

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Verônica Farina Azzolin**

**INTERAÇÃO ENTRE O BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA E O  
DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO  
NA CITO-GENOTOXICIDADE DE CÉLULAS NEURAIS E IMUNES  
MONONUCLEARES**

Santa Maria, RS  
2018

**Verônica Farina Azzolin**

**INTERAÇÃO ENTRE O BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA E O DESBALANÇO  
SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA CITO-GENOTOXICIDADE DE  
CÉLULAS NEURAIS E IMUNES MONONUCLEARES**

Tese apresentada ao Curso de  
Pós Graduação em  
Farmacologia, da Universidade  
Federal de Santa Maria (UFSM,  
RS) como requisito para  
obtenção do título de **Doutora  
em Farmacologia**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Beatrice Mânicca da Cruz

Santa Maria, RS  
2018

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Azzolin, Verônica Farina

Interação entre o Brometo de Piridostigmina e o desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio na cito genotoxicidade de células neurais e imunes mononucleares / Verônica Farina Azzolin.- 2018.

172 p.; 30 cm

Orientador: Ivana Beatrice Mânicia da Cruz  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Cito-Genotoxicidade do Fármaco Brometo de Piridostigmina 2. Associação do polimorfismo Val16Ala SOD2 com fármaco Brometo de Piridostigmina I. Mânicia da Cruz , Ivana Beatrice II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

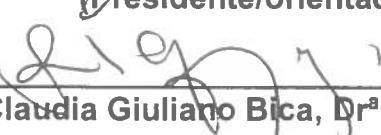
**Verônica Farina Azzolin**

**INTERAÇÃO ENTRE O BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA E O DESBALANÇO  
SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA CITO-GENOTOXICIDADE DE  
CÉLULAS NEURAIS E IMUNES MONONUCLEARES**

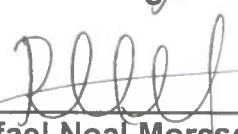
Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Aprovada em 11 de junho de 2018:

  
**Ivana Beatrice Mânicca da Cruz, Drª. (UFSM)**  
(Presidente/orientadora)

  
**Claudia Giuliano Bica, Drª. (UFCSPA)**

  
**Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)**

  
**Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)**

  
**Rômulo Barcelos, Dr. (UPF)**

Santa Maria, RS

## **DEDICATÓRIA**

*Didico este trabalho, á minha família, ao meu pai, mãe, irmã e tia. Os meus grandes incentivadores, os quais não mediram esforços, para eu estar aqui hoje.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Este trabalho é resultado de uma caminhada muito importante na minha vida, pois, foi acompanhado de muitos períodos com “altos e baixos”. Foi uma etapa onde exigiu muita maturidade, dedicação, um período fundamental de aprendizado, onde estavam presentes pessoas fundamentais para conclusão deste sonho de fazer doutorado.*

*Por isso gostaria de deixar aqui alguns agradecimentos. No entanto, serei bem sucinta, pois, acredito que a melhor forma de agradecer são as atitudes no decorrer da vida.*

*Primeiro gostaria de agradecer aos seres superior, na qual acredito, que são quem nos transmitem muita força.*

*À minha família que esteve presente em todas as etapas da minha vida, e nessa tiveram uma participação muito especial, pois foram quem não me deixaram desistir na hora agá. Obrigada pai Valdenir Azzolin, mãe Geneci Azzolin, irmã Vitória Azzolin, tia Líria Farina. Obrigada por serem essa família unida que somos, pelo amor, carinho, companheirismo. Me sinto honrada de telo-os.*

*Agradeço in memoriam, ás minhas avós, Juliva Canterle e Almerinda Azzolin e a tia Maria Helena Canterle, que tenho certeza que sempre estiveram na torcida.*

*À minha orientadora, por ser esse exemplo de pessoa e profissional. Obrigada pela confiança. Agradeço pelos ensinamentos profissionais, mas também os que levarei para a vida. Agradeço por todo o empenho, trabalho e dedicação, que mesmo passando por momentos difíceis não deixaram de acontecer. Terás sempre minha admiração, amizade, respeito e reconhecimento.*

*À minha amiga Fernanda Barbisan, a qual foi mais uma “irmã” que ganhei nessa caminhada. Agradeço pela amizade e força de sempre. Tu sabes que sempre irei torcer muito por ti. E também sempre estarei aqui para o que der e vier.*

*Agradeço aos amigos Moisés Mastella, Cibele Teixeira, Micheli Jobim, Gustavo Monteiro, Neida Pellez pela amizade, por toda ajuda e suporte nos experimentos, e claro pelos nossos momentos de diversão. Sempre estarei aqui para o que precisarem.*

*Agradeço a Maiquidiele Dalberto, Jessica Mota, Juliane Sasso, pela torcida de sempre! Podem contar comigo!*

*Agradeço aos demais colegas e amigos do Laboratório de Biogenômica todos vocês foram muito importantes nessa trajetória. Ao Alencar Machado, Francine Cadoná e o Eduardo Dornelles que foram fundamentais quando entrei aqui. A Danieli Pillar por toda ajuda e suporte no dia a dia. Obrigada à todos!*

*À Universidade Federal de Santa Maria. Ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia, a todos os professores, a secretaria Zeli Carvalho. A Bolsa de estudos do Programa de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).*

*E a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para esse momento.*

*A vida é como andar de bicicleta,  
para ter equilíbrio você precisa  
se manter em movimento.*

*(Albert Einstein)*

*Eu não tenho ídolos.  
Tenho admiração por trabalho,  
dedicação e competência.*

*(Ayrton Senna)*

## RESUMO

### INTERAÇÃO ENTRE O BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA E O DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA CITO-GENOTOXICIDADE DE CÉLULAS NEURAIS E IMUNES MONONUCLEARES

AUTOR: Verônica Farina Azzolin  
ORIENTADOR (A): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Beatrice Mânicca da Cruz

O brometo de piridostigmina (PB) é um inibidor reversível da acetilcolinesterase (AChE), e a primeira linha de tratamento dos sintomas associados à distúrbios da junção neuromuscular (JNM) e também foi utilizado de forma profilática na Guerra do Golfo Pérsico (GWI), para prevenção de estresse pós traumático, exposição ao calor e pesticidas. O papel do PB em relação a doença da GWI, que inclui sintomas como fadiga, disfunção cognitiva e musculoesquelética ainda é controverso. Uma vez que se utilizado isoladamente parece não apresentar intensos efeitos tóxicos, entretanto associado a outros fármacos e agentes químicos torna-se genotóxico e indutor de apoptose em animais. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar a interação entre o PB e o desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio (S-HP) na cito-genotoxicidade de células neurais e imunes mononucleares. Três delineamentos experimentais foram conduzidos. O primeiro estudo teve por objetivo avaliar o efeito do PB sobre a cito e genotoxicidade em células neurais SHSY-5Y. Foi realizada uma investigação *in vitro* utilizando células neurais humanas (SHSY-5Y). As células foram expostas ao PB em diferentes concentrações, com base na concentração terapêutica plasmática do fármaco para o tratamento da Miastenia Gravis MG (40 ng/ mL). A curva de concentração do fármaco mostrou uma inibição da atividade da AChE. No entanto, este efeito foi transitório e não envolveu a regulação da expressão gênica da AChE. Em geral, o PB não desencadeou estresse oxidativo, exceto na maior concentração (80 ng/mL), foi detectado dano proteico e dano ao DNA. Os efeitos genotóxicos foram confirmados pelo aumento na expressão dos genes p53 e DNA metiltransferase 1 (DNMT1) genes, que estão associados ao reparo do DNA celular. A concentração de 40 ng/mL, que é a dose terapêutica mínima, apresentou um efeito cito-genotóxico menos intenso, promovendo uma maior proliferação celular e atividade mitocondrial em comparação com o grupo não tratado. Esses efeitos foram corroborados pelo aumento da expressão do gene da telomerase. Dois outros protocolos foram conduzidos a fim de avaliar a influência genética associada ao desequilíbrio oxidativo basal de S-HP desencadeado pelo polimorfismo de nucleotídeo único da enzima superóxido dismutase 2 (Val16Ala-SOD2 SNP, rs4880). O genótipo VV apresenta maiores níveis de superóxido basal ( $O_2^-$ ), enquanto o AA exibe maiores níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) basal quando comparado com o do genótipo AV. Portanto, o objetivo foi avaliar se o polimorfismo Val16Ala-SOD2 poderia alterar os efeitos cito-genotóxicos desencadeados por diferentes concentrações de PB em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs). As CMSPs foram obtidas de voluntários portadores de diferentes genótipos da SOD2. Níveis proteicos e expressão gênica de enzimas antioxidantes, marcadores apoptóticos (Bax, Bcl-2, caspases 3 e 8) e DNMT1 foram avaliadas em culturas de 24 horas. Em geral, o PB aumentou a expressão gênica de enzimas antioxidantes e desencadeou eventos apoptóticos nas células do genótipo AA. As CMSPs AA mostram-se mais sensíveis à exposição ao PB, resultando em maior inibição da AChE, mortalidade celular, carbonilação de proteínas e danos no DNA, conforme analisado pelo ensaio cometa. Contrariamente, o PB demonstrou efeitos cito-genoprotetores nas células do alelo-V. Esses resultados sugerem que fatores genéticos que aumentam a liberação de  $H_2O_2$  podem afetar a eficiência e a segurança do PB. Por fim, o terceiro estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a interação entre o desbalanço farmacológico S-HP associado ao PB em células neurais SHSY-5Y. Um protocolo farmacológico de desbalanço S-HP foi desenvolvido para obter células semelhantes ao genótipo AA (AA-

*like*), apresentando níveis elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e células semelhantes ao genótipo VV (VV-*like*), apresentando maiores níveis de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Os resultados mostraram que a interação entre o desbalanço S-HP associado ao PB diminuiu a viabilidade celular, aumentou os níveis de dano ao DNA em células AA-*like*. Análises da expressão gênica e modulação proteica do BAX, BCI-2, caspase 3 e 8, sugerem que o efeito citotóxico sobre as células neurais não envolve apoptose intrínseca ou extrínseca, sugerindo a ocorrência de outros processos na morte celular. As células VV-*like* apresentaram maior atividade da AChE que as células balanceadas, e menor eficácia na inibição dessa enzima pela exposição ao PB. Portanto, a interação entre o desequilíbrio S-HP em associação como PB poderia ter algum papel no desenvolvimento da doença da GWI e na ocorrência de efeitos adversos em alguns pacientes que utilizam para o tratamento da MG. Em síntese, apesar das limitações metodológicas relacionadas aos estudos *in vitro*, o conjunto dos resultados confirmou que o PB isoladamente em células neurais não causa extensa toxicidade, no entanto quando esse está associado ao desbalanço oxidativo S-HP em células neurais e periféricas pode causar toxicidade.

**Palavras Chave:** Inibidor da Acetylcolinesterase. Estresse Oxidativo. Neurotoxicidade. Polimorfismo Val16Ala-SOD2.

## ABSTRACT

### INTERACTION BETWEEN PYRIDESTIGMINE BROMIDE AND HYDROGEN SUPEROXIDE-PEROXIDAL DEBALANCE IN CYTO-GENOTOXICITY OF NEURAL AND IMMUNE MONONUCLEAR CELLS

AUTHOR: Verônica Farina Azzolin

ADVISOR: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Beatrice Mânic da Cruz

Pyridostigmine bromide (PB) is a reversible acetylcholinesterase inhibitor (AChE), and the first line of symptoms associated with neuromuscular junction disorders (JNM) and has been used prophylactically in the Persian Gulf War (GWI), for prevention of post-traumatic stress, exposure to heat and pesticides. The role of PB in relation to GWI disease, which includes symptoms such as fatigue, cognitive and musculoskeletal dysfunction, is still controversial. Since it is used alone it does not appear to present intense toxic effects, however associated to other drugs and chemical agents it becomes genotoxic and inducer of apoptosis in animals. Therefore, the objective of this study was to evaluate the interaction between PB and superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance in the cytogenotoxicity of neural and mononuclear immune cells. Three experimental designs were conducted. The first study aimed to evaluate the effect of CP on cytotoxicity and genotoxicity in SHSY-5Y neural cells. An in vitro investigation using human neural cells (SHSY-5Y) was performed. Cells were exposed to PB in different concentrations, based on the plasma drug concentration for the treatment of Myasthenia Gravis MG (40 ng / mL). The concentration curve of the drug showed an inhibition of AChE activity. However, this effect was transient and did not involve the regulation of AChE gene expression. In general, PB did not trigger oxidative stress except at the highest concentration (80 ng/mL), protein damage and DNA damage were detected. Genotoxic effects were confirmed by increased expression of p53 and DNA methyltransferase 1 (DNMT1) genes, which are associated with cellular DNA repair. The concentration of 40 ng/mL, which is the minimal therapeutic dose, showed a less intense cytotoxic effect, promoting a greater cell proliferation and mitochondrial activity compared to the untreated group. These effects were corroborated by increased telomerase gene expression. Two other protocols were conducted to evaluate the genetic influence associated with the basal oxidative imbalance of S-HP triggered by the unique nucleotide polymorphism of the enzyme superoxide dismutase 2 (Val16Ala-SOD2 SNP, rs4880). The VV genotype presents higher levels of basal superoxide ( $O_2^-$ ), whereas AA exhibits higher levels of basal hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) when compared to that of the AV genotype. Therefore, the objective was to evaluate whether the Val16Ala-SOD2 polymorphism could alter the cytotoxic effects triggered by different concentrations of PB in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PBMCs were obtained from volunteers with different genotypes of SOD2. Protein levels and gene expression of antioxidant enzymes, apoptotic markers (Bax, Bcl-2, caspases 3 and 8) and DNMT1 were evaluated in 24-hours cultures. In general, PB increased the gene expression of antioxidant enzymes and triggered apoptotic events in AA genotype cells. AA PBMCs are shown to be more sensitive to PB exposure, resulting in increased AChE inhibition, cell death, protein carbonylation and DNA damage as analyzed by the comet assay. In contrast, PB demonstrated cyto-genoprotective effects on V allele cells. These results suggest that genetic factors that increase the release of  $H_2O_2$  may affect the efficiency and safety of PB. Finally, the third study aimed to evaluate in vitro the interaction between the pharmacological imbalance S-HP associated with PB in SHSY-5Y neural cells. An S-HP unbalance pharmacological protocol was developed to obtain cells similar to the AA-like genotype, presenting high levels of  $H_2O_2$ , and cells similar to the VV-like genotype, presenting higher levels of  $O_2^-$ . The results showed that the interaction between PB-associated S-HP imbalance decreased cell viability, increased levels of DNA damage in AA-like cells. Analysis of the gene expression and protein modulation of BAX, BCL-2, caspase 3 and 8 suggest that the cytotoxic effect on neural cells does not involve intrinsic or extrinsic apoptosis, suggesting the

occurrence of other processes in cell death. VV-like cells had higher AChE activity than the equilibrated cells, and less efficacy in the inhibition of this enzyme by exposure to PB. Therefore, the interaction between the S-HP imbalance in association with PB may have some role in the development of GWI disease and in the occurrence of adverse effects in some patients who use it for the treatment of MG. In summary, despite the methodological limitations related to the in vitro studies, the results set confirmed that PB alone in neural cells does not cause extensive toxicity, however, when this is associated with S-HP oxidative imbalance in neural and peripheral cells can cause toxicity.

**Keywords:** Acetylcholinesterase Inhibitor. Oxidative stress. Neurotoxicity. Val16Ala-SOD2 polymorphism.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Ilustração do Sistema Nervoso Central e Periférico.....	24
<b>Figura 2-</b> Síntese e hidrólise da ACh.....	26
<b>Figura 3-</b> Vias de síntese, armazenamento, liberação e degradação da acetilcolina.	28
<b>Figura 4-</b> Desenho esquemático da AChE.....	29
<b>Figura 5-</b> Sinapse colinérgica na ausência e a na presença de um inibidor da AChE.....	30
<b>Figura 6-</b> Estrutura molecular da fisostigmina, neostigmina e piridostigmina.....	31
<b>Figura 7-</b> Atuação de enzimas antioxidantes e efeitos das EROS.....	43
<b>Figura 8-</b> Demostra de forma resumida o polimorfismo da SOD2.....	50
<b>Figura 9-</b> Demostra de forma resumida o desbalanço farmacológico S-HP.....	52
<b>Figura 10-</b> Delineamento geral do artigo 1.....	54
<b>Figura 11-</b> Delineamento geral do artigo 2.....	55
<b>Figura 12-</b> Delineamento geral do artigo 3.....	56

### **Figuras do Artigo 1**

<b>Figure 1-</b> Effects of pyridostigmine (PB) at different concentrations on the enzyme acetylcholinesterase AChE.....	67
<b>Figure 2-</b> Citotoxic effects of pyridostigmine bromide (PB) at different concentrations on SH-SY5Y neural cells.....	68
<b>Figure 3-</b> Effect of pyridostigmine bromide (PB), on proliferation, cell cycle and expression of the telomerase gene of neural cells (SH-SY5Y).....	70
<b>Figure 4-</b> Effects of pyridostigmine bromide (PB) at different concentrations on oxidative markers of SH-SY5Y neural cells.....	71
<b>Figure 5-</b> Genotoxic effects of pyridostigmine bromide (PB) at different concentrations on of SH-SY5Y neural cells.....	73
<b>Figure 6-</b> Schematic illustration of the results found in neural SH-SY5Y cells exposed to therapeutic dose (40 ng/mL) and higher therapeutic dose (80 ng/mL) of pyridostigmine bromide (PB).....	75

## **Figuras do Artigo 2**

- Figure 1-** Effect of pyridostigmine bromide (PB) in 24 h peripheral blood mononuclear cells carrying different Val16AlaSOD2 genotypes. ....93
- Figure 2-** Effect of pyridostigmine bromide (PB) on lipoperoxidation, carbonylation of proteins, and DNA damage in 24 h peripheral blood mononuclear cell cultures, as determined by the comet assay.....95
- Figure 3-** Effect of PB on the action of antioxidant enzymes and 8OHdG DNA damage marker in PBMC with different Val16AlaSOD2 genotypes.....96
- Figure 4-** Cell apoptosis and expression of the DNMT1 repair gene at different PB concentration in PBMCs of different Val16AlaSOD2 genotypes.....98

## **Figuras do Artigo 3**

- Figure 1-** Pharmacological imbalance analysis of superoxide-hydrogen peroxide in neural cells. Analysing the viability and oxidative metabolism.....120
- Figure 2-** Effect of the interaction of pyridostigmine bromide on the superoxide-hydrogen peroxide imbalance in neural cells. In viability and oxidative metabolism.121
- Figure 3-** Effect of the interaction of pyridostigmine bromide on the superoxide-hydrogen peroxide imbalance in neural cells. Analysing oxidation of 8OHdG DNA and antioxidant enzymes.....123
- Figure 4-** Effect of the interaction of pyridostigmine bromide on the superoxide-hydrogen peroxide imbalance in neural cells. In modulation of apoptosis in protein and gene expression level and the DNA damage repair gene.....125
- Figure 5-** Evaluated the potential interaction between superoxide-hydrogen peroxide imbalance in inhibition of AChE and the same interaction of pyridostigmine bromide.....126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Alanina Alanina  
AA-like: Similar ao genótipo Alanina Alanina  
Acetyl CoA: Acetyl coenzima A  
ACh: Acetilcolina  
AChE: Enzima acetilcolinesterase  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AV: Alanina Valina  
BuCH: Butirilcolina  
BuChE: Butirilcolinesterase  
C: Citosina  
CAT: Catalase  
ChAT: Colina acetiltransferase  
CMSPs: Células Mononucleares do Sangue Periférico  
Cu<sup>++</sup>: Íon cobre  
DEET: *N, N-dimetil-meta-toluamida*  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio  
Fe<sup>++</sup>: Íon Ferro  
GCT: Alanina  
GPx: Glutationa peroxidase  
GTT: Valina  
GWI: do inglês *Persian Gulf War*  
H<sub>2</sub>O: Água  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio  
HP: do inglês *Hydrogen Peroxide*  
JNM: Junção neuromuscular  
LDL: Lipoproteína de baixa densidade  
mAChR: Receptores muscarínicos  
MG: Miastenia Gravis  
MTS: do inglês *Mitocondrial Sequence Target*  
nAChR: Receptores nicotínicos  
8-OHdG: 8 hidroxi-2-desoxiguanosina  
O<sub>2</sub><sup>°</sup>: Radical Superóxido  
OH<sup>°</sup>: Radical hidroxila  
<sup>°</sup>NO: Oxido Nítrico  
ONOO<sup>-</sup>: Peróxidonitrito  
PB: do inglês *Pyridostigmine Bromide*  
qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real  
ROS: do inglês *Oxygen-reactive species*  
S: Superóxido  
S-HP: Superóxido-peróxido de hidrogênio  
SHSY-5Y- Células Neuronais  
SNA: Sistema Nervoso Autônomo  
SNC: Sistema Nervoso Central  
SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único  
SNP: Sistema Nervoso Periférico  
SOD: Superóxido dismutase

SOD2: Superóxido dismutase dependente de manganês

T: Timina

VAChT: Transportador vesicular de acetilcolina

VV: Valina Valina

VV-*like*: Similar ao genótipo valina valina

Zn: Zinco

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	18
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	19
1.1 HIPÓTESE .....	20
1.2 OBJETIVOS .....	21
<b>1.2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>22</b>
2.1 SISTEMA NERVOSO.....	22
2.2 AÇÕES DO SISTEMA COLINÉRGICO NO SISTEMA NERVOSO .....	24
<b>2.2.1 Metabolismo da Acetylcolina .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.2 Metabolismo da Acetylcolinesterase.....</b>	<b>27</b>
2.3 INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE .....	30
<b>2.3.1 Mecanismo de Ação dos inibidores da Acetylcolinesterase .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2 Efeito terapêutico dos fármacos anticolinesterásicos.....</b>	<b>33</b>
2.4 CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA .....	34
2.5 USO DO BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA NA GUERRA DO GOLFO PÉRSICO .....	38
2.6 POTENCIAL EFEITO DO BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA NO ESTRESSE OXIDATIVO.....	40
<b>2.6.1 Indução de genotoxicidade e apoptose via estresse oxidativo .....</b>	<b>43</b>
2.7 O MODELO DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDRÔGENIO .....	46
<b>3 DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL .....</b>	<b>53</b>
3.1 DELINEAMENTO GERAL ARTIGO 1 .....	53
3.2 DELINEAMENTO GERAL ARTIGO 2 .....	54
3.3 DELINEAMENTO GERAL ARTIGO 3 .....	55
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
Artigo 1 .....	59
Artigo 2 .....	85
Artigo 3 .....	110

<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	141
<b>6 CONCLUSÕES PARCIAIS .....</b>	155
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	156
<b>ANEXOS.....</b>	170

## APRESENTAÇÃO

Essa tese de doutorado segue as recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) do ano de 2015. A mesma está apresentada na forma de 3 artigos científicos, que avaliaram o efeito cito-genotóxico do PB, um inibidor da enzima AChE em células neurais-*like* (SHSY-5Y) e células imunes mononucleares. O primeiro estudo avaliou o efeito isolado do PB *in vitro* utilizando células SHSY-5Y, analisando a viabilidade celular, a indução de apoptose, modulação diferencial do ciclo celular, estresse oxidativo e genotoxicidade, sendo que os resultados obtidos foram publicados na revista *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. O segundo estudo analisou o potencial efeito cito-genotóxico do PB diferencialmente modulado pelo desbalanço S-HP causado pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2, rs4880 que tem sido associado ao risco de diversas doenças crônicas não-transmissíveis, e também a possíveis efeitos fármacos terapêuticos. Por fim, o terceiro estudo apresenta o desenvolvimento de um modelo farmacológico de desbalanço S-HP em células SHSY-5Y, utilizado para avaliar o quanto tal desbalanço poderia também afetar a resposta cito-genotóxica destas células, à exposição ao PB. As seções MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS encontram-se nos ARTIGOS CIENTÍFICOS I, II e III, os quais apresentam-se na integra desse estudo e seguem as recomendações das revistas as quais foram enviados. Os itens INTRODUÇÃO, REFERENCIAL TEÓRICO E UMA SÍNTESE DOS MATERIAIS E MÉTODOS, encontram-se no início dessa tese, os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, encontradas no final da mesma, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos nesse trabalho. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens, INTRODUÇÃO, REFERENCIAL TEÓRICO E DISCUSSÃO desta tese, uma vez que as referências utilizadas nos artigos científicos estão ao final de cada um deles.

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema colinérgico atua amplamente nos tecidos do corpo, principalmente através da ação da acetilcolina (ACh), um neurotransmissor, que modula a contração muscular, sendo, portanto, constantemente liberado por neurônios e degradado pela enzima acetilcolinesterase (AChE) na placa neuromotora.

Em certas morbidades auto-imunes que afetam a placa neuromotora, como geralmente é o caso da Miastenia Graves (MG), inibidores da AChE, especialmente o Brometo de Piridostigmina (PB) são utilizados para aliviar os sintomas da doença, principalmente fadiga generalizada e ptose palpebral. O PB é um fármaco parassimpaticomimético inibidor reversível da AChE.

Quimicamente trata-se de uma amina quaternária (GOLAN,2009), usado clinicamente não só no tratamento da MG, mas também no tratamento coadjuvante da doença de Little, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, mioatrofias espinhais e paresias consecutivas a poliomielite. O acúmulo transitório da Ach induzido pelo PB auxilia na redução dos sintomas neuromusculares, como por exemplo a fadiga ou mesmo na diminuição de eventos potencialmente fatais com é o caso da crise respiratória miastênica. Também está liberado para uso na prevenção dos distúrbios da pós-punção lombar e do meningismo pós-eletroencefalografia (HALEY e KURT, 1997; SPENCER et al., 2001).

Por ser um inibidor reversível da AChE, o PB foi ministrado a soldados que participaram da Guerra do Golfo Persíco (GWI) como agente profilático contra a potencial exposição a organofosforados irreversíveis, por exemplo, o gás Sarin, utilizado como armamento biológico. Entretanto, cerca de 30% dos soldados que fizeram uso do PB desenvolveram uma síndrome caracterizada pela presença de múltiplos sintomas, que ficou conhecida como síndrome do Golfo. Os principais sintomas são: fadiga, dores de cabeça, disfunção cognitiva, distúrbios respiratórios, gastrointestinais e musculoesqueléticos (WHITE et al.,2016).

Um estudo realizado identificou o risco do desenvolvimento de três síndromes associadas ao uso do PB: síndrome 1, caracterizada por “cognição prejudicada”; síndrome 2, caracterizada por “confusão-ataxia”; e síndrome 3, caracterizada por “arto-mio-neuropatia” (HALEY e KURT, 1997).

Pesquisas em modelos experimentais sugeriram que a doença da GWI poderia ser potencialmente induzida pela interação entre o PB e outros agentes químicos,

físicos e psicológicos que levariam a um aumento no estresse oxidativo desencadeando posteriormente os efeitos da doença (ABOU-DONIA et al., 2003; LI et al., 2012). Alguns dos sintomas relacionados a síndrome do Golfo também sugeriram ação do PB em nível de sistema nervoso central (SNC), provavelmente desencadeado pela alteração na permeabilidade da barreira sangue-cérebro causada pela interação entre o PB e os demais agentes estressores (FRIEDMAN et al., 1996; SINTON et al., 2000; PAVLOVSKY et al., 2003).

Apesar destas evidências prévias, investigações avaliando o efeito cito-genotóxico do PB em células neuronais ainda não foram conduzidos em profundidade, bem como não foram conduzidos estudos envolvendo a potencial interação entre o PB e desbalanço oxidativo associado a variações genéticas de enzimas antioxidantes. Este é o caso do polimorfismo Val16AlaSOD-2 encontrado no gene da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2) que está associado ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, também parece ter efeitos farmacogenéticos na eficácia e segurança de determinados fármacos.

## 1.1 HIPÓTESE

O presente estudo está subsidiado na seguinte hipótese: O PB é um fármaco inibidor da enzima AChE, impermeável a barreira sangue-cérebro, que quando utilizado isoladamente parece ser farmacologicamente seguro. Entretanto, seus efeitos cito-genotóxicos parecem ser induzidos pela interação com outros fatores, como o desbalanço oxidativo associado ao polimorfismo da SOD2. O trabalho apresenta três hipóteses integradas:

- o PB afeta a cito-genotoxicidade e atividade da enzima AChE em células neurais de origem humana (linhagem comercial SHSY-5Y) sem nenhuma associação.
- o PB afeta diferencialmente a cito-genotoxicidade e a atividade da enzima AChE em CMSPs portadoras de um desbalanço oxidativo associado ao polimorfismo genético Val16AlaSOD-2.
- o PB afeta diferencialmente a cito-genotoxicidade e a atividade da enzima AChE em células neurais previamente expostas ao paraquat e porfirina que geram um desbalanço oxidativo similar ao observado no polimorfismo genético Val16AlaSOD-2.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a interação entre o PB e o desbalanço S-HP na cito-genotoxicidade e modulação da inibição da enzima AChE em células neurais e imunes monucleares.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

Em células neurais de linhagem comercial SHSY-5Y avaliar o efeito do PB na viabilidade celular, marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, dano de DNA, marcadores da apoptose celular, taxa de proliferação celular e na inibição da enzima AChE (*Artigo 1*).

Avaliar a interação entre a exposição ao PB e o desbalanço oxidativo causado pelo polimorfismo da Val16Ala-SOD2 na eficácia da inibição da enzima AChE e na cito-genotoxicidade, em CMSPs portadoras de diferentes genótipos deste polimorfismo, através da análise da viabilidade celular, marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, dano de DNA, marcadores da apoptose celular e na inibição da enzima AChE (*Artigo 2*).

Avaliar a interação entre a exposição ao PB e o desbalanço oxidativo farmacológico causado pela exposição ao paraquat ou a porfirina em células neurais SHSY-5Y na eficácia da inibição da enzima AChE e na cito-genotoxicidade. Avaliando a viabilidade celular, marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, dano de DNA, marcadores da apoptose celular (*Artigo 3*).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso realiza atividades que são iniciadas a partir de experiências sensoriais, incluindo receptores visuais, auditivos, gustativos, táticos, entre outros e também de informações endógenas relacionadas ao desenvolvimento e a homeostase corporal. Dessa forma, seu papel principal consiste em controlar as atividades corporais principalmente através das contrações musculares voluntárias e involuntárias, e secreções de substâncias parácrinas, autócrinas e de glândulas endócrinas e exócrinas (GUYTON e HALL, 2006).

Durante o desenvolvimento evolutivo, o sistema nervoso passou a fixar características específicas em cada estágio ontogenético, o que nos animais complexos, incluindo os seres humanos levou a sua diferenciação anátomo-funcional em: SNC e Sistema Nervoso Periférico (SNP) (Figura 1) (GUYTON e HALL, 2006).

O SNP ainda pode ser subdividido em sistema nervo aferente e eferente subdividido em Sistema Somático e Sistema Autônomo esse constituído pelo sistema simpático e parassimpático (GUYTON e HALL, 2006). Em termos anatomofuncionais, o SNC envolve todas as estruturas situadas dentro do crânio e da coluna vertebral. A medula espinhal está associada com a condução de informação do ambiente externo ao encéfalo, ocorrendo também o sentido inverso. A comunicação ocorre através dos nervos espinhais que estão ligados a raiz dorsal e ventral na sua superfície, emergindo para o SNP (BEAR et al., 2008).

Já o SNP é constituído principalmente por nervos que se espalham por todas as partes do corpo, transmitindo impulsos elétricos através de informações captadas no ambiente ou no próprio organismo (BEAR et al., 2008; LENT, 2010). As ramificações nervosas podem transportar informações sensitivas ou motoras, somáticas ou viscerais. O sistema nervoso somático apresenta nervos espinhais sob controle voluntário enquanto o sistema nervoso visceral é involuntário, autônomo, apresentando neurônios inervados a órgãos internos, vasos sanguíneos e glândulas (LENT, 2010).

A transmissão dos impulsos elétricos é responsável pelas ações de todas as divisões do sistema nervoso, que ocorre por vias sinápticas entre os neurônios, ou entre neurônios e tecidos efetores, como é o caso do tecido muscular. Assim, o

impulso elétrico é o mesmo responsável pela propagação dos estímulos nervosos ao corpo, a transmissão do impulso elétrico, via desencadeamento de um potencial de ação é finalizada pela liberação de moléculas neurotransmissoras que estão geralmente contidas nas chamadas “vesículas sinápticas” localizadas nas terminações nervosas (LENT, 2010; MERIGGIOLI e SANDERS, 2009).

Moléculas neurotransmissoras liberadas se difundem na fenda sináptica e interagem com os seus receptores na membrana pós-sináptica de neurônios e músculos, gerando um potencial de ação que induz uma resposta tecidual. Nas células musculares, este processo ocorre em uma estrutura conhecida como placa motora (LENT, 2010; MERIGGIOLI e SANDERS, 2009; THANVI e LO, 2004).

Em termos fisiológicos, quando os neurotransmissores são liberados induzem uma despolarização da membrana da célula receptora, podendo gerar, uma resposta motora, sensorial ou visceral (BEAR et al., 2008; LENT, 2010).

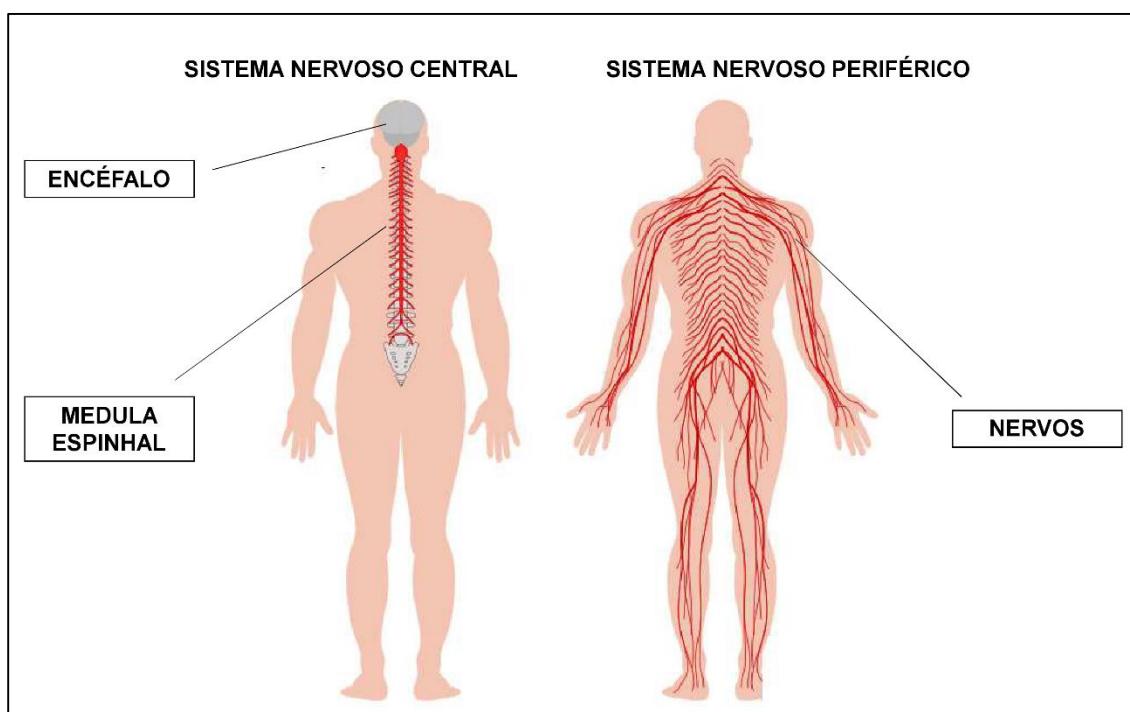
Como os neurotransmissores são moléculas de grande efeito fisiológico, sua ação pós-sináptica tem que ser intensa e de curto prazo. Para tanto, logo após a sua liberação, geralmente os neurotransmissores são removidos da fenda sináptica. Esta remoção é feita através de vários mecanismos, como a recaptação desses neurotransmissores pela membrana pré-sináptica através do auxílio de transportadores proteicos específicos, localizados na membrana celular. A retirada do neurotransmissor da fenda sináptica também pode envolver enzimas que degradam esta molécula a moléculas menores que podem voltar a ingressar para o interior dos neurônios pré-sinápticos. De qualquer modo, estes processos interrompem a sua ação fisiológica (BEAR et al., 2008; LENT, 2010).

Este conhecimento básico sobre neurofisiologia possibilitou o diagnóstico ou o entendimento de mecanismos causais de morbidades neurológicas que afetam de modo direto ou indireto a placa motora. Além disto, possibilitou o desenvolvimento de diversos tipos de fármacos que interferem na transmissão sináptica, aumentam a ação dos neurotransmissores, ou ao contrário bloqueando ou amenizando tal neurotransmissão. Este é o caso das moléculas antagonistas, os quais se ligam aos receptores e bloqueiam a ação do neurotransmissor endógeno no tecido alvo (BEAR et al., 2008; LENT, 2010).

O curare, por exemplo, é um composto orgânico extraído de algumas espécies de plantas na América do Sul como, por exemplo, o arumã, que atua como um antagonista. Alguns povos indígenas utilizam esta substância na ponta das flechas

para capturar presas. Dessa forma, quando injetado no organismo, liga-se aos receptores de ACh, bloqueando a ação deste neurotransmissor e impedindo a contração muscular (BEAR et al., 2008). Existem também agonistas de receptores que atuam mimetizando a ação dos neurotransmissores. Esta característica pode ser observada na nicotina, a qual se liga ao receptores nicotínicos para acetilcolina (AChR) que são canais iônicos, no músculo esquelético, ativando-os (BEAR et al., 2008).

**Figura 1-** Ilustração do Sistema Nervoso Central e Periférico. O SNC é composto por encéfalo e medula espinhal. Já o SNP composto por nervos.



Fonte: Autora.

## 2.2 AÇÕES DO SISTEMA COLINÉRGICO NO SISTEMA NERVOSO

Dentro dos neurotransmissores que agem no sistema nervoso corporal, encontra-se o chamado sistema colinérgico associado a liberação da molécula de ACh na fenda sináptica (MESULAM, 2004; PARENT e BAXTER, 2004; POHANKA, 2011; POHANKA, 2012; PRADO et al., 2006; SARTER e PARikh, 2005; SOFUOGLU e MOONEY, 2009; VENTURA et al., 2010).

A ACh é considerada como um dos principais neurotransmissores químicos do SNP sendo liberada por todas as fibras pré-ganglionares, pós-ganglionares parassimpáticas e algumas simpáticas, bem como por neurônios motores que se projetam para a musculatura esquelética. Foi o pesquisador Otto Loewi quem descobriu esta molécula, quando observou em seu estudo a liberação de uma substância bioquímica pelas terminações nervosas parassimpáticas, a qual ele denominou ACh (BARTOLINI et al., 2011; POHANKA, 2011).

Todavia, está também se encontra envolvida em várias disfunções neurológicas e musculares. A ação aparentemente antagônica da ACh ocorre em decorrência da existência de diferentes receptores colinérgicos, que estão presentes conforme cada tipo de tecido-alvo. O conhecimento das diversas formas de atuação da ACh permitiu a identificação de mecanismos causais de diversas neuromorbidades associadas a distúrbios na placa neuromotora, principalmente relacionados a alterações nos receptores nicotínicos (POHANKA, 2011).

Este conhecimento, por sua vez, levou ao desenvolvimento ou ao entendimento da atuação de fármacos relacionados ao controle de sintomas de doenças neurológicas via modulação diferencial do sistema colinérgico (POHANKA, 2011; POHANKA, 2012; VENTURA et al., 2010).

Entre as morbidades com etiopatologia associada a alterações na resposta colinérgica destaca-se a MG e outras formas de síndromes miastênicas. Nestas doenças, inibidores da AChE são utilizados para controlar os sintomas clínicos (PAIVA, 2013). Além do seu papel na MG, estudos mais recentes indicam que a ACh poderia ser uma molécula chave na progressão e controle de sintomas de outras doenças neurodegenerativas, como é o caso da Doença de Alzheimer e outros tipos de demência (HEPNAROVA et al., 2018; KNIGHT et al., 2018).

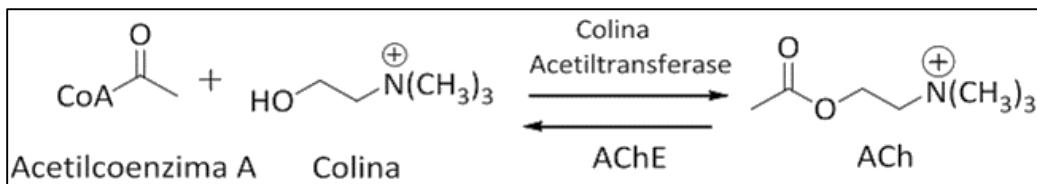
Por sua ação fisiológica bastante específica, fármacos associados a modulação de neurônios colinérgicos também acabaram sendo profilaticamente utilizados para prevenir populações sujeitas a exposição de moléculas potencialmente utilizadas na guerra biológica, como é o caso do gás Sarin (RAO et al., 2017). Por este motivo, considera-se que estudos que envolvam a farmacologia relacionada ao sistema colinérgico são clínicos e epidemiologicamente relevantes, para além da sua ação na MG.

## 2.2.1 Metabolismo da Acetylcolina

A ACh desempenha um papel crucial no controle de inúmeros processos fisiológicos de todas as divisões do SN. Este neurotransmissor é sintetizado em uma única etapa a partir da colina e da acetil coenzima A (acetil CoA), sendo catalisado pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) (Figura 2). A ACh, não está presente somente no SN, mas também é encontrada em muitos tipos de células, incluindo células endoteliais até células imunes (TAYLOR, 2007).

Em laboratório, ACh foi sintetizada pela primeira vez por Baeyer em 1867, entretanto naquela ocasião esta molécula não possuía aplicações terapêuticas relevantes já que a sua ação era difusa e a sua hidrolise muito rápida, uma vez que a mesma é catalisada tanto pela enzima AChE, quanto pela enzima butirilcolinesterase plasmática. Posteriormente, várias moléculas derivadas da ACh foram sintetizadas na tentativa de se obter fármacos com uma ação mais seletiva e prolongada (TAYLOR, 2007).

**Figura 2-** Síntese e hidrólise da ACh.



Fonte: Adaptada de Taylor, 2007.

Em termos fisiológicos, a manutenção da disponibilidade colinérgica está diretamente relacionada com a capacidade das terminações nervosas de sintetizar, armazenar e liberar ACh. Após ser sintetizada, a ACh é armazenada em vesículas sinápticas, pela ação do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), uma proteína que troca dois prótons vesiculares pela ACh citoplasmática (NGUYEN et al., 1998; POHANKA, 2012; THANVI e LO, 2004; VENTURA et al., 2010).

Logo que ocorre a despolarização, as vesículas se fundem com a membrana celular liberando a ACh na fenda sináptica, a fim de que ocorra interação com seus receptores. Por ser uma molécula estável, a ACh pode permanecer na fenda sináptica por um longo período de tempo, sendo fundamental a ação da enzima AChE para que ocorra a sua rápida degradação. Esta degradação é muito relevante, já que sua manutenção descontrolada poderia desencadear reações fisiológicas indesejáveis

incluindo a tetania muscular, ou mesmo distúrbios gastrointestinais como náusea e vômito, e alterações cardiovasculares importantes, principalmente a braquicardia (CASTRO et al., 2009; PRADO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006).

## **2.2.2 Metabolismo da acetilcolinesterase**

Nas sinapses colinérgicas estão presentes as colinesterases, que consistem em uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise da ACh em ácido acético e colina na fenda sináptica, e assim, permitem que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após ser ativado. As colinesterases mais comuns presentes na fenda sináptica a butirilcolinesterase (BuChE) e a AChE (COLOVIC et al., 2013).

Embora sejam evolutivamente semelhantes, estas enzimas diferenciam-se quanto a sua distribuição nos tecidos, as suas propriedades cinéticas e pela especificidade para com os seus substratos. A AChE encontra-se mais abundantemente no SNC, nos músculos esqueléticos e na membrana dos eritrócitos. Enquanto que a BuChE se encontra, em sua maioria, no plasma sanguíneo sendo por este motivo conhecida também como colinesterase plasmática (MULLER et al., 2002).

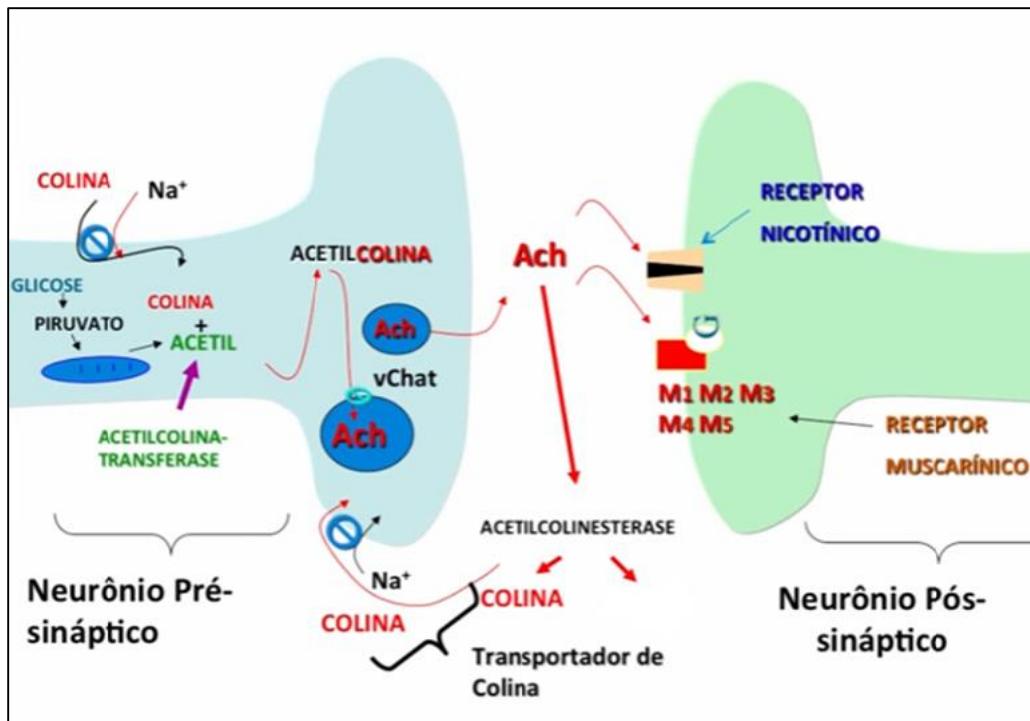
A AChE e BuChE apresentam semelhanças estruturais, sendo que seus aminoácidos apresentam aproximadamente 50% de homologia. Os outros 50% de heterogeneia entre os aminoácidos são responsáveis pelas diferenças de seletividade tanto dos substratos quanto dos inibidores destas enzimas. A AChE hidrolisa preferencialmente a ACh enquanto que a BuChE é menos seletiva e atua hidrolisando tanto a ACh quanto a Butirilcolina (BuCh) em quantidades comparáveis (PEZZEMENTI et al., 2011).

Em geral, a AChE é uma enzima que atua hidrolisando a ACh em moléculas precursoras encerrando rapidamente a sinalização desta molécula no neurônio pós-sináptico ou tecido-alvo. Deste modo, a AChE é uma enzima alvo no tratamento de diversas doenças, uma vez que os fármacos anticolinesterásicos, agem via sua inibição (Figura 3) (BRENNER, 2003; NGUYEN et al., 1998; OKUDA et al., 2000; POHANKA, 2011; POHANKA, 2012; RIBEIRO et al., 2006; SOFUOGLU e MOONEY, 2009; THANVI e LO, 2004; VENTURA et al., 2010;).

Uma vez liberada na fenda sináptica, a ACh liga-se a uma de duas classes de receptores, localizados habitualmente sobre a superfície da membrana da célula pós-sináptica. Os receptores muscarínicos (mAChR) são receptores acoplados à proteína

G com sete domínios transmembrana, enquanto os receptores nicotínicos (nAChR) são canais iônicos regulados por ligantes. Conforme o tecido, um dos receptores está presente ou é o mais predominante (GOLAN et al., 2009).

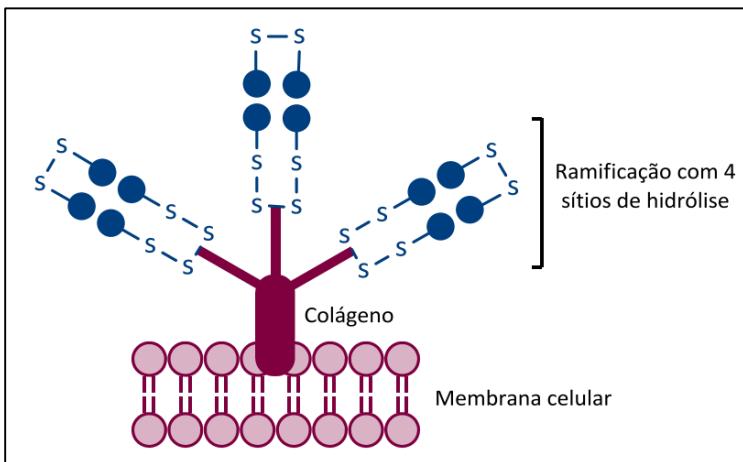
**Figura 3-** Vias de síntese, armazenamento, liberação e degradação da acetilcolina.



Fonte: Adaptada Rang et al., 2001.

Em termos estruturais, a AChE é uma enzima que apresenta três ramificações, ligadas por pontes dissulfeto, sendo fixada à membrana celular por colágeno. Cada ramificação é uma unidade enzimática composta por quatro subunidades proteicas, capazes de hidrolisar a ACh. Resultando desta forma, num total de 12 sítios ativos por enzima (PATRIC, 2009) (Figura 4).

**Figura 4-** Desenho esquemático da AChE.



Fonte: Adaptado de Patrick, 2009.

As subunidades catalíticas da AChE possuem aminoácidos que são fundamentais para sua atividade. Os resíduos de histidina e serina são importantes para a hidrólise da ACh. Existem também dois pontos essenciais para a interação do neurotransmissor com a enzima. O primeiro é o sítio iônico, onde há uma interação entre a carga positiva do nitrogênio da ACh e a carga negativa produzida pelo resíduo de aspartato da AChE. O segundo é o sítio esteárico, onde o grupo éster da ACh faz ligação de hidrogênio com o resíduo de tirosina da AChE (BERGMANN et al., 1950; WILSON et al., 1950).

A hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE depende dos resíduos de histidina, que funciona como um catalisador ácido-base, e de serina, que age como um nucleófilo. Na verdade, a serina por si só é incapaz de hidrolisar um éster, levando a histidina a exercer um papel importante na catálise.

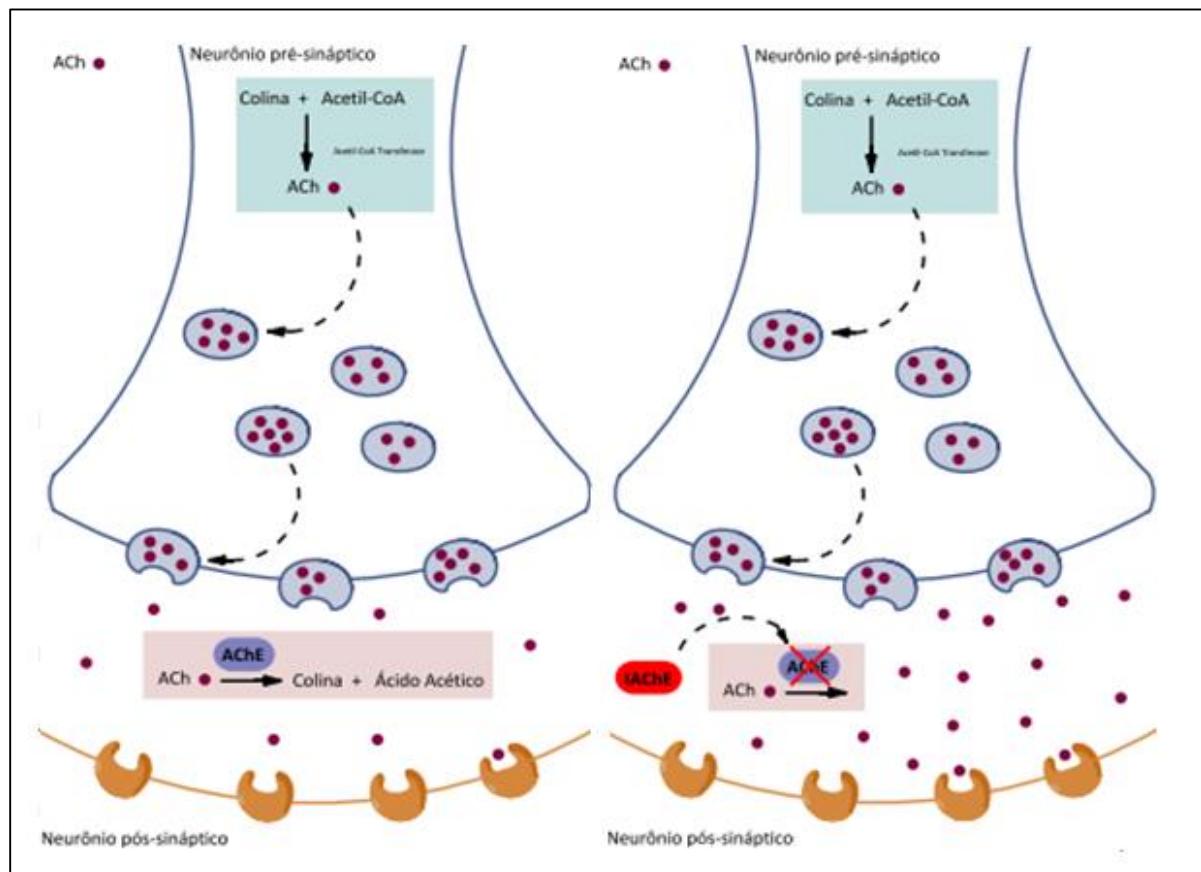
As seguintes etapas da atividade da AChE podem ser observadas: I. Após a chegada da ACh ao sítio ativo da AChE, a carbonila do neurotransmissor é atacada pelo par de elétrons da hidroxila do resíduo de serina. E a histidina atua como uma base retirando um próton do íon hidroxônio formado; II. A histidina protonada atua posteriormente como um ácido, doando um próton para a porção colina da ACh, que é então liberada. A saída da porção colina deixa a AChE acetilada e, para que a enzima volte a ter atividade está sofrerá hidrólise, com a água atuando como nucleófilo. Então, ácido acético é formado neste processo e o resíduo de serina é

liberado, fazendo com que a enzima esteja pronta para atuar novamente (FIFER, 2007).

## 2.3 INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE

Os fármacos inibidores da AChE são denominados anticolinesterásicos, e estes são terapeuticamente utilizados para reverter o bloqueio neuromuscular promovido por miorrelaxantes não despolarizantes, no tratamento de doenças neurológicas como a MG e a Síndrome Miastênica, atonia do músculo liso, no estrabismo, no tratamento dos sintomas da Doença de Alzheimer, entre outros casos (INOUE e OLIVEIRA, 2004; SILVA, 2002; STANDAERT e YOUNG, 2006). Um fármaco anticolinesterásico retarda a degradação da ACh, assim o neurotransmissor passa mais tempo na fenda sináptica, intensificando desta forma a transmissão colinérgica, conforme pode ser observado na (Figura 5) (ARAÚJO et al., 2016).

**Figura 5:** Sinapse colinérgica na ausência e a na presença de um inibidor da AChE.

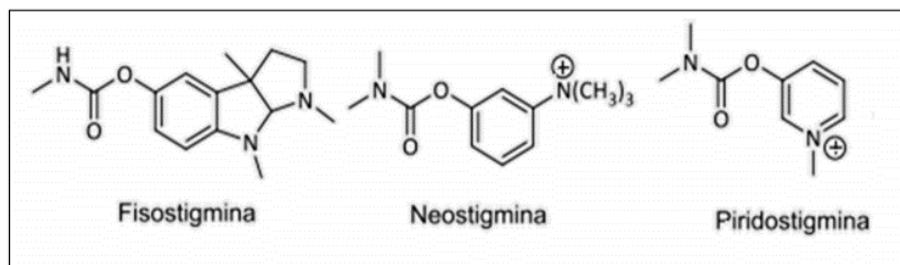


Fonte: Adaptada Araújo et al., 2016.

A fisostigmina, um alcalóide obtido do *Physostigma venenosum* L, foi o primeiro inibidor da AChE a ser descoberto. Assim, seus efeitos colinérgicos são conhecidos há muitos anos, em 1923 a estrutura molecular da substância ativa foi elucidada. Em 1929 Stedman demonstrou que os efeitos colinomiméticos da fisostigmina deviam-se à inibição reversível da AChE (FIFER, 2007). Apesar de antigo, este fármaco continua em uso, sendo utilizado no tratamento do glaucoma e em casos de overdose por compostos anticolinérgicos, como a atropina, e antidepressivos tricíclicos, como a amitriptilina (NETO et al., 2013).

Outros fármacos com ação inibitória da AChE foram desenvolvidos, como é o caso da neostigmina e do PB. Estes são análogos simplificados da fisostigmina (Figura 6) (SILVA, 2002).

**Figura 6-** Estrutura molecular da fisostigmina, neostigmina e piridostigmina.



Fonte: Adaptada Araújo et al., 2016.

O mecanismo de ação destes fármacos anticolinesterásicos (fisostigmina, neostigmina e PB) ocorre por apresentarem em suas estruturas químicas a função orgânica carbamato, sendo esta responsável pela inibição da AChE. Tal inibição ocorre nas seguintes etapas: I. No sítio catalítico da AChE, a carbonila do carbamato é atacada pela hidroxila do resíduo de serina, neste momento, a histidina atua como uma base recebendo um próton; II. Em seguida, a histidina funcionará como um ácido doando um próton para a liberação de uma porção do carbamato. Nesta etapa, a enzima fica impedida de realizar hidrólise, visto que seu sítio catalítico encontra-se ocupado. Na última etapa, o resíduo de serina ocupado com o grupo carbamato sofre hidrólise lentamente e a enzima torna-se ativa novamente. A velocidade de recuperação da enzima ligada com um grupo carbamato é mais lenta que quando a mesma encontra-se ligada com um grupo acetato (PATRICK, 2009).

### 2.3.1 Mecanismo de Ação dos inibidores da Acetylcolinesterase

Há duas classes de inibidores da AChE, com base no seu mecanismo de ação, podendo ser reversíveis ou irreversíveis dependendo do tipo de ação com o sítio ativo do fármaco. Os agentes reversíveis ainda se apresentam em dois grupos os de ação curta e os de ação intermediária (RANG e DALE, 2011).

Dentre os anticolinesterásicos reversíveis de ação curta tem-se o edrofônio, um composto de amônio quaternário que se liga apenas ao sítio aniônico da enzima. A ligação iônica formada é facilmente revertida, e a ação do fármaco é breve. É utilizado principalmente com finalidade diagnóstica, visto que a melhora da força muscular observada com o uso de um anticolinesterásico é característica da MG, mas não ocorre quando a fraqueza muscular é decorrente de outras causas (MARRS, 1993). Já, os anticolinesterásicos de duração intermediária englobam a neostigmina, PB e a fisostigmina que são compostos de amônio quaternário de importância clínica (RANG e DALE, 2011).

Em termos químicos, todos esses fármacos são carbamoil-ésteres, e possuem grupos básicos que se ligam ao sítio aniônico. A transferência do grupo carbamil para o grupo hidroxila da serina do sítio esterásico ocorre da mesma forma que com a ACh, porém a enzima carbamilada sofre hidrólise muito mais lentamente, levando minutos em vez de microssegundos. Os fármacos anticolinesterásicos são, portanto, hidrolisados, mas a uma velocidade insignificante quando comparados com a ACh e a recuperação lenta da enzima carbamilada indica que a ação desses fármacos é bastante prolongada (COLOVIC et al., 2013).

Já anticolinesterásicos irreversíveis, são compostos que apresentam um fósforo pentavalente que contêm um grupo lábil, como o fluoreto, ou um grupo orgânico. Ao ligar a enzima esse grupo é liberado, deixando fosforilado o grupo hidroxila da serina da enzima. A maior parte desses compostos organofosforados e muitos deles foram desenvolvidos para serem utilizados como arma química, na forma de gases tóxicos, e como pesticida, mas também para uso clínico, eles interagem apenas com o sítio esterásico da enzima e não apresentam grupo catiônico. O ecotiofato é uma exceção, uma vez que possui um grupo com nitrogênio quaternário que também se liga ao sítio aniônico (COLOVIC et al., 2013).

Quando a AChE está na forma fosforilada inativa esta molécula é geralmente muito estável. Com fármacos como o diflos, não ocorre uma hidrólise apreciável e a

recuperação da atividade enzimática depende de síntese de novas moléculas da enzima, um processo que pode levar semanas. Com outros fármacos como o ecotiofato, ocorre uma lenta hidrólise no decorrer de alguns dias, de modo que sua ação não é estritamente irreversível. O diflos e o paration são substâncias apolares voláteis com alta lipossolubilidade, rapidamente absorvidas através das membranas mucosas e até mesmo através da pele integra e da cutícula dos insetos. O uso desses agentes como arma química ou como inseticida baseia-se nessa propriedade. A ausência de um grupo quaternário que confirma especificidade indica que a maioria desses fármacos bloqueia outras serinas hidrolases, embora seus efeitos farmacológicos decorram principalmente da inibição da AChE (RANG e DALE, 2011).

### **2.3.2 Efeito terapêuticos dos fármacos anticolinesterásicos**

Os inibidores da AChE afetam tanto as sinapses colinérgicas periféricas, autônomas, quanto as sinapses do SNC. Também é importante destacar que, alguns compostos organofosforados são capazes de produzir uma forma grave de neurotoxicidade que levam a alterações irreversíveis do sistema colinérgico, principalmente desencadeando efeitos sobre as sinapses colinérgicas autonômicas. Essas implicações refletem principalmente o aumento da atividade da ACh nas sinapses pós-ganglionares parassimpáticas (aumento das secreções das glândulas salivares, lacrimais, brônquicas e gastrintestinais, aumento da atividade peristáltica, broncoconstricção, bradicardia, hipotensão, constrição pupilar, fixação da acomodação da visão para perto, queda da pressão intraocular). Doses maiores são capazes de estimular, e posteriormente bloquear, os gânglios autônomos, produzindo efeitos autônomos complexos. O bloqueio quando ocorre, consiste em bloqueio por despolarização e está associado ao acúmulo de ACh no plasma e nos líquidos orgânicos. A neostigmina e o PB tendem a afetar mais a transmissão neuromuscular que o sistema autônomo, ao passo que fisostigmina e os organofosforados mostram padrão oposto. O motivo desta disparidade não está claro, mas o uso terapêutico tira proveito dessa seletividade parcial (RANG e DALE, 2011).

O principal efeito desses fármacos se dá sob a junção neuromuscular (JNM), os mesmos aumentam a força de contração muscular estimulado por meio de seu nervo motor, graças à descarga repetitiva na fibra muscular associada a um prolongamento do potencial de ação. Normalmente, a ACh é hidrolisada tão

rapidamente que cada estímulo dá início a apenas um potencial de ação na fibra muscular. Contudo, quando a AChE está inibida, surge uma curta série de potenciais de ação na fibra muscular e, como consequência, uma maior tensão. Mais importante, porém, é o efeito produzido quando a transmissão é bloqueada por um agente bloqueador não despolarizante, como o pancurônio. Nesse caso, a adição de um anticolinesterásico pode restaurar drasticamente a transmissão. Quando um grande número de receptores é bloqueado, a maior parte das moléculas de ACh encontrará normalmente moléculas de AChE e será destruída por elas antes de alcançar um receptor vago, a inibição da AChE dá-se às moléculas de ACh uma chance maior de encontrar um receptor vago antes de serem destruídas, e como consequência aumenta o potencial de ação de tal modo que ele atinge o limiar. Na MG a transmissão não ocorre porque há pouquíssimos receptores de ACh, e, nesse caso a inibição da AChE melhora a transmissão (COLOVIC et al., 2013).

Em altas doses, os fármacos anticolinesterásicos podem causar intoxicação, causando inicialmente espasmos musculares. Isso ocorre porque a liberação espontânea de ACh pode dar origem a potenciais de ação que alcançam o limiar de disparo. Posteriormente, pode surgir paralisia em decorrência de bloqueio por despolarização, que está associado a um acúmulo de ACh no plasma e nos líquidos teciduais. Podem causar efeitos sobre o SNC os compostos terciários, como a fisostigmina, e os organofosforados apolares, que atravessam livremente a barreira sangue cérebro atingindo o cérebro. O resultado é uma excitação inicial, que pode causar convulsões, seguida de depressão, podendo originar perda da consciência e insuficiência respiratória. Esses efeitos centrais resultam principalmente da ativação de mAchR da ACh e são antagonizados pela atropina (GUEVARA e PUEYO, 1995).

## 2.4 CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA

O PB é um fármaco parassimpaticomimético inibidor reversível da AChE. É usado clinicamente no tratamento da MG, assim como também na GWI foi utilizado na profilaxia contra a intoxicação por organofosforatos. Quimicamente trata-se de uma amina quaternária (GOLAN,2009). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde também considera o PB para uso terapêutico no caso da doença de Little, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, mioatrofias espinhais e paresias consecutivas a poliomielite. Também

está liberado para uso na prevenção dos distúrbios da pós-punção lombar e do meningismo pós-eletroencefalografia (HALEY e KURT, 1997; SPENCER et al., 2001).

Esse fármaco tem sido o inibidor da AChE mais utilizado no tratamento sintomático de pacientes com MG durante décadas. O PB acabou substituindo a fisostigmina que era antes utilizada, por melhorar a transmissão neuromuscular e permitir uma ação da ACh por mais tempo na JNM. Como também induz uma menor quantidade e intensidade de efeitos secundários gastrointestinais, o PB é mais tolerável e assim também é mais utilizado do que o brometo de neostigmina (COOK et al., 2002; GARCIA-CARRASCO et al., 2007; MANTEGAZZA et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; MEHNDIRATTA et al., 2014; SHUMM et al., 1985; YU et al., 2010).

Entretanto, apesar do PB possuir alta especificidade pela AChE, este fármaco apresenta uma curta duração de ação farmacodinâmica. Seu efeito ocorre dentro de 30 minutos, com pico de atividade que ocorre em 2 horas e declínio da atividade entre 3 a 4 horas após a sua administração. Isto ocorre por que o PB é rapidamente metabolizado pelo organismo (KIM et al., 2011; MANTEGAZZA et al., 2011; THANVI e LO, 2004). Assim, o uso deste fármaco em tratamentos clínicos apresenta alguns problemas, sendo necessárias múltiplas doses diárias (10 doses/dia). O desenvolvimento de formulações de liberação lenta, em diversos pacientes, buscando alcançar maior eficácia tem sido estudado, mas até o momento os resultados não têm apresentado o sucesso esperado (KIM et al., 2011).

Para o tratamento sistêmico utilizando o PB, existem diferentes formas de aplicação e posologia. Para adultos encontram-se disponíveis comprimidos orais (concentração de 60 mg) que são os mais comumente utilizados. Existem apresentações farmacêuticas do PB em concentrações superiores a 60 mg, o que possibilita maior intervalo de aplicação (KIM et al., 2011; MANTEGAZZA et al., 2011).

Em geral, observa-se que os pacientes apresentam boa aceitabilidade e responsividade aos inibidores com características inibidoras da AChE, sendo, portanto, considerados fármacos seguros (GARCIA-CARRASCO et al., 2007; KIM et al., 2011; MANTEGAZZA et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; SKEIE et al., 2010). Existem xaropes na concentração de 12 mg/mL que podem ser indicados para crianças. Outra forma de administrar o PB pode ser por via intravenosa ou intramuscular através de ampolas de 2 mL, contendo 5 mg/mL do composto, que são aplicados principalmente quando pacientes apresentam crise miastênica, que é

extremamente debilitante e impede a deglutição adequada. Neste caso, passam a fazer uso do PB via parenteral (KIM et al., 2011; MANTEGAZZA et al., 2011).

Todavia, apesar dos benefícios conduzidos pela terapia farmacológica, indivíduos que fazem o uso de altas doses de inibidor da AChE em geral, apresentam efeitos colaterais, sendo assim, é recomendado uma dose máxima de 120mg a cada 3 horas. Doses elevadas, podem originar toxicidade colinérgica grave, com ocorrência de descargas extras, resultando em uma transmissão neuromuscular excessiva (PUNGA et al., 2008; SKEIE et al., 2010).

Embora sejam amplamente utilizados, os fármacos anticolinesterásicos podem causar diversos efeitos colaterais envolvendo os dois receptores da ACh. No caso, os efeitos adversos muscarínicos incluem a hipermotilidade do trato gastrointestinal, salivação e sudorese excessiva, secreções respiratórias e bradicardia ou arritmia. Comparado a estes efeitos, estudos mostraram uma menor frequência de efeitos nicotínicos em pacientes que usam o PB, os quais envolvem fasciculações musculares e cãibras (PUNGA et al., 2008; RICHMAN e AGIUS, 2003; THANVI e LO, 2004; SKEIE et al., 2010; YU et al., 2010).

Geralmente, a intoxicação causada pela ingestão abusiva do PB pode causar náuseas, fraqueza, visão turva, problemas de micção, vômitos, diarreia, flatulência, dor abdominal e fadiga. Dentre os sintomas, a flatulência, náusea e dor abdominal são os mais citados pelos pacientes. Assim, devido às reações adversas muscarínicas e nicotínicas, causadas pelo uso dos fármacos anticolinesterásicos, a dose diária deve ser limitada. A administração oral inicial é de 30 a 60mg a cada 4 a 6 horas em adultos. Entretanto, cada indivíduo reage de uma maneira específica ao fármaco, podendo ser necessário um ajuste de 60 a 960 mg na dosagem diária. Devido à excreção renal do fármaco, pacientes que apresentam insuficiência renal devem utilizar doses menores (COOK et al., 2002; KIM et al., 2011; MANTEGAZZA et al., 2011; MERIGGIOLI e SANDERS 2009; TELLEZ-ZENTENO et al., 2004; THANVI e LO, 2004).

Os inibidores da AChE raramente induzem completamente o alívio dos sintomas em pacientes miastênicos e não afetam a progressão da doença, porém, podem ser suficientemente eficientes para a gestão adequada em certos pacientes com a doença não progressiva leve ou puramente ocular (MERIGGIOLI e SANDERS, 2009).

É também importante comentar que, portadores de MG são suscetíveis a apresentar a chamada “crise miastênica” que envolve fraqueza nos músculos das vias

aéreas superiores, músculos respiratórios, ou uma combinação de ambos os grupos musculares. Ambos os músculos respiratórios inspiratórios e expiratórios podem ser afetados, manifestando-se como dispnéia. A disfunção respiratória também pode se manifestar como obstrução da via aérea superior se ocorrer fraqueza bulbar ou dos músculos das vias aéreas superiores. A fraqueza das vias aéreas superiores pode levar a falha por colapso orofaríngeo ou obstrução da língua aumentando o trabalho dos músculos respiratórios já fatigados. Sinais de fraqueza bulbar incluem disfagia, regurgitação nasal, qualidade nasal à fala, fala staccato (fala entrecortada), fraqueza da mandíbula (fechamento da mandíbula mais fraco que a abertura da mandíbula), paresia facial e fraqueza da língua. Em termos epidemiológicos, estima-se que 2/3 dos pacientes miastênicos que apresentem crise miastênica precisam ser intubados e receber ventilação mecânica (WENDELL et al., 2011).

Por outro lado, pacientes que ingerem excesso de inibidores da acetilcolinesterase como o PB pode precipitar uma crise colinérgica caracterizada como toxicidade muscarínica e nicotínica. Os sintomas incluem um aumento da transpiração, lacrimação, salivação e secreções pulmonares, náuseas, vômitos, diarréia, bradicardia e fasciculações. Embora a crise colinérgica seja uma importante consideração na avaliação do paciente em crise miastênica, ela é bastante incomum nestes pacientes. No caso de suspeita de crise colinérgica, inibidores da acetilcolinesterase deve ser significativamente reduzido ou descontinuado (WENDELL et al., 2011).

Oosterhuis (1989) descreveu em seu trabalho que o curso natural da MG, utilizando apenas fármacos anticolinesterásicos, sem outro tipo de tratamento, apresenta uma remissão dos sintomas em 20% dos pacientes e uma mortalidade em 25%. No entanto, as diversas terapias que envolvem timectomia, imunossupressão, controle de infecções e outras, afetam positivamente a história natural da doença. Ainda naquela década, este autor concluiu que a mortalidade em pacientes que apresentam MG é praticamente zero e a grande maioria dos pacientes têm vida normal, graças a melhoria na tecnologia assistiva relacionada ao manejo da crise miastênica.

## 2.5 USO DO BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA NA GUERRA DO GOLFO PÉRSICO

O uso de agentes de guerra química constitui uma das maiores ameaças no mundo atual. A guerra química se baseia na utilização de substâncias com propriedades tóxicas, que são capazes de matar, para destruição em massa, além de causar danos severos ao meio ambiente. Os agentes de guerra química mais destacados e perigosos são os organofosforados neurotóxicos que, devido a sua alta toxicidade, bastam pequenas quantidades para causar convulsões e morte (SILVA, 1999).

Um dos principais motivos para o uso de armas químicas em guerra e ações terroristas é que esta estratégia bélica acaba sendo mais barata que as armas convencionais, como bombas, projéteis e explosivos. Por exemplo, para matar todas as pessoas em uma área de um quilômetro quadrado, o uso de armas químicas pode chegar a um custo de aproximadamente 40% menor do que seria gasto se fossem utilizadas armas tradicionais. O outro motivo é que as armas químicas, além de causarem morte de forma rápida e eficiente, também causam transtornos psicológicos aos que conseguem sobreviver à intoxicação, sendo assim mais preocupantes que outras armas de guerra (SILVA, 2012).

Os agentes de guerra química foram utilizados diversas vezes em guerras desde a antiguidade, ainda que sendo agentes não bem definidos nem muito eficientes. Já vários agentes tóxicos mais eficientes receberam maior importância em 1915, quando o exército alemão lançou gases como cloro e mostarda contra tropas francesas durante a Primeira Guerra Mundial, causando inúmeras baixas no exército inimigo. A partir dessa data o desenvolvimento de agentes neurotóxicos foi mais intenso para diversos exércitos (SILVA, 2012).

Antes da Segunda Guerra Mundial o exército alemão iniciou o desenvolvimento dos primeiros organofosforados neurotóxicos como agentes de guerra química, especialmente tabun, sarin e soman. Apesar disso, estes agentes, assim como o gás mostarda e outras substâncias tóxicas, que não foram utilizados durante a Segunda Guerra Mundial. Na década de 1950, foram desenvolvidos os organofosforados neurotóxicos da família V, que são mais tóxicos e persistentes no ambiente, sendo que o primeiro, chamado VX, foi desenvolvido na Inglaterra. Depois foram criados outros compostos similares, especialmente na antiga União Soviética (SILVA, 2012).

Um dos primeiros países a utilizar organofosforados neurotóxicos foi o Iraque, sob o comando de Saddam Hussein na guerra contra Irã entre 1980 e 1988, levando a centenas de mortes de iranianos (MORITO, 1995). No ano de 1994, o sarin foi utilizado no Japão contra civis em um ataque terrorista que resultou na morte de 7 pessoas e 200 intoxicações (HOLSTEGE et al 1997; OKUMURA et al., 1996). Por outro lado, aconteceram intoxicações de soldados americanos por sarin durante a GWI, em 1991. Armas químicas também foram utilizadas na Síria, levando a morte de cerca de 1.300 pessoas, especialmente civis e crianças, sendo esse um dos piores eventos de uso de armas químicas no mundo (CPAQ, 2013).

Organofosforados, pesticidas, carbamatos, agentes químicos como sarin e o fármaco PB. Todos pertencem a uma classe de produtos químicos que inativam a circulação de enzimas colinesterases como a AChE, BUhE, paraoxanase e esterase neurotóxica resultando na interferência com a quebra do neurotransmissor ACh entre outros efeitos (GORDON et al., 1983; SOLTANINEJAD e ABDOLLAHI, 2009).

As exposições levam ao aumento da ACh no cérebro e nas terminações nervosas periféricas, com super estimulação resultante dos receptores do nervo colinérgico (TERRY, 2012) e subsequentes redução da Ach disponível, bem como alterada expressão gênica e efeitos cognitivos tardios (KAUFER et al., 1998).

Em doses altas de exposição, os inibidores de AChE podem ser tóxicos ou fatais. Em doses mais baixas podem levar a efeitos sobre a saúde a longo prazo (SANBORN et al., 2007), sendo um de seus mecanismos o estresse oxidativo (SOLTANINEJAD e ABDOLLAHI, 2009). Os principais sintomas secundários à inibição da AChE de pessoas com deficiência na função colinérgica central e periférica é semelhante à aqueles relatados por soldados da GWI, como fadiga do músculo esquelético, déficit cognitivo, gastrointestinal, no sono e problemas de regulação de temperatura (GOLOMB, 2008; KHAN et al., 2003).

Exposições a agentes tóxicos na GWI foram considerados contribuintes para inúmeros problemas de saúde a longo prazo. Os efeitos pós guerra, incluem efeito de pesticidas, munições de urânio, contaminantes do ar dos incêndios causados nos poços de petróleo do Kuwait, agentes nervosos químicos. O PB, foi então utilizado como medida profilática contra uma possível exposição a esses agentes nervosos, e outros riscos, tais como condições psicologicamente estressantes e calor. Militares que sofreram várias exposições em diferentes combinações, apresentaram efeitos sinérgicos que ainda não foram determinadas nessa população (WHITE et al., 2016).

A Doença da GWI é considerada uma condição crônica de múltiplos sintomas que atingiu 25 a 32% dos soldados que atuaram na guerra. Ela é clinicamente caracterizada pela presença de fadiga, dores de cabeça, disfunção cognitiva, respiratória e musculoesquelética e distúrbios gastrointestinais (GOLOMB, 2008; JANULEWICZ et al., 2017; ODEGARD et al., 2013; WHITE et al, 2016). Inflamação e quadros de estresse oxidativo associado à disfunção mitocondrial pode afetar negativamente a função cognitiva e humor, direta ou indiretamente, através da redução da neurogênese do hipocampo (KOHMAN e RHODES, 2013; JENROW et al., 2013; PARIHAR et al., 2013). Portanto, é provável que a inflamação crônica e o estresse oxidativo estejam entre as principais causas de disfunção cerebral na GWI.

Estudos foram conduzidos afim de identificar possíveis fatores causais, e as evidências sugeriram que o PB pode ser associado com etiopatogênese da GWI. Um dos primeiros estudos realizado Haley e Kurt (1997) descreveu o desenvolvimento de três síndromes associadas com o uso PB: (1) "cognição prejudicada"; (2) "confusão-ataxia" e (3) "neuropatia". Entretanto, investigações complementares também sugeriram que à utilização do PB sem nenhum outro agente estressor químico ou físico em células neuronais de animais, não causa grandes danos, como diminuição na viabilidade e aumento da apoptose celular. Deste modo, parece que a interação do PB com outros fatores endógenos ou exógenos é que seriam os desencadeantes da doença da GWI (BERRÍOS et al., 2015, POHANKA, 2011).

## 2.6 POTENCIAL EFEITO DO BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA NO ESTRESSE OXIDATIVO

Considerando-se os resultados experimentais epidemiológicos e os realizados em animais, dados descritos até aqui reforçam a hipótese de que a interação entre PB e outras drogas, como por exemplo os organofosforados, ou talvez outros fatores de estresse poderiam contribuir para causar o rompimento da homeostase neural, via amplificação do estresse oxidativo e de quadros inflamatórios crônicos que desencadeariam disfunções neurais sistêmicas associadas à GWI (ASSIS, 1960; CARRERAS et al 2018; KODALI et al 2018; JENROW et al., 2013; KOHMAN e RHODES, 2013; PARIHAR et al., 2013; SULLIVAN et al 2018).

Nas últimas décadas o papel das espécies reativas em processos fisiopatológicos relacionados ao estresse oxidativo tem sido intensamente investigado

(ROBERTS et al., 2010). As espécies reativas são moléculas que contém um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica (VALKO et al., 2007). Essas moléculas reativas são geralmente instáveis e se originam a partir do oxigênio (EROs), nitrogênio ou enxofre (PANASENKO et al., 2013). Quando a geração de espécies reativas excede a capacidade antioxidante do organismo, ocorre um desequilíbrio no estado redox celular, levando ou induzindo estresse oxidativo e posterior dano oxidativo (HALLIWELL, 2007).

A mitocôndria é o principal local de produção de EROS (BARJA, 2007). Grande parte da energia produzida no organismo é gerada por meio da fosforilação oxidativa. Portanto, paradoxalmente, um processo fundamental para o desenvolvimento da vida dos eucariotos (fosforilação oxidativa) é também um dos principais responsáveis pela produção de EROS. Essas espécies são produzidas, ainda, por outras reações de transferência de elétrons entre diferentes agentes reativos redox, como aquelas envolvidas em mecanismos de defesa contra patógenos, por exemplo, o caso da oxidase nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (DOWLING e SIMMONS, 2009).

A produção de EROS em vários processos metabólicos exerce um papel importante no funcionamento do organismo. Eles são dose dependente e, alguns tipos de EROS quando em baixas concentrações, são considerados importantes moléculas de sinalização responsáveis pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória, (DOWLING e SIMMONS, 2009). As EROS passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção ou quando há diminuição de agentes oxidantes. Os três principais tipos de EROS são: ânion superóxido ( $O_2^\circ$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\circ$ ).

Dentre as EROS, o radical  $O_2^\circ$  é o mais comum e abundante, e bastante difusível tanto no interior quanto entre as células *in vivo*, sendo a primeira ERO formado através da redução do oxigênio por um único elétron durante a fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria (HALLIWELL, 2007). É uma ERO pouco reativa e não tem habilidade de penetrar membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG e ARNÉR, 2001). O  $H_2O_2$  não é um radical livre, mas um metabólito intermediário do oxigênio, que em quantidades elevadas torna-se extremamente deletério, uma vez que, participa como intermediário na reação que produz o radical  $OH^\circ$ . O  $H_2O_2$  tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; MAIA, 2006; NORDBERG

e ARNÉR, 2001). O radical OH<sup>•</sup> é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ERO. É formado a partir do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em uma reação catalisada por íons metálicos de transição (Fe<sup>++</sup> ou Cu<sup>+</sup>), denominada reação de Fenton. Este radical OH<sup>•</sup> também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; MAIA, 2006; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

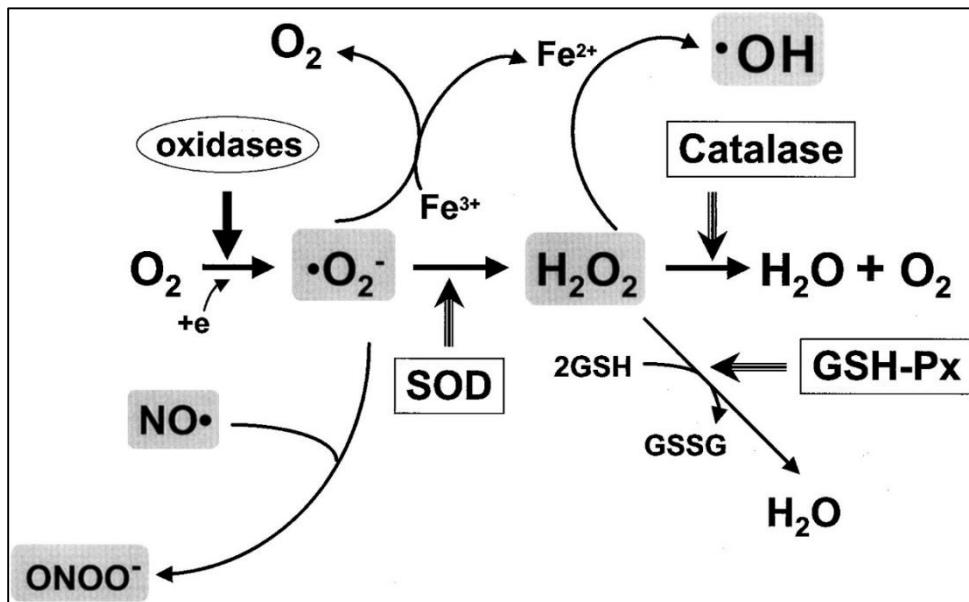
Todavia, a fim de manter o equilíbrio na geração EROs, existe o sistema antioxidante, porém quando as EROs encontram-se em excesso e o sistema antioxidante não consegue manter o equilíbrio, podem ocorrer processos de danos ao organismo e esta situação de desequilíbrio é denominada estresse oxidativo (MAK e NEWTON, 2001; OBAYAN, 2004; SHAMI e MOREIRA, 2004).

O sistema antioxidante possui por função inibir os danos oxidativos acarretados pelas espécies reativas em excesso. Estes são divididos em antioxidantes enzimáticos ou endógenos e antioxidantes não-enzimáticos ou exógenos, sendo estes últimos adquiridos principalmente pela dieta (KOURY et al, 2003).

Dentre os antioxidantes não-enzimáticos pode-se citar o ácido ascórbico (vitamina C), o qual inibe a ação das lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidado e protege contra a ação das EROs, ácidos fenólicos, resveratrol, catequinas, β-caroteno (vitamina A), que protegem contra a lipoperoxidação e danos ao DNA, α-tocoferol (vitamina E), cobre (Cu), zinco (Zn), dentre outros (FITO et al, 2007; RODRIGO et al, 2007). Já quanto aos antioxidantes enzimáticos tem-se a superóxido dismutase (SOD) que propicia a conversão do radical O<sub>2</sub><sup>•</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a catalase (CAT) que converte o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, e a glutationa peroxidase (GPx) a qual possui capacidade de reduzir o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (VICENT et al, 2007).

O estresse oxidativo está envolvido em várias doenças crônicas não-transmissíveis, como por exemplo, aterosclerose, hipertensão, doenças neurodegenerativas, câncer e diabetes mellitus tipo II, nesta última, por exemplo, as espécies reativas em excesso influenciam de forma prejudicial a captação da glicose pelos tecidos musculares e adiposo, além de diminuir a secreção de insulina, morte neuronal e apoptose de diversas células (BROWNLEE, 2001; GREEN et al, 2004; MADDUX et al, 2001; RUDICH et al, 1998).

**Figura 7-** Atuação de enzimas antioxidantes e efeitos das EROs.



Fonte: Adaptado de Kathy et al., 2003.

### 2.6.1 Indução de Genotoxicidade e Apoptose via Estresse Oxidativo

Durante o desenvolvimento embrionário, com a perspectiva de moldar os diversos órgãos do corpo ocorre um processo de morte celular programada, conhecido como apoptose. Assim, a apoptose é essencial para a eliminação de tecidos excedentes na fase embrionária, já que auxilia a formação de membros, como, por exemplo, a perda tecidual a fim de formar os dedos (MEIER et al., 2000).

Diferente da necrose desencadeada por infecções ou lesões corporais, a apoptose é um processo fisiológico totalmente regulado pelas células sendo também essencial para prevenir o desenvolvimento de disfunções diretamente relacionadas a algumas doenças como por exemplo o câncer. Isto porque, a apoptose evita que células disfuncionais, geralmente com dano de DNA e instabilidade cromossômica, gerem novas células disfuncionais via mitose se perpetuando no organismo (SARASTE e PULKKI, 2000).

O processo de apoptose desencadeia uma série de modificações cujas as principais características são: redução no tamanho celular, fragmentação do núcleo em partículas do tamanho dos nucleossomos, autofagia do conteúdo citoplasmático e celular com produção de pequenas vesículas apoptóticas que, no final de todo o

processo são liberadas na matriz tecidual e absorvidas pelas células vizinhas que utilizam o seu conteúdo como nutrição (SARASTE e PULKKI, 2000).

Deste modo, pode-se dizer que a apoptose geralmente ocorre durante o desenvolvimento e como processo que ajuda a manter a homeostase tecidual. Nos indivíduos já formados, a apoptose também acontece em situações de resposta imune, tanto para conter o crescimento celular no processo inflamatório, quanto para eliminar células danificadas. A apoptose pode ser iniciada por muitos estímulos, tanto patogênicos quanto fisiológicos. Há alguns fatores determinantes para desencadear a apoptose, como, por exemplo, a ausência de oxigênio, trauma mecânico, agentes químicos e infecciosos, reações anafiláticas e auto-antígenas, distúrbios genéticos e desequilíbrios nutricionais (HENGARTNER et al., 2000).

Em termos bioquímicos e moleculares o processo apoptótico pode ser desencadeado por uma sucessão de eventos bioquímicos, moleculares que podem atuar por duas vias metabólicas: a via apoptótica intrínseca e extrínseca. Ambas vias culminam com a ativação da rota das caspases que desencadeia os eventos de morte celular propriamente ditos. A família das caspases inclui mais de dez membros e pode ser dividida em dois grupos, iniciadoras (por exemplo, caspase-9 e caspase-8) e efetoras (por exemplo, caspase-3 e caspase-7). O processo apoptótico é iniciado pela fase de ativação, na qual as caspases tornam-se cataliticamente ativas, e seguido por uma fase de execução, onde essas enzimas atuam provocando a morte da célula. Inicialmente, a apoptose ocorre, sobretudo por duas vias distintas, porém ambas convergem para ativar as caspases, a via extrínseca ou citoplasmática, iniciada por receptores, e a via intrínseca ou mitocondrial (MEIER et al., 2000).

A via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores presentes na membrana celular que são genericamente chamados de “receptores de morte”, como o fator de Necrose Tumoral (TNF) e o CD95, que ativam caspases iniciadoras e, por sua vez, direcionam a célula para a fase efetora (BUDIHARDJO et al., 1999). Assim, a via extrínseca está muito associada com respostas imunes importantes que controlam, por exemplo a sobrevivência de células infectadas por patógenos que, se continuam vivas propagam os invasores e podem levar a morte do organismo (ZHOU et al., 2017).

Já a via intrínseca ou mitocondrial, está diretamente relacionada com a detecção de importantes eventos de genotoxicidade que se traduzem no acúmulo de mutações e quebra da molécula de DNA. Este evento é diretamente mediado pela

proteína p53 quando a célula se prepara para entrar em processo de duplicação do DNA que subsequentemente leva a mitose. Neste momento, ocorre checagem da integridade do DNA pela proteína p53. A proteína p53 é considerada “guardiã do genoma” como um dos mais potentes supressores tumorais. Além disto, a p53 também é necessária para manter a função mitocondrial basal. Especificamente, através do seu papel como supressor tumoral, a p53 examina intimamente a ocorrência de dano ao DNA celular, em particular do DNA mitocondrial (mtDNA), para garantir que a rede mitocondrial seja cuidadosamente monitorada e a viabilidade celular seja mantida (JEGGO et al., 2016, WU e PRIVES, 2018).

Grande parte das proteinas p53 estão ligadas na própria molécula de DNA em associação com outras moléculas com a MDM-2. Quando ocorre dano no DNA o balanço a associação entre a proteína p53 e a MDM-2 é interrompida podendo levar ao desencadeamento da apoptose, que vai ocorrer via inibição da expressão do gene Bcl-2 e super expressão do gene BAX, que resulta no aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial com extravazamento do citocromo C para o citoplasma. Este fenômeno, por fim induz a rota apoptótica das caspases (DESAGHER e MARTINUO, 2000; JEGGO et al., 2016). Assim, o balanço MDM2-p53 parece ser critico para a célula que, uma vez interrompido pode gerar, além da apoptose, senescênciia celular e mudanças metabólicas que levam a disfunção orgânica (WU e PRIVES, 2018).

De fato, o nosso DNA é consequentemente exposto a uma variedade de substâncias genotóxicas tanto por fontes endógenas, a exemplo de subprodutos metabólicos do organismo, tanto como fontes exógenas, a exemplo da radiação ultravioleta, fármacos etc (ERMOLAEVA e SCHUMACHER, 2014).

O potencial mutagênico desses efeitos genotóxicos depende do alvo celular atingido e alguns destes produtos precisam de metabolização para adquirir sua capacidade mutagênica. Estes agentes podem induzir danos ao DNA de forma direta através da ligação direta como o DNA e/ou de forma indireta através da ligação a proteínas envolvidas em manter a integridade desse genoma, como por exemplo a radiação ionizante que ataca o DNA sobre as duas formas de danos (direta/indireta) (MATEUCA et al., 2006).

As consequências dos efeitos da interação do mutagênico- célula alvo podem levar o DNA a sofrer vários danos e mutações que vão desde mudanças de nucleotídeos, alterações cromossômicas, tanto numéricas quanto estruturais (MATEUCA et al., 2006). Algumas dessas alterações podem afetar o metabolismo

celular, desregular o ciclo de divisão celular e até mesmo levar a célula à morte (RODRIGUEZ-ROCHA et al., 2011).

No caso do PB estudos têm mostrado que o mesmo em associação com outros agentes químicos e físicos causa apoptose e genotóxicidade em modelos animais, uma hipótese provável seria via estresse oxidativo (ABOU-DONIA et al., 2003; AQEL et al., 2001; LI et al., 2012).

Pesquisa realizada por Li e colaboradores (2012) mostra que a associação do PB com um organofosforado aumenta o número de convulsões em ratos. Trabalho de Abou-Donia et al (2003) relata e caracteriza apoptose testicular após a exposição diária de ratos machos a doses subcrônicas de PB (1,3 mg/kg) e exposição combinada com permetrina e um outro inseticida produziu maior toxicidade em comparação com componentes isolados. O dano testicular foi significativamente aumentado quando os animais foram ainda expostos a uma combinação de produtos químicos e estresse. Além dos estudos mostrados anteriormente, a pesquisa realizada por Aqel e colaboradores (2001) analisou urina de ratos tratados somente com PB e PB mais gás sarin os resultados demonstraram que o PB isoladamente não causa genotoxicidade, no entanto, quando associado ao gás sarin aumenta os níveis 8-hidroxi-2' deoxiguanosina (8-OHdG). Sugerindo assim, que a exposição simultânea ao PB e sarin pode gerar EROs e causar estresse oxidativo em ratos.

Apesar de estes trabalhos indicarem que a interação entre PB e fatores estressores poderia desencadear genotoxicidade, o mecanismo associado à indução do estresse oxidativo que leva a este efeito adverso ainda não foi completamente elucidado, podendo ocorrer interação entre o PB e desbalanço oxidativo endógeno desencadeado por variações genéticas presentes no metabolismo antioxidante.

## 2.7 O MODELO DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDRÔGENIO

Sugere que o estresse oxidativo está associado com o envelhecimento celular, disfunções e doenças (LEITE et al., 2012). Entretanto, por muito tempo acreditou-se que as EROs em qualquer nível eram as responsáveis por estes processos deletérios. Por este motivo, há cerca de 20 anos foram iniciados estudos para averiguar o impacto benéfico na saúde da suplementação de grande quantidade de antioxidantes. Os resultados, surpreendentemente, não foram bons. Em alguns, estudos foram evidenciados maiores cargas de morbidades nos indivíduos suplementados com altas

doses de vitamina do que no grupo placebo. A explicação para este aparente paradoxo logo emergiu: muitas EROs, em baixas concentrações eram na realidade moléculas sinalizadoras de diversas funções celulares. Entre estas, destacam-se o NO e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, logo a neutralização destas moléculas por parte dos agentes antioxidantes, têm influencia nos processos de homeostase celular (WALLACE, 1999).

A partir de então, emergiu a hipótese de que a manutenção do equilíbrio *redox* era um aspecto relevante para evitar morbidades crônicas não-transmissíveis ou para a diminuição de efeitos colaterais relacionados a ingestão de alguns fármacos (DUSSE et al., 2003). Esta hipótese acabou sendo testada e corroborada por estudos genéticos envolvendo desbalanço do sistema endógeno antioxidante. Este é o caso do polimorfismo SNP (do inglês= *Single Nucleotide Polymorphism*) observado no gene da SOD2 denominado Val16Ala-SOD2 (BRESCIANI et al., 2013).

A enzima SOD2 é sintetizada a partir de um gene nuclear localizado no cromossomo 6, sub-região 6q25 gene codifica para um homotetrâmero o qual liga-se a um íon de manganês por subunidade. Esta estrutura proteica sintetizada no reticulo endoplasmático rugoso ainda é enzimaticamente inativa, e possui uma sequência peptídica conhecida como sequência mitocondrial alvo (*Mitocondrial Target Sequence*, MTS) que direciona a SOD2 para o interior da mitocôndria. Ao passar pelos poros da membrana mitocondrial interna, o segmento peptídico MTS é clivado por lisossomos e a proteína madura se agrega em uma forma ativa tornando-se uma enzima SOD2 funcional (SUTTON et al., 2003; ZELKO et al., 2002).

Estudos prévios identificaram um SNP na região MTS do gene da SOD2, em que uma tiamina (T) é substituída por uma citosina (C) no exon 2, nucleotídeo 47. A substituição afeta o codon 16, que codifica para o aminoácido 9, mutando uma valina (GTT) em uma alanina (GCT) por isto o polimorfismo é chamado Val16Ala-SOD2 (ZELKO et al., 2002). Portanto, este polimorfismo está associado a presença de dois alelos A (Alanina) e V (Valina) e três possíveis genótipos: AA, AV e VV. Em termos fenotípicos a variante Ala-SOD2 gera uma proteína com estrutura α-hélice, assim sendo facilmente importada para o interior da mitocôndria. Já a variante Val-SOD2 gera uma proteína com estrutura parcial β-lamina, o que faz com que, no momento que ocorre a importação da proteína SOD2 inativa para dentro da mitocôndria, a mesma fique parcialmente retida nos poros da membrana interna. Na presença dos

dois alelos que formam o genótipo heterozigótico a proteína Ala/Val-SOD2 apresenta estrutura helicoidal (BAG e BAG, 2008; SUTTON et al., 2003).

Investigações *in vitro* demonstraram que o Ala-SOD2 é capaz de gerar homotetrâmeros SOD2 com uma atividade enzimática 30-40% maior do que a matriz processada com precursor Val-SOD2 (SUTTON et al., 2003). Apesar da maior eficiência da SOD2 produzida a partir do alelo A muitos estudos epidemiológicos têm descrito associação entre esta variante genética e diversos tipos de câncer (KANG, 2015) incluindo câncer de próstata (TAUFER et al., 2005), de mama (BICA et al., 2009), pulmão, estômago (ZEJNIOVIC et al., 2009).

Acredita-se que este fenômeno ocorra devido a maior eficiência da SOD2 que se não for acompanhada por um aumento nos níveis de GPX e CAT, ou de compostos antioxidantes não enzimáticos armazenados na célula, acaba gerando excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que pode reagir com metais de transição via reação de Fenton originando o radical OH<sup>•</sup>, fortemente mutagênico (WALLACE, 1999).

Por outro lado, investigações prévias relacionadas com o alelo Val-SOD2 sugerem que este alelo e/ou o genótipo VV aumentaria o risco de algumas doenças crônicas não-transmissíveis e também resposta diferencial a agente xenobióticos (BRESCIANI et al., 2013). De fato, o genótipo VV possui menor eficiência enzimática da SOD2, e assim potencialmente ocasiona o acúmulo basal de maiores concentrações do ânion radical O<sub>2</sub><sup>•</sup> dentro da mitocôndria. Esta EROs é pouco permeável as membranas, e altamente reativa na presença do óxido nítrico (NO) o que leva a produção do peroxinitrito (ONOO<sup>•</sup>). Por sua vez, esta molécula tem grande afinidade com lipídios causando assim uma extensa oxidação das membranas celulares, fenômeno conhecido como lipoperoxidação ou peroxidação lipídica. Além disto, o excesso do ânion radical O<sub>2</sub><sup>•</sup> pode levar a produção de outras EROs que contribuem para estabelecer estados de estresse oxidativo (BRESCIANI et al., 2015).

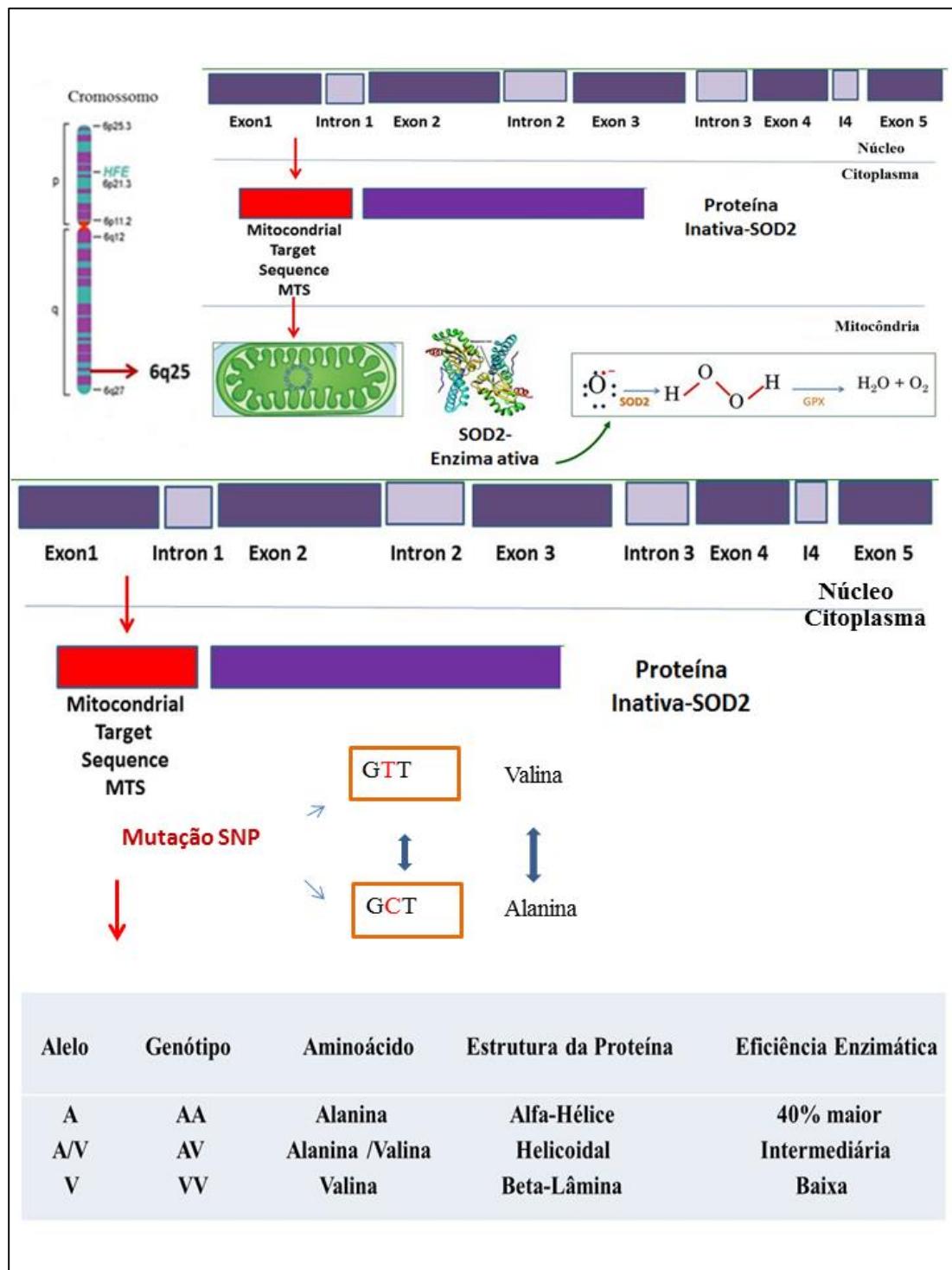
Assim, o genótipo VV-SOD2 tem sido associado com disfunção endotelial, níveis elevados de LDL-oxidado (GOTTLIEB et al., 2005), presença de complicações microvasculares do diabetes associadas ao diabetes incluindo retinopatias e nefropatias (TIAN, 2011), níveis elevados de citocinas inflamatórias (MONTANO et al., 2012; BARBISAN et al., 2017a), maior risco de desenvolvimento de obesidade (MONTANO et al., 2009), de hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2010), e de associação entre dislipidemia e acidente vascular cerebral (FLORES et al., 2017). Apesar do genótipo AA aumentar o risco de câncer de mama, em determinadas

populações, o genótipo VV parece amplificar a agressividade tumoral, já que aumenta o potencial de metástase no câncer de mama (BICA et al., 2010; WANG et al., 2017).

Por outro lado, investigações *in vitro* também mostraram que este polimorfismo Val16Ala-SOD2 afeta diferencialmente a toxicidade de linfócitos expostos a radiação ultravioleta (MONTAGNER et al., 2010), ao metal pesado metil-mercúrio (ALGARVE et al., 2013), bem como a ação de fármacos como: a ação antioxidant do citrato de clomifeno (COSTA et al., 2012) , a citotoxicidade do metotrexato (BARBISAN et al., 2014) , a resposta farmacológica de pacientes hipercolesterolemicos a rosuvastatina (DUARTE et al., 2016). Tal polimorfismo também foi capaz de modular a ação antioxidant do resveratrol (CAPELETO et al., 2015), bem como da L-selênio metionina ao selênio (SCHOTT et al., 2017).

Ainda o polimorfismo apresentou modulação na resposta a agentes físicos como a radiosensibilidade *in vitro* de células de câncer de mama MCF-7 expostas a radiação ionizante (DA COSTA ARALDI et al., 2018). Um resumo esquemático desse polimorfismo genético é ilustrado na (Figura 8).

**Figura 8-** Essa figura demostra de forma resumida o polimorfismo da SOD2. Esta proteína possui uma pequena região peptídica conhecida como sequência mitocondrial alvo (MTS) que direciona a proteína SOD2 para dentro da mitocôndria. No interior desta organela finalmente a enzima SOD2 torna-se ativa. Este polimorfismo faz com que ocorra a troca de uma timina por uma citosina no códon 16. Esta troca leva a substituição do aminoácido valina pelo aminoácido alanina. Assim, existem três possíveis genótipos relacionados a este polimorfismo: AA, VV e AV.



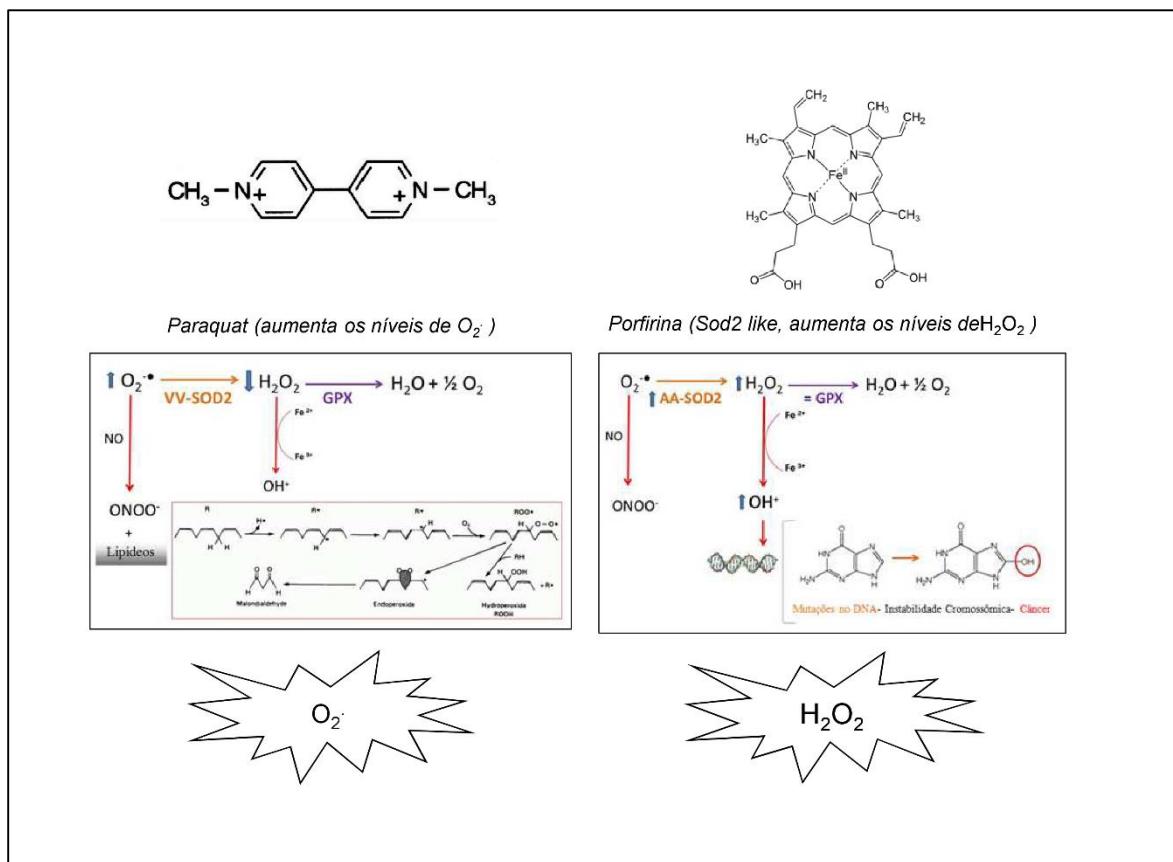
Fonte: Adaptada de Barbisan et al., 2014.

Por conta da relavância desse polimorfismo genético para saúde humana, foi desenvolvido um modelo experimental farmacológico por Dal Berto e colaboradores (2015), para câncer de próstata e Azzolin e colaboradores (2016), para câncer colorretal, mostrando em células tumorais a diferença no tratamento mediante desbalanço S-HP.

Neste modelo de desbalanço farmacológico S-HP foram utilizados duas moléculas, o paraquat e porfirina. O paraquat é um gerador de ânion  $O_2^-$ , cujos níveis mais elevados desta molécula são observados em células (VV-*like*). Já a porfirina é uma molécula que atua similar a SOD2 (SOD2-*like*), causando assim um aumento dos níveis de  $H_2O_2$  como é observado em células com o genótipo (AA-*like*) (AZZOLIN et al., 2016; DAL BERTO et al., 2015), simulando *in vitro* os dois genótipos do polimorfismo. Na figura 9 um representação esquemática desse desbalanço farmacológico S-HP.

Em síntese, considerando que o PB parece interagir com outros agentes exógenos pró oxidantes, desencadeando sintomas reconhecidos na GWI, não pode ser descartada a hipótese de ocorrência de interação entre este fármaco e o polimorfismo Val16Ala-SOD2.

**Figura 9** - De forma resumida o desbalanço farmacológico S-HP. O paraquat induz formação do anion radical superóxido, aumentando seus níveis. Já a porfirina induz formação de peróxido de hidrogênio. Assim, devido a elevação dos níveis de superóxido na presença de paraquat, considera-se este como um VV-Like, e aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio considera-se AA-like.



Fonte: Autora

### **3 DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL**

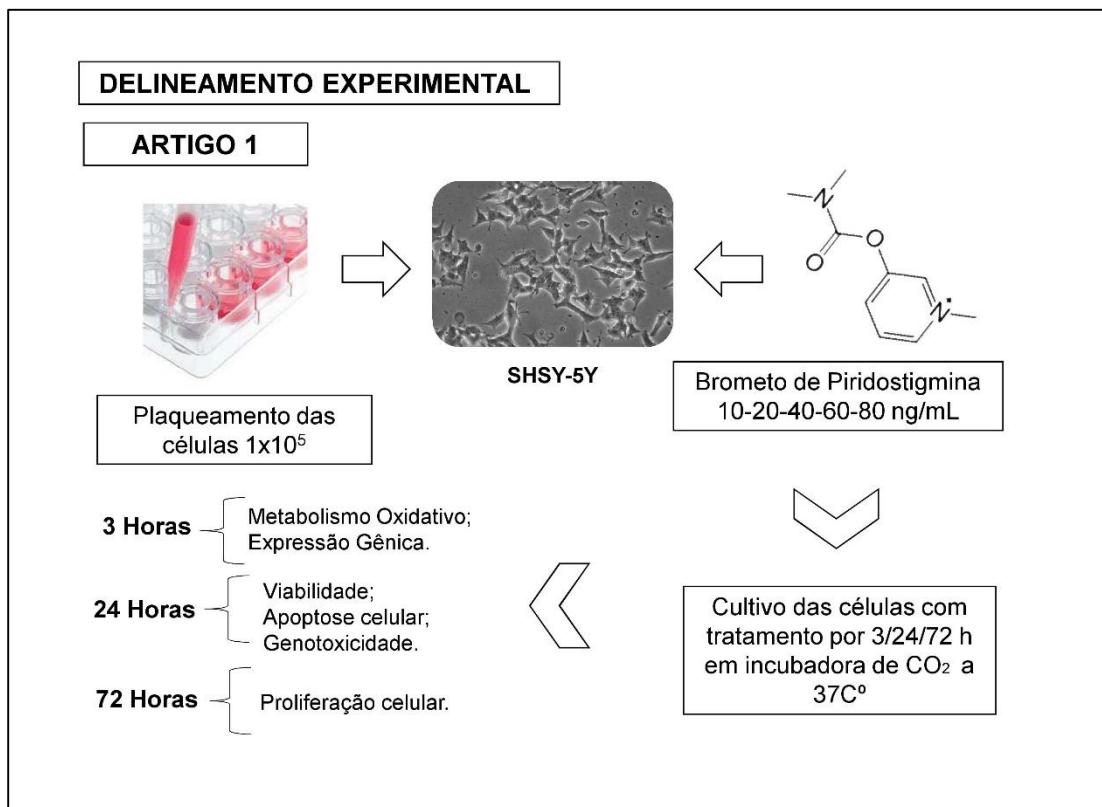
Essa tese está composta por 3 artigos científicos. Por esse motivo, o delineamento metodológico geral é apresentado considerando os artigos que compõe a presente tese.

#### **3.1 DELINEAMENTO GERAL ARTIGO 1**

O primeiro trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de efeito do PB sobre a cito e genotóxicidade em células neurais, utilizando-se para isto a linhagem comercial de neuroblastoma com fenótipo neural, SHSY-5Y. Deste modo, foi conduzida uma investigação *in vitro* utilizando SHSY-5Y obtidas da *American Type Cell Culture Collection* (ATCC CRL-2266) e cultivadas em condições controladas. As células foram expostas ao PB em diferentes concentrações. As concentrações de PB foram escolhidas tendo-se como referência a dose terapêutica plasmática do fármaco no tratamento da MG (40 ng/ mL) e duas concentrações maiores e duas menores a mesma. Células SHSY-5Y quando não são estimuladas a diferenciação via exposição de agentes como o ácido retinóico, apresentam atividade colinérgica.

Por este motivo, antes de executar as análises, a atividade e modulação da expressão gênica da enzima AChE foi avaliada com e sem tratamento com PB. Esta análise confirmou tanto a atividade colinérgica das células SHSY-5Y quanto a ação inibidora da AChE pelo PB. Nesse estudo, os seguintes parâmetros foram avaliados: viabilidade celular, indução de apoptose, proliferação celular, modulação do ciclo celular e expressão de genes apoptóticos, genes relacionados ao reparo do DNA (DNA metiltransferase 1 (DNMT1) e p53) gene de proliferação celular como a (telomerase). Os experimentos foram realizados em culturas de 3, 24 e 72 horas. Os ensaios realizados em triplicata e todos os resultados apresentados como % do grupo controle não tratado (Figura 10).

**Figura 10-** Delineamento experimental geral do artigo 1: Effects of Pyridostigmine Bromide on SH-SY5Y cells: an *in vitro* neuroblastoma neurotoxicity model.



Fonte: A autora.

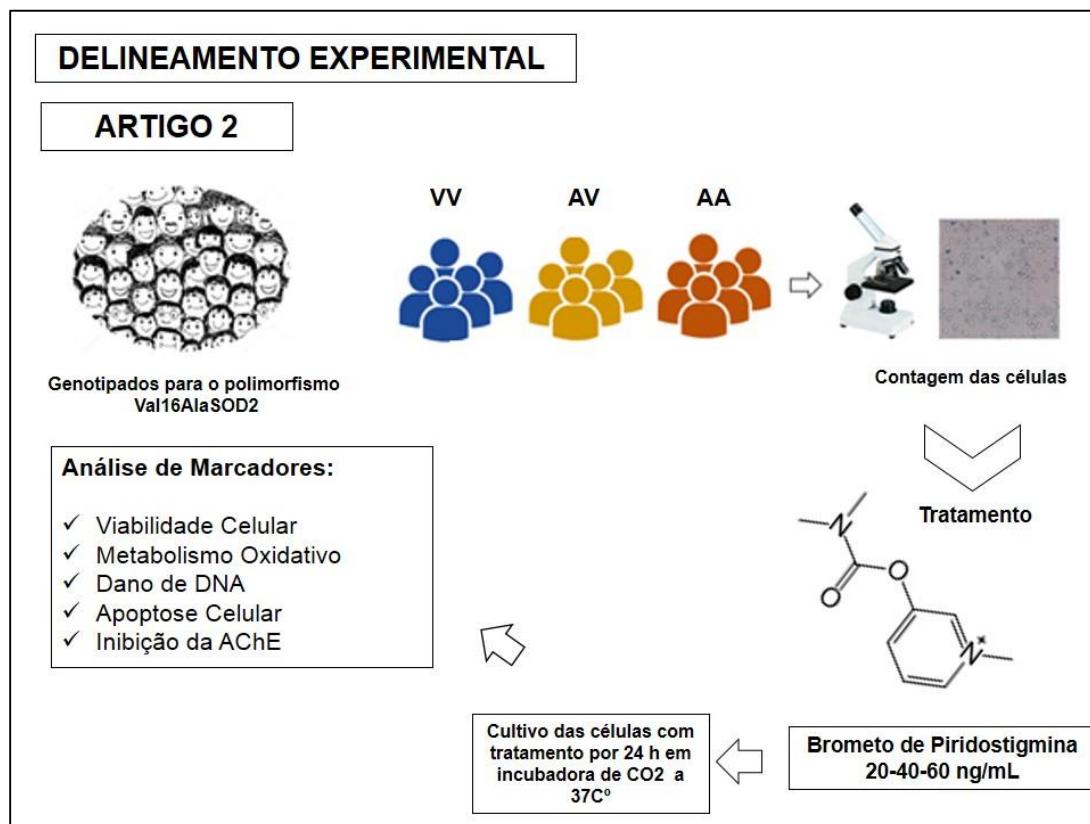
### 3.2 DELINAMENTO GERAL ARTIGO 2

O segundo trabalho contemplou o efeito na modulação do estresse oxidativo do PB em CMSPs portadoras do polimorfismo genético Val16AlaSOD2. O presente estudo utilizou um protocolo *in vitro* semelhante ao descrito anteriormente por Barbisan et al (2014; 2017). Para tanto, foi realizado uma punção venosa de pacientes portadores de diferentes genótipos do polimorfismo da Val16Ala-SOD2 para obtenção de amostra de sangue. O mesmo foi processado e as CMSPs obtidas foram expostas a três concentrações de PB (20, 40 e 60 ng/mL), baseadas nos achados relacionados ao artigo 1 desta tese.

Os efeitos do PB na inibição da AChE, viabilidade celular, metabolismo oxidativo, marcadores de danos no DNA e apoptose foram analisados para cada

genótipo da Val16Ala-SOD2. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, e os resultados foram apresentados como % do grupo controle não tratado.

**Figura 11-** Delineamento experimental geral do artigo 2: The effect of Val16Ala-SOD2 polymorphism on inhibition of acetylcholinesterase and cyto-genotoxicity of pyridostigmine bromide in human peripheral blood mononuclear cells.



Fonte: A autora.

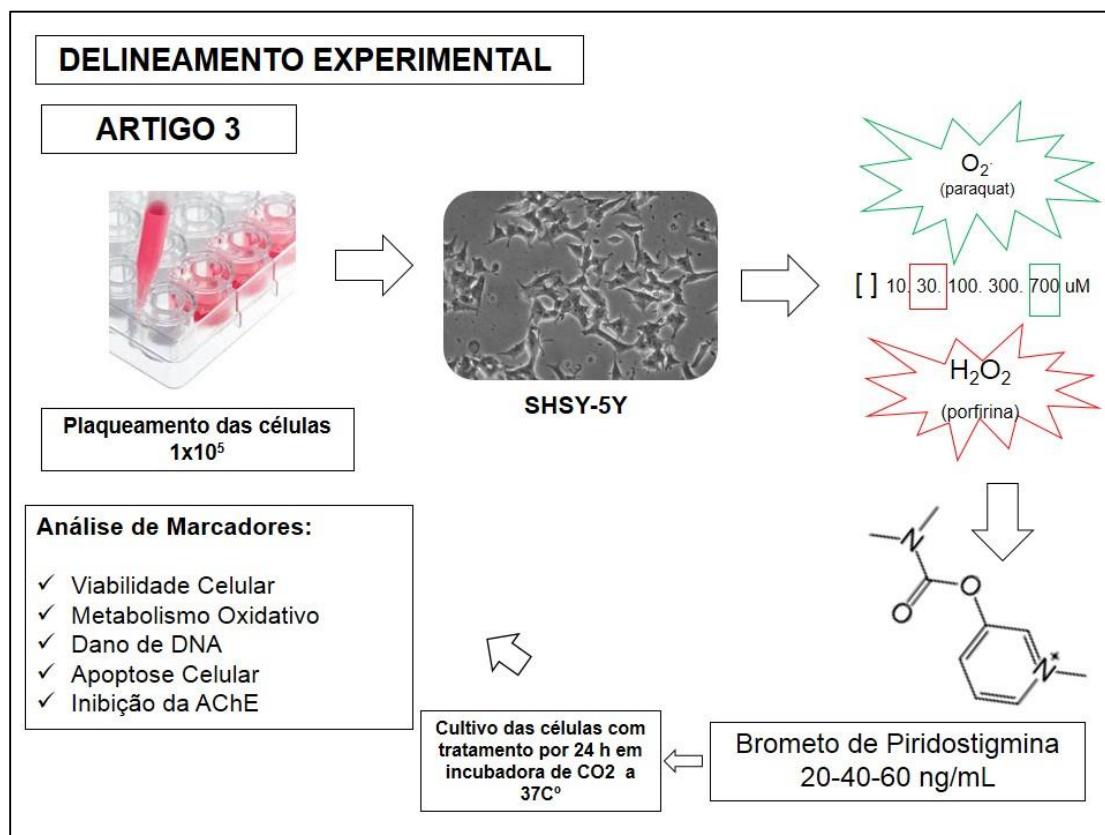
### 3.3 DELINAMENTO GERAL ARTIGO 3

O terceiro estudo buscou avaliar a interação do PB com um desbalanço farmacológico S-HP produzido via exposição ao paraquat e a porfirina de células neurais (SHSY-5Y) que também foram utilizadas no primeiro artigo. O desequilíbrio S-HP por indução farmacológica seguiu protocolo similar previamente descrito por Azzolin et al (2016), adaptado para células neurais. Resumidamente, as células foram expostas ao paraquat e porfirina em diferentes concentrações, a fim de gerar um desbalanço S-HP. As concentrações de paraquat e porfirina que induziram 30% de mortalidade celular e alteraram alguns marcadores de apoptose e metabolismo oxidativo foram escolhidas para gerar o desbalanço S-HP e para realizar análises

subsequentes envolvendo potencial interação entre este desequilíbrio e o PB nas células neurais. As células desbalanceadas farmacologicamente por paraquat - VV-like e as células com desbalanço induzido pela porfirina AA-like.

As seguintes variáveis cito-genotóxicas relacionadas ao potencial efeito do desequilíbrio entre S-HP e associação com o PB foram então investigadas: viabilidade, modulação da cascata apoptótica via análise proteica e de expressão gênica (Bcl-2, Bax, caspases 3 e 8), ação inibitória da AChE, marcadores do metabolismo oxidativo, danos no DNA e níveis proteíco e expressão gênica das enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, CAT, GPX) e níveis gênicos da DNMT1. O desequilíbrio de S-HP sem e com a interação com PB no efeito inibitório de AchE também foi avaliado, a fim de determinar se esse desequilíbrio poderia alterar a eficácia do PB. Todos os experimentos foram realizados em culturas de 24 horas. Os ensaios realizados em triplicata e todos os resultados apresentados como % do grupo controle não tratado.

**Figura 12-** Delineamento experimental geral do artigo 3: Superoxide-hydrogen peroxide imbalance in the cyto-genotoxicity of neural cells associated with Pyridostigmine Bromide.



Fonte: A autora.

## 4 RESULTADOS

Os resultados foram organizados sob a forma de três artigos científicos. O primeiro artigo apresentou resultados relacionados ao efeito do PB sobre a cito-genotóxicidade de células neurais SH-SY5Y, publicados na revista *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental*. O segundo contemplou análise do efeito do PB frente ao desbalanço oxidativo S-HP basal associado a CMSPs portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo da Val16AlaSOD2, que se encontra submetido a revista *Free Radical Research*. O terceiro, e último descreveu um modelo de desbalanço farmacológico S-HP em células neurais SHSY-5Y e subsequentemente avaliou o impacto deste desbalanço na cito-genotoxicidade potencialmente causada pela exposição ao PB. Este artigo está em fase de submissão a revista *Neurotoxicology and Teratology*.

### Artigo 1

**Título:** Effects of Pyridostigmine Bromide on SH-SY5Y cells: an *in vitro* neuroblastoma neurotoxicity model

**Autores:** Veronica Farina Azzolin, Fernanda Barbisan, Luana Suéling Lenz, Cibele Ferreira Teixeira, Milena Fortuna, Thiago Duarte, Marta Maria Frescura Medeiros Duarte, Ivana Beatrice Mânicá da Cruz

**Revista:** Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental. Fator de impacto =2. 13.

**Situação:** Publicado: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.08.003>.

## Artigo 2

**Título:** The effect of Val16Ala-SOD2 polymorphism on inhibition of acetylcholinesterase and cyto-genotoxicity of pyridostigmine bromide in human peripheral blood mononuclear cells

**Autores:** Veronica Farina Azzolin, Fernanda Barbisan, Cibele Ferreira Teixeira, Danieli Pillar, Moisés Henrique Mastella, Thiago Duarte, Raquel de Souza Praia, Euler Esteves Ribeiro, Marta Maria Frescura Medeiros Duarte, Ivana Beatrice Mânic da Cruz.

**Revista:** Free Radical Research. Fator de impacto =3.18.

**Situação:** Submetido

## Artigo 3

**Título:** Superoxide-hydrogen peroxide imbalance in the cyto-genotoxicity of neural cells associated with Pyridostigmine Bromide

**Autores:** Veronica Farina Azzolin, Fernanda Barbisan, Cibele Ferreira Teixeira, Beatriz Sadigursky, Moisés Henrique Mastella, Thiago Duarte, Marta Maria Frescura Medeiros Duarte, Ivana Beatrice Mânic da Cruz

**Revista:** Neurotoxicology and Teratology. Fator de impacto = 2.38.

**Situação:** A ser Submetido.

## **Artigo 1**

### **Effects of Pyridostigmine bromide in human neuronal cells SH-SY5Y *in vitro* neuroblastoma neurotoxicity model**

Veronica Farina Azzolin<sup>1</sup>, Fernanda Barbisan<sup>1</sup>, Luana Suéling Lenz<sup>2</sup>, Cibele Teixeira<sup>2</sup>, Milena Fortuna<sup>2</sup>, Thiago Duarte<sup>2</sup>, Marta Maria Frescura Medeiros Duarte<sup>2</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av Roraima 1000, Prédio 20. Zip Code 97105-900 Santa Maria, RS- Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Biogenômica Universidade Federal de Santa Maria, Av Roraima 1000, Prédio 19. Zip Code 97105-900 Santa Maria, RS- Brazil.

Corresponding author: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av Roraima 1000, Prédio 19. CEP: 97105-900 Santa Maria, RS- Brazil. Email: ivana.ufsm@gmail.com

## ABSTRACT

Pyridostigmine bromide (PB) is a reversible acetylcholinesterase (AChE) inhibitor and the first-choice for the treatment of symptoms associated with myasthenia gravis and other neuromuscular junction disorders. However, evidence suggested that PB could be associated with the Gulf War Illness characterised by the presence of fatigue, headaches, cognitive dysfunction, and musculoskeletal respiratory and gastrointestinal disturbances. Given that a potential neurotoxic effect of PB has not yet been completely elucidated, the present investigation used neural SH-SY5Y cells to evaluate the effect of PB on the cellular viability, cell apoptosis, modulation of the cell cycle, oxidative stress, and genotoxicity variables, which indicate neurodegeneration. As expected, a PB concentration curve based on the therapeutic dose of the drug showed an inhibition of the AChE activity. However, this effect was transient and did not involve differential AChE gene regulation by PB. These results confirmed that undifferentiated SH-SY5Y cells can be used as a cholinergic *in vitro* model. In general, PB did not trigger oxidative stress, and at a slightly higher PB concentration (80 ng/mL), higher levels of protein carbonylation and DNA damage were detected, as determined by the marker 8-deoxyguanosine. The PB genotoxic effects at 80 ng/mL were confirmed by the upregulation of the *p53* and DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*) genes, which are associated with cellular DNA repair. PB at 40 ng/mL, which is the minimal therapeutic dose, led to higher cell proliferation and mitochondrial activity compared with the control group. The effects of PB were corroborated by the upregulation of the telomerase gene. In summary, despite the methodological constraints related to the *in vitro* protocols, our results suggested that exposure of neural cells to PB, without other chemical and physical stressors did not cause extensive toxicity or indicate any neurodegeneration patterns.

**KEY-WORDS:** Cholinesterase inhibitor; Pyridostigmine bromide; DNA damage; Neural cells.

## 1. INTRODUCTION

Pyridostigmine bromide (PB), a reversible acetylcholinesterase (AChE) inhibitor, is the first-choice therapy to treat symptoms associated with myasthenia gravis (MG) and other neuromuscular junction disorders [1]. PB has also been used as prophylaxis against chemical warfare attacks by Persian Gulf War soldiers. However, evidence suggested that PB could be associated with the Gulf War Illness (GWI), which is characterised by the presence of fatigue, headaches, cognitive dysfunction, and musculoskeletal respiratory and gastrointestinal disturbances [2]. A study performed in Navy Seabees identified a risk of the development of three syndromes associated with the use of PB: syndrome 1, characterised by “impaired cognition”; syndrome 2, characterised by “confusion-ataxia”; and syndrome 3, characterised by “arthro-myo-neuropathy” [3]. Other studies also reported dose-response effects on GWI in relation to PB therapy [4–6].

A study performed in rats orally treated with PB for 4 days reported apoptosis induction in the cerebral cortex, striatum, and hippocampus cells; this effect was blocked by pre-treatment with atropine, indicating that PB treatment could contribute to the neurodegeneration processes [7]. Apoptosis induction in rat testicular germ-cells concomitantly exposed to PB, *N,N-diethyl m-toluamide* (DEET), and permethrin was also described previously [8].

Despite evidence from animal models suggesting that PB could present some neurotoxic effects, including DNA damage and subsequent neural apoptosis induction, studies in humans are still limited. Due to difficulties in evaluating this effect in *in vivo* human investigations, studies using an *in vitro* neural experimental model could be useful to clarify the PB effects on the central nervous system (CNS). Undifferentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells, which have been previously used as a model of neurotoxicity studies of some pharmacological drugs, such as all-trans-retinoic acid [9], are such an *in vitro* model. Most studies have used SH-SY5Y as a dopaminergic model; however, there are some investigations showing that these cells could be used as a neural model of the cholinergic metabolism [10–12].

Therefore, in the present investigation, we analysed the effects of PB *in vitro* using SH-SY5Y cells by evaluating cell viability, apoptosis induction, differential modulation of the cell cycle, oxidative stress, and genotoxicity.

## 2. METHODS

Human neuronal cells (SH-SY5Y) were obtained from the American Type Cell Culture Collection (ATCC CRL-2266) and cultured under controlled *in vitro* conditions. Cells were exposed to PB at different concentrations. The PB concentrations were determined by the therapeutic dose of this drug quantified in blood after pharmacological use (40 ng/mL); two higher and two lower concentrations were used to determine the effects of PB on the neural cells. Before performing these analyses, AChE enzyme quantification was performed to confirm the cholinergic effect of PB on the SH-SY5Y cells. The effect of PB on AChE gene modulation was also determined. The following parameters were evaluated: cellular viability, apoptosis induction, cell proliferation, cell cycle modulation, and expression of apoptotic genes, genes related to DNA repair (DNA methyltransferase 1 [DNMT1] and p53), and cell proliferation genes (telomerase).

### 2.1 Cell culture conditions

The neuronal cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM F12; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) with 10% foetal bovine serum (FBS; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B (Invitrogen USA). The cells were cultured at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments. The cell suspension was placed in each well of a 96-well plate ( $2.5 \times 10^5$  cells/well). The treatments were performed to verify the cyto-capacity and genotoxicity of PB in the therapeutic concentration range: 10, 20, 40, 60, and 80 ng/mL. Furthermore, the cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for 3, 24, and 72 h.

We selected this time, because, *in vivo*, the PB peak occurs between 2–3 h after ingestion [13, 14, 15]. In previous *in vitro* studies, cell viability is typically evaluated after 24 h of cell cultures, while the proliferative status after 72 h. For this reason, we decided to select these three points, namely 2–3 h, 24 h, and 72 h [16].

## **2.2 Determination of AchE**

The enzymatic activity of AChE was evaluated by the colorimetric method of Ellman et al. (1961). The method is based on measuring the production rate of thiocholine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) by the hydrolysis of the analogue AChE substrate, acetylthiocholine. The thiocholine reacts with the cell to inhibit the enzyme's activity. The inhibition of AchE using Ellman's reagent (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) forms an admixture of disulphides and yellow anions (nitrobenzoate) with intense absorption at 412 nm [17].

## **2.3 Cell viability and cell proliferation assays**

The neuronal cell viability and cellular proliferation were initially evaluated by the MTT ( 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) Assay. The supernatants of the treatments were removed and the cells were resuspended in phosphate buffer (PBS, 0.01 M; pH 7.4). The MTT was dissolved in 5 mg/mL PBS added to a 96-well plate containing the sample treatments and was subsequently incubated for 1 h at 37 °C. Subsequently, the supernatant was removed from the wells and the cells were resuspended in 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was read at 560 nm using a fluorimeter [18]. To supplement the determination of cell viability, a fluorimetric assay for determining free double-stranded DNA present within the cell medium was conducted using the Quant-iT™ dye PicoGreen® dsDNA (Invitrogen, Life Technologies). This is a fluorescent and stable reagent, with a high affinity for double-stranded DNA, thus enabling the assessment of cellular integrity, assuming that the presence of free DNA in the medium is indicative of cell death due to membrane disruption [19, 20].

## **2.4 Apoptosis and cell cycle assays by flow cytometry**

Complementary flow cytometry analyses were performed to confirm the treatment cytotoxicity using the Annexin-V-FITC and Propidium Iodide (PI) staining kit (BD Pharmingen™). Annexin-V-FITC can detect the early apoptotic process, whereas PI allows the identification of late or necrotic apoptotic cells. The detection is performed through the binding of the cell receptors to the fluorescent antibodies Annexin-V and PI. The analysis was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, cells

were seeded in 6-well plates at  $1 \times 10^6$  cells/well in 2 mL of different treatments of DMEM F12 and were incubated for 24 h. Following incubation, the cells were trypsinised in order to ensure that they were detached, and were subsequently washed twice with cold PBS before being resuspended in 1X Binding Buffer at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL. After transferring the cells into 100  $\mu$ L of the solution ( $1 \times 10^5$  cells), the contents were placed into a 5-mL culture tube. The resuspended cells were subjected to gentle vortexing and were stained with 5  $\mu$ L of Annexin-V-FITC and 5  $\mu$ L of PI. Following a short incubation (15 min) in the dark at room temperature, 400  $\mu$ L of 1X Binding Buffer was added to each tube, and the cell fluorescence was analysed by flow cytometry according to the manufacturer's instructions [21].

The cell cycle analysis was also performed using flow cytometry after 72 h of prior treatment of the neuronal cells with PB. The PI reagent binds to the DNA by intercalating between the bases with little or no sequence preference. PI also binds to the RNA, necessitating treatment with nucleases to distinguish between the RNA and DNA. In our work, cells were seeded in 6-well plates at  $5 \times 10^4$  cells per well in 2 mL of different treatments in DMEM F12 and were incubated for 72 h. Following incubation, the cells were trypsinised, washed with PBS, and resuspended in 70% ethanol. Subsequently, cells were stored overnight at -20 °C. Prior to conducting the analyses, the cells were centrifuged and washed once with PBS, followed by resuspension in 500  $\mu$ L PI-solution in PBS (50  $\mu$ g/mL PI from 50X [2.5 mg/mL] stock solution, 0.1 mg/mL RNase A, and 0.05% Triton X-100) and subsequent incubation for 40 min at 37 °C. Finally, 3 mL of PBS were added for washing and cells were resuspended in 500  $\mu$ L PBS for flow cytometry analysis [22].

## **2.5 Analyses of the oxidative stress levels**

Dichlorofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) measures the presence of reactive oxidative stress (ROS), especially hydrogen peroxide; the test was performed as described previously [23]. Reactive substances to thiobarbituric acid were analysed because oxidative stress can damage the cell membranes; the method to evaluate the lipid peroxidation was as described previously [24]. During the fragmentation of the carbonylation proteins due to oxidative stress, chain fragmentation occurs and almost all amino acids are released, with the frequent

production of carbonyl compounds. These forms of damage are measured by determining the formation of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine, as previously described [25]. Nitric oxide was assessed by analysing the nitrate levels using the Griess reagent [26]. Superoxide ( $O_2^-$ ) radical levels were assessed by the analysis of the formazan levels via a reaction with nitro blue tetrazolium chloride (NBT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [27].

## **2.6 Genotoxicity assays**

The alkaline Comet Assay DNA was performed according to the general specifications previously described [28] in accordance with the general guidelines for the use of the comet assay [29]. A total of 100 cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analysed. Cells were visually scored according to the tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the dam-age index for cells ranged from 0 (cells with no migration) to 400 (cells with maximal migration). The slides were analysed under blind conditions (i.e. the status of the participants) by at least two different researchers.

We also evaluated 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), which is a DNA damage oxidation product formed by the hydroxyl radical, oxygen, and photodynamic action, by the enzyme immunoassay ELISA after 24 h of treatment, using the Quantikine® kit, according to the manufacturer's recommendations.

## **2.7 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis**

Total RNA was extracted using Trizol, following the manufacturer's instructions (Ludwing-Biotec, Brazil). The extracted RNA was measured by a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. To perform reverse transcription, RNA was added to the samples of RNA (1 µg/mL) with 0.2 µL of DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 5 min at 37 °C, followed by heating for 10 min at 65°C. The complementary DNA (cDNA) was generated with 1 µL of Iscript cDNA and 4 µL of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA). The next steps of the reaction were 10 min at 5°C, 5 min at 25 °C, and 5 min at 85°C, with a final incubation for 60 min at 5°C. The qRT-PCR was performed in the Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN biotechnology, Germany) with 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN biotechnology, Germany), starting with 3 min at 95°C

followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, and a melt curve of 5 s at 60 °C to 90 °C in 0.5 °C increments. The reactions of each sample were performed in triplicate, using 1 µM of each primer (Table 1) and 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN biotechnology, Germany); the final volume was 20 µL. The beta-actin gene was used as the housekeeping gene [18].

Genes	Primers	
	Sense	Antisense
β actina	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTGTC
BAX	CCCTTTCTACTTGCAGCAA	CCCGGAGGAAGTCCAATGT
BCL-2	GAGGATTGTGGCCTTCTTGAGT	AGTCATCCACAGGGCGATGT
CASP 8	AAGGAGCTGCTCTCCGAATT	CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT
CASP 3	TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG	TACCAAGTGCATGGAGAAATGG
Telomerase	CCTGTGCTACGGCGACATG	ACCAACAAGAAATCATCCACCAA
DNMT1	AACGGCATCCTGTACCGAGTT	CCTTCCGTGGCGTTTC
AChE	CCCAGGCTTCAGCAAAGACAA	TTCAAAGACGTAGGCGTAGACCC
P53	TTGGGTCTTGAAACCCTTGCT	GTGCAGGCCAACTTGTTCACT

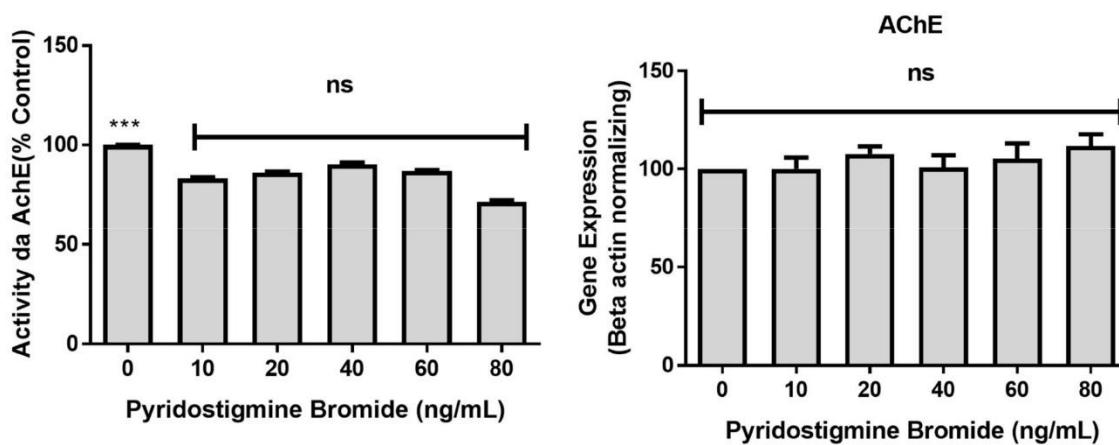
**Table 1.** Gene primers list.

## 2.8 Statistical analysis

All data were transformed into percentages in relation to the negative control group. Results were statistically analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test using GraphPad (GraphPad Prism software, version 5.0, 2015). Results with a  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.

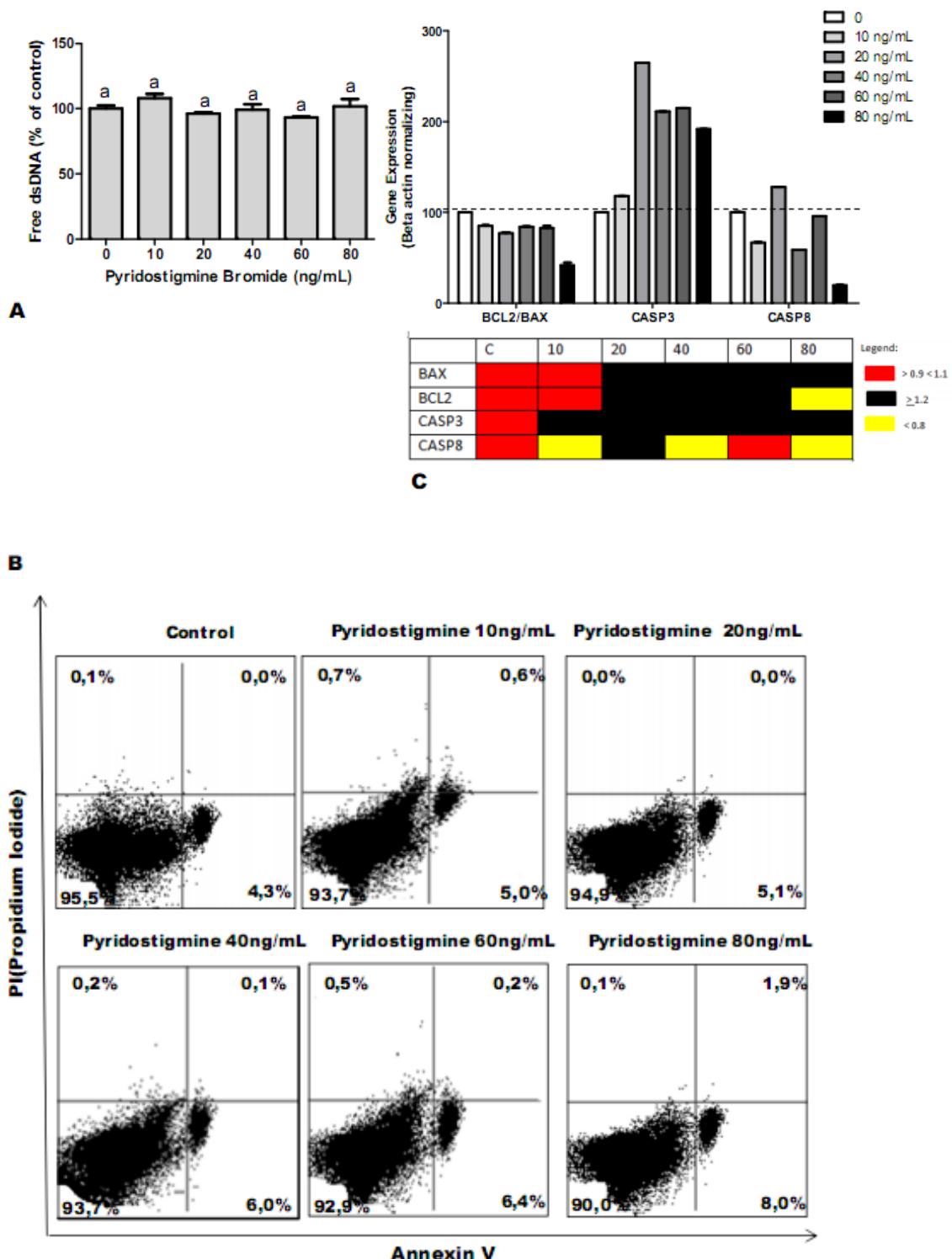
## 3. RESULTS

Initially, the effects of PB on neural cells were determined by the AChE inhibition. As can be seen in Figure 1A, all PB concentrations had a lowering effect on the AChE activity. However, complementary analysis did not show an influence of PB on the modulation of AChE gene expression, confirming the transitory and reversible PB effects on neural cells (Figure 1B).



**Figure 1.** Effects of pyridostigmine bromide (PB) at different concentrations on the enzyme acetylcholinesterase activity (A) and gene expression (B). Results are represented by mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Tukey's *post-hoc* test. Significant differences at  $p \leq 0.05$  among treatments were identified by different letters. The assays were performed in triplicate.

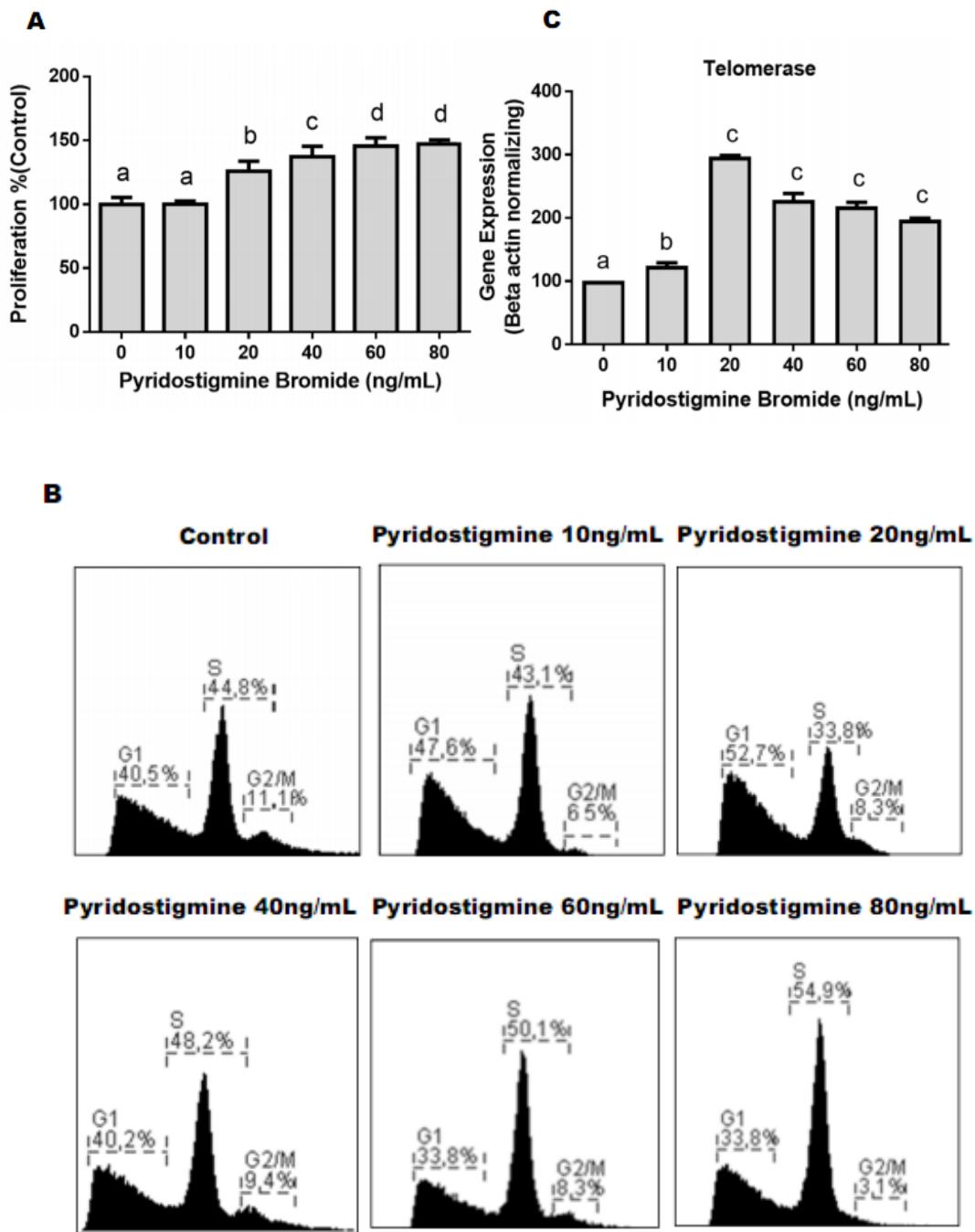
PB did not cause an acute cytotoxic effect on SH-SY5Y cells (Figure 2A). However, the flow cytometry analysis revealed significant increases in the number of apoptotic cells (earlier plus latter apoptosis) when cells were treated with high PB concentrations ( $\geq 40$  ng/mL) ( $p < 0.01$ ). However, at a higher BP concentration (80 ng/mL), the rate of apoptotic cells ( $9.9 \pm 1.1\%$ ) was twice that of the control group ( $4.3 \pm 0.6\%$ ) and higher than the other BP concentrations tested here. In particular, the apoptosis rate was  $0.6 \pm 0.02\%$  at 10 ng/mL BP,  $5.6 \pm 0.9\%$  at 20 ng/mL BP,  $6.1 \pm 0.9\%$  at 40 ng/mL BP,  $6.6 \pm 1.1\%$  at 60 ng/mL BP, and  $9.9 \pm 1.2\%$  at 80 ng/mL. The gene expression analysis revealed a downregulation of the Bcl-2/Bax rate in all PB-treated cells. Caspase 8, an apoptosis initiator gene, showed a difference in its expression between cells treated with different PB concentrations. However, caspase 3, an apoptosis executor gene, presented strong upregulation in neural cells treated at PB concentrations  $\geq 20$  ng/mL. Taken together, these results confirmed the PB-related apoptosis induction via an apoptosis extrinsic pathway.



**Figure 2.** Cytotoxic effects of pyridostigmine bromide (PB) at different concentrations on SH-SY5Y neural cells. (A) Viability determined by the quantification of double-strand (ds)DNA levels in cell culture medium. Results are represented by mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Tukey's *post-hoc* test. Significant differences at  $p \leq 0.05$  among treatments were identified by use of different letters. (B) Modulation of apoptotic events by PB treatment (representative flow cytometry graphs). (C) Modulation of apoptotic gene expression by PB

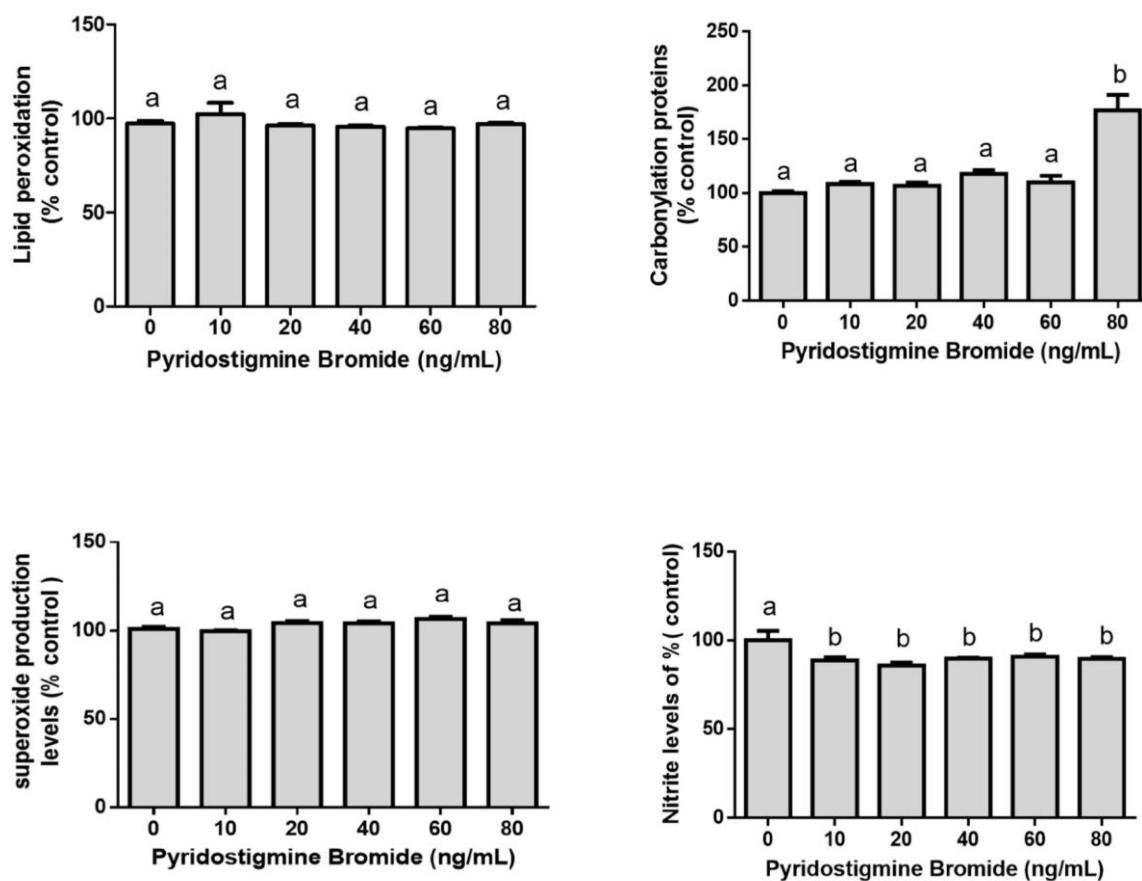
treatments calculated by the relative mRNA expression using the mRNA levels in untreated control cells as a reference. The assays were performed in triplicate.

In cultures with 3 h BP exposure, no effect on neural cell viability was observed when compared with the control group (data not shown). Neurotoxicity triggered by some drugs can cause differential modulation of the cell cycle and proliferative metabolism. In this study, the mitochondrial activity estimated by the MTT assay was elevated in cells treated with PB compared with the control cell group. As shown in Figure 3A, the effect of PB on the cellular metabolism was dose-dependent, indicating an active proliferative state. This result was confirmed by the flow cytometry analysis, which showed a PB action on the SH-SY5Y cell cycle (Figure 3B) when cultures were exposed to higher PB concentrations ( $> 60$  ng/mL). At these high concentrations, a higher frequency of cells in the S phase was observed. Exposure to PB also upregulated the telomerase gene expression, another marker of the cellular proliferative state (Figure 3C). This effect was also more intense in cells exposed to higher PB concentrations.



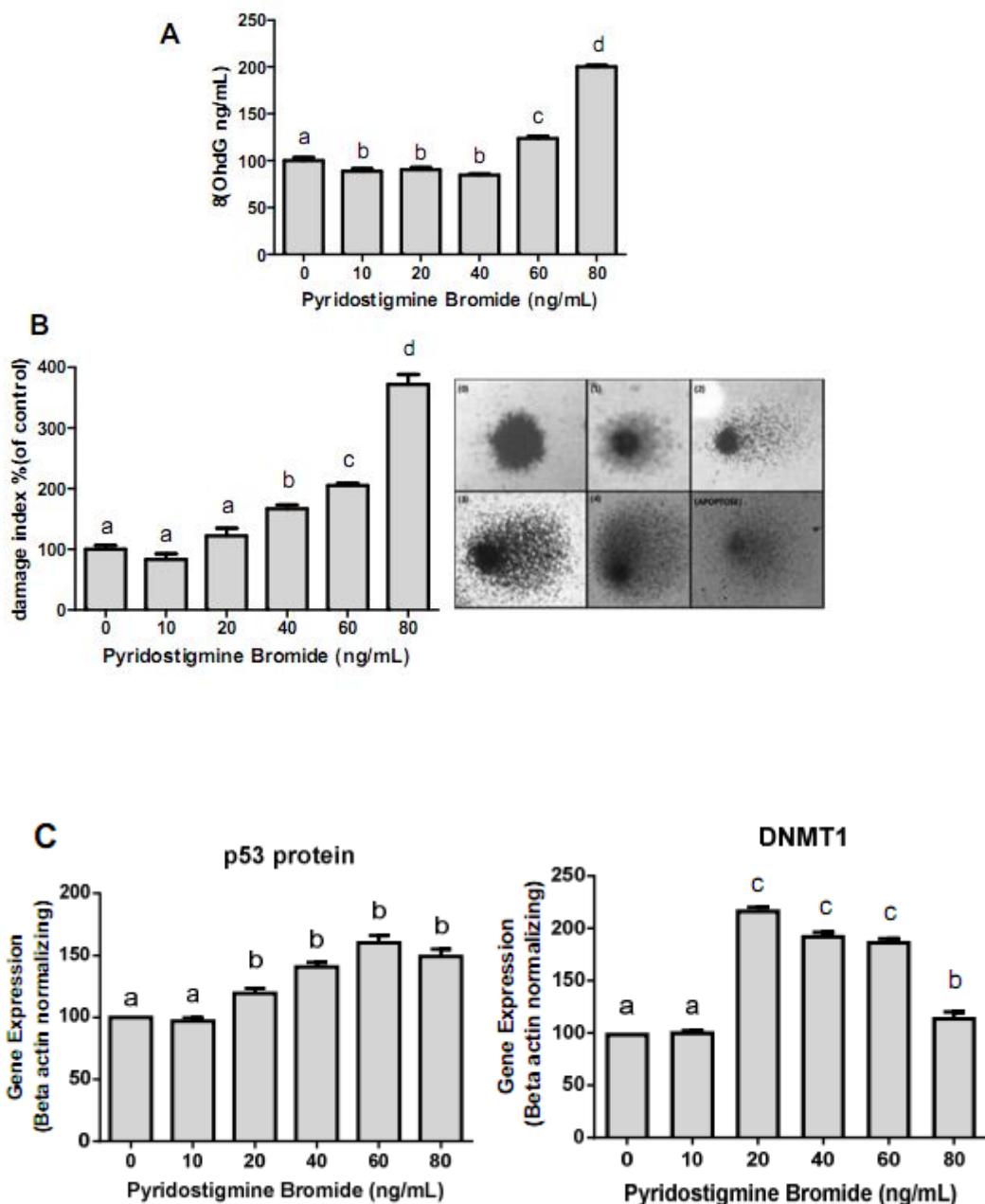
**Figure 3.** Effect of pyridostigmine bromide (PB) on proliferation, cell cycle, and expression of the telomerase gene in neural cells (SH-SY5Y). (A) Cell proliferation among cultures exposed to different PB concentrations. (B) Representative cell cycle graphs from flow cytometric analysis (G1 = gap 1; S= Synthesis; G2 = Gap 2 cell cycle phases). (C) Modulation of the telomerase gene by PB treatment calculated by relative mRNA expression using mRNA levels found in untreated control cells as a reference. Results are represented by mean  $\pm$  standard deviation (SD). Treatments were statistically compared by analysis of variance followed by Tukey's *post-hoc* test. Significant differences at  $p \leq 0.05$  among treatments were identified by the use of different letters. The assays were performed in triplicate.

Non-acute effects of PB on oxidative stress were observed in SH-SY5Y cell cultures exposed to PB for 3 h (Figure 4). In this case, PB exposure resulted in similar concentrations of oxidative markers to those observed in control cells or decreased these markers. The only exception was observed in cells treated with PB at 80 ng/mL, which presented a higher level of protein carbonylation than control cells.



**Figure 4.** Effects of pyridostigmine bromide (PB) at different concentrations on oxidative markers of SH-SY5Y neural cells. Results are represented by mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Tukey's *post-hoc* test. Significant differences at  $p \leq 0.05$  between treatments were identified by different letters. The assays were performed in triplicate.

Genotoxicity induction by PB exposure was analysed in neural cells by two assays: quantification of the 8-OHdG levels and the DNA Comet assay. Analysis of the impact of PB on DNMT1 repair and p53 gene expression was also undertaken. Cells treated with lower PB concentrations (10 - 40 ng/mL) showed a significant decrease in DNA damage as evidenced by the 8-OHdG quantification (Figure 5A). In general, the results of the DNA Comet assay were similar to those found in the 8-OHdG analysis, except for the 40 ng/mL PB concentration, which presented a slight increase in the DNA damage compared with the control group (Figure 5B). In cells cultured for 3 h with  $\geq 20$  ng/mL PB, upregulation of the DNMT1 and p53 genes was observed.

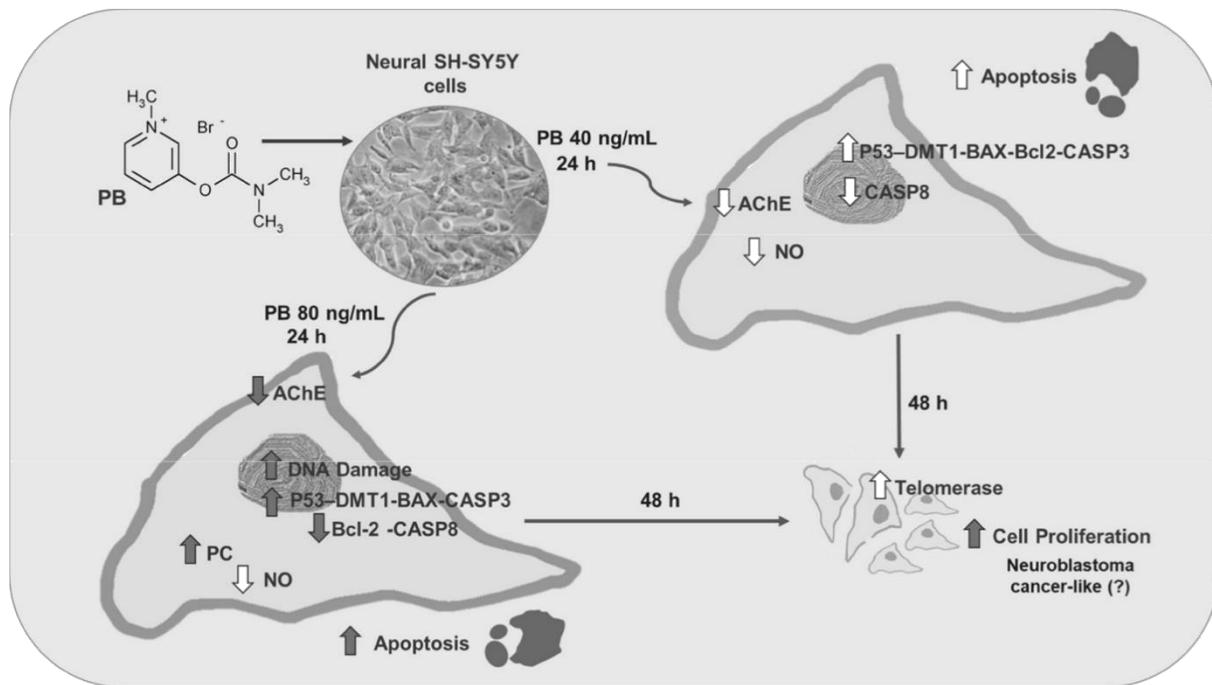


**Figure 5.** Genotoxic effects of pyridostigmine bromide (PB) at different concentrations in SH-SY5Y neural cells. (A) DNA damage measured by 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). (B) Damage Index determined by the Comet DNA assay. (C) Modulation of p53 and methyltransferase 1 (DNMT1) genes by PB treatments calculated by relative mRNA expression using the mRNA levels found in untreated control cells as reference. Results are represented by mean  $\pm$  standard deviation (SD). Treatments were statistically compared by analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test. Significant differences at  $p \leq 0.05$  between treatments were identified by different letters. The assays were performed in triplicate.

#### 4. DISCUSSION

The present study evaluated the impact of PB *in vitro* on human neural cells in order to determine the potential cyto- and genotoxic effects of PB. Initially, the action of PB was evaluated by analysing the AChE activity and gene expression. The results confirmed the transitory effect of PB on this enzyme, since a decrease in AChE activity was observed without the occurrence of differential gene modulation by PB. This first assay was used to validate the potential PB effects, which pharmacologically acts on AChE, on SH5Y-SY cells that are generally used as a dopaminergic model. Previous studies also reported that SH5Y-SY cells could express different general ACh receptors, according to their differentiation state. A study performed by Scott et al. [30] demonstrated that both undifferentiated and differentiated SHSY-5Y cells presented muscarine G-protein receptors, whereas the nicotinic ligand gated ion channel receptors were only present in differentiated cells. However, other investigations have also used undifferentiated SH-SY5Y cells as potential cholinergic *in vitro* model [10,11,17]. However, the main focus of the present study was to investigate the potential PB neurotoxic effect on neural cells. Therefore, we did not analyse the PB action on different sub-types of ACh nicotinic and muscarinic receptors in SHSY-5Y cells.

Taken together, our present results suggested that the use of PB in human neural cells in the absence of physical and chemical agents could trigger some cytotoxic events. However, the results also indicated that these cyto-genotoxic effects are less intense in cells exposed to a 40-nM PB concentration than in cells exposed to a higher PB concentration (80 nM) (Figure 6). The higher PB concentration tested here resulted in a significant elevation of protein carbonylation and DNA damage levels, which are two important oxidative stress markers. Protein carbonylation is generally produced in consequence to the oxidation processes promoted by ROS exposure, which forms reactive ketones or aldehydes from proteins, or by oxidative decomposition of polyunsaturated fatty acids, which can trigger chain reactions that lead to the formation of a variety of carbonyl species [31]. Therefore, the elevation of protein carbonylation could be considered as a consequence of prior production of oxidative and nitrosative molecules that act on the cellular macromolecules. However, it is probable that the elevation of oxidative molecules could occur earlier, which could be the reason for which we did not observe higher levels of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO, and ROS.



**Figure 6.** Schematic illustration of the results found in neural SH-SY5Y cells exposed to a therapeutic dose (40 ng/mL) and a higher therapeutic dose (80 ng/mL) of pyridostigmine bromide (PB). AChE = acetylcholinesterase enzyme; BAX = Bcl-2-associated X protein; Bcl-2 = B-cell lymphoma 2; CASP = caspases; DNMT1 = DNA methyltransferase 1; NO = nitric oxide; PC = protein carbonylation Genes; p53 = p53 protein. DNA damage was evaluated by 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and DNA Comet assays.

At a higher PB concentration, the genotoxic effect was well evidenced by two assays, namely the 8-deoxyguanosine and DNA comet assays. Moreover, we observed an upregulation of the p53 and DMT1 genes, probably in response to the PB-triggered DNA damage. The tumour suppressor gene p53 protein is considered a key regulator of cell cycle progression and apoptosis and a crucial player in the pathway responsible for DNA repair, which is critical for maintaining the genomic stability. Therefore, consistent evidence has suggested that the p53 protein is upregulated in response to diverse stressor agents including oxidative stress and DNA damage [32]. The study performed by Bonda et al. [33] described mutations in the mitochondrial DNA that led to the misincorporation of noncanonical 2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate, and that these mutations could activate the p53 protein in order to facilitate the DNA repair or trigger apoptosis. DNMT 1 is also an enzyme linked to DNA methylation and repair caused by several environmental factors [34]. It is probable that these modifications were responsible for the increase in the apoptotic events observed in the neural cells exposed to PB at 80 ng/mL. This presumption is corroborated by the fact that apoptosis involved the intrinsic (mitochondrial) pathway with the upregulation

of caspases 3 and 8 and the downregulation of the Bcl-2/BAX gene expression ratio [35]. In a previous study [36], the rat cerebellar granule cells treated with PB presented fragmentation on gel electrophoresis, ROS generation, and apoptotic cell death, which is consistent with our present results. In rat germ Sertoli and Leydig cells, the combination of PB, DEET, and permethrin, used in the Gulf War, resulted in an increase of oxidative stress markers and apoptosis rate [8]. The authors also reported increased expression of the apoptosis-promoting proteins Bax and p53. Because the study did not test the isolated effects of the agents, we could only speculate that higher PB concentrations could also cytotoxic effects, which would be so intense at lower concentrations.

At the estimated therapeutic plasmatic PB concentration (40 ng/mL), SHSY-5Y cells did not exhibit the intense cytotoxic and genotoxic effects observed at the higher PB concentration. For example, cells exposed to 40 ng/mL did not show any elevation of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO, ROS, lipoperoxidation, or protein carbonylation in comparison with the control group. However, we observed a slight, but significant elevation of DNA index damage in the Comet assay. Moreover, lower 8-OHdG levels in cells exposed to PB at 40 ng/mL were observed than in control cells. Modification of 8-OHdG is considered an important marker of DNA damage triggered by oxidative stress. 8-OHdG was tested here by an indirect method (ELISA assay), which is among the most widely used tests in biomedical research. The ELISA assay used to measure 8-OHdG has a high sensitivity, repeatability, specificity, and relatively low cost [37]. The Comet assay is also an indirect method to evaluate the DNA damage. This assay is versatile, cost-efficient, and reliable for detecting DNA damage in any tissue [38]. This apparent conflict could indicate that PB at 40 ng/mL presents some intermediary and nonstable genotoxic effect compared to the higher concentration tested here. This interpretation is reinforced by the results on the effects of PB at 40 ng/mL on apoptosis. Indeed, despite the increased rate of apoptotic cells, when compared with the control group, this effect was intermediary when compared with cells exposed to PB at 80 ng/mL. Moreover, it is relevant to note that PB has been accepted by the US military as a pre-treatment for exposure to organophosphate chemical warfare agents since 1986 using a prophylactic dose of 30 mg three times a day [39]. This is a lower doses in relation to PB doses used to treat MG, been estimated a plasmatic therapeutic concentration about 10-20 ng/mL.

We also evaluated the effect of PB on the proliferative status of SHSY-5Y cells. After 72 h of exposure to PB, cells exhibited a higher level of cell proliferation and mitochondrial activity when compared with the control group. PB induced apoptosis, as previously reported in *in vivo* studies in rats [6]. Surprisingly, given that 72 h are sufficient to reflect a clear proliferative status, including cells treated with PB at a concentration of 80 ng/mL, the evaluated DNA damage events were not extensive. The effects of PB were reinforced by the upregulation of the telomerase gene. Previous investigations by Hasoi et al. [40] demonstrated a downregulation of the telomerase reverse transcriptase gene in stressed SH-SY5Y cells. The authors also suggested that the inhibition of the telomerase activity could enhance the cells vulnerability to neural cell death. The promotion of apoptosis by telomere shortening when SH-SY5Y cells are exposed to certain anti-tumour molecules has been also described [41]. As our results did not show a PB-induced downregulation of the telomerase gene, we assumed that the effect of PB on neural cells does not involve telomere shortening.

Overall, our results could suggest that the PB-induced toxicity was transient and some of the effect was concentrated in the first 24 h of cell exposure. However, in the subsequent period evaluated in the 72-h cell cultures, the negative effects of PB were not maintained. There could be other explanations for the improvement of the proliferative status of SHSY-5Y cells following exposure to PB. Considering that higher DNA damage was observed mainly in cultures exposed to PB at 80 ng/mL, accumulated mutations or differential gene regulations triggered by PB could have stimulated the SHSY-5Y cells to present a cancer-like phenotype. It is worth noting that the SH-SY5Y cells were obtained from a bone marrow biopsy taken from a 4-year-old girl with neuroblastoma. Indeed, SH-SY5Y cells can spontaneously interconvert between two phenotypes *in vitro*, namely the neuroblast-like cells and neural differentiated cells; however, the mechanisms underlying this process are not well understood [42]. A previous investigation performed by Ross et al. [43] reported that the SH-SY5Y cells responded to the exogenous granulocyte colony stimulating factor (GCSF) by increasing their capacity to proliferate, particularly at days 3, 5, and 7 post-treatment, compared with untreated cells.

Moreover, a consideration that it is relevant to point out is to the regulation of the caspase 8 gene in the PB-exposed cells. Surprisingly, cells exposed to PB at 40 and 80 ng/mL exhibited a significant downregulation of the caspase 8 gene, which is crucial in the apoptotic caspase pathway since it regulates and initiates the

programmed cell death via both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways [44]. However, there is evidence that caspase 8 downregulation could be associated with the progression brain tumours. It has also been reported that loss of caspase 8 via the epigenetic phenomenon of methylation in neuroblastoma is associated with an increased resistance to chemotherapy [45].

Due to the dual SH-SY5Y characteristics, the present results could be more a pattern associated with a specific cell line rather than with the potential procarcinogenic PB effects. This assumption is based on epidemiological data from GWI veterans, such as those reported in a previous study by Young et al. [46], which analysed the potential cancer risk in GWI veterans using data from 621,902 veterans who were deployed to the Persian Gulf war (1990–1991) and 746,248 non-Gulf War veteran controls, obtained from the Defense Manpower Data Center. A 15-year follow-up analysis showed that there was no overall increase in the proportional risk of cancer in GWI veterans compared with the non-Gulf War veterans. Although lung cancer was the only specific neoplasia that was higher in GWI than in non-Gulf War veterans, authors suggested that this difference could be associated with the different smoking patterns between the two groups. To the best of our knowledge, there are no *in vitro* or experimental studies evaluating the effects of PB on tumour cells. Thus, future investigations on this question could clarify whether or not the DNA damage caused by PB exposure could effectively promote the proliferation of malignant cells.

There are several AChE inhibitors belonging to a wide group of chemical molecules with different physicochemical properties. PB is a carbamate AChE inhibitor used to increase the levels of ACh in injured neurosynaptic clefts. PB is also used as a prophylaxis to nerve agent exposure, which inhibits AchE in an irreversible manner [47]. A large number of carbamate AChE irreversible molecules trigger oxidative stress, which could cause extensive cellular and functional damage [48]. Therefore, we can speculate that the interaction between PB and these molecules could amplify the oxidative stress, leading to systemic neural dysfunctions associated with GWI. However, this hypothesis needs to be confirmed by future investigations.

In summary, despite the methodological constraints related to the *in vitro* protocols, our results suggested that the exposure of neural cells to PB without other chemical and physical stressors does not cause extensive toxicity that could explain the clinical symptoms observed in GWI.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the CNPq (No 402325/2013-3; 490760/2013-9; 311446/2012-4), FAPERGS, FAPEAM, and CAPES for grants and fellowships.

## 5. REFERENCES

- [1] N.E. Gilhus, Myasthenia gravis — autoantibody characteristics and their implications for therapy, *Nat. Rev. Neurol.* 12 (2016) 259–268.
- [2] R.F. White, L. Steele, J.P. O'Callaghan, K. Sullivan, J.H. Binns, B.A. Golomb, F.E. Bloom, J.A. Bunker, F. Crawford, J.C. Graves, A. Hardie, N. Klimas, M. Knox, W.J. Meggs, J. Melling, M.A. Philbert, R. Grashow, Recent research on Gulf War illness and other health problems in veterans of the 1991 Gulf War: Effects of toxicant exposures during deployment, *Cortex* 74 (2016) 449–475.
- [3] R.W. Haley, T.L. Kurt, Self-reported exposure to neurotoxic chemical combinations in the Gulf War. A cross-sectional epidemiologic study, *JAMA* 277 (1997) 231–237.
- [4] P.S. Spencer, L.A. McCauley, J.A. Lapidus, M. Lasarev, S.K. Joos, D. Storzbach, Self-reported exposures and their association with unexplained illness in a population-based case-control study of Gulf War veterans, *J. Occup. Environ. Med.* 43 (2001) 1041–1056.
- [5] N. Cherry, F. Creed, A. Silman, G. Dunn, D. Baxter, J. Smedley, S. Taylor, G.J. Macfarlane, Health and exposures of United Kingdom Gulf war veterans. Part I: the pattern and extent of ill health. *Occup. Environ. Med.* 58 (2001) 291–298.
- [6] J. Wolfe, S.P. Proctor, D.J. Erickson, H. Hu, Risk factors for multi-symptom illness in US Army veterans of the Gulf War, *J. Occup. Environ. Med.* 44 (2002) 271–281.

- [7] L. Li, Y. Shou, J.L. Borowitz, G.E. Isom, Reactive oxygen species mediate pyridostigmine-induced neuronal apoptosis: involvement of muscarinic and NMDA receptors, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177 (2001), 17–25.
- [8] M.B. Abou-Donia, Testicular germ-cell apoptosis in stressed rats following combined exposure to pyridostigmine bromide, N,N-diethyl m-toluamide (DEET), and permethrin, *Neurotoxicology* 21 (2003) 541–552.
- [9] T.Y. Chueng, W.K. Lau, M.S. Yu, C.S. Lai, S.C. Yeung, K.F. So, R.C. Chang, Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research, *Neurotoxicology* 30 (2009) 127–135.
- [10] M.F. Santillo, Y. Liu, A fluorescence assay for measuring acetylcholinesterase activity in rat blood and a human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y), *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 76 (2015) 15–22.
- [11] T. Weiser, S. Just, Hyoscine butylbromide potently blocks human nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells, *Neurosci. Letters* 450 (2009) 258–261.
- [12] H. Li, G. Jin, P. Zhu, L. Zou, J. Shi, X. Yi, X. Zhang, M. Tian, J. Qin, Up-regulation of Lhx8 increase VACHT expression and ACh release in the neuronal cell line SHSY5Y, *Neurosci. Letters* 1 (2013) 1–5.
- [13] B.R. Thanvi, T.C.N. Lo, Update on myasthenia gravis, *Postgrad Med. J.* 80 (2004) 690–700.
- [14] R. Mantegazza, S. Bonanno, G. Camera, C. Antozzi, Current and emerging therapies for the treatment of myasthenia gravis, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 7 (2011) 151–160.
- [15] J.Y. Kim, K.D. Park, D.P. Richman, Treatment of Myasthenia Gravis based on its immunopathogenesis, *Clin. Neurol. J.* 7 (2011) 173–183.

- [16] A.K. Machado, A.C. Andreazza, T.M. da Silva, A.A. Boligon, V. do Nascimento, G. Scola, A. Duong, F.C. Cadoná, E.E. Ribeiro, I.B. da Cruz, Neuroprotective Effects of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone *In Vitro* Exposure, *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016 (2016) 1–14.
- [17] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V.Jr. Andres, R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.
- [18] F. Barbisan, Jde.R. Motta, A. Trott, V. Azzolin, E.B. Dornelles, M. Marcon, T.D. Algarve, M.M. Duarte, C.P. Mostardeiro, T.C. Unfer, K.L. Schott, I.B. da Cruz, Methotrexate related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism, *PLoS One* 9 (2014) 1–12.
- [19] S.J. Ahn, J. Costa, J.R. Emanuel, PicoGreen quantification of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 2623–2625.
- [20] T.T. Há, N.T. Huy, L.A. Murao, N.T. Lan, T.T. Thuy, H.M. Tuan, C.T. Nga, V.V. Tuong, T.V. Dat, M. Kikuchi, M. Yasunami, K. Morita, V.T. Huong, K. Hirayama, Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection, *PLoS One* 6 (2011) 1–7.
- [21] X. Zhao, S. Huang, H. Luo, X. Wan, Y. Gui, J. Li, D. Wu, Evaluation of vesicular stomatitis virus mutant as an oncolytic agent against prostate cancer, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7 (2014) 1204–1213.
- [22] V.F. Azzolin, F.C. Cadoná, A.K. Machado, M.D. Berto, F. Barbisan, E.B. Dornelles, W.G. Glanzner, P.B. Gonçalves, C.G. Bica, I.B. da Cruz, Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response, *Toxicol. In Vitro* 32 (2016) 8–15.
- [23] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 231–255.

- [24] A.M. Jentzsch, H. Bachmann, P. Fürst, H.K. Biesalski, Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1983) 251–256.
- [25] F. Morabito, M. Cristani, A. Saija, C. Stelitano, V. Callea, A. Tomaino, P.L. Minciullo, S. Gangemi, Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma, *Mediators Inflamm.* 13 (2004) 381–383.
- [26] W.S. Choi, P.G. Shin, J.H. Lee, G.D. Kim, The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells, *Cell. Immunol.* 280 (2012) 164–170.
- [27] C.F. Morabito, Rovetta, M. Bizzarri, G. Mazzoleni, G. Fanò, M.A. Mariggiò, Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 579–589.
- [28] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [29] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice; 4th International Comet Assay Workshop, Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *International Comet Assay Workshop 4th, Mutagenesis* 18 (2003) 45–55.
- [30] I.G. Scott, K.E. Akerman, J.E. Heikkilä, K. Kaila, L.C. Andersson, Development of a neural phenotype in differentiating ganglion cell-derived human neuroblastoma cells, *J. Cell. Physiol.* 128 (1986) 285–292.
- [31] Y.J. Suzuki, M. Carini, D.A. Butterfield, Protein carbonylation, *Antioxid. Redox Signal.* 12 (2010) 323–325.

- [32] C. Lanni, M. Racchi, M. Memo, S. Govoni, D. Uberti, p53 at the crossroads between cancer and neurodegeneration, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1727–1733.
- [33] E. Bonda, G. Rahav, A. Kaya, M. Bakhanashvili, p53 in the mitochondria, as a trans-acting protein, provides error-correction activities during the incorporation of non-canonical dUTP into DNA, *Oncotarget* 1 (2016) 1–9.
- [34] B. Jin, K.D. Robertson, DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer, *Adv. Exp. Med. Biol.* 754 (2013) 3–29.
- [35] Y. Kiraz, A. Adan, M. Kartal Yandim, Y. Baran, Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis, *Tumour Biol.* 37 (2016) 8471–8486.
- [36] L. Li, P.G. Gunasekar, J.L. Borowitz, G.E. Isom, Muscarinic receptor-mediated pyridostigmine-induced neuronal apoptosis, *Neurotoxicology*, 21 (2000) 541–552.
- [37] N. Dąbrowska, A. Wiczkowski, Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage, *Adv. Clin. Exp. Med.* 26 (2017) 155–166.
- [38] M. Glei, T. Schneider, W. Schlörmann, Comet assay: an essential tool in toxicological research, *Arch. Toxicol.* 90 (2016) 2315–2336.
- [39] S.F. Gouge, D.J. Daniels, C.E. Smith, Exacerbation of asthma after pyridostigmine during Operation Desert Storm, *Mil. Med.* 159 (1994) 108–111.
- [40] T. Hosoi, K. Nakatsu, A. Shimamoto, H. Tahara, K. Ozawa, Inhibition of telomerase causes vulnerability to endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death, *Neurosci. Lett.* 6 (2016) 241–244.
- [41] X. Tian, W. Hou, S. Bai, J. Fan, H. Tong, Y. Bai, XAV939 promotes apoptosis in a neuroblastoma cell line via telomere shortening, *Oncol. Rep.* 32 (2014) 1999–2006.

- [42] J.L Biedler, S. Roffler-Tarlov, M. Schachner, L.S. Freedman, Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones, *Cancer Res.* 38 (1978) 3751–3757.
- [43] R.A. Ross, B.A. Spengler, J.L. Biedler, Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 71 (1983) 741–747.
- [44] B. Tummers, D.R. Green, Caspase-8: regulating life and death, *Immunol. Rev.* 277 (2017) 76–89.
- [45] T. Teitz, J.M. Lahti, V.J. Kidd, Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death, *J. Mol. Med. Berl.* 79 (2001) 428–436.
- [46] H.A. Young, J.D. Maillard, P.H. Levine, S.J. Simmens, C.M. Mahan, H.K. Kang, Investigating the risk of cancer in 1990-1991 US Gulf War veterans with the use of state cancer registry data, *Ann. Epidemiol.* 20 (2010) 265–272.
- [47] M. Pohanka, Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.* 155 (2011) 219–230.
- [48] J.L. Assis, Treatment of severe forms of myasthenia by intravenous administration of ACTH, *Arch. Neuro-psychiat.* 18 (1960) 359–370.

## **Artigo 2**

### **The effect of Val16Ala-SOD2 polymorphism on inhibition of acetylcholinesterase and cyto-genotoxicity of pyridostigmine bromide in human peripheral blood mononuclear cells**

Veronica Farina Azzolin<sup>1</sup>, Fernanda Barbisan<sup>2</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>1</sup>, Danieli Pillar<sup>3</sup>, Moisés Henrique Mastella<sup>2</sup>, Thiago Duarte<sup>1</sup>, Raquel de Souza Praia<sup>4</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>4</sup>, Marta Maria Frescura Medeiros Duarte<sup>3</sup>, Ivana Beatrice Mânic da Cruz<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>2</sup> Postgraduate Program of em Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>4</sup> Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil.

\* **Corresponding author:** Ivana Beatrice Mânic da Cruz, PhD

Address for correspondence and reprints: Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Avenue Roraima 1000, Building 19, Chamber 3102, Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900. Phone: 55-55-91199099. Fax: 55-55-32208239. Email: ivana.ufsm@gmail.com.

## Abstract

Pyridostigmine bromide (PB), an acetylcholinesterase (AChE) enzyme inhibitor that interacts with other toxicant molecules, is considered responsible for Gulf War Illness (GWI). Experimental evidence supported this hypothesis, showing that when combined with other drugs or exercise, PB causes extensive neural and/or systemic oxidative stress. However, no studies have been conducted on the genetic influence associated with basal oxidative superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance, such as that triggered by Val16Ala-SOD2 single nucleotide polymorphism (SNP, rs4880). This SNP, (homozygous genotypes) has been associated with several chronic degenerative disorders; VV at the SNP locus exhibits higher basal superoxide level, while AA exhibits higher basal hydrogen peroxide level as compared with that of the AV genotype. Therefore, we evaluated whether the SOD-SNP could alter cytogenotoxic effects triggered by different PB-concentrations in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PBMCs were obtained from volunteers carrying different SOD2-genotypes, and were cultured with various concentrations of PB. PB effects on AChE inhibition, mortality rate, oxidative stress markers, and DNA damage were assessed. Protein and gene expression of antioxidant enzymes, apoptotic markers (Bax, Bcl-2, caspases 3 and 8) and DNA repair enzyme (DNMT 1) were evaluated in 24 h cultures. In general, PB up-regulated expression of antioxidant enzymes, and did not trigger apoptotic events. However, AA-PBMCs were sensitive to PB exposure, resulting in higher AChE inhibition, cell-mortality, protein carbonylation, and DNA damage, as analysed by the Comet assay. Contrarily, PB demonstrated cytoprotective effects on V-allele cell s. These results indicated that genetic factors that increase HP-release may affect PB efficiency and safety.

**Key Words:** Acetylcholinesterase inhibitor. Superoxide-hydrogen peroxide. Oxidative stress.

## Introduction

The cholinergic system is broadly found in body tissues, and acts mainly at neuromuscular junctions. It has also been found to act on T and B-lymphocytes present in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [1, 2]. The function of this system involves releasing of the neurotransmitter acetylcholine, which is subsequently degraded by the enzyme acetyl cholinesterase (AChE). In certain disorders, such as myasthenia gravis (MG), AChE inhibitors, especially pyridostigmine bromide (PB), trigger a transient accumulation of acetylcholine in the synaptic cleft. Their pharmacological actions can reduce neuromuscular symptoms such as fatigue [3, 4].

In the past, PB was used prophylactically to prevent the negative effects exerted by toxic chemicals used in biological warfare, such as during the Persian Gulf War. However, evidence suggested that soldiers administered PB experienced physiological and psychological side effects; these were potentially associated with interactions between PB and other drugs/toxins, including permethrin, organophosphorus pesticides, and smoke from oil fields [5]. Furthermore, it was suggested that these side effects involve induction of chronic oxidative stress in neural and systemic cells [6, 7, 8]. An *in vitro* study using SHSY-5Y neural cells revealed that PB exposure alone did not trigger extensive oxidative damages [9].

To this date, potential interactions between PB and genetic factors associated with basal chronic oxidative imbalance, such as manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2) single nucleotide polymorphism (Val16Ala-SOD2 SNP, rs4880), are not well-studied. Homozygous genotypes (AA and VV) of this SNP have been consistently associated with basal oxidative stress, inflammatory modulation, and chronic non-transmissible diseases due to an imbalance caused by SOD2 activity in the mitochondria [10, 11, 12]. Therefore, gene polymorphisms at this locus could elicit potential interactions with PB, as prior *in vitro* and *in vivo* studies confirmed the effect of Val16Ala-SOD2 on the actions of certain pharmacological agents [13, 14, 15], bioactive molecules [16, 17], and environmental toxicants [18, 19].

Therefore, we determined the potential influence of Val16Ala-SOD2 SNP on the efficacy of PB AChE inhibition, and examined cyto-genotoxic effects of PB in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different genotypes of this SNP.

## Materials and Methods

### *Chemical reagents and equipment*

All chemicals and solvents used in this study were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, United States). Materials used in cell culture were purchased from Vitrocell-Embriolife (Campinas, São Paulo, Brazil) and Gibco-Life Technologies (Carlsbad, California, United States). Molecular biology reagents were obtained from Qiagen (Hilden, North Rhine-Westphalia, and Germany), Invitrogen (Carlsbad, California, United States), and Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, United States).

The protocols involving biochemical reagents for performing spectrophotometry assays were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, United States). The apoptotic, genotoxic, and antioxidant markers included in the ELISA immunoassay kit was obtained from Abcam (Cambridge, Massachusetts, United States). The equipment used included the SpectraMax i3x Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, United States) and the Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN Biotechnology, Germany).

### *Experimental design*

The present study used an *in vitro* protocol similar to that previously described by Barbisan et al. [12, 14]. PBMCs carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes were exposed to three PB concentrations (20, 40, and 60 ng/mL), which were previously studied in SH-SY5Y cells by Azzolin et al. [20]. The effects of PB on AChE inhibition, cell viability, oxidative metabolism, DNA damage markers, and apoptosis were analyzed for each SOD2 genotype. All assays were performed in triplicates, and results were presented as % of the untreated control group.

### *PBMC collection*

PBMC cultures carrying different Val16AlaSOD2 genotypes were obtained from blood samples of volunteers that participated in a project previously approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (UFSM) (nº

23081.015838 / 2011/10). All volunteers signed a free and informed consent form. Volunteers were chosen from a databank; 120 adult subjects (18 to 35 years old) previously genotyped for Val16AlaSOD were selected. The chosen subjects had similar health, anthropometry, and lifestyles, such as non-smoking, non-obese, no previous history of any chronic degenerative disease or dysfunction, and no habitual use of vitamin supplements that could influence study results.

#### *Genetic protocol of in vitro PBMC culture*

Four healthy carriers of each genotype (VV, AV, AA) were asked to donate blood samples to perform the experiment. Blood was drawn from each volunteer 2-3 times to obtain PBMC samples; assays were performed in triplicates. Subjects were recommended to have an 8-h fast prior to blood draws. Blood samples (20 mL) were collected by venepuncture using EDTA, vials and then transferred to tubes with Ficoll histopaque (1:1). The tubes were centrifuged for 30 min at 252 xg to separate PBMCs from the plasma. PBMCs were further centrifuged (10 minutes at 1.162 xg) and transferred into culture medium containing 2 mL RPMI 1640 with 10% fetal calf serum (FBS) and 1% penicillin / streptomycin [14, 12]. The culture tubes for each subject were prepared at a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells /mL. PBMCs were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h prior to performing the experiments.

#### *Cell cytotoxic assays*

The effect of PB on PBMC viability was indirectly evaluated by trypan exclusion and MTT assays, which estimated cell viability via mitochondrial activity. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) assay was performed as described by Azzolin et al. [9]. Briefly, supernatants of all treatments were removed, and cells were resuspended in phosphate buffer (PBS, 0.01 M; pH 7.4). MTT was dissolved in 5 mg/mL PBS, and was added to a 96-well plate containing the treated samples, which were incubated at 37°C for 1 h. Subsequently, the supernatant was removed from the wells, the cells were resuspended in 200 µL dimethyl sulfoxide (DMSO), and absorbance measured at 560 nm.

### *Immunoassay assays*

The inhibitory effect of PB on AChE, apoptosis markers (BAX- Bcl-2, CASP 3, 8), and antioxidant enzymes (SOD total; glutathione-peroxidase (GPX) and catalase (CAT)) was quantified using the Quantikine Human Immunoassay Kit according to manufacturer's instructions. Briefly, all reagents and working standards were prepared, and excess micro plate strips were removed. The assay diluent RD1W was added (50 µL) to each well. Standards and samples (100 µL) were added into each well, after which the plate was covered with adhesive strips and incubated for 1.5 h at room temperature. Each well was aspirated and washed twice for three washes. The antiserum for each molecule analyzed was added into each well, covered with a new adhesive strip, and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and the caspase-1 conjugate (100 µL) was added into each well and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was again repeated, and 200 mL substrate solution was added into each well and incubated for 20 min at room temperature. Finally, 50 µL stop solution was added into each well, and the optical density was determined within 30 min using a micro plate reader set to 450 nm.

### *Oxidative marker assays*

Dichlorofluorescein diacetate measures the presence of reactive oxygen species (ROS), especially hydrogen peroxide; the ROS level was determined as described previously [21]. Substances reactive to thiobarbituric acid were analyzed, as oxidative stress can damage the cell membranes; the method for evaluating lipid peroxidation was as previously described [22]. Chain fragmentation of carbonylation proteins occurs due to oxidative stress, during which almost all amino acids are released, with frequent production of carbonyl compounds. These forms of damage are measured by determining the formation of carbonyl groups based on reactions with dinitrophenylhydrazine, as previously described [23]. Nitric oxide was assessed by analyzing nitrate levels using the Griess reagent [24].

### *Genotoxicity assays*

The alkaline comet assay for assessing DNA damage was performed according to general specifications described previously [25, 26]. A total of 100 cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to the tail length, and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (cells with no migration) to 400 (cells with maximal migration). The slides were analyzed under blinded conditions (i.e. the status of the participants) by at least two different researchers.

We also evaluated 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) level, which is a DNA damage oxidation product formed by the hydroxyl radical, oxygen, and photodynamic action; following a 24-h treatment, enzyme immunoassay ELISA was performed using the Quantikine® kit, according to manufacturer's recommendations.

### *Gene expression analysis by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)*

Total RNA was extracted using Trizol, following manufacturer's instructions (Ludwing-Biotec, Brazil). Concentration of the extracted RNA was measured with the Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. To perform reverse transcription, Sample RNA was added (1 µg/mL) to reaction mixture with 0.2 µL DNAase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Reaction mixture was incubated at 37°C for 5 min, followed by heating to 65°C for 10 min. Complementary DNA (cDNA) was generated with 1 µL Iscript cDNA and 4 µL of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA). The next steps of PCR were as follows: 10 min at 5°C, 5 min at 25 °C, 5 min at 85°C, with final incubation for 60 min at 5°C. The qRT-PCR was performed in a Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN biotechnology, Germany) with 2× QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN biotechnology, Germany); the thermocycling conditions were as follows: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. A melt curve was generated from 60 °C to 90°C in 0.5°C increments for 5 s at each temperature. All reactions were performed in triplicates, with 1 µM of each primer (Table 1) and 2× QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix; final reaction volume was 20 µL. The beta-actin gene was used as the housekeeping gene [14].

Genes	Primers	
	Sense	Antisense
$\beta$ actina	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTGTC
BAX	CCCTTTCTACTTGCCAGCAA	CCCGGAGGAAGTCCAATGT
BCL-2	GAGGATTGTGCCCTCTTGAGT	AGTCATCCACAGGGCGATGT
CASP 8	AAGGAGCTGCTCTCCGAATT	CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT
CASP 3	TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG	TACCAGTGCCTGGAGAAATGG
DNMT1	AACGGCATCCTGTACCGAGTT	CCTTCCGTGGCGTTTC
SOD1	GCACACTGGTGGTCCATGAA	ACACCCACAAGCCAACGACTT
SOD2	GCCCTGGAACCTCACATCAA	GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT
CAT	GATAGCCTCGACCCAAGCA	ATGGCGGTGAGTGTCAAGGAT
GPX	GGTTTTCATCTATGAGGGTGTTC	GCCTTGGTCTGGCAGAGACT

**Table 1.** Gene primers list.

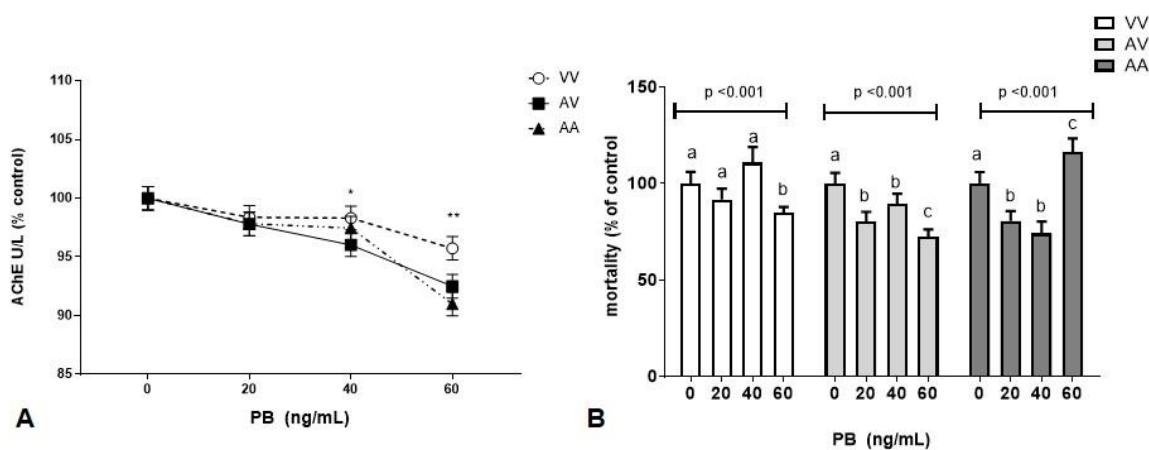
### Statistical analysis

All data were transformed into percentages in relation to the negative control group. Results were statistically analyzed by two-way analysis of variance followed by a *post-hoc Tukey's test*, using the GraphPad software (GraphPad Prism software, version 7.0, 2017). P ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

Initially, the inhibitory effect of PB on AChE was analyzed in all PBMC samples without differentiating between various Val16Ala-SOD2 genotypes. Low PB concentration (20 ng/mL) did not elicit AChE inhibition when compared with the untreated control group ( $98.1 \pm 2.2\%$  of control group). Intermediate PB concentration (40 ng/mL) inhibited the AChE enzyme, though the effect was small ( $97.3 \pm 1.2\%$  of control group); high PB concentration (60 ng/mL) was able to induce significant and consistent AChE inhibition ( $93.1 \pm 2.3\%$  of control group). From this first analysis, the potential effect of Val16Ala-SOD2 SNP on AChE inhibition was evaluated (Figure 1A). At 60 ng/mL, the inhibitory effect of PB on AChE was greater in AA and AV as compared with that on VV-PBMCs.

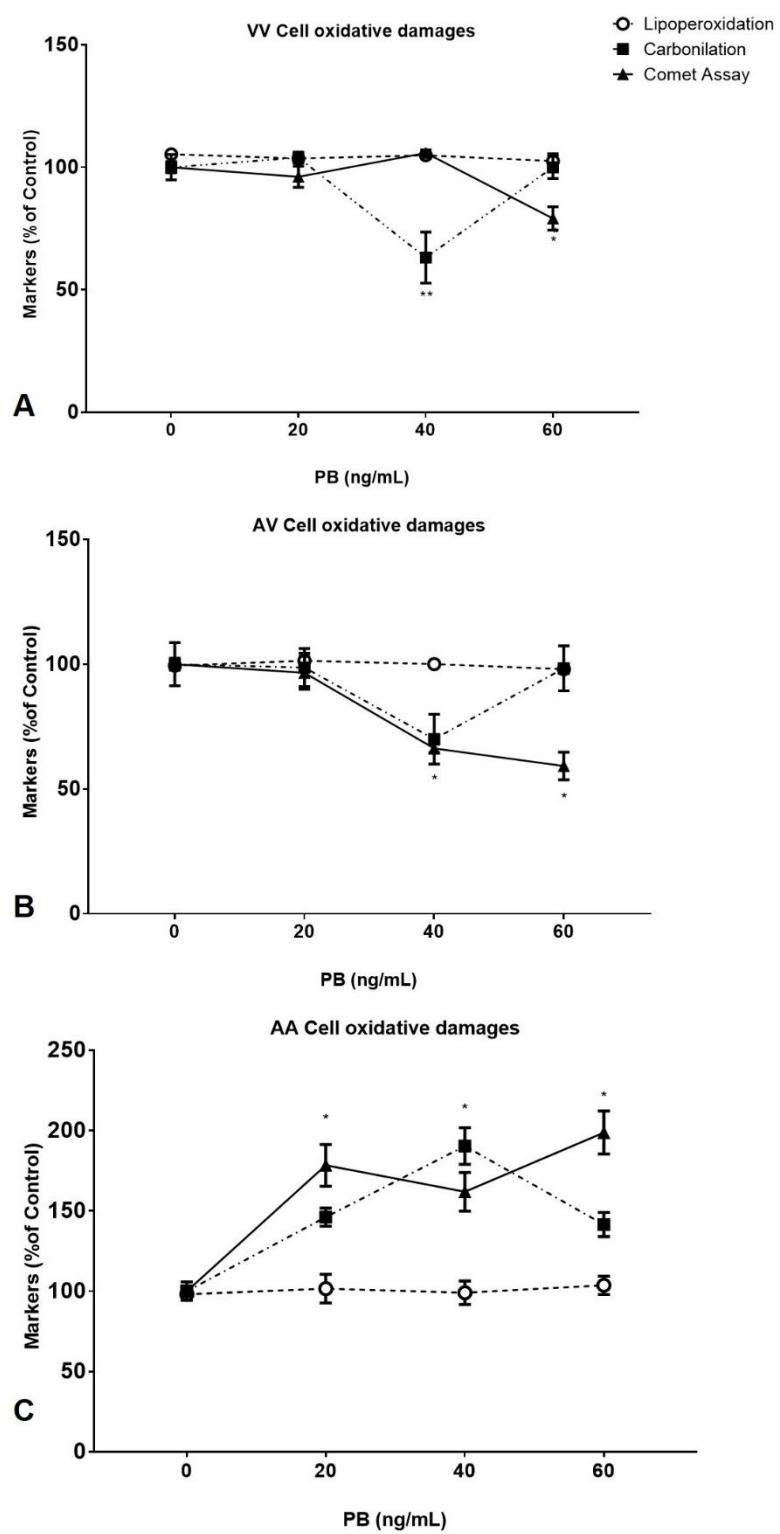
The effects of PB on the cell death rate were also found to differ (Figure 1B) between various Val16Ala-SOD2 genotypes. In VV-cells, higher PB concentration (60 ng/mL) induced cytoprotective effects, as cell mortality was found to be reduced as compared with that in the control group. This cytoprotective effect was also observed in AV-cells exposed to all PB concentrations tested here; however, this effect was magnified at 60 ng/mL PB. In AA-cells, PB induced hermetic effects, with cytoprotective effects observed at low and intermediate PB concentrations (20 and 40 ng/mL); cytotoxic effect was observed at high PB concentration (60 ng/mL).



**Figure 1-** Effect of pyridostigmine bromide (PB) in 24 h peripheral blood mononuclear cells carrying different Val16AlaSOD2 genotypes. (A) PB action on acetylcholinesterase (AChE) activity inhibition. (B) PB action on PBMCs mortality rate, as determined by ds-DNA supernatant levels quantified with the DNA Picogreen® fluorescent dye. Results are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by two-way analysis of variance, followed by the *pos-hoc* Tukey test. Different letters denote significant differences at  $p \leq 0.05$  among treatments. The assays were performed in triplicates.

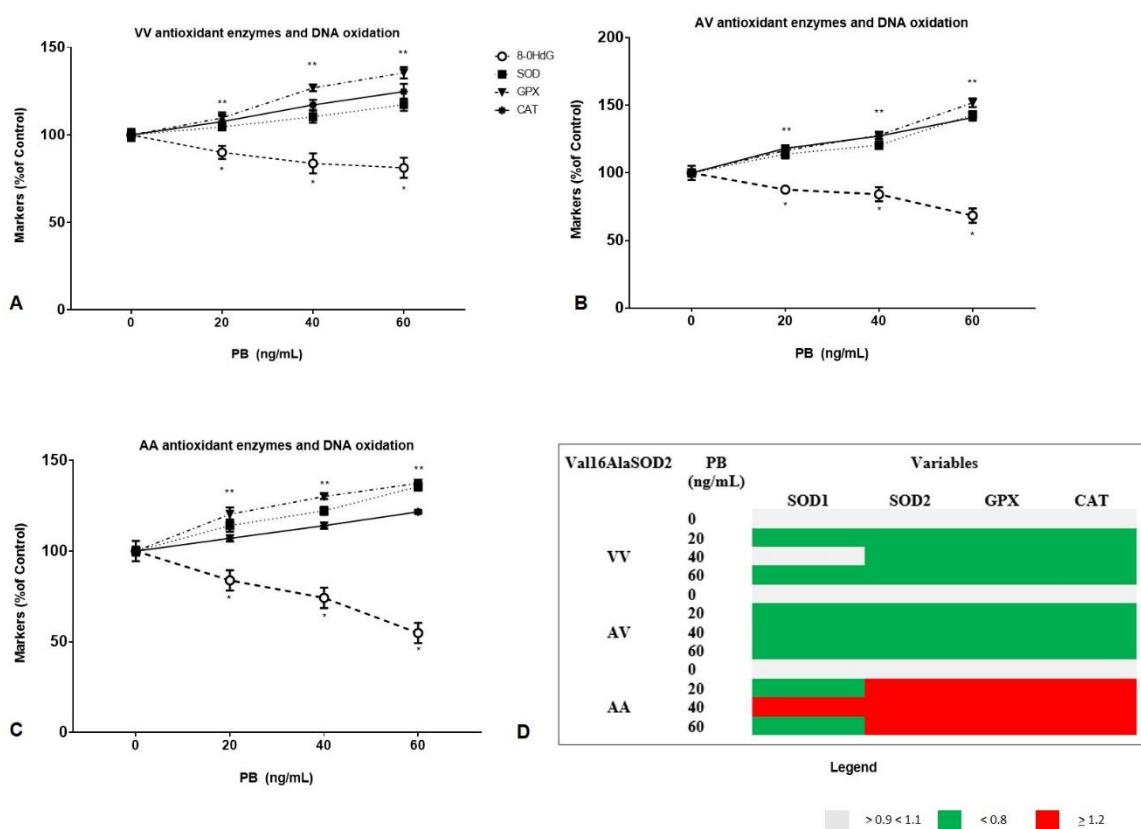
The influence of PB on the oxidative metabolism of PBMCs in 24-h cell cultures were also analyzed, and results are presented in Figure 2. Initially, PB-induced changes in ROS and nitric oxide were evaluated. However, this drug did not present any direct influence on these oxidative markers, and this result was independent of Val16Ala-SOD2 genotypes (data not shown). Indicators of oxidative damage by PB exposure were also determined and compared among genotypes. While PB did not affect lipoperoxidation levels in all genotypes, protein carbonylation and genotoxicity evaluated by the comet assay were significantly influenced by this drug in a Val16Ala-SOD2 genotype-dependent manner.

PB demonstrated hermetic effects on protein carbonylation in VV-cells, as intermediate level of PB (40 ng/mL) decreased levels of oxidative markers as compared with those in the control group; at higher PB concentrations, this protective effect was lost. Reduced DNA damage was observed in VV-cells exposed to higher PB concentration (Figure 2A). The effect of PB on AV-cells was similar to that on VV-cells; however, 40 ng/mL PB was found to be genoprotective, which was maintained at 60 ng/mL (Figure 2B). In contrast, AA- cells showed increased protein carbonylation and DNA damage when exposed to all PB concentrations (Figure 2C).



**Figure 2-** Effect of pyridostigmine bromide (PB) on lipoperoxidation, carbonylation of proteins, and DNA damage in 24 h peripheral blood mononuclear cell cultures, as determined by the comet assay. (A) genotype VV-SOD2. (B) AV-SOD2. (C) AA-SOD2. Results are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by two-way analysis of variance, followed by the pos-hoc Tukey test.

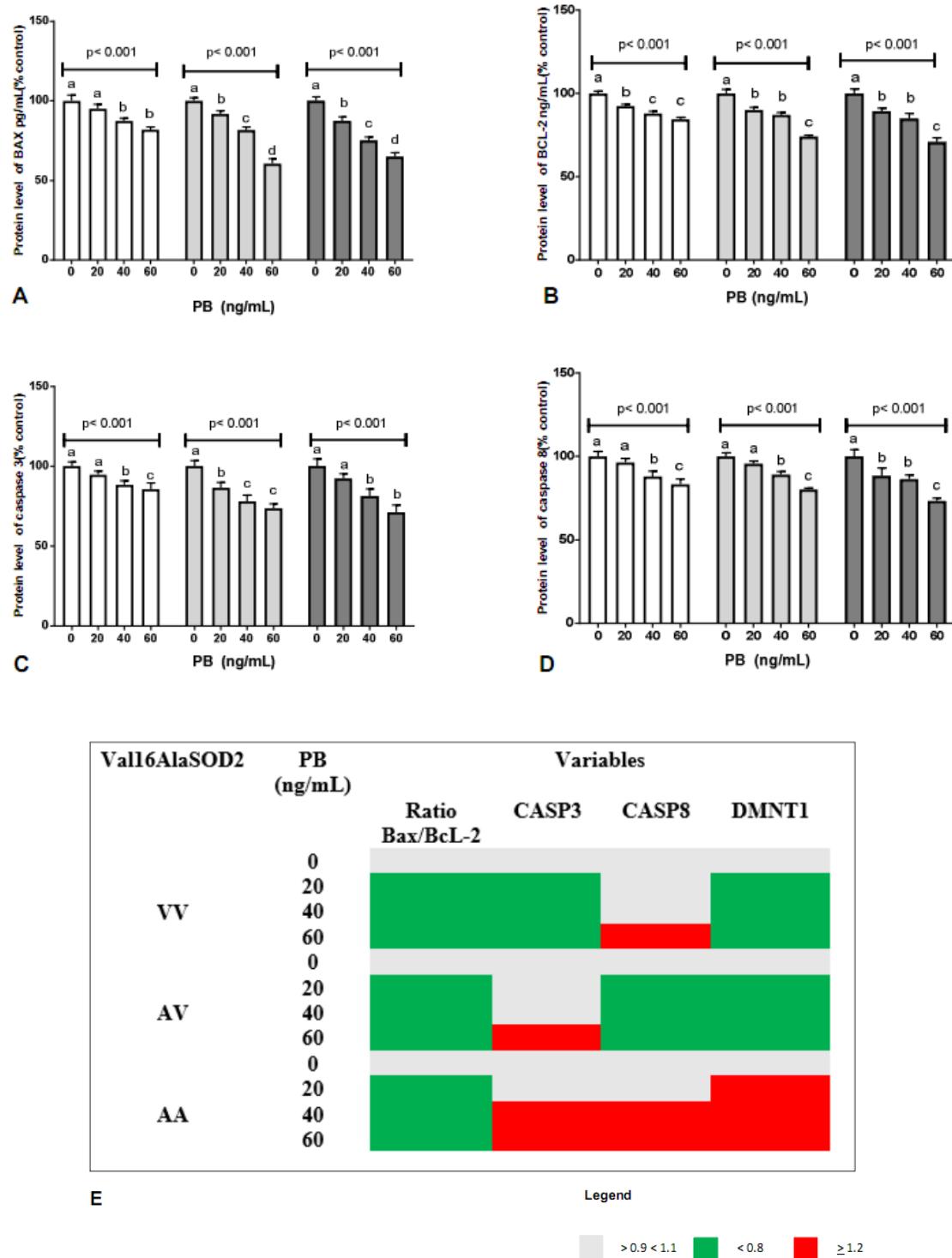
Antioxidant enzyme levels were significantly increased in all PB-exposed PBMCs, independent of Val16Ala-SOD2 genotypes (Figure 3). On the other hand, reduction in levels of 8-deoxyguanosine, a DNA oxidative marker, was observed in all cells. Gene expression analysis showed that in V-allele cells, PB triggered down-regulation of SOD1, SOD2, CAT, and GPX genes, whereas in AA-cells, up-regulation of these antioxidant enzyme genes was observed (Figure 3D).



**Figure 3-** Effect of PB on the action of antioxidant enzymes and 8OHdG DNA damage marker in PBMC with different Val16AlaSOD2 genotypes. Activity and expression level of these enzymes were assessed. (A) genotype VV-SOD, 8OHdG, and activity of SOD, GPX, and CAT. (B) genotype AV-SOD, 8OHdG, and activity of SOD, GPX, and CAT. (C) AA-SOD, 8OHdG genotype, and SOD, GPX, and CAT activity. (E) Gene expression analysis of antioxidant enzymes. Results are represented as mean ± standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by analysis of variance, followed by the *post-hoc* Tukey test.

A potential consequence of oxidative stress and extensive genotoxic effect is cell death by apoptosis. The potential effect of PB on DMNT1, a DNA repair enzyme and apoptotic molecule markers was examined in PBMCs carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes. PB exposure significantly decreased levels of BAX, caspases 3, and 8 pro-apoptotic molecules. Furthermore, it also decreased levels of the anti-apoptotic Bcl-2 protein independent of Val16Ala-SOD2 genotypes and PB concentrations (Figures 4 A-D). Interestingly, PB differentially modulated gene expressions of these proteins based on SOD2 genotypes; VV-cells showed down-regulation of all these genes, with the exception of caspase 8, which maintained similar gene expression levels to control cells when 20 and 40 ng/mL PB was added. However, PB at 60 ng/mL triggered up-regulation of caspase 8 gene. Similar results were obtained with VV cells; however, caspase 3 expression was also altered in these cells.

AA-cells showed gene up-regulation of caspases 3 and 8 when exposed to all PB concentrations. These cells also presented upregulation of the DNA repair enzyme, DMNT 1.



**Figure 4-** Cell apoptosis and expression of the DNMT1 DNA repair gene at different PB concentrations in PBMCs of different Val16AlaSOD2 genotypes. Protein expression levels of BAX (A), BCL-2 (B), caspase 3 (C), and caspase 8 (D) were determined. (E) Analysis of gene expression. Results are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by the *pos-hoc* Tukey test. Different letters identify significant differences at  $p \leq 0.05$  among treatments. The assays were performed in triplicates.

## Discussion

The present investigation evaluated whether a basal chronic oxidative state associated with Val16Ala-SOD2 SNP may have some influence of PB cyto-genotoxicity modulation. To perform this study, PBMCs from volunteers carrying different SOD2 genotypes were collected, since these mononuclear immune cells, especially lymphocytes, demonstrate AChE activity [2]. Our results indicated that this polymorphism can affect PB activity on PBMCs, and trigger differential cyto-genotoxicity among various Val16Ala-SOD2 genotypes.

In general, A allele-cells were more responsive to AChE inhibition as compared with VV-cells. AA-cells especially presented higher number of cyto-genotoxic markers as compared with V-allele cells when exposed to PB. Based on these results, it is important to explore the biological plausibility that an SNP changes basal oxidative status, which could contribute to changes in PB-induced cell-toxicity. Furthermore, it is important to determine the functional role of Val16Ala-SOD2 that could affect PBMC sensitivity to PB exposure.

Chemical hypersensitivity to organophosphate and AChE inhibitors is well-established, and is associated with distinct toxic and neurotoxic effects. In general, these effects are dependent on the frequency and dose of exposure, chemical type of the drug, and endogenous host factors that can exert some influence on susceptibility and sensitivity [27]. Endogenous factors are mostly associated with genetic variations, but studies that have evaluated potential associations between SNPs and hypersensitive to PB are few in numbers. In fact, we were only able to identify a single investigation that described acute sensitivity to PB is associated with a polymorphism found in the AChE promoter region [28].

Studies conducted on Gulf War veterans and agricultural workers revealed polymorphism in the paraoxonase (PON1) gene, which produces an enzyme that hydrolyses aryl esters, lactones, and organophosphates. Subjects with reduced ability to catalyze organophosphates were more susceptible to side effects and neuromorbidities associated with organophosphorus exposure [29, 30, 31]. Unfortunately, we were not able to find previous studies that investigated SNPs presents in antioxidant enzyme genes, and their effect on PB exposure.

Despite the lack of evidence of the association between antioxidant SNPs and PB sensibility, a large number of studies have described the potential role of oxidative

stress in clinical symptoms found in veterans of the 1991 Gulf War. Some veterans presented health complaints after returning from the war, which included fatigue, memory problems, and debilitating moods more than two decades later. It was proposed that such symptoms were due to synergistic effect of various chemicals, including pesticides and PB drug [32, 33, 34, 35, 36, 37, 4, 5].

Studies have confirmed this hypothesis via the development of a Gulf War Illness (GWI) model; rats were exposed daily to BP, N,N-diethyl-m-toluamide (DEET), and permethrin, and were subjected to 5 minutes of restraint stress for 28 days. Important alterations in chronic oxidative stress response, inflammation, and mitochondrial dysfunction were observed in the hippocampus of these animals [8]. Another study conducted by Kodali et al. [38] using the same GWI model showed important improvements in cognitive and mood function when rats were treated with curcumin, a bioactive antioxidant and anti-inflammatory molecule.

Exercises that cause a transient alteration in the redox balance seem to exert influence on PB toxicity via differential modulation of antioxidant enzymes. For example, Jagannathan et al. [39] showed that in adult male mice, 10 weeks of exercise with concomitant PB treatment amplified oxidative damage in skeletal muscles. Based on these study results, we postulated that Val16Ala-SOD2 SNP could have an effect on PB toxicity.

However, before we highlight differences in PB cyto-genotoxicity among PB different SOD2-genotypes, it is important to consider opposing data that demonstrated similar responses in PB-treated PBMCs independent of Val16Ala-SOD2 genotypes. We did not find differences in ROS and nitric oxide levels in 24-hour cell cultures exposed to PB at different concentrations. However, we observed an increase in all antioxidant enzyme levels, with concomitant decrease in DNA-oxidation levels, as determined by quantification of 8-deoxyguanosine. Moreover, our results indicated no occurrence of intrinsic apoptosis facilitated by *Bax/Bcl-2* proteins, which was further confirmed by gene expression analysis. Caspases 3 and 8 are active in both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, and protein levels of these molecules were decreased in PB-exposed cells, which suggested that apoptotic events are not affected by PB in PBMCs. However, maximum PB concentration should be  $\leq$  80 ng/mL, as both Li et al. [40] and Azzolin et al. [20] showed that higher PB concentrations could trigger apoptotic events.

These study results suggested that PB triggers transient alterations in PBMC redox balance, which is compensated by modulation of all endogenous antioxidant enzymes, and a concomitant reduction of DNA-oxidation levels in cells. However, it is probable that compensatory events have a certain threshold, which when exceeded, results in PB-induced cytotoxicity. It is also possible that interactions between PB and other chemical or physical variables could decrease the non-toxic threshold of PB, thus exacerbating its toxic effects. This may explain why AA-PBMCs are more sensitive to PB exposure.

In fact, our results showed that AA-PBMCs were more sensitive to PB exposure as compared with AV and VV cells. These cells presented higher mortality rate when exposed to PB at 60 ng/mL; V-allele cells remained viable at such PB concentration. AA-PBMCs also demonstrated greater protein carbonylation and DNA damage when exposed to all PB concentrations. In general, PB triggers alterations in redox balance, as shown by increased antioxidants in PBMCs during PB exposure, and decreased DNA oxidation levels quantified by 8-deoxyguanosine. While this pattern was observed in all SOD2 genotypes, antioxidant genes were down-regulated in VV- and AV-cells, and up-regulated in AA-cells. AA-cells also showed upregulation of all apoptotic genes when exposed to PB at 40 and 60 ng/mL. The DNA repair enzyme gene was also up-regulated in these cells when exposed to all PB concentrations.

In order to investigate the high PB sensitivity of AA-cells, it is important to determine the structural and functional specifics of the Val16Ala-SOD2 SNP. SOD2 is a nuclear gene, and is initially produced as a non-active protein. It contains a small peptide region (mitochondrial target sequence, MTS) that triggers translocation to the mitochondria, where it finally becomes active. The MTS-region is located on the SOD2 SNP studied here, and causes a T to C substitution at codon 16; this changes valine (V) to alanine (A) in the SOD2-protein. This substitution triggers a conformational modification in the inactive SOD2 protein; the SOD2-beta sheet form is produced in the presence of the V-allele, and the SOD2-alpha helix form is produced in the presence of the A-allele [10]. This conformational modification compromises the ability of SOD2 to neutralize superoxide radicals, since A-SOD2 can ingress more efficiently into the mitochondria as compared with V-SOD2, as shown by Shimoda-Matsubayashi et al. [41]. Therefore, the A-allele is associated with a 40% increase in enzyme efficiency as compared with the V-allele.

While the A-allele increases SOD2 activity, its phenotype is not completely beneficial to cells, since the high superoxide radical (S) dismutation rate in hydrogen peroxide (HP) is not balanced by an increase in GPX enzyme, which reduces free HP to water. As a result, Val16Ala-SOD2 triggers a basal oxidative imbalance, where the VV-genotype is associated with higher S levels and the AA-genotype is associated with higher HP levels. As HP is a membrane-soluble molecule, it can easily enter the cytoplasm and react with metals such as Fe to produce other dangerous ROS. One such species is the hydroxyl radical, which has high affinity for DNA, and can cause extensive oxidative damages [10].

For this reason, data from multiple studies have associated the A-allele and the AA-genotype with risk of certain cancer types, such as prostate, breast, Non-Hodgkin lymphoma, lung cancer, and colorectal cancer [11, 42, 43]. Moreover, studies suggested that A/A- PBMCs variants may be more sensitive to cyto-genotoxicity triggered by environmental pollutants such UV-exposure [44], meth mercury-exposure [18], static magnetic fields-exposure [19], as well as some drugs and bioactive molecules [13, 14, 15, 16, 17].

Based on this evidence, it is possible to infer that the higher HP levels in AA-cells may be associated with an increase in efficacy of PB-mediated AChE inhibition and PB-induced cyto-genotoxic effects. Cells upregulate endogenous antioxidant defenses during PB exposure; V-allele cells are more sensitive to PB toxicity as compared with AA-cells.

On the other hand, it is important to explore the cytoprotective effects of PB on VV and AV-cells; we observed that PB reduced cell mortality, mostly at a concentration of 60 ng/mL. Moreover, it did not affect or improve protein carbonylation and state of DNA damage in these cells. In general, PB exposure triggers downregulation of antioxidant and apoptotic genes as well as a DNA repair enzyme gene. Again, it is important to consider the role of V-allele on SOD2 function. In fact, S imbalance is expected to be present in VV cells due to low SOD2 activity [10].

Polymorphism in the SOD2 gene was suggested to explain the link between V/VV variants and risks to metabolic diseases such as obesity [45], hypercholesterolemia [46], as well as certain diabetes mellitus type 2 complications [47, 48]. This genotype also seems to affect response to certain hypolipidemic drugs, such as Rosuvastatin [15]. Potential mechanisms that underlie the association between the VV variant and morbidities may involve alterations in chronic inflammatory

patterns [12]; reactions between excess S anions and nitric oxides can lead to oxidative damages such as membrane lipoperoxidation, which is a pro-inflammatory condition [49]. As a result, V-allele genotypes may be a cytoprotective factor during PB exposure.

In summary, our study demonstrated that PB can transiently modulate redox metabolism in cells. However, factors that increase HP levels, such as the AA-SOD2 genotype, may affect PB efficiency and efficacy by inducing AChE inhibition and oxidative stress. Data from these *in vitro* studies may be useful for complementing population studies investigating PB or other AChE inhibitors.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the CNPq (Nos. 402325/2013-3; 490760/2013-9; 311446/2012-4), FAPERGS, FAPEAM, and CAPES for grants and fellowships.

### Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the article.

### References

- [1] Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, et al. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neurosci Lett.* 1999;266(1):17–20.
- [2] Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci.* 2017;134(1):1–21.
- [3] Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, et al. Myasthenia gravis - autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(5):259–268.

- [4] White RF, Steele L, O'Callaghan JP, et al. Recent research on Gulf War illness and other health problems in veterans of the 1991 Gulf War: Effects of toxicant exposures during deployment. *Cortex*. 2016;74:449–475.
- [5] Sullivan K, Krengel M, Bradford W, et al. Neuropsychological functioning in military pesticide applicators from the Gulf War: Effects on information processing speed, attention and visual memory. *Neurotoxicol Teratol*. 2018;65:1–13.
- [6] Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Combined exposure to sarin and pyridostigmine bromide increased levels of rat urinary 3-nitrotyrosine and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, biomarkers of oxidative stress. *Toxicol Lett*. 2001;123(1):51–58.
- [7] Abou-Donia MB, Suliman HB, Khan WA, et al. Testicular germ-cell apoptosis in stressed rats following combined exposure to pyridostigmine bromide, N,N-diethyl m-toluamide (DEET), and permethrin. *J Toxicol Environ Health A*. 2003;66(1):57–73.
- [8] Shetty GA, Hatiangady B, Upadhyay D, et al. Chronic oxidative stress, mitochondrial dysfunction, Nrf2 activation and inflammation in the hippocampus accompany heightened systemic inflammation and oxidative stress in an animal model of Gulf War illness. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:182.
- [9] Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol In Vitro*. 2016;32:8–15.
- [10] Bresciani G, Cruz IB, de Paz JA, et al. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res*. 2013;47(10):781–792.
- [11] Bresciani G, da Cruz IB, González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv Clin Chem*. 2015;68:87–130.

- [12] Barbisan F, Azzolin VF, Ribeiro EE, et al. The in vitro influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence. *Rejuvenation Res.* 2017;20(4):334–335.
- [13] Costa F, Dornelles E, Mânicá-Cattani MF, et al. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reprod Biomed Online.* 2012;24(4):474–481.
- [14] Barbisan F, Motta Jde R, Trott A, et al. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One* 2014; 9(10):e107299.
- [15] Duarte T, Da Cruz IB, Barbisan F, et al. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytic blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism. *Pharmacogenomics J.* 2016;16(6):501–506.
- [16] Capeleto D, Barbisan F, Azzolin V, et al. The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. *Biogerontology.* 2015;16(5):621–630.
- [17] Schott KL, Assmann CE, Barbisan F, et al. Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. *Chem Biol Interact.* 2017;273:18–27.
- [18] Algarve TD, Barbisan F, Ribeiro EE, et al. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. *Genet Mol Res.* 2013;12(4):5134–5144.
- [19] Dornelles EB, Goncalves BD, Schott KL, et al. Cytotoxic effects of moderate static magnetic field exposure on human periphery blood mononuclear cells are influenced by Val16Ala-MnSOD gene polymorphism. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017;24(5):5078–5088.

- [20] Azzolin VF, Barbisan F, Lenz LS, et al. Effects of Pyridostigmine bromide on SH-SY5Y cells: An in vitro neuroblastoma neurotoxicity model. *Mutat Res.* 2017;823:1–10.
- [21] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231–255.
- [22] Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(2):251–256.
- [23] Morabito F, Cristani M, Saija A, et al. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediators Inflamm.* 2004;13(5-6):381–383.
- [24] Choi WS, Shin PG, Lee JH, et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol.* 2012;280(2):164–170.
- [25] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 75(1):184–191.
- [26] Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem.* 2001;49(9):1183–1186.
- [27] Mangas I, Vilanova E, Estévez J. Phenyl valerate esterase activity of human butyrylcholinesterase. *Arch Toxicol.* 2017;91(10):3295–3305.
- [28] Shapira M, Tur-Kaspa I, Bosgraaf L, et al. A transcription-activating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases. *Hum Mol Genet.* 2000;9(9):1273–1281.

- [29] Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, et al. Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med.* 2003; 54:371–392.
- [30] Rose RL, Tang J, Choi J, et al. Pesticide metabolism in humans, including polymorphisms. *Scand J Work Environ Health.* 2005;31 Suppl 1:156–163.
- [31] Mackenzie Ross SJ, Brewin CR, Curran HV, et al. Neuropsychological and psychiatric functioning in sheep farmers exposed to low levels of organophosphate pesticides. *Neurotoxicol Teratol.* 2010;32(4):452–459.
- [32] Fukuda K, Nisenbaum R, Stewart G, et al. Chronic multisymptom illness affecting Air Force veterans of the Gulf War. *JAMA.* 1998;280(11):981–988.
- [33] Proctor SP, Heeren T, White RF, et al. Health status of Persian Gulf War veterans: self-reported symptoms, environmental exposures and the effect of stress. *Int J Epidemiol* 1998;27(6):1000–1010.
- [34] Unwin C, Blatchley N, Coker W, et al. Health of UK servicemen who served in Persian Gulf War. *Lancet.* 1999;353(9148):169-178.
- [35] Steele L. Prevalence and patterns of Gulf War illness in Kansas veterans: association of symptoms with characteristics of person, place, and time of military service. *Am. J. Epidemiol.* 2000;152(10):992–1002.
- [36] White RF, Proctor SP, Heeren T, et al. Neuropsychological function in Gulf War veterans: Relationships to self-reported toxicant exposures. *Am J Ind Med.* 2001;40(1):42–54.
- [37] Sullivan K, Krengel M, Proctor SP, et al. Cognitive functioning in treatment-seeking Gulf War veterans: Pyridostigmine bromide use and PTSD. *J Psychopathol Behav Assess.* 2003;25(2):95–103.

- [38] Kodali M, Hatiangady B, Shetty GA, et al. Curcumin treatment leads to better cognitive and mood function in a model of Gulf War Illness with enhanced neurogenesis, and alleviation of inflammation and mitochondrial dysfunction in the hippocampus. *Brain Behav Immun.* 2018;69:499–514.
- [39] Jagannathan R, Husain K, Somani SM. Interaction of pyridostigmine and physical stress on antioxidant defense system in skeletal muscle of mice. *J Appl Toxicol.* 2001;21(4):341–348.
- [40] Li L, Shou Y, Borowitz JL, et al. Reactive oxygen species mediate pyridostigmine-induced neuronal apoptosis: Involvement of muscarinic and NMDA receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;177(1):17–25.
- [41] Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, et al. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 226(2):561–565.
- [42] Kang JH, Park YD, Lee CH, et al. Primary mantle cell lymphoma of the nasopharynx: A rare clinical entity. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2015;81(4):447–450.
- [43] Li X, Chen F, Zhu Q, et al. Gli-1/PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B pathway mediates resistance to radiation and is a target for reversion of responses in refractory acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget.* 2016;7(22):33004–33015.
- [44] dos Santos Montagner GF, Sagrillo M, Machado MM, et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol Vitro.* 2010;24(5):1410–1416.
- [45] Montano MA, Barrio Lera JP, Gottlieb MG, et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Mol Cell Biochem.* 2009;328(1-2):33–40.

- [46] Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem*. 2010;43(13-14):1118–1123.
- [47] Papatheodorou K, Papanas N, Banach M, et al. Complications of Diabetes 2016. *J Diabetes Res*. 2016;2016:6989453.
- [48] Huang D, Refaat M, Mohammedi K, et al. Macrovascular complications in patients with diabetes and prediabetes. *Biomed Res Int*. 2017;2017:7839101.
- [49] Kalousová M, Zima T, Tesar, V. et al. Advanced glycation products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mut Res*. 2005;579(102):37–46.

**Artigo 3****Superoxide-hydrogen peroxide imbalance in the cyto-genotoxicity of neural  
cells associated with Pyridostigmine Bromide**

Veronica Farina Azzolin<sup>a</sup>, Fernanda Barbisan<sup>b</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>a</sup>, Beatriz Sadigursky<sup>c</sup>, Moisés Henrique Mastella<sup>b</sup>, Thiago Duarte<sup>a</sup>, Raquel de Souza Praia<sup>d</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>d</sup>, Marta Maria Frescura Medeiros Duarte<sup>c</sup>, Ivana Beatrice Mânic da Cruz<sup>a,b,c\*</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>b</sup> Postgraduate Program of em Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>d</sup> Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil.

**\* Corresponding author:**

Address for correspondence and reprints: Ivana Beatrice Mânic da Cruz, MSc, PhD, Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Avenue Roraima 1000, Building 19, Chamber 3102, Santa Maria, RS, Brazil, Zip Code 97105-900. Phone: 55-55-91199099; Fax: 55-55-32208239; Email: ivana.ufsm@gmail.com.

## Abstract

Pyridostigmine bromide (PB) is an acetylcholinesterase enzyme (AChE) inhibitor used to treat Myasthenia gravis (MG) and to avoid poisoning by some toxicants exposure of Persian Gulf War soldiers. However, its use seems to contribute to development of Gulf War Illness (GWI) in some soldiers, possibly triggered by PB interaction with other drugs that causes systemic oxidative stress. Therefore, PB negative effects could be also influenced by some basal oxidative imbalance associated with genetic factors, as triggered by a single nucleotide polymorphism (SNP) located in the superoxide dismutase manganese dependent (Val16Ala-SOD, rs4880). Both homozygous genotypes (AA and VV) present a basal superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance. To test this hypothesis was performed an *in vitro* analysis of interaction between S-HP imbalance on PB on SHSY-5Y neural cells. A pharmacological S-HP imbalance assay was created to obtain AA-like cells presenting higher HP levels and VV-like cells presenting higher S levels, that were subsequently exposed to PB at different concentrations. Results showed that interaction between PB and S-HP imbalance decreased cellular viability increasing DNA damage levels in AA-like cells. Analysis of BAX, BCI-2, caspases 3 and 8 gene and protein modulation suggested that cytotoxic effect on neural cells did not involve intrinsic or extrinsic apoptotic suggesting occurrence of other cellular dead processes. VV-cells presented higher AChE levels than balanced-cells, and lower efficacy in the inhibition of this enzyme by PB-exposure. Therefore, the interaction between PB and S-HP imbalance could have some role on GWI development and occurrence of side effects in some MG patients.

**Key Words:** Superoxide Dismutase. Stress Oxidative. Paraquat. Porphyrin.

## 1. Introduction

Due reversible inhibitory effects on acetylcholinesterase (AChE) enzyme, a drug named Pyridostigmine bromide (PB) is commonly used to treat symptoms of some neuromuscular junction morbidities, mainly myasthenia gravis (MG) (Gilhus, 2016; White et al., 2016). However, interaction of PB with other chemical agents seems to trigger important cell dysfunctions and cyto-genotoxicity. This presumption is based in the PB use as a prophylactic drug against soldier's exposure to toxic molecules, such as sarin gas, permethrin and uranium gas in the Persian Gulf War. However, about 30% of soldiers that served during 1990-1991 period and were treated with PB (60 mg/day), developed chronic multi-symptom illness not currently diagnosed by standard medical or laboratory test known as Gulf War Illness (GWI). Some symptoms indicated neuronal disturbs, such as headaches, cognitive dysfunction, and memory loss (White et al., 2016; Sullivan et al., 2018).

Interaction between PB and other chemical agents has been postulated as possible GWI an etiologic. In fact, results from experimental models have corroborated this hypothesis. However, PB contribution in GWI seems to be triggered just in the present of toxicant drugs, since the *in vitro* study performed by Azzolin et al. (2017) showed no PB cytotoxic and genotoxic effect on neural cells (SHSY-5Y) just PB-exposed in  $\geq 60$  ng/mL concentrations.

Another possible causal mechanism involved with GWI development could be PB interaction of genetic variations related to differential modulation of some body functions. This hypothesis was tested from case-control studies involving some single nucleotide polymorphisms (SNP) related to hydrolysis of organophosphate pesticides (OP) and nerve gases by serum paraoxonase (PON1) (Mackness et al., 1997; La Du et al., 2001; Costa et al., 2003), detoxifying cytochrome P450 enzymes (McKeown-Eyssen et al., 2004) and also neuromodulation (Schulz-Heik et al., 2011; Young et al., 2018). However, results not showed consistent influence of the SNPs tested with GWI symptomatology.

Actually, experimental studies suggested that main causal mechanism associated to negative effects triggering by PB interaction with chemical toxicants would be occurrence of extensive oxidative stress associated to GWI (Li et al., 2001; Abou-Donia et al., 2003; Sullivan et al., 2018). In this way, could be possible that basal

oxidative imbalance associated with some human SNPs could have some influence on PB role on GWI development. This is the case of a SNP located in the manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2) gene (rs4880) that has been associated with risk of several chronic non-transmissible diseases (CNTDs) such as cancer and cardiometabolic morbidities (Bresciani et al., 2013, 2015).

In metabolic terms, SOD2 is an enzyme that acts just into mitochondria despite to be synthetized from a nuclear gene. The Val16Ala SOD2 SNP results in three different genotypes VV, AA and AV due a change in the 16-codon of a T to C nucleotide triggering a substitution of a Valine to Alanine amino acid. This substitution causes a modification in the SOD2-protein conformation that affect transit of this enzyme into mitochondria (Bresciani et al., 2013). V-allele produces a beta-sheet SOD2 protein that stay partially arrested in the mitochondrial membrane leading to lower SOD2-enzymatic levels. In consequence, VV-genotype has been associated to higher basal superoxide anion (S) levels. On the other hand, A-allele produces an alpha-helix SOD2 protein leading to a greater availability of this enzyme inside the mitochondria. In consequence, AA-genotype presents higher SOD2 levels that increase dismutation rates of superoxide (S) in hydrogen peroxide (HP). However, high HP levels is not accompanied by the increase in levels of the enzyme glutathione peroxidase (GPX) enzyme that catalyzes HP in water and oxygen.

Therefore, both homozygous genotypes present a basal S-HP oxidative imbalance. In addition to increasing the CNTDs risk, previous *in vivo* and *in vitro* studies have suggested that SOD2 SNP could affect efficacy and or safety response of some chemical pharmacological or nutritional molecules (Costa et al., 2012; Algarve et al., 2013; Barbisan et al., 2014; Capeleto et al., 2015; Berto et al., 2015; Azzolin et al., 2016; Duarte et al., 2016; Barbisan et al., 2018). A recent investigation performed by Azzolin et al (2018) also suggested that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes affect PB cyto-genotoxic effects. In general, PB up-regulated antioxidant enzymes and did not trigger apoptosis events. However, specific analysis of SOD2 genotypes showed that AA-PBMCs were very sensitive to PB exposure, whereas PB presented a cyto-genoprotective effect on V-allele cells.

From these results, we postulated here that S-HP imbalance associated to Val16Ala-SOD2 SNP could interact with PB-response and change cytotoxicity and AChE inhibitory effect of SHSY-5Y neural cells that in the undifferentiated state present

cholinergic phenotype. To test this hypothesis, we developed an *in vitro* pharmacological S-HP imbalance assay using as experimental model no-differentiated SHSY-5Y neural cell lines to create VV-like and AA-like cells that were subsequently PB exposed.

## 2. Methods

### 2.1 Chemical reagents and equipment

All chemicals and solvents used in this study were from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, United States), MnTBAP (Porphyrin) was from Merck Millipore (Billerica, MA, USA). Materials used in cell culture were purchased from Vitrocell-Embrionlife (Campinas, São Paulo, Brazil) and Gibco-Life Technologies (Carlsbad, California, United States). Molecular biology TED MAN reagents were obtained from Qiagen (Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany), Invitrogen (Carlsbad, California, United States), and Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, United States).

The protocols involving the biochemical reagents for performing the spectrophotometry assays were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, United States). The apoptotic, genotoxic and antioxidant markers marked by ELISA immunoassay kit obtained from Abcam (Cambridge, Massachusetts, United States).

The equipment used SpectraMax i3x Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, United States), Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN biotechnology, Germany).

### 2.2 Experimental design

An *in vitro* investigation using human neuroblastoma cells (SHSY-5Y) were obtained from the American Type Cell Culture Collection (ATCC CRL-2266) was performed in controlled conditions. S-HP imbalance by pharmacological induction follow similar protocol previously described by Azzolin et al (2016), adapted to neuroblastoma cells. Briefly, cells were exposed to paraquat and porphyrin at different concentrations in order to generate a superoxide and hydrogen peroxide imbalance and association with PB. The concentration of paraquat and porphyrin that induced

30% of cell mortality and alteration in some oxidative metabolism and apoptotic markers were choosing to perform subsequent analysis involving potential interaction between S-HP imbalance and PB on neural cells. It is also to point out that we did not induced SHSY-5Y neuron cyto-differentiation by retinoic acid exposure, since as previously demonstrated that SHSY-5Y undifferentiated act as cholinergic neurons (Weiser, 2009; Santillo and Liu, 2015). Moreover, considering another prior study that investigated potential cyto-genotoxic effect of PB on SHSY-5Y cell lines, in the present investigation are described just results obtained from S-imbalanced (VV-like) and HP-imbalance (AA-like) cells.

The follow cyto-genotoxic variables related to potential effect of S-HP imbalance plus PB exposure were investigated: viability, apoptosis cascade modulation by protein and gene expression analysis of *Bcl-2*, *Bax* and *caspases 3 and 8*; AChE inhibitory action by enzyme; oxidative metabolism markers, DNA damage and antioxidant enzymes. Transcriptional modulation of these antioxidant enzymes genes and *DNA methyltransferase 1 (DNMT1)*, a DNA repair gene. S-HP imbalance without and with PB-interaction on AchE inhibitory effect was also evaluated, in order to determine if this imbalance could change PB-efficacy.

All experiments were conducted in 24 hours cell cultures. All assays were performed in triplicate and all results were presented as % of untreated control group.

### *2.3 Neuronal cell cultures pharmacological protocol*

S-HP pharmacological imbalance was performed in human neuronal cells (SHSY-5Y) commercially obtained from the BCRJ. In neural cells were cultured in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM F12) with 10% foetal bovine serum, supplemented with 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B. The cells were cultured at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments. Cells were exposed a paraquat and porphyrin at concentrations of 10, 30, 100, 300, 700 uM, respectively. Cells were PB-exposed at 20, 40, 60 ng/mL that is considered the range of plasmatic therapeutic PB-dose the treatment of MG (Azzolin et al., 2017).

## 2.4 Cell toxicity assays

Cell viability was indirectly evaluated by mitochondrial activity using MTT assay. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) assay using equal protocol described in Azzolin et al (2016). Briefly, supernatants of all treatments were removed, and the cells were resuspended in phosphate buffer (PBS, 0.01 M; pH 7.4). The MTT was dissolved in 5 mg/mL PBS added to a 96-well plate containing the sample treatments and was subsequently incubated for 1 h at 37 °C. Subsequently, the supernatant was removed from the wells and the cells were resuspended in 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and absorbance was read at 560 nm. Trypan dye exclusion assay was also performed in order to confirm the effect of treatments on cellular viability.

## 2.5 Immunoassay tests

The follow variables were quantified using Quantikine Human Immunoassay Kit according to the manufacturer's instructions: AChE enzyme, apoptosis markers (Bax-Bcl-2, CASP 8, 3), antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPX) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), which estimate DNA oxidized levels induced by reaction with reactive oxygen species (ROS) hydroxyl radical, oxygen, and photodynamic action. Briefly, all reagents and working standards were prepared and the excess micro plate strips were removed. The assay diluent RD1W was added (50 µL) to each well. Further, 100 µL of standard control for our sample was added per well, after which the well was covered with the adhesive strip and incubated for 1.5 h at room temperature. Each well was aspirated and washed twice for three washes. The antiserum of each molecule analysed here was added to each well, covered with a new adhesive strip, and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and the caspase-1 conjugate (100 µL) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and 200 mL of substrate solution was added to each well and incubated for 20 min at room temperature. Finally, the 50 µL stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a micro plate reader set to 450 nm.

## 2.6 Biochemical spectrophotometric assays

Lipoperoxidation and protein carbonylation, that are two important oxidative stress markers in the cells were spectrophotometrically determined in the treatments. Lipoperoxidation was quantified by reactive substances to thiobarbituric acid were analysed because oxidative stress can damage the cell membranes the method to evaluate the lipid peroxidation was as described previously (Jentzsch, 1996). During the fragmentation of the carbonylation proteins due to oxidative stress, chain fragmentation occurs and almost all amino acids are released, with the frequent production of carbonyl compounds. These forms of damage are measured by determining the formation of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine, as previously described (Morabito, 2004).

Genotoxicity assays the alkaline Comet Assay DNA was performed according to the general specifications previously described (Singh et al., 1988), in accordance with the general guidelines for the use of the comet assay (Nadin et al., 2001). A total of 100 cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analysed. Cells were visually scored according to the tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the dam-age index for cells ranged from 0 (cells with no migration) to 400 (cells with maximal migration). The slides were analysed under blind conditions (i.e. the status of the participants) by at least two different researchers.

## 2.7 Gene expression analysis by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted using Trizol, following the manufacturer's instructions. The extracted RNA was measured by a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. To perform reverse transcription, RNA was added to the samples of RNA (1 µg/mL) with 0.2 µL of DNAase for 5 min at 37 °C, followed by heating for 10 min at 65°C. The complementary DNA (cDNA) was generated with 1 µL of Iscript cDNA and 4 µL of Mix Iscript. The next steps of the reaction were 10 min at 5°C, 5 min at 25 °C, and 5 min at 85°C, with a final incubation for 60 min at 5°C. The qRT-PCR was performed in the Rotor-Gene Q 5plex HRM System with 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix, starting with 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C, 30

s at 60 °C, and a melt curve of 5 s at 60 °C to 90 °C in 0.5 °C increments. The reactions of each sample were performed in triplicate, using 1 µM of each primer (Table 1) and 2× QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix, the final volume was 20 µL. The beta-actin gene was used as the housekeeping gene (Barbisan et al., 2014).

Genes	Primers	
	Sense	Antisense
<i>β actina</i>	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTGTCA
<i>BAX</i>	CCCTTTCTACTTGCCAGCAA	CCCGGAGGAAGTCCAATGT
<i>BCL-2</i>	GAGGATTGTGGCCTTCTTGAGT	AGTCATCCACAGGGCGATGT
<i>CASP 8</i>	AAGGAGCTGCTCTTCCGAATT	CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT
<i>CASP 3</i>	TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG	TACCAGTGCCTATGGAGAAATGG
<i>DNMT1</i>	AACGGCATCCTGTACCGAGTT	CCTTCCGTGGCGTTTC
<i>SOD1</i>	GCACACTGGTGGTCCATGAA	ACACCCACAAGCCAAACGACTT
<i>SOD2</i>	GCCCTGGAACCTCACATCAA	GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT
<i>CAT</i>	GATAGCCTCGACCCAAGCA	ATGGCGGTGAGTGTCAAGGAT
<i>GPX</i>	GGTTTTCATCTATGAGGGTGTTC	GCCTTGGTCTGGCAGAGACT

**Table 1.** Gene primers list.

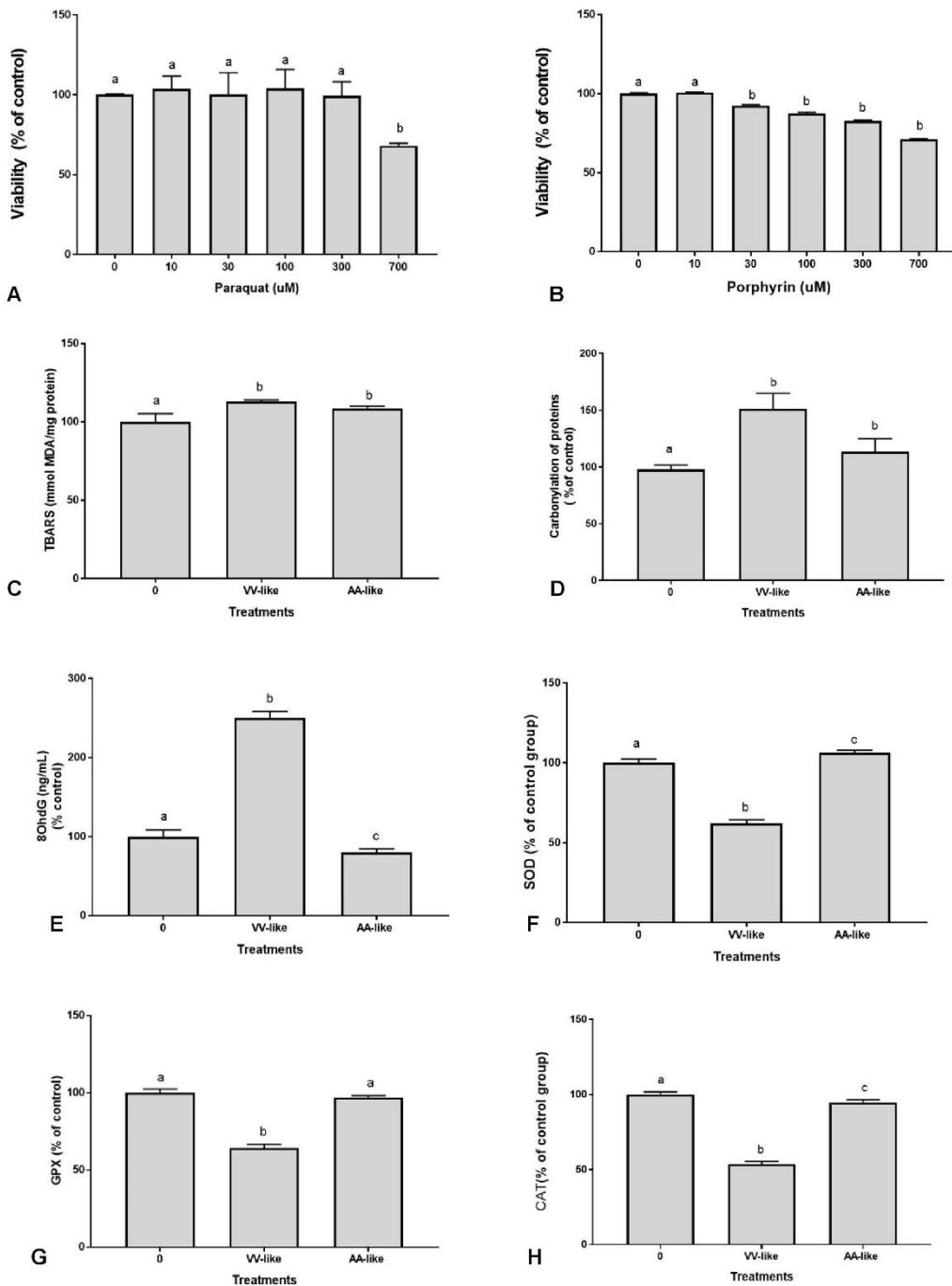
## 2.8 Statistical analysis

All data were transformed into percentages in relation to the negative control group. Results were statistically analysed by two-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test using GraphPad (GraphPad Prism software, version 7.0, 2017). Results with a  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.

## 3. Results

Viability analysis was initially used to establish S-HP pharmacological imbalance of neural cells triggered by paraquat and porphyrin exposure. The first concentration that triggered  $\geq 30\%$  of mortality of neural cells was used to obtain VV and AA-like cell cultures. Therefore, VV-like cells were obtained at 700 µM paraquat exposure and AA-like cells at 30 µM porphyrin exposure (Figure 1A, 1B).

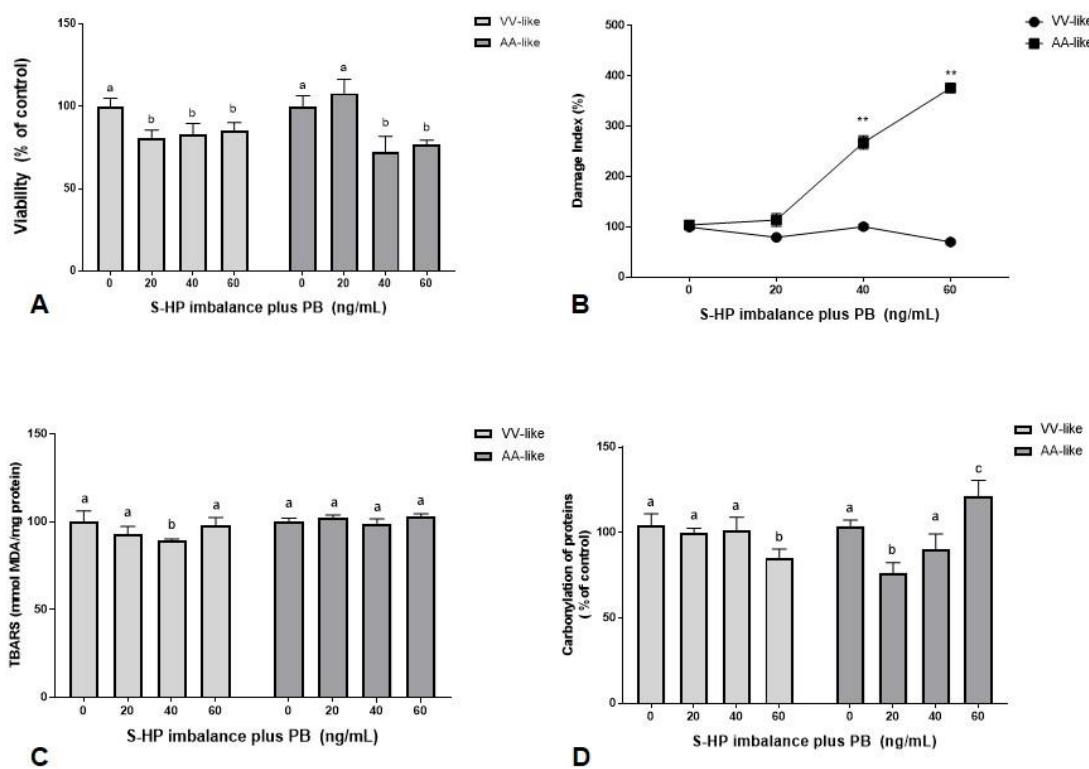
S-HP imbalance was confirmed by complementary oxidative markers analysis comparing balanced neural cells, VV and AA-like cells. Both S-HP imbalance cells presented higher lipoperoxidation and protein carbonylation levels than balanced-neurons (Figures 1C, 1D). The levels of DNA oxidation were higher in VV-like cells than control cells, whereas AA-like cells presented lower levels of this oxidative marker when compared to control balanced cell (Figure E). S-HP imbalance also affect the levels of antioxidant enzymes. SOD total enzyme was lower in VV-like cells and slight higher in AA-like cells than control group (Figure F). Levels of GPX were lower in VV-like cells, whereas AA-like cells presented similar levels of this enzyme than control group (Figure 1G). Catalase levels decreasing in both S-HP imbalanced group, however this result was stronger in VV-like than AA-like cells (Figure 1H).



**Figure 1-** Pharmacological imbalance analysis of superoxide-hydrogen peroxide in neural cells. Analysing the viability and oxidative metabolism. (A) Cell viability curve with paraquat. (B) Cell viability curve with porphyrin. (C) Lipoperoxidation. (D) Carbonylation of proteins. (E) 8OHdG DNA damage marker. (F) Superoxide dismutase. (G) Catalase. (H) Glutathione peroxidase. Results are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by one-way analysis of variance, followed by the pos-hoc Dunnet test. Different letters denote significant differences at  $p \leq 0.05$  among treatments. The assays were performed in triplicates.

From results, showing the S-HP imbalance on neural cells was possible to evaluate the PB interaction effect with this imbalance. Analysis of viability showed that, in both S-HP imbalanced cells PB decreased viability when compared to control VV-like and AA-like groups (Figure 2A). Effect of PB on DNA damage evaluated by Comet assay showed increase in genotoxicity just in AA-like cells, whereas in VV-cells the interaction with PB was not significant on this variable (Figure 2B).

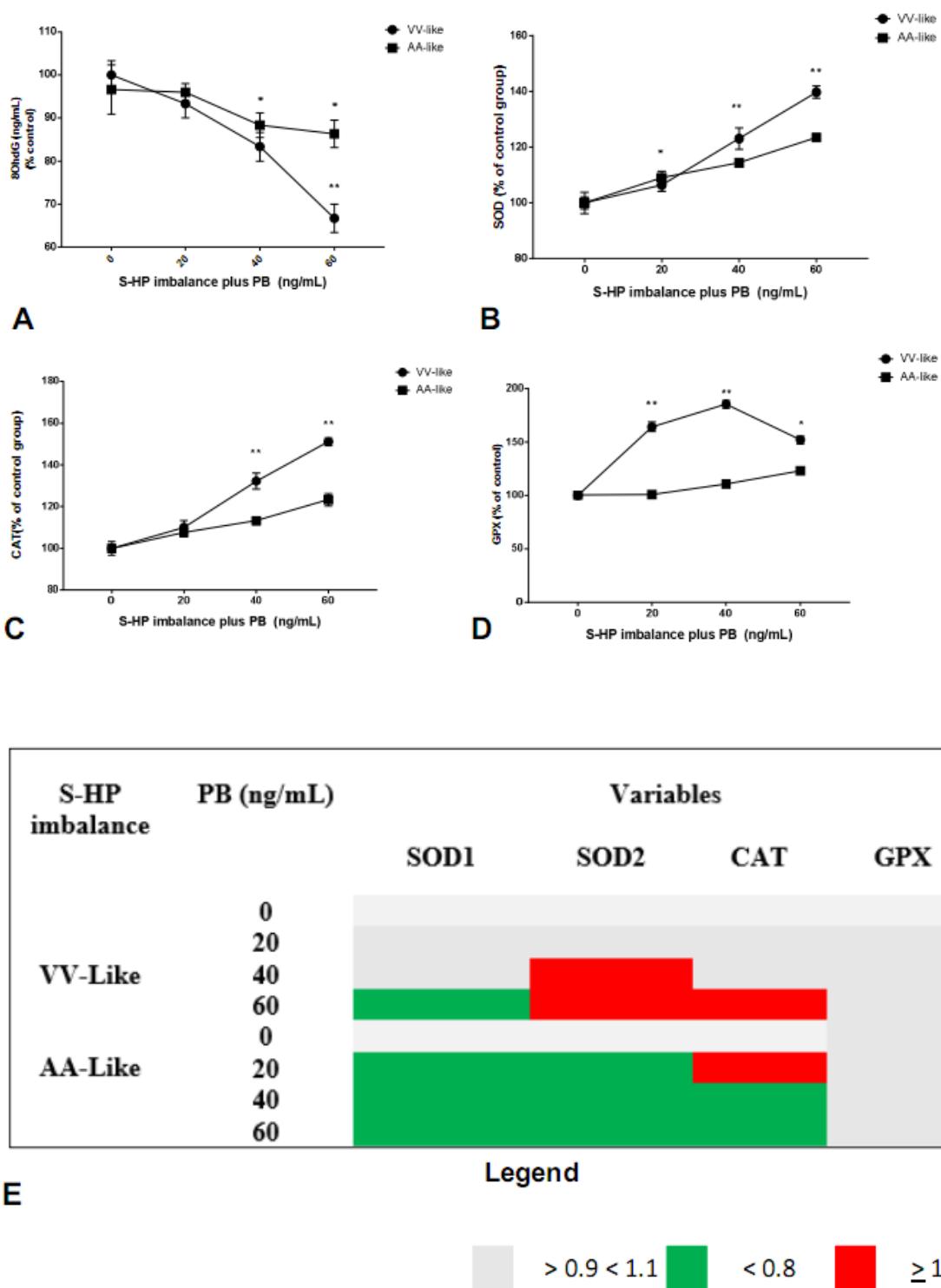
Lipoperoxidation levels decreased significantly, but slightly in VV-like cells PB-exposed at 40 ng/mL, whereas PB did not change lipoperoxidation levels of AA-like cells (Figure 2C). Protein carbonylation was lower in VV-like PB-exposed at 60 ng/mL. However, a decrease in the protein carbonylation levels was observed just when AA-like cells were PB-exposed at 20 ng/mL. At contrary, in higher PB concentration (60 ng/mL) the levels of this oxidative marker were higher than AA-like control group. (Figure 2D).



**Figure 2-** Effect of the interaction of pyridostigmine bromide on the superoxide-hydrogen peroxide imbalance in neural cells. In viability and oxidative metabolism. (A) Cell viability. (B) DNA damage Comet assay. (C) Lipoperoxidation. (D) Carbonylation of proteins. Results are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by two-way analysis of variance, followed by the pos-hoc Tukey test. Different letters denote significant differences at  $p \leq 0.05$  among treatments. The assays were performed in triplicates.

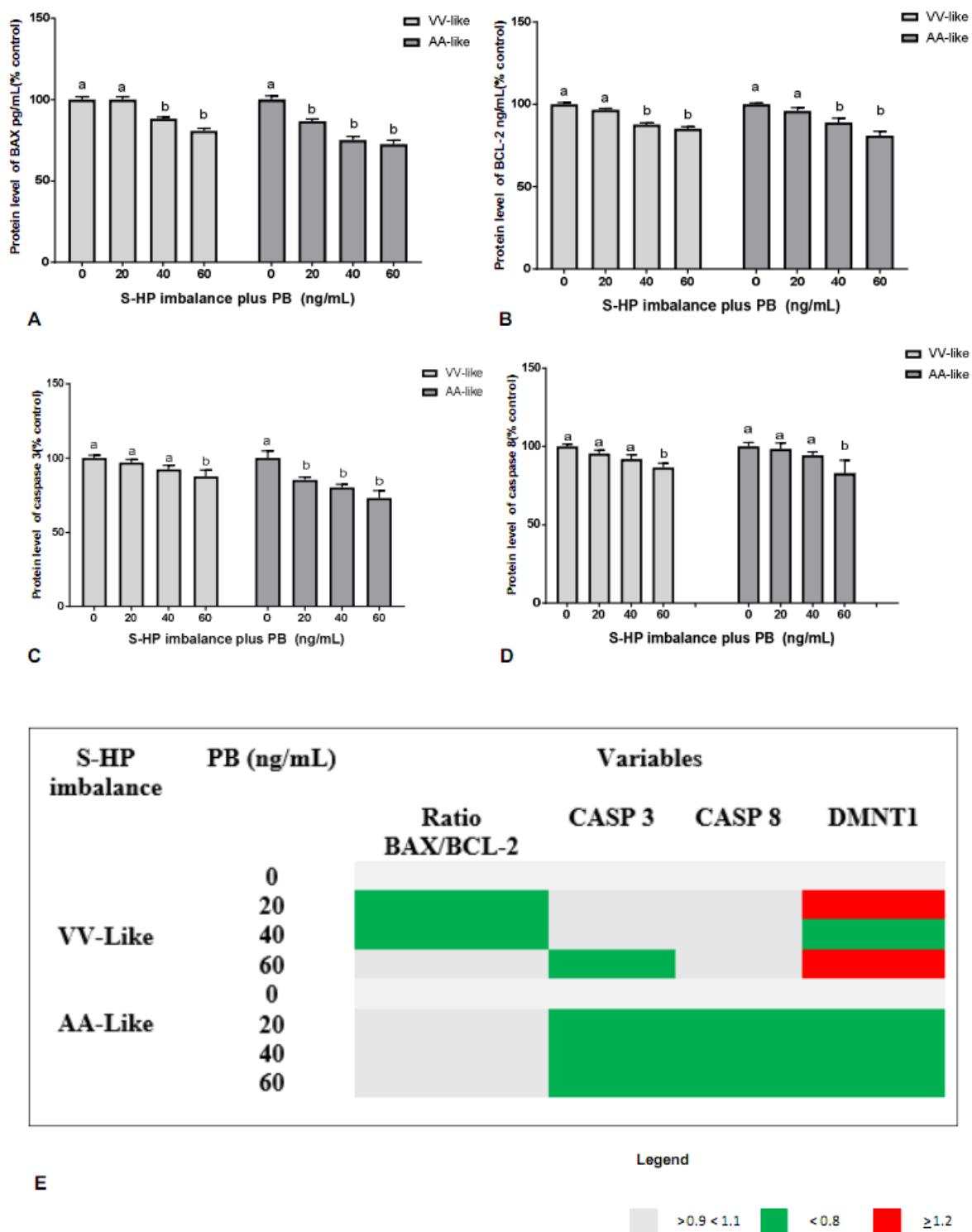
Interaction PB and S-HP imbalance on DNA oxidation levels was also evaluated (Figure 3A) showing a decrease in this oxidative marker from 40 ng/mL in S-HP imbalanced cells. However, this effect was dose-dependent just in VV-like cells. SOD total and catalase levels increased significantly in two S-HP cell lines, but this effect was more intense in VV-like than AA-like cells (Figures 3B, 3C). GPX enzyme levels increased in AA-like cells when PB-exposed at 20 and 40 ng/mL. However, in higher PB concentration the level of enzyme dropped. At contrary, just in higher PB concentration GPX levels increased in VV-like cells (Figure 3D).

A complementary analysis to evaluate the interaction between PB and S-HP imbalance on gene expression modulation o antioxidant enzymes was performed and results are presented in Figure 3E. GPX gene was not modulated by PB-exposure. In VV-like cells, SOD1 gene was downregulated when PB-exposed at 60 ng/mL. At contrary, SOD2 gene was upregulated when PB-exposed at  $\geq 40$  ng/mL concentration. Catalase gene was also upregulated, but just when exposed to higher PB concentration. Interaction between AA-like cells and PB showed downregulation in SOD1 and SOD2 genes, whereas catalase gene was up-regulated in lower PB-exposure (20 ng/mL) and also dow-regulation when exposed at high PB concentrations.



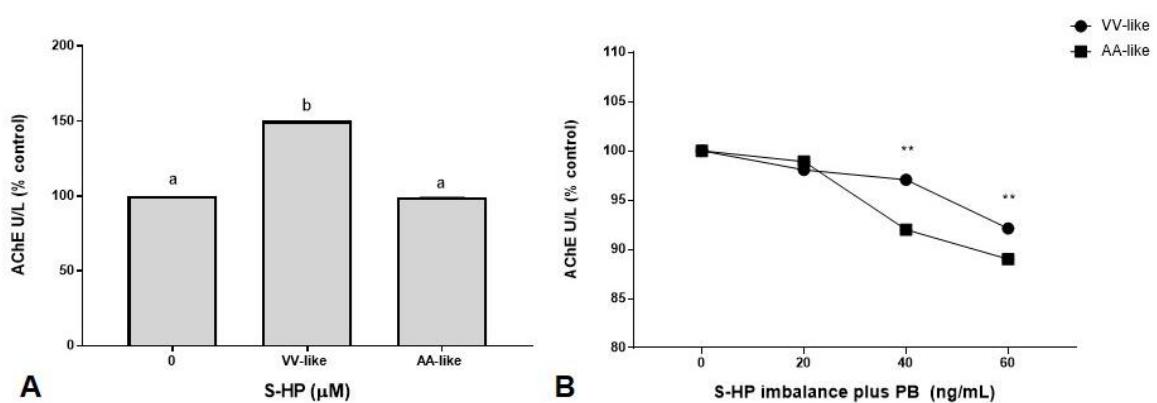
**Figure 3-** Effect of the interaction of pyridostigmine bromide on the superoxide-hydrogen peroxide imbalance in neural cells. Analysing oxidation of 8OHdG DNA and antioxidant enzymes. (A) 8OHdG DNA damage marker. (B) Superoxide dismutase. (C) Catalase. (D) Glutathione peroxidase. (E) Gene expression of antioxidant enzymes. Results are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by two-way analysis of variance, followed by the *pos-hoc* Tukey test. Different letters denote significant differences at  $p \leq 0.05$  among treatments. The assays were performed in triplicates.

Considering that interaction between PB-exposure and S-HP imbalanced cells decreased the viability was also analysed if this cytotoxic effect could be involved apoptosis modulation. The whole of results did not detect potential induction of intrinsic apoptosis via, since did not occur increase of BAX, caspases 3 and 8 levels in both S-HP imbalanced cells (Figures 4A-D). At contrary, some PB concentrations have a lowering effect on these intrinsic apoptotic markers. In general, analysis of gene modulation of these markers did not indicate apoptotic events, despite the DMNT1 DNA repair gene present some upregulation in VV-like cells (Figure 4E).



**Figure 4-** Effect of the interaction of pyridostigmine bromide on the superoxide-hydrogen peroxide imbalance in neural cells. In modulation of apoptosis in protein and gene expression level and the DNA damage repair gene. (A) BAX. (B) BCL-2. (C) Caspase 3. (D) Caspase 8. (E) Gene expression. Results are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by two-way analysis of variance, followed by the *post-hoc* Tukey test. Different letters denote significant differences at  $p \leq 0.05$  among treatments. The assays were performed in triplicates.

Finally, we evaluated potential interaction between PB and S-HP imbalance on its AChE inhibitory activity. In comparison with balanced cells, VV-like cells presented higher AChE activity on this enzyme, whereas AA-like cells did not affect AChE activity (Figure 5A). The interaction between PB and VV-like cells showed AChE inhibition just when cells were exposed to higher PB-concentration, whereas in AA-like cells AChE enzyme was inhibited from  $\geq 40$  ng/mL of PB-exposure (Figure 5B).



**Figure 5-** We evaluated the potential interaction between superoxide-hydrogen peroxide imbalance in inhibition of AChE and the same interaction of pyridostigmine bromide. (A) Superoxide-hydrogen peroxide imbalance in inhibition of AChE. (B) Interaction of pyridostigmine bromide with imbalance in the action of AChE. Results are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by two-way analysis of variance, followed by the *pos-hoc* Tukey test. Different letters denote significant differences at  $p \leq 0.05$  among treatments. The assays were performed in triplicates.

#### 4. Discussion

The present investigation showed that an oxidative S-HP imbalance triggered by paraquat and porphyrin exposure changed the cyto-genotoxic and AChE inhibitory effect of neural cholinergic cells PB-exposed. The results found here could present implication in detection of GWI susceptible soldiers and also in the efficacy and safety of PB use by patients with MG and other neurological conditions.

Before we discuss results related to PB and S-HP imbalance interaction on neural cells it is important to do some comments related to obtaination of experimental approach involving S-HP pharmacological imbalance. To perform the present study, SY cells were treated with paraquat used to increase the levels of S anion, and porphyrin to increase the HP levels. The S-HP pharmacological imbalance was chosen to perform the present investigation, since obtaination of neural viable cells from humans carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes is very difficult for logistic and ethical issues. Moreover, studies using S-HP pharmacological imbalance in other human cancer and PBMCs *in vitro* model has been previously validated and described in the literature (Barbisan et al., 2014; Berto et al., 2015; Azzolin et al., 2016).

However, it is important to point out that paraquat and porphyrin concentrations to trigger S-HP imbalance has been different according cell-type. For example, paraquat and porphyrin at 0.1  $\mu$ M concentration triggered S-HP imbalance in prostate and colorectal cancer cells (Berto et al., 2015; Azzolin et al., 2016) indicating that cancer cells are higher sensitive to these drugs than neural cells tested here.

Actually, we were able to identify just two *in vitro* studies that exposed SHSY-5Y cells to paraquat. In fact, the occurrence of chemical hypersensitivity to organophosphates and inhibitors of AChE has been well established and associated with the occurrence of distinct toxic and neurotoxic effects. In general, these effects depend on the frequency and dose of exposure, the chemical type of the drug and the endogenous host factors that may have some influence on susceptibility and sensitivity (Mangas et al., 2017). Therefore, differences in paraquat concentrations used in our study and these studies could be possible due some methodological variations. For example, in the protocol conducted by Chau et al (2009), authors used 300  $\mu$ M paraquat to trigger cell death in 48 h cell cultures. This is half-concentration used in the present study where 24 h SHSY-5Y were evaluated. On the other hand, McCarthy

et al. (2004) described higher toxicity and apoptotic effect of paraquat at 10 µM concentration on SHSY-5Y cells. However, before paraquat-exposure the authors induced a neural differentiation using trans retinoic acid. In the present investigation the neural induction was not performed, since just undifferentiated SH-SY5Y cells can be used as a cholinergic *in vitro* model (Weiser, 2009; Santillo and Liu, 2015). Therefore, seems that paraquat concentrations to trigger cytotoxic effect on SHSY-5Y cells is dependent of differentiation state of these cells.

The SHSY-5Y cells were also high susceptible to low concentrations of porphyrin, that generates increase in the basal HP levels. However, we were not able to identify previous studies that evaluated porphyrin effect on SHSY-5Y neural cells. On the other hand, we found three prior investigations triggering cytotoxic effect in these cells using HP-exposure. All studies used HP molecule on SHSY-5Y cells described oxidative stress induction and analysed protective effect of some compounds against this damage (Molina-Holgado et al., 2008; Nunome et al., 2008; Han et al., 2014). Therefore, even considering the methodological limitations related to *in vitro* studies, we believed that the experimental model described here allows us to investigate potential interaction between S-HP pharmacological imbalance and some drugs, such as PB.

In chemical terms, PB is a carbamate AChE inhibitor that presents a quaternary ammonium group in its chemical structure that prevents PB penetration through the blood - brain barrier. However, under a similar regimen, PB administration during the Persian Gulf War resulted in a greater than threefold increase in the frequency of reported SNC symptoms. Veterans of the 1991 Gulf War (GW) continue to report health complaints after returning from GWI including fatigue, memory problems, and debilitating moods more than two decades after the return. Suspicious causes for such complaints include the synergistic effects of varying exposures to chemicals, including pesticides with PB drug (Fukuda et al., 1998; Proctor et al., 1998; Unwin et al., 1999; Steele, 2000; White et al., 2001; Sullivan et al., 2003; White et al., 2016).

How to explain does the potential effect of PB on the nervous system? Previous investigations have suggested that under some environmental or clinical conditions blood-brain barrier could be disrupted allowing PB to enter into the brain. In this organ, PB can changes cortical excitability, and leads to long-lasting alterations in gene expression (Friedman et al., 1996; Sinton et al., 2000; Pavlovsky et al., 2003). Therefore, interaction PB and other chemical molecules could affect directly the neuron

functions (Kerr et al., 2015). For this reason, results described here in neural cells could be considered relevant.

The overall results indicated that S-HP imbalance changed neural cell viability to PB-exposure. In VV- and AA-like cells PB  $\geq 40$  ng/mL triggered increase in the mortality, whereas a previous study performed by Azzolin et al (2017) described PB cytotoxic effect just in cells exposed to higher concentrations of this drug ( $\geq 80$  ng/mL). A possible explanation of these results could be a synergic effect involving S-HP imbalance and PB exposure by increase of cellular oxidative stress state. This hypothesis is based in a previous study conducted by Azzolin et al (2017) did not observed alterations in the NO, protein carbonylation and lipoperoxidation of cells PB-exposed at similar concentrations tested here.

In AA-like, the analysis of three important oxidative markers (genotoxicity, lipoperoxidation and protein carbonylation) showed higher effect of PB on DNA damage determined by Comet DNA assay in 24 h cell cultures. However, in VV-like cells the PB effect on these markers was not so strong. These results could be explained by the fact that surviving cells could be solved the oxidative stress triggered by interaction among S-HP imbalance and PB by increase of antioxidant enzymes levels and subsequent decreasing of DNA oxidation levels. Considering that DNMT1 DNA repair gene was upregulated in VV-like cells, but no in AA-like cells it is possible to explain why in these last cells we also found higher DNA damage than VV-like cells. In fact, AA-SOD2 genotypes has been associated to cancer due higher DNA damage levels possibly triggered by increase of ROS, such as hydroxyl radical that has highly affinity to DNA molecule (Bresciani et al., 2013).

From these results it was evaluated the role of interaction between PB and S-HP imbalance on cellular dead events. Initially, it is important to consider that genetic cellular programmed dead, generically known as apoptosis is a defence mechanism against damaged, stressed, or stimulated cells by any agents to prevent accumulation of non-functional cells in the tissues. However, apoptosis can be triggered by different mechanisms such as intrinsic, extrinsic pathways as well as pyroptosis and autophagy (Kiraz et al., 2016).

The intrinsic apoptosis is triggered by DNA mutations that are detected mainly p53 protein, a nuclear transcription factor that regulates the expression of large gene numbers involving to apoptotic cascade. The p53 protein activate this route by downregulation of Bcl-2 and up-regulation of BAX gene products, making the

cytochrome c releasing from the intermembrane space of mitochondria, that activated intrinsic caspases pathway (Tummers and Green, 2017). For this reason, we analysed four main genes that participate of intrinsic apoptosis pathway: BAX, Bcl-2, caspases 3 and 8. However, our analysis did not detect that interaction between PB and S-HP imbalance could trigger this apoptotic pathway.

However, we cannot discard some extrinsic apoptosis events that also involves initiator molecules, such as caspases 8 and effector molecules such as caspase 3 triggered by S-HP imbalance. Apoptosis triggered by extrinsic pathway is primarily mediated by cell membrane death receptors mainly belonging of tumor necrosis factor (TNF) gene superfamily. Once the extrinsic apoptotic route is induced it will also activate the caspase pathway. For this reason, if the interaction between PB and S-HP imbalance would be activating the extrinsic apoptotic route would be expected to observe some increase in the caspase levels. As we did not observe any alteration in caspases 3 and 8, at principle we did not consider that extrinsic apoptotic via could to explain cytotoxicity triggered by PB and S-HP imbalance interaction. Therefore, we cannot discard that this interaction can be trigger cytotoxic effect involving pyroptosis, autophagia or cellular necrosis. This issue remains to be elucidated in complementary future studies.

Furthermore, it is relevant to comment that interaction between PB and S-HP imbalance induced a downregulation in caspases 3 and 8 in AA-like neuron cells. Currently inhibitors of apoptosis have been considered as potential drugs in the treatment of some diseases that present excessive caspase activation, including inflammation and immune diseases and neurological conditions such as Parkinson and Alzheimer diseases (Morris et al., 2017). However, the lowering caspase 3 effect of PB seems to occur just in S-HP imbalance cells, since Azzolin et al (2018) described opposite elevation in the caspase 3 levels in SHSY-5Y neural balanced cells.

In summary, the whole of results suggest that S-HP imbalance induces PB cytotoxicity of neural cells, even though this induction is differentiated between cells exposed to higher S levels and higher HP levels. Furthermore, the results corroborate the hypothesis that interaction between PB with other drugs that trigger oxidative stress could to present negative effects on body cells, specially neurons and in this way, to contribute to GWI development (Kerr et al., 2015).

A complementary analysis evaluating potential PB and S-HP imbalance interaction on AChE inhibitory activity was also performed. When SHSY-5Y cells were

just S or HP exposed AChE activity was changed in VV-like cells that presented increased in the levels of these enzyme than balanced-cells. This result was not observed in cells just HP-exposed (AA-like cells). In general, AChE inhibition was not affect in the AA-like cells and was similar to previously described by Azzolin et al (2017) when SHSY-5Y cells were PB-exposed. However, VV-like cells showed important loss of AChE inhibitory action by PB exposure in all concentrations tested here of this drug.

Changes in the efficacy of drugs associated to S-imbalance found in VV-SOD2 subjects has been described in the literature *from in vivo* and *in vitro* studies (Costa et al., 2012; Barbisan et al., 2014; Duarte et al., 2017; Barbisan et al., 2018). A possible causal mechanism associated to S-imbalance involves increase of some oxidative markers, as well as chronic-inflammation (Montano et al., 2012; Barbisan et al., 2017). Therefore, results found here reinforce hypothesis that S-imbalance could have pharmacogenetic and/or pharmacogenomic effect on efficacy of some drugs. It is possible that, this balance could also be associated low-tolerance of PB by some MG patients that suffer from side effects triggered by this drug (Li et al., 2016).

In these terms, complementary genetic studies analysing potential association between Val16Ala-SOD2 SNP and GWI development could be useful in order to understand the physiopathology of this condition. Moreover, differences in the PB cytotoxicity and AChE inhibition efficacy could be associated to differential side effects triggered by PB treatment on MG patients. In fact, AChE inhibition seems to be sufficient for therapeutic efficiency used to treat muscle weakness and fatigue present in MG patients. However, inhibition AChE enzyme in other tissues also occurs resulting in adverse effects including hyperactivation of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in vegetative nerve system, primarily in smooth muscles and, to a lesser extent, in myocardium. As these side effects present variation among MG patients, we cannot discard that Val16Ala-SOD2 SNP could contribute with these differences, where AA-carriers could be more sensible to PB-exposure than VV-carriers.

## 5. Conclusion

In summary, our study demonstrated the existence of interaction between PB and S-HP imbalance changing cytotoxicity and AChE inhibition efficiency. Despite methodological constrains associated to in vitro studies, the whole of results point out the relevance of basal oxidative state on PB effect that could be associated to GWI development and to occurrence of side effects in some MG patients.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the CNPq (Nos. 402325/2013-3; 490760/2013-9; 311446/2012-4), FAPERGS, FAPEAM, and CAPES for grants and fellowships.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the article.

## References

- Abou-Donia, M.B., Suliman, H.B., Khan, W.A., Abdel-Rahman, A.A., 2003. Testicular germ-cell apoptosis in stressed rats following combined exposure to pyridostigmine bromide, N,N-diethyl m-toluamide (DEET), and permethrin. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 66, 57–73. <https://doi.org/10.1080/15287390306463>.
- Algarve, T.D., Barbisan, F., Ribeiro, E.E., Duarte, M.M.M.F., Mânicica-Cattani, M.F., Mostardeiro, C.P., Lenz, A.F., da Cruz, I.B.M., 2013. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. *Genetics and molecular research : GMR* 12, 5134–44. <https://doi.org/10.4238/2013.October.29.7>.
- Azzolin, V.F., Barbisan, F., Lenz, L.S., Teixeira, C.F., Fortuna, M., Duarte, T., Duarte, M.M.F.M., da Cruz, I.B.M., 2017. Effects of Pyridostigmine bromide on SH-SY5Y

cells: An in vitro neuroblastoma neurotoxicity model. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 823, 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.08.003>

Azzolin, V.F., Barbisan, F., Teixeira, C.F., Pillar, D., Mastella, M.H., Duarte, T., Praia, R.S., Ribeiro, E.E., Duarte, M.M.F., Da Cruz, I.B.M. 2018. The effect of Val16Ala-SOD2 polymorphism on inhibition of acetylcholinesterase and cyto-genotoxicity of pyridostigmine bromide in human peripheral blood mononuclear cells. *Free Radical Research.* (submitted).

Azzolin, V.F., Cadoná, F.C., Machado, A.K., Berto, M.D., Barbisan, F., Dornelles, E.B., Glanzner, W.G., Gonçalves, P.B., Bica, C.G., da Cruz, I.B.M., 2016. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicology in Vitro* 32, 8–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.12.001>.

Barbisan, F., Azzolin, V.F., Monteiro, G.C., Teixeira, C.F., Mastella, M.H., Bueno, V., Duarte, M.M.M.F., Wagner, G., do Prado-Lima, P.A.S., Ribeiro, E.E., da Cruz, I.B.M., 2018. Genetic or pharmacological superoxide-hydrogen peroxide imbalances modulate the in vitro effects of lithium on glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Gene* 655, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.046>.

Barbisan, F., De Rosso Motta, J., Trott, A., Azzolin, V., Dornelles, E.B., Marcon, M., Algarve, T.D., Duarte, M.M.M.F., Mostardeiro, C.P., Unfer, T.C., Schott, K.L., Da Cruz, I.B.M., 2014. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS ONE* 9, 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107299>.

Berto, M.D., Bica, C.G., de Sá, G.P., Barbisan, F., Azzolin, V.F., Rogalski, F., Duarte, M.M.M.F., da Cruz, I.B.M., 2015. The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis. *Medical Oncology* 32. <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0700-1>.

Bresciani, G., Cruz, I.B.M., De Paz, J.A., Cuevas, M.J., González-Gallego, J., 2013. The MnSOD Ala16Val SNP: Relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radical Research* 47, 781–792.  
<https://doi.org/10.3109/10715762.2013.836275>

Bresciani, G., da Cruz, I.B.M., González-Gallego, J., 2015. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Advances in Clinical Chemistry* 68, 87–130. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.11.001>.

Capeleto, D., Barbisan, F., Azzolin, V., Dornelles, E.B., Rogalski, F., Teixeira, C.F., Machado, A.K., Cadoná, F.C., da Silva, T., Duarte, T., Duarte, M.M.M.F., da Cruz, I.B.M., 2015. The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. *Biogerontology* 16, 621–630. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9561-4>

Chau, K.Y., Korlipara, L.V.P., Cooper, J.M., Schapira, A.H.V., 2009. Protection against paraquat and A53T alpha-synuclein toxicity by cabergoline is partially mediated by dopamine receptors. *Journal of the Neurological Sciences* 278, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.11.012>

Costa, F., Dornelles, E., Mânicca-Cattani, M.F., Algarve, T.D., De Souza Filho, O.C., Sagrillo, M.R., Garcia, L.F.M.H., Da Cruz, I.B.M., 2012. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reproductive BioMedicine Online* 24, 474–481.  
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.01.009>

Costa, L.G., Cole, T.B., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., 2003. Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annual review of medicine* 54, 371–392.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.med.54.101601.152421>

Duarte, T., Barbisan, F., do Prado-Lima, P.A.S., Azzolin, V.F., da Cruz Jung, I.E., Duarte, M.M.M.F., Teixeira, C.F., Mastella, M.H., da Cruz, I.B.M., 2017. Ziprasidone,

a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response in vitro. *Cytokine*. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.017>

Duarte, T., Da Cruz, I.B.M., Barbisan, F., Capelleto, D., Moresco, R.N., Duarte, M.M.M.F., 2016. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytics blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism. *Pharmacogenomics Journal* 16, 501-506. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.91>

Friedman, A., Kaufer, D., Shemer, J., Hendlir, I., Soreq, H., Tur-Kaspa, I., 1996. Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. *Nature Medicine* 2, 1382–1385. <https://doi.org/10.1038/nm1296-1382>

Fukuda, K., Nisenbaum, R., Stewart, G., Thompson, W.W., Robin, L., Washko, R.M., Noah, D.L., Barrett, D.H., Randall, B., Herwaldt, B.L., Mawle, A.C., Reeves, W.C., 1998. Chronic multisymptom illness affecting Air Force veterans of the Gulf War. *Journal of the American Medical Association* 280, 981–988. <https://doi.org/10.1001/jama.280.11.981>

Gilhus, N.E., Skeie, G.O., Romi, F., Lazaridis, K., Zisimopoulou, P., Tzartos, S., 2016. Myasthenia gravis - Autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nature Reviews Neurology* 12, 259-268 <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.44>.

Han, S.M., Kim, J.M., Park, K.K., Chang, Y.C., Pak, S.C., 2014. Neuroprotective effects of melittin on hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-286>

Jentzsch, a M., Bachmann, H., Furst, P., Biesalski, H.K., 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 251–256. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21646>

Kang, J.H., Park, Y.D., Lee, C.H., Cho, K.S., 2015. Primary mantle cell lymphoma of the nasopharynx: A rare clinical entity. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 81, 447–450. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.02.002>

Kerr, K.J., 2015. Gulf War illness: An overview of events, most prevalent health outcomes, exposures, and clues as to pathogenesis. *Reviews on Environmental Health* 15, 273-286. <https://doi.org/10.1515/reveh-2015-0032>

Kiraz, A., Adan, M., Kartal Yandim, Y., Baran. 2016. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol* 37, 8471–8486.

La Du, B.N., Billecke, S., Hsu, C., Haley, R.W., Broomfield, C.A., 2001. Serum paraoxonase (PON1) isozymes: The quantitative analysis of isozymes affecting individual sensitivity to environmental chemicals, in: *Drug Metabolism and Disposition*. pp. 566–569.

Li, L., Shou, Y., Borowitz, J.L., Isom, G.E., 2001. Reactive oxygen species mediate pyridostigmine-induced neuronal apoptosis: Involvement of muscarinic and NMDA receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology* 177, 17–25.  
<https://doi.org/10.1006/taap.2001.9283>

Li, X., Chen, F., Zhu, Q. 2016 Gli-1/PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B pathway mediates resistance to radiation and is a target for reversion of responses in refractory acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* 7, 33004–33015.

Mackness, B., Mackness, M.I., Arrol, S., Turkie, W., Durrington, P.N., 1997. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *British Journal of Pharmacology* 122, 265–268.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701390>

Mangas, I., Vilanova, E., Estévez, J., 2017. Phenyl valerate esterase activity of human butyrylcholinesterase. *Archives of Toxicology* 91, 3295–3305.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-017-1946-5>

McCarthy, S., Somayajulu, M., Sikorska, M., Borowy-Borowski, H., Pandey, S., 2004. Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; Neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. *Toxicology and Applied Pharmacology* 201, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.04.019>

McKeown-Eyssen, G., Baines, C., Cole, D.E.C., Riley, N., Tyndale, R.F., Marshall, L., Jazmaji, V., 2004. Case-control study of genotypes in multiple chemical sensitivity: CYP2D6, NAT1, NAT2, PON1, PON2 and MTHFR. *International Journal of Epidemiology* 33, 971–978. <https://doi.org/10.1093/ije/dyh251>

Molina-Holgado, F., Gaeta, A., Francis, P.T., Williams, R.J., Hider, R.C., 2008. Neuroprotective actions of deferiprone in cultured cortical neurones and SHSY-5Y cells. *Journal of Neurochemistry* 105, 2466–2476. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05332.x>

Montano, M.A.E., Barrio Lera, J.P., Gottlieb, M.G.V., Schwanke, C.H.A., Rocha, M.I.U.M., Manica-Cattani, M.F., Santos, G.F., Cruz, I.B.M., 2009. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Molecular and Cellular Biochemistry* 328, 33–40. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0071-z>

Morabito, F., Cristani, M., Saija, A., Stelitano, C., Callea, V., Tomaino, A., Minciullo, P.L., Gangemi, S., 2004. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediators of Inflammation* 13, 381–383. <https://doi.org/10.1080/09629350400008760>

Morris, R., Lord, S., Lawson, R.A., Coleman, S., Galna, B., Duncan, G.W., Khoo, T.K., Yarnall, A.J., Burn, D.J., Rochester, L., 2017. Gait Rather Than Cognition Predicts Decline in Specific Cognitive Domains in Early Parkinson's Disease. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* 72, 1656–1662. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx071>

Nadin, S.B., Vargas-Roig, L.M., Ciocca, D.R., 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49, 1183–1186. <https://doi.org/10.1177/002215540104900912>

Nunome, K., Miyazaki, S., Nakano, M., Iguchi-Ariga, S., Ariga, H., 2008. Pyrroloquinoline quinone prevents oxidative stress-induced neuronal death probably through changes in oxidative status of DJ-1. *Biological & pharmaceutical bulletin* 31, 1321–1326. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1321>

Pavlovsky, L., Browne, R.O., Friedman, A., 2003. Pyridostigmine enhances glutamatergic transmission in hippocampal CA1 neurons. *Experimental Neurology* 179, 181–187. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(02\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(02)00016-X)

Proctor, S.P., Heeren, T., White, R.F., Wolfe, J., Borgos, M.S., Davis, J.D., Pepper, L., Clapp, R., Sutker, P.B., Vasterling, J.J., Ozonoff, D., 1998. Health status of Persian Gulf War veterans: self-reported symptoms, environmental exposures and the effect of stress. *Int J Epidemiol* 27, 1000–1010.

Santillo, M.F., Liu, Y., 2015. A fluorescence assay for measuring acetylcholinesterase activity in rat blood and a human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 76, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.07.002>

Schulz-Heik, R.J., Schaer, M., Eliez, S., Hallmayer, J.F., Lin, X., Kaloupek, D.G., Woodward, S.H., 2011. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism moderates anterior cingulate volume in posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry* 70, 1091–1096. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.06.012>

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

Sinton, C.M., Fitch, T.E., Petty, F., Haley, R.W., 2000. Stressful manipulations that elevate corticosterone reduce blood-brain barrier permeability to pyridostigmine in

the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 165, 99–105.  
<https://doi.org/10.1006/taap.2000.8931>

Steele, L., 2000. Prevalence and patterns of Gulf War illness in Kansas veterans: Association of symptoms with characteristics of person, place, and time of military service. *American Journal of Epidemiology* 152, 992–1002.  
<https://doi.org/10.1093/aje/152.10.992>

Sullivan, K., Krengel, M., Bradford, W., Stone, C., Thompson, T.A., Heeren, T., White, R.F., 2018. Neuropsychological functioning in military pesticide applicators from the Gulf War: Effects on information processing speed, attention and visual memory. *Neurotoxicology and Teratology* 65, 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.11.002>

Sullivan, K., Krengel, M., Proctor, S.P., Devine, S., Heeren, T., White, R.F., 2003. Cognitive functioning in treatment-seeking Gulf War veterans: Pyridostigmine bromide use and PTSD. *Journal of Psychopathology and Behavioral Assessment* 25, 95–103. <https://doi.org/10.1023/A:1023342915425>

Tummers, D.R. 2017. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol* 277, 76–89.

Unwin, C., Blatchley, N., Coker, W., Ferry, S., Hotopf, M., Hull, L., Ismail, K., Palmer, I., David, A., Wessely, S., 1999. Health of UK servicemen who served in Persian Gulf War. *Lancet* 353, 169–178. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)11338-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11338-7)

Weiser, T., Just, S., 2009. Hyoscine butylbromide potently blocks human nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters* 450, 258–261.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.12.004>

White, R.F., Proctor, S.P., Heeren, T., Wolfe, J., Krengel, M., Vasterling, J., Lindem, K., Heaton, K.J., Sutker, P., Ozonoff, D.M., 2001. Neuropsychological function in Gulf War veterans: Relationships to self-reported toxicant exposures. *American Journal of Industrial Medicine* 40, 42–54. <https://doi.org/10.1002/ajim.1070>

White, R.F., Steele, L., O'Callaghan, J.P., Sullivan, K., Binns, J.H., Golomb, B.A., Bloom, F.E., Bunker, J.A., Crawford, F., Graves, J.C., Hardie, A., Klimas, N., Knox, M., Meggs, W.J., Melling, J., Philbert, M.A., Grashow, R., 2016. Recent research on Gulf War illness and other health problems in veterans of the 1991 Gulf War: Effects of toxicant exposures during deployment. *Cortex* 74, 449-475  
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.08.022>.

Young, D.A., Neylan, T.C., O'Donovan, A., Metzler, T., Richards, A., Ross, J.A., Inslicht, S.S. 2018. The interaction of BDNF Val66Met, PTSD, and child abuse on psychophysiological reactivity and HPA axis function in a sample of Gulf War Veterans. *J Affect Disord* 3, 235:52-60. <https://doi: 10.1016/j.jad.2018.04.004>.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o desbalanço S-HP na cito-genotoxicidade induzida em células neurais SHSY-5Y e CMSPs via exposição ao PB. Para tanto, inicialmente foi determinado se o PB poderia causar efeitos genotóxicos na dosagem plasmática terapêutica em células neurais. Em geral os resultados mostraram ação tóxica apenas nas maiores concentrações de PB que geralmente não são administradas a maior parte dos pacientes em uso desse fármaco e nem aos soldados da GWI que ingeriram este fármaco de forma profilática. Por outro lado, o estudo mostrou efeito diferenciado do PB na citotoxicidade de CMSPs portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Val16Ala-SOD2, ainda que nas células neurais submetidas a um desbanço farmacológico S-HP o efeito cito-genotóxico do PB não tenha sido tão pronunciado. Considerando a potencial relevância clínica e epidemiológica destes resultados, algumas considerações devem ser aprofundadas.

Como anteriormente comentado, o PB utilizado para o tratamento de alterações na JNM (INOUYE e OLIVEIRA, 2004; SILVA, 2002; STANDAERT e YOUNG, 2006) e também foi utilizado de forma profilática na GWI para prevenção de estresse e contra os agentes químicos e físicos os quais os soldados eram expostos durante a guerra (SULLIVAN et al., 2018). No entanto, esse fármaco foi associado a diversos efeitos adversos detectados durante e após a guerra nos soldados que ingeriram profilaticamente 30 mg/ 3 vezes ao dia deste fármaco. Entre estes efeitos, os principais foram: fadiga do músculo esquelético, cefaléia, *déficit* de atenção, problemas de cognição, distúrbios gastrointestinais, do sono, regulação de temperatura entre outras alterações autonômicas (GOLOMB, 2008; JANULEWICZ et al., 2017; ODEGARD et al., 2013; WHITE et al, 2016).

Estes resultados sugeriram que o PB poderia ter efeito cito-genotóxico relevante nos seres humanos. Porém, os estudos prévios realizados em células de animais sugeriram que a exposição isolada ao PB não causaria danos extensivos incluindo diminuição na viabilidade celular, apoptose celular (BERRÍOS et al., 2015, POHANKA, 2011). No entanto, outros estudos mostraram que quando animais eram tratados com PB associado com outras moléculas químicas que eram potencialmente utilizadas em guerras biológicas ou na profilaxia de outras doenças ou mesmo parasitoses, como é o caso da permetrina, por exemplo, utilizada para evitar infestação por piolhos os resultados eram bastante diferentes. Estes resultados

indicaram então que a interação do PB com agentes químicos, ou mesmo fatores físicos como a atividade física intensa e psicológicos como o estresse causava estresse oxidativo e inflamação a esses animais (ABOU-DONIA et al., 2003; LI et al., 2012).

Considerando que a maior parte dos agentes no qual o PB interage são fatores que aumentam o estresse oxidativo e a inflamação corporal, uma questão em aberto diz respeito a potencial ocorrência de interação entre o PB e desbalanços oxidativos associados a características genéticas dos indivíduos, como é o caso do polimorfismo Val16Ala-SOD2. Esta questão é bastante pertinente já que, até o presente momento pairam dúvidas sobre a eficácia e segurança no uso do PB como fármaco e também sobre o mesmo ter sido apontado como o causador da doença da GWI. Esta premissa subsidiou então a realização dos estudos que compõe o presente trabalho.

Com base nos resultados obtidos, o primeiro aspecto a ser discutido é se o PB de forma isolada causaria ou não cito-genotoxicidade em células neurais humanas, mesmo que sob o ponto de vista farmacológico não atravesse a barreira sangue-cérebro (ASSIS, 1960). Então, o primeiro estudo avaliou o impacto *in vitro* do PB em células neurais humanas (SH-SY5Y), a fim de determinar os potenciais efeitos citotóxicos e genotóxicos do fármaco. Como foi anteriormente comentado, indicadores de cito-genotoxicidade foram observados mais intensamente em células expostas a maior concentração de PB testada (80 ng/mL) incluindo aumento na taxa de oxidação do DNA, carbonilação de proteínas e super regulação dos genes p53 e DNMT1. Ao contrário, na dose terapêutica plasmática estimada (40 ng/mL) foi observado aumento na taxa de proliferação celular e atividade mitocondrial e super expressão do gene da telomerase e os efeitos citotóxicos foram menos intensos.

Cabe comentar que, em alguns pacientes portadores de MG são ministradas 120 mg de PB em intervalos de quatro horas, a fim de reduzir o estado de fadiga e evitar a crise miastênica que é eventualmente fatal a esses pacientes. Neste caso, estima-se que a dosagem terapêutica plasmática do PB seja próxima a 80 ng/mL, o que torna os resultados aqui obtidos clinicamente relevantes. Por exemplo, a carbonilação de proteínas é geralmente produzida em consequência dos processos de oxidação promovidos pela exposição a EROs, formando cetonas reativas ou aldeídos de proteínas, ou por decomposição oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados, que podem desencadear reações em cadeia que levam à formação de uma variedade de espécies carboniladas (SUZUKI et al., 2010). Portanto, a elevação

da carbonilação de proteínas poderia ser considerada como consequência da produção prévia de moléculas oxidativas e nitrosativas que atuam sobre as macromoléculas celulares. É provável que a elevação de moléculas oxidativas possa ocorrer mais cedo, o que poderia ser a razão pela qual não observamos níveis mais altos de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO e ROS.

Na concentração mais elevada de PB (80 ng/mL), o efeito genotóxico também foi bem evidenciado através de resultados obtidos a partir de dois ensaios, a quantificação dos níveis de 8OHdG por imunoensaio e a realização do ensaio DNA cometa. Concomitante ao aumento da oxidação do DNA e danos causados pela exposição a maior concentração de PB aqui testada, observou-se super expressão dos genes p53 e DMNT1, provavelmente em resposta ao dano ao DNA desencadeado pelo PB. No caso, a proteína p53 é considerada um regulador chave da progressão do ciclo celular via checagem da qualidade da molécula de DNA antes que ocorra uma próxima mitose. Na presença de danos no DNA, ocorre uma disruptão entre a ligação do p53 e a molécula MDM2 o que é um importante sinal para a indução da apoptose, que se inicia justamente com a super expressão da própria proteína p53. Esta vai inibir a expressão do gene Bcl-2 que é um forte indutor da proliferação celular e vai estimular a produção da proteína BAX que é chave para o desencadeamento da apoptose por via intrínseca, também chamada de apoptose mitocondrial (KIRAZ et al., 2016; WU e PRIVES, 2018).

A sugestão de que doses terapêuticas elevadas de PB poderiam ser cito-genotoxicas também foi corroborada pelo aumento na expressão do gene DNMT 1 que sintetiza uma enzima ligada à metilação e reparo do DNA. Esta enzima pode ser positivamente modulada na presença de vários fatores ambientais (JIN et al., 2013). É provável que essas modificações sejam responsáveis pelo aumento nos eventos apoptóticos observados nas células neurais expostas ao PB na concentração de 80 ng/mL.

Estes resultados também corroboram com resultados obtidos em um estudo anterior conduzido por Li et al. (2000), em células de cerebelo de ratos tratadas com PB. Tais células apresentaram fragmentação do DNA analisada via eletroforese em gel, e também aumento nos níveis de EROs e de marcadores apoptóticos. Outro estudo realizado com as células germinativas de Sertoli e Leydig de ratos, descreveu que a combinação de PB com *N, N-dimetil-meta-toluamida* (DEET) e permetrina, que foram utilizada em soldados da GWI, também resultou em um aumento de marcadores

de estresse oxidativo e taxa de apoptose (ABOU-DONIA et al., 2003). No caso, estes autores relataram elevação da expressão das proteínas pró apoptóticas Bax e p53, como foi também observado no presente estudo. Entretanto, ao contrário do presente estudo que avaliou o efeito isolado do PB, no estudo conduzido por Abou-Donia et al (2003) o efeito de altas concentrações relacionados somente a exposição do PB não foi avaliado. Assim, não se pode afirmar que o mesmo não apresentaria efeitos citotóxicos, que não são tão intensos em concentrações mais baixas. É claro que, sob a perspectiva de se entender o papel do PB no desencadeamento da doença da GWI análises de toxicidade causada por altas concentrações de PB não faria sentido, uma vez que, os soldados Norte-Americanos receberam uma dose profilática de 30 mg três vezes ao dia (GOUGE et al., 1994), ou seja menor em relação aquelas utilizadas no tratamento da MG com um pico de concentração plasmática estimada deste fármaco de 20 ng/mL para cada ingestão de 30 mg de PB.

Na concentração terapêutica estimada no plasma (40 ng/mL), as células SHSY-5Y não exibiram os efeitos citotóxicos e genotóxicos intensos observados na maior concentração de PB. Por exemplo, as células expostas a 40 ng/mL não apresentaram nenhuma elevação de  $O_2^-$ , NO, ROS, lipoperoxidação ou carbonilação de proteínas em comparação com o grupo não tratado. No entanto, foi observado, um significativo aumento na taxa dano ao DNA pelo ensaio cometa. Por outro lado, níveis significativamente mais baixos de 8-OHdG nas células expostas ao PB de 40 ng/mL foram observados em comparação com as células não tratadas. Assim, esta aparente contradição de resultados merece ser discutida em maior detalhe.

A 8-OHdG é considerada um importante marcador de oxidação ao DNA desencadeado pelo estresse oxidativo (VORILHON et al., 2018). Este aparente conflito pode indicar que PB a 40 ng/mL apresenta algum efeito genotóxico intermediário, mas transitório em comparação com 80 ng/ mL, a maior concentração testada aqui. Essa interpretação é reforçada pelos resultados sobre os efeitos do PB a 40 ng/mL na modulação da apoptose. Os resultados aqui descritos sugerem que o PB induziu apoptose, como relatado anteriormente em estudos *in vivo* em ratos (WOLFE et al., 2000, LI et al., 2000). De fato, apesar do aumento dos eventos apoptóticos, quando comparado com o grupo não tratado, este efeito foi intermediário ao das células expostas ao PB a 80 ng/mL. Portanto, o conjunto dos resultados sugere que, apesar de concentrações menores do PB causarem algum nível de estresse oxidativo e dano de DNA, o mesmo é transitório e potencialmente reversível

provavelmente por mecanismos antioxidantes endógenos presentes nas próprias células neurais.

Também foi aqui avaliado o efeito do PB no estado proliferativo das células SHSY-5Y. Em culturas de 72 horas pós exposição ao PB, as células exibiram um maior nível de proliferação celular e atividade mitocondrial quando comparadas ao grupo controle, incluindo culturas expostas a concentração máxima deste fármaco que foi aqui testada (80 ng/mL). Os efeitos do PB na proliferação celular foram corroborados pelo aumento da expressão gênica da telomerase.

A telomerase é uma enzima que mantém os telômeros em células em divisão usando um modelo em seu componente de RNA inerente. Investigações têm sugerido que a ativação desta enzima poderia estar relacionada a processos de neurogênese em neurônios oriundos de cérebros envelhecidos (LEE et al., 2012). Segundo revisão conduzida por Miwa e Saretzki (2017), além da regeneração dos telômeros, outros estudos descreveram que a parte de proteína TERT (Transcriptase Reversa da Telomerase) poderia realizar outras funções adicionais nas células. Por exemplo, teria a capacidade de atuar em células expostas ao estresse oxidativo, via proteção das mitocôndrias, do aumento nos danos no DNA e da apoptose. Recentemente foi demonstrado que a proteína TERT persiste em neurônios adultos no cérebro, possivelmente possuindo uma função protetora nessas células pós-mitóticas (MIWA e SARETZKI, 2017).

Investigações anteriores como a conduzida por Hasoi et al (2016) descreveram super expressão do gene da telomerase em células SHSY-5Y estressadas. Os autores também sugeriram que a inibição da atividade da telomerase poderia aumentar a vulnerabilidade das células à morte. A promoção da apoptose por encurtamento dos telômeros quando células SHSY-5Y são expostas a certas moléculas antitumorais também foi descrita (TIAN et al., 2014). Portanto, é possível que, o PB tenha uma ação inicial cito-genotóxica, que é transitória e suficiente para gerar uma resposta protetora das células neurais, via indução dos níveis de telomerase. Como foi observado aumento na taxa de proliferação celular, parece que este mecanismo poderia ser benéfico quando células neurais fossem expostas a doses iguais ou menores do que 40 ng/mL.

Poderiam haver outras explicações para o efeito proliferativo das células SHSY-5Y após a exposição ao PB. Considerando que danos maiores ao DNA foram observados principalmente em culturas expostas a maior concentração 80 ng/mL,

mutações acumuladas ou regulações gênicas diferenciais desencadeadas pelo PB poderiam ter estimulado as células SHSY-5Y a apresentar um fenótipo semelhante ao câncer. Além disso, uma consideração que é relevante salientar é a regulação do gene da caspase 8 nas células expostas ao PB. As células expostas ao PB a 40 e 80 ng/mL exibiram uma significativa diminuição no gene da caspase 8, que é crucial na via apoptótica da caspase, uma vez que regula e inicia a morte celular programada através das vias apoptóticas intrínseca e extrínseca (TUMMERS et al., 2017). No entanto, há evidências de que a regulação negativa da caspase 8 poderia estar associada à progressão dos tumores cerebrais. Também foi relatado que a perda de caspase 8 por meio do fenômeno epigenético de metilação no neuroblastoma está associada a um aumento da resistência à quimioterapia (TEITZ et al., 2001).

Entretanto, existe uma aparente contradição entre estes resultados e os que mostram aumento nos níveis da proteína p53 em células neurais expostas ao PB. Como de fato ocorreu tal aumento, estes resultados novamente sugerem que o PB afeta transitoriamente o estado genotóxico da célula, mas que esta condição é revertida via aumento nos níveis de p53 que acabam induzindo apoptose nas primeiras horas de exposição, com posterior estímulo a taxa de proliferação celular das células sobreviventes. Porém a qualidade genômica destas células teria que ser estimada a partir de estudos complementares. Aqui é importante salientar que, evidências epidemiológicas obtidas a partir do seguimento de soldados que participaram da GWI sugeriram maior risco de câncer cerebral nesta população (WHITE et al., 2016). Entretanto, novamente é possível que tal risco esteja justamente associado a interação entre o PB e outros fármacos. Esta afirmativa é indiretamente corroborada por trabalhos que relatam, justamente o uso clínico do PB no tratamento da neuropatia de pacientes com câncer tratados com o quimioterápico vincristina, incluindo pacientes pediátricos. Este tratamento, que aparentemente é seguro é realizado por que a vincristina é um quimioterápico que, em alguns pacientes pode induzir ptose unilateral (AKBAYRAM et al., 2010; OZYUREK et al., 2007).

Os resultados obtidos no primeiro estudo sugeriram que a exposição de células neurais ao PB sem outros estressores químicos e físicos não causa toxicidade extensiva em células neurais que possa explicar os sintomas clínicos observados na GWI, e que envolvem alterações neurodegenerativas e neuropsiquiátricas.

Por sua vez, os dois estudos complementares aqui conduzidos buscaram elucidar se um desbalanço oxidativo S-HP gerado por fatores endógenos como

polimorfismo Val16AlaSOD2 poderia alterar a resposta cito-genotóxica induzida pela exposição ao PB. O primeiro deles foi realizado com amostras de CMSPs de voluntários portadores de diferentes genótipos da SOD2. É importante salientar que, além destas células serem diretamente expostas as concentrações do PB que circulam na corrente sanguínea, as células imunes mononucleares, especialmente os linfócitos possuem atividade da AChE (FUJII et al., 2017). Deste modo, o PB poderia estar afetando não só a cito-genotoxicidade celular, mas também a função destas células.

Em geral, os resultados obtidos nestas células com diferentes genótipos da SOD2 indicaram que o desbalanço S-HP poderia afetar a inibição da AChE pelo PB e também a cito-genotoxicidade. Em termos funcionais, as CMSPs portadoras do alelo A foram mais responsivas à inibição da AChE quando comparadas com as células VV. Por outro lado, quando expostas ao PB, estas mesmas células AA apresentaram maior número de marcadores citotóxicos elevados em comparação com as células VV. Estes resultados sugeriram potencial interação entre o PB e o estado oxidativo basal influenciado endogenamente pelo polimorfismo Val16AlaSOD2, e por este motivo são a seguir discutidos em maior profundidade.

Organofosforados são considerados agentes potencialmente tóxicos, entretanto seu impacto na população não é uniforme. Assim, a hipersensibilidade química a exposição a organofosforados e aos inibidores da AChE está bem estabelecida apresentando efeitos tóxicos e neurotóxicos distintos. Em geral, esses efeitos dependem da frequência e dose de exposição, do tipo químico da droga e dos fatores endógenos do hospedeiro que podem exercer alguma influência na suscetibilidade e sensibilidade (MANGAS et al., 2017). Apesar destas evidências ainda são bastante incipientes os estudos que envolvem exposição a organofosforados e polimorfismos genéticos.

Entre estas, os estudos prévios parecem ter se concentrado no efeito de variações genéticas no gene da paraoxonase (PON1) que degrada estas moléculas (COSTA et al, 2003; MARSILLACH et al., 2016; TAWFIK et al., 2016). Estudos realizados com veteranos da GWI e trabalhadores agrícolas revelaram polimorfismo no gene da paraoxonase (PON1), que produz uma enzima que hidrolisa ésteres de arila, lactonas e organofosfados. Indivíduos com capacidade reduzida de catalisar organofosforados eram mais suscetíveis a efeitos adversos e neuromorbidades associadas à exposição a organofosforados (COSTA et al., 2003; MACKENZIE et al.

2010; ROSE et al., 2005). Somente uma única investigação prévia descreveu a sensibilidade aguda do PB a um polimorfismo encontrado na região promotora da AChE (SHAPIRA et al., 2000).

Neste sentido, a revisão da literatura conduzida para a realização do presente estudo não foi capaz de identificar investigações envolvendo polimorfismos genéticos associados ao metabolismo oxidativo e a exposição ao PB. Como o polimorfismo aqui investigado, localizado no gene da enzima SOD2 tem sido associado ao risco de diversas doenças e a um desbanço basal S-HP (BRESCIANI et al., 2013; 2015) a potencial influência na cito-genotoxicidade causada via exposição poderia ser esperada.

No entanto, antes de destacar as diferenças na citotoxicidade do PB entre os diferentes genótipos da SOD2, é importante considerar que ocorreram efeitos semelhantes em CMSPs tratados com PB independente de genótipo Val16Ala-SOD2. Por exemplo, não foram observadas diferenças nos níveis de ROS e NO em culturas de células de 24 horas expostas ao PB em diferentes concentrações. No entanto, foi observado um aumento nos níveis de todas as enzimas antioxidantes avaliadas (SOD, CAT e GPX), e concomitante nos níveis de oxidação do DNA. Estes resultados corroboraram a pouca influência do PB em alguns indicadores de cito-genotoxicidade, independente do desbalanço basal S-HP que as CMSPs apresentavam.

Além disso, os resultados não indicaram ocorrência de apoptose por via intrínseca que envolve modulação diferencial da expressão de genes e proteínas Bax e Bcl-2. Nas células a via das caspases que incluem ativação das caspases 3 e 8 estão ativas em ambas as vias apoptóticas intrínseca e extrínseca, e os níveis de proteína dessas moléculas foram diminuídos nas células expostas ao PB na concentração de 60 ng/mL, o que sugere que o fármaco não causa danos extensivos ao DNA que justifica-se a ocorrência da ativação da via das caspases nas CMSPs.

Novamente, os resultados deste segundo estudo sugerem que o PB poderia desencadear alterações transitórias no equilíbrio redox de CMSPs, que seria compensado pela modulação das enzimas antioxidantes endógenas, levando a uma redução concomitante dos níveis de oxidação do DNA nas células. No entanto, é provável que os eventos compensatórios tenham um certo limiar, que, quando o mesmo é excedido poderia resultar em aumento da citotoxicidade induzida pelo fármaco. Também é possível que as interações entre PB e outras variáveis químicas ou físicas poderiam diminuir o limiar não tóxico do PB, exacerbando assim seus efeitos tóxicos. Isso pode explicar porque os CMSPs AA são mais sensíveis à exposição ao

PB. Entretanto, estas interações precisam ser estudadas a partir de investigações complementares.

Apesar do PB não causar genotoxicidade, os resultados mostraram que as CMSPs AA foram mais sensíveis à exposição ao PB em comparação com as células AV e VV. Essas células apresentaram maior taxa de mortalidade quando expostas ao PB na concentração de 60 ng/mL. Por outro lado, células portadoras do alelo-V permaneceram viáveis em tal concentração. AA-CMSPs também apresentaram maior nível de carbonilação de proteínas e danos ao DNA quando expostos a todas as concentrações de PB. Em geral, o PB desencadeia alterações no balanço redox, como observado através do aumento de enzimas antioxidantes induzido pela exposição ao PB, e pela diminuição dos níveis de oxidação do DNA quantificados pela 8-OHdG. Embora esse padrão tenha sido observado em todos os genótipos da SOD2, os genes das enzimas antioxidantes diminuíram nas células VV e AV, aumentaram nas células do genótipo AA. As células AA também mostraram aumento da expressão de todos os genes apoptóticos quando expostos a concentrações de 40 e 60 ng/mL do PB. O gene da enzima de reparo do DNA também foi regulado positivamente nessas células quando exposto a todas as concentrações de PB.

A alta sensibilidade das células AA a exposição ao PB possivelmente está relacionada com as especificidades estruturais e funcionais da SOD2 induzida por tal genótipo. Vale lembrar que a SOD2 produzida via genótipo AA tem maior permeabilidade a membrana mitocondrial em decorrência da forma alfa-hélice da sua proteína e, portanto é virtualmente mais ativa e eficiente do que a SOD2 produzida a partir dos genótipos VV e AV (BRESCIANI et al., 2013).

Enquanto o alelo A aumenta a atividade da SOD2, seu fenótipo não é completamente benéfico para as células, uma vez que a alta taxa de dismutação do radical  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  não é balanceada por um aumento na enzima GPX, que reduz o  $H_2O_2$  livre a  $H_2O$  e  $O_2$ . Como resultado, o polimorfismo Val16Ala-SOD2 desencadeia um desequilíbrio oxidativo basal, em que o genótipo VV está associado a níveis mais elevados de  $O_2^-$  e o genótipo AA está associado a níveis mais elevados de  $H_2O_2$ . Como o  $H_2O_2$  é uma molécula solúvel em membrana, pode entrar facilmente no citoplasma e reagir com metais como o  $Fe^{++}$  para produzir outras EROs. Uma dessas espécies é o radical  $OH^-$ , que tem alta afinidade pelo DNA e pode causar extensos danos oxidativos (BRESCIANI et al., 2013).

Por essa razão, vários estudos têm sugerido associação entre o alelo A e/ou genótipo AA com maior risco de desenvolvimento de certos tipos de câncer, como próstata, mama, linfoma não-Hodgkin, câncer de pulmão e câncer colorretal (KANG et al., 2015; LI et al., 2016). Além disso, estudos sugeriram que CMSPs portadoras da variante A / AA- poderiam ser mais sensíveis a agentes ambientais incluidos na radiação UV (MONTAGNER et al 2010), exposição ao metil mercúrio (ALGARVE et al., 2013), exposição a campos eletromagnéticos estáticos (DORNELLES et al., 2017). Por outro lado, o polimorfismo Val16AlaSOD2 também parece afetar *in vitro* a resposta das CMSPs expostas a alguns fármacos e moléculas bioativas (BARBISAN et al., 2014; CAPELETO et al., 2015; COSTA et al., 2012; DUARTE et al., 2016; SCHOTT et al., 2017).

Por outro lado, as CMSPs portadoras do genótipo AA apresentaram uma maior eficácia do PB frente a inibição da AChE. Assim, o conjunto destes resultados sugeriu interação entre o PB e o polimorfismo Val16Ala-SOD2 sugerindo potencial efeito farmacogenético relacionado tanto a eficácia quanto a segurança deste fármaco. Estes resultados abrem a possibilidade de estudos populacionais envolvendo pacientes portadores de MG e de outros distúrbios da placa neuromotora que apresentam sensibilidade ou resistência ao uso do PB.

Por outro lado, é importante explorar também os resultados que sugeriam efeito citoprotetor do PB em células portadoras dos genótipos VV e AV. Nestas, a exposição ao PB reduziu significativamente a mortalidade celular, principalmente na concentração de 60 ng/mL. Além disso, tal exposição não afetou ou melhorou os níveis de carbonilação de proteínas e a oxidação do DNA dessas células. Novamente, é importante considerar o papel do alelo-V na função SOD2. De fato, espera-se que o desequilíbrio de O<sub>2</sub><sup>-</sup> esteja presente nas células VV devido à baixa atividade da SOD2 (BRESCIANI et al., 2013). Evidências pregressas têm sugerido que o genótipo VV poderia estar associado a um maior risco de desenvolvimento de doenças metabólicas, como é o caso da obesidade (MONTANO et al., 2009), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2010). Esta variante genética também pareceria aumentar o risco de complicações do diabetes mellitus tipo 2, em especial retinopatias e nefropatias (HUANG et al., 2017; PAPATHEODOROU et al., 2016).

Além do potencial risco de morbidades metabólicas e disfunções associados ao genótipo VV, também parece apresentar efeito farmacogenético associado a redução da eficácia de fármacos, como é o caso da rosuvastatina utilizada em

pacientes dislipidêmicos (DUARTE et al., 2016). O estudo de potenciais mecanismos subjacentes à associação entre o genótipo VV e as morbidades parece envolver alterações que levam ao estabelecimento de estados inflamatórios crônicos de baixo-grau (BARBISAN et al., 2017). Esta associação possivelmente é desencadeada por reações que ocorrem entre excesso de  $O_2^-$  e NO que produzem ONOO<sup>-</sup> e aumentam os danos oxidativos, em especial a lipoperoxidação da membrana. De fato, a ocorrência de peroxidação lipídica, por si só é considerada uma condição pró-inflamatória uma vez que gera resíduos celulares que podem ativar células imunes (KALOUSOVÁ et al., 2005). Apesar da sua associação entre o genótipo VV e estados pró-inflamatórios os resultados aqui obtidos não indicam que tal genótipo seria negativamente afetado pela exposição ao PB. Deste modo, estudos complementares poderiam ser conduzidos na tentativa de esclarecer se, o PB poderia de algum modo também regular positivamente estados pró-inflamatórios associados com o desbalanço S-HP, em especial em células portadoras do genótipo VV.

Em síntese, os resultados deste segundo estudo sugeriram que a exposição ao PB pode modular transitoriamente o metabolismo redox das CMSP, sendo que fatores genéticos que aumentam os níveis de  $H_2O_2$ , como o genótipo AA-SOD2, poderiam intensificar a eficácia do PB na inibição da AChE, mas também aumentar os potenciais efeitos citotóxicos deste fármaco. Por outro lado, fatores genéticos que conduziriam a um aumento nos níveis de  $O_2^-$  poderiam estar relacionados a algum nível de resistência a atividade inibidora da enzima AChE pelo PB. Será que estes resultados também seriam similares na placa motora onde o PB tem sua ação farmacológica? Esta é uma questão em aberto, que precisa ser melhor investigada, ainda que os resultados aqui descritos sugeriram efeito farmacogenético relevante do polimorfismo Val16Ala-SOD2 em relação a exposição ao PB.

Considerando tais resultados, o terceiro estudo foi conduzido para avaliar o efeito do desbalanço S-HP na indução de cito-genotoxicidade do PB em células neurais SHSY-5Y. Para tanto, inicialmente foi estabelecido um modelo farmacológico *in vitro* de desbalanço S-HP baseado em protocolos similares descritos previamente por Dal Berto et al (2015) e Azzolin et al (2016) em células cancerosas. Os resultados iniciais confirmaram a ocorrência de desbalanço oxidativo desencadeado pela exposição ao paraquat e à porfirina nas células neurais. Além disto, os resultados também sugeriram que tal desbalanço teria efeito diferencial na inibição da enzima AChE pela exposição ao PB. Cabe aqui salientar que, as células de neuroblastoma

SHSY-5Y possuem um fenótipo “neurônio-*like*”, mas em estado indiferenciado, apresentam um fenótipo colinérgico (SANTILLO e LIU, 2015; WEISER, 2009). Portanto, elas podem ser utilizadas para análises relacionadas a eficiência e segurança da exposição ao PB.

Os resultados mostraram que, em células AA-*like* expostas ao PB induziu maior dano de DNA em culturas de 24horas, enquanto que nas células VV-*like* este efeito não foi tão intenso e significativo. Esses resultados poderiam ser explicados pelo fato de que as células sobreviventes poderiam ser responsivas ao estresse oxidativo desencadeado pela interação entre o desbalanço S-HP e o PB pelo aumento dos níveis de enzimas antioxidantes e subsequente diminuição dos níveis de oxidação do DNA. Considerando que o gene de reparo do DNA, DNMT1 foi regulado positivamente em células VV-*like*, mas não em células AA-*like*, é possível inferir que estas últimas apresentam maior taxa de dano de DNA sem que ocorra retroalimentação positiva da enzima de reparo. Taxas de maior dano de DNA em células portadoras do genótipo AA têm sido descritas em estudos prévios e associadas principalmente ao risco de câncer (BRESCIANI et al., 2013; 2015).

Entretanto, na revisão de literatura realizada, não foram identificados estudos mostrando efeito do genótipo AA na modulação de enzimas de reparo do DNA. Neste sentido, parece que o genótipo AA aumenta os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não ocorrendo nem aumento subsequente dos níveis da enzima GPX que poderiam diminuir os efeitos negativos desta EROs, e nem aumento na expressão da enzima de reparo DNMT1 que poderia, em um segundo momento prevenir danos genotóxicos causados pela elevação principalmente nos níveis do radical OH<sup>-</sup> produzidos a partir da reação de fenton no citoplasma.

Os resultados obtidos a partir da análise conduzida no terceiro estudo poderiam também apresentar implicações no desenvolvimento de alguns dos sintomas neurológicos observados nos soldados da GWI e também na eficácia e segurança do uso do PB por pacientes com MG e outras condições neurológicas. Entretanto, uma questão que emerge diz respeito de como o PB poderia estar atuando no SNC, se este fármaco tem muito baixa permeabilidade a barreira sangue-cérebro. Na realidade, investigações anteriores sugeriram que, sob certas condições ambientais ou clínicas, a permeabilidade da barreira sangue-cerebro poderia ser alterada, o que permitiria que o PB penetrasse no cérebro. Segundo autores que conduziram estes estudos prévios, nesse órgão, o PB poderia facilmente modificar a excitabilidade

cortical levando a alterações duradouras na expressão gênica (FRIEDMAN et al., 1996; SINTON et al., 2000; PAVLOVSKY et al., 2003). Esta ação poderia ser diretamente desencadeada pela interação do PB e outras moléculas químicas, que deste modo poderia afetar diretamente as funções neuronais (KERR et al., 2015). Neste contexto, apesar do estudo aqui ter sido conduzido *in vitro*, os resultados descritos em células neurais expostas ao desbalanço S-HP podem ser considerados relevantes.

Entretanto, é importante considerar que, nestas células parece que o efeito do desbalanço S-HP foi mais atenuado em comparação com o efeito observado em CMSPs portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Val16AlaSOD2. Por exemplo, não foi observado efeito sobre a ocorrência de apoptose celular considerando as duas vias intrínsecas e extrínsecas. Para explicar a citotoxicidade observada nas células neurais, é possível inferir que a interação entre o desbalanço S-HP com PB poderia ser por outros eventos de morte celular como é o caso da piroptose e um excesso descontrolado de autofagia. Existem outras vias que induzem morte celular que são independentes da rota das caspases incluindo a existência de canais que estão estrategicamente localizados. Os canais iônicos podem conduzir as células a apoptose, resultando em morte celular silenciosa, isto é, em uma morte imunologicamente não reconhecida. Por outro lado, a alteração nestes canais pode induzir o aumento celular, a desintegração da membrana celular e a morte celular necrótica que é altamente imunogênica (KUNZELMANN, 2016). Deste modo, investigações complementares relacionadas com outros mecanismos de apoptose induzidos pela interação entre o desbalanço S-HP e a exposição ao PB precisam ser conduzidas para elucidar este aspecto.

Uma análise complementar observou potencial interação entre a exposição ao PB e o desbalanço S-HP na atividade inibitória da AChE. No caso, células VV-*like* foram menos responsivas a inibição da AChE induzida pela exposição ao PB do que as células neurais AA-*like* que apresentaram efeito inibitório similar ao descrito por Azzolin et al (2017) no primeiro artigo deste trabalho. Mudanças na eficácia de drogas associadas ao desequilíbrio de O<sub>2</sub><sup>-</sup> encontradas em indivíduos portadores do genótipo VV-SOD2 têm sido descritas na literatura a partir de estudos *in vivo* e *in vitro* (COSTA et al., 2012; BARBISAN et al., 2014; DUARTE et al., 2017; BARBISAN et al., 2018). É possível que esse equilíbrio também possa estar associado à baixa tolerância do PB

por alguns pacientes com MG que sofrem efeitos adversos desencadeantes desse fármaco (Li et al., 2016).

Em síntese, os resultados oriundos do terceiro estudo aqui conduzido sugerem que o desbalanço S-HP associado ao PB modula diferencialmente a citotoxicidade em células neurais, ocorrendo maior sensibilidade das células AA-*like* ao PB do que nas células VV-*like*. Além disso, os resultados corroboram a hipótese de que a interação entre PB e outras drogas que provocam o estresse oxidativo pode apresentar efeitos negativos sobre as células do corpo, especialmente os neurônios. Desta forma, não se descarta que a interação entre o desbalanço S-HP e a exposição ao PB poderia contribuir para o desenvolvimento dos sintomas neurológicos relacionados aos da GWI.

Finalmente, é importante destacar que, apesar das limitações metodológicas associadas a estudos *in vitro* que impossibilitam, por exemplo análise de efeitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos de fármacos como a PB, o conjunto dos resultados sugere que desbalanços endógenos causados por variantes genéticas associadas ao metabolismo oxidativo poderiam contribuir no desenvolvimento da doença da GWI e também na eficácia e segurança no uso deste fármaco por pacientes portadores de MG e de outras morbidades que afetam a placa neuromotora.

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e apresentados sob a forma de três artigos científicos concluiu-se que:

O PB afeta *in vitro* a cito-genotoxicidade e a atividade da enzima AChE de células neurais SHSY-5Y, de um modo concentração-dependente, apresentando diminuição na viabilidade celular, aumento do estresse oxidativo e apoptose principalmente quando as mesmas foram expostas a maior concentração testada. Como ocorreu aumento na taxa de proliferação celular parece que os efeitos oxidativos desencadeados pela exposição ao PB são transitórios e reversíveis nestas células neurais.

A cito-genotoxicidade e eficácia na inibição da AChE induzida pela exposição ao PB foi diretamente modulada pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2 que altera o estado oxidativo basal das CMSPs. No caso, células com maior produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram maior sensibilidade cito-genotóxica ao PB, enquanto que células com maior produção basal do ânion O<sub>2</sub><sup>-</sup> apresentaram maior resistência a inibição da enzima AChE. Estes resultados sugerem potencial efeito farmacogenético do desbalanço S-HP na eficácia e segurança do PB.

A cito-genotoxicidade e eficácia da inibição da AChE induzida pelo PB em células neurais SHSY-5Y foi modulada pelo desbalanço oxidativo S-HP nestas células causado pela exposição prévia ao paraquat, que aumenta os níveis do ânion O<sub>2</sub><sup>-</sup> e a porfirina, que aumenta os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, esta interação não aumentou os níveis de apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca, sugerindo que o PB em interação com o desbalanço S-HP poderia induzir outros tipos de morte celular. Os resultados também corroboraram a resistência de células com níveis elevados do ânion O<sub>2</sub><sup>-</sup> a inibição da enzima AChE.

O conjunto dos resultados, a despeito das limitações metodológicas relacionadas a estudos *in vitro*, sugere que a eficácia e toxicidade ao PB é influenciada pela interação com o desbalanço oxidativo S-HP indicando potencial efeito toxicogenético e farmacogenéticos deste fármaco. Os resultados aqui apresentados podem contribuir potencialmente na elucidação da interação entre o PB e agentes que induzem estresse oxidativo, e também podem ser relevantes para a área clínica e epidemiológica relacionada ao uso de inibidores da AChE como agentes terapêuticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABOU-DONIA, M.B. et al. Testicular germ-cell apoptosis in stressed rats following combined exposure to pyridostigmine bromide, N,N-diethyl m-toluamide (DEET), and permethrin. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, v. 66, n. 1, p. 57–73, 2003.
- AKBAYRAM, S. et al. Use of pyridoxine and pyridostigmine in children with vincristine-induced neuropathy. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 77, n. 6, p. 681–683, 2010.
- ALGARVE, T. D. et al. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 12, n. 4, p. 5134–44, 2013.
- AQEL, W.; MOHAMED, A.D. Combined exposure to sarin and pyridostigmine bromide increased levels of rat urinary 3-nitrotyrosine and 8-hydroxy-2\_-deoxyguanosine, biomarkers of oxidative stress. **Toxicology Letters**, v. 123, p. 51–58, 2001.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V.L.A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.
- ASSIS, J.L. Treatment of severe forms of myasthenia by intravenous administration of ACTH. **Archive Neuro-psiquiatry**, v. 18, p. 359-370, 1960.
- AZZOLIN, V. F. et al. Effects of Pyridostigmine bromide on SH-SY5Y cells: An in vitro neuroblastoma neurotoxicity model. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 823, p. 1–10, 2017.
- AZZOLIN, V.F. et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. **Toxicology in Vitro**, v. 32, p. 8-15, 2016.
- BAG, A.; BAG, N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: A review. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 17, n. 12, p. 3298–3305, 2008.
- BARBISAN, F. et al. Genetic or pharmacological superoxide-hydrogen peroxide imbalances modulate the in vitro effects of lithium on glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . **Gene**, v. 655, p. 48–55, 2018.
- BARBISAN, F. et al. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

BARBISAN, F. *et al.* The in Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence. **Rejuvenation Research**, v. 20, n. 4, 2017.

BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation Research**, v.10, p. 215-223, 2007.

BARTOLINI, A.; DI CESARE MANNELLI, L.; GHELARDINI, C. Analgesic and antineuropathic drugs acting through central cholinergic mechanisms. **Recent patents on CNS drug discovery**, v. 6, n. 2, p. 119–140, 2011.

BEAR, M. F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociência, desvendando o sistema nervoso**. 3<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, 2008. 845.p.

BERGMANN, F.; WILSON, I. B.; NACHMANSOHN, D. Acetylcholinesterase. IX. Structural features determining the inhibition by amino acids and related compounds. **The Journal of biological chemistry**, v. 186, n. 2, p. 693–703, 1950.

BERRÍOS, V.O. *et al.* Paraoxon and Pyridostigmine Interfere with Neural Stem Cell Differentiation. **Neurochemical Research**, v.40, p.2091–2101, 2015.

BICA, C.G. *et al.* MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. **Pathology Oncology Research**, v.15, p.19-24, 2009.

BICA, C.G. *et al.* Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. **Cancer Genetic Cytogenetic**, v. 15, p. 153-58, 2010.

BRENNER, T. The role of readthrough acetylcholinesterase in the pathophysiology of myasthenia gravis. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 2, p. 214–222, 2003.

BRESCIANI, G. *et al.* The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radical Research**, v. 47, n. 10, p. 781-792, 2013.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BUDIHARDJO, I. *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 15, p. 269-90, 1999.

CAPELETO, D. *et al.* The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. **Biogerontology**, v. 16, n. 5, p. 621–630, 2015.

CARRERAS, I. *et al.* Corrigendum to “Anxiety, neuroinflammation, cholinergic and GABAergic abnormalities are early markers of Gulf War illness in a mouse model of the disease”. **Brain Research**, v. 1688, p. 113–115, 2018.

- CASTRO, B.M. et al. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, p. 23–35, 2009.
- COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.
- COOK, M. R. et al. Physiological and performance effects of pyridostigmine bromide in healthy volunteers: A dose-response study. **Psychopharmacology**, v. 162, n. 2, p. 186–192, 2002.
- COSTA, F. et al. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 24, n. 4, p. 474–481, 2012.
- COSTA, L.G. et al. Functional Genomics of the Paraoxonase (PON1) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism. **Annual Review of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 371–392, 2003.
- DAL BERTO, M. et al. The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis. **Medicine Oncology**, v. 32, p. 1-10, 2015.
- DA COSTA ARALDI, I. C. et al. The in vitro radiosensitizer potential of resveratrol on MCF-7 breast cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 282, p. 85–92, 2018.
- DESAGHER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 369-76, 2000.
- DORNELLES, E.B. et al. Cytotoxic effects of moderate static magnetic field exposure on human periphery blood mononuclear cells are influenced by Val16Ala-MnSOD gene polymorphism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 5, 2017.
- DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1737–1745, 2009.
- DUARTE, M.M. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clinical. Biochemical**, v.43, n.13-14, p.1118-1123, 2010.
- DUARTE, T. et al. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytic blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism. **Pharmacogenomics Journal**, v. 16, n. 6, p. 501–506, 2016.
- DUARTE, T. et al. Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response in vitro. **Cytokine**, 2017.

DUSSE, L.M.I.; VIERA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia Médico Laboratorial*, v. 39, n.4, p.343-350, 2003.

ERMOLAEVA, M.A.; SCHUMACHER, B. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability. *Trends in Genetics*, v.30, n.3, p. 95-102, 2014.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free Radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Revista da Associação Medélica Brasileira*, v.43, n.1, 1997.

FIFER, E. K. **Em Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 6 ed. Lemke, T. L.; Williams, D. A. Lippincott Williams & Wilkins, 2007, 769 p.

FITO, M. L. A., et al. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes. Metab*, v. 9, p. 813-839, 2007.

FLORES, A. E. et al. ALA16VAL-MnSOD gene polymorphism and stroke: Association with dyslipidemia and glucose levels. *Gene*, v. 627, p. 57–62, 2017.

FRIEDMAN, A. et al. Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. *Nature Medicine*, v. 2, n. 12, p. 1382–1385, 1996.

FUJII, T. et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 134, n. 1, p. 1–21, 2017.

GARCÍA-CARRASCO, M et al. Therapeutic options in autoimmune myasthenia gravis. *Autoimmunity Reviews*, v. 6, n. 6, p. 373–378, 2007.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 166–185.

GOLOMB, B. A. Acetylcholinesterase inhibitors and Gulf War illnesses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 11, p. 4295–4300, 2008.

GORDON, J. J. et al. The delayed neuropathic effects of nerve agents and some other organo-phosphorus compounds. *Archives of Toxicology*, v. 52, n.2, p. 71-82, 1983.

GOTTLIEB, M.G. et al. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genetics and molecular research*, v.4, n.4, v. 691-703, 2005.

GOUGE, S. F.; DANIELS, D. J.; SMITH, C. E. Exacerbation of asthma after pyridostigmine during Operation Desert Storm. *Mil Med*, v. 159, n. 2, p. 108–111, 1994.

- GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 110-118, 2004.
- GRIENDLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, n. 16, p. 1912–1916, 2003.
- GUEVARA, J.L.; DE PUEYO, V.M. **Toxicología médica: clínica y laboral**. 1ed. Madri: Madrid: Interamericana, McGraw-Hill. 1995, 416 p.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiología médica**. 11<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 750.p.
- HALEY, R W.; KURT, T L. Self-reported exposure to neurotoxic chemical combinations in the Gulf War. A cross-sectional epidemiologic study. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 277, n. 3, p. 231–237, 1997.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-76, 2000.
- HEPNAROVA, V. *et al.* The concept of hybrid molecules of tacrine and benzyl quinolone carboxylic acid (BQCA) as multifunctional agents for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 292–306, 2018.
- HOLSTEGE, C. P.; KIRK, M.; SIDELL, F. R. Chemical warfare: nerve agent poisoning. **Critical Care Clinics**, v.13, p.923, 1997.
- HOSOI, T. *et al.* Inhibition of telomerase causes vulnerability to endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death. **Neuroscience Letters**, v. 629, p. 241–244, 2016.
- HUANG, D. *et al.* Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- INOUE, K.; OLIVEIRA, G. H. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para Doença de Alzheimer. **Infarma**, v.15, n. 12, p. 1-5, 2004.
- JANULEWICZ, P. A. *et al.* Neuropsychological characteristics of Gulf War illness: A meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 2017.
- JEGGO, P. A.; PEARL, L. H.; CARR, A.M. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 35-42, 2016.
- JENROW, K. A. *et al.* Selective Inhibition of Microglia-Mediated Neuroinflammation Mitigates Radiation-Induced Cognitive Impairment. **Radiation Research**, v. 179, n. 5, p. 549–556, 2013.

JIN, B.; ROBERTSON, K. D. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 754, p. 3–29, 2013.

KALOUSOVÁ, M. et al. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases - Clinical chemistry and genetic background. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1–2, p. 37–46, 2005.

KANG, J.H. et al. Primary mantle cell lymphoma of the nasopharynx: A rare clinical entity. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 81, n. 4, p. 447–450, 2015.

KANG, S. W. Superoxide dismutase 2 gene and cancer risk: Evidence from an updated meta-analysis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 9, p. 14647–14655, 2015.

KAUFER, D. et al. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. **Nature**, v. 393, n. 6683, p. 373–377, 1998.

KERR, K. J. Gulf War illness: An overview of events, most prevalent health outcomes, exposures, and clues as to pathogenesis. **Reviews on Environmental Health**, v. 30, n. 4, p. 273–286, 2015.

KHAN, F. et al. Peripheral cholinergic function in humans with chronic fatigue syndrome, Gulf War syndrome and with illness following organophosphate exposure. **Clinical Science**, v. 106, n. 2, p. 183–189, 2004.

KIM, J. Y.; PARK, K. D.; RICHMAN, D.P. Treatment of myasthenia gravis based on its immunopathogenesis. **Journal of Clinical Neurology (Korea)**, v. 7, n. 4, p. 173–183, 2011.

KIRAZ, Y. et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 8471–8486, 2016.

KNIGHT, R. et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effectiveness of Acetylcholinesterase Inhibitors and Memantine in Treating the Cognitive Symptoms of Dementia. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Guidelines**, v. 45, n.3, p. 131-151, 2018.

KODALI, M. et al. Curcumin treatment leads to better cognitive and mood function in a model of Gulf War Illness with enhanced neurogenesis, and alleviation of inflammation and mitochondrial dysfunction in the hippocampus. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 69, p. 499–514, 2018.

KOHMAN, R. A.; RHODES, J.S. Neurogenesis, inflammation and behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 27, n. 1, p. 22–32, 2013.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr**, v. 16, p. 433-441, 2003.

- KUNZELMANN, K. Ion channels in regulated cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11–12, p. 2387–2403, 2016.
- LANNI, C. et al. P53 at the crossroads between cancer and neurodegeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1727–1733, 2012.
- LEITE, L.E.A. et al. Envelhecimento, estresse oxidativo e sarcopenia: uma abordagem sistêmica. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 15, n.2, p. 365-380, 2012.
- LENT, R. **Cem bilhões de neurônios?** Conceitos fundamentais de neurociência. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 450.p.
- LEE, S. W.; CLEMENSON, G.D.; GAGE, G. H. New neurons in an aged brain. **Behavioural Brain Research**, v. 227, n. 2, p. 497–507, 2012.
- LI, L. et al. Reactive oxygen species mediate pyridostigmine-induced neuronal apoptosis: Involvement of muscarinic and NMDA receptors. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 177, n. 1, p. 17–25, 2001.
- LI, X. et al. Gli-1/PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B pathway mediates resistance to radiation and is a target for reversion of responses in refractory acute myeloid leukemia cells. **Oncotargetic**, v. 7, n.22, p. 33004–33015, 2016.
- LI, Y. et al. Neuregulin-1 is neuroprotective in a rat model of organophosphate-induced delayed neuronal injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 262, n. 2, p. 194–204, 2012.
- MACKENZIE ROSS, S. J. et al. Neuropsychological and psychiatric functioning in sheep farmers exposed to low levels of organophosphate pesticides. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, n. 4, p. 452–459, 2010.
- MADDUX, B.A. et al. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. **Diabetes**, v. 50, p. 404–410, 2001.
- MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase.** 2006. Tese (Doutorado em Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2006.
- MAK, S.; NEWTON, G. E. The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure: radical thoughts. **Chest**, v. 120, p. 2035–2046, 2001.
- MANGAS, I.; VILANOVA, E.; ESTÉVEZ, J. Phenyl valerate esterase activity of human butyrylcholinesterase. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 10, p. 3295–3305, 2017.

MANTEGAZZA, R. et al. Current and emerging therapies for the treatment of myasthenia gravis. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 7, n. 1, p. 151–160, 2011.

MARRS, T.C. Organophosphate poisoning. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 1, p. 51–66, 1993.

MARSILLACH, J.; COSTA, L.G.; FURLONG, C. E. Paraoxonase-1 and Early-Life Environmental Exposures. **Annals of Global Health**, v. 82, n. 1, p. 100–110, 2016.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, n. 11, p.1515-1531, 2006.

MEHNDIRATTA, M. M.; PANDEY, S.; KUNTZER, T. Acetylcholinesterase inhibitor treatment for myasthenia gravis. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 10, p. CD006986, 2014.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v.407, p.796-801, 2000.

MERIGGIOLI, M. N.; SANDERS, D.B. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 475–490, 2009.

MESULAM, M. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? **Learn Mem**, v. 11, p. 43-49, 2004.

MIWA, S.; SARETZKI, G. Telomerase and mTOR in the brain: The mitochondria connection. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 3, p. 358–361, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**. Portaria SAS/MS no 229, de 10 de maio de 2010. Disponível em:  
[http://conitec.gov.br/images/Protocolos/pcdt\\_miastenia-gravis\\_2015.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/pcdt_miastenia-gravis_2015.pdf). Acesso em 15 de maio de 2018.

MONTAGNER, G.F.S. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology in Vitro**, v.24, n.5, p.1410-1416, 2010.

MONTANO, M.A. et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.328, n.1-2, p.33-40, 2009.

MONTANO, M.A. et al. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine**, v.60, n.1, p.30-33, 2012.

MORRIS, R. et al. Gait Rather Than Cognition Predicts Decline in Specific Cognitive Domains in Early Parkinson's Disease. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 72, n. 12, p. 1656–1662, 2017.

MÜLLER, T. C. et al. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. **Biochimica Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1587, n. 1, p. 92–98, 2002.

NETO, A.C. **Psiquiatria para estudantes de medicina**. 3 ed. Porto Alegre: Edipucrs, 2013.692 p.

NGUYEN, M. L.; COX, G. D.; PARSONS, S. M. Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: Two protons are exchanged for one acetylcholine. **Biochemistry**, v. 37, n. 38, p. 13400–13410, 1998.

NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.

OBAYAN, A. **Oxidative stress: Natural history and modulation in surgery and trauma patients**. 2004. 195 f. Tese (Doutorado em Filosofia) - Departamento de Cirurgia, Universidade de Saskatchewan, Saskatoon, 2004.

ODEGARD, T. N. et al. Memory impairment exhibited by veterans with Gulf War Illness. **Neurocase**, v. 19, n. 4, p. 316–327, 2013.

OKUDA, T. et al. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. **Nature Neuroscience**, v.3, p. 120-125, 2000.

OKUMURA, T. et al. Report on 640 victims of the Tokyo subway sarin attack. **Annals of Emergency Medicine**, v. 28, n. 2, p. 129–135, 1996.

OOSTERHUIS, H.G.H. The natural course of myasthenia gravis: a long-term follow up study. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**. v.52, p.1121-1127, 1989.

OZYUREK, H. et al. Pyridoxine and pyridostigmine treatment in vincristine-induced neuropathy. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 24, n. 6, p. 447–452, 2007.

PAIVA, J. T. **O uso de anticolinesterásicos empregados na miastenia gravis**. 2013. 96 p. Monografia (Curso de Graduação Bacharelado Interdisciplinar em Biossistemas) - Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del Rei, 2013.

PANASENKO, O. M.; GORUDKO, I. V.; SOKOLOV, A. V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 13, p. 1466–1489, 2013.

PAPATHEODOROU, K. et al. Complications of Diabetes 2016. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.

PARENT, M.B.; BAXTER, M.G. Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory. **Learnin & Memory**, v.11, p. 9-20, 2004.

PARIHAR, V.K. et al. Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory. **Molecular Psychiatry**, v. 16, p. 171-183, 2011.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. **UCL lecture notes**, v. 40, p. 752, 2009.

PAVLOVSKY, L.; BROWNE, R. O.; FRIEDMAN, A. Pyridostigmine enhances glutamatergic transmission in hippocampal CA1 neurons. **Experimental Neurology**, v. 179, n. 2, p. 181–187, 2003.

PEZZEMENTI, L.; NACHON, F.; CHATONNET, A. Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: An atypical butyrylcholinesterase from the medaka *oryzias latipes*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

POHANKA, M. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 2, p. 2219–2238, 2012.

POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomedical Papers**, v. 155, n. 3, p. 219–230, 2011.

PRADO, V. F. et al. Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter Are Myasthenic and Have Deficits in Object and Social Recognition. **Neuron**, v. 51, n. 5, p. 601–612, 2006.

PUNGA, A. R.; SAWADA, M.; STÅLBERG, E. V. Electrophysiological signs and the prevalence of adverse effects of acetylcholinesterase inhibitors in patients with myasthenia gravis. **Muscle & Nerve**, v. 37, n. 3, p. 300–307, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Drogas que Inibem a Cholinesterase. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.110-115.p.

RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 151-155.p.

RAO, A. N. et al. Pharmacologically increasing microtubule acetylation corrects stress-exacerbated effects of organophosphates on neurons. **Traffic**, v. 18, n. 7, p. 433–441, 2017.

RIBEIRO, F. M. et al. The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 1, p. 1–12, 2006.

RICHMAN, D. P.; AGIUS, M.A. Treatment of autoimmune myasthenia gravis. **Neurology**, v. 61, n. 12, p. 1652–1661, 2003.

RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and RODRIGUEZ-ROCHA, H. et al. DNA damage and autophagy. **Mutation Research**, v.711, p. 158-166, 2011.

ROSE, R. L. *et al.* Pesticide metabolism in humans, including polymorphisms. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, v. 31, n. SUPPL. 1, p. 156–163, 2005.

RUDICH, A. *et al.* Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. **Diabetes**, v. 47, p. 1562–1569, 1998.

SANBORN, M *et al.* Non-cancer health effects of pesticides: Systematic review and implications for family doctors. **Canadian Family Physician**, v. 53, n. 10, p. 1712–1720, 2007.

SANTILLO, M.F.; LIU, Y. A fluorescence assay for measuring acetylcholinesterase activity in rat blood and a human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 76, p. 15–22, 2015.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 528–537, 2000.

SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 48–56, 2005.

SCHOTT, K. L. *et al.* Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 18–27, 2017.

SCHUMM, F. *et al.* Serumspiegel von Pyridostigmin bei Myasthenia gravis: Methoden und klinische Bedeutung. **Fortschr Neurol Psychiatr**, v. 53, p. 201–211, 1985.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr**, v. 17, p. 227–236, 2004.

SHAPIRA, M. *et al.* A transcription-activating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 9, p. 1273–81, 2000.

SHIMODA-MATSUBAYASHI, S. *et al.* Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, n. 2, p. 561–565, 1996.

SILVA, F. C.; CARDEAL, Z. D.L.; DE CARVALHO, C. R. Determinação de pesticidas organofosforados em agua usando microextração em fase solida e CGAR-EM. **Quimica Nova**, v. 22, n. 2, p. 197–200, 1999.

SILVA, G. R. *et al.* Defesa química: histórico, classificação dos agentes de guerra e ação dos neurotóxicos. **Quimica Nova**, v. 35, n. 10, p. 2083–2091, 2012.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; PÊGAS-HENRIQUES, J.A. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, P. Em Farmacologia. 6 ed. Silva, P., Eds.; Guanabara, 2002, cap. 32.

SINTON, C.M. *et al.* Stressful manipulations that elevate corticosterone reduce blood-brain barrier permeability to pyridostigmine in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 165, n. 1, p. 99–105, 2000.

SKEIE, G. O. *et al.* Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 7, p. 893–902, 2010.

SOFUOGLU, M.; MOONEY, M. Cholinergic functioning in stimulant addiction: Implications for medications development. **CNS Drugs**, v. 23, n. 11, p. 939–952, 2009.

SOLTANINEJAD, K.; ABDOLLAHI, M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 15, n. 3, p. RA75-A90, 2009.

SPENCER, P S *et al.* Self-reported exposures and their association with unexplained illness in a population-based case-control study of Gulf War veterans. **Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine**, v. 43, n. 12, p. 1041–56, 2001.

STANDAERT, D. G.; YOUNG, A. B. Em Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap. 20.

STEDMAN, E. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. Part II. The miotic activity of urethanes derived from the isomeric hydroxybenzylidimethylamines. **Biochemical Journal**, v.23, p.17-24, 1929.

SULLIVAN, K. *et al.* Neuropsychological functioning in military pesticide applicators from the Gulf War: Effects on information processing speed, attention and visual memory. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 65, p. 1–13, 2018.

SUTTON, A. *et al.* The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetic**, v.13, n.3, p.145-157, 2003.

SUZUKI, Y.J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. Allan. Protein Carbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 3, p. 323–325, 2010.

TAUFER, M. *et al.* Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 60 a, n. 4, p. 432–438, 2005.

TAYLOR, P.; GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. 147 p.

TAWFIK KHATTAB, A. M. et al. The role of PON1 and CYP2D6 genes in susceptibility to organophosphorus chronic intoxication in Egyptian patients. **NeuroToxicology**, v. 53, p. 102–107, 2016.

TEITZ, T.; LAHTI, J.M.; KIDD, V.J. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: An important component of programmed cell death. **Journal of Molecular Medicine**, v. 79, n. 8, p. 428–436, 2001.

TÉLLEZ-ZENTENO, J. F. et al. Myasthenia gravis and pregnancy: Clinical implications and neonatal outcome. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 5, p.42, 2004.

TERRY, A. V. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 134, n. 3, p. 355–365, 2012.

THANVI, B. R.; LO, T. C.N. Update on myasthenia gravis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, n. 950, p. 690–700, 2004.

TIAN, C. Association of C47T polymorphism in SOD2 gene with coronary artery disease: a case-control study and a meta-analysis. **Molecular Biology Reports**, v.39, n.5, p.5269-5276, 2012.

TUMMERS, D.R. Caspase-8: regulating life and death. **Immunology**, v. 277, p. 76–89, 2017.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VENTURA, A. L. M. et al. Sistema colinérgico: Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 2, p. 74–80, 2010.

VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes Obesidade Metababólica** v. 9, p. 813-839, 2007.

VORILHON, S. et al. Accuracy of human sperm DNA oxidation quantification and threshold determination using an 8-OHdG immuno-detection assay. **Human Reproduction**, v. 33, n. 4, p. 553–562, 2018.

WALLACE, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science**, v. 283, p. 1482-1488, 1999.

WANG, C. et al. There is no relationship between SOD2 Val-16Ala polymorphism and breast cancer risk or survival. **Molecular and clinical oncology**, v. 7, n. 4, p. 579–590, 2017.

WEISER, T.; JUST, S. Hyoscine butylbromide potently blocks human nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, v. 450, n. 3, p. 258–261, 2009.

WHITE, R. F. *et al.* Recent research on Gulf War illness and other health problems in veterans of the 1991 Gulf War: Effects of toxicant exposures during deployment. **Cortex**, v. 74, p. 449–475, 2016.

WILSON, I. B.; BERGMANN, F. Acetylcholinesterase. VIII. Dissociation constants of the active groups. **The Journal of biological chemistry**, v. 186, n. 2, p. 683–692, 1950.

WOLFE, J. *et al.* Risk factors for multisymptom illness in US Army veterans of the Gulf War. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 44, n. 3, p. 271–281, 2002.

WU, D.; PRIVES, C. Relevance of the p53-MDM2 axis to aging. **Cell Death Differ**, v. 24, n.1, p. 169-179, 2018.

YANAGISAWA, N. *et al.* Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. **The Lancet**, v. 346, n. 8970, p. 290–293, 1995.

YU, Q. S. *et al.* Long-acting anticholinesterases for myasthenia gravis: Synthesis and activities of quaternary phenylcarbamates of neostigmine, pyridostigmine and physostigmine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 13, p. 4687–4693, 2010.

ZEJNILOVIC, J. *et al.* Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. **Cancer Genetic. Cytogenetic**, v.189, n.1, p.1-4, 2009.

ZELKO, I. N. *et.al.* Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical. Biology. Medical**, v.33, n.3, p.337-449, 2002.

ZHOU, X. *et al.* Virus infection and death receptor-mediated apoptosis. **Viruses**, v. 9, n. 11, 2017.

## ANEXO A- COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO ARTIGO 1

Mutat Res Gen Tox En 823 (2017) 1–10  
 

**Mutat Res Gen Tox En**  
 journal homepage: [www.elsevier.com/locate/genotox](http://www.elsevier.com/locate/genotox)

---

**Effects of Pyridostigmine bromide on SH-SY5Y cells: An *in vitro* neuroblastoma neurotoxicity model.**

Verônica Farina Azzolin<sup>a</sup>, Fernanda Barbisan<sup>a</sup>, Luana Sudling Lenz<sup>b</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>a</sup>, Milena Fortuna<sup>b</sup>, Thiago Duarte<sup>b</sup>, Maria Maria Prescure Medeiros Duarte<sup>b</sup>, Ivana Beatrice Minicci da Cruz<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Prédio 210, 97010-900 Santa Maria, RS, Brazil  
<sup>b</sup> Laboratório de Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Prédio 210, 97010-900 Santa Maria, RS, Brazil

---

**ARTICLE INFO**

Keywords:  
 Cholinesterase inhibitor  
 Pyridostigmine bromide  
 DNA damage  
 Neural cells

**ABSTRACT**

Pyridostigmine bromide (PiB) is a reversible acetylcholinesterase (AChE) inhibitor and the first-choice for the treatment of symptoms associated with myasthenia gravis and other neuromuscular junction disorders. However, evidence suggested that PiB could be associated with the Gulf War Illness characterized by the presence of fatigue, headaches, cognitive dysfunction, and musculoskeletal respiratory and gastrointestinal disturbances. Given that a potential neurotoxic effect of PiB has not yet been completely elucidated, the present investigation used neural SH-SY5Y cells to evaluate the effect of PiB on the cell viability, cell cycle modulation of the cell cycle, cellular stress, and genotoxicity variables, which indicate neurodegeneration. As expected, a PiB concentration curve based on the therapeutic dose of the drug showed an inhibition of the AChE activity. However, this effect was transient and did not involve differential AChE gene regulation by PiB. These results confirmed that undifferentiated SH-SY5Y cells can be used as a challenge in screens. In general, PiB did not trigger cellular stress, and at a slightly higher PiB concentration (100 μM), higher levels of protein carbonylation and DNA damage were detected, as determined by the marker 8-hydroxyguanosine. The PiB genotoxic effects at 200 μM, were confirmed by the upregulation of the p53 and DNA methyltransferase 1 (DNMT1) genes, which are associated with cellular DNA repair. PiB at 400 μM, which is in the minimal therapeutic dose, led to higher cell proliferation and mitochondrial activity compared with the control group. The effects of PiB were corroborated by the upregulation of the telomerase gene. In summary, despite the methodological constraints related to the *in vivo* scenario, our results suggested that exposure of neural cells to PiB, without other chemical and physical stresses did not cause extensive toxicity or induce any neurodegeneration pattern.

---

**1. Introduction**

Pyridostigmine bromide (PiB), a reversible acetylcholinesterase (AChE) inhibitor, is the first-choice therapy to treat symptoms associated with myasthenia gravis (MG) and other neuromuscular junction disorders [1]. PiB has also been used as prophylaxis against chemical warfare agents by Persian Gulf War soldiers. However, evidence suggested that PiB could be associated with the Gulf War Illness (GWI), which is characterized by the presence of fatigue, headaches, cognitive dysfunction, and musculoskeletal respiratory and gastrointestinal disturbances [2]. A study performed in Navy Seabees identified a risk of the development of three syndromes associated with the use of PiB: syndrome 1, characterized by "impaired cognition"; syndrome 2, characterized by "confusion/agitated"; and syndrome 3, characterized by "arthro-myo-neuropathy" [3]. Other studies also reported dose-response effects on GWI in relation to PiB therapy [4–6].

A study performed in mice orally treated with PiB for 4 days reported apoptosis induction in the cerebral cortex, striatum, and hippocampus cell; this effect was blocked by pre-treatment with amiprolil, indicating that PiB treatment could contribute to the neurodegeneration processes [7]. Apoptosis induction in rat nuclear germ-cell concentrations exposed to PiB, N,N-dimethyl-n-butylamide (DNMT), and permethrin was also described previously [8].

Despite evidence from animal models suggesting that PiB could present some neurotoxic effects, including DNA damage and subsequent neural apoptosis induction, studies in humans are still limited. Due to difficulties in evaluating this effect in *in vivo* human investigations, studies using an *in vitro* neural experimental model could be useful to

\* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 210, CEP 97010-900 Santa Maria, RS, Brazil.  
 E-mail address: [ivana.cruz@uol.com.br](mailto:ivana.cruz@uol.com.br).

<https://doi.org/10.1016/j.genotox.2017.08.023>  
 Received 8 February 2017; Received in revised form 18 August 2017; Accepted 22 August 2017  
 1345-062X/\$ – see front matter © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## ANEXO B- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2

Seguro | https://mc.manuscriptcentral.com/gfrr

ScholarOne Manuscripts™ Ivana Cruz ▾ Instructions & Forms Help Log Out

Free Radical Research Taylor & Francis Group

# Home Author Review

Author Dashboard

**Submitted Manuscripts**

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ED: Davies, Michael	GFRR-OM-2018-0165	The effect of Val16Ala-SOD2 polymorphism on inhibition of acetylcholinesterase and cyto-genotoxicity of pyridostigmine bromide in human peripheral blood mononuclear cells	26-Apr-2018	26-Apr-2018
	Under Review	<a href="#">View Submission</a>		

**Author Dashboard**

- 1 Submitted Manuscripts >
- 1 Manuscripts with Decisions >
- Start New Submission >
- Legacy Instructions >
- 5 Most Recent E-mails >
- English Language Editing Service >