

Efeitos do excesso de cobre sobre a atividade e expressão de enzimas antioxidantes em células da linhagem C6

Lorena Aparecida de Souza¹
Annelise Hoffmann Goslar¹
Viviane Glaser²

RESUMO

O cobre é fundamental para o bom funcionamento do organismo de humanos e animais; no entanto, o excesso do mesmo causa citotoxicidade. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar parâmetros de estresse oxidativo, onde analisou-se a atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx); além de verificar o conteúdo relativo de mRNA de GPx1 e GR em células da linhagem de glioma de rato (C6) após a exposição ao sulfato de cobre (CuSO₄) durante 24h. Os resultados mostraram um aumento da atividade da GPx quando as células foram expostas a 75 e 100 µM de CuSO₄, além de um aumento no conteúdo relativo de mRNA da GPx1 e GR quando expostas a 100 µM de CuSO₄. Esses resultados sugerem que a exposição ao CuSO₄ pode estar relacionada à ativação do sistema antioxidante, possivelmente em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo cobre.

Palavras-chave: Cobre; Toxicidade; Estresse Oxidativo; Astroglioma.

INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial para o funcionamento do organismo em humanos e animais (Conforti *et al.*, 2023). No entanto, o excesso do metal resulta no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e causa estresse oxidativo, levando à morte celular (Liu *et al.*, 2020). Intracelularmente, existem mecanismos de degradação que atuam contra o excesso de ERO, como as enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) (Barbosa *et al.*, 2010).

Em animais domésticos, a intoxicação pelo cobre é mais vista em ovinos, quando ocorre o emprego da dieta mineral de bovinos para ovinos (Miguel *et al.*, 2013). Em cães, a susceptibilidade ao cobre pode ser de

¹ Graduandas em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos - SC.

² Docente da Coordenadoria Especial de Ciências Biológicas e Agrônomicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos - SC
Autor Correspondente: lorenasouza167@gmail.com



caráter hereditário em algumas raças, como por exemplo em Labrador Retriever, que envolve mutações em dois genes (ATP7A e ATP7B) responsáveis pela regulação da homeostase do cobre nos mamíferos (Wu *et al.*, 2019).

MATERIAL E MÉTODOS

As células da linhagem de glioma de rato (C6) foram cultivadas em frascos em meio Eagle's com modificação de Dulbecco (DMEM) contendo antibiótico, antimicótico e 5% de soro fetal bovino (SFB), em estufa a 37°C, 95% de umidade relativa, e com 5% de CO₂. Após a confluência, as células foram cultivadas em placas de 6 poços e foram expostas durante 24h às concentrações de 0 -100 µM de CuSO₄.

Para a mensuração da atividade da GPx foi utilizado o método descrito em Wendel (1981); e para a atividade da GR foi usado a metodologia descrita em Carlberg e Mannervik (1985). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro para microvolumes, em 340 nm por 5min, a 37°C. Os dados foram expressos como µmol de NADPH consumido/minuto/mg de proteína. Para a determinação do teor de proteínas foi usada a técnica de Lowry *et al.* (1951).

O conteúdo relativo de mRNA de GPx1 e GR foi quantificado por RT-PCR em tempo real. Os resultados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo ATP5B. Os dados foram expressos como conteúdo relativo de mRNA em relação ao grupo controle.

Para análise estatística, foi usado a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett. Para a análise entre dois grupos foi usado o teste *t* de Student. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

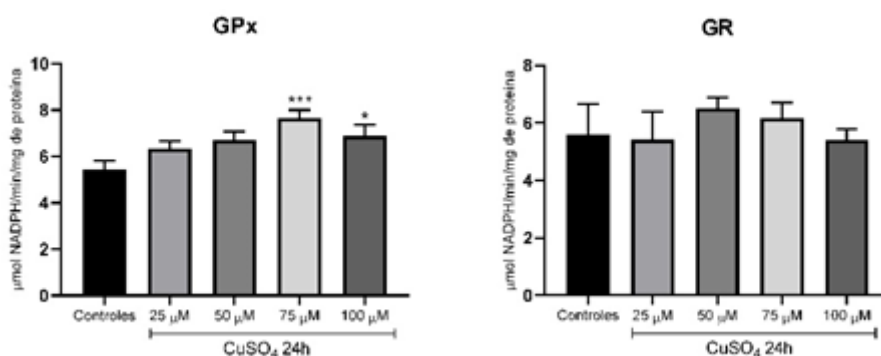
Na Figura 1, pode-se observar que a atividade da GPx apresentou um aumento nas células expostas a 75 µM e 100 µM de CuSO₄ em relação ao grupo controle. Já na atividade da GR nenhum grupo apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle.

O aumento da atividade da GPx em condições de excesso de cobre também é descrito em outros trabalhos, onde em um estudo que utilizou peixes dourados (*Carassius auratus*), a atividade desta enzima foi maior que os valores dos controles no cérebro dos peixes expostos ao cobre. Neste mesmo estudo, a exposição ao cobre resultou em maior atividade de GR no fígado, mas não foi alterada no cérebro e nas brânquias, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho (Husak *et al.*, 2018). O aumento da atividade da GPx observado no presente estudo está relacionado ao aumento da produção de ERO causado pelo cobre, para que assim ocorra a conversão



destas em moléculas não reativas, evitando desta forma o estresse oxidativo e a morte celular (Kim *et al.*, 2014; Husak *et al.*, 2018).

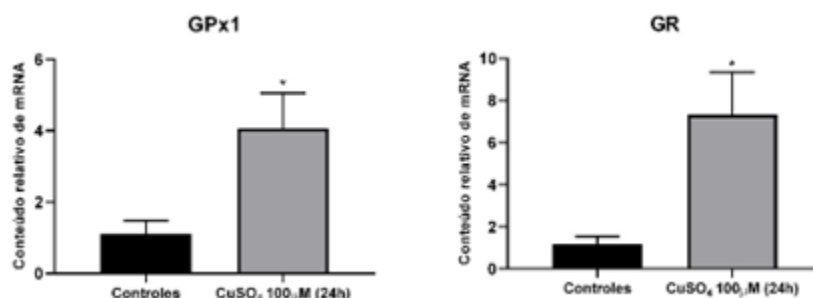
Figura 1 - Atividade da glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) em células C6 após a exposição ao CuSO₄ durante 24h.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

Em relação à expressão destas enzimas, após a exposição ao CuSO₄ durante 24 h, a Figura 2 mostra que ocorreu um aumento no conteúdo de mRNA de GPx1 e GR.

Figura 2 - Expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante em células da linhagem C6 após a exposição ao CuSO₄ durante 24h.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

O aumento do conteúdo de mRNA de GPx1 e/ou GR observado no presente trabalho em resposta à exposição ao cobre já foi descrito anteriormente na literatura, mas em cílios marinhos (*Euplotes crassus*) (Kim *et al.*, 2014), e em cérebro de peixes (carpas Jian), sugerindo um mecanismo adaptativo contra o estresse (Jiang *et al.*, 2014). Além disso, verificou-se que a exposição ao cobre aumentou o acúmulo nuclear de Nrf2, fator de transcrição que resulta no aumento dos níveis de mRNA de enzimas antioxidantes (Jiang *et al.*, 2014).

Assim, o aumento da atividade da GPx, em conjunto com o aumento do conteúdo relativo de mRNA de GPx1 e GR, podem estar relacionados a um mecanismo de ativação do sistema antioxidante, onde a atividade e/ou a expressão dessas enzimas aumentam devido a maior produção de ERO (como H₂O₂) resultante da exposição ao cobre (Kim *et al.*, 2014; Husak *et al.*, 2018), considerando que em trabalhos anteriores do grupo observou-se um aumento na produção destas já a partir de 100µM de CuSO₄ (dados ainda não publicados).

CONCLUSÃO

Concluimos que a exposição ao cobre induziu um aumento na atividade antioxidante, evidenciado pelo aumento da atividade da GPx e pela expressão de mRNA da GPx1 e GR. Esses resultados indicam a ativação do sistema antioxidante em resposta ao estresse oxidativo causado pelo cobre.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, K.B.F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. **Glutathione reductase**. *Methods in Enzymology*, v. 113, p. 484-490, 1985.
- CONFORTI, R. A. *et al.* Copper in Gynecological Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 24, p. 17578, 2023.
- HUSAK, V.V. *et al.* Acute exposure to copper induces variable intensity of oxidative stress in goldfish tissues. **Fish physiology and biochemistry**, v. 44, p. 841-852, 2018.
- JIANG, W.D. *et al.* Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: Protective effects of myoinositol. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 301-313, 2014.
- KIM, S. *et al.* Acute effects of heavy metals on the expression of glutathione-related antioxidant genes in the marine ciliate *Euplotes crassus*. **Marine pollution bulletin**, v. 85, n. 2, p. 455-462, 2014.
- LIU, H. *et al.* Copper induces oxidative stress and apoptosis in the mouse liver. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.
- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MIGUEL, M. P. *et al.* Intoxicação crônica por cobre em ovinos: conduta para o diagnóstico conclusivo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 364-368, 2013.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-333, 1981.



WU, X. *et al.* Association of the canine ATP7A and ATP7B with hepatic copper accumulation in Dobermann dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 33, n. 4, p. 1646-1652, 2019.

Apoio financeiro: CNPq Universal, UFSC, CNPq-PIBIC

Agradecimentos: CNPq, UFSC.

