P., LAX, P., PINILLA, I. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, 1-59, 2014.
- DA FONSECA, S.S. S. **Efeito protetor da flavana extraída da espécie *Brosimum acutifolium* protege células da retina contra danos causados por hipóxia: um estudo in vitro**. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular). Universidade Federal do Pará, Pará. 2014. 34 e 38p.
- DAVIES, K. J. A. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB Life**, 50(4-5): 279-89, 2000.
- DEAVELL, D. G., MARTIN, E. A., HORNER, J. E., ROBERTS, R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. **Journal of Toxicology**, 2012.
- Desenho esquemático do globo ocular de aves.** Disponível em <http://www.poultryhub.org/physiology/body-systems/nervous-systems-important-sensory-organs/>. Acessado em 27 de mar. 2017.
- DRINGEN, R., PFEIFFER, B., HAMPRECHT, B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. **The Journal of Neuroscience**, Vol. 19. No. 1. pp. 562–569, 1999.
- DYER, M.A., CEPKO, C.L. Control of müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. **Nature neuroscience**, Vol. 3, No. 9, 2000.
- DAYER, R., FISCHER, B. B., EGGEN, R. I. L., LEMAIRE, S. D. The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Genetics**, Vol. 179, No. 1, pp. 41–57, 2008.
- DO NASCIMENTO, J. L. M., VENTURA, A.L.M., DE CARVALHO, R.P. Veratridine- and glutamate-induced release of [³H]-GABA from cultured chick retina cells: possible involvement of

a GAT-1-like subtype of GABA transporter. **Brain Research**, Vol. 798, No 1-2, pp. 217-222, 1998.

Estrutura molecular da cloroquina. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c6628?lang=pt®ion=BR>. Acessado em 09 de jun. 2016.

Estrutura molecular da hidroxicloroquina. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h0915?lang=pt®ion=BR>. Acessado em 09 de jun. 2016.

FAROOQ, U., MAHAJAN, R. C. Drug resistance in malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, Vol. 41, No. 3-4, pp. 45-53, 2004.

FATTMAN, C. L., LISA M. SCHAEFER, L. M., OURY, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 35, No. 3, pp. 236–256, 2003.

FERRAZ, L. R. M., DOS SANTOS, F. L. A., FERREIRA, P. A., JUNIOR, R. T. L. M., ROSA, T. A., ROLIM, L. A., PEDRO JOSÉ ROLIM-NETO, P. J. Clinical, pharmacokinetic and technological aspects of the hydroxychloroquine sulfate. **Journal of Pharmacy**, Vol. 4, No. 11, pp. 53-64, 2014.

FILIPPIN, L. I., VERCELINO, R., MARRONI, N. P., XAVIER, R. M. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Vol. 48, No. 1, pp. 17-24, 2008.

GARCÍA, A. E. Z. El envejecimiento y el estrés oxidativo. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, Vol. 21, No. 3, pp.178-185, 2002.

GARCÍAS, T. A. M., CARVALHO, R. P. Nitric oxide regulates cell survival in purified cultures of avian retinal neurons: involvement of multiple transduction pathways. **Journal of Neurochemistry**, Vol. 100, No. 2, pp. 382-394, 2007.

GINSBURG, H. Should chloroquine be laid to rest? **Acta Tropica**, 96 16–23, 2005.

GOLDMAN, D. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. **Nature neuroscience**, Vol. 15, 2014.

GÓMEZ-GUZMÁN, M., JIMÉNEZ, R., ROMERO, M., SÁNCHEZ, M., ZARZUELO, M. J., GÓMEZ-MORALES, M., O'VALLE, F., LÓPEZ-FARRÉ, A. J., ALGIERI, F., GÁLVEZ, J., PÉREZ-VIZCAINO, F., SABIO, J. M., DUARTE, J. Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. **Hypertension**, Vol.64. No. 2. pp. 330-337, 2014.

GORRINI, C., HARRIS, I. S., MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature reviews Drug discovery**, Vol. 12, 2013.

GUO, X., YU, Y., LIU, X., ZHANG, Y., GUAN, T., XIE, G., WEI, J. Heterologous expression and characterization of human cellular glutathione peroxidase mutants. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life (IUBMB Life)**, Vol. 66, No. 3, pp. 212-219, 2014.

- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, Vol 35, 2007.
- HOON, M., OKAWA, H., SANTINA, L. D., WONG, R. O.L. Functional architecture of the retina: development and disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, Vol. 42, pp. 44-84, 2014.
- HO, Y. S., MAGNENAT, J. L., GARGANO, M., CAO, J. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. **Environmental Health Perspectives**, Vol. 106, No. 5, 1998.
- HUANG, T.T., ZOU, Y., CORNIOLA, R. Oxidative stress and adult neurogenesis – effects of radiation and superoxide dismutase deficiency. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Vol. 23, No.7, pp. 738–744, 2012.
- HUANG1, Y. Y., NAGATA, K., TEDFORD5, C. E., MCCARTHY, T., HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. **J Biophotonics**, Vol.6, No.10, pp 829–838, 2013.
- HUBER, P.C., ALMEIDA, W.P. Glutaciona e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. Vol. 31, No. 5, pp. 1170-1179, 2008.
- JENSEN, M., MEHLHORN, H. Seventy-five years of Resochin® in the fight against malaria. **Parasitology Research**, Vol. 105, pp. 609–627, 2009.
- JONES, C. J. P., JAYSON, M. I.V. Chloroquine: its effect on leucocyte auto- and heterophagocytosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Vol. 43, pp. 205-212, 1984.
- JOSELEVITCH, C. Human retinal circuitry and physiology. **Psychology & Neuroscience**, Vol.1, No. 2, pp. 141-165, 2008.
- KIRKMAN, H. N., GAETANIT, G. F. Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Biochemistry**, Vol. 81, pp. 4343-4347, 1984.
- KOCH, M., ZABAD, R., GIULIANI, F., HADER. W., LEWKONIA, R., METZ, L., YONG, V. W. Hydroxychloroquine reduces microglial activity and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of the Neurological Sciences**, Vol, 358. No. 1-2. pp. 131-137, 2015.
- KORTHAGEN, N. M., BASTIAANS, J., MEURS, J. C., BILSEN, K., HAGEN, P. M., DIK, W.A. Chloroquine and hydroxychloroquine increase retinal pigment epithelial layer permeability. **J Biochem Molecular Toxicology**, Vol. 29, No. 7, pp. 299-304. 2015.
- KOWLURU, R. A., ABBAS, S. N. Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. **IOVS**, Vol. 44, No. 12, 2003.
- KUNWAR, A., PRIYADARSINI, K. I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. **Journal of Medical & Allied Sciences**, Vol. 1, No. 2, 2011.
- LEE, H. O., MUSTAFA, A., HUDES, G. R., KRUGER, W. D. Hydroxychloroquine Destabilizes Phospho-S6 in Human Renal Carcinoma Cells. **PLOS ONE**, Vol. 10, No. 2, 2015.

- LI, Y., SHEFFIELD, J. B. An immunohistochemical analysis of hypoxia in multi-layer avascular retina and vascular pecten oculi of the developing chicken. **Medical Research Archives**, Vol. 3, No. 6, 2016.
- LOEW, O. A new enzyme of general occurrence in organisms. **Science**, Vol. 11, No. 279, 1900.
- MARMOR, M.F., CARR, R. E., EASTERBROOK, M., FARJO, A. A., MIELER, W. F. Recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy. **Ophthalmology**, Vol. 109, No. 7, 2002.
- MARTINS, D., ENGLISH, A. M. Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. **Redox Biology**, Vol. 2, pp. 308–313, 2014.
- MATAMOROS, M. A., SAIZ, A., PEÑUELAS, M., SANMAMED, P. B. MULET, J.M., BARJA, M. V., ROUHIER, N., MOORE, M., JAMES, E. K., DIETZ, K. J., BECANA, M. Function of glutathione peroxidases in legume root nodules. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 66, No. 10, pp. 2979–2990, 2015.
- MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Vol. 153, pp. 83–104, 2000.
- MCCORDS, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 244, No. 22, 1969.
- MCGILLEM, G. S., GUIDRY, C., DACHEUX, R. F. Antigenic changes of rabbit retinal müller cells in culture. **IOVS**, Vol. 39, No. 8, 1998.
- MOSCHOS, M. M., NITODA, E., CHATZIRALLI, I. P., GATZIOUFAS, Z., KOUTSANDREA, C., KITSOS, G. Assessment of hydroxychloroquine maculopathy after cessation of treatment: an optical coherence tomography and multifocal electroretinography study. **Drug Design, Development and Therapy**, Vol. 9, pp. 2993–2999, 2015.
- MÜLLER-CALLEJA, N., MANUKYAN, D., CANISIUS, A., STRAND, D., LACKNER, K. J. Hydroxychloroquine inhibits proinflammatory signalling pathways by targeting endosomal NADPH oxidase. **Ann Rheum Dis**, 2016.
- NAIR, S., SINGH, S. V., KRISHAN, A. Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. **Cytometry**, Vol. 12, pp. 336–342, 1991.
- NICOLE, O., ALI, C., DOCAGNE, F., PLAWINSKI, L., MACKENZIE, E. T., VIVIEN, D., BUISSON, A. Neuroprotection Mediated by Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor: Involvement of a Reduction of NMDA-Induced Calcium Influx by the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. **The Journal of Neuroscience**, Vol. 21, No. 9, pp. 3024–3033, 2001.
- NISHIKAWA, M., HASHIDA, M., TAKAKURA, Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Vol. 61, pp. 319–326, 2009.

- NIXONA, R. A., MATHEWS, P. M., CATALDO, A.M. The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, Vol. 3, No. 1, pp.97-107, 2001.
- PARK, B. C., PARK, S. H., PAEK, S. H., PARK, S. Y., KWAK, M. K., CHOI, H. G., YONG, C. S., YOO, B. K., KIM, J. A. Chloroquine-induced nitric oxide increase and cell death is dependent on cellular GSH depletion in A172 human glioblastoma cells. **Toxicology Letters**, Vol. 178. No.1. pp. 52–60, 2008.
- PASADHIKA, S., FISHMAN, G. A. Effects of chronic exposure to hydroxychloroquine or chloroquine on inner retinal structures. **Eye**, 24, 340–346, 2010.
- PIVTORAIKO, V. N., HARRINGTON, A. J., MADER, B. J., LUKER, A. M., CALDWELL, G. A., CALDWELL, K. A., ROTH, K. A., SHACKA, J. J. Low-Dose Bafilomycin Attenuates Neuronal Cell Death Associated with Autophagy-Lysosome Pathway Dysfunction. **Journal of Neurochemistry**, Vol. 114. No. 4. pp. 1193–1204, 2010.
- RAMSER, B., KOKOT, A., METZE, D., WEIB, N., LUGER, T. A., BOHM, M. Hydroxychloroquine modulates metabolic activity and proliferation and induces autophagic cell death of human dermal fibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology**, Vol. 129. pp 2419–2426, 2009.
- REIS, R. A. M., SILVA, M. C. C., SANTOS, N. E. L., BAMPTON, E., TAYLOR, J. S. H., MELLO, F. G., LINDEN, R. Sympathetic neuronal survival induced by retinal trophic factors. **Journal of Neurobiology**, Vol. 50, No.1, pp. 13-23, 2002.
- REPETTO, G.; PESO, A. D., ZURITA, J. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, Vol. 3, No. 7, 2008.
- RODRIGUES, A. P., CARVALHO, A. S. C., SANTOS, A. S., ALVES, C. N., DO NASCIMENTO, J. L M., SILVA, E.O. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. **Cell Biology International**, Vol. 35, No. 4, pp. 335-343, 2011.
- RODRÍGUEZ-MUELA, N., HERNÁNDEZ-PINTO A. M., SERRANO-PUEBLA, A., GARCÍA-LEDO, L., LATORRE, S. H., DE LA ROSA, E. J., BOYA, P. Lysosomal membrane permeabilization and autophagy blockade contribute to photoreceptor cell death in a mouse model of retinitis pigmentosa. **Cell Death and Differentiation**, Vol. 22, pp. 476–487, 2015.
- ROHENKOHL, C. C., CARNIEL, A. P., COLPO, E. Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, Vol. 24, No 2, pp. 107-112, 2011.
- ROTTA, R. B. **Estudo da atividade da enzima glutatona peroxidase em carne de frango**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul. 2007. 35-37p.
- SAMES, E., PATERSON, H., LI, C. Hydroxychloroquine-induced agranulocytosis in a patient with long-term rheumatoid arthritis. **European Journal of Rheumatology**, Vol.3, No.2, 2016.
- SCHAD, A., FAHIMI, H. D., VÖLKL, A., BAUMGART, E. Expression of catalase mRNA and protein in adult rat brain: Detection by nonradioactive in situ hybridization with signal

- amplification by catalyzed reporter deposition (ISH-CARD) and immunohistochemistry (IHC)/immunofluorescence (IF). **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Vol. 51, No.6, pp.751–760, 2003.
- SLATER, A. F.G. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. **Pharmacology & Therapeutics**, Vol. 57, pp. 203-235, 1993.
- SHIBATA, N., HIRANO, A., KOBAYASHI, M., CANTO, M. C. D., GURNEY, M. E., KOMORI, T., UMAHARA, T., ASAYAMA, K. Presence of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) immunoreactivity in neuronal hyaline inclusions in spinal cords from mice carrying a transgene for Gly93Ala mutant human Cu/Zn SOD. **Acta Neuropathologica**, 95: 136–142, 1998.
- SHICHIRI, M., KONO, N., SHIMANAKA, Y., TANITO, M., ROTZOLL, D. E., YOSHIDA, Y., HAGIHARA, Y., TAMAI, H., ARAI, H. A novel role for α -tocopherol transfer protein (α -TTP) in protecting against chloroquine toxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 287, No. 4, pp. 2926–2934, 2012.
- SILVA, J. C., MARIZ, H. A., JÚNIOR, L. F.R., OLIVEIRA, P. S. S., DANTAS, A. T., DUARTE, A. L.B.P., PITTA, I. R., GALDINO, S. L., PITTA, M. G. R. Hydroxychloroquine decreases Th17-related cytokines in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. **Clinics**, Vol. 68, No. 6, pp. 766-771, 2013.
- SILVA, W. J. M., FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Vol. 14, No. 3, pp. 441-451, 2011.
- SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010.
- SOLOMON, V. R., LEE, H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. **European Journal of Pharmacology**, 625 220–233, 2009.
- SYSLOVÁ, K., BÖHMOVÁ, A., MIKOŠKA, M., KUZMA, M., PELCLOVÁ, D., KAIER, P. Multimarker screening of oxidative stress in aging. **Hindawi Publishing Corporation**, 2014.
- THANAN, R., OIKAWA, S., HIRAKU, Y., OHNISHI, S., MA, N., PINLAOR, S., YONGVANIT, P., KAWANISHI, S., MURATA, M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, Vol. 16, No. 1, pp. 193-217, 2015.
- TOWNSEND, D. M., TEW, K. D., TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Vol. 57, pp. 145–155, 2003.
- UZAR, E., OZAY, R., EVLIYAOGU, O., AKTAS, A., ULKAY, M. B., UYAR, M. E., ERSOY, A., BURAKGAZI, A. Z., TURKAY, C., ILHAN, A. Hydroxychloroquine-induced oxidative stress on sciatic nerve and muscle tissue of rats: A stereological and biochemical study. **Human and Experimental Toxicology**, Vol. 31, No. 10, pp. 1066-1073, 2012.
- VERGARA, M. N., CANTO-SOLER, M. V. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. **Neural Development**, Vol, 7. No. 22, 2012.

- WANG, L. F., LIN, Y. S., HUANG, N. C., YU, C. Y., TSAI, W. L., CHEN, J. J., KUBOTA, T., MATSUOKA, M., CHEN, S. R., YANG, C. S., LU, R. W., LIN, Y. L., CHANG, T. H. Hydroxychloroquine-inhibited dengue virus is associated with host defense machinery. **Journal of Interferon & Cytokine**, Vol. 35, No.3, pp. 143–156, 2015.
- WIESNER, J. ORTMANN, R. JOMAA, H. SCHLITZER, M. New antimalarial drugs. **Angewandte Chemie**, Vol. 42, No. 43, pp. 5274-5293, 2003.
- WELLEMS, T. E., PLOWE, C. V. Chloroquine-resistant malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, Vol. 184, No. 6, pp. 770-776, 2001.
- WEYDERT, C. J., CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**, Vol. 5, No. 1, pp. 51–66, 2010.
- WILLOUGHBY, C.E., PONZIN, D., FERRARI, S., LOBO, A., LANDAU, K., OMIDI, Y. Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function – a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, 38: 2–11, 2010.
- WU, G., FANG, Y. Z., YANG, S. LUPTON, J. R., TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**, Vol. 134, No. 3, pp. 489-492, 2004.
- YOSHIKAWA, T., NAITO, Y. What is oxidative stress? **Journal of the Japan Medical Association**, Vol. 45, No. 7, 271–276, 2002.
- ZAMOCKY, M., FURTMULLER, P. G., OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antioxidants & Redox Signaling**, Vol. 10, No. 9, 2008.