

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STELIA CAROLINA MÉNDEZ SÁNCHEZ

**EFEITOS DO COMPOSTO MESOIÔNICO MI-D E DA IMIDA CÍCLICA S2.2 SOBRE
MECANISMOS RELACIONADOS À INDUÇÃO DE MORTE CELULAR POR VIA
MITOCONDRIAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira.

Orientadora: Prof. Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena.

Co-orientadora: Prof. Dra. Glauca Regina Martinez.

CURITIBA

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Para mi amada familia,
a mis padres Stella y Reynaldo,
a mi esposo Jonny y a mi hijo Juan Miguel.

À Prof. Dra. Maria Benigna Martinelli de
Oliveira, mentora deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelo amor e pelas pessoas que colocou no meu caminho, pessoas que fizeram mais fácil a minha permanência aqui.

Aos meus pais, pelo seu apoio, incentivo, motivação, pelo seu exemplo de luta e perseverança e pelo seu amor. Ao meu querido esposo, pelo amor, paciência, companheirismo e incentivo. Ao meu filho pelo sorriso de todos os dias, pela paciência e por me lembrar a cada dia as coisas que realmente são importantes. Por ustedes cada minuto de esfuerzo valió la pena.

À Prof. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, pelo voto de confiança ao me aceitar no laboratório sem me conhecer, por aceitar ser minha orientadora, pelo apoio (mesmo depois de saber que estava grávida) quando manifestei que queria fazer progressão, pelo exemplo de pessoa e profissional, com carinho, admiração e respeito sempre me lembrarei de você.

À Prof. Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena, pelo apoio, amizade, paciência e orientação, Eu sei que para você era quase uma obrigação moral continuar me orientando, mas eu quero muito lhe agradecer por sua dedicação, por me ajudar a seguir o caminho mais certo.

Às professoras do laboratório de Oxidações Biológicas e de Cultivo Celular, especialmente à Prof. Dra Eva Carnieri e à Prof. Dra Glaucia Regina Martinez, pela ajuda no entendimento de alguns experimentos e pela motivação para explorar outras possibilidades.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências, Bioquímica, especialmente às professoras Fanny Reicher e Leda Chubatzu pela ajuda e contato durante os primeiros correios eletrônicos que mandei, ainda quando estava na Colômbia. Ao professor Miguel Nosedá e a Senhora Marilza Lamour.

À Prof. Dra Aurea Echevarria e o Prof. Dr. Valdir Cechinel-Filho por ceder os compostos aqui estudados (MI-D e S2.2, respectivamente).

Ao programa estudantes convênio PEC-PG, ao Ministério de Educação (MEC), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Às minhas colegas e principalmente amigas, Tatiana, Silvia e Rosilene, pela amizade e pelos muitos momentos de conversa entre risos.

Ao Glaucio e ao Paulo, colegas e amigos, pela amizade e pelos momentos de brincadeira.

Às pessoas com quem fiz estágio Ana Paula, André e Silvia Prado, pela paciência, não unicamente por minha falta de experiência, mas também pela incapacidade de me comunicar em português. Graças a Ana Paula e a Tatiana aprendi português rapidamente.

Aos colegas de turma de mestrado, principalmente a Amanda e a Marianita.

Ao Lauro Mera de Souza, pela ajuda nas análises de espectrometria de massas, mesmo não dando resultados positivos.

A Eliane pela ajuda nos experimentos de transição de permeabilidade.

Aos meus irmãos na fé, Camila, Fabiane, Joice, Roseli, Ruy, Eduardo, Alcaro, Jhon, Leo e Fabio, obrigada pelos momentos de apoio e incentivo, principalmente durante os últimos meses.

Aos meus amigos hispanos, que durante muito tempo fizeram parte da minha família, Grego, Daniel, Pepe e Paul.

A todas aquelas pessoas que cruzaram meu caminho, marcando de alguma forma, minha vida pessoal e profissional.

Por último agradeço pela oportunidade de estar no meio de tantas pessoas que me ajudaram a crescer como pessoa e a me sentir em casa, mesmo estando muito longe dela. No tempo em que estive aqui em Curitiba aprendi que a morte faz parte da vida, que dá para aprender a ser feliz no meio da tristeza, tive exemplos de dignidade, de luta e coragem, compartilhei com pessoas que mesmo que nunca volte a ver estarão sempre presentes na minha vida, a vocês muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ESQUEMAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 MITOCÔNDRIA E MORTE CELULAR	21
2.1.1 Via mitocondrial (intrínseca) da apoptose	23
2.1.1.1 Transição de Permeabilidade Mitocondrial	23
2.1.1.1.1 Mitocôndria e fluxos de cálcio	24
2.1.1.2 Aumento da permeabilidade mitocondrial mediado pela família de proteínas Bcl2	26
2.1.3 Mitocôndria e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	27
2.2 COMPOSTOS MESOIÔNICOS - MI-D (CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA)	32
2.3 IMIDAS CÍCLICAS – N-FENILMALEIMIDA (S2.2)	36
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	41
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	43
5. MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1 REAGENTES	44
5.1.1 Preparação das soluções de MI-D e S2.2	44
5.2 ANIMAIS	45
5.3 OBTENÇÃO DE FRAÇÕES SUBCELULARES	45
5.3.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.	45
5.3.2 Obtenção de partículas submitocondriais (PSMs)	46
5.4 PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA	47
5.4.1 Lipossomas unilamelares - indução da lipoperoxidação com AAPH (α - α' Azodiisobutiramidina dihidrocloro)	47
5.4.2 Lipossomas multilamelares - indução da lipoperoxidação com ABCPA (4,4 azobis (ácido 4-cianopentóico))	47

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS ENVOLVENDO AS PREPARAÇÕES MITOCONDRIAIS	48
5.5.1 Transição de permeabilidade mitocondrial	48
5.5.2 Transporte mitocondrial de cálcio	48
5.6 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	49
5.6.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	49
5.6.2 Medida da fluorescência do ácido cis-parinárico	49
5.6.3 Consumo de Oxigênio	50
5.7 CAPACIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAL SUPERÓXIDO	50
5.8 PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NO CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES	51
5.8.1 Células	51
5.8.2 Esterilização de Materiais	51
5.8.3 Soluções e Meios de Cultura	51
5.8.3.1 Solução Salina Tamponada (PBS)	51
5.8.3.2. Solução Balanceada de Hanks (HBSS)	52
5.8.3.3 Meios de Cultura	52
5.8.3.4 Solução de Tripsina-EDTA	52
5.8.4 Manutenção das Células B16-F10	53
5.8.5 Manutenção das Células HeLa	53
5.8.6 Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT	53
5.8.7 Determinação de peróxidos	54
5.8.8 Detecção da liberação de citocromo c	55
5.8.9 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em células	54
5.8.10 Obtenção do extrato livre de células (ELC)	56
5.8.11 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes	56
5.8.11.1 Superóxido Dismutase (SOD)	56
5.8.11.2 Catalase	56
5.8.11.3 Glutaciona Peroxidase (Gpx)	57
5.8.11.4 Glutaciona Redutase (Gred)	57
5.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	57
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1 EFEITOS DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL	59
6.2 EFEITOS DO MI-D E DA S2.2 SOBRE O TRANSPORTE DE CÁLCIO	70
6.3 EFEITOS DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO INDUZIDA	78
6.3.1 Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida em mitocôndrias	78
6.3.2 Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida em partículas submitocondriais	82
6.3.3 Capacidade seqüestradora de radicais superóxido pelo MI-D	87
6.3.4 Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida em lipossomas de fosfatidilcolina	89
6.3.5 Efeito da S2.2 sobre a lipoperoxidação induzida	91
6.4 EFEITO DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A VIABILIDADE EM CÉLULAS HeLa E B16-F10	95
6.5 EFEITO DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A PRODUÇÃO DE PERÓXIDOS	100
6.6 EFEITO DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO NÃO INDUZIDA EM CÉLULAS	106
6.7 EFEITO DO MI-D E S2.2 SOBRE A LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C EM CÉLULAS HELA E B16-F10	109
6.8 EFEITO DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	112
7. DISCUSSÃO FINAL	119
8. CONCLUSÕES	125
9. REFERENCIAS	126
10. ANEXOS	143

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação simplificada das vias extrínseca e intrínseca da apoptose22
FIGURA 2	Vias de fluxo de cálcio na mitocôndria e seus inibidores específicos.....26
FIGURA 3	Principais espécies radicalares geradas <i>in vivo</i>28
FIGURA 4	Principais reações no processo de lipoperoxidação.....29
FIGURA 5	Inativação de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria - sistemas antioxidantes.....31
FIGURA 6	Representação genérica da estrutura de um composto mesoiônico.....32
FIGURA 7	Estruturas representativas de compostos mesoiônicos com destacada atividade biológica.....33
FIGURA 8	Estrutura química do cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) (A) e de seu derivado mesoiônico 4-fenil-5-[4-nitrocinaoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (B)....34
FIGURA 9	Estrutura geral das imidas cíclicas.....37
FIGURA 10	Estruturas gerais de imidas cíclicas com destacada atividade biológica.....38
FIGURA 11	Estrutura da N-fenilmaleimida (S2.2).....38
FIGURA 12	Fluxograma do plano de trabalho experimental.....43

FIGURA 13	Efeito do MI-D sobre o inchamento mitocondrial induzido por fosfato.....	61
FIGURA 14	Efeito do MI-D sobre a amplitude do inchamento mitocondrial induzido por fosfato.....	62
FIGURA 15	Efeito do MI-D sobre o inchamento mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio.....	64
FIGURA 16	Efeito do MI-D sobre a amplitude do inchamento mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio.....	65
FIGURA 17	Efeito da S2.2 sobre o inchamento mitocondrial induzido por fosfato	66
FIGURA 18	Efeito da S2.2 sobre a amplitude do inchamento mitocondrial induzido por fosfato	67
FIGURA 19	Efeito da S2.2 sobre o inchamento mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio	68
FIGURA 20	Efeito da S2.2 sobre a amplitude do inchamento mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio	69
FIGURA 21	Efeito do MI-D sobre o fluxo mitocondrial cálcio.....	71
FIGURA 22	Efeito do MI-D sobre o fluxo mitocondrial de cálcio – captação inibida por vermelho rutênio.....	73
FIGURA 23	Efeito da S2.2 sobre o fluxo mitocondrial de cálcio.....	76
FIGURA 24	Efeito da S2. 2 sobre o fluxo mitocondrial de cálcio - captação	

	inibida por Vermelho de Rutênio.....	77
FIGURA 25	Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação ferro induzida em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	79
FIGURA 26	Decomposição do AAPH em presença de O ₂	80
FIGURA 27	Efeito do MI-D sob a lipoperoxidação induzida por AAPH em mitocôndrias.....	81
FIGURA 28	Atividade ATPásica de partículas submitocondriais acopladas e desacopladas.....	83
FIGURA 29	Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação ferro induzida em partículas submitocondriais acopladas.....	85
FIGURA 30	Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação ferro induzida em partículas submitocondriais desacopladas.....	86
FIGURA 31	Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida por AAPH em partículas submitocondriais desacopladas.....	87
FIGURA 32	Capacidade seqüestradora de radicais superóxido pelo MI-D..	88
FIGURA 33	Descomposição do ABCPA em presença de O ₂	89
FIGURA 34	Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida por AAPH em lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina.....	90
FIGURA 35	Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida por ABCPA em lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina.....	91
FIGURA 36	Efeito da S2.2 sobre a lipoperoxidação ferro induzida em mitocôndrias	93

FIGURA 37	Efeito da S2.2 sobre a oxidação do ácido <i>cis</i> -parinário induzida por AAPH em partículas submitocondriais desacopladas.....	94
FIGURA 38	Efeito do MI-D sobre a viabilidade de células HeLa.....	96
FIGURA 39	Efeito do MI-D sobre a viabilidade de células B16-F10.....	97
FIGURA 40	Efeito da S2.2 sobre a viabilidade de células HeLa.....	98
FIGURA 41	Efeito da S2.2 sobre a viabilidade de células B16-F10.....	99
FIGURA 42	Efeito do MI-D sobre a produção de peróxidos em células HeLa.....	102
FIGURA 43	Efeito do MI-D sobre a produção de peróxidos em células B16-F10.....	103
FIGURA 44	Efeito da S2.2 sobre a produção de peróxidos em células HeLa.....	104
FIGURA 45	Efeito da S2.2 sobre a produção de peróxido em células B16-F10.....	105
FIGURA 46	Efeito de MI-D e da S2.2 sobre a lipoperoxidação em células HeLa.....	107
FIGURA 47	Efeito de MI-D e da S2.2 sobre a lipoperoxidação em células B16-F10.....	108
FIGURA 48	Efeito de MI-D e da S2.2 sobre a liberação de citocromo c em células B16-F10 e HeLa.....	111

FIGURA 49	Efeito do MI-D e da S2.2 sobre a atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	113
FIGURA 50	Efeito do MI-D e a S2.2 sobre a atividade da catalase.....	115
FIGURA 51	Efeito do MI-D e da S2.2 sobre a atividade da glutaciona peroxidase.....	117
FIGURA 52	Efeito do MI-D e a S2.2 sobre a atividade da glutaciona redutase.....	118

LISTA DE ESQUEMAS

- ESQUEMA 1 Dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase.....112
- ESQUEMA 2 Redução do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela catalase.....114
- ESQUEMA 3 Redução de peróxidos (ROOH) pela glutathione peroxidase (Gpx) na presença de glutathione reduzida (GSH), gerando glutathione oxidada (GSSG) e álcool (ROH). A GSSG é novamente reduzida pela glutathione redutase (Gred) em presença de NADPH.....116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	α - α' -Azodiisobutiramidina dihidrocloroto
ABCPA	4,4 azobis (ácido cianopentoico)
ADP	adenosina 5'-difosfato
ANT	Translocador de nucleotídeos de adenina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
B16-F10	Células de melanoma murino
BHT	Butil hidroxitolueno
BSA	Albumina bovina sérica
CCCP	Cianeto de carbonila de meta-clorofenil hidrazona
CsA	Ciclosporina A
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
DC	Dienos conjugados
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol bis(éter 2-aminoetil)-N, N, N', N' tetracético
ELC	Extrato livre de células
EPL	Endoperóxido lipídico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	carbonilcianida <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
FL	Fosfolípidos
HeLa	Células de carcinoma de cervix uterino humano
Gpx	Glutaciona peroxidase
Gred	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPL	Hidroperóxido lipídico
MDA	Malondialdeído
MEM	meio essencial mínimo de Eagle

MI-D	Cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoila]-1,3,4-tiazólio-2-fenilamina
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotideo reduzida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida
NBT	Nitroblue tetrazolium
NO [•]	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
[•] OH	Radical hidroxila
[•] ONOO ⁻	Peroxinitrito
PEP	Fosfoenol piruvato
PiC	Translocador de fosfato
PMS	Fenazina metossulfato
PSM	Partículas submitocondriais
aPSM	Partículas submitocondriais acopladas
dPSM	Partículas submitocondriais desacopladas
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
RL	Radical lipídico
RLP	Radical lipoperoxila
S2.2	N-fenilmaleimida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRIS	tris (hidroximetil) amino metano
TS	Tioredoxina reduzida
TSST	Tioredoxina oxidada
VDAC	Canal aniônico dependente de voltagem
VR	Vermelho de rutênio

RESUMO

Neste estudo foram avaliados os efeitos do composto mesoiônico, cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D), e da imida cíclica, N-fenilmaleimida (S2.2) sobre mecanismos relacionados à morte celular por via mitocondrial. Os dois compostos possuem importante atividade antimelanoma contra melanoma murino (B16-F10) e, particularmente o MI-D, atividade citotóxica em células humanas de melanoma e de carcinoma cervical. No presente trabalho, os dois compostos inibiram o inchamento mitocondrial dependente da formação/abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), induzido por fostato. A inibição promovida pelo MI-D foi dose dependente, sendo de ~42% na maior concentração (80 nmol.mg⁻¹ prot.), enquanto que a S2.2 causou uma inibição total e dose-independente (40-120 nmol.mg⁻¹ prot.). Os compostos também promoveram a inibição do inchamento dependente do PTPM induzido por H₂O₂. O MI-D (5-80 nmol.mg⁻¹ prot.) diminuiu discretamente a captação de cálcio mitocondrial, enquanto que o efluxo, induzido por vermelho de rutênio, foi significativamente inibido de forma dose-dependente (5-80 nmol.mg⁻¹ prot.). Por outro lado, a S2.2, causou a diminuição da captação de cálcio de forma dose-dependente (5-80 nmol. mg⁻¹) e não comprometeu o efluxo do íon. Os efeitos dos compostos sobre a lipoperoxidação também foram avaliados. O MI-D (80 nmol.mg⁻¹ prot.) inibiu em aproximadamente 95%, 42% e 7% a lipoperoxidação ferro induzida em mitocôndrias, partículas submitocondriais acopladas e desacopladas, respectivamente. O composto (80 nmol.mg⁻¹ prot.) também foi capaz de inibir a lipoperoxidação induzida pelo azocomposto gerador de radicais AAPH, em ~22% e ~50% em mitocôndrias e partículas submitocondriais desacopladas, respectivamente. Em lipossomas de fosfatidilcolina o MI-D inibiu a lipoperoxidação (5 a 80 µmol.L⁻¹) independentemente da origem dos radicais gerados, se de fase aquosa ou lipídica. O MI-D também apresentou a capacidade de seqüestrar radical superóxido em sistema livre de células. Já a S2.2 (40-200 nmol.mg⁻¹) não causou efeitos significativos sobre a lipoperoxidação ferro induzida em mitocôndrias isoladas ou decorrente de azocompostos geradores de radicais em partículas submitocondriais desacopladas. Em células HeLa o MI-D (20-25µmol.L⁻¹) promoveu o aumento na produção de peróxidos em ~30%, mas não causou efeito sobre a lipoperoxidação não induzida. A S2.2 (10-20 µmol.L⁻¹) não modificou os níveis de peróxido nas duas linhagens celulares (HeLa e B16-F10), mas foi capaz de induzir a lipoperoxidação em maiores concentrações (40-120 µmol.L⁻¹). Os dois compostos, MI-D (25 µmol.L⁻¹) e S2.2 (120 µmol.L⁻¹), promoveram a liberação de citocromo c em células B16-F10 (~80%) e HeLa (~175%), respectivamente. O MI-D (25 µmol.L⁻¹) ainda estimulou a atividade da glutatona peroxidase (~30%) e a S2.2 (120 µmol.L⁻¹) inibiu as atividades da catalase e da glutatona redutase, em ~20% e ~78%, respectivamente. A partir destes resultados é possível sugerir que os compostos são capazes de induzir a morte celular por apoptose, com a liberação de citocromo c, porém o mecanismo de liberação não inclui a formação/abertura do PTPM, mas provavelmente envolve a permeabilização da membrana mitocondrial externa devido à ativação ou aumento de expressão de proteínas proapoptóticas da família Bcl2.

Palavras-chave: Compostos mesoiônicos. Imidas cíclicas. Transição de permeabilidade mitocondrial. Transporte mitocondrial de cálcio. Lipoperoxidação. Citocromo c. Apoptose.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of the mesoionic compound MI-D (4-phenyl-5-(4-nitro-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride) and S2.2 (N-phenilmaleimide) on cell death mediated by mitochondrial pathway. These compounds have shown an important antimelanoma activity against B16-F10 cells implanted in mice. Particularly for MI-D, it has also been described a cytotoxic effect to human melanoma and cervical carcinoma cells. In the present work these compounds were able to inhibit the mitochondrial swelling dependent of the formation/opening of the permeability transition pore (PTPM) induced by phosphate. The inhibition promoted by MI-D was dose-dependent, reaching ~42% at the highest concentration (80 nmol.mg⁻¹ prot.), while S2.2 caused a total dose-independent inhibition (40 -120 nmol.mg⁻¹ prot.). The compounds also inhibited the formation/opening of PTPM induced by H₂O₂. MI-D (5-80 nmol.mg⁻¹ prot.) slightly lowered calcium accumulation by the uniporter transport whereas the efflux induced by ruthenium red was significantly inhibited in a dose-dependent manner (5-80 nmol.mg⁻¹ prot.). In comparison, S2.2 (5 – 80 nmol. mg⁻¹ prot.) lowered the ion accumulation in a dose-dependent way and it did not affect its efflux. The effects of the compounds on lipoperoxidation were also evaluated. MI-D (80 nmol.mg⁻¹ prot.) promoted the inhibition of the lipoperoxidation induced by Fe³⁺-ADP/2-oxoglutarate by ~95%, ~42% and ~7% in mitochondria, coupled and uncoupled submitochondrial particles, respectively. At the same concentration the mesoionic compound was able to inhibit lipoperoxidation induced by the azocompound, AAPH, this inhibition was around ~22% and ~50% in mitochondria and uncoupled submitochondrial particles, respectively. MI-D inhibited the soybean phosphatidylcholine liposomes lipoperoxidation in a dose dependent manner (5-80 μM) regardless of the radical being generated in lipid or aqueous phase. The mesoionic compound showed ability of scavenging superoxide radical. N-phenilmaleimide (S2.2) did not affect the lipoperoxidation induced by Fe³⁺-ADP/2-oxoglutarate in mitochondria or induced by azocompounds in submitochondrial particles. In HeLa cells, MI-D (20-25 μmol.L⁻¹) increased the peroxide production by ~30%, however, it did not induce lipoperoxidation. S2.2 (10 – 20 μmol.L⁻¹) did not modify the peroxide levels in both cell lines (HeLa and B16-F10) but it was able to induce the lipoperoxidation in higher concentrations (40-120 μmol.L⁻¹). MI-D (25 μmol.L⁻¹) and S 2.2 (120 μmol.L⁻¹) promoted the release of cytochrome c in B16-F10 (~80%) and HeLa cells (~175%), respectively. The mesoionic compound (25 μmol.L⁻¹) stimulated the glutathione peroxidase activity (~30%) and S2.2 inhibited the activities of catalase and glutathione reductase by ~20% and ~78% respectively. The results of this study suggest that the compounds are able to induce the cell death by apoptosis with the liberation of cytochrome c not mediated by PTPM, but probably due to permeabilization of outer mitochondrial membrane by activation or increase of expression of Bcl2 family proteins.

Keywords: Mesoionic compounds. Cyclic imides. Mitochondrial permeability transition. Mitochondrial calcium transport. Lipoperoxidation. Cytochrome c. Apoptosis.

1. INTRODUÇÃO

Na pesquisa de novos fármacos com atividade antitumoral, duas famílias de compostos vêm sendo estudadas no Laboratório de Oxidações Biológicas e de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, os compostos 1,3,4 – tiadiazóis mesoiônicos e as imidas cíclicas.

Estudos anteriores, realizados nesse laboratório, demonstraram que o cloreto de 4–fenil–5–[4–nitrocinamoil]–1,3,4–tiadiazólio–2–fenilamina (MI-D), da família dos compostos 1,3,4 – tiadiazóis mesoiônicos, possui ação citotóxica em células HeLa, sendo a mesma associada aos efeitos do composto sobre a bioenergética mitocondrial (CADENA *et al.*, 1998; CADENA, 1999). Também para o MI-D e para a N–fenil maleimida (S2.2), pertencente a família das imidas cíclicas, demonstrou-se uma importante ação antimelanoma. O MI-D foi mais eficaz que os antineoplásicos fotemustina e dacarbazina (fármacos usados rotineiramente no tratamento do melanoma) em inibir o crescimento de tumores resultantes da implantação subcutânea de células B16-F10 em camundongos (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004a,b). Nesse mesmo modelo experimental, a S2.2 também foi capaz de inibir o crescimento tumoral (PRADO, 2005). Análises morfológicas de células HeLa em presença de MI-D e de células B16-F10 em presença de S2.2, mostraram características próprias de morte celular por apoptose, condensação de cromatina, fragmentação do núcleo e formação de expansões globosas na membrana celular (CADENA, 1999; PRADO, 2005). No entanto, para o MI-D a morte celular por necrose não foi desconsiderada devido à presença de algumas células com volume aumentado, característica de morte celular por necrose (CADENA, 1999).

O uso terapêutico de um fármaco exige que o mesmo seja objeto de uma vasta investigação, que inclui estudos farmacocinéticos, toxicológicos e de metabolização. No entanto, esses estudos devem ser acompanhados de investigações a nível molecular que esclareçam seu mecanismo de ação. Desta forma, considerando o potencial uso terapêutico do MI-D e da S2.2, principalmente no tratamento do melanoma, neste estudo pretende-se contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na ação antitumoral destes compostos,

avaliando seus efeitos sobre fenômenos relacionados à morte celular por via mitocondrial, mais especificamente sobre a transição de permeabilidade e fluxo de Ca^{2+} mitocondriais, a liberação de citocromo c, a geração de radicais livres e sistemas de defesa antioxidante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MITOCÔNDRIA E MORTE CELULAR

A mitocôndria tem papel fundamental no metabolismo celular ao manter os níveis de ATP, modular o estado redox e a homeostase do cálcio. Entre as outras funções da organela destaca-se seu envolvimento nos processos de indução da morte celular (NICHOLLS & FERGUSON, 2002; OTT *et al.*, 2007). A mitocôndria participa das duas principais formas de morte celular, necrose e apoptose, por mecanismos que envolvem o aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais. Em particular na apoptose, a organela participa tanto da via intrínseca como da via extrínseca, também conhecida como via mediada pela ligação a receptores de morte (*Death Receptors*). As vias extrínseca e intrínseca da apoptose estão representadas de forma simplificada na Figura 1. A via extrínseca é ativada pela ligação de moléculas a seus receptores específicos na membrana celular, como receptores Fas e TNF, entre outros, o que desencadeia uma série de eventos que culminam na ativação de cisteína-proteases com especificidade para o ácido aspártico, denominadas de caspases. A ativação de caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) resulta na morte celular. Estímulos apoptóticos que ativam a via extrínseca podem resultar também na ativação da via intrínseca mediante a ativação de componentes proapoptóticos Bid e Bax, pertencentes a família de proteínas Bcl2. Na via intrínseca, denominada também de via mitocondrial, a apoptose se inicia devido ao aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais e conseqüente liberação de fatores proapoptóticos do espaço intermembranas que, como na via extrínseca, ativarão caspases específicas, resultando na morte celular (KINNALLY & ANTONSSON, 2007; KROEMER *et al.* 2007; GREN & KROEMER, 2004).

Como este estudo trata dos efeitos do composto mesoiônico MI-D e da imida cíclica S2.2 sobre mecanismos relacionados à indução de morte celular por via mitocondrial (via intrínseca), a seguir, esta revisão abordará eventos relacionados à mesma.

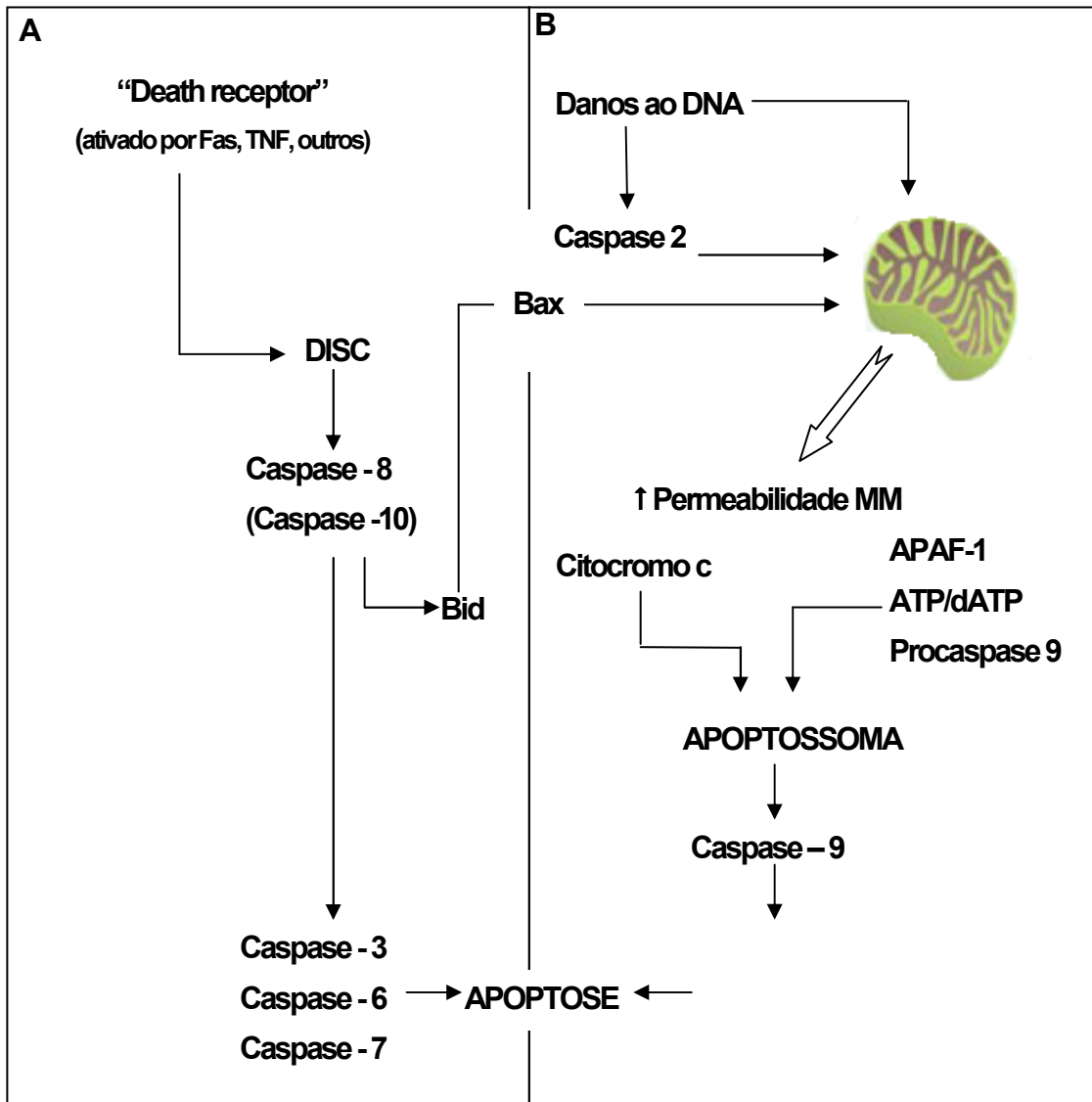


FIGURA1 – Representação simplificada das vias extrínseca e intrínseca da apoptose.

FONTE: KROEMER *et al.* (2007)

NOTA: A) Via extrínseca – a ligação de moléculas a seus receptores específicos na membrana celular (*death receptors*) induz a formação do complexo indutor de morte - DISC (*death inducing signaling complex*) no citosol. Este por sua vez, promove a ativação da caspase-8 e da caspase-10 que ativam as caspases- 3,6 e 7 (caspases efetoras). A caspase-8 também ativa proteoliticamente Bid (constituente proapoptótico da família Bcl2) que promove o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (MM) via Bax, sendo este o principal elo de ligação entre as vias intrínseca e extrínseca. B) Via intrínseca – diversos sinais intracelulares, como por exemplo, danos ao DNA, podem resultar no aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais, resultando na liberação de fatores proapoptóticos do espaço intermembranas. Dentre estes, o citocromo c (cit c) induz a reunião de APAF-1 (*apoptosis protease-activating factor -1*) e ATP/dATP para a formação do apoptossoma que promove a ativação proteolítica da caspase 9. Esta por sua vez, cliva e ativa as caspases efetoras (3,6 e 7) resultando na apoptose.

2.1.1 Via mitocondrial (intrínseca) da apoptose.

Como já mencionado, a indução da apoptose por via mitocondrial relaciona-se ao aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais e a consequente liberação de fatores proapoptóticos do espaço intermembranas para o citosol e a posterior ativação das caspases efetoras, o que culmina na morte celular. Desta forma, é importante conhecer quais os mecanismos envolvidos nesse fenômeno. Neste contexto, destacam-se na literatura dois mecanismos responsáveis pelo aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais: a formação de um poro, denominado poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), o que leva ao fenômeno conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial e, a ativação de constituintes proapoptóticos da família de proteínas Bcl2, que formam um canal na membrana mitocondrial externa. Esses modelos não se excluem mutuamente, ao contrário, existe a possibilidade de coexistirem, levando ao remodelamento das cristas mitocondriais e a máxima liberação de citocromo *c* e amplificação da cascata apoptótica. (KINNALLY & ANTONSSOM, 2007; KROEMER *et al.*, 2007).

2.1.1.1 Transição de Permeabilidade Mitocondrial.

Embora os eventos envolvidos na transição de permeabilidade mitocondrial não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que o poro formado (PTPM) é constituído por proteínas localizadas nas membranas mitocondriais interna e externa. Estas proteínas são: canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), translocador de fosfato (PiC), hexoquinase e ciclofilina D, entre outros (TAZAWA *et al.*, 2009; LEUNG & HALESTRAP, 2008; HAIL, 2005). Normalmente, estas proteínas estão próximas, mas em uma conformação que impossibilita a abertura do poro. Uma série de fatores, incluindo estímulos patológicos, como aumento da concentração de cálcio citosólico e a geração de ERO (espécies reativas de oxigênio), assim como determinados agentes químicos, podem causar a abertura do PTPM (TAZAWA *et al.* 2009; KLESZCZYNSKI *et al.* 2008; VAY *et al.*, 2008; HAIL, 2005; KOWALTOWSKI *et*

al., 2001; SUSIN *et al.*, 1998). Por sua vez, isto permite que água e solutos de até 1500 Da entrem na matriz, o que pode resultar no inchamento mitocondrial, que se de grande magnitude, promove o rompimento da membrana mitocondrial externa, e a consequente liberação de fatores proapoptóticos no citosol (BERNARDI, 1996).

A formação do poro de transição de permeabilidade além de desencadear o processo apoptótico compromete de forma definitiva a fosforilação oxidativa, ocorrendo o colapso do potencial de membrana, a diminuição das concentrações celulares de ATP, o aumento da geração de ERO e das concentrações citosólicas de cálcio e a indução da peroxidação lipídica (GOGVADZE *et al.*, 2008; ARMSTRONG, 2006; KOWALTOWSKI *et al.*, 2001; SUSIN *et al.*, 1998; KROEMER *et al.*, 1995).

Se por um lado, a abertura do PTPM resulta no aumento da concentração de cálcio citosólico, por outro, é necessário a presença do cátion na mitocôndria para que ocorra sua formação (BERNARDI, 1992). Desta forma, considerando a importância do íon no mecanismo de transição de permeabilidade mitocondrial, a seguir será feita uma breve revisão sobre o transporte de cálcio mitocondrial.

2.1.1.1.1 Mitocôndria e fluxos de cálcio.

A mitocôndria não está somente relacionada com o metabolismo energético, mas também com a sinalização de cálcio intracelular, a organela pode captar e induzir a liberação do íon no citosol (JOUAVILLE *et al.*, 1998). O influxo de cálcio é realizado por um uniporter específico que permite a sua rápida acumulação no interior da matriz mitocondrial, dependente de sua concentração externa e do potencial de membrana. O uniporter pode ser inibido competitivamente por outros cátions divalentes (Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+}), que também são transportados por esta via, por policátions como o vermelho de rutênio (VR) e cobalto de hexamina, por anestésicos, guanidinas e diuréticos; e pode ser ativado pelos íons transportados, como Ca^{2+} , e por poliaminas específicas, particularmente a espermina, que promove a acumulação de cálcio quando o íon está presente em baixas concentrações (JOUAVILLE *et al.*, 1998, SALVI & TONINELLO, 2004).

Em adição a este uniporter, outra via descrita como RaM (*“rapid mode of uptake”*) é capaz de responder a pulsos de cálcio semelhantes aos que ocorrem em

condições fisiológicas (SPARAGNA *et al.* 1995, GUNTER & SHEU, 2009; SAOTOME *et al.*, 2005; JOUAVILLE *et al.*, 1998).

O efluxo de cálcio é realizado por dois transportadores catiônicos, o independente de sódio ($\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$) e o dependente de sódio ($\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$). O transportador $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ predomina em mitocôndrias de fígado, rins e músculos lisos, sendo a energia do efluxo proveniente da força próton motriz. Já o transportador $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$, predominante em mitocôndrias de coração, músculo esquelético, cérebro entre outros tecidos, pode ser inibido por Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} externo, benzodiazepinas e ativado por Na^+ , espermina e espermidina (GUNTER & SHEU, 2009; SAOTOME *et al.*, 2005; JOUAVILLE *et al.*, 1998, SALVI & TONINELLO, 2004).

O PTPM também tem sido considerado como uma via de efluxo de cálcio regulada pelas flutuações das concentrações do cátion na matriz mitocondrial (BERNARDI & PETRONILLI, 1996; JOUAVILLE *et al.*, 1998, GUNTER E SHEU, 2009). Em condições em que a transição de permeabilidade é induzida, ocorre a dissipação do potencial de membrana evitando a retenção de cálcio, este fenômeno é facilmente observado pela utilização de marcadores fluorescentes específicos (SINHA ROY & HAJNÓCZKY, 2008). Na figura 2 estão resumidas as vias de transporte mitocondrial de cálcio e os seus inibidores específicos (GUNTER & SHEU, 2009; SAOTOME *et al.*, 2004; JOUAVILLE *et al.*, 1998).

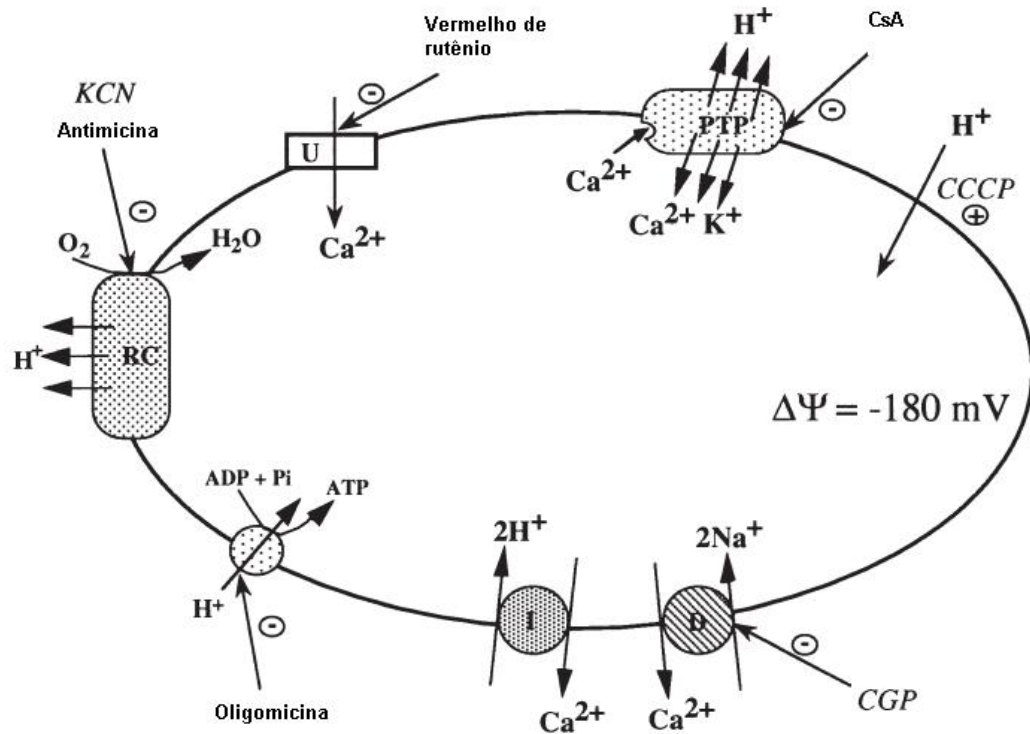


FIGURA 2. Vias de fluxo de cálcio na mitocôndria e seus inibidores específicos

FONTE: JOUAVILLE *et al.* (1998).

NOTA: U- Ca^{2+} , uniporter; RC, cadeia respiratória; PTP, poro de transição de permeabilidade mitocondrial; I - $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$, transportador de cálcio independente de sódio; D - $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^{+}$, transportador de cálcio dependente de sódio; CsA, ciclosporina A; CGP, benzodiazepina CGP-37157; $\Delta\Psi$, potencial de membrana.

2.1.1.2 Aumento da permeabilidade mitocondrial mediado pela família de proteínas Bcl2.

Esta família de proteínas possui membros com características proapoptóticas e antiapoptóticas, sendo que os membros antiapoptóticos (como Bcl2 e Bcl-XL) podem atenuar os efeitos causados por indutores de apoptose, mantendo a sobrevivência da célula. Por outro lado, a ativação dos membros proapoptóticos (por exemplo, Bax e Bak), que normalmente estão em sua forma inativa, leva ao desequilíbrio da relação entre os membros da família Bcl-2, fazendo com que o processo de apoptose seja desencadeado. Em condições normais, a proteína proapoptótica Bak está associada a membrana mitocondrial externa, enquanto que Bax está no citosol em sua forma monomérica, a qual não é capaz de formar canais.

No entanto, uma vez ativada, Bax se transloca para a mitocôndria e aí se oligomeriza levando à formação de canais protéicos na membrana mitocondrial externa, o que promove a liberação de fatores indutores de apoptose e ao aumento da concentração citosólica de cálcio (CARTRON *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; TELES *et al.*, 2008; LALIER *et al.*, 2007; TSUJINOTO, 2003). O papel de Bak neste processo parece ser o de induzir a oligomerização de Bax na membrana. Bak e Bax são importantes constituintes do denominado MAC, canais mitocondriais indutores de apoptose (KINNALLY & ANTONSSOM, 2007). De forma semelhante à formação do PTPM, a indução de permeabilidade mitocondrial por proteínas da família Bcl-2 leva à inibição da respiração mitocondrial e ao colapso do potencial de membrana (TELES *et al.*, 2008).

Uma vez que alterações na respiração mitocondrial estão envolvidas nos dois processos que promovem o aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais e, ainda, considerando que tais alterações podem resultar no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que estão intimamente relacionados aos processos de dano celular, a seguir será feita uma breve revisão sobre o envolvimento da mitocôndria na produção de tais espécies e os mecanismos de defesa antioxidante.

2.1.2 Mitocôndria e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

A maioria das ERO são geradas durante a respiração mitocondrial, quando cerca 1-2% do oxigênio consumido durante a respiração fisiologicamente normal é reduzido a radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (OTT *et al.*, 2007). O $O_2^{\cdot-}$ reage principalmente com íons metálicos e centros ferro-enxofre, facilitando a liberação de ferro (BARTOSZ, 2008; TURRENS, 2003). Pela ação da enzima antioxidante, superóxido dismutase (SOD), o $O_2^{\cdot-}$ é dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A reação de H_2O_2 com metais de transição produz radical hidroxila ($\cdot OH$), a espécie mais reativa gerada *in vivo*. O $\cdot OH$ reage rápida e indiscriminadamente com biomoléculas de todos os tipos, incluindo ácidos nucleicos, nucleotídeos livres, proteínas, lipídeos e carboidratos (BARTOSZ, 2008).

A reação entre $O_2^{\cdot-}$ e óxido nítrico (NO^{\cdot}) gera o peroxinitrito ($\cdot ONOO^-$), uma espécie reativa de nitrogênio, um poderoso oxidante que causa danos celulares por

vários mecanismos, incluindo a peroxidação lipídica (MORO *et al.*, 2005; TURRENS, 2003). Na Figura 3 estão representadas as reações envolvidas na geração de radicais a partir de $O_2^{\cdot-}$.

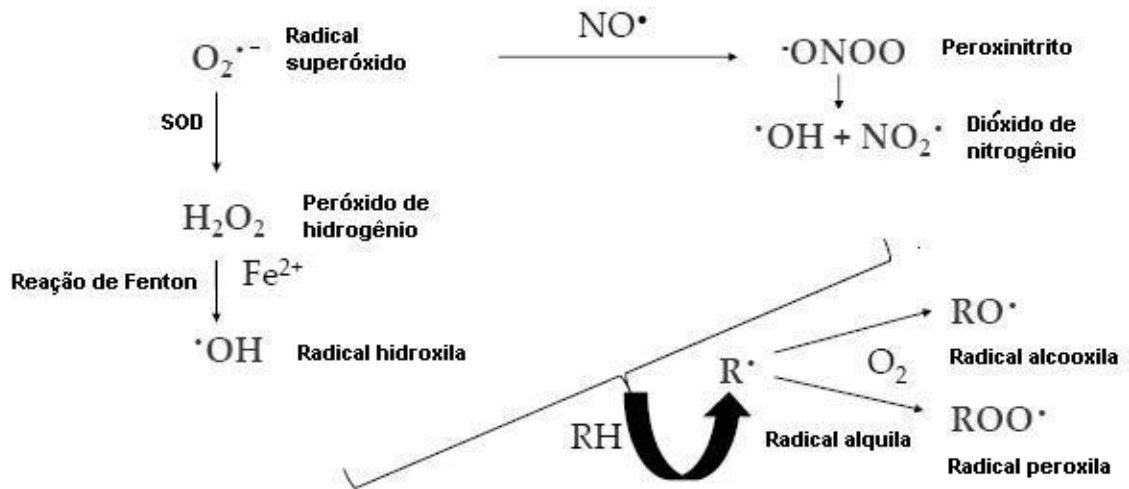


FIGURA 3. Principais espécies radicalares geradas *in vivo*.

FONTE: BARTOSZ (2008).

As ERO tem dois papéis em sistemas biológicos: em baixas concentrações tem efeitos benéficos como a indução da resposta mitogênica e, em altas concentrações podem causar danos irreversíveis a ácido nucléicos, fosfolipídeos e proteínas (GRIVENNIKOVA & VINOGRADOV, 2006; VALKO *et al.*, 2006).

Entre as ERO, em especial o $\cdot OH$ pode reagir com qualquer componente do DNA, causando lesões, que se não reparadas, podem representar o primeiro passo para a carcinogênese. O DNA mitocondrial, mais do que o nuclear, sofre mutações por causa das ERO. A expressão alterada das proteínas dos complexos I, III, IV e ATP sintase tem sido identificada em vários tipos de câncer humano e doenças relacionadas ao envelhecimento (GRISHKO *et al.*, 2009; LUUKKONEN *et al.*, 2008; ZIELONKA & KALYANARAMAN, 2008; VALKO *et al.*, 2006).

Os fosfolipídeos também são extremamente sensíveis à oxidação. As membranas celulares são ricas em ácidos graxos poliinsaturados que na presença de ERO geram radicais peroxila e radicais alcooxila que sofrem uma série de reações que levam ao rearranjo e ao comprometimento da integridade da membrana, num processo conhecido por lipoperoxidação. A lipoperoxidação envolve

a formação e a propagação de radicais lipídicos, a captação de oxigênio, o rearranjo de duplas ligações em lipídeos insaturados e a eventual destruição de membranas lipídicas. As membranas biológicas são ricas em ácidos graxos insaturados que se encontram em meio rico em oxigênio contendo metais, como o ferro presente em algumas proteínas, o que as torna suscetíveis ao ataque peroxidativo. Na figura 4 estão resumidas as diferentes reações que sofrem os fosfolipídeos (FL) durante a lipoperoxidação. O início se dá com a abstração de um átomo de hidrogênio gerando um radical lipídico (RL) que tende a sofrer um rearranjo, resultando na formação de dienos conjugados (DC). O ataque por oxigênio molecular produz um radical lipoperoxil (RLP), o qual pode tanto abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um lipídeo adjacente, para formar um hidroperóxido lipídico (HPL), quanto formar um endoperóxido lipídico (EPL). A formação de endoperóxidos lipídicos em ácidos graxos insaturados, contendo pelo menos três duplas ligações interrompidas por metileno, pode levar à formação de malondialdeído (MDA) como um produto de degradação (BUEGE & AUST, 1978). Esses efeitos deletérios são muito importantes no desenvolvimento da aterosclerose, no câncer e nos processos inflamatórios (CATALÁ, 2009; MACZUREK *et al.*, 2008; VALKO *et al.*, 2006).

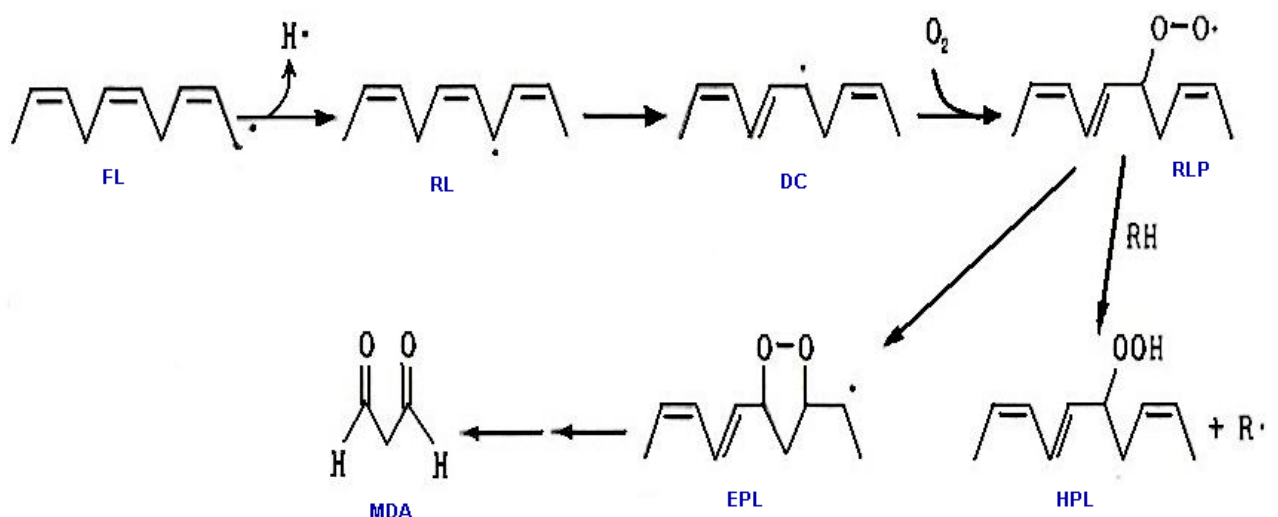


FIGURA 4. Principais reações no processo de lipoperoxidação.

FONTE: BUEGE e AUST (1978).

NOTA: FL, fosfolipídeo; RL, radical lipídico; DC, dienos conjugados; RLP, radical lipoperoxil; HPL, hidroperóxido lipídico; EPL, endoperóxido lipídico; MD, malondialdeído.

A oxidação de proteínas por ERO está associada com a formação de diferentes classes de ligações cruzadas, inter e intra protéicas. Um importante mecanismo de toxicidade do $O_2^{\cdot-}$ está relacionado com a oxidação direta de proteínas que possuem grupos ferro-enxofre. A aconitase é um exemplo deste tipo de proteína, que ao sofrer o ataque do $O_2^{\cdot-}$ sofre inativação devido à oxidação do ferro do grupo ferro-enxofre (LIOCHEV & FRIDOVICH, 1994).

Os efeitos deletérios resultantes da formação de ERO na mitocôndria são prevenidos por vários sistemas antioxidantes. O radical superóxido é enzimaticamente convertido a H_2O_2 pela MnSOD (na matriz) e pela Cu e ZnSOD (no espaço intermembranas e no citosol). Esta reação também pode ocorrer espontaneamente no espaço intermembranas, sendo que neste caso, o citocromo c atua como sistema de defesa ao sequestrar o $O_2^{\cdot-}$. Desta forma, sua liberação para o citosol, devido ao aumento de permeabilidade da membrana externa, contribui para o aumento da concentração deste radical. O H_2O_2 proveniente da reação catalisada pela SOD é decomposto pelas enzimas glutathione peroxidase, tioredoxina peroxidase (na mitocôndria) e pela catalase (nos peroxissomos e nas mitocôndrias de coração) (BARTOSZ, 2008; OTT *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2006; TURRENS, 2003).

Existem várias isoformas de glutathione peroxidase Gpx1 a 4. As Gpx1 a 3 decompõem o H_2O_2 , enquanto a Gpx4 reduz peróxidos de fosfolípidos, lipoproteínas e ésteres de colesterol. A Gpx4 é considerada a primeira defesa enzimática contra a oxidação de membranas celulares (OTT *et al.*, 2007). Esta enzima tem como cofator a glutathione reduzida (GSH) sendo, portanto, que a manutenção dos níveis de GSH é essencial para manter a atividade da enzima. As enzimas glutathione reductase (Gred) e tioredoxina reductase são as encarregadas de manter o GSH e a TS (tioredoxina) na forma reduzida. Estas enzimas reduzem GSSG e TSST (tioredoxina oxidada) a GSH e TSH, respectivamente, na presença de NADPH (HUBER e ALMEIDA, 2008; VALKO *et al.*, 2006). As reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes descritas e a interação entre as mesmas estão representadas na figura 5.

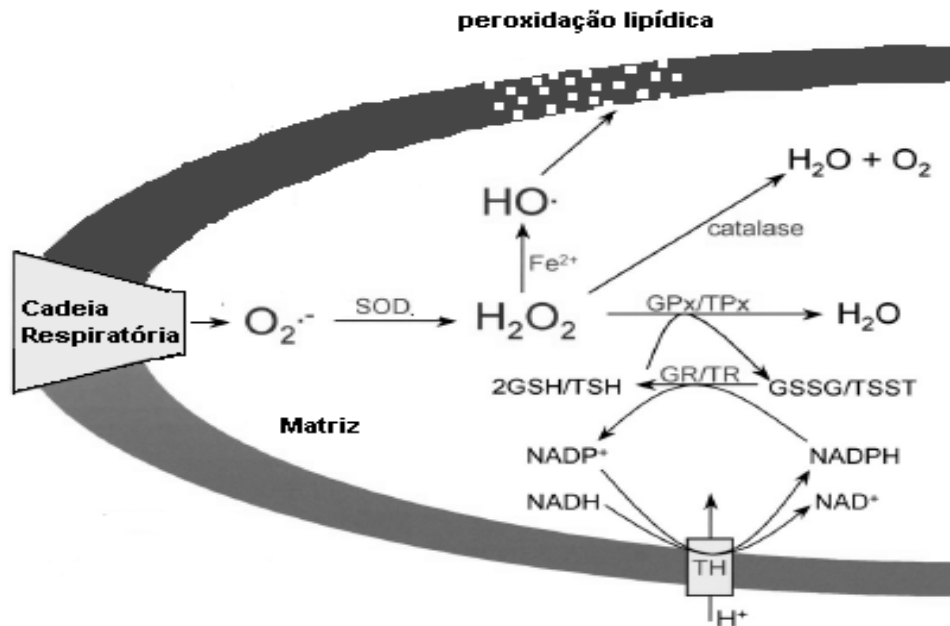


FIGURA 5. Inativação de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria - sistemas antioxidantes.

FONTE: KOWALTOWSKI *et al.* (2001).

NOTA: $O_2^{\cdot-}$, radical superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; $HO\cdot$, radical hidroxila; SOD, superóxido dismutase; GPx, glutatona peroxidase, TPx, tioredoxina peroxidase; GR, glutatona redutase; TR, tioredoxina redutase; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; TSH, tioredoxina reduzida; TSST, tioredoxina oxidada; TH, transidrogenase.

A capacidade de moléculas mitocondriais de induzir a morte celular faz desta organela alvo de vários compostos convencionais e experimentais no tratamento do câncer. Muitos destes compostos inibem a respiração mitocondrial, promovem a geração de ERO e colapsam o potencial de membrana (HAIL *et al.*, 2008; HAIL, 2005; TURRENS, 2003). Alguns destes efeitos são comuns aos compostos MI-D e S2.2, objetos deste estudo (CADENA *et al.*, 1998; PRADO *et al.*, 2004; PRADO, 2005). Esta revisão tratará a seguir das características químicas, atividades biológicas e mecanismos de ação, até então descritos para estes compostos.

2.2 COMPOSTOS MESOIÔNICOS - MI-D (CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA).

Conceitualmente, um composto pode ser denominado mesoiônico quando constituído por um anel heterocíclico de 5 membros, o qual não pode ser representado satisfatoriamente por uma estrutura covalente ou polar, e que possui um sexteto de elétrons π associados aos 5 átomos que formam o anel (OLLIS & RAMSDEN, 1976). Estes compostos podem ser representados genericamente pela estrutura demonstrada na figura 6, onde os átomos constituintes do anel, indicados pelas letras a-f, podem ser: carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre, com seus respectivos substituintes específicos para cada tipo de composto (OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982).

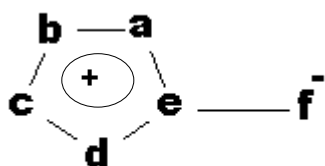


FIGURA 6. Representação genérica da estrutura de um composto mesoiônico.
 FONTE: OLLIS & RAMSDEN (1976); NEWTON & RAMSDEN (1982).

Apresentando regiões de carga positiva e negativa, associadas a um sistema aromático poliheteroatômico, estes compostos podem interagir com biomoléculas, enquanto que a ausência de uma carga líquida na molécula facilita a sua passagem através de membranas biológicas (NEWTON & RAMSDEN, 1982; CHEUNG *et al.*, 1992).

Dentre as classes dos compostos mesoiônicos que apresentam atividade biológica destacam-se as sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olatos), as sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminidas), os oxatriazóis e os 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos. Suas estruturas gerais estão representadas na figura 7 (KIER & ROCHE, 1967).

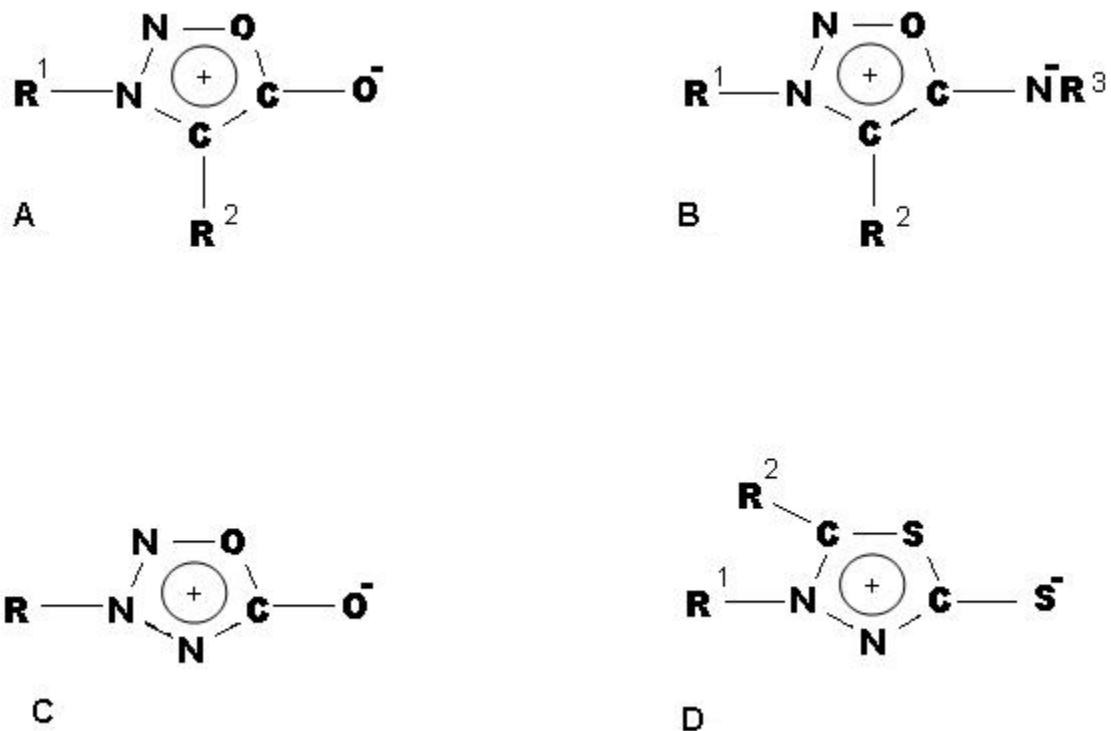


FIGURA 7. Estruturas representativas de compostos mesoiônicos com destacada atividade biológica.

FONTE: KIER & ROCHE (1967).

NOTA: (A) sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olato). (B) sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminida). (C) oxatriazóis (1,2,3,4 oxatriazólio-5-olato). (D) 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos (1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato).

Para as sidnonas (FIGURA 7A) diversas atividades biológicas foram descritas, tais como: antimicrobiana (COBURN & CARAPELLOTTI, 1976; MOUSTAFA & EISA, 1991; MOUSTAFA *et al.*, 2004), antimalárica contra *Plasmodium berghei* (NYBERG & CHEN, 1965), anti-inflamatória e analgésica (SATYANARAYANA & RAO, 1995), como estimulantes do sistema nervoso central (KIER *et al.*, 1967), antitumoral contra carcinoma 755 em ratos (GRECO *et al.*, 1962) e contra as células tumorais de carcinoma de Ehrlich, Sarcoma-180, histiocitoma fibroso B10MCII e células leucêmicas L1210 (GRYNBERG *et al.*, 1997; DUNKLEY & THOMAN, 2003).

As sidnoniminas (FIGURA 7B) são compostos estruturalmente semelhantes às sidnonas, porém menos estáveis (EADE & EARL, 1946), possuem efeito sobre o sistema cardiovascular, atividades antiplaquetária, antitrombótica e vasodilatadora *in*

vivo, efeitos relacionadas à liberação de óxido nítrico de suas estruturas (MAJID *et al.*, 1980; REHSE *et al.*, 1993 a, b).

Os oxatriazóis mesoiônicos (FIGURA 7C) têm apresentado muitas aplicações biológicas para diversos derivados. Da mesma forma que as sidnoniminas, os efeitos mais importantes dos oxatriazóis estão relacionados à sua capacidade intrínseca de liberar óxido nítrico (KAURUP *et al.*, 1994; KANKAANRANTA *et al.*, 1996). Estudos mostraram atividade antitrombótica, de inibição da agregação plaquetária, fibrinolítica, trombolítica e broncolítica (REHSE & MARTENS, 1993; REHSE & KONIG, 1995; COREL *et al.*, 1994; KANKAANRANTA *et al.*, 1996).

Em relação à classe dos 1,3,4- tiadiazóis mesoiônicos (FIGURA 7D), um importante representante é o MI-D. Este composto passa a ser mesoiônico após a desprotonação do seu grupo amina, o que ocorre em pH aproximado de 7,5 (FIGURA 8).

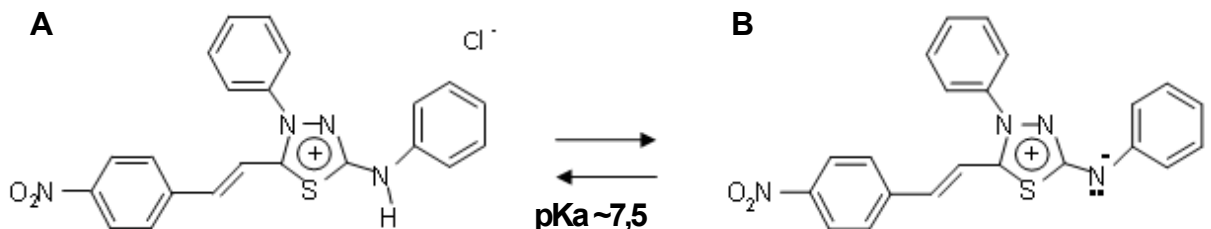


FIGURA 8. Estrutura química do cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) (A) e de seu derivado mesoiônico 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (B).

FONTE: GRYNBERG *et al.* (1997).

Os resultados de Grynberg e seus colaboradores (1997) forneceram as primeiras evidências da ação antitumoral do MI-D em Sarcoma 180 e tumor de Ehrlich, quando administrado intraperitonealmente em camundongos, nas doses de 30 e 25 mg.Kg⁻¹, respectivamente. Buscando uma correlação desta atividade com os efeitos sobre a bioenergética mitocondrial, Cadena *et al.* (1998) demonstraram que o composto reduz a eficiência da fosforilação oxidativa, diminuindo, de forma

significativa, o coeficiente de controle respiratório e a razão ADP/O. Análises dos complexos da cadeia respiratória evidenciaram que o composto é capaz de inibir o transporte de elétrons, sendo os sítios de inibição localizados após o complexo I e entre os complexos II e III. Também de forma dose dependente, o MI-D colapsou o potencial de membrana e estimulou a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas. No entanto, foi observada uma inibição desta atividade em mitocôndrias desacopladas por carbonilcianida p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). De acordo com estes resultados, os autores classificaram o MI-D como um agente desacoplador inibitório. Através de experimentos de inchamento mitocondrial e de polarização de fluorescência com o uso de sondas específicas, estes mesmos autores demonstraram que o MI-D afeta a fluidez e a elasticidade de membrana, aumentando sua rigidez (CADENA *et al.*, 2002).

Em cultura de células HeLa o composto promoveu as seguintes alterações morfológicas: condensação de cromatina, fragmentação do núcleo e formação de expansões globosas na membrana celular (blebs) (CADENA, 1999), alterações características da morte celular por apoptose (DANIAL & KORMEYER, 2004). Alternativamente, a possibilidade de que o composto mesoiônico possa ter levado a morte celular por necrose foi também considerada, uma vez que entre as células tratadas com MI-D, algumas se apresentavam inchadas, característica de morte celular por necrose (CADENA, 1999).

A ação antitumoral do MI-D em melanoma, tumor mais agressivo e metastático, foi avaliada em estudos realizados também no Laboratório de Oxidações Biológicas e de Cultivo Celular da UFPR. Os efeitos antitumorais do composto e de outros derivados mesoiônicos da mesma classe foram comparados entre si (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004a) e com antineoplásicos de uso corrente, utilizando modelos murinos (B16-F10) e linhagens de melanoma humano. Nestes estudos o MI-D (25 mg.Kg⁻¹) mostrou-se mais eficaz que os antineoplásicos fotemustina e dacarbazina em inibir o desenvolvimento de melanoma B16-F10 em camundongos, assim como também foi eficiente em inibir (64%) o crescimento de melanomas já desenvolvidos (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003).

Em diferentes linhagens de melanoma humano (MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO), o MI-D demonstrou uma elevada atividade citotóxica. A adesão das células MEL-85 a diferentes componentes da matriz extracelular foi avaliada em presença

do composto, sendo que o mesmo reduziu a adesão à laminina, fibronectina e matrigel. Também a morfologia e a organização dos filamentos de actina do citoesqueleto foram alteradas pelo tratamento com MI-D (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004b).

Em adição a estes, em modelo murino, Cardoso *et al.* (2004) demonstraram que o MI-D possui ação analgésica e antiinflamatória nas doses de 8 mg.Kg⁻¹, e antipirética na dose de 1 mg.Kg⁻¹.

Em relação aos demais derivados da classe 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, importantes atividades biológicas têm sido descritas, dentre as quais destacam-se: a) atividade antibacteriana *in vitro* para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris* (PADVAMATHI *et al.*, 2008); b) inibição da enzima adenosina 3',5'-monofosfato fosfodiesterase, devido a sua similaridade estrutural com as xantinas naturais, conhecidos inibidores da fosfodiesterase (GLENNON *et al.*, 1981); c) atividade antifúngica *in vitro* e antibacteriana para *E. coli*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus*, e os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula sp.*, *Penicillium sp.*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* (LIMA *et al.*, 1986); d) atividade contra *Saccharomyces cerevisiae* e atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (MONTANARI *et al.*, 1992; MONTANARI *et al.*, 1997); e) atividade antitumoral (GRYNBERG *et al.*, 1997; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003, 2004a e b); f) atividade contra as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania amazonensis* (DA SILVA *et al.*, 2002) e contra as formas promastigotas de 3 tipos de *Leishmania*, *L. amazonensis*, *L. Brasiliensis* e *L. Chagasi* (RODRIGUES *et al.*, 2007); g) atividade contra as formas epimastigotas, trypomastigotas e amastigotas de *Trypanosomas cruzi* (FERREIRA *et al.*, 2008); entre outras.

2.3 IMIDAS CÍCLICAS – N-FENILMALEIMIDA (S2.2)

As imidas cíclicas são compostos obtidos por síntese orgânica resultantes da reação entre ácidos dicarboxílicos e amônia, com conseqüente liberação de água. São compostos de natureza hidrofóbica, sendo que para estudos biológicos,

são solubilizadas em solventes apolares, comumente o dimetilsulfóxido (DMSO), (HARGREAVES *et al.*, 1970).

Na figura 9 está representada a estrutura geral das imidas cíclicas (-CO-N(R')-CO-), onde R' pode ser um átomo de hidrogênio, grupo alquila ou arila, sendo a maioria destes compostos constituído por um sistema cíclico com menos de 7 átomos de carbono (HARGREAVES *et al.*, 1970).

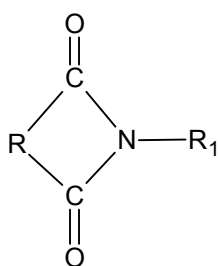


FIGURA 9. Estrutura geral das imidas cíclicas.

FONTE: HARGREAVES *et al.* (1970)

NOTA: R1= H, alquil ou aril.

As subclasses desses compostos incluem as maleimidas, succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas (FIGURA 10), entre outras, bem como seus respectivos derivados, sendo que muitos destes apresentam atividades biológicas que motivam estudos voltados para uma possível aplicação terapêutica (HARGREAVES *et al.*, 1970, CECHINEL-FILHO *et al.* 2003).

Para algumas maleimidas foram descritos os efeitos antifúngico (SORTINO *et al.*, 2008), antibacteriano, inseticida (HARGREAVES *et al.*, 1970; CECHINEL-FILHO *et al.*, 2003), antinociceptivo (ANDRICOPULO *et al.*, 2000) e citotóxico contra vários tipos de células cancerosas (FERRI *et al.*, 2008; JHA *et al.*, 2007). As maleimidas podem servir também como modelo na obtenção de outros derivados imídicos, sendo a N-fenilmaleimida ou S2.2 (FIGURA 11), objeto deste estudo, muito utilizada para a síntese de derivados com potencial farmacológico (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998).

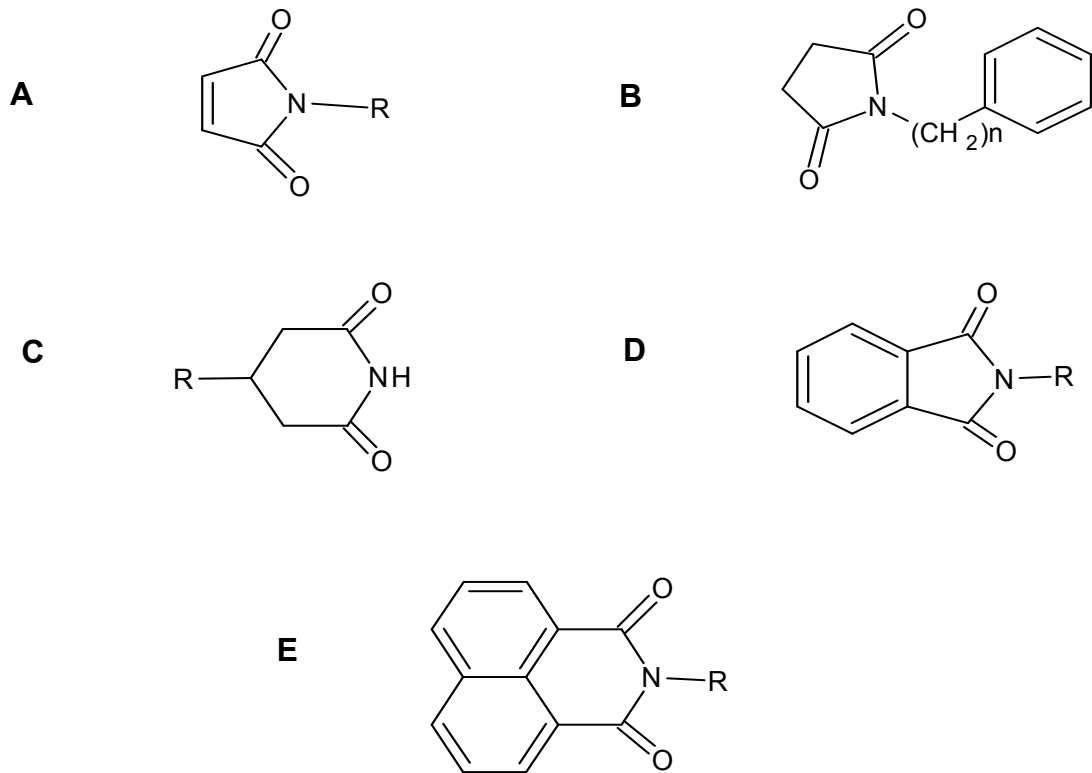


FIGURA 10. Estruturas gerais de imidas cíclicas com destacada atividade biológica.

FONTE: CECHINEL-FILHO *et al.* (2003); HARGREAVES *et al.* (1970).

NOTA: (A) Maleimidas. (B) Succinimidas. (C) Glutarimidas. (D) Ftalimidas. (E) Naftalimidas.

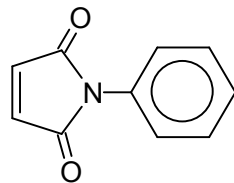


FIGURA 11. Estrutura da N-fenilmaleimida (S2.2).

FONTE: CECHINEL-FILHO *et al.* (1996).

Sob outro enfoque, foram avaliados os efeitos de diferentes maleimidas sobre parâmetros bioenergéticos em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (PRADO *et al.*, 2004, PRADO, 2005). Esses estudos foram desenvolvidos no

Laboratório de Oxidações Biológicas e de Cultivo Celular da UFPR. Entre os compostos testados estava a N-fenilmaleimida (S2.2), que foi capaz de inibir drasticamente o consumo de oxigênio em mitocôndrias desacopladas por FCCP (~70% na concentração de 40 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ de prot.) . Esta inibição foi dose dependente e localizada entre os complexos I e III da cadeia respiratória. O composto também estimulou a atividade ATPásica em ~100% na concentração de 120 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ de proteína. O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), analisado por citometria de fluxo foi reduzido pela maleimida na concentração de 40 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ de prot., em ~40%.

Os efeitos citotóxicos desta maleimida também foram avaliados por PRADO (2005) em cultura celular. O autor demonstrou que em células de melanoma murino da linhagem B16-F10 o consumo de oxigênio foi reduzido em ~90% em presença de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de S2.2. A viabilidade destas células foi reduzida em ~50% com 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto (após 4 horas de tratamento) e a morte de todas as células foi observada na concentração de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Da mesma forma, a proliferação e adesão das células B16-F10 também foram inibidas, em função da dose e do tempo de incubação. O composto S2.2 (30 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$) causou uma importante redução (~70%) do crescimento tumoral *in vivo*, em modelo de melanoma murino em camundongos C57/BL6, sendo tal efeito observado tanto em tumores recém implantados (24 h) como em tumores anteriormente estabelecidos (10 dias). As análises morfológicas mostraram redução do número de células e alteração de vários parâmetros celulares, como a redução de tamanho, vacuolização do citoplasma, condensação da cromatina, diminuição do número de espículas celulares, desorganização do citoesqueleto de actina, assim como a formação de expansões globosas, efeitos sugestivos de apoptose. Este composto na concentração de 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ainda reduziu o potencial elétrico de membrana (~70%) e aumentou os níveis de citocromo c citoplasmático (~37%). O autor concluiu que a S2.2 possui uma importante atividade antimelanoma, que pode ser exercida por diferentes mecanismos, dentre eles, a apoptose.

Em relação à seguinte classe de imidas cíclicas, as succinimidas, são descritas as atividades antimicrobiana, antiespasmódica, analgésica, embora as mesmas não tão intensas quanto àquelas observadas para as correspondentes

maleimidadas (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2003). Efeitos anticonvulsivantes também foram descritos para estes compostos (KAMINSKI *et al.*, 2008).

Já para as glutarimidadas foram demonstradas as atividades antifúngica (VOLPP & DOUNCHIS, 1971), antipsicótica (YEVICH *et al.*, 1986), anticonvulsivante (GOEHRING *et al.*, 1990), analgésica (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2003), ansiolítica e antidepressiva (PALUCHOWSKA *et al.*, 2007).

Para as ftalimidadas, são relatadas as atividades anticonvulsivante (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2003), antibacteriana (ANDRICOPULO *et al.*, 2000) e citotóxica em células renais de macaco verde africano (ABDEL-AZIZ, 2007).

A última classe citada, as naftalimidadas, apresenta atividade citostática contra diferentes tipos de tumores (TORRES SUÁREZ & CAMACHO, 1994; BRAÑA *et al.*, 1995; COSTANZA *et al.*, 1995) e analgésica (ANDRICOPULO *et al.*, 2000).

As imidas cíclicas também têm sido utilizadas na síntese de fármacos poliméricos com atividades biológicas de interesse como antitumoral, antiviral, antibacteriana e fungicida, a exemplo de copolímeros do tipo metacrilato de poliglicilmaleimida (GMI-CO-MA) e vinil acetato de poliglicilmaleimida (GMI-CO-VAC) que apresentaram atividade antitumoral *in vivo* (ZAWADOWSKI *et al.*, 1995).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Estudos realizados no laboratório de Oxidações Biológicas e de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR apontam o MI-D e a S2.2 como potenciais fármacos para o tratamento do melanoma. Como já descrito, estes compostos têm a capacidade de inibir o crescimento do tumor já desenvolvido e de reduzir a viabilidade de células de melanoma murino B16-F10 em cultura. Estudos morfológicos também sugeriram que a morte celular ocorre por apoptose. Contudo, o mecanismo pelo qual ocorreria este tipo de morte ainda não foi totalmente esclarecido.

Em adição a ação antitumoral, o MI-D e a S2.2 exercem importantes efeitos sobre a bioenergética mitocondrial, comprometendo de forma significativa os eventos relacionados a fosforilação oxidativa, incluindo a permeabilidade das membranas mitocondriais. Uma vez que alterações nesta permeabilidade podem desencadear a morte celular, é possível que os compostos estejam causando a morte das células tumorais por eventos relacionados à via mitocondrial.

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar esta possibilidade ao determinar os efeitos do MI-D e da S2.2 sobre a formação do poro de transição de permeabilidade e transporte de cálcio, sobre o estresse oxidativo e defesas antioxidantes e sobre a liberação de citocromo c, fenômenos que estão diretamente relacionados com a indução de apoptose pela via mitocondrial, e assim contribuir para o conhecimento do mecanismo de ação destes compostos nas células cancerosas. Para tanto foram utilizados diferentes modelos experimentais: mitocôndrias isoladas, partículas submitocondriais, lipossomas e células em cultura e, estabelecidos, os seguintes objetivos específicos:

- a) Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, avaliar os efeitos do MI-D e da S2.2 sobre:
 - a formação do poro de transição de permeabilidade e o fluxo de cálcio;
 - a lipoperoxidação induzida.

- b) Em partículas submitocondriais e lipossomas de fosfatidilcolina, avaliar os efeitos do MI-D e S2.2 sobre a lipoperoxidação induzida.
- c) Em cultura de células B16-F10 e HeLa avaliar os efeitos do MI-D e da S2.2 sobre:
- a produção de peróxidos, a lipoperoxidação não induzida e a liberação de citocromo c.
 - a atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx, Gred, e Catalase.

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

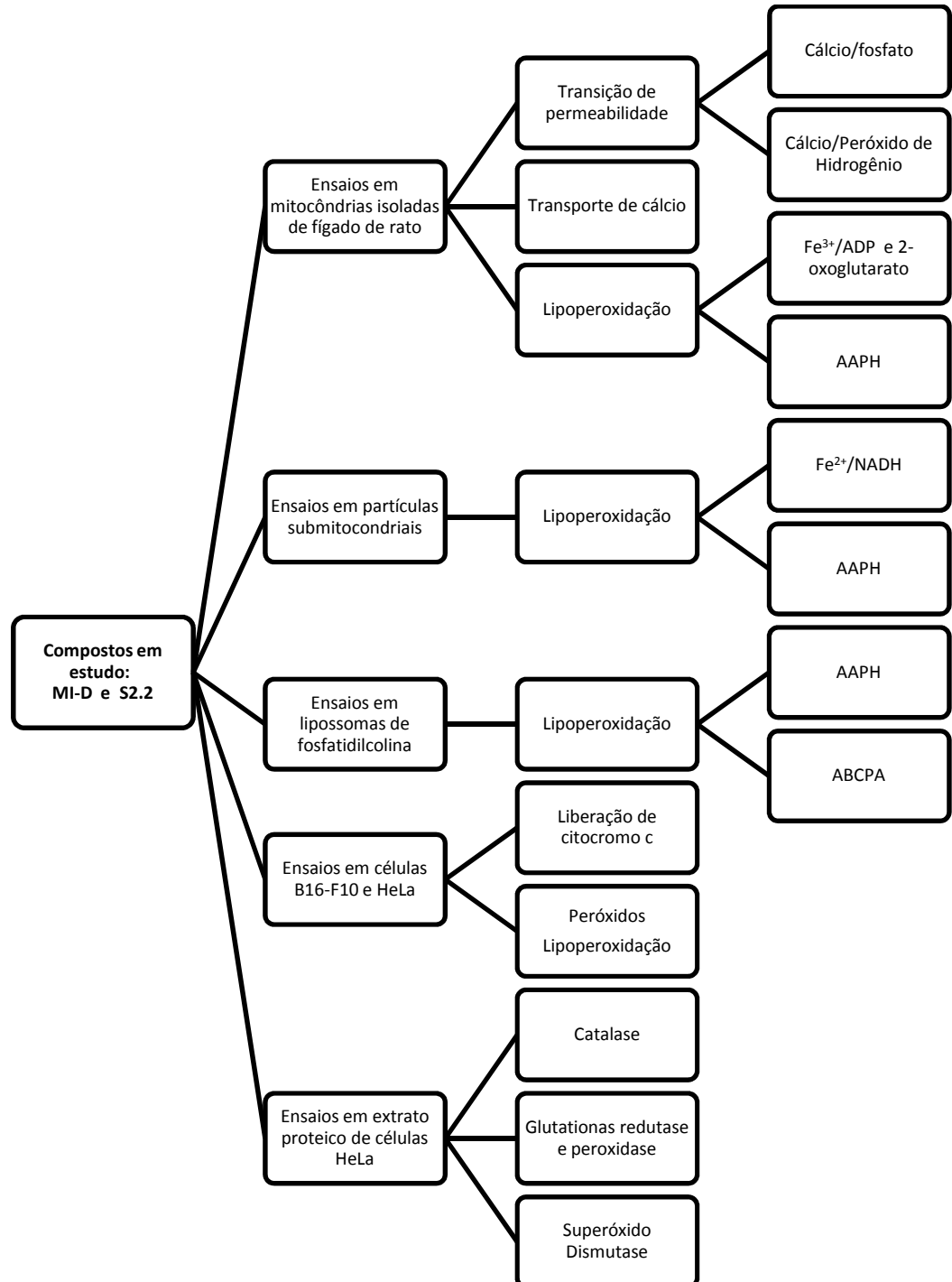


FIGURA 12. Fluxograma do plano de trabalho experimental.

FONTE: O Autor (2009).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

Foram obtidos da Sigma Chemical Co. : Dimetil sulfóxido (DMSO), D-manitol, ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico (HEPES), ácido etilenoglicol bis(éter 2-aminoetil)-N,N,N',N' tetracético (EGTA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), albumina de soro bovino, ácido glutâmico, adenosina 5'-difosfato (ADP), adenosina 5'-trifosfato (ATP), nicotinamida adenina dinucleotideo reduzida (NADH), fosfoenolpiruvato, piruvato quinase (tipo I, 100U/mg de proteína), lactato desidrogenase (tipo I, 60U/mg de proteína), carbonilcianida *p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), brometo de 3-(4,5-demitiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), Fura 2AM e tris (hidroximetil) amino metano (TRIS).

Os reagentes a seguir indicados foram adquiridos dos laboratórios: ácido *cis*-parinárico (Molecular Probes), meio essencial mínimo de Eagle (MEM) e RPMI 1640 (Flow laboratories), soro fetal bovino estéril (Invitrogen) e tripsina (Difco). Os demais reagentes, também com alto grau de pureza, foram obtidos da Merck.

O MI-D (cloreto de 4-fenil-5-(4-nitrocinaoíl)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) foi sintetizado e gentilmente cedido pela Prof^a. Dra. Áurea Echevarria do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O composto teve sua estrutura confirmada por RMN ¹H e ¹³C e espectroscopia de massas (GRYNBERG *et al.*, 1997). A S2.2 (N-fenilmaleimida) foi sintetizada e caracterizada estruturalmente por métodos espectroscópicos e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Valdir Cechinel-Filho e pela Profa. Dra. Fátima de Campos Buzzi, da Universidade do Vale do Itajaí.

5.1.1 Preparação das soluções de MI-D e S2.2

As soluções de MI-D e S2.2 foram preparadas em DMSO e mantidas congeladas a -18°C. Para a utilização nos ensaios, as soluções estoque foram diluídas em meio de reação, a fim de obter-se a concentração final desejada para cada situação experimental. Em todos os ensaios (com exceção dos realizados em

cultura celular) os compostos foram incubados por 2 minutos no sistema de reação antes do início dos experimentos. Para cada ensaio foi feito o respectivo controle com a mesma concentração do solvente (DMSO), mantendo-se as mesmas condições experimentais.

5.2 ANIMAIS

Para o isolamento de mitocôndrias, foram utilizados ratos albinos, da linhagem Wistar, machos, pesando entre 200 g - 300g, mantidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas com água à vontade. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados e certificados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (Certificado nº 242 em anexo).

5.3 OBTENÇÃO DE FRAÇÕES SUBCELULARES

5.3.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por VOSS *et al.* (1961) com algumas modificações, utilizando como meio de isolamento: D-manitol 250 mmol.L^{-1} , HEPES 10 mmol.L^{-1} , pH 7.2, EGTA 1 mmol.L^{-1} e BSA 0,1g%. Para a obtenção das mitocôndrias, os animais foram sacrificados por decapitação. O fígado foi imediatamente retirado e imerso em meio de extração gelado. Após lavado, o órgão foi picado e homogeneizado em homogenizador van Potter Elvehjen, usando-se sucessivamente pistilo frouxo (3 vezes) e normal (2 vezes). O homogeneizado obtido foi centrifugado a $320 \times g$ a 4°C em centrífuga Hitachi himac CR21E, durante 5 minutos, para eliminação de restos de células intactas, membranas e núcleos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a $12.600 \times g$, durante 10 minutos a 4°C . O precipitado obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspensado, lavado duas vezes em meio de extração por centrifugação a $8.100 \times g$, durante 10 minutos a 4°C . As mitocôndrias assim obtidas foram ressuspensas em meio de extração e mantidas a 4°C até a sua utilização.

5.3.2 Obtenção de partículas submitocondriais (PSMs)

As PSMs foram obtidas de acordo com PENIN *et al.* (1982), com pequenas modificações. Para a obtenção de PSM acopladas, as mitocôndrias obtidas como descrito no item anterior foram ressuspensas em concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em meio constituído de KH_2PO_4 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4. A suspensão foi centrifugada a $105.000 \times g$ por 9 minutos em ultracentrífuga Hitachi himac cp90 β , o precipitado foi ressuspenso em meio constituído de sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e TRIS-HCl $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4, e submetido a centrifugação a $1.500 \times g$ por 15 minutos, para eliminar remanescentes de membrana externa. O precipitado foi ressuspenso em meio constituído de sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, TRIS- H_2SO_4 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7,5), ATP $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e MgSO_4 $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A suspensão, mantida a 4°C , foi sonicada a 40 Watts em seis intervalos de 30 segundos para obtenção de PSM acopladas. Em seguida a suspensão foi centrifugada a $22.500 \times g$ por 10 minutos a 4°C , sendo o sobrenadante centrifugado a $105.000 \times g$ por 75 minutos e o precipitado, constituído de partículas submitocondriais, ressuspenso em meio contendo sacarose $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TRIS- H_2SO_4 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7,5) e MgSO_4 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Esta última centrifugação foi repetida mais uma vez, e a preparação foi acondicionada em nitrogênio líquido.

Para a obtenção de PSM desacopladas utilizou-se mitocôndrias previamente isoladas, seguindo-se o procedimento descrito acima com exceção da etapa de sonicação que, neste caso, foi realizada a 80 Watts em três intervalos de 1 minuto. As partículas acopladas e desacopladas foram diferenciadas por sua atividade de ATPase, a qual foi avaliada espectrofotometricamente como descrito (PULMAN *et al.*, 1970; MARTINS *et al.*, 1988). O meio de reação foi constituído de sacarose $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, TRIS-HCl $12 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, KCl $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, NADH $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, PEP $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, piruvato quinase 4U, lactato desidrogenase 3U, ATP $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g}$ de PSM. A reação ocorreu a 30°C na presença ou ausência de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de FCCP. A concentração de NADH foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6.220 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ em 340 nm e os resultados foram expressos como nmol de Pi liberado por min por mg de proteína, considerando que 1.0 nmol NADH oxidado corresponde a 1.0 nmol de Pi liberado.

5.4 PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA

5.4.1 Lipossomas unilamelares - indução da lipoperoxidação com AAPH (α - α' Azodiisobutiramidina dihidroclorato).

Lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina de soja (PC) foram preparados como descrito por DINIS *et al.* (1993) com pequenas modificações. O lipídeo foi dissolvido em clorofórmio e o solvente evaporado até a secura, em evaporador rotatório a 37°C. A seguir o filme lipídico foi hidratado com volume adequado de tampão TRIS-HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,4, adicionado de forma a se obter uma concentração lipídica final de 5 mmol.L⁻¹. A mistura foi levemente agitada em banho-maria a 37°C obtendo-se assim lipossomas multilamelares. A partir desta preparação foram obtidos os lipossomas unilamelares como descrito por MacDONALD *et al.* (1991). Para tanto, a preparação foi submetida a 7 passagens através de um filtro simples de poliestireno com 0,22 μ m de tamanho do poro.

5.4.2 Lipossomas multilamelares - indução da lipoperoxidação com ABCPA (4,4 azobis (ácido 4-cianopentóico)).

Os lipossomas multilamelares com o indutor de fase lipídica ABCPA, foram preparados de acordo com TESORIERE *et al.* (1993) com algumas modificações. Soluções de fosfatidilcolina de soja em clorofórmio foram misturadas com o indutor de radicais de fase lipídica ABCPA, dissolvido em metanol, num balão de evaporação mantido sempre em banho de gelo. Os solventes foram secos por corrente de nitrogênio gasoso, o filme obtido foi dissolvido em tampão TRIS-HCl 16 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), para obter uma concentração de 10 mmol.L⁻¹ de ABCPA e 800 μ mol.L⁻¹ de fosfatidilcolina de soja. A solução foi agitada em vortex por 10 minutos, obtendo-se assim os lipossomas multilamelares com indutor de fase lipídica.

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS ENVOLVENDO AS PREPARAÇÕES MITOCONDRIAIS

5.5.1 Transição de permeabilidade mitocondrial

Os experimentos de transição de permeabilidade mitocondrial foram realizados acompanhando-se o decréscimo da absorbância em 540 nm relativa ao inchamento da organela conforme descrito (BERNARDI *et al.*, 1992; GUNTER & PFEIFER, 1990). O meio de reação foi constituído de D-manitol 250 mmol.L⁻¹, tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹, proteína mitocondrial 0,5 mg. mL⁻¹ e 45 µmol.L⁻¹ de CaCl₂. Foram feitas adições individuais de ditioneitol (DTT) 1 mmol.L⁻¹, EGTA 1 mmol.L⁻¹, e ciclosporina A (CsA) 0,5 µmol.L⁻¹, para confirmar que o inchamento observado era decorrente da formação do poro. Para induzir o inchamento pela formação do PTPM foi usado fosfato de potássio 0,3 mmol.L⁻¹ ou H₂O₂ 10 µmol.L⁻¹.

5.5.2 Transporte mitocondrial de cálcio

Mitocôndrias de fígado de rato obtidas como descrito no item 5.3.1. foram utilizadas nos ensaios de fluxo de cálcio conforme descrito por SCARPA (1979) com meio de reação contendo: D-manitol 125 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹, HEPES-KOH (pH 7,2) 10 mmol.L⁻¹ e fosfato de potássio 1 mmol.L⁻¹. Este meio foi incubado com resina Chelex-100 0,1% e mantido sob agitação constante durante período mínimo de 4 horas, antes do uso. No ensaio, mitocôndrias (3,5 mg.mL⁻¹) foram incubadas com fura 2AM 5 µmol.L⁻¹ durante 20 min, no escuro a 28°C. Decorrido este tempo a preparação foi centrifugada durante 10 min a 8.100 x g e CaCl₂ 13,5 µmol.L⁻¹ foi adicionado, sendo seu influxo iniciado pela adição de glutamato de sódio 4 mmol.L⁻¹. Após finalizada captação, o efluxo do íon foi induzido por FCCP 1 µmol.L⁻¹ ou por vermelho de rutênio 10 µmol.L⁻¹. As alterações de intensidade de fluorescência provocadas pela captação e efluxo do íon, foram acompanhadas em espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301PC a 340 nm para emissão e 510 nm para excitação, com abertura de fenda de 5, a 28°C, em espectrofluorímetro.

5.6 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Foram usadas diferentes metodologias para quantificar a peroxidação lipídica. Para o MI-D foi usado o método de TBARS e consumo de oxigênio, e para a S2.2 foi usado o método de TBARS e a oxidação do ácido *cis*-parinárico.

5.6.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Mitocôndrias, obtidas conforme descrito no item 5.3.1 foram incubadas sob agitação constante, a 37°C, em meio de reação constituído de: D-manitol 250 mmol.L⁻¹ e HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2. Foram usadas duas metodologias para a indução da lipoperoxidação. Uma utilizando o α - α' -Azodiisobutiramidina dihidroclorato, AAPH (10 mmol.L⁻¹), um indutor de radicais livres de fase aquosa, e a outra por adição de ADP 2 mmol.L⁻¹, FeCl₃ 0,2 mmol.L⁻¹ e 2-oxoglutarato 6 mmol.L⁻¹ (TAKAYANAGI *et al.*, 1980) para induzir a produção de radicais livres provenientes da cadeia respiratória. Após 45 minutos de incubação, alíquotas foram retiradas, às quais foram adicionadas 2 mL de reativo constituído de ácido tricloroacético (TCA) 15% (w/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,375% (w/v) em HCl 0,25 mol.L⁻¹ e butil hidroxitolueno (BHT) 0,01%. A mistura foi submetida à fervura por 15 minutos em banho-maria, resfriada e centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada em 535 nm e os resultados foram expressos em nmol de TBARS por miligrama de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do malondialdeído de $1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (BUEGE & AUST, 1978).

5.6.2 Medida da fluorescência do ácido *cis*-parinárico

As determinações fluorimétricas do ácido *cis*-parinárico (PnA) foram realizadas em espectrofluorímetro – modelo – RF –5301 PC – Shimadzu a 27°C sob agitação constante. A solução estoque de ácido *cis*-parinárico foi preparada a 2 mmol.L⁻¹ em etanol e conservada em alíquotas sob atmosfera de N₂, a –18°C. A concentração desta solução foi determinada com base na absorvidade molar a 304 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar ϵ 78.000 mol⁻¹.L.cm⁻¹ correspondente à banda de maior intensidade do espectro de absorção (SKLAR *et a*, 1977 a, b). A

incorporação da sonda PnA foi iniciada pela adição de uma alíquota de uma solução etanólica de ácido cis-parinárico a suspensão de partículas submitocondriais em tampão TRIS-HCl 25 mmol.L⁻¹ (pH 7,4) e NaCl 125 mmol.L⁻¹, sob leve agitação, por 2 minutos. A intensidade de fluorescência foi registrada ao longo do tempo, utilizando-se os comprimentos de onda de 324 nm e 413 nm, para excitação e emissão, respectivamente, com abertura de fenda de 5. Para indução da oxidação do PnA foi usado AAPH 10 mmol.L⁻¹.

5.6.3 Consumo de Oxigênio

A oxidação lipídica das membranas (lipossomas de fosfatidilcolina de soja e partículas submitocondriais) foi seguida cineticamente pelo registro do consumo de oxigênio detectado por intermédio de um eletrodo de oxigênio do tipo Clark em oxígrafo GILSON acoplado a um registrador. As reações foram realizadas em câmara de vidro fechada com capacidade de 1,3 mL, termostatizada e com agitação constante, sendo iniciadas pela adição dos indutores da lipoperoxidação AAPH 10mmol.L⁻¹, ABCPA 10mmol.L⁻¹ ou Fe²⁺/NADH 500μmol.L⁻¹ e 100 μmol.L⁻¹.

5.7 CAPACIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAL SUPERÓXIDO

A capacidade seqüestradora do radical superóxido foi avaliada pelo método descrito por Nishimiki e seus colaboradores (1972), com algumas modificações. Neste ensaio, radicais superóxido gerados em presença de NADH e PMS reduzem o nitroblue tetrazolium (NBT). O sistema de reação foi constituído de tampão TRIS-HCl 10 mmol.L⁻¹ (pH 8,0), NADH 340μmol.L⁻¹, NBT 72μmol.L⁻¹ e PMS 30μmol.L⁻¹. A reação foi acompanhada a 560 nm durante 5 minutos e a capacidade sequestradora do radical superóxido foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Capacidade sequestradora (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \right) * 100 \quad (\text{Qi et al., 2005}).$$

5.8 PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NO CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES

5.8.1 Células

Foram utilizadas células da linhagem B16-F10 e HeLa. As B16-F10 são células de melanoma murino, que crescem em monocamada. Células HeLa são derivadas de carcinoma de cervix uterino humano, crescem em monocamada e apresentam aparência epitelial. As duas linhagens foram procedentes da American Type Culture Collection, sendo adquiridas da Seção de Cultivo Celular do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, e mantidas no laboratório de cultivo celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

5.8.2 Esterilização de Materiais

Todo material de vidro utilizado para os procedimentos de cultivo de células (frascos de vidro para armazenamento de soluções, equipamento para filtração sob pressão, pipetas de vidro, microtubos e ponteiras de pipetas automáticas) foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante 45 minutos, a 1 atm. Material de plástico como garrafas, tubos cônicos e rodos foram esterilizados em microondas, durante 40 minutos.

5.8.3 Soluções e Meios de Cultura

5.8.3.1 Solução Salina Tamponada (PBS)

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque concentrada 5 vezes. Esta solução concentrada foi constituída por: NaCl 680 mmol.L⁻¹, KCl 13,4 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 40,5 mmol.L⁻¹ (pH 7,5). A solução foi esterilizada em autoclave (120°C, 45 minutos) e armazenada a 4°C. Para o uso, a solução foi diluída com água ultrapura estéril, recém obtida.

5.8.3.2. Solução Balanceada de Hanks (HBSS)

A solução balanceada de Hanks (HBSS) se constitui da mistura das soluções A e B, as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 20x) e armazenadas a 4°C. A solução A era composta de NaCl 2,73 mol.L⁻¹, KCl 107 mmol.L⁻¹, CaCl₂ 25 mmol.L⁻¹ e MgSO₄.7H₂O 27 mmol.L⁻¹. A solução B era constituída por Na₂HPO₄ 8,5 mmol.L⁻¹ e glicose 110 mmol.L⁻¹. As duas soluções foram preparadas em água ultrapura em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. Para o uso, as soluções A e B foram misturadas (1:1), diluídas com água ultrapura e o pH ajustado para 7,4. As soluções foram esterilizadas em autoclave (120°C, 45 minutos) e armazenada a 4°C.

5.8.3.3 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados foram meio essencial mínimo de Eagle (MEM) e RPMI 1640, reconstituídos em água ultrapura e esterilizados por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius. Após o procedimento de filtração, alíquotas do meio foram deixadas em estufa 37°C, para acompanhamento do aparecimento de eventuais contaminantes. Os meios foram mantidos em geladeira a 4°C. Para os experimentos os meios foram suplementados com quantidade adequada de soro fetal bovino estéril inativado. O pH do meio foi ajustado com quantidades adequadas de solução de bicarbonato de sódio esterilizado em autoclave a 120°C por 45 minutos, e para o tamponamento do meio em pH 7,4 foi utilizado HEPES 20 mmol.L⁻¹ (pH 7,0).

5.8.3.4 Solução de Tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA foi constituída de NaCl 137 mmol.L⁻¹, KCl 5,4 mmol.L⁻¹, glucose 5 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 0,42 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 0,44 mmol.L⁻¹, NaHCO₃ 2,3 mmol.L⁻¹, EDTA 0,53 mmol.L⁻¹, 50 mg % tripsina (1:250) e 2 mg % de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio. A solução foi esterilizada por filtração e armazenada a -20°C.

5.8.4 Manutenção das Células B16-F10

A linhagem celular foi cultivada seguindo a rotina do Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, em meio RPMI 1640 contendo 7,5% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo), em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°C. Os repiques foram realizados utilizando-se solução Tripsina-EDTA (item 5.8.3.4) para descolar as células. Para armazenamento das linhagens, as células (10⁶ células.mL⁻¹) foram suspensas em meio de cultura, acrescido de soro fetal bovino 40% (v/v) e DMSO 10% (v/v), e congeladas inicialmente a -20°C durante 2 horas, passadas a -70°C e mantidas durante 48 horas, e a seguir estocadas em nitrogênio líquido (-196°C). Para uso as células foram descongeladas a 37°C e adicionadas em garrafas pequenas (50 mL) contendo meio adequado como já descrito. Após adesão das células à superfície da garrafa (~2h), o meio foi trocado, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (Olympus, modelo CK2).

5.8.5 Manutenção das Células HeLa.

As células HeLa foram cultivadas em condições similares às células B16-F10 com pequenas modificações: o meio de cultivo usado foi o MEM com 7,5 % de SFB e as células foram repicadas com tripsina-EDTA.

5.8.6 Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil [4-, 5-dimetiltiazol-2il]-2,5 difeniltetrazólio) de acordo com o descrito por MOSSMAN (1983). Segundo o princípio do método, as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em DMSO que absorvem a 550 nm.

Células HeLa e B16-F10 foram plaqueadas (1 x 10⁴ células por poço) em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ durante 24 horas para total aderência. Após o período de aderência as células foram

tratadas com DMSO (grupo controle) ou com um dos compostos em estudo. Após o tempo de tratamento o sobrenadante foi descartado e aos poços foi acrescentado 180 μL de HBSS mais 20 μL de solução de MTT de modo a obter-se uma concentração final de MTT de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As células foram incubadas por mais 3 horas a 37°C em atmosfera de 5 % CO_2 . Após a incubação o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO. A leitura da absorbância em 550 nm foi realizada em leitor de microplacas BIO-RAD modelo Bemchmark, utilizando-se o solvente DMSO como branco.

5.8.7 Determinação de peróxidos.

Peróxidos foram quantificados pelo método da oxidação do íon ferroso detectado pela formação do complexo Fe^{3+} - alaranjado de xilenol (JIANG *et al.*,1990). Células HeLa e B16-F10 foram plaqueadas (1×10^4 células por poço) em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 durante 24 horas para total aderência. Após o período de aderência as células foram tratadas com DMSO (grupo controle) ou com um dos compostos em estudo. Após o tempo de tratamento, 30 μL do meio sobrenadante foram misturados com 270 μL de solução indicadora (250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sulfato ferroso amoniacal, 25 mmol.L^{-1} de H_2SO_4 , 100 mmol.L^{-1} de sorbitol e 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de alaranjado de xilenol), seguido de agitação e incubação a temperatura ambiente durante 1 hora, no escuro. Após incubação a formação do complexo alaranjado de xilenol – Fe (III) foi avaliada pela absorbância a 560 nm em leitor de microplacas BIO-RAD modelo Bemchmark. Os resultados foram expressos em μmol de peróxido, calculado de acordo a curva de calibração realizada com soluções de H_2O_2 de concentração conhecida.

5.8.8 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em células

A determinação da lipoperoxidação em células HeLa e B16-F10 foi realizada de acordo ao método descrito por OHKAWA *et al.* (1979) com modificações. As células foram plaqueadas (4×10^5 células/poço) em placa de 6 poços e incubadas durante 24 horas. Em seguida as células foram tratadas com cada um dos compostos, mantendo um volume final de 2 mL/poço. Após o tratamento as células

foram soltas com rodo e sonicadas durante 30 segundos a 20W, alíquotas de 250µL foram retiradas e misturadas com 100 µL de SDS 7%, 150 µL de ácido fosfotungstínico 1%, e 1,5 mL de TBA 0,67% (preparado em HCl 66,66 mmol.L⁻¹, no escuro e sob aquecimento). As amostras foram agitadas e incubadas a 95°C durante 1 hora, seguida de resfriamento em banho de gelo, n-butanol (2 mL) foi adicionado, seguindo-se forte agitação em vortex e centrifugação a 4000 x g durante 10 minutos. A fluorescência da fase orgânica foi determinada em espectrofotômetro de fluorescência Shimadzu modelo RF-5301PC, com 520 nm e 553 nm, de emissão e excitação, respectivamente, com abertura de fenda de 5. Os resultados foram calculados utilizando-se curva de calibração com 1,1,3,3-tetraetoxi propano.

5.8.9 Detecção da liberação de citocromo c

Para a detecção do citocromo c, foi usada a metodologia descrita por APPAIX *et al.* (2000) com algumas modificações. As células (4×10^5 células/poço) foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas por 12 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% CO₂. Decorrido este tempo, foram expostas a cada um dos compostos em estudo (MI-D ou S2.2) diluídos em meio de cultura. Após o tratamento, as células foram soltas, centrifugadas e lavadas com PBS, mantendo um volume final de 1mL. Uma alíquota de 30 µL foi separada para quantificação de proteína pelo método de BRADFORD (1956). A segunda alíquota foi centrifugada a 4.500 x g durante 15 minutos, o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de solução A (TRIS-HCl 10mg.mL⁻¹, pH 7,2, EGTA 3mg.mL⁻¹ e sacarose 50 µg.mL⁻¹) e digitonina 10 µmol.L⁻¹ foi adicionada e incubada durante 30 minutos a 4°C. Após o período de incubação a suspensão celular foi centrifugada a 10.000 x g durante 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado usando membrana de poliestireno com diâmetro de poro de 200 nm, sendo sua absorbância lida a 414 nm. A concentração de citocromo c liberada foi calculada usando o ϵ 100 mmol⁻¹.L.cm⁻¹, e os resultados expressos em nmol de citocromo c liberado. mg⁻¹ prot.

5.8.10 Obtenção do extrato livre de células (ELC)

Para a obtenção do extrato livre de células, células HeLa foram descoladas com rodo, ressuspensas em PBS e congeladas em nitrogênio líquido. Para realização dos experimentos a suspensão de células foi sonicada a potência de 20W, três vezes, por 20 segundos. Em seguida as células foram centrifugadas a 13.000 x g durante 10 minutos e o sobrenadante livre de partículas celulares foi usado nos ensaios enzimáticos.

5.8.11 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Todos os ensaios para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes foram acompanhados em espectrofotômetro Shimadzu UV-2450, como descrito a seguir.

5.8.11.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada de acordo com o método proposto por NISHIMIKI *et al.* (1972), com algumas modificações. Neste ensaio, radicais superóxido em presença de PMS e NADH, e em presença de SOD são dismutados a peróxido de hidrogênio. O sistema de reação foi constituído de tampão TRIS-HCl 10 mmol.L⁻¹ (pH 8,0), NADH 340 µmol.L⁻¹, NBT 72 µmol.L⁻¹ e PMS 30 µmol.L⁻¹ e ELC-HeLa 250 µg proteína/mL. A reação foi iniciada pela adição do NADH e acompanhada a 560 nm durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle.

5.8.11.2 Catalase

A atividade da catalase foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm (AEBY, 1984) em sistema de reação constituído de tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,0), H₂O₂ 10 mmol.L⁻¹ e ELC-HeLa 130 µg de proteína.mL⁻¹. O ensaio foi iniciado pela adição do H₂O₂ e acompanhado durante 2 minutos. Os resultados expressos como porcentagem em relação ao controle, foram calculados considerando-se o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (3,94 µmol⁻¹.L.cm⁻¹).

5.8.11.3 Glutathione Peroxidase (Gpx)

A atividade da Gpx foi avaliada de acordo com a técnica proposta por FLOHÉ & GUNZLER (1984). Neste ensaio a Gpx catalisa a redução do peróxido em presença de GSH gerando glutathione oxidada (GSSG), a GSSG na presença de NADPH e Gred reduz novamente a glutathione. A atividade enzimática foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância do NADPH a 340 nm. O sistema de reação foi composto de tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,0) EDTA 1 mmol.L⁻¹, GSH 2 mmol.L⁻¹, NADPH 0,15 mmol.L⁻¹, Gred purificada 0,2 U, *t*-butil hidroperóxido 0,5 mmol.L⁻¹ e ELC-HeLa 50 µg de prot.mL⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de *t*-butil hidroperóxido e acompanhada durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH (6220 mol⁻¹.L.cm⁻¹).

5.8.11.4 Glutathione Redutase (Gred)

A atividade da Gred foi avaliada de acordo com a técnica proposta por Sies *et al.* (1979). Neste ensaio a Gred catalisa a redução da glutathione na presença de NADPH. O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,0) EDTA 1 mmol.L⁻¹, GSSG 0,66 mmol.L⁻¹, NADPH 0,075 mmol.L⁻¹ e ELC-HeLa 50 µg de proteína.mL⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de GSSG e acompanhada durante 5 minutos a 340 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH (6220 mol⁻¹.L.cm⁻¹).

5.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Nos ensaios com mitocôndrias isoladas de fígado de rato e partículas submitocondriais foi usado o método de quantificação de proteína descrito por LOWRY *et al.* (1951), e para os ensaios envolvendo células foi usado o método de BRADFORD (1956).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (média \pm dp) e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EFEITOS DO MI-D E DA S.2.2 SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL.

Como descrito anteriormente, o aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais está relacionado aos mecanismos de morte celular, apoptose e necrose (GOGVADZE *et al.*, 2008; HIRSCH *et al.*, 1998). No presente estudo, foram investigados os efeitos do MI-D e da S.2.2 sobre um dos mecanismos envolvidos no aumento de permeabilidade das membranas mitocondriais. Trata-se do fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial dependente da formação de um poro inespecífico entre as duas membranas, denominado poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM). O PTPM permite a passagem de solutos de até 1500 Da, o que leva ao inchamento mitocondrial e ao rompimento da membrana mitocondrial externa, ocorrendo, assim, a liberação de fatores proapoptóticos contidos no espaço intermembranas, entre eles o citocromo c. A formação do poro é dependente de vários fatores como o aumento da concentração citosólica de cálcio, a diminuição da relação NADPH/NADP⁺ e NADH/NAD⁺, a oxidação dos lipídeos de membrana e o aumento da concentração de fosfato, entre outros (GRIMM & BRDICZKA, 2007; KOWALTOWSKI *et al.*, 2001).

Na mitocôndria energizada, o cálcio entra eletroforicamente, levando a um rearranjo dos lipídeos de membrana, ao aumento da geração de ERO e à indução da lipoperoxidação, favorecendo, assim, a formação do PTPM (GRIJALBA *et al.*, 1999). Na presença de fosfato, o cálcio entra com maior facilidade, amplificando os seus efeitos sobre a mitocôndria. Além disso, foi comprovado que o fosfato induz a lipoperoxidação por catalizar a tautomerização de aldeídos C_n produzindo enóis, que podem ser oxidados por hemoproteínas gerando aldeídos C_{n-1} em estado triplete. Estes aldeídos, como as ERO, induzem a formação de peróxidos e outros produtos decorrentes da fragmentação de lipídeos (KOWALTOWSKI *et al.*, 1996).

Para confirmar que o inchamento mitocondrial observado era dependente da formação do poro foram usados três conhecidos inibidores do PTPM: EGTA,

quelante de cálcio, DTT, agente redutor de pontes dissulfeto e ciclosporina A (CsA), inibidor de ciclofilina D (KOWALTOWSKI *et al.*, 1996). Observa-se na figura 13, a completa inibição do inchamento mitocondrial em presença destes inibidores em contraste ao inchamento observado para o experimento controle, realizado na ausência dos mesmos. Estes resultados confirmaram que o inchamento mitocondrial foi decorrente da formação do poro.

O inchamento mitocondrial dependente da formação do PTPM induzido por cálcio e fosfato, na presença de substrato oxidável na presença ou ausência das drogas em estudo (MI-D e S2.2), foi acompanhado espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorbância em 540 nm. O efeito do MI-D sobre o PTPM nas concentrações de 5 a 80 nmol. mg⁻¹ de proteína está demonstrado nas figuras 13 e 14. Observa-se que o composto promove a inibição do inchamento estatisticamente significativo a partir de 25 nmol.mg⁻¹ prot., sendo esta inibição aproximadamente de 25, 35 e 42% para as concentrações de 25, 65 e 80 nmol.mg⁻¹ prot., respectivamente (FIGURAS 13 e 14). Embora seja clara a tendência desta inibição ser dose-dependente, não há diferença estatística entre as concentrações.

A ação inibitória do MI-D sobre o inchamento mitocondrial não é surpresa se considerados os efeitos do composto sobre a bioenergética mitocondrial (CADENA *et al.*, 1998). O MI-D é capaz de colapsar o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) de forma dose dependente, nas mesmas concentrações aqui utilizadas. Sendo assim, uma vez que a formação do PTPM é dependente de cálcio e que a entrada do cátion é favorecida pelo potencial de membrana, o resultado era esperado. Neste contexto, a dependência do estado energético mitocondrial na formação do PTPM foi tema da investigação de Huang e colaboradores (2001). Os autores demonstraram que em mitocôndrias isoladas de fígado de rato a inibição parcial ou total do fluxo de elétrons resultava na inibição também parcial ou total da abertura do PTPM. Ainda, a adição de agentes desacopladores ao sistema experimental inibia completamente a abertura do poro e a liberação de citocromo c. No caso do MI-D, que foi classificado como desacoplador inibitório, a inibição sobre o PTPM não foi total (~42% na concentração de 80 nmol.mg⁻¹ prot.), o que também é coerente, pois seu efeito desacoplador é inferior ao dos desacopladores clássicos, como o CCCP, utilizado no trabalho de Huang e colaboradores (2001).

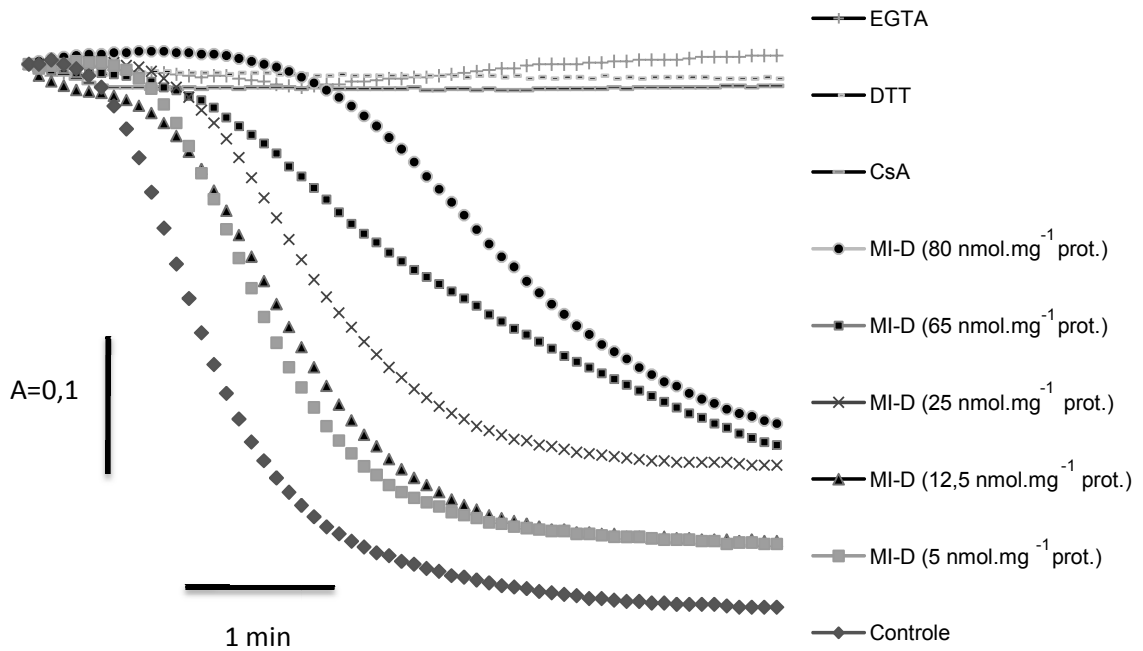


FIGURA 13. Efeito do MI-D sobre o inchamento mitocondrial induzido por fosfato.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KH₂PO₄ 0,3 mmol.L⁻¹, CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹ na ausência de MI-D (controle) ou na presença de EGTA 1 mmol.L⁻¹, DTT 1 mmol.L⁻¹, CsA 0,5 μmol.L⁻¹ ou MI-D nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.5.1). Os traçados são representativos de 5 experimentos independentes.

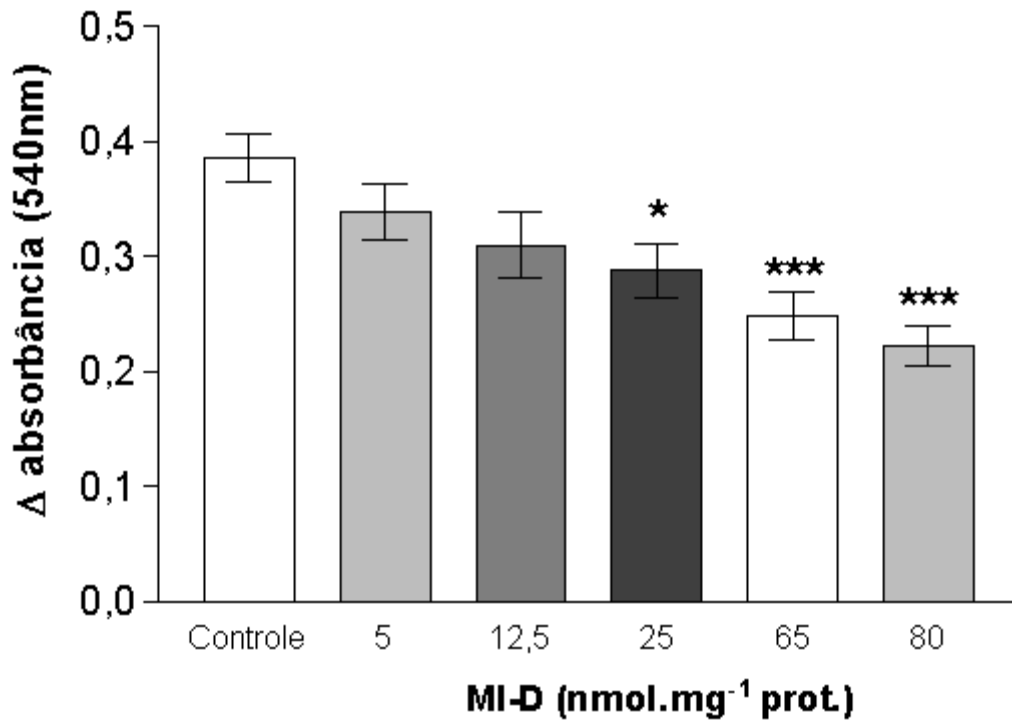


FIGURA 14. Efeito do MI-D sobre a amplitude do inchamento mitocondrial induzido por fosfato.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KH₂PO₄ 0,3 mmol.L⁻¹, CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹ na ausência de MI-D (controle) ou na presença de diferentes concentrações de MI-D. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.5.1). Os valores representam a média ± dp do delta de absorvância (absorvância inicial menos absorvância final em 5 minutos), de 5 experimentos independentes. * e *** Significativamente diferente do controle ao nível de p < 0,05 e p < 0,001, respectivamente.

Os efeitos do MI-D sobre a transição de permeabilidade mitocondrial em sistema induzido por fosfato poderiam ser justificados pelos efeitos que o composto promove sobre a bioenergética mitocondrial. Porém, a informação de que o MI-D é capaz de inibir a lipoperoxidação ferro-induzida em mitocôndrias isoladas e de seqüestrar O₂⁻ em sistema livre de células (MENDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2008) conduziram a realização de novos experimentos nos quais a formação do PTPM foi induzida por H₂O₂ em presença de cálcio e substrato oxidável. Neste sistema, o H₂O₂ atravessa a membrana mitocondrial, reage com proteínas ferro-enxofre da cadeia respiratória, induzindo a liberação de ferro e a reação de Fenton, o que por

sua vez, pode levar a geração de radical hidroxila, a indução da lipoperoxidação e a formação do PTPM (OTT *et al.*, 2007).

Os resultados destes experimentos estão representados nas figuras 15 e 16. Observa-se na figura 15 que na ausência de cálcio não ocorreu o inchamento, como era esperado, enquanto que na presença de cálcio (controle) ocorreu um inchamento de pequena amplitude. A amplitude do inchamento foi maior na presença do indutor (H_2O_2), mas menor quando comparada àquela observada na figura 13, quando o indutor do PTPM foi o fosfato. Este resultado reflete a diferença entre os mecanismos envolvidos na formação do PTPM pelos indutores. O MI-D ($80 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ prot.}$) inibiu o inchamento mitocondrial induzido por H_2O_2 na presença de cálcio (FIGURA 15) sendo que esta inibição foi de ~66% (FIGURA 16). No entanto, o perfil foi diferente do observado quando o indutor utilizado foi o fosfato (FIGURA 13). Durante os primeiros dois minutos de reação observou-se completa inibição seguida de um gradativo, mas pequeno, aumento do inchamento mitocondrial (FIGURA 15). Embora este resultado indique a capacidade seqüestradora de radicais livres do MI-D, não se pode descartar o efeito do composto sobre a entrada do cálcio.

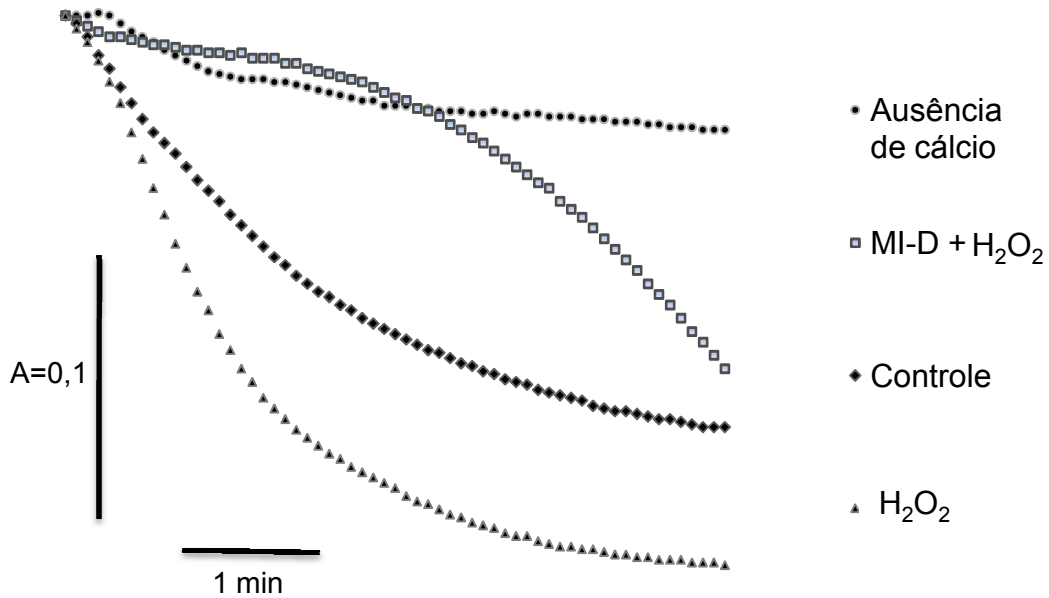


FIGURA 15. Efeito do MI-D sobre o inchamento mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio.

FONTE: O autor.

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹. Todos os experimentos, com exceção do indicado na legenda, foram realizados na presença de cálcio e: na presença de MI-D (80 nmol.mg⁻¹ prot.) mais H₂O₂ (10 μmol.L⁻¹) – **MI-D+H₂O₂**; na ausência de H₂O₂ e MI-D – **controle**; na presença de H₂O₂ (10 μM) - **H₂O₂**. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.5.1). Os traçados são representativos de 6 experimentos independentes.

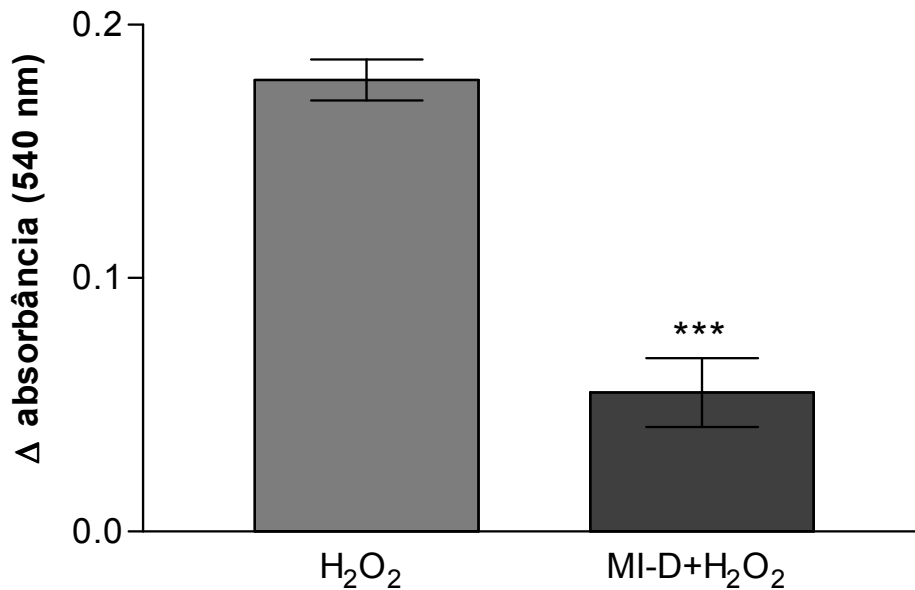


FIGURA 16. Efeito do MI-D sobre a amplitude do inchamento mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio.

FONTE: O autor.

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹, na presença de H₂O₂ (10 μmol.L⁻¹) ou na presença de MI-D (80 nmol.mg⁻¹ prot.) mais H₂O₂ (10 μmol.L⁻¹). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.5.1). Os valores representam a média ± dp do delta de absorbância (absorbância inicial menos absorbância final em 5 minutos), de 6 experimentos independentes. *** Significativamente diferente do controle ao nível de p < 0,001.

O efeito da S2.2 sobre a formação do PTPM foi analisado num sistema contendo cálcio e fosfato, nas mesmas condições descritas anteriormente para o MI-D. Na figura 17 observa-se no experimento controle o inchamento mitocondrial decorrente da formação do PTPM, enquanto que a presença da S2.2 promove inibição quase total, independente da concentração (40 a 120 nmol.mg⁻¹ prot.) (FIGURAS 17 e 18). Assim como o MI-D, a S2.2 compromete de forma significativa as funções mitocondriais relacionadas a provisão de energia (PRADO *et al.*, 2004), sendo possível sugerir que o composto esteja impedindo a entrada do cálcio na mitocôndria por colapsar o potencial de membrana.

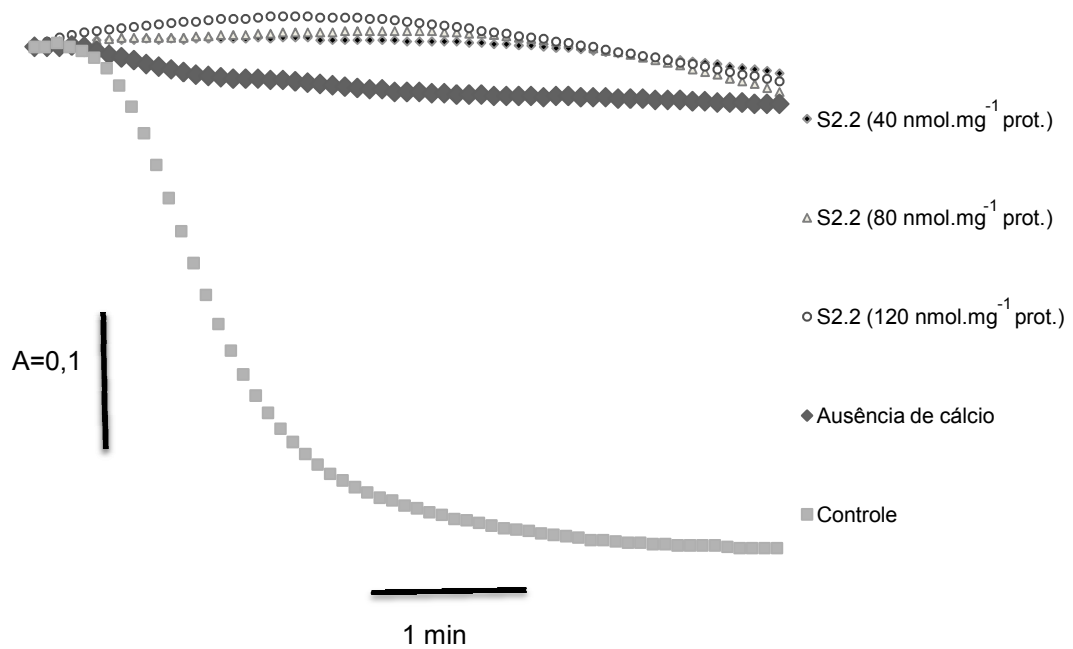


FIGURA 17. Efeito da S2.2 sobre o inchamento mitocondrial induzido por fosfato.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KH₂PO₄ 0,3 mmol.L⁻¹, CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹ na ausência de S2.2 (controle) ou na presença de S2.2 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.5.1). Os traçados são representativos de 3 experimentos independentes.

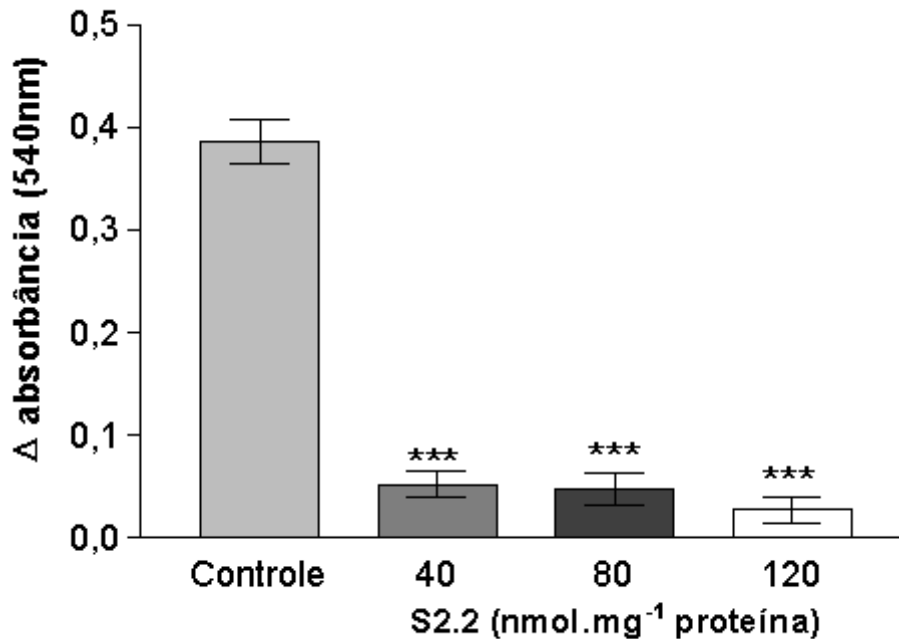


FIGURA 18. Efeito da S2.2 sobre a amplitude do inchamento mitocondrial induzido por fosfato.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KH₂PO₄ 0,3 mmol.L⁻¹, CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹ na ausência de S2.2 (controle) ou na presença de S2.2 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item (5.5.1). Os valores representam a média ± dp do delta de absorvância (absorvância inicial menos absorvância final em 5 minutos), de 3 experimentos independentes. *** Significativamente diferente do controle ao nível de p < 0,001.

No presente estudo, o efeito da S2.2 também foi avaliado sobre o inchamento decorrente da formação do PTPM induzido por H₂O₂, em presença de cálcio e substrato oxidável (FIGURAS 19 e 20). Observa-se na figura 19 que na ausência de cálcio não ocorreu o inchamento, enquanto que na presença (controle) ocorreu um inchamento de pequena amplitude, que foi maior em presença do indutor (H₂O₂), mas muito menor quando comparado àquele quando o indutor foi o fosfato (FIGURA 17). A S2.2 inibiu o inchamento mitocondrial, porém em menor intensidade em relação a inibição observada quando o indutor foi o fosfato (FIGURA 17). A maior efetividade da S2.2 sobre o inchamento induzido por fosfato (FIGURAS 17 e 18), em relação a induzida pelo peróxido (FIGURAS 19 e 20), sugere que o

mecanismo principal pelo qual o composto inibe o PTPM se relacione a captação de cálcio.

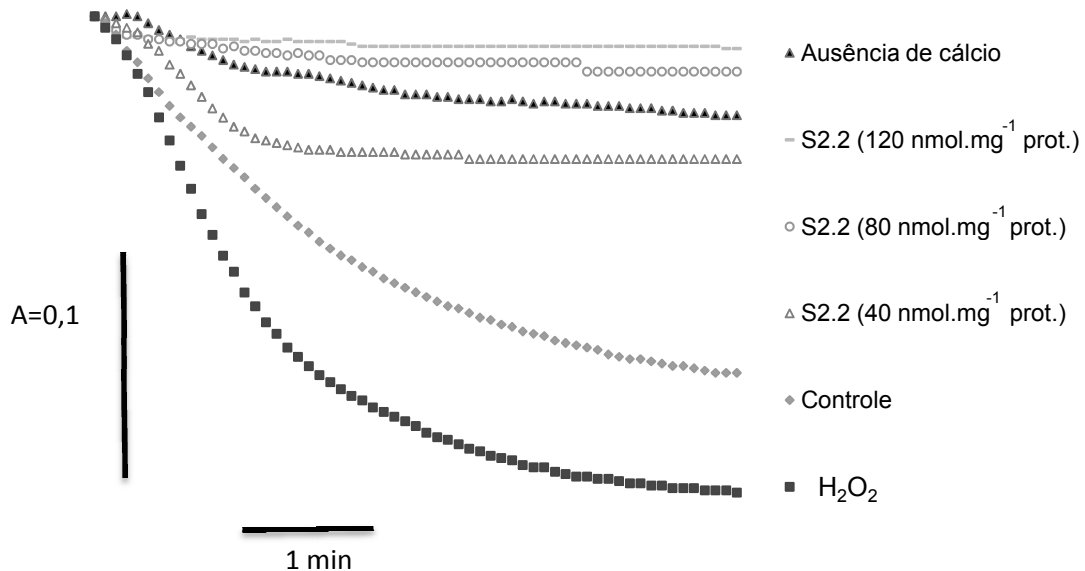


FIGURA 19. Efeito da S2.2 sobre o inchamento mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹. Todos os experimentos, com exceção do indicado na legenda, foram realizados na presença de cálcio e: na presença de S2.2, nas concentrações indicadas, mais H₂O₂ (10 μmol.L⁻¹); na ausência de H₂O₂ e S2.2 – **controle**; na presença de H₂O₂ (10 μmol.L⁻¹) - **H₂O₂**. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.5.1). Os traçados são representativos de 3 experimentos independentes.

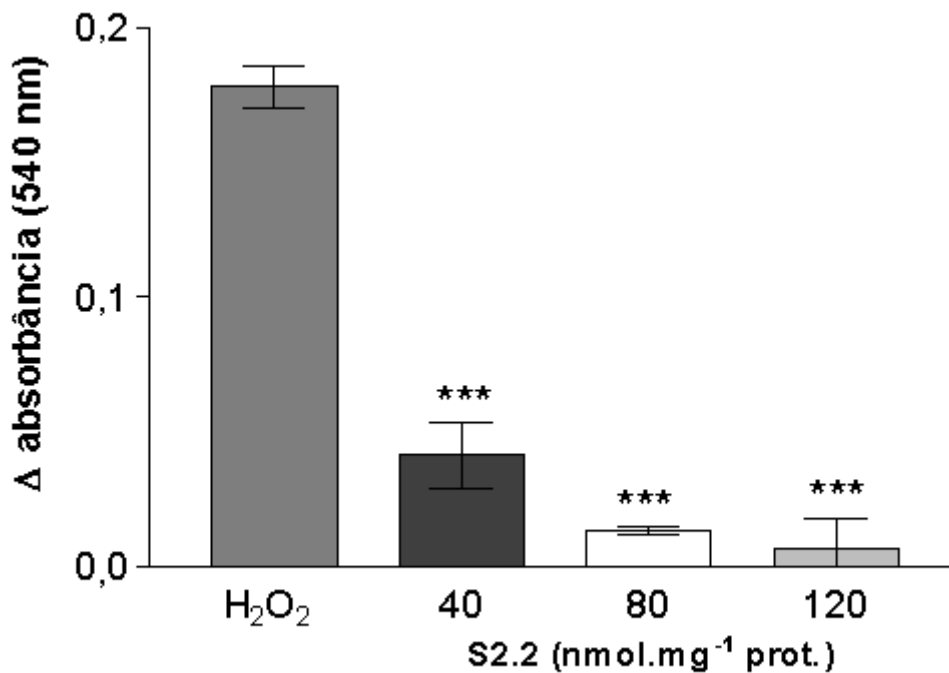


FIGURA 20. Efeito da S2.2 sobre a amplitude do inchamento mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹, na presença de H₂O₂ (10 μmol.L⁻¹) ou na presença de H₂O₂ mais S2.2 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.5.1). Os valores representam a média ± dp do delta de absorbância (absorbância inicial menos absorbância final em 5 minutos), de 3 experimentos independentes. *** Significativamente diferente do controle ao nível de p < 0,001.

A formação e abertura do PTPM é um evento complexo. Na verdade, mesmo que alguns componentes do PTPM tenham sido descritos, não se descarta a participação de outros ainda não identificados. Da mesma forma, as vias de estímulo ou inibição de sua formação e/ou abertura não são totalmente conhecidas (GRIMM & BRDICZA, 2007). Para dar continuidade a este estudo, seria importante a realização de experimentos de transição de permeabilidade com outros indutores, cujos mecanismos são conhecidos como, por exemplo, com a diamida e mersalil, oxidantes responsáveis pela formação de pontes dissulfeto presentes nas proteínas que formam o PTPM, entre outros (HARRIS, 1979). Acredita-se que com a realização desses ensaios se alcance um melhor entendimento dos mecanismos

moleculares a respeito dos efeitos do MI-D e da S2.2 sobre o fenômeno da transição de permeabilidade mitocondrial.

Os resultados deste estudo, somados aos já descritos para o MI-D e para S2.2, sugerem fortemente que os compostos interfiram no fluxo de cálcio mitocondrial. Experimentos foram realizados para avaliar esta possibilidade e os resultados estão apresentados a seguir.

6.2 EFEITOS DO MI-D E DA S2.2 SOBRE O TRANSPORTE DE CÁLCIO

No sentido de esclarecer se a inibição do inchamento mitocondrial observado na presença do MI-D e da S2.2 é devido a alterações no transporte de cálcio, foi avaliado o efeito dos dois compostos sobre o influxo e efluxo do cátion em preparações mitocondriais.

Neste trabalho, para determinação da captação de cálcio mitocondrial foi usado o composto fura 2AM, na presença de fosfato, mantendo um sistema experimental muito similar ao utilizado nos estudos do PTPM. O fura 2AM, é um indicador de cálcio que em sua forma esterificada (AM) é capaz de permear as membranas mitocondriais. Uma vez na matriz, sofre hidrólise por ação de esterases gerando o fura 2, em sua forma de ácido carboxílico, que é a forma ativa para quantificação de cálcio (GUNTER *et al.*, 1988). Quando ligado ao cálcio e excitado em 340 nm este indicador emite fluorescência em 510 nm. A medida desta fluorescência em função do tempo foi utilizada para determinar a captação e efluxo de cálcio.

Preparações mitocondriais em presença de substratos oxidáveis e na ausência de ionóforos podem captar e acumular cálcio exógeno devido ao potencial de membrana formado (VAY *et al.*, 2008). Os efeitos do MI-D (5 a 80 nmol. mg⁻¹prot.) sobre o transporte de cálcio foi avaliado nestas condições e os resultados estão apresentados nas figuras 21 e 22. Na figura 21, no experimento controle, a adição de glutamato de potássio como substrato oxidável levou a formação do potencial de membrana, observando-se em seguida um rápido aumento no sinal da fluorescência correspondente à captação do cátion. A adição do FCCP,

um desacoplador clássico, promoveu o efluxo do íon. O MI-D promoveu uma discreta diminuição na captação do íon em relação ao experimento controle, como se observa pela menor amplitude do aumento da fluorescência após adição do glutamato. Para maior clareza, na figura foram representadas apenas as concentrações de 5, 25 e 80 nmol.mg⁻¹ prot., uma vez que o efeito pareceu ser dose-independente. A adição do FCCP, como no caso do experimento controle (na ausência de MI-D), também promoveu o efluxo do íon, aparentemente da mesma maneira como observado no experimento controle.

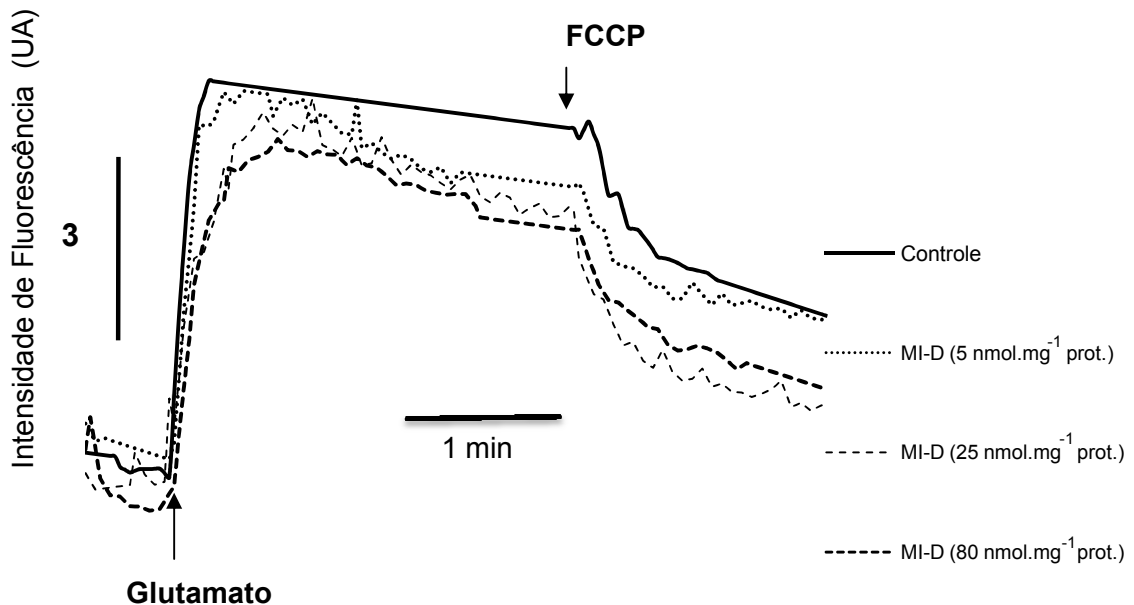


FIGURA 21. Efeito do MI-D sobre o fluxo mitocondrial de cálcio.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, CaCl₂ 13,5 μmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 1,0 mmol.L⁻¹, Fura 2AM 5 μmol.L⁻¹ e 0,2 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. A captação de cálcio foi iniciada pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹ e o efluxo foi induzido por FCCP 1 μmol.L⁻¹, na ausência (controle) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.5.2). Os traçados são representativos de 3 experimentos independentes.

Na figura 22 estão representados os resultados de experimentos de captação de cálcio realizados nas mesmas condições anteriores, porém, com adição de vermelho de rutênio em substituição ao FCCP. Como mencionado anteriormente, este composto inibe a via de captação de cálcio por uniporter dependente do potencial de membrana, favorecendo o efluxo do íon. Como observado na figura 22, a adição do glutamato leva a captação do cátion em função do potencial de membrana formado. Por sua vez, a adição do vermelho de rutênio promove o efluxo do íon, mas de maneira mais rápida a observada quando da adição do FCCP (FIGURA 21). O MI-D (5 a 80 nmol.mg⁻¹ prot.), também nestes ensaios, promove a diminuição da captação de cálcio em concordância com o demonstrado na figura 21. No entanto, o efluxo do íon foi comprometido significativamente pela presença do composto. Para fins de clareza, são mostradas somente as concentrações de 5, 25 e 80 nmol.mg⁻¹ prot. Observa-se neste caso um efeito dependente da concentração.

Na verdade, os resultados apresentados nas figuras 21 e 22 são de difícil interpretação devido à complexidade dos temas que os envolvem, nomeadamente: o fluxo de cálcio e sua relação com o PTPM e o amplo espectro de efeitos do MI-D. Um resultado conclusivo é que a inibição que o MI-D causou sobre a transição de permeabilidade (~42% na concentração de 80 nmol.mg⁻¹ prot. – FIGURAS 13 e 14) não é exclusivamente decorrente do impedimento da captação de cálcio na mitocôndria, uma vez que o efeito que o composto causa na captação do cátion não justifica a inibição observada sobre a transição. Esta questão poderá ser esclarecida com a realização de experimentos com indutores e inibidores específicos do poro.

Outro ponto que chama atenção nos experimentos de fluxo de cálcio é o fato de que o MI-D parece inibir o efluxo do cátion, de maneira mais significativa quando se utiliza vermelho de rutênio. Como descrito anteriormente, o PTPM tem sido considerado também uma via de efluxo de cálcio (BERNARDI & PETRONILLI, 1996; JOUAVILLE *et al.*, 1998, GUNTER & SHEU, 2009). Neste estudo, os experimentos foram realizados em presença de fosfato, na tentativa de manter o sistema de reação semelhante ao de transição de permeabilidade, ou seja, de forma a possibilitar a formação/abertura do poro de transição.

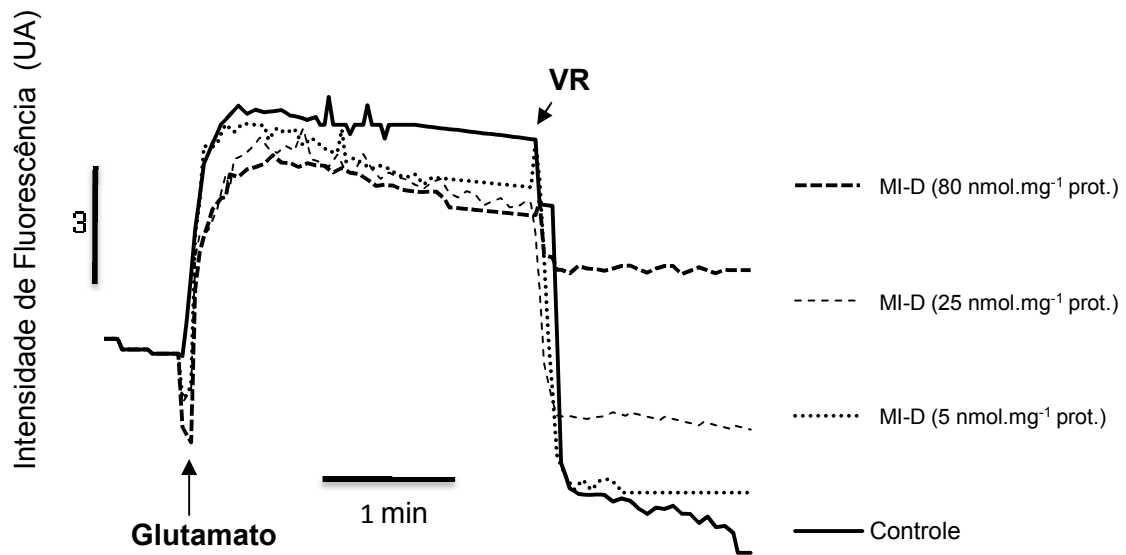


FIGURA 22. Efeito do MI-D sobre o fluxo mitocondrial de cálcio – captação inibida por vermelho rutênio.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L^{-1} , HEPES 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2, CaCl_2 $13,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, KH_2PO_4 $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, Fura 2AM $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mg prot.mL}^{-1}$, a 28°C . A captação de cálcio foi iniciada pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L^{-1} e inibida por vermelho de rutênio (VR) $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, na ausência (controle) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas. Condições experimentais realizadas conforme descrito em materiais e métodos item (5.5.2). Os traçados são representativos de 3 experimentos independentes.

Segundo o estudo de Petronilli e seus colaboradores (1993) o efluxo do cátion observado na presença de vermelho de rutênio ou fostato mais o desacoplador FCCP é decorrente, em cerca de 90%, da formação do PTPM. Sugere-se, no presente estudo que isto aconteça nos experimentos cujos resultados estão representados na figura 21 (perfil de efluxo), pois no sistema de reação estão presentes fostato e FCCP. Desta forma, a inibição do efluxo aparentemente mais lenta no caso do MI-D, confirmaria seu efeito inibitório sobre o PTPM. No caso do experimento na presença de vermelho de rutênio (FIGURA 22), a interpretação poderia ser ainda mais complexa, pois no sistema de reação está presente também o fostato. Porém, os efeitos do vermelho de rutênio e do fostato são descritos como

não aditivos (PETRONILLI *et al.*, 1993). Observa-se na figura 22 que o MI-D inibiu de maneira significativa o efluxo do cálcio. Neste sentido, Petronilli *et al.* (1993) descreveram que o vermelho de rutênio em mitocôndria desenergizada promove um efluxo mais lento do cálcio, mas também via PTPM. Como se visualiza na figura 22, o MI-D em efeito dose-dependente promove a inibição do efluxo do cátion, estando este resultado de acordo com os efeitos que o composto promove sobre o potencial de membrana, ou seja o seu maior comprometimento em função da concentração do composto (CADENA *et al.*, 1998).

É fato que as hipóteses aqui levantadas para justificar os resultados apresentados devem ser comprovados por experimentos adicionais, considerando a complexidade do tema. Um bom início seria repetir estes experimentos em presença de ciclosporina A, um conhecido inibidor do PTPM (BERNARDI, 1996). Esses ensaios comprovariam ou não que a via de efluxo observada envolve a formação/abertura do PTPM.

Em relação a S2.2 os resultados apresentados na figura 23 parecem justificar a significativa inibição na formação do PTPM causada pelo composto (FIGURAS 17 E 18). Observa-se no experimento controle a captação de cálcio em reposta a adição de glutamato, sendo que a adição de FCCP promove o efluxo do íon. Já quando a S2.2 estava presente, a captação foi menor em função da concentração do composto (40 a 120 nmol. mg⁻¹ prot.). Ao contrário do observado para o MI-D (FIGURA 21), na maior concentração a S2.2 (120 nmol. mg⁻¹ prot.) promoveu a inibição quase que total da captação do cátion. Já o efluxo do íon, promovido pela adição de FCCP, parece ter sido estimulado pela S2.2. De fato, observa-se que ocorre efluxo do íon mesmo antes da energização da mitocôndria com substrato.

Na figura 24, observa-se o experimento de fluxo de cálcio onde captação foi inibida pelo vermelho de rutênio, ocorrendo em seguida a esta adição o efluxo do íon (controle). A presença de S2.2 no meio de reação promoveu uma diminuição significativa e dose-dependente (40 a 120 nmol. mg⁻¹ prot.) da captação do íon como observado anteriormente (FIGURA 23). Porém neste caso, o efluxo não foi comprometido.

Se considerarmos que nas condições experimentais o efluxo do cálcio ocorreria principalmente via PTPM, o resultado da S2.2 sobre o efluxo de cálcio representado na figura 21 poderia ser interpretado como contraditório ao efeito inibitório deste composto sobre o PTPM. No entanto, deve-se considerar que um requisito essencial para a formação do PTPM é a presença de cálcio na matriz mitocondrial, o que foi impedido pela presença da S2.2.

O efeito do composto sobre os transportadores de cálcio mitocondriais também deve ser considerado. Neste contexto, Parker e Glosson (1987) descreveram um efeito direto da S2.2 sobre transportadores Na^+/H^+ em eritrócitos de cachorro. Nestas células este transportador é ativado quando o meio se torna hipertônico ocasionando a contração das células. Os autores verificaram que a maleimida atua de formas diferentes, dependendo do estado osmótico celular. Quando as células estavam em meio hipotônico e, portanto, inchadas, a maleimida promovia a inativação irreversível do transportador. Caso contrário, ou seja, quando as células estavam em meio hipertônico e, portanto, contraídas, o efeito da S2.2 era o de ativar o transportador. Segundo os autores esse feito foi dependente da concentração do composto e do volume celular, sendo que o último determinaria a acessibilidade da imida a grupos específicos do transportador, regulando sua atividade. Em estudo posterior, utilizando o mesmo modelo experimental Parker e Colclasure (1992), sugeriram haver uma correlação entre os fluxos de Na^+ K^+ nestas células e, utilizaram como ferramenta experimental a *N*-fenilmaleimida para demonstrar tal correlação. Os autores observaram que células contraídas em presença do composto, quando retornavam as condições de tonicidade ideais, permaneciam com seus transportadores Na^+/H^+ ativos, ou seja, havia um aumento no fluxo de sódio e redução no fluxo de potássio. As células inchadas incubadas em presença da maleimida quando voltavam as condições ideais, permaneciam com características de células inchadas em relação ao fluxo de íons, ou seja, com seus transportadores $\text{K}^+:\text{Cl}^-$ e Na^+/H^+ desativados. Como no estudo anterior, segundo os autores, o efeito da maleimida era dependente de sua concentração e do volume celular.

Desta forma, considerando estes resultados (FIGURA 23 e 24) e os efeitos do composto sobre a transição de permeabilidade (FIGURAS 17 e 18) é possível sugerir que o principal fator envolvido na inibição da formação do PTPM pela S2.2 é o impedimento da entrada de cálcio via o uniporter dependente de potencial de membrana. Se este efeito é provocado pelo comprometimento das funções mitocondriais pela S2.2 (PRADO *et al.*, 2004) ou devido a um possível efeito direto do composto sobre o uniporter de cálcio, é matéria para estudos futuros.

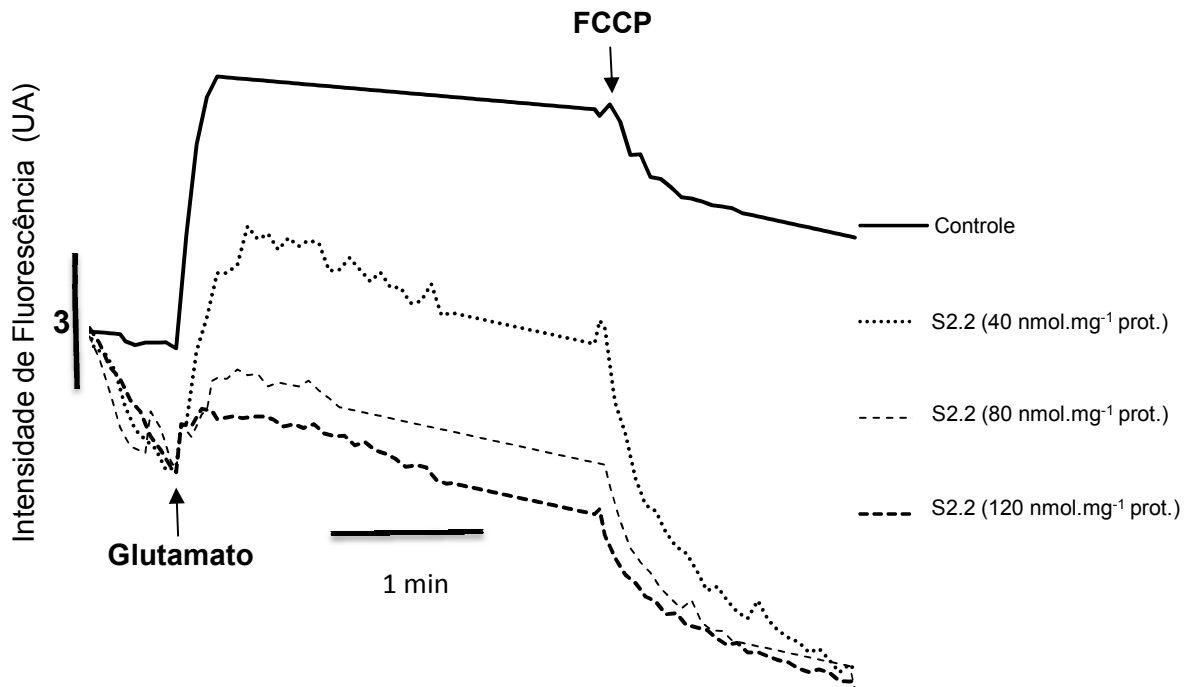


FIGURA 23. Efeito da S2.2 sobre o fluxo mitocondrial de cálcio.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, CaCl₂ 13,5 μmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 1,0 mmol.L⁻¹, Fura 2AM 5 μmol.L⁻¹ e 0,2 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. A captação de cálcio foi iniciada pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹ e o efluxo foi induzido por FCCP 1 μmol.L⁻¹, na ausência (controle) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas. Condições experimentais como descrito em materiais e métodos (item 5.5.2). Os traçados são representativos de 3 preparações mitocondriais com duas repetições.

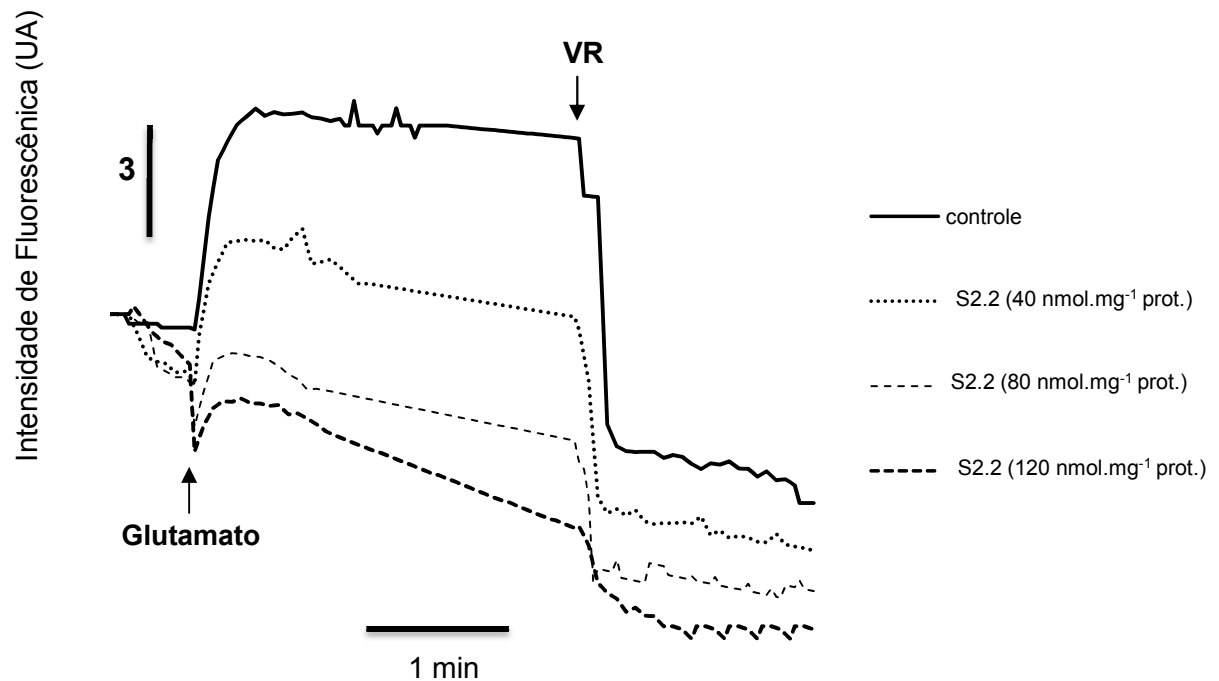


FIGURA 24. Efeito da S2. 2 sobre o fluxo mitocondrial de cálcio - captação inibida por Vermelho de Rutênio.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, CaCl₂ 13,5 µmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 1,0 mmol.L⁻¹, Fura 2AM 5 µmol.L⁻¹ e 0,2 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. A captação de cálcio foi iniciada pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹ e inibido por Vermelho de rutênio (VR) 10 µmol.L⁻¹, na ausência (controle) e na presença de S2.2 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.5.2). Os traçados são representativos de 3 preparações mitocondriais com duas repetições.

6.3 EFEITOS DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO INDUZIDA.

Como descrito anteriormente, durante os processos de morte celular pode ocorrer o aumento da geração de ERO que atacam indiscriminadamente os constituintes celulares, entre eles as membranas que sofrem lipoperoxidação (BARTOZS, 2008). Neste contexto, a oxidação de fosfolipídeos pode fazer parte da sinalização celular para a indução de apoptose (BARRERA *et al.*, 2008; LOIDL *et al.*, 2003). Com a finalidade de avaliar se o MI-D e a S2.2 tem efeito direto sobre a peroxidação de lipídeos, foram realizados ensaios em diferentes sistemas de membrana: mitocôndrias isoladas, partículas submitocondriais e lipossomas de fosfatidilcolina. Por se tratar dos efeitos de dois compostos (MI-D e S2.2) sobre a lipoperoxidação em diferentes modelos experimentais, os resultados serão apresentados, a seguir, como itens em separado. Em todos os ensaios foi mantido um máximo de 0,5% de DMSO, nesta porcentagem o solvente das drogas não apresentou diferença significativa com relação ao controle.

6.3.1 Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida em mitocôndrias

O efeito do MI-D sobre a peroxidação lipídica foi avaliado em mitocôndrias isoladas de fígado de rato em sistema contendo substrato oxidável (2-oxoglutarato) em presença de Fe^{3+}/ADP . Durante a reação, a oxidação do substrato e o transporte de elétrons na cadeia respiratória levam a geração de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que ao sofrer dismutação a H_2O_2 resulta na formação de $\cdot OH$ através da reação de Fenton (FIGURA 3). Este último ataca lipídeos de membrana gerando uma série de subprodutos, entre eles o malondialdeído (MDA), cuja quantificação reflete a extensão da reação de lipoperoxidação em membranas *in vitro*. O MDA reage com ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um complexo rosa (TBARS) que pode ser quantificado a 532 nm.

O efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação ferro induzida está apresentado na figura 25. Neste sistema o MI-D (25 e 38 $nmol.mg^{-1}$ de prot.) inibiu em ~48% a peroxidação lipídica, chegando esta inibição a 95% na maior concentração testada (80 $nmol.mg^{-1}$ de prot.).

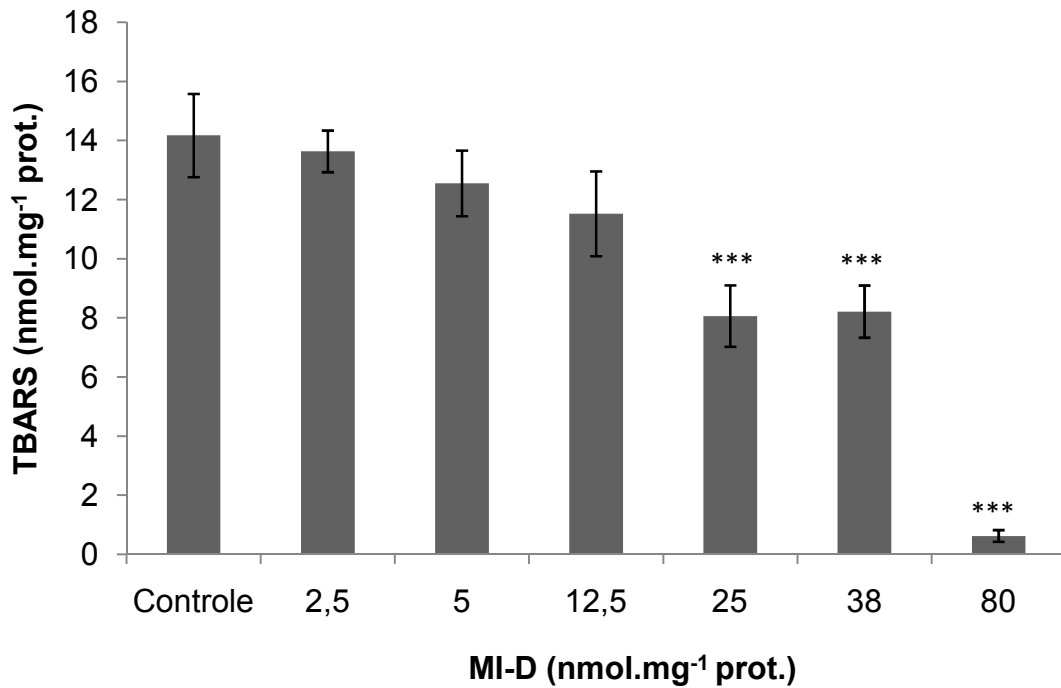


FIGURA 25. Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação ferro induzida em mitocôndrias.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, FeCl₃ 0,2 mmol.L⁻¹, ADP 2 mmol.L⁻¹ e 1 mg prot.mL⁻¹, a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 2-oxoglutarato 6 mmol.L⁻¹ na ausência (controle) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas. Após 45 min de incubação a reação foi interrompida pela adição de BHT (0.012%). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.6.1). Os valores representam a média ± dp (n=7) de 3 experimentos independentes. *** Significativamente diferente do controle ao nível de p< 0,001.

Com a finalidade de obter informações que possibilitassem o esclarecimento deste efeito, foram realizados ensaios utilizando como indutor de radicais o azocomposto AAPH (FIGURA 26), um gerador de radicais de carbono que se autodecompõe a 37°C (HANLON & SEYBERT, 1997).

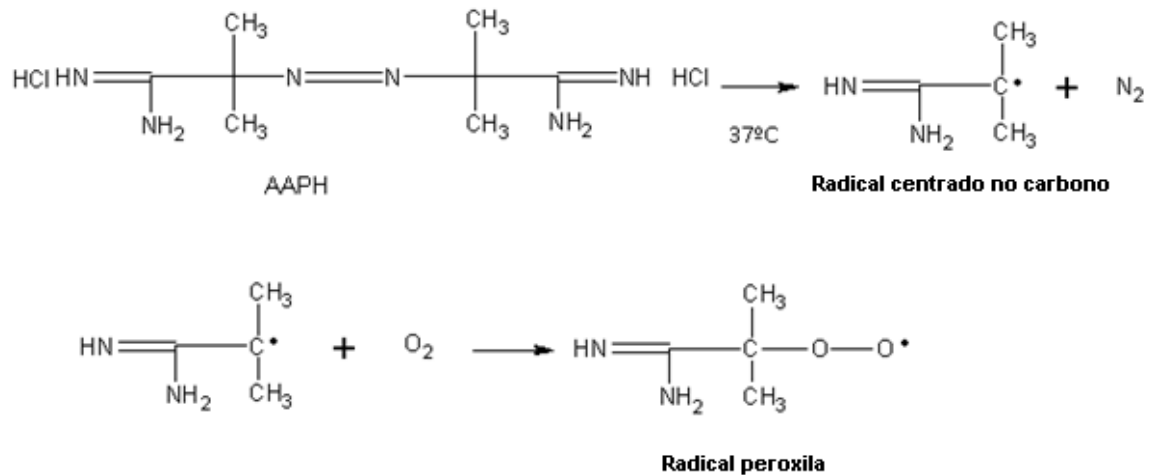


FIGURA 26. Decomposição do AAPH em presença de O₂.

FONTE: HANLON & SEYBERT (1997).

NOTA: Estrutura química do azoiniciador α - α' Azodiisobutiramidina dihidrocloreto (AAPH), do radical gerado quando o mesmo é exposto a 37°C e, do radical peroxil gerado quando o radical de carbono reage com oxigênio.

Também nestes ensaios observou-se um efeito inibitório do MI-D a partir da concentração de 38 nmol.mg⁻¹ proteína (FIGURA 27). No entanto, é importante ressaltar a diferença de intensidade desta inibição em relação a observada quando o sistema indutor era induzida por ferro (FIGURA 25). Na maior concentração de MI-D (80 nmol.mg⁻¹ de proteína) a inibição observada na presença do indutor de radicais foi de ~22% (FIGURA 27), enquanto que na lipoperoxidação ferro induzida (FIGURA 25), nas mesmas condições, a inibição foi de ~97%. Estes resultados levam a conclusão de que a inibição é maior quando os radicais que iniciam a lipoperoxidação são gerados pela cadeia respiratória e pela reação de Fenton.

Esta diferença poderia ser justificada pelo efeito desacoplador do MI-D, descrito anteriormente por CADENA *et al.*(1998). Neste sentido, sabe-se que agentes desacopladores da fosforilação oxidativa diminuem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) por acelerarem o transporte de elétrons na cadeia respiratória e, desta forma, diminuem a lipoperoxidação (ADAM-VIZI & CHINOPOULUS, 2006; MARAGO & KORDE, 2004; KORSHUNOV *et al.*, 1997).

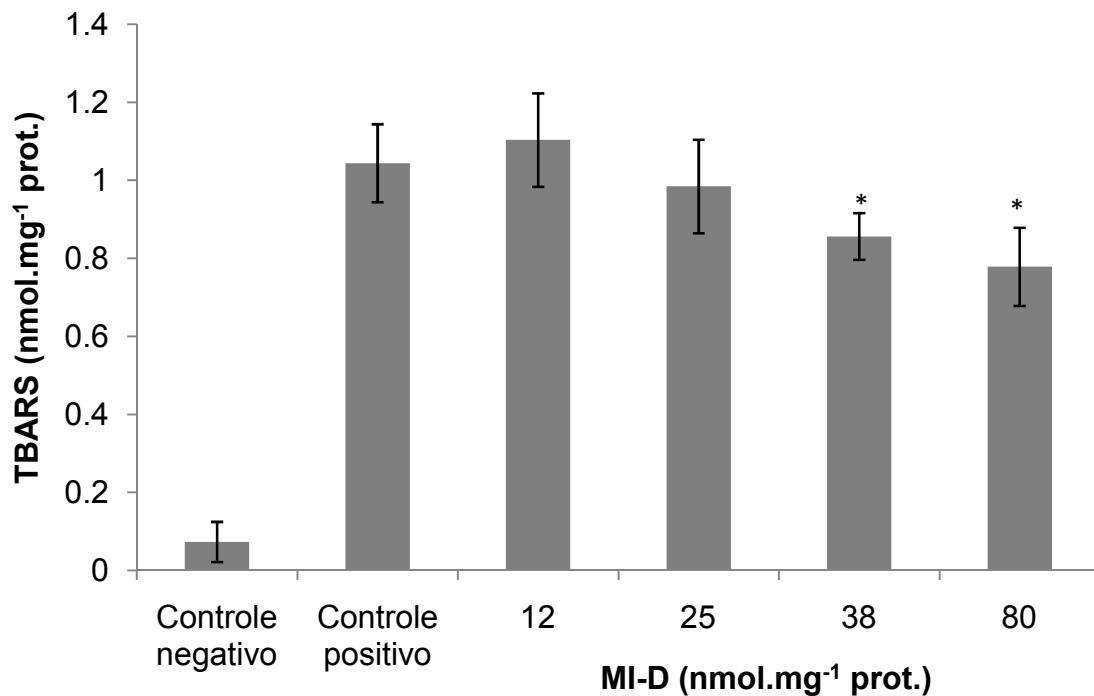


FIGURA 27. Efeito do MI-D sob a lipoperoxidação induzida por AAPH em mitocôndrias.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, e 1 mg prot.mL⁻¹, a 37°C. O controle negativo refere-se a reação na ausência de AAPH. A reação foi iniciada pela adição de AAPH 10 mmol.L⁻¹ na ausência (controle positivo) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas. Após 45 min de incubação a reação foi interrompida pela adição de BHT (0.012%). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.1. Os valores representam a média \pm dp (n=7) de 3 experimentos realizados independentemente. *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$.

Para confirmar esta hipótese foram realizados ensaios com partículas submitocôndrias acopladas e desacopladas, sendo os resultados apresentados a seguir.

6.3.2 Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida em partículas submitocondriais

As partículas submitocondriais (PSM) são pequenas vesículas, formadas pela sonicação de mitocôndrias em condições experimentais adequadas, que possuem as proteínas da cadeia respiratória e ATP sintase voltadas para o lado externo. Nestas preparações, como em mitocôndrias isoladas, a força próton-motriz advém do transporte de elétrons através da cadeia respiratória ou da hidrólise de ATP, no entanto, devido a disposição dos complexos protéicos a fase positiva é formada no interior das vesículas (TZAGALOFF, 1982).

A vantagem deste modelo consiste na possibilidade de obter-se partículas acopladas (aPSM) ou desacopladas (dPSM), variando-se as condições experimentais. As partículas acopladas diferenciam-se das desacopladas por sua atividade ATPásica. Como na mitocôndria, a atividade ATPásica das aPSM é menor comparada às dPSM (MARTINS *et al.*, 1988; TZAGALOFF, 1982), sendo esta propriedade utilizada neste estudo para caracterizar estas preparações. Como se observa na figura 28 as aPSM apresentaram uma atividade ATPásica 4 vezes menor ($0,176 \pm 0,05$ μmol de Pi liberado por min por mg de proteína) em relação as dPSM ($0,680 \pm 0,13$ μmol de Pi liberado por min por mg de proteína). Quando tratadas com o desacoplador FCCP a atividade ATPásica das aPSM duplicou ($0,382 \pm 0,09$ μmol de Pi liberado por min por mg de proteína) em relação as não tratadas, enquanto que nas dPSM esta atividade não sofreu alteração ($0,682 \pm 0,02$ μmol de Pi liberado por min por mg de proteína).

O efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação em partículas submitocondrias foi avaliada de uma forma indireta, através da determinação do consumo de oxigênio. Durante o processo de lipoperoxidação ocorrem reações com oxigênio e a consequente formação de radicais lipoperoxil, hidroperóxidos e endoperóxidos lipídicos (FIGURA 4). Isto possibilita que em sistema de membranas incubadas com agentes indutores de radicais livres seja possível correlacionar o aumento do consumo de oxigênio dissolvido no meio com o aumento da peroxidação lipídica.

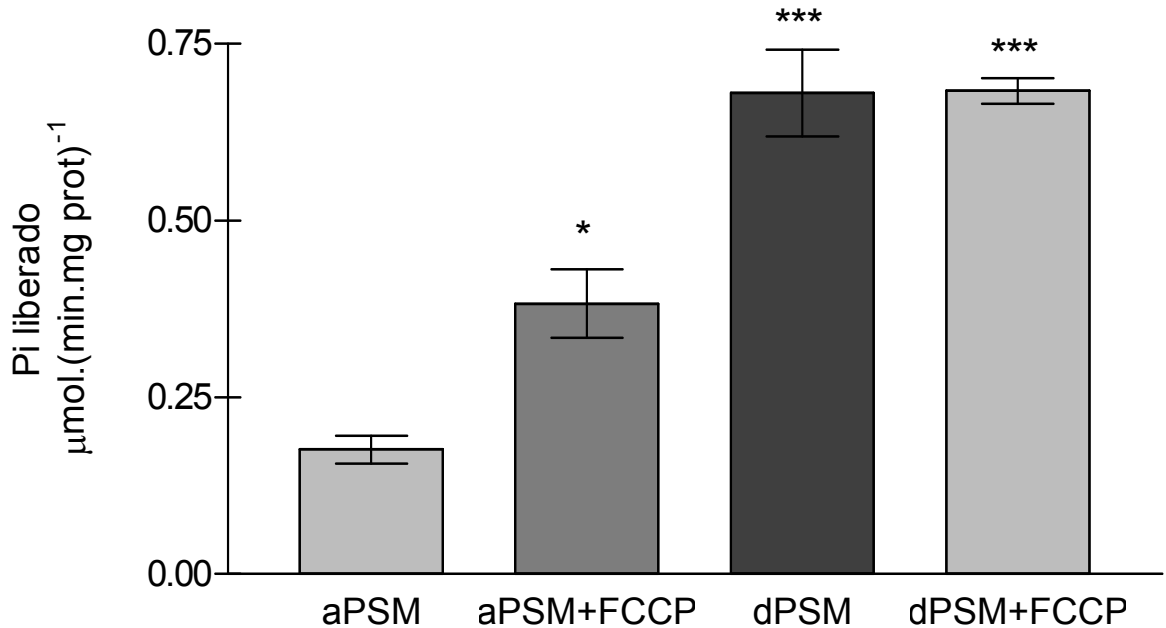


FIGURA 28. Atividade ATPásica de partículas submitocondriais acopladas e desacopladas.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: Sacarose 50 mmol.L⁻¹, TRIS-HCl 12 mmol.L⁻¹, pH 7,4, KCl 50 mmol.L⁻¹, NADH 0,2 mmol.L⁻¹, PEP 1 mmol.L⁻¹, Piruvato quinase 4U, lactato desidrogenase 3U, e 0,1 mg prot.mL⁻¹, a 30°C. A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mmol.L⁻¹ na ausência e na presença de FCCP 1 μmol.L⁻¹. A concentração de Pi liberado foi estimada usando o $\epsilon_{340\text{ nm}} 6220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, considerando que 1nmol de NADH oxidado corresponde a 1nmol de Pi liberado. Os valores representam a média \pm dp (n=4) de 3 experimentos realizados independentemente. * e *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$ e $0,001$, respectivamente.

O efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida por Fe²⁺/NADH em PSM acopladas e desacopladas está apresentado nas figuras 29 e 30, respectivamente. Observa-se que na ausência de Fe²⁺/NADH não ocorrem mudanças significativas no consumo de oxigênio (FIGURAS 29 e 30). Como esperado, após a adição de NADH, o oxigênio é consumido devido a oxidação da coenzima e transporte de elétrons na cadeia respiratória. No entanto, em partículas acopladas o consumo é mais lento e se estabiliza aos 5 minutos de reação, enquanto que nas partículas desacopladas observa-se ainda uma queda gradual até o tempo final da reação (30 minutos - FIGURA 30). Como controles, foram feitos experimentos somente na presença de MI-D (80 nmol.mg⁻¹ de proteína) e NADH (sem ferro), observando-se um aumento na velocidade do consumo de oxigênio (~35%) nas aPSM após 30 minutos de

reação (FIGURA 29), em contraste com o pequeno aumento observado nas dPSM (~7% - FIGURA 30) o qual não foi significativo estatisticamente. Este efeito sugere que o efeito desacoplador do MI-D (CADENA *et al.*, 1998) foi o responsável pelo aumento do consumo de oxigênio nas aPSM.

Como em mitocôndrias isoladas (FIGURA 25) a adição de Fe^{2+} /NADH às PSM induz o aumento da geração de ERO e a peroxidação lipídica, acompanhada nestes experimentos pelo maior consumo de oxigênio em relação às partículas apenas em presença de NADH (FIGURAS 29 e 30). Neste sistema foram testadas 3 concentrações de MI-D (5, 25 e 80 nmol.mg^{-1} prot.), observando-se uma inibição dose dependente nas aPSM a partir de 25 nmol.mg^{-1} prot. de ~25% chegando a ~42% na maior concentração testada (80 nmol.mg^{-1} de prot.) após 30 min de reação (FIGURA 29). Por outro lado, nas dPSM observou-se uma pequena inibição de ~7% a partir de 25 nmol.mg^{-1} de proteína (FIGURA 30). Estes resultados somados aos observados em mitocôndrias isoladas (FIGURA 25) confirmam que o efeito desacoplador do MI-D contribui em seu efeito inibitório sobre a lipoperoxidação.

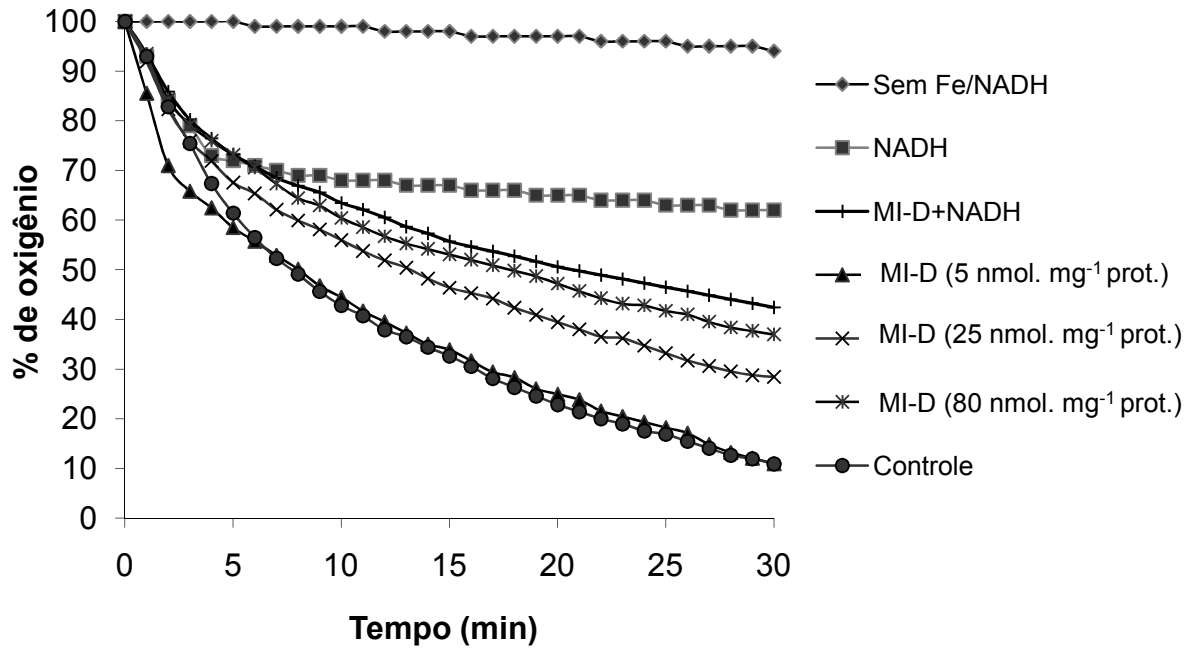


FIGURA 29. Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação ferro induzida em partículas submetocondriais acopladas.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl 25 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 125 mmol.L⁻¹ FeSO₄ 500 μmol.L⁻¹, NADH 100 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg de prot. a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de NADH na ausência (controle) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.6.3). Os resultados estão expressos em porcentagem de oxigênio dissolvido na água, onde 100% equivale a 120 nmol O₂.mL⁻¹. Os traçados são representativos de 4 preparações independentes, em duplicata.

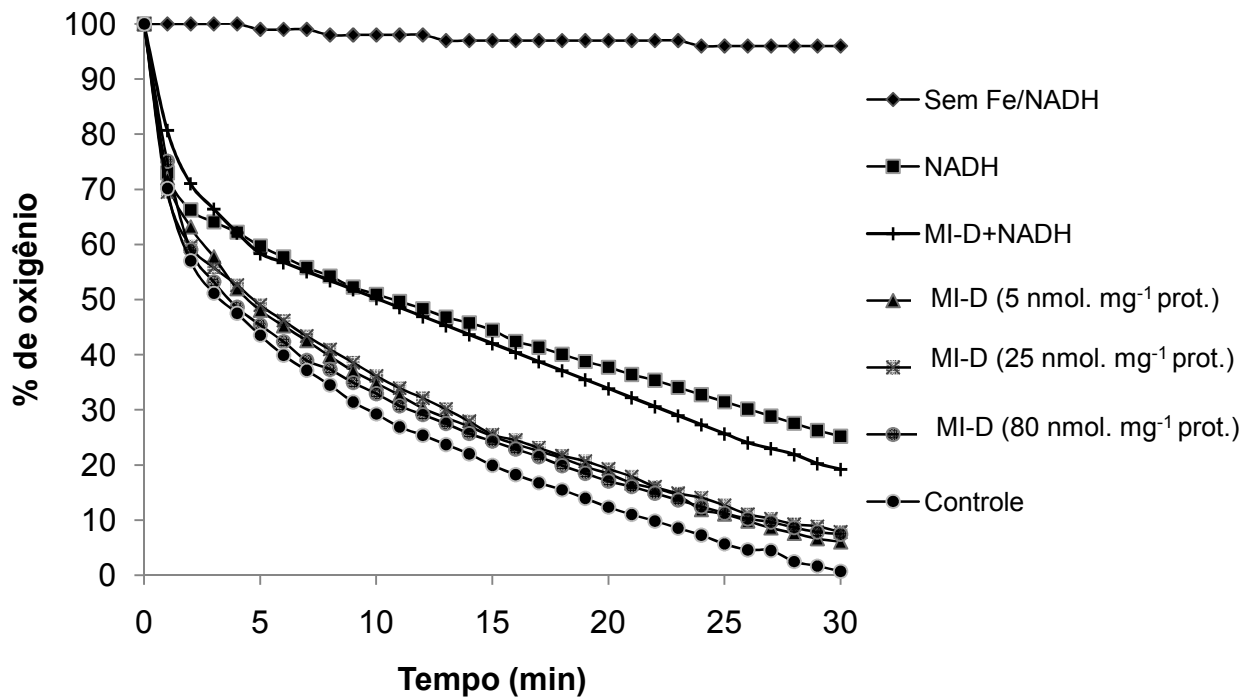


FIGURA 30. Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação ferro induzida em partículas submetocondriais desacopladas.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl 25 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 125 mmol.L⁻¹, FeSO₄ 500 μmol.L⁻¹, NADH 100 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg de prot. a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de NADH na ausência (controle) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.6.3). Os resultados estão expressos em porcentagem de oxigênio dissolvido na água, onde 100% equivale a 120 nmol O₂.mL⁻¹. Os traçados são representativos de 4 preparações independentes.

Para eliminar a influência da cadeia respiratória na geração de radicais livres, foi avaliado o efeito do MI-D em partículas submetocondrias desacopladas (dPSM) em sistema onde a lipoperoxidação foi induzida por AAPH. Como observado na figura 31, o MI-D inibiu a lipoperoxidação em ~32% e ~50% nas concentrações de 25 e 80 nmol.mg⁻¹ prot., respectivamente, sugerindo que este mesoiônico inibe a peroxidação lipídica não só por seu efeito desacoplador mas também por outros mecanismos, como a capacidade de sequestrar radicais livres.

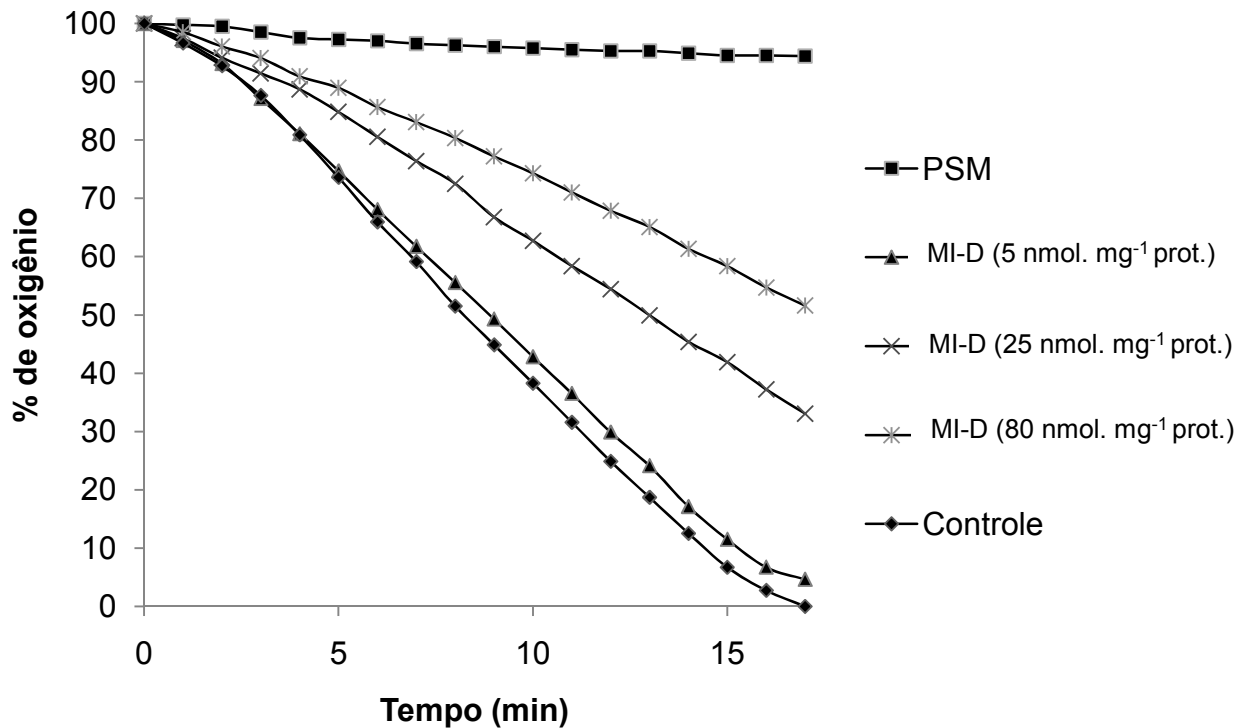


FIGURA 31. Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida por AAPH em partículas submitocondriais desacopladas.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl 25 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 125 mmol.L⁻¹, AAPH 10 mmol.L⁻¹ e 0,5 mg de prot. a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de AAPH na ausência (controle) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item (5.6.3). Os resultados estão expressos em porcentagem de oxigênio dissolvido na água, onde 100% equivale a 120 nmol O₂.mL⁻¹. Os traçados são representativos de 4 preparações independentes.

6.3.3 Capacidade seqüestradora de radicais superóxido pelo MI-D.

Para avaliar a eventual capacidade do MI-D de seqüestrar radicais livres, o que ajudaria a explicar a inibição da lipoperoxidação em dPSM utilizando AAPH, foram realizados ensaios específicos para o radical superóxido (O₂^{•-}). Nestes experimentos o O₂^{•-} é gerado na presença de NADH e fenazine metossulfato (PMS) e reduz NBT (nitroblue tetrazolium). Como observado na figura 32 o MI-D foi capaz de sequestrar O₂^{•-} de forma dose dependente em aproximadamente 7, 11 e 31% para 25, 38 e 80 μmol.L⁻¹ de MI-D, respectivamente.

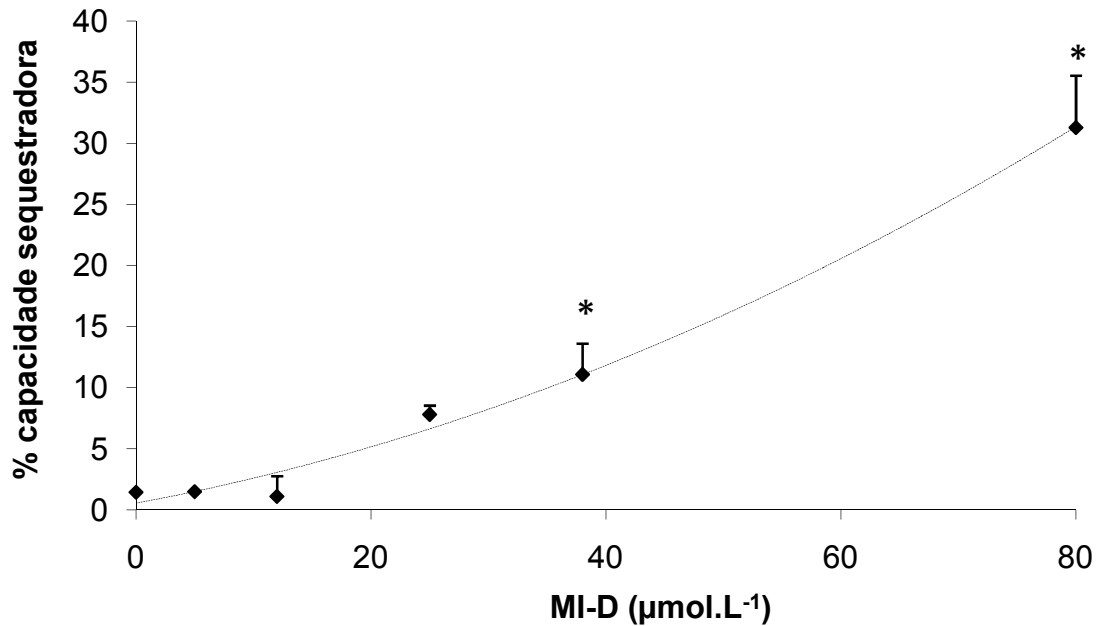


FIGURA 32. Capacidade seqüestradora de radicais superóxido pelo MI-D.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 8,0, NADH 340 μmol.L⁻¹, NBT 72 μmol.L⁻¹ e PMS 30 μmol.L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de NADH 10 mmol.L⁻¹ na ausência (controle) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.7). Os resultados estão expressos em porcentagem de radical superóxido sequestrado com relação ao controle (ausência de MI-D) de quatro experimentos. * Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$.

O fato do MI-D seqüestrar $O_2^{\cdot-}$ explicaria os resultados descritos por Cardoso *et al.* (2004) que avaliaram os efeitos do MI-D sobre macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos. Esses autores observaram o decréscimo dos níveis de $O_2^{\cdot-}$ em macrófagos estimulados por PMA (forbol ester 12-meristato 13-acetato), tratados com 15 μmol.L⁻¹ de MI-D. No entanto, naquele estudo não esclareceu-se o porque deste efeito, que possivelmente seja atribuído a capacidade sequestradora deste radical pelo MI-D.

Em relação à possível atividade sequestradora de radicais, é relevante notar que as porcentagens de $O_2^{\cdot-}$ sequestrado são similares aos valores de inibição da lipoperoxidação em mitocôndrias e em dPSM na presença de AAPH (FIGURAS 27 e 31). Estes resultados são indicativos de que o MI-D seja capaz de seqüestrar outras

espécies radicalares e motivam a realização de experimentos futuros para avaliar esta possibilidade.

6.3.4 Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida em lipossomas de fosfatidilcolina.

Para elucidar se a inibição da lipoperoxidação pelo MI-D é dependente da fase em que o radical é gerado e também para eliminar possíveis interferências das proteínas de membrana, o efeito do composto sobre a lipoperoxidação foi avaliado em lipossomas de fosfatidilcolina, usando dois azocompostos indutores de radicais, um de fase lipídica (ABCPA) e outro de fase aquosa (AAPH), sendo este sistema também acompanhado pelo consumo de oxigênio.

Azocompostos indutores de radicais livres têm sido usados rotineiramente para avaliar a capacidade sequestradora de radicais por compostos de interesse farmacológico (TESORIERE *et al.*, 1993; MANSANI *et al.* 1999; LAKSHMI *et al.*, 2005).

Como descrito anteriormente o AAPH é um indutor que se autodecompõe a 37°C (FIGURA 26), gerando radicais de carbono e peroxil, quando reagem com oxigênio. O ABCPA também é um azocomposto gerador de radicais (FIGURA 33), mas sua diferença em relação ao AAPH está em sua capacidade de inserção no interior das membranas de lipossomas multilamelares, facilitando a produção de radicais livres na fase lipídica do sistema (HANLON & SEYBERT, 1997).

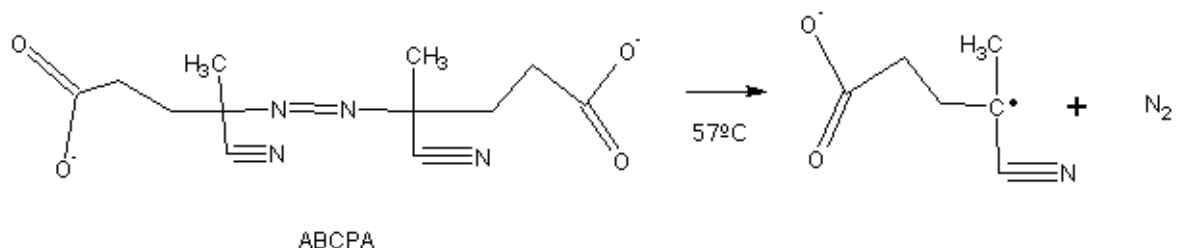


FIGURA 33. Descomposição do ABCPA em presença de O₂.

FONTE: HANLON & SEYBERT (1997).

NOTA: Estrutura química do azoiniciador ABCPA (4,4 azobis(ácido 4-cianopentóico)) e do radical gerado quando o composto é submetido a temperatura de 57°C.

O MI-D inibiu a lipoperoxidação nos lipossomas de fosfatidilcolina, independentemente da origem dos radicais (FIGURAS 34 e 35), chegando a aproximadamente 50% de inibição na maior concentração testada ($80 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Esta inibição foi dose dependente como também a observada em mitocôndrias isoladas (FIGURA 27) e partículas submitocondriais (FIGURA 31), sugerindo mais uma vez que o composto é capaz de inibir a peroxidação lipídica também por mecanismos independentes dos efeitos que causa na bioenergética mitocondrial, possivelmente por sequestrar radicais livres.

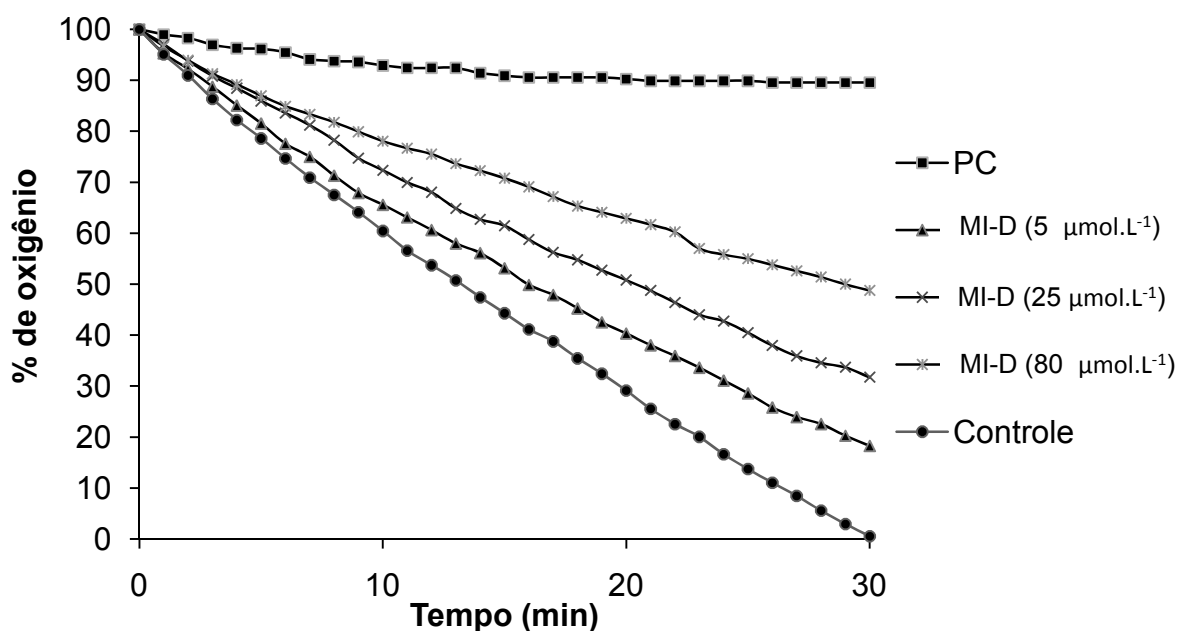


FIGURA 34. Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida por AAPH em lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl 16 mmol.L^{-1} , pH 7,2 e lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina (PC) $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a 37°C . A reação foi iniciada pela adição de AAPH 10 mmol.L^{-1} na ausência (controle) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.3. Os resultados estão expressos em porcentagem de oxigênio dissolvido na água, onde 100% equivale a $120 \text{ nmol O}_2.\text{mL}^{-1}$. Os traçados são representativos de 4 preparações independentes.

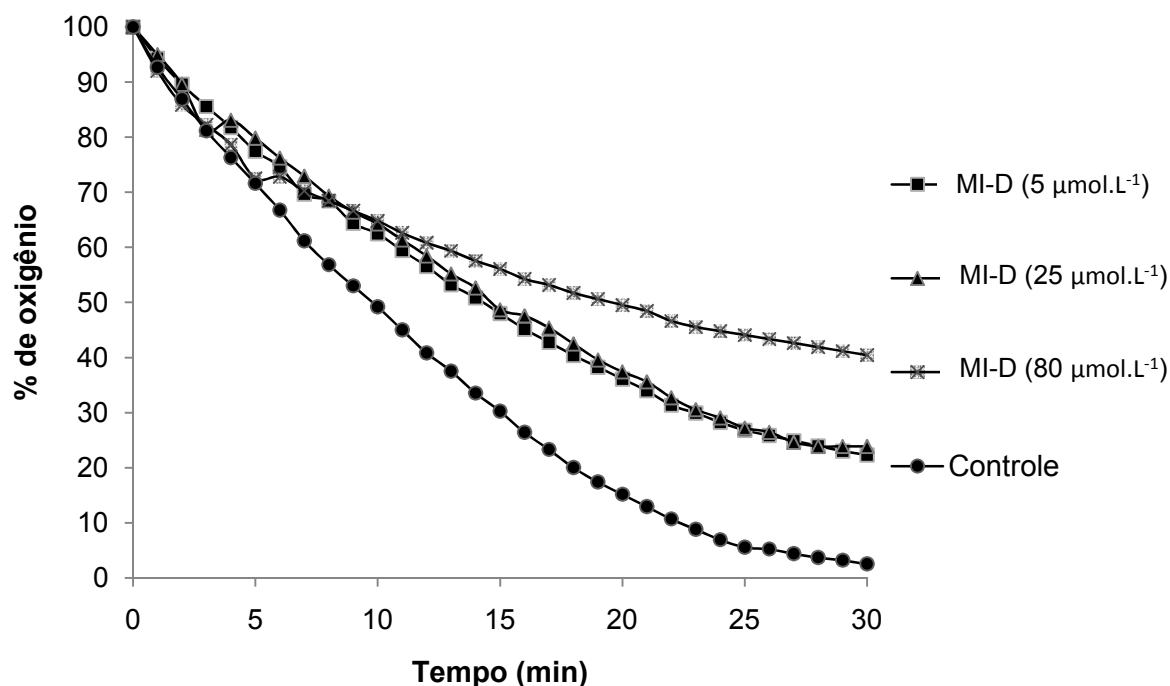


FIGURA 35. Efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida por ABCPA em lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl 16 mmol.L⁻¹, pH 7,2 e lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina (PC) 800 µmol.L⁻¹ acoplados com ABCPA 10 mmol.L⁻¹ a 57°C na ausência (controle) e na presença de MI-D nas concentrações indicadas na figura. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.3. Os resultados estão expressos em percentagem de oxigênio dissolvido na água, onde 100% equivale a 120 nmol O₂.mL⁻¹. Os traçados são representativos de 4 preparações independentes.

6.3.5 Efeito da S2.2 sobre a lipoperoxidação induzida

A N-fenilmaleimida (S2.2), segundo composto investigado, também foi testada em ensaios de lipoperoxidação em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. No ensaio de TBARS com indução da lipoperoxidação por adição de substrato e ferro não foi observada diferença estatisticamente significativa nas diferentes concentrações testadas, com relação ao controle (FIGURA 36). Devido a isto optou-se pelo uso de um método mais sensível para avaliar os efeitos deste composto

sobre a lipoperoxidação, a oxidação do ácido cis-parinário em partículas submitocondriais desacopladas.

O ácido cis-parinário (ácido 9, 11, 13, 15-*cis-trans-trans-cis*-octadecatetraenoico, (cPnA) é um ácido graxo que se incorpora rapidamente a membranas lipídicas, emitindo fluorescência. Na presença de radicais livres o cPnA perde um elétron sofrendo rearranjo do tetraeno o que resulta na diminuição da intensidade da fluorescência, o que é uma medida direta de lipoperoxidação (MCGUIRE *et al.*, 1997). Os resultados dos efeitos da S2.2 sobre a oxidação do ácido cis-parinário, incorporado em partículas submitocondriais desacopladas, induzido por AAPH estão apresentados na figura 37. Neste ensaio observa-se uma leve tendência à indução da lipoperoxidação, embora não seja estatisticamente significativa. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a S2.2 não afeta significativamente a lipoperoxidação nos modelos testados. Em decorrência disto, experimentos em outros sistemas de membrana e indutores, como os realizados para o MI-D, não foram executados.

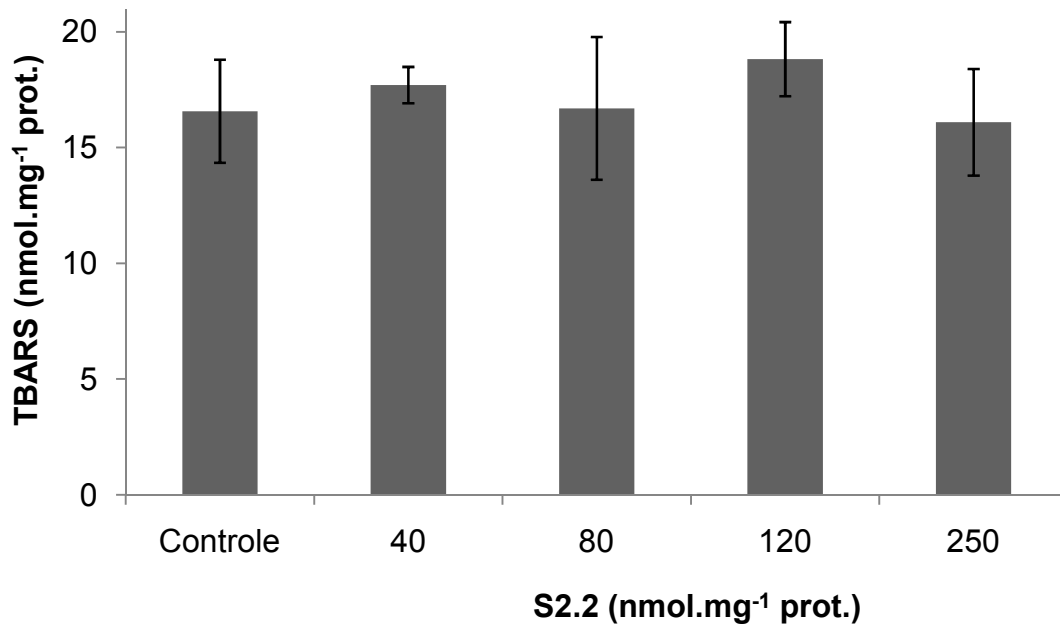


FIGURA 36. Efeito da S2.2 sobre a lipoperoxidação ferro induzida em mitocôndrias.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, FeCl₃ 0,2 mmol.L⁻¹, e 1 mg prot.mL⁻¹, a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 2-oxoglutarato 6 mmol.L⁻¹ na ausência (controle) e na presença de S2.2 nas concentrações indicadas. Após 45 min de incubação a reação foi interrompida pela adição de BHT (0.012%). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.1. Os valores representam a média ± dp (n=7) de 3 experimentos realizados independentemente.

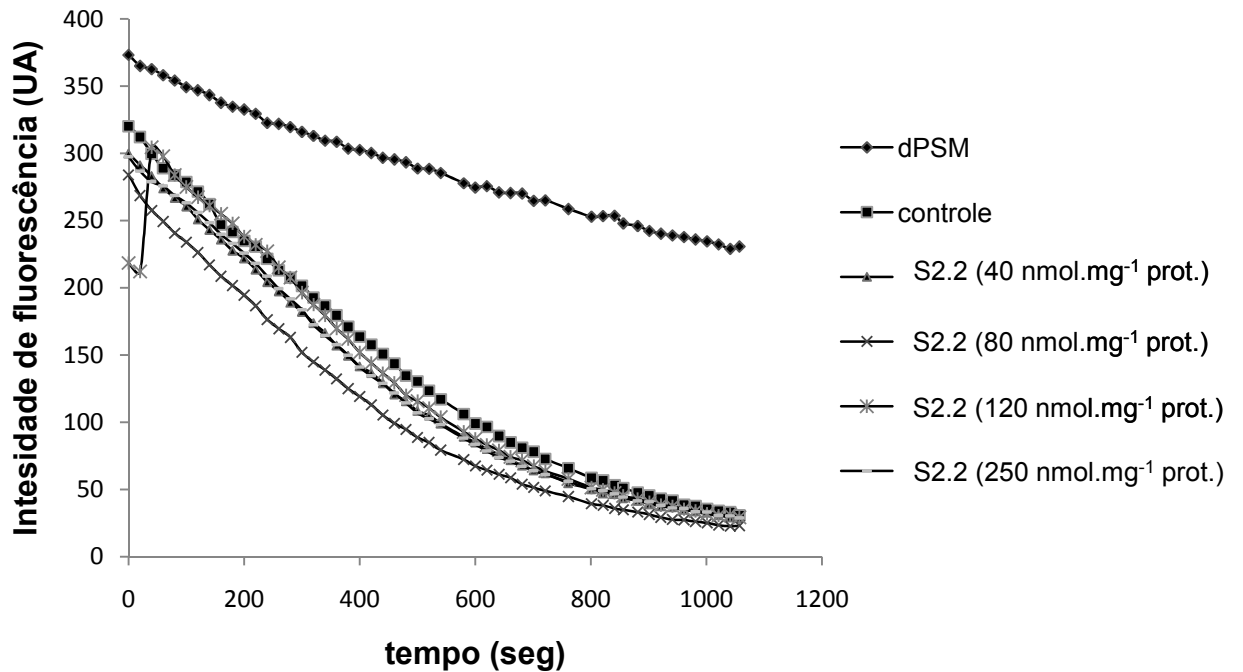


FIGURA 37. Efeito da S2.2 sobre a oxidação do ácido *cis*-parinário induzida por AAPH em partículas submitocondriais desacopladas.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl 25 mmol.L⁻¹, pH 7,4, NaCl 125 mmol.L⁻¹, ácido *cis*-parinário 1 μmol.L⁻¹ e 0,33 mg prot.mL⁻¹, a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de AAPH 10 mmol.L⁻¹ na ausência (controle) e na presença de S2.2 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.6.1). Os traçados são representativos de 4 preparações independentes.

6.4 EFEITO DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HeLa E B16-F10.

Uma vez avaliados os efeitos do MI-D e da S2.2 sobre eventos relacionados a morte celular envolvendo as mitocôndrias e, considerando os estudos que demonstram que estes compostos apresentam efeitos citotóxicos em células cancerosas (GRYNBERG, 1997; CADENA, 1999; SENFF-RIBEIRO *et al.* 2003; 2004 a, b; PRADO *et al.* 2004; PRADO, 2005) este estudo buscou avançar nestes conhecimentos, avaliando os efeitos do MI-D e da S2.2 sobre alguns parâmetros relacionados a morte celular. Para isto foram escolhidas como modelo células HeLa (carcinoma cervical humano) e B16-F10 (melanoma murino) e analisados os efeitos dos compostos sobre a produção de peróxidos e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, marcadores indiretos da produção de ERO e de danos às membranas celulares por lipoperoxidação, respectivamente.

O primeiro passo quando se pretende avaliar o efeito de um determinado composto em cultura celular é avaliar sua citotoxicidade através de ensaios de viabilidade celular. Embora os efeitos destes compostos sobre a viabilidade celular já tenham sido avaliados (CADENA, 1999; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003; 2004 a, b; PRADO *et al.*, 2004; PRADO, 2005), neste estudo a viabilidade celular foi avaliada novamente utilizando um método diferente, o método do MTT, que é um método colorimétrico baseado na capacidade das células vivas em reduzir, por ação de desidrogenases, o brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio], gerando como produto cristais de formazana que são solúveis em DMSO (MOSMANN, 1983).

Uma vez que o objetivo dos ensaios subsequentes era o de avaliar a produção de ERO nos períodos iniciais de indução de morte celular, as células foram tratadas durante 1 hora, com MI-D e S2.2. Em todos os experimentos se manteve a porcentagem de 0,12% de DMSO para evitar efeitos do solvente sobre a viabilidade celular.

Apesar de ser conhecido o fato de que o MI-D inibe a succinato desidrogenase em aproximadamente 20% (CADENA *et al.*, 1998) e que a S2.2 inibe a NADH desidrogenase e a succinato desidrogenase em 20 e 43%, respectivamente (PRADO, 2005), neste estudo foi usado o método do MTT considerando que existem outras desidrogenases citosólicas que também podem reduzir o MTT. De fato, os resultados apresentados nas figuras 38-39 e 41 são compatíveis aos obtidos

anteriormente pelo método de azul de tripan (CADENA, 1999; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003; PRADO, 2005).

O efeito do MI-D sobre a viabilidade de células HeLa após uma hora de tratamento está apresentado na figura 38, que mostra uma diminuição estatisticamente significativa a partir de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (80% de viabilidade), ressaltando-se que na concentração de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ obteve-se 73% de viabilidade, resultado similar ao obtido por CADENA (1999), para esta mesma concentração e tempo de exposição.

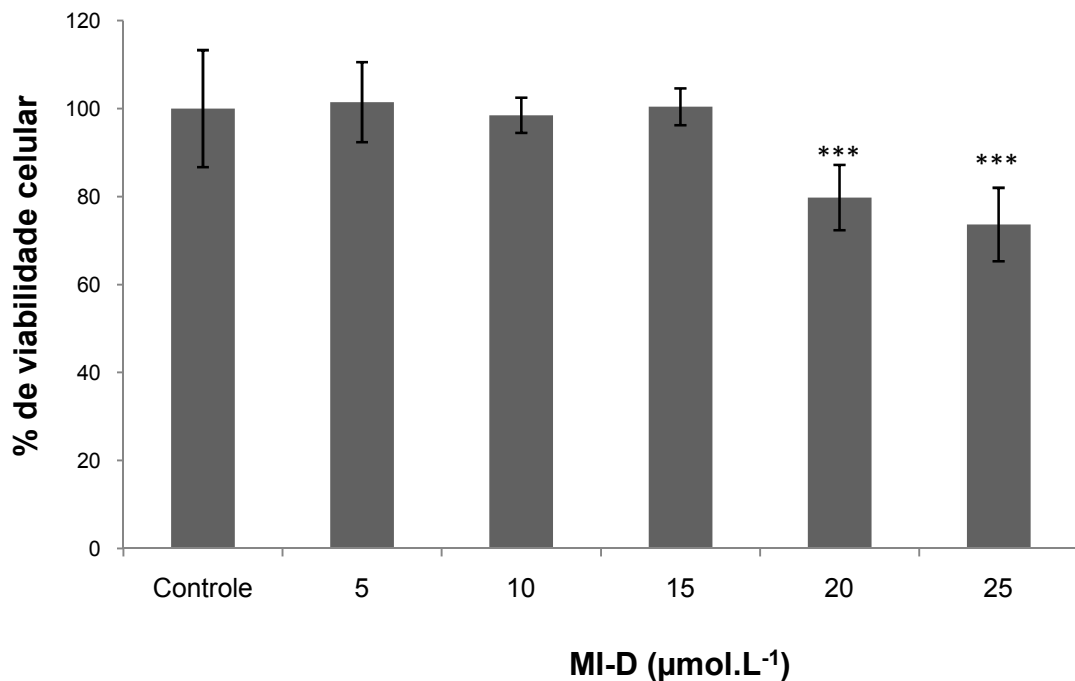


FIGURA 38. Efeito do MI-D sobre a viabilidade de células HeLa.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Viabilidade celular avaliada pelo método do MTT na ausência e após 1 hora de tratamento com o MI-D nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.6). Os valores representam a média \pm dp de porcentagem de viabilidade celular com relação ao controle de três experimentos independentes em quadruplicata. *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,001$.

Similarmente ao observado em células HeLa (FIGURA 38), o MI-D (FIGURA 39) apresentou diminuição da viabilidade de células B16-F10, porém, a mesma foi estatisticamente significativa apenas na maior concentração testada (~80% para 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Este resultado também é congruente com o apresentado por Senff-Ribeiro et al. (2003), para esta mesma concentração e tempo de exposição.

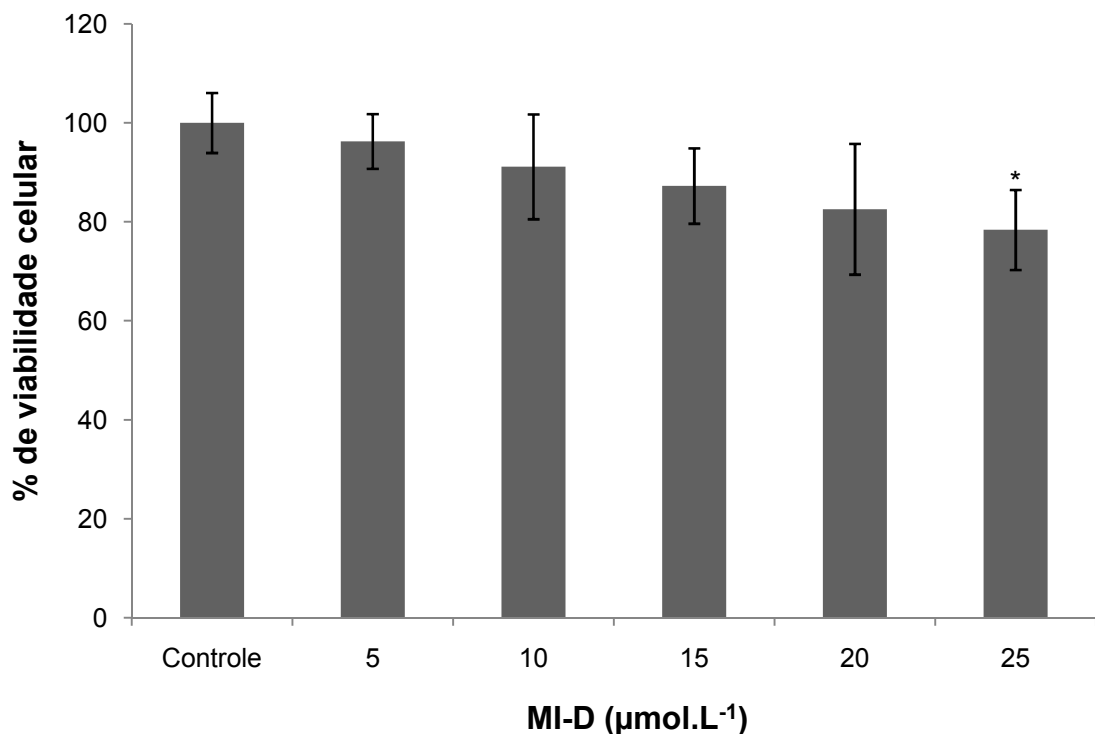


FIGURA 39. Efeito do MI-D sobre a viabilidade de células B16-F10.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Viabilidade celular avaliada pelo método do MTT na ausência (Controle) e após 1 hora de tratamento com MI-D nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.6). Os valores representam a média \pm dp de porcentagem de viabilidade celular com relação ao controle de três experimentos independentes em quadruplicata. * Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$.

Com relação à S2.2, em células HeLa (FIGURA 40), observou-se uma pequena queda da viabilidade celular, estatisticamente significativa apenas para a maior concentração testada (~82% para 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Já para as células B16-F10 (FIGURA 41) foi observada uma drástica diminuição dose dependente a partir de 40

$\mu\text{mol.L}^{-1}$, onde observou-se apenas 65% de viabilidade após 1 hora de tratamento, chegando a 50% e 20% para as concentrações de 80 e 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados mostram que a S2.2 é mais citotóxica para as células de melanoma murino, o que torna interessante avaliar futuramente se esse mesmo efeito pode ser encontrado em células de melanoma humano.

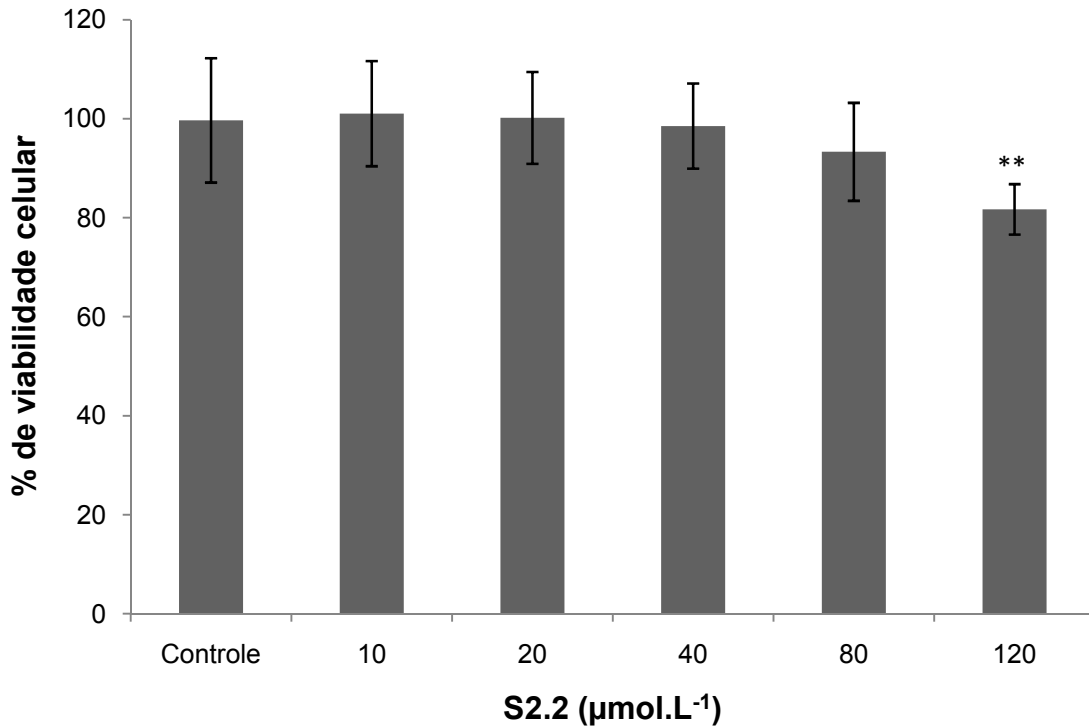


FIGURA 40. Efeito da S2.2 sobre a viabilidade de células HeLa.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Viabilidade celular avaliada pelo método do MTT na ausência e após 1 hora de tratamento com a S2.2 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.6). Os valores representam a média \pm dp de porcentagem de viabilidade celular com relação ao controle de três experimentos independentes em quadruplicata ** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,01$.

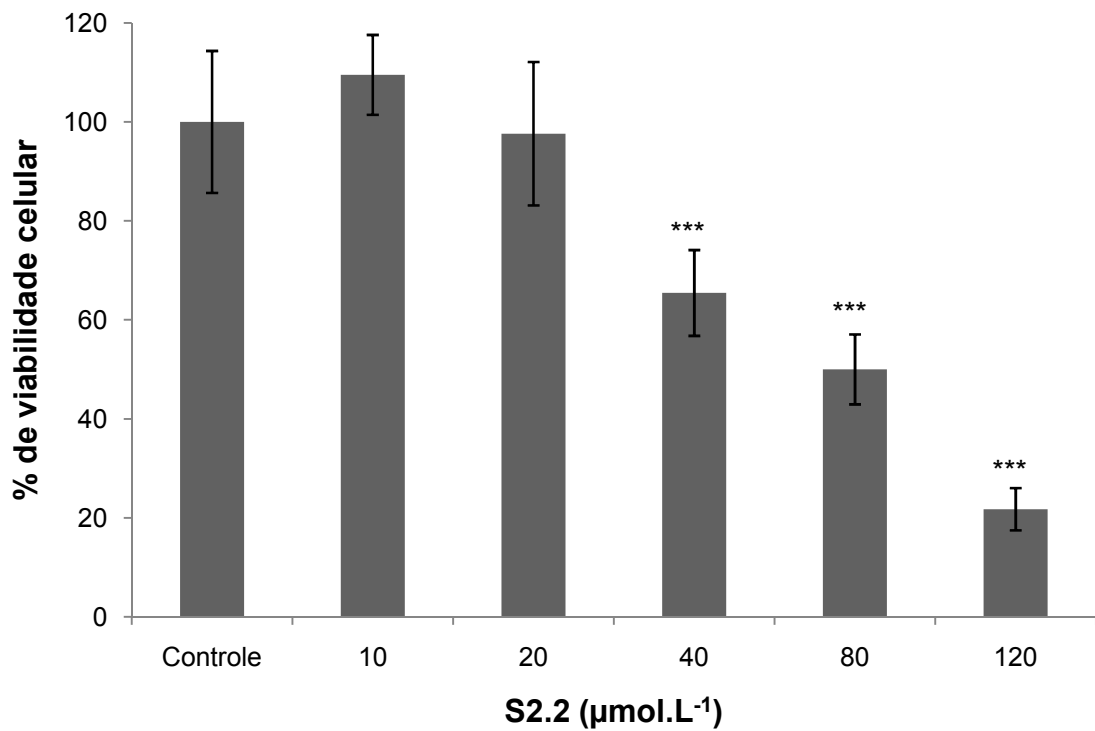


FIGURA 41. Efeito da S2.2 sobre a viabilidade de células B16-F10.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Viabilidade celular avaliada pelo método do MTT na ausência e após 1 hora de tratamento com a S2.2 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.6). Os valores representam a média \pm dp de porcentagem de viabilidade celular com relação ao controle de três experimentos independentes em quadruplicata. *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,001$

6.5 EFEITO DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A PRODUÇÃO DE PERÓXIDOS

Entre os peróxidos formados em sistemas biológicos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um dos mais estudados (VEAL *et al.*, 2007; HALLIWELL *et al.*, 2000). Seus níveis celulares estão diretamente relacionados à geração de $O_2^{\cdot-}$ que, por sua vez, pode ser produzido durante a respiração mitocondrial e em várias reações enzimáticas de oxidação, como por exemplo, as catalisadas pelos citocromos P450 e NADPH oxidase (BOVERIS & CADENAS, 1975, FRANCO *et al.*, 2008). Como descrito anteriormente, o H_2O_2 é resultante da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ que pode ocorrer espontânea ou enzimaticamente. O H_2O_2 pode atravessar membranas sem ajuda de canais específicos, sendo que na falta de um controle adequado e consequente aumento de sua concentração, difunde-se pelo citosol, para as organelas celulares e líquido extracelular, e na presença de metais de transição como ferro e cobre, participa da reação de Fenton, gerando $\cdot OH$ que é o radical de oxigênio mais deletério às células e tecidos (BARTOSZ, 2008). Isto faz do H_2O_2 um ponto de convergência entre os radicais $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$, o que justifica o fato de ser considerado um indicador da geração de ERO (SHYONG *et al.* 2003).

Neste estudo, a produção de peróxidos foi avaliada pelo método do FOX (ferrous oxidation in xylenol Orange), em meio de reação contendo sulfato ferroso amoniacal, H_2SO_4 , sorbitol e alaranjado de xilenol. Neste sistema o peróxido oxida o ferro a Fe^{3+} que reage com o alaranjado de xilenol formando um complexo que absorve entre 540 e 580 nm (JIANG *et al.*, 1990).

O efeito do MI-D sobre a produção de peróxidos em células HeLa e B16-F10 (FIGURAS 42 e 43, respectivamente) foi avaliado nas mesmas concentrações usadas nos ensaios de viabilidade celular (5 a 25 $\mu mol.L^{-1}$). Após 1 hora de tratamento apenas com o veículo (DMSO 0,12% - controle), o peróxido contido no meio de cultivo foi quantificado, encontrando-se para o controle os valores de $\sim 1,5$ e 2 $\mu mol.L^{-1}$ de peróxido para as células HeLa e B16-F10, respectivamente, valores compatíveis aos descritos na literatura (SHYONG *et al.* 2003).

Nas figuras 42 e 43, observa-se que o MI-D promoveu o aumento na produção de peróxidos nas duas linhagens celulares, no entanto, este aumento foi estatisticamente significativo apenas para as células HeLa ($\sim 30\%$), nas maiores concentrações (20 e 25 $\mu mol.L^{-1}$) (FIGURA 42).

Os resultados anteriores em mitocôndrias isoladas mostraram que o MI-D inibe a formação do PTPM induzido por H_2O_2 e a lipoperoxidação (FIGURAS 15, 16 e 25) e é capaz de seqüestrar $O_2^{\cdot-}$ (FIGURA 32). Portanto, os resultados apresentados nas figuras 41 e 42, parecem ser contraditórios. No entanto, deve-se considerar que nas células, diferentemente de mitocôndrias isoladas, outras reações são capazes de gerar $O_2^{\cdot-}$, em adição ao produzido durante a respiração mitocondrial. Um exemplo importante é a reação catalisada pela NADPH oxidase, enzima cuja expressão foi confirmada em diversos tipos de células tumorais, incluindo as aqui estudadas (BARTOSZ, 2008; LIU *et al.*, 2008; BRAR, *et al.* 2002). Ainda neste contexto, sabe-se que alguns compostos são capazes induzir a apoptose em células tumorais por modular a atividade desta enzima (MOCHIZUKI *et al.*, 2006; CHUNG-YI *et al.*, 2007). Este efeito não pode ser descartado para o MI-D e deve ser avaliado em experimentos futuros.

Simizu *et al.* (1998) testaram vários compostos com reconhecida atividade antitumoral (Camptotecina, vimblastina, inostamicina e adriamicina), e propuseram que independentemente do modo de ação, o aumento de H_2O_2 está envolvido na apoptose induzida pelos compostos testados. Ainda neste mesmo estudo, os autores concluíram que o aumento de H_2O_2 observado foi uma consequência da ativação da Caspase 3. Este mecanismo de indução de morte celular poderia explicar o aumento de peróxido causado pelo MI-D, porém, esta possibilidade deve ser investigada através de ensaios específicos.

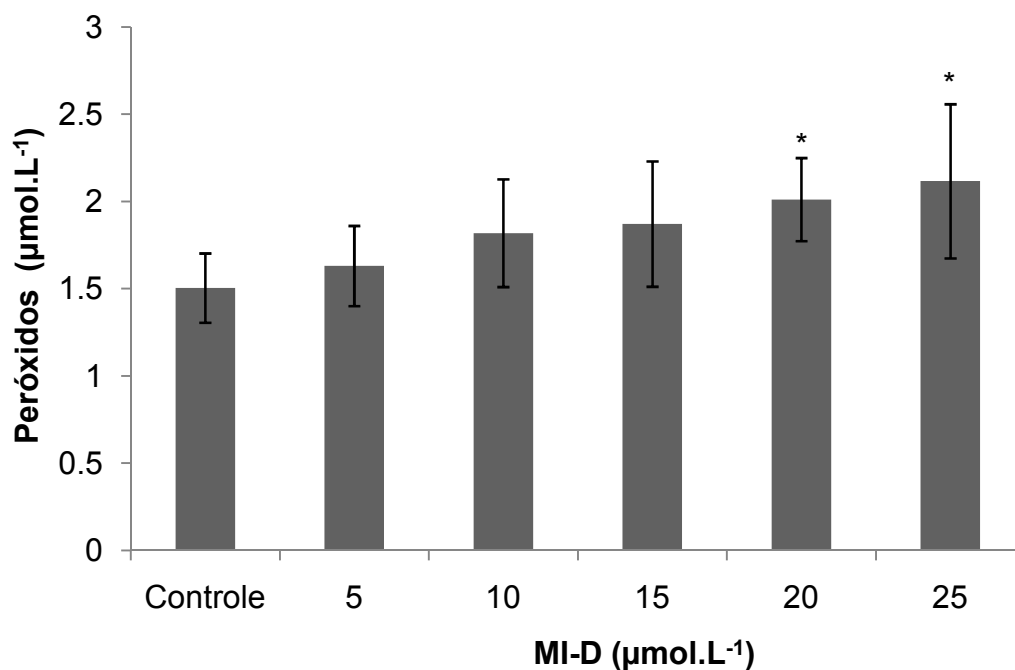


FIGURA 42. Efeito do MI-D sobre a produção de peróxidos em células HeLa.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Produção de peróxidos determinada pelo método do alaranjado de xilenol, após 1 hora de tratamento com o MI-D, nas concentrações indicadas. Controle – ausência dos compostos e presença de DMSO 0,12%. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.7). Os valores foram calculados utilizando curva de calibração construída a partir de solução estoque de H₂O₂ e representam a média ± dp de peróxido produzido, de três experimentos independentes em quadruplicata. * Significativamente diferente do controle ao nível de p < 0,05.

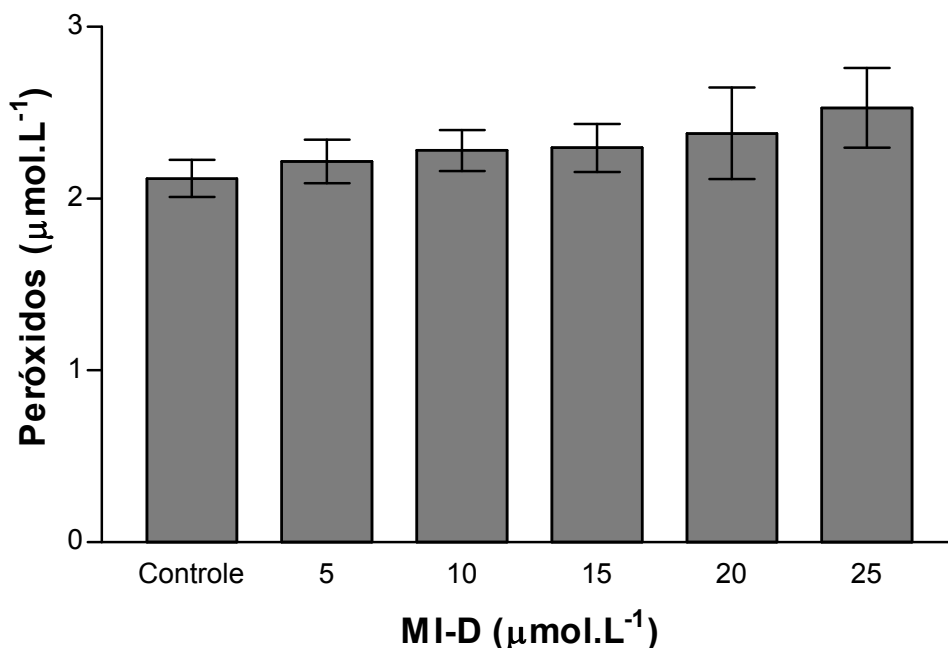


FIGURA 43. Efeito do MI-D sobre a produção de peróxidos em células B16-F10.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Produção de peróxidos determinada pelo método do alaranjado de xilenol, após 1 hora de tratamento com o MI-D, nas concentrações indicadas. Controle – ausência dos compostos e presença de DMSO 0,12%. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 4.10.7). Os valores foram calculados utilizando curva de calibração construída a partir de solução estoque de H₂O₂ e representam a média ± dp de peróxido produzido, de três experimentos independentes em quadruplicata.

Com relação à S2.2, após 1 hora de tratamento das células HeLa ou B16-F10 com o composto (10-20 µmol.L⁻¹), não observou-se mudança significativa nos níveis de peróxido (FIGURAS 44 e 45).

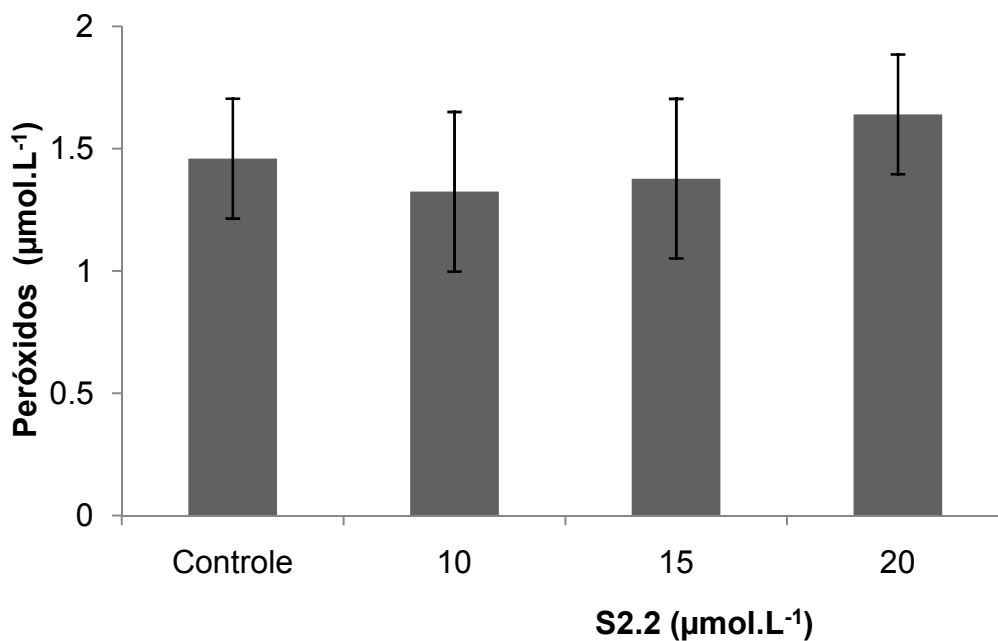


FIGURA 44. Efeito da S2.2 sobre a produção de peróxidos em células HeLa.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Produção de peróxidos determinada pelo método do alaranjado de xilenol, após 1 hora de tratamento com a S2.2 nas concentrações indicadas. Controle – ausência dos compostos e presença de DMSO 0,12%. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.7). Os valores foram calculados utilizando curva de calibração construída a partir de solução estoque de H₂O₂ e representam a média ± dp de peróxido produzido, de três experimentos independentes em quadruplicata.

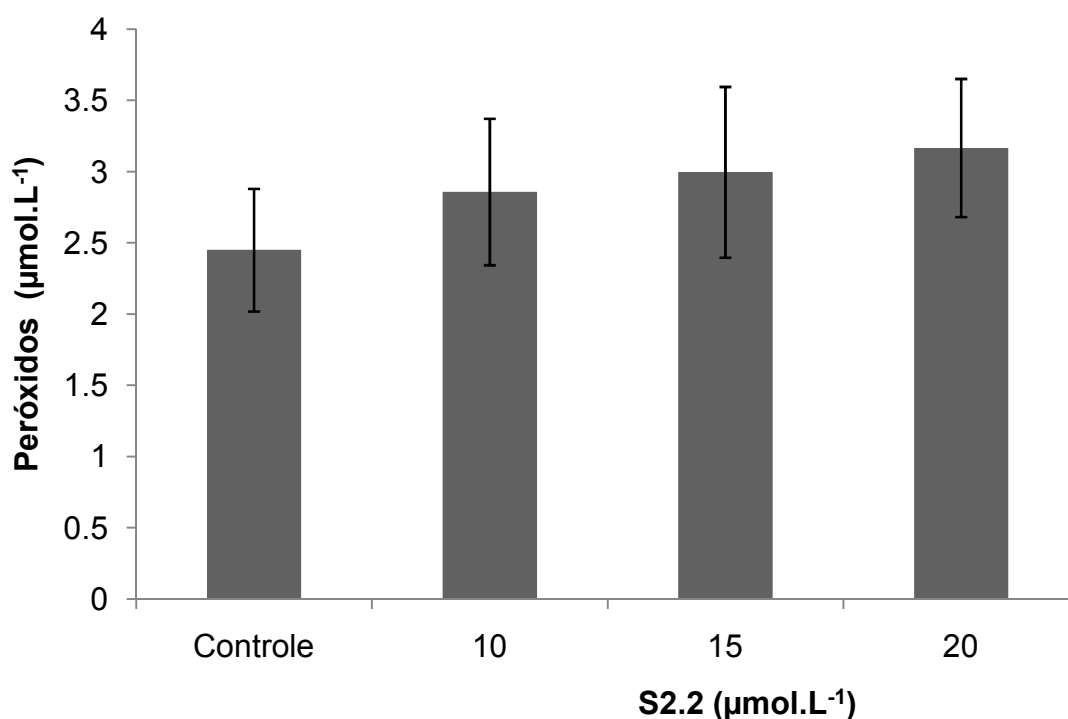


FIGURA 45. Efeito da S2.2 sobre a produção de peróxido em células B16-F10.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Produção de peróxidos determinada pelo método do alaranjado de xilenol, após 1 hora de tratamento com a S2.2 nas concentrações indicadas. Controle – ausência dos compostos e presença de DMSO 0,12%. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.7). Os valores foram calculados utilizando curva de calibração construída a partir de solução estoque de H₂O₂ e representam a média ± dp de peróxido produzido, de três experimentos independentes em quadruplicata.

Os experimentos em mitocôndrias isoladas, demonstraram que a S2.2 inibiu a transição de permeabilidade quando o indutor foi o H₂O₂ (FIGURAS 19 e 20), porém, em menor intensidade em relação a inibição observada quando o indutor foi o fosfato. Sobre a lipoperoxidação, o composto não teve qualquer efeito (FIGURA 36). Estes resultados estão de acordo com os observados sobre a produção de peróxidos (FIGURAS 44 e 45).

6.6 EFEITO DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO NÃO INDUZIDA EM CÉLULAS.

Complementar à avaliação dos efeitos do MI-D e da S2.2 sobre a formação de peróxidos, foi determinado também os efeitos dos compostos sobre a formação de malondialdeído (MDA), subproduto gerado durante o processo de lipoperoxidação, em células HeLa e B16-F10. A produção de MDA e compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico foram avaliadas pelo método do TBARS de acordo com o descrito por OHKAWA *et al.* (1979), onde ocorre a formação de um complexo fluorescente destes compostos com o ácido tiobarbitúrico.

Nas células HeLa e B16-F10, o MI-D (5 a 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) não apresentou efeito significativo sobre a lipoperoxidação (FIGURAS 46 e 47), após 1 hora de tratamento. Estes resultados sugerem que o efeito desacoplador e capacidade de sequestrar $\text{O}_2^{\cdot-}$ do composto não foram suficientes para inibir a lipoperoxidação nas células, como observado em mitocôndrias, partículas submitocondriais e lipossomas de fosfatidilcolina (FIGURAS 25, 27, 29-31, 34 e 35). Deve-se considerar também a diferença entre os sistemas experimentais, sendo que a lipoperoxidação nas células foi determinada na ausência de sistema indutor, enquanto que nos sistemas de membrana menos complexos (mitocôndrias, partículas submitocondriais e lipossomas) indutores estavam presentes.

No caso da S2.2, a menor concentração testada (40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) não causou efeito sobre a lipoperoxidação nas duas linhagens avaliadas (FIGURAS 46 e 47). Este resultado é compatível com a ausência de efeitos sobre os níveis de peróxido (FIGURAS 44 e 45) e sobre a lipoperoxidação em mitocôndrias e partículas submitocondriais (FIGURAS 36 e 37). Porém, optou-se por testar concentrações maiores (80 e 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), observando-se então um perfil de indução da lipoperoxidação (FIGURAS 46 e 47). No entanto, devido a ausência de outros resultados para estas concentrações, este resultado foi considerado até então, como um resultado isolado, sendo necessária a realização de experimentos adicionais.

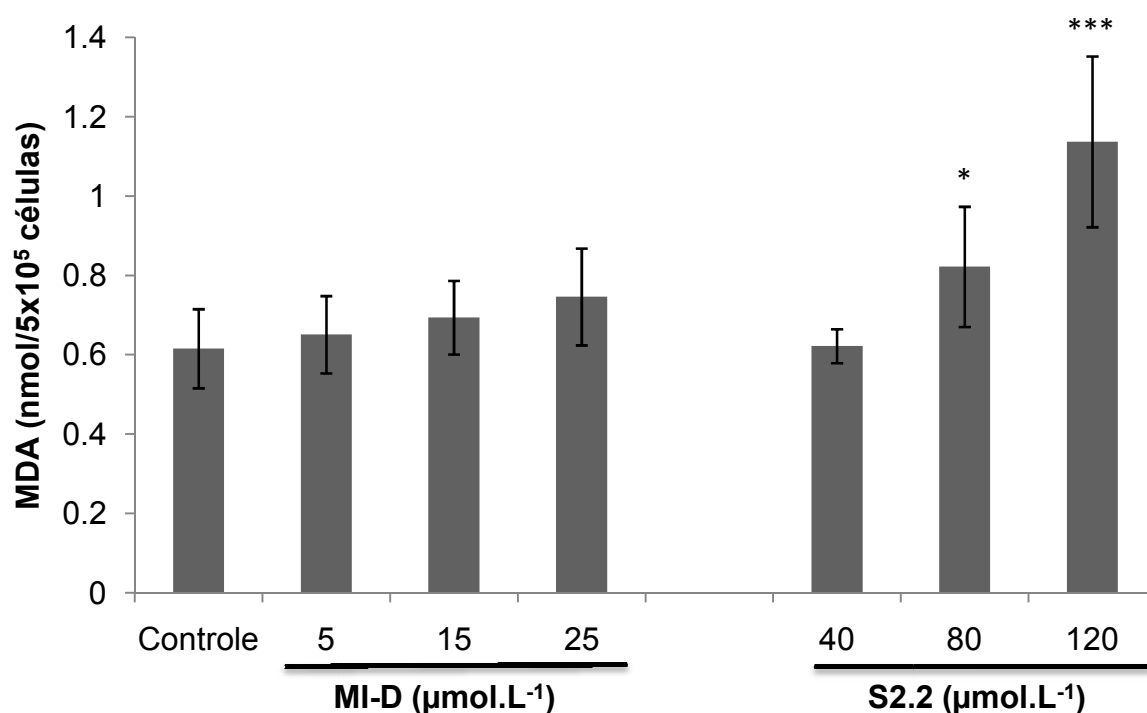


FIGURA 46. Efeito de MI-D e da S2.2 sobre a lipoperoxidação em células HeLa.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: A lipoperoxidação foi avaliada pelo método do TBARS, após 1 hora de tratamento com os compostos nas concentrações indicadas. Controle – ausência dos compostos e presença de DMSO 0,12%. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.8). Os valores foram calculados utilizando-se curva de calibração com 1,1,3,3-tetraetoxi propano e representam a média \pm dp de MDA, de três experimentos em triplicata. * e *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$ e $0,001$, respectivamente.

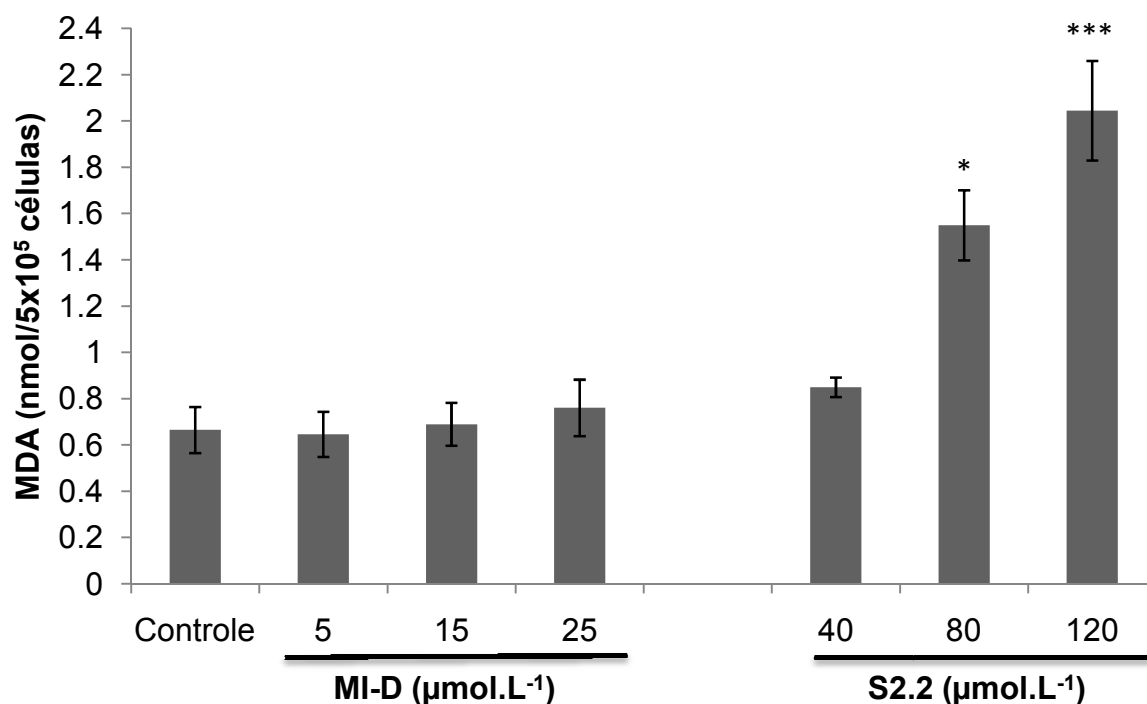


FIGURA 47. Efeito do MI-D e da S2.2 sobre a lipoperoxidação em células B16-F10.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: A lipoperoxidação foi avaliada pelo método do TBARS, após 1 hora de tratamento com os compostos nas concentrações indicadas. Controle – ausência dos compostos e presença de DMSO 0,12%. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.8). Os valores foram calculados utilizando-se curva de calibração com 1,1,3,3-tetraetoxi propano e representam a média \pm dp de MDA, de três experimentos em triplicata. * e *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$ e $0,001$, respectivamente.

6.7 EFEITO DO MI-D E S2.2 SOBRE A LIBERAÇÃO DE CITOCROMO *c* EM CÉLULAS HELA E B16-F10

Como descrito anteriormente, a liberação de citocromo *c* está envolvida na morte celular por apoptose. Uma vez no citosol o citocromo *c* se liga com ATP/dATP, Apaf-1 e procaspase 9, promovendo a formação de um complexo protéico conhecido como apoptossomo. A formação deste complexo leva a ativação da caspase 9 que, por sua vez, promove a ativação de outras caspases, denominadas caspases efetoras, entre elas a caspase 3 (SAELENS *et al.* 2004).

Para a liberação de citocromo *c* é necessária a permeabilização da membrana mitocondrial externa, que pode ocorrer pela formação de um canal protéico composto de proteínas proapoptóticas da família Bcl-2 ou pela formação do poro de transição de permeabilidade, que leva ao inchamento mitocondrial e ao subsequente rompimento da membrana mitocondrial externa (KINNALLY & ANTONSSOM, 2007; KROEMER *et al.*, 2007).

O efeito do MI-D e da S2.2 sobre a liberação de citocromo *c*, foi avaliado espectrofotometricamente, pelo método descrito por Appaix *et al.* (2000), em células HeLa e B6-F10 usando as maiores concentrações testadas nestas linhagens celulares nos experimentos de viabilidade celular (25 e 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para o MI-D e a S2.2, respectivamente). Nas células HeLa o MI-D, após 1 hora de tratamento, não promoveu aumento significativo na liberação de citocromo *c* com relação ao controle (FIGURA 48). Cadena (1999), com base em análises morfológicas e ensaio TUNEL, descreveram que o MI-D nesta mesma concentração, induz a apoptose em células HeLa. No entanto, os autores utilizaram o tempo de tratamento de 90 minutos. Não se descarta que esteja ocorrendo apoptose também em 60 minutos de tratamento, mas se ocorrer não esta sendo mediada pela liberação de citocromo *c*.

Já em células B16-F10 este mesoiônico aumentou em 80% a liberação de citocromo *c* (FIGURA 48). A ação citotóxica e antitumoral do MI-D contra melanoma murino foram demonstradas por Senff-Ribeiro *et al.* (2003). Naquele estudo a viabilidade celular foi reduzida em 80% após 72 horas de tratamento com a concentração de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. O MI-D (25 mg.Kg^{-1}) mostrou-se mais eficaz que os antineoplásicos fotemustina e dacarbazina em inibir o desenvolvimento de melanoma B16-F10 em camundongos, assim como também foi eficiente em inibir

(64%) o crescimento de melanomas já desenvolvidos (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003). Desta forma, considerando o resultado obtido no presente estudo pode-se sugerir que a morte por apoptose esteja envolvida na atividade antitumoral do composto e que esta seja mediada pela mitocôndria via liberação de citocromo *c*.

Em relação a S2.2, anteriormente foi descrito por Prado (2005) que o composto induz a liberação de citocromo *c* em células B16-F10 após 45 minutos de tratamento com $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto. Desta forma, neste estudo o ensaio de liberação do citocromo *c*, foi realizado apenas com as células HeLa. Devido ao composto apresentar menor efeito sobre estas células, como observado nos ensaios de viabilidade, produção de peróxidos e lipoperoxidação (FIGURAS 40, 44 e 46, respectivamente), foi usada a concentração de $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$, observando-se um aumento de ~175% de citocromo liberado no citosol em relação ao controle (FIGURA 48). A maior quantidade de citocromo *c* liberado poderia ainda explicar o aumento da lipoperoxidação na presença de S2.2 (FIGURA 46). Como descrito anteriormente, esta proteína é essencial para a respiração mitocondrial e sua liberação no citosol induz o aumento na geração de ERO, devido a diminuição da velocidade da respiração mitocondrial (BOUCHIER-HAYES *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos sugerem que, nestas concentrações e tempo de tratamento, os dois compostos são capazes de induzir morte celular por apoptose, sendo que as células de melanoma murino mostraram-se mais susceptíveis do que as de carcinoma humano. Considerando o fato de que os dois compostos inibem o inchamento mitocondrial dependente da formação do PTPM, sugere-se, ainda, que a liberação de citocromo *c* é decorrente da permeabilização da membrana mitocondrial externa por mecanismos relacionados às proteínas proapoptóticas da família Bcl2, como Bax/Bak.

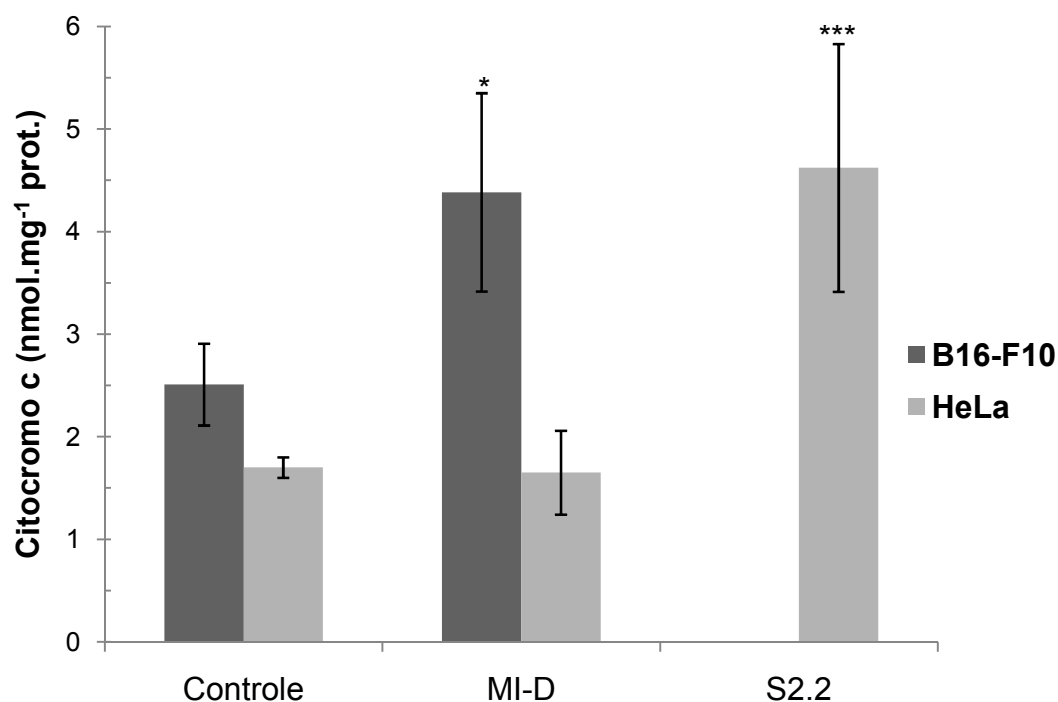


FIGURA 48. Efeito de MI-D e da S2.2 sobre a liberação de citocromo *c* em células B16-F10 e HeLa.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: A liberação de citocromo *c* foi avaliada espectrofotometricamente a 414 nm, após 1 hora de tratamento, usando 25 e 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para o MI-D e a S2.2, respectivamente. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.9). Os valores foram calculados de acordo ϵ 100 $\text{mmol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$ do citocromo *c*, a 414 nm. Os resultados estão expressos como nmol de citocromo *c* liberado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de prot. com relação ao controle (ausência dos compostos e presença de DMSO) e representam a média \pm dp de três experimentos em triplicata. * e *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$ e $0,001$, respectivamente.

6.8 EFEITO DO MI-D E DA S2.2 SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Como descrito anteriormente, os efeitos deletérios resultantes da formação de ERO são prevenidos por vários sistemas antioxidantes, sendo que seu mau funcionamento pode levar ao aumento descontrolado de ERO e à indução de morte celular. Com a finalidade de avaliar se o MI-D e a S2.2 interferem na atividade de enzimas antioxidantes, foram avaliadas a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutaciona peroxidase (Gpx) e glutaciona redutase (Gred), provenientes do extrato protéico de células HeLa.

A primeira enzima analisada foi a SOD, enzima encarregada da dismutação do radical superóxido gerando H_2O_2 (ESQUEMA 1). Existem várias isoformas de SOD, a MnSOD que se encontra na matriz mitocondrial e as Cu e ZnSOD que se encontram no espaço intermembranas e no citosol (BARTOSZ, 2008; OTT *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2006; TURRENS, 2003). A superexpressão desta enzima pode levar à inibição do crescimento de células cancerosas (WEYDERT *et al.*, 2006; VAN DE WETERING *et al.*, 2008), o que torna o controle de sua atividade um alvo para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais (USHIO-FUKAI & NAKAMURA, 2008).



ESQUEMA 1. Dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase.

FONTE: BARTOSZ (2008).

A atividade da SOD foi avaliada pelo método do NBT, que é reduzido em presença de PMS e NADH. Nos resultados mostrados na figura 49, observa-se que MI-D ($5-25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e a S2.2 ($40-120 \mu\text{mol.L}^{-1}$) não modificaram a atividade da enzima.

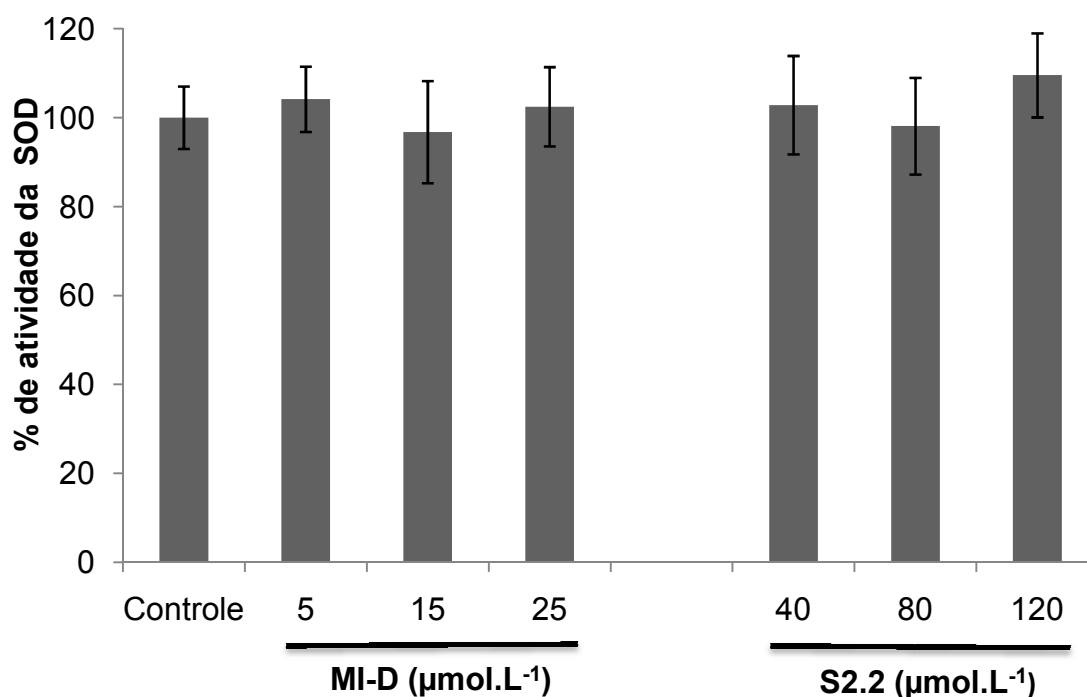


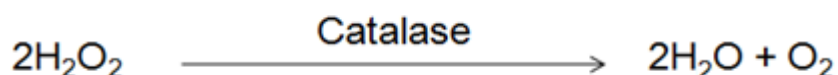
FIGURA 49. Efeito do MI-D e da S2.2 sobre a atividade da Superóxido Dismutase (SOD).

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl 10mmol.L^{-1} , pH 8,0, NADH $340 \mu\text{mol.L}^{-1}$, NBT, nitroblue tetrazolium, $72 \mu\text{mol.L}^{-1}$, PMS $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e ELC-HeLa $250 \mu\text{g prote\u00edna.mL}^{-1}$. A reação foi iniciada pela adição do NADH e acompanhada a 560 nm durante 1 minuto. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.11.1). Os valores estão expressos em porcentagem de atividade com relação ao controle (ausência dos compostos e presença de DMSO 0,12%) e representam a média \pm dp, de três experimentos independentes em triplicata. 100% corresponde a 1 unidade de SOD, que equivale à inibição de 50% da taxa de redução do NBT.

Produto da reação catalisada pela SOD, o H_2O_2 pode ser decomposto pela catalase (nos peroxissomos e nas mitocôndrias de coração) e pelas enzimas glutathione peroxidase, tioredoxina peroxidase (na mitocôndria) (BARTOSZ, 2008; OTT *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2006; TURRENS, 2003).

A catalase reduz o H_2O_2 a H_2O e O_2 (ESQUEMA 2), sendo que a diminuição da sua atividade pode levar ao aumento de peróxido de hidrogênio que em *in vivo* facilita a proliferação de alguns tipos de células cancerosas (HEMPEL *et al.*, 2009; MAURIZ *et al.*, 2007) além de promover a geração de radicais hidroxila, induzindo a lipoperoxidação (BARTOSZ, 2008).



ESQUEMA 2. Redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela catalase.

FONTE: AEBI (1984).

A atividade da catalase foi avaliada espectrofotometricamente pela diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio a 240 nm. Neste ensaio (FIGURA 50) observou-se uma inibição dose independente a partir de $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de S2.2 de ~20%. Este resultado pode estar envolvido no aumento da lipoperoxidação (FIGURAS 46 e 47) observado nas células HeLa e B16-F10 quando tratadas com as mesmas concentrações da S2.2. Por outro lado, o MI-D não promoveu alterações na atividade da enzima (FIGURA 50).

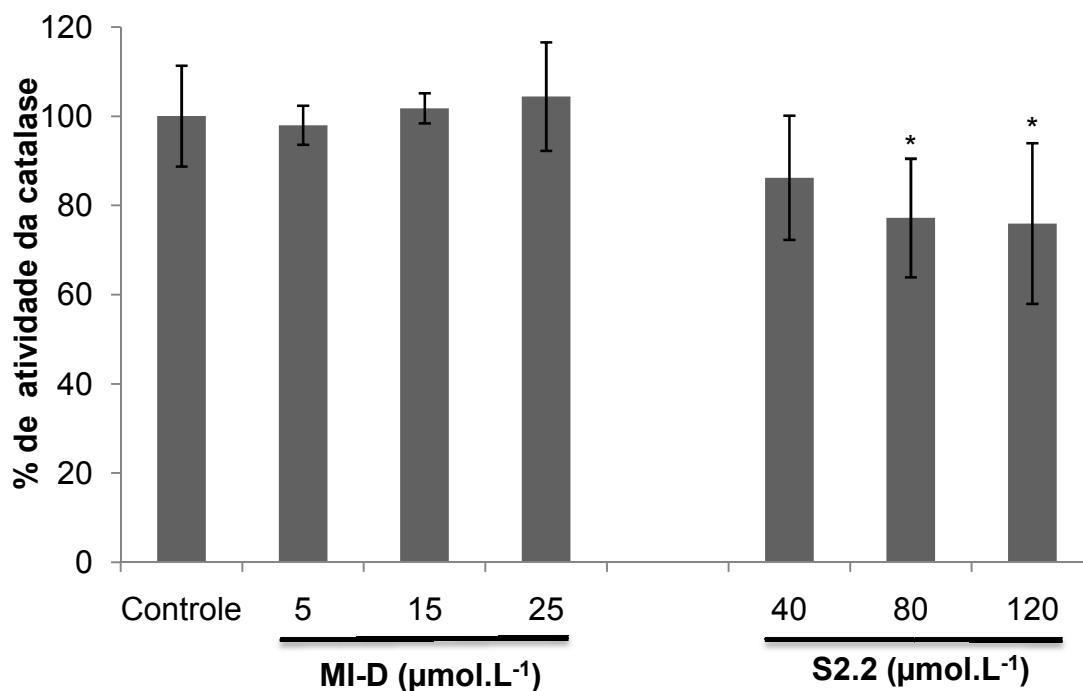
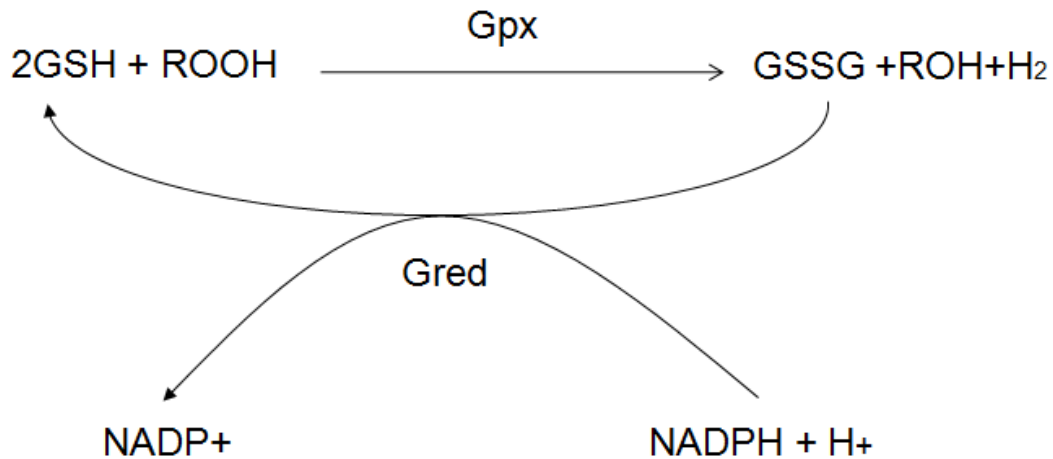


FIGURA 50. Efeito do MI-D e a S2.2 sobre a atividade da catalase.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: tampão fosfato 50mmol.L⁻¹, pH 7,0, H₂O₂ 10 mmol.L⁻¹ e ELC-HeLa 130 μg proteína.mL⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ e acompanhada a 240 nm durante 2 minutos. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.11.2). Os valores estão expressos em porcentagem de atividade com relação ao controle (ausência dos compostos e presença de DMSO 0,12%) e representam a média ± dp, de três experimentos independentes em triplicata. 100% corresponde a 63 pmol de H₂O₂ reduzido.(μg de proteína.min)⁻¹, considerando o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (3,94 μmol⁻¹.L.cm⁻¹). * Significativamente diferente do controle ao nível de p< 0,05.

Com relação à glutaciona peroxidase, são descritas várias isoformas de Gpx1 a 4. As Gpx1a 3 decompõem o H₂O₂, enquanto a Gpx4 reduz peróxidos de fosfolipídeos, lipoproteínas e ésteres de colesterol (ESQUEMA 3), sendo que a Gpx4 é considerada a primeira defesa enzimática contra a oxidação de membranas celulares (OTT *et al.*, 2007). A atividade da Gpx foi avaliada espectrofotometricamente, acompanhando-se o consumo de NADPH a 340 nm.



ESQUEMA 3. Redução de peróxidos (ROOH) pela glutaciona peroxidase (Gpx) na presença de glutaciona reduzida (GSH), gerando glutaciona oxidada (GSSG) e álcool (ROH). A GSSG é novamente reduzida pela glutaciona redutase (Gred) em presença de NADPH.

FONTE: FLOHÉ & GUNZLER (1984).

Na figura 51, observa-se que o MI-D aumentou em aproximadamente 30% a atividade da glutaciona peroxidase. Este resultado não se refletiu nos experimentos de produção de peróxidos e lipoperoxidação (FIGURAS 42, 46 e 47), pois nos primeiros o composto promoveu um aumento de ~30% na produção de peróxidos (FIGURA 42) e no segundo (FIGURAS 46 e 47) nenhum efeito foi observado para o composto. Na interpretação destes resultados deve-se considerar as diferenças metodológicas. Enquanto que nos ensaios de atividade enzimática o efeito dos compostos foi avaliado sobre enzimas do extrato livre de células, permanecendo dois minutos em contato as mesmas, nos ensaios de produção de peróxido e lipoperoxidação foram utilizadas células em cultivo que permanecem em contato com os compostos por 1 hora. A complexidade estrutural das células em relação a presença da enzima no ELC também deve ser considerada, uma vez que neste último modelo experimental os compostos tiveram acesso facilitado a enzima alvo. Por outro lado, este resultado poderia explicar, pelo menos em parte, a inibição que o MI-D ocasionou sobre a lipoperoxidação ferro induzida em mitocôndrias (FIGURA 25), já que esta enzima faz parte do sistema de defesa antioxidante da mitocôndria.

Com relação à S2.2, não foi observado efeito do composto sobre a atividade desta enzima (FIGURA 51).

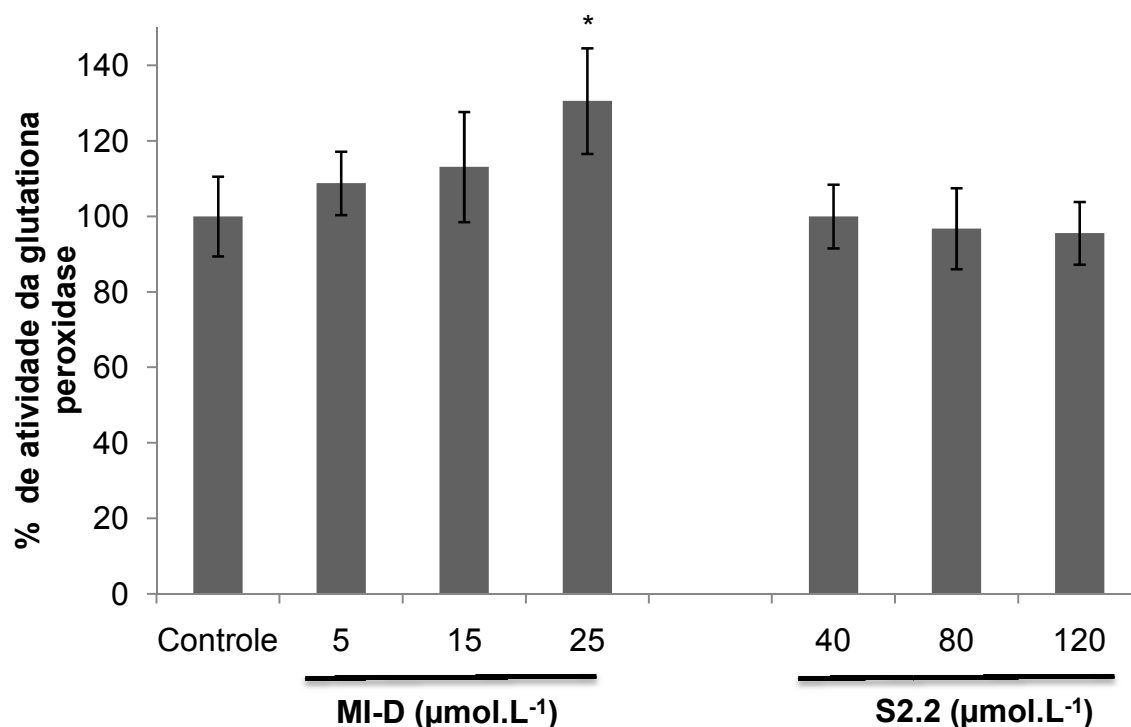


FIGURA 51. Efeito do MI-D e da S2.2 sobre a atividade da glutatona peroxidase.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹, pH 7,0, EDTA 1 mmol.L⁻¹, GSH 2 mmol.L⁻¹, NADPH 0,15 mmol.L⁻¹, Gred purificada 0,2 U, t-butil hidroperóxido 0,5 mmol.L⁻¹ e ELC-HeLa 50 µg proteína.mL⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de t-butil hidroperóxido e acompanhada a 340 nm durante 1 minuto. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.11.3). Os valores estão expressos em porcentagem de atividade com relação ao controle (ausência dos compostos e presença de DMSO 0,12%) e representam a média ± dp, de três experimentos independentes em triplicata. 100% corresponde a 0,42 pmol de NADPH consumido. µg de proteína.min.⁻¹, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH (6220 M⁻¹.cm⁻¹). * Significativamente diferente do controle ao nível de p < 0,05.

A Gpx tem como cofator glutatona reduzida (GSH) sendo, portanto, que a manutenção dos níveis de GSH é essencial para manter a atividade da enzima. A enzima glutatona redutase (Gred) é encarregada de manter o GSH na forma reduzida (ESQUEMA 3). Esta enzima reduz GSSG a GSH na presença de NADPH (HUBER *et al.*, 2008; VALKO *et al.*, 2006). Neste estudo a atividade da Gred foi avaliada espectrofotometricamente, acompanhando-se o consumo de NADPH a 340 nm.

Os resultados destes experimentos estão apresentados na figura 52. Observa-se que o MI-D não teve nenhum efeito sobre a atividade da enzima, enquanto que a S2.2 apresentou um efeito inibitório, de ~30, 70 e 78% para as concentrações de 40, 80 e 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Esperava-se que este efeito comprometesse a atividade da glutatona peroxidase, no entanto, S2.2 não afetou a atividade desta enzima (FIGURA 51). Neste caso deve-se considerar que no ensaio da Gpx é adicionado ao sistema a enzima Gred purificada cuja concentração se soma a existente no extrato, como também GSH reduzida. Se, no entanto, em cultura de células a inibição de Gred pela S2.2 for suficiente para diminuir os níveis de GSH de forma a comprometer a atividade da Gpx, seria justificado o efeito indutor do composto sobre a lipoperoxidação (FIGURAS 46 e 47).

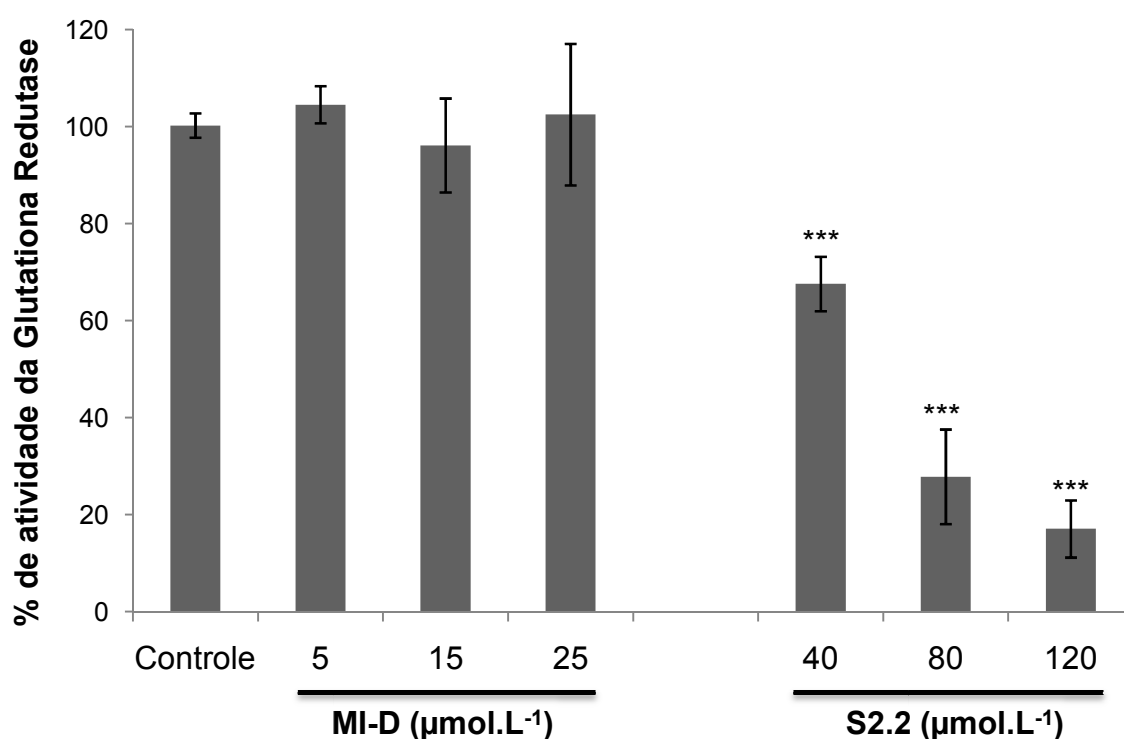


FIGURA 52. Efeito do MI-D e a S2.2 sobre a atividade da glutaciona redutase.

FONTE: O autor (2009).

NOTA: Sistema de reação: tampão fosfato (100 mmol.L^{-1} , pH 7,0), EDTA (1 mmol.L^{-1}), GSSG ($0,66 \text{ mmol.L}^{-1}$), NADPH ($0,075 \text{ mmol.L}^{-1}$) e ELC-HeLa $50 \mu\text{g}$ proteína/mL. A reação foi iniciada pela adição de GSSG e acompanhada a 340 nm durante 5 minutos. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos (item 5.8.11.4). Os valores estão expressos em porcentagem de atividade com relação ao controle e representam a média \pm dp, de três experimentos independentes em triplicata. 100% corresponde a $0,144 \mu\text{mol}$ de NADPH consumido (μg de proteína.min.) $^{-1}$, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH ($6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,001$.

7. DISCUSSÃO FINAL

Este trabalho foi motivado por estudos anteriores que demonstraram que o MI-D e a S2.2 possuem importante atividade antimelanoma em células B16-F10, modelo de melanoma murino e, particularmente o MI-D, atividade citotóxica em células de câncer humano, incluindo melanoma e carcinoma de colo do útero (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003, 2004a,b; CADENA, 1999). Concomitantemente a estes estudos, investigações sobre os efeitos dos compostos sobre a bioenergética mitocondrial, realizados pelo mesmo grupo de pesquisa (CADENA *et al.*, 1998; PRADO *et al.*, 2004), apontaram para o possível envolvimento da mitocôndria nos mecanismos de morte celular induzida pelos compostos. Em relação aos mesmos, considerando-se a ocorrência de apoptose ou necrose, demonstrou-se que tratamento de células HeLa e MEL-85 com MI-D e, o tratamento de células B16-F10 com S2.2, promoveram alterações morfológicas características de apoptose, nomeadamente: contração celular, presença de expansões globosas (blebs), condensação de cromatina e fragmentação do núcleo (CADENA, 1999; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004b; PRADO, 2005). Diante de todas estas informações, o presente estudo buscou contribuir para esclarecer qual o envolvimento da mitocôndria na ação antitumoral do MI-D e da S.2.2.

Neste estudo inicialmente foram avaliados os efeitos do MI-D e da S2.2 sobre a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), um dos mecanismos conhecidos de indução de morte celular em que a mitocôndria sofre inchamento e libera fatores proapoptóticos (KINNALLY & ANTONSSOM, 2007; KROEMER *et al.*, 2007). Os dois compostos inibiram o inchamento mitocondrial dependente da formação/abertura do PTPM, embora a S2.2 tenha sido mais efetiva nesta inibição (FIGURAS 13 e 14; 17 e 18).

A formação do PTPM é dependente da concentração de cálcio que entra eletroforicamente na mitocôndria. Tanto o MI-D quanto a S2.2, tem a capacidade de colapsar o potencial de membrana (CADENA *et al.*, 1998; PRADO *et al.*, 2004), sendo que a princípio, este efeito foi considerado o responsável pela inibição observada sobre o PTPM, uma vez que teoricamente impediria a entrada do cálcio. No entanto, os experimentos de transporte de cálcio realizados em sistema similar ao do PTPM (na presença de cálcio e fosfato), mostraram que o composto

mesoiônico diminui discretamente a captação de cálcio, o que não justificaria a inibição sobre o PTPM (FIGURA 21). Por outro lado, considerando que o PTPM também é usado para o efluxo de cátion (BERNARDI & PETRONILLI, 1996; JOUAVILLE *et al.*, 1998, GUNTER E SHEU, 2009), a diminuição dose-dependente do efluxo apresentada após a adição de vermelho de rutênio na presença de MI-D (FIGURA 22), confirma a inibição do PTPM pelo composto, mas não esclarece qual o mecanismo envolvido. No caso da S2.2 a inibição da captação de cálcio foi compatível com a inibição observada sobre o PTPM (FIGURA 23).

O MI-D foi também capaz de inibir a lipoperoxidação ferro induzida (~97% - FIGURA 25), num sistema onde os radicais promotores eram gerados pela cadeia respiratória e pela reação de Fenton ($O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$), de forma mais eficiente do que quando induzida pela adição do azocomposto AAPH (~22% - FIGURA 27). Estes resultados apontaram para a importância do efeito desacoplador do composto (CADENA *et al.*, 1998) que ao promover o aumento da velocidade da respiração mitocondrial, diminuiria o vazamento de elétrons e, conseqüentemente a formação de $O_2^{\cdot-}$ (ADAM-VIZI & CHINOPOULUS, 2006; MARAGO & KORDE, 2004; KORSHUNOV *et al.*, 1997). A importância do efeito desacoplador do MI-D foi comprovado nos experimentos subsequentes em partículas submitocondriais (PSM) acopladas (aPSM) e desacopladas (dPSM), onde observou-se as inibições de ~42 e ~7% respectivamente (figuras 29 e 30). Estes resultados confirmam que o efeito desacoplador do MI-D está diretamente relacionado à inibição da lipoperoxidação ferro induzida em PSM, mas não explica o porquê da inibição da lipoperoxidação induzida por AAPH em partículas desacopladas (~50% - FIGURA 31). Uma vez que a cadeia respiratória não estava envolvida neste efeito, uma possibilidade seria que o MI-D estivesse sequestrando radicais necessários à reação de lipoperoxidação. Na verdade, em experimento subsequente a capacidade sequestradora de radicais superóxido pelo MI-D foi comprovada. Como perspectiva futura, espera-se determinar a capacidade sequestradora do MI-D de outros radicais. Em relação a S2.2 nenhum efeito foi observado sobre a lipoperoxidação, nas condições testadas.

A capacidade do MI-D em sequestrar radicais superóxido e de inibir a lipoperoxidação, fez com que os estudos de transição de permeabilidade fossem retomados, mas utilizando-se como indutor o peróxido de hidrogênio, em substituição ao fosfato. Nestes experimentos, a inibição promovida pelo MI-D foi

mais pronunciada (~66%, FIGURAS 13 e 14) em relação a observada com fosfato (42%, FIGURAS 15 e 16) sendo ainda que o perfil de inchamento foi mais lento, e quase completamente inibido durante os primeiros dois minutos de reação. Estes resultados somados ao transporte de cálcio indicam que o MI-D pode inibir o PTPM em parte pela discreta diminuição que promove sobre a captação de cálcio (possivelmente por colapsar o potencial de membrana) e por sua capacidade de seqüestrar radicais. Porém, estes resultados não excluem outros mecanismos que devem ser investigados futuramente, através de experimentos específicos com indutores e inibidores do PTPM.

A partir destes resultados, sugere-se que os compostos induzam a morte celular por outros mecanismos, não envolvendo a formação/abertura do poro de permeabilidade mitocondrial e/ou indução de estresse oxidativo. No entanto, deve-se considerar que os modelos utilizados foram de menor complexidade (mitocôndrias isoladas, partículas submitocôndriais e lipossomas) quando comparados a células em cultivo. Devido a isto, o efeito dos compostos foi avaliado em cultura de células. Foram escolhidas células HeLa e células B16-F10 devido a observações anteriores de indução de morte nestas células por apoptose (CADENA, 1999; PRADO, 2005) causada por estes compostos. Ao contrário do esperado e considerando a inibição da lipoperoxidação promovida pelo MI-D em mitocôndrias isoladas, partículas submitocôndriais e lipossomas (FIGURAS 25, 29-31, 34-35), este mesoiônico (20 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) promoveu o aumento da produção de peróxidos (FIGURA 42) nas células HeLa. Este resultado aparentemente contraditório pode ser justificado pela diferença entre os modelos experimentais. As células possuem outros mecanismos para a produção de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente de peróxidos, que podem induzir a lipoperoxidação. Neste contexto, vários estudos relacionam a atividade da enzima NADPH oxidase com o aumento da produção de peróxidos na célula (USHIO-FUKAI & NAKAMURA, 2008; SIMIZU *et al.*, 1998; SIES, 1993). Uma hipótese a ser avaliada é se o MI-D poderia atuar estimulando esta enzima, o que por sua vez aumentaria a concentração de peróxidos. Segundo relatos da literatura, dependendo do tipo celular, o estímulo desta enzima pode levar a apoptose (LIU *et al.*, 2008; CHUNG-YI CHEN *et al.*, 2007).

A S2.2 não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a produção de peróxidos (10 a 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ – FIGURAS 44 e 45) e sobre a lipoperoxidação na

menor concentração testada ($40 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (FIGURAS 46 e 47) nas duas linhagens celulares, efeitos que estariam de acordo aos observados em mitocôndrias e em partículas submitocondriais (FIGURAS 36 e 37). Estes resultados indicam que o aumento da geração de peróxidos e a indução da lipoperoxidação não fazem parte do mecanismo inicial de ação do composto, o que não implica que estes efeitos não ocorram em maior tempo de exposição ou concentração da droga. Na verdade, em concentrações maiores a (80 e $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$ - FIGURAS 46 e 47) a S2.2 foi capaz estimular a lipoperoxidação.

Como descrito por Cadena (1999), o MI-D é capaz de induzir a morte celular em células HeLa por apoptose, como demonstrado pelo autor através de padrões morfológicos característicos e ensaio de TUNEL, que é específico para esta via de morte celular. No entanto, no presente estudo, o MI-D foi incapaz de induzir a liberação do citocromo *c* nestas mesmas células (FIGURA 48). Embora o tempo de tratamento das células tenha sido diferente nos dois estudos – no de Cadena (1999) 90 min e neste estudo 60 min – esperava-se que ocorresse a liberação do citocromo *c*, uma vez que este composto causa importantes efeitos sobre a permeabilidade da membrana mitocondrial (CADENA *et al.*, 2002). Entretanto, a não liberação do citocromo *c* é compatível com a inibição do PTPM e da lipoperoxidação. Isto não significa que o composto não induza a apoptose como descrito (CADENA, 1999), mas sugere que esta não é induzida via formação do PTPM, mas pode ocorrer, por exemplo, por efeito direto sobre as caspases. Neste contexto, Simizu *et al.* (1998) descreveram o efeito ativador de uma série de compostos antitumorais sobre a caspase-3. Naquele estudo os autores demonstraram que concomitantemente a esta inibição, ocorria o aumento dos níveis de peróxidos, mediado pela ativação da enzima NADPH oxidase. Em relação ao MI-D que induz a morte de células cancerosas por apoptose e promove o aumento dos níveis de peróxido nestas células, é imprescindível para o esclarecimento do seu mecanismo de ação, que seus efeitos sejam avaliados sobre a atividade das caspases e NADPH oxidase.

Em células B16-F10, ao contrário do observado em células HeLa, o MI-D aumentou em 80% a liberação de citocromo *c* (FIGURA 48). Porém, novamente cabe ressaltar que o composto inibe o PTPM em mitocôndrias isoladas (FIGURA 13 a 16). Estes resultados sugerem que a permeabilização da membrana mitocondrial externa esteja sendo mediada pelas proteínas proapoptóticas da família Bcl2, como

Bax/Bak (ANTONSSON, 2004; DANIAL *et al.*, 2004; ARMSTRONG, 2006; JOSEPH & HAJNOCZKY, 2007). Esta possibilidade é bastante interessante e deve ser explorada na continuação deste estudo.

Em relação a S2.2, anteriormente foi descrito por Prado (2005) que o composto induz a liberação de citocromo c em células B16-F10 e, portanto, neste estudo este ensaio foi realizado apenas com as células HeLa. Devido ao composto apresentar menor efeito sobre estas células, como observado nos ensaios de viabilidade, produção de peróxidos e lipoperoxidação (FIGURAS 40, 44 e 46, respectivamente), foi usada a concentração de $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$, observando-se um aumento de ~175% de citocromo liberado no citosol em relação ao controle (FIGURA 48). A grande quantidade de citocromo c liberado poderia ainda explicar o aumento da lipoperoxidação na presença de S2.2 (FIGURA 46). Como descrito anteriormente, esta proteína é essencial para a respiração mitocondrial e sua liberação no citosol induz o aumento na geração de ERO, devido a diminuição da velocidade da respiração mitocondrial (BOUCHIER-HAYES *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos sugerem que, nestas concentrações e tempo de tratamento, os dois compostos possivelmente induzem a morte celular, sendo as células de melanoma murino mais susceptíveis do que as de carcinoma humano.

É importante ressaltar que o MI-D e a S2.2 são compostos hidrofóbicos, podem atravessar membranas, chegando a todos os constituintes celulares, o que permitiria que estes compostos ativassem a expressão de proteínas proapoptóticas, especialmente proteínas da família Bcl2. Na verdade, no Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular da UFPR, está sendo realizada análise proteômica em células HeLa com o objetivo de verificar a influência do MI-D no nível de expressão de proteínas, o que pode auxiliar no esclarecimento desta questão.

Como outro parâmetro importante para o esclarecimento dos efeitos promovidos pelo MI-D e S2.2, os ensaios de atividade das enzimas antioxidantes mostraram que o MI-D promove o aumento da atividade da glutathiona peroxidase, enzima encarregada da redução de peróxidos. Embora este resultado possa parecer contraditório ao aumento de peróxidos observado nas células HeLa (FIGURA 42), cabe ressaltar que os ensaios da atividade enzimática foram realizados em extrato protéico de células HeLa após dois minutos de exposição ao composto. Neste caso, o composto tem acesso direto à enzima, enquanto que nos ensaios de determinação

de peróxidos foram usadas células em cultivo, onde o composto poderia se difundir pelas diferentes organelas, se ligar às membranas - uma vez que é hidrofóbico - e desta forma ter seu efeito diminuído sobre a enzima. Por outro lado, este resultado também poderia contribuir para explicar o mecanismo de inibição da lipoperoxidação em mitocôndrias isoladas, já que uma das isoformas desta enzima faz parte do mecanismo de defesa antioxidante da organela.

A S2.2 inibiu duas das enzimas estudadas, a catalase e a glutathione redutase. A catalase está envolvida na redução de peróxido de hidrogênio e a glutathione redutase na manutenção de glutathione na sua forma reduzida, que é substrato da glutathione peroxidase. A inativação da glutathione redutase poderia levar à diminuição das concentrações de GSH na célula, o que desencadearia na inibição da glutathione peroxidase, que somado ao efeito da inibição da catalase poderiam levar ao aumento do estresse oxidativo e ao aumento da lipoperoxidação. De fato, nas mesmas concentrações, a S2.2 induziu a lipoperoxidação nas células HeLa e B16-F10 (FIGURA 46)

Através do presente estudo é possível sugerir que a atividade antimelanoma do MI-D e da S2.2 apresentam em comum a liberação de citocromo c, provavelmente mediada pelas proteínas proapoptóticas da família Bcl2. Embora nas células HeLa o MI-D não tenha promovido a liberação da proteína, mecanismos envolvendo a liberação de citocromo c não podem ser descartados e experimentos em maior tempo de exposição ao composto, como os descritos por CADENA (1999), devem ser realizados.

Embora muitas informações sobre o mecanismo da ação antitumoral do MI-D e da S2.2 tenham sido obtidas através deste estudo, muito ainda resta para ser investigado. Tendo em vista a importante ação antitumoral destes compostos, acredita-se que todos os esforços devam ser feitos neste sentido.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo levam as seguintes conclusões:

- a) Em mitocôndrias isoladas o MI-D e a S2.2 inibem a formação/abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, sendo que no caso da S2.2 esta inibição pode ser decorrente da diminuição da captação de cálcio
- b) O MI-D inibe a lipoperoxidação, devido ao seu efeito desacoplador em (mitocôndrias e aPSM) e, pelo seqüestro de radicais livres em sistemas independentes da cadeia respiratória (dPSM e lipossomas de fosfatidil colina).
- c) A S2.2 não afeta significativamente a lipoperoxidação em mitocôndrias e em dPSM.
- d) O MI-D promove o aumento da produção de peróxidos em células HeLa, mas não em células B16F10, enquanto que a S2.2 não exerce efeito significativo nas concentrações testadas.
- e) O MI-D não afeta a lipoperoxidação em células HeLa e B16F10, nas concentrações testadas ($5-25 \mu\text{mol.L}^{-1}$), enquanto que a S2.2 aumenta a peroxidação lipídica em altas concentrações ($80-120 \mu\text{mol.L}^{-1}$).
- f) Os dois compostos induzem a liberação de citocromo c. Neste estudo este efeito foi demonstrado para o MI-D em células B16-F10 e para a S2.2 em células HeLa.
- g) Os compostos induzem a permeabilização da membrana mitocondrial externa, de uma forma independente da formação de poro de transição de permeabilidade.
- h) Em extrato livre de células, a S2.2 diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione redutase, enquanto o MI-D promove o aumento da atividade da glutathione peroxidase.

9. REFERENCIAS.

ABDEL-AZIZ, A. A.M. Novel and versatile methodology for synthesis of cyclic imides and evaluation of their cytotoxic, DNA binding, apoptotic inducing activities and molecular modeling study. **Eur. J Med Chem.** Paris, v. 42, p. 614-626, 2007.

ADAM-VIZI, V.; CHINOPOULOS, C. Bioenergetics and formation of mitochondrial reactive oxygen species. **TRENDS Pharmacol. Sci.** London, v. 27, p 639-45. 2006.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** San Diego, v.105, p.121-126, 1984.

ANDRICOPULO, A.D.; MULLER, L.A.; CECHINEL-FILHO, V.; CANI, G.S.; ROOS, J.F.; CORREA, R.; SANTOS, A.R.S. NUNES, R.J.; YUNES, R.A. Analgesic activity of cyclic imides: 1,8-naphthalimide and 1,4,5,8-naphthalenediimide derivatives. **II Farmaco.** v. 55, p. 319-321, 2000.

ANTONSON, B. Mitochondria and Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. **Mol Cell Biochem.** Dordrecht, v. 256/257, p. 141-154, 2004.

APPAIX, F.; MINATCHY, M.N.; RIVA-LAVIELLE, C.; OLIVARES, J. ANTONSSON, B. SAKS, V.A. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. **Biochim. Biophys Acta.** Arnsterdam, v. 1457, p. 175-181, 2000.

ARMSTRONG, J. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. **Mitochondrion.** Oxon, v. 6, p. 225-234, 2006.

BARRERA, G.; PIZZIMENTI, S.; DIANZANI, M. U. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. **Mol. Asp. Med.** Amsterdam, v. 29, p. 1-8, 2008.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers?. **Biochem Pharmacol**, Oxford, 2008. Disponível em www.sciencedirect.com

BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporine A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. **J. Biol. Chem.** Bethesda, v. 267, n. 13, p.8834-8839, 1992.

BERNARDI, P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporine A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. **Biochim. Biophys. Acta.** Amsterdam, v. 1275, p. 5-9, 1996.

BERNARDI, P.; PETRONILLI, V. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. **J. Bioenerg. Biomembr.** New York, v.28, p. 131-138, 1996.

BOUCHIER-HAYES, L.; MUÑOZ-PINEDO, C.; CONNELL, S.; GREEN, D.R. Measuring apoptosis at the single cell level. **Methods.** San Diego, v. 44, p. 222-228, 2008.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. **FEBS Lett.** Amsterdam, v. 54, p. 311-414, 1975.

BRADFORD, M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** Bethesda, v.72, p. 248-254, 1976.

BRAÑA, M. F.; CASTELLANO, J. M.; MORÁN, M.; EMLING, F.; KLUGE, M.; SCHILICK, E.; KLEBE, G.; WALKER, N. Synthesis, structure and antitumor activity of new benz[d.e.]isoquinolin-1,3-diones. **Arzneim. Forsch/Drug Res.**, Aulendorf, v. 45(12), p. 1311-1318, 1995.

BRAR, S.S.; KENNEDY, T.P.; STURROCK, A.B.; HUECKSTEADT, T.P. QUINN, M.T.; WHORTON, A.R.; HOIDAL, J.R. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** Bethesda, v. 282, p. c1212-c1224, 2002.

BUEGE, J.A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation, **Method. Enzymol.** San Diego, v. 52, p.302-310, 1978.

CADENA, S.M.S.C.; CARNIERI, E.G.S.; ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **FEBS Lett.** Amsterdam, v. 440, p. 46-50, 1998.

CADENA, S. M. S. C. **Contribuição ao conhecimento do mecanismo de ação dos compostos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos.** 169f. Tese (Doutorado em

Bioquímica) – Setor de ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná . Curitiba, 1999.

CADENA, S.M.S.C.; CARNIERI, E.G.S.; ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M.B.M. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. **Cell Biochem. Funct.** Sussex, v. 20, p. 31-37, 2002.

CARDOSO, J.C.; CADENA, S.M.S.C.; ZAMPRONIO, A.; ARRUDA, A.M.S.; CARNIERI, E.G.S.; ECHEVARRIA, A.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A. OLIVEIRA, M.B.O. Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on acute inflammatory response. **Drug Develop Res.** Hoboken, v.61, n. 4, p. 207-217, 2004.

CARTRON, P.F.; BELLOT, G.; OLIVER, L.; GRANDIER-VAZEILLE, X.; MANON, S.; VALLETTE, F.M. Bax inserts into the mitochondrial outer membrane by different mechanisms. **FEBS letters.** Amsterdam, v.582, p. 3045-3051, 2008.

CATALA, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chem. Phys. Lipids.** Ireland, v. 157, p. 1-11, 2009.

CECHINEL-FILHO, V.; QUEIROZ, E. F.; LIMA, E.O.; PINHEIRO, T.R.; NUNES, J.R.; YUNES, R. A. Síntese de *N*-alquilfenilmaleimidas e *N*-alquilarilmaleimidas com atividade antifúngica. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 19(6), p. 590, 1996.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégia para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 21(1), p. 99-105, 1998.

CECHINEL-FILHO, V.; DE CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; NUNES, J.R.; YUNES, R. A.. Aspectos Químicos e Potencial Terapêutico de Imidas Cíclicas: uma Revisão da Literatura. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26(2), p. 230-241, 2003.

CHEUNG, K. K.; ECHEVARRIA, A.; GALEMBECK, S.; MACIEL, M. A. A.; MILLER, J.; RUMJANEK, V. M.; SIMAS, A. M. Mesoionic compounds 3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4 – thiadiazolium-2-phenylamine. **Acta Crystallogr.**, Copenhagen, v. 48, p. 1471-1474, 1992.

CHUNG-YI CHENG; LIU, T.; CHEN, C.; WU, C.; CHENG, J.; YIIN, S.; SHIH, M.; WU, M. CHERN, C. Isoobtusilactone A-induced apoptosis in human hepatoma Hep G2 cells is mediated via increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species

(ROS) production and the mitochondria-associated apoptotic mechanisms. **Food. Chem. Toxicol.** Oxford, v. 45, p. 1268-1276, 2007.

COBURN, R. A.; CARAPELLOTTI, R. A. Synthesis and properties of mesoionic pyrimido 1,2-b-a1 pyridazine-2,4-diones and mesoionic pyridazino 2,3-a-a1-s-triazine-2,4-diones: mesoionic analogs structurally related fervenulin. **J. Pharm. Sci.**, Washington, DC, v. 65, n. 10, p 1505-1510, 1976.

CONSTANZA, M. E.; BERRY, D.; HENDERSON, I. C.; RATAIN, M. J.; WU, K.; SHAPIRO, C.; DUGGAN, D.; KALRA, J.; BERKOWITZ; LYSS, A. P. Amonafide: An active agent in the treatment of previously untreated advanced breast cancer – a cancer and leukemia group B study (CALGB 8642). **Clin. Cancer. Res.**, Denville, v. 1 (7), p. 699-704, 1995.

CORELL, T.; PEDERSEN, S. B.; LISSAU, B.; MOILANEN, E.; METSA-KETELA, T.; KANKAANRATA, H.; VOURENINEN, P.; VAPAATALO, H.; RYDELL, E.; ANDERSSON, R.; MARCINKIEWICZ, E.; KORBUT, R.; GRYGLEWSKI, R. J. Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. **Pol J. Pharm.** Cracow, v. 46, p 553-566, 1994.

DANIAL, N. KORSMEYER, S.J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell.** Cambridge, v. 116, p. 205-219, 2004.

DA SILVA, E. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; BRAZ, V. R.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. L.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. **Eur. J. Chem.**, Paris, v. 37, p. 979-984, 2002.

DINIS, T. C. P.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. C. Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membranes: effect on functional and biophysical properties. **Arch. Biochem. Biophys.** Orlando, v. 301, p. 256-264, 1993.

DUNKLEY, C. S.; THOMAS, C. J. Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone series as potential antitumor agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Kindlington, v. 13, p. 2899-2901, 2003.

EADE, R.; EARL, C. The sydnones. A new class of compound containing two adjacent nitrogen atoms. **J. Chem. Soc.**, London, p. 591-593, 1946.

FERREIRA, W.S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; SARAIVA, V.B.; ALISSON-SILVA, F.; MENDOÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J.O.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, E.F. Novel

1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: Chemical and biological studies. **Bioorg. Med. Chem.** Oxford, v. 16, p. 2984-2991, 2008.

FERRI, N.; BECALLI, E.M.; CONTINI, A.; CORSINI, A.; ANTONINO, M.; RADICE, T.; PRATEZI, G.; TINELLI, S.; ZUNINO, F.; GELMI, M.L. Antiproliferative effects on human tumor cells and rat aortic smooth muscular cells of 2,3-heteroarylmaleimides and heterofused. **Bioorg. Med. Chem.** Oxford, v. 16, p. 1691-1701, 2008.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** San Diego, v. 105, p. 114-120, 1984.

FRANCO, R.; SANCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E.M.; PANAYIOTIDIS, M.I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis Ménage à Trois. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** Amsterdam, in press. 2008. Disponível em www.sciencedirect.com

GLENON, R. A.; ROGERS, M. E.; SMITH, J. D.; EL-SAID, M. K. Mesoionic xanthine analogues: phosphodiesterase inhibitory and hypotensive activity. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v 24, n 6, p 658-661, 1981.

GOEHRING, R.R. GREENWOOD, T.D. NWOKOGU, G.C. PISIPATI, J.S. ROGERS, T.G. WOLFE, J. F. Synthesis and anticonvulsant activity of 2-benzylglutarimides. **J. Med. Chem.** Washington, v. 33, p. 926-931, 1990.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?. **Trends Cell Biol.** London, v.18, p. 165-173, 2008.

GRECO, C.V.; NYBERG, W. H.; CHENG, C. C. Synthesis of sydnone and sydnone imines. **J. Med. Pharm. Chem.**, Washington DC, v. 5, p. 861-865, 1962.

GREN, D.R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science.** Washington, v. 305, p. 626-629, 2004.

GRIJALBA, M. T.; VERCESI, A. E.; SCHREIER, S. Ca²⁺-Induced Increased Lipid Packing and Domain Formation in Submitochondrial Particles. A Possible Early Step in the Mechanism of Ca²⁺-Stimulated Generation of Reactive Oxygen Species by the Respiratory Chain. **Biochemistry.** Washington, v. 38, p. 13279-13287, 1999.

GRIMM, S.; BRDICZKA, D. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis*. Dordrecht, v. 12, p. 841-855, 2007

GRISHKO, V.I.; HO, R.; WILSON, G.L.; PEASALL, A.W. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**. London, v. 17, p. 107-113, 2009.

GRIVENNIKOVA, V.G.; VINOGRADOV, A.D. Generation of superoxide by the mitochondrial complex I. **Biochim. Biophys. Acta**. Amsterdam, v. 1757, p. 553-561, 2006.

GRYNBERG, N.; SANTOS, A.C.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. *Anti-Cancer Drugs*. Philadelphia, v. 8, p. 88-91, 1997.

GUNTER, T.E.; SHEU, S-S. Characteristics and Possible Functions of Mitochondrial Ca²⁺ Transport Mechanisms. **Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics**. Amsterdam, in press, 2009. Disponivel em www.sciencedirect.com

GUNTER, T. E.; PFEIFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.** Bethesda, v. 258, p.c755-C786, 1990.

GUNTER, T.E.; RESTREPO, D.; GUNTER, K.K. Conversion of esterified fura-2 and indo-1 to Ca²⁺-sensitive forms by mitochondria. **The American Physiological Society**, p. C304-C310, 1988.

HAIL, N.J.; CORTES, M.; DRAKE, E.N.; SPALLHOLZ, J.E. Cancer chemoprevention: A radical perspective. **Free Radic. Biol. Med.** New York, v. 45, p. 97-110, 2008.

HAIL, N. J. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. **Apoptosis**, Dordrecht, v 10, n. 4, p 687-705, 2005.

HALLIWELL, B.; CLEMENTE, M.V.; LONGA, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**. Amsterdam, v. 486, p. 10-13, 2000.

HANLON, M. C.; SEYBERT, D. W. The pH dependence of lipid peroxidation using water-soluble azo initiators. **Free Radic. Biol. Med.** New York, v. 23, No. 5, pp. 712-719, 1997.

HARGREAVES, M.K.; PRITCHARD, J.G.; DAVE, H.R. Cyclic carboxylic monoimides (Review). **Chem. Res.**, London, v. 70(4), p. 439-469, 1970.

HARRIS, E.J.; AL-SHAIKHALY, M.; BAUM, H. Stimulation of mitochondrial calcium ion efflux by thiol-specific reagents and by thioxine. **Biochem J.** London, v. 182, p. 455-464, 1979.

HAYES, J.D. FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** Palo alto, v. 45, p. 51-88, 2005.

HEMPEL, N.; YE. H.; ABESSI, B.; MIAN, B.; MELENDEZ, A. Altered redox status accompanies progression to metastatic human bladder cancer. **Free Radic. Biol. Med.** New York, v. 46, p. 42-50, 2009.

HIRSCH, T.; SUSIN, S.A.; MARZO, I.; MARCHETTI, P.; ZAMZANI, N.; KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. **Cell Biol. Toxicol.** Dordrecht, v.14, p. 141-145, 1998.

HUANG, X.; ZHAI, D.; HUANG, Y. Dependence of permeability transition pore opening and cytochrome c release from mitochondria on mitochondria energetic status. **Mol. Cell. Biochem.** Dordrecht, v. 224, p. 1-7, 2001.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova.** São Paulo, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

JHA, A.; MUKHERJEE, C.; ROLLE, A.J.; DE CLERQ, E.; BALZARINI, J.; STABLES, J.P. Cytostatic activity of novel 40-aminochalcone-based imides. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** Oxford, v.17, p. 4545-4550, 2007.

JIANG, Z. Y.; WOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. **FEBS Lett.** Amsterdam, v. 268, n. 1, p 69-71, 1990.

JOSEPH, S.; HAJNÓCZKY, G. IP3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca²⁺ release and beyond. **Apoptosis.** Dordrecht, v. 12, p. 951-968, 2007.

JOUAVILLE, L.S.; ICHAS, F.; MAZAT, J-P. Modulation of cell calcium signals by mitochondria. **Mol. Cell. Biochem.** Dordrecht, v. 184, p. 371-376, 1998.

KAMINSKI, K.; OBNISKA, J. Design, synthesis, and anticonvulsant activity of N-phenylamino derivatives of 3,3-dialkyl-pyrrolidine-2,5-diones and hexahydro-isoindole-1,3-diones. **Bioorg. Med. Chem.** Oxford, v. 16, p. 4921-4931, 2008.

KANKAANRANTA, H.; RYDELL, E.; PETERSSON, A. S.; HOLM, P.; MOILANEN, E.; CORELL, T.; KARUP, G.; VUORINEN, P.; PEDERSEN, S. B.; WENNMALM, A.; METSA-KETELA, T. Nitric oxide-donating properties of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives. **Br. J. Pharmacol.**, Basingstoke, v. 117, n. 3, p. 401-406, 1996.

KAURUP, G.; PREIKSCHAT, H.; WILHELMSSEN, E. S.; PEDERSEN, S. B.; MARCINKIEWICZ, E.; CIESLIK, K.; GRYGLEWSKI, R. J. Mesoionic oxatriazole derivatives a new group of NO-donors. **Pol. J. Pharmacol.**, Cracow, v. 46, p. 541-552, 1994.

KIER, L. B.; ROCHE, E. B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v 56, p 148-169, 1967.

KINALLY, K. W.; ANTONSON, B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. **Apoptosis**. Dordrecht, v 12, p 857-868, 2007.

KLESZCZYNSKI, K.; STEPNOWSKI, P.; SKALADANOWSKI, A.C. Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids. II. Disruption of mitochondrial bioenergetics. **Toxicol. Applied Pharmacology**. San Diego. 2008. Disponivel em www.sciencedirect.com

KORSHUNOV, S.S.; SKULACHEV, V. P.; STARKOV, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Lett.** Amsterdam, v. 416 , p. 15-18, 1997.

KOWALTOWSKI , A. J.; CASTILHO, R.F.; GRIJALBA, M.; BECHARA, E. J.H. VERCESI, A. E. Effect of Inorganic Phosphate Concentration on the Nature of Inner Mitochondrial Membrane Alterations Mediated by Ca²⁺ Ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol. Chem.** Bethesda, v. 271, p. 2929-2934, 1996.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS letters**, Amsterdam, v 495, p 12-15, 2001.

KROEMER, G.; PETIT, P.; ZAMZAMI, N.; VAYSSIERE, J.; MIGNOTTE, B. The biochemistry of programmed cell death. **The FASEB J.** Bethesda, v. 9, p. 1277-1287, 1995.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol. Rev.** Bethesda, v. 87, p. 99-163, 2007.

JIANG, Z. Y.; WOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. **FEBS Lett.** Amsterdam, v. 268, n. 1, p. 69-71, 1990.

JOSEPH, S.; HAJNÓCZKY, G. IP3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca²⁺ release and beyond. **Apoptosis.** Dordrecht, v. 12, p. 951-968, 2007.

JOUAVILLE, L.S.; ICHAS, F.; MAZAT, J-P. Modulation of cell calcium signals by mitochondria. **Mol. Cell. Biochem.** Dordrecht, v. 184, p. 371-376, 1998.

LAKSHMI, B.; TILAK, J. C. ; ADHIKARI, S. ; DEVASAGAYAM, T. P. A.; JANARDHANAN, K. K. Inhibition of lipid peroxidation induced by gg-radiation and AAPH in rat liver and brain mitochondria by mushrooms, **Curr. Sci. India.** Bangalore, v. 88, p. 484-488, 2005.

LALIER, L.; CARTRON, P.F.; JUIN, P.; NEDELKINA, S.; MANON, S.; BECHINGER, B.; VALLETTE, F.M. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. **Apoptosis.** Dordrecht, v.12, p. 887-896, 2007.

LEUNG, A.W.C.; HALESTRAP, A. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. **Biochim. Biophys. Acta.** Amsterdam, v. 1777, p. 946-952, 2008.

LI, T.; BRUSTOVETSKY, T.; ANTONSSON, B.; BRUSTOVETSKY, N. Oligomeric BAX induces mitochondrial permeability transition and complete cytochrome c release without oxidative stress. **Biochim. Biophys Acta.** Armstendam, v. 1777, p. 1409-1421, 2008.

LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; FILHO, J. M. B.; FILHO, L. X. Atividades antibacteriana e antifúngica de derivados mesoiônicos. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 132-136, 1986.

LIOCHEV, S.; FRIDOVICH, I. The role of O₂^{•-} in the production of HO[•] in vitro and in vivo. **Free Radic. Biol. Med.** New York, v. 16, p. 29-33, 1994.

LIU, Q.; HE, X.; LIU, Y.; DU, B.; WANG, X.; ZHANG, W.; JIA, P.; DONG, J.; MA, J.; LI, S.; ZHANG, H. NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species: A new mechanism for X-ray-induced HeLa cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** San Diego, v. 377, p. 775-779, 2008.

LOIDL, A.; SEVCSIK, E.; RIESENHUBER, G.; DEIGNER, H.P.; HERMETTER, A. Oxidized Phospholipids in Minimally Modified Low Density Lipoprotein Induce Apoptotic Signaling via Activation of Acid Sphingomyelinase in Arterial Smooth Muscle Cells. **J Biol. Chem.** Bethesda, v. 278, p. 32921-32928, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Anal. Biochem.** Bethesda, v.193, p. 265-275, 1951.

LUUKKONEN, J.; HAKULINEN, P.; MÄKI-PAKKANEN, J.; JUUTILAINEN, J.; NAARALA, J. Enhancement of chemically induced reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 872 MHz radiofrequency radiation. **Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.** Amsterdam, in press. 2008. Disponivel em www.sciencedirect.com

MACZUREK, A.; HAGER, K.; KENKLIES, M.; SHARMAN, M.; MARTINS, R.; ENGEL, J.; CARLSON, D. A.; MÜNCH, G. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. **Adv. Drug Deliv. Rev.** Amsterdam, v. 60, p. 1463-1470, 2008.

MAJID, P. A.; DeFEYETER, J. F.; VAN DER WALL, E.E.; WARDEH, R.; ROOS, J. P. Molsidomine in the treatment of patients with angina pectoris. **J. Med.**, Boston, v. 302, n. 1, p. 1-6, 1980.

MANSANI, F. P.; DINIS, T. C. P.; CARNIERI, E. G. S.; MADEIRA, V. M. C. Neutrality of amiodarone on the initiation and propagation of membrane lipid peroxidation. **Cell. Biochem. Funct.** London, v. 17, p. 131-142, 1999.

MARAGOS, W.F.; KORDE, A. S. Mitochondrial uncoupling as a potential therapeutic target in acute central nervous system injury, **J. Neurochem.** Oxon, v. 91, p.257-262, 2004.

MARTINS, O. B.; GÓMEZ-PUYOU, M. T. ; GÓMEZ-PUYOU, A. Pre-steady-state studies of the adenosine triphosphatase activity of coupled submitochondrial particles. Regulation by ADP, **Biochemistry.** Washington, v. 27, p. 7552-7558, 1988.

MAURIZ, J. L.; DURÁN, M.C.; MOLPECERES, V.; BARRIO, J.P.; MARTÍN-RENEDO, J.; CULEBRAS, J.M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; GONZÁLEZ, P. Changes in the antioxidant system by TNP-470 in an *in vivo* model of hepatocarcinoma. **Transl. Res.** New York, v. 150, p. 189-196, 2007.

McDONALD, R.C.; McDONALD, R.I.; MENCO, B. P.M.; TAKESHITA, K.; SUBBARAO, N.K.; HU, L. Small-volume extrusion apparatus for preparations of large, unilamellar vesicles. **Biochem. Biophys. Acta.** Amsterdam, v. 1061, p 297-303, 1991.

McGUIRE, S. O.; JAMES-KRACKE, M. R.; SUN, G. Y.; FRITSCHKE, K. L. An esterification protocol for cis-parinaric acid determined lipid peroxidation in immune cells. **Lipids.** Heidelberg, v. 32, n. 2, p 219-226, 1997.

MENDEZ-SANCHEZ, S.C; MARTINEZ, G.R.; ROMÃO, S.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; ROCHA, M.EM; NOLETO, G.R.; CARNIERI, E.G.S.; CADENA, S.M.S.C.; OLIVEIRA, M.B.M. The inhibition of lipoperoxidation by mesoionic compound mi-d: a relationship with its uncoupling effect and scavenging activity . **Chem-Biol. Interact.** Ireland, in press, 2008. Disponível em www.sciencedirect.com

MOCHIZUKI, T.; FURUTA, S.; MITSUSHITA, J.; SHANG, W.H.; IT, M.; YOKOO, Y.; YAMAURA, M.; ISHIZONE, S.; NAKAYAMA, J.; KONAGAI, A.; HIROSE, K.; HIYOSAWA, K; KAMATA, T. Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis. **Oncogene.** London, v. 25, p. 3699-3707, 2006.

MONTANARI, C.A.; BEEZER, A. E.; SANDALL, J. P. B.; MONTANARI, M. L. C.; MILLER, J.; GIESBRESCHT, A. M. On the interaction of some mesoionic compounds with *Saccharomyces cerevisiae* by biological microcalorimetry. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 23, p. 274-278, 1992.

MONTANARY, C.A.; AMARAL, A. T.; GIESBRECHT, A. M. Synthesis and antibacterial activity of some new 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives. **Pharmaceutical Sciences.**, Wallingford, v. 3, p. 565-568, 1997.

MORO, M.A.; ALMEIDA, A.; BOLAÑOS, J.P.; LIZASOAIN, I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. **Free Radic. Biol. Med.** New York, v. 39, p. 1291-1304, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferate and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOUSTAFA, M. A. A.; EISA, H. M. Synthesis and antimicrobial activity of 3-(substituted-phenyl)-sydnones. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 325, p. 397-401, 1991.

MOUSTAFA, M. A.; GINEINAH, M.M.; NASR, M.N.; BAYOUMI, W.A.H. Novel analogues of sydnone: Synthesis, characterization and antibacterial evaluation. **Arch. Phar. Pharm. Med. Chem**, v 337, p. 427-433, 2004.

NEWTON, C.G.; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic heterocycles. **Tetrahedron**. Oxford, v. 38, p. 2965-3011, 1982.

NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics 3**. San Diego: Elsevier Science, 2002.

NISHIMIKI M.; RAO, N. A.; YAGI, K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** San Diego, v 46, P 849-864, 1972.

NYBERG, W. H.; CHEN, C. C. 3-Piperonylsydnone. A new type of antimalarial agent. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v. 8, p. 531-533, 1965.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** Bethesda, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLLIS, W.D.; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic compounds. **Adv Heterocycl Chem**. San Diego, v. 19, p. 1-121, 1976.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**. Dordrecht, v. 12, p. 913-922, 2007.

PADMAVATHI, V.; SUDHAKAR REDDY, G.; PADMAJA, A.; KONDAIAH, P.; ALI-SHAZIA. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazoles. **Eur. J Med Chem**. Paris, in press, 2008.

PALUCHOWSKA, M.H.; BUGNO, R.; DUSZYNSKA, E.; NIKIFORUK, A.; LENDA, T.; CHOJNACKA-WOJCIK, E. The influence of modifications in imide fragment structure on 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor affinity and in vivo pharmacological properties of some new 1-(m-trifluoromethylphenyl)piperazines. **Bioorg. Med. Chem**. Oxford, v.15, p. 7116-7125, 2007.

PARKER, J.C.; GLOSSON, P.S. Interactions of sodium-protonexchange mechanism in dog red blood cells with N-phenylmaleimide. **The american physiological society**. Bethesda, p. C60-C65. 1987.

PARKER, J. C.; COLCLASURE, G.C. Actions of thiocyanate and N-phenylmaleimide on volume-responsive Na and K transport in dog red cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, Bethesda, v. 262, C418-421, 1992.

PENIN, F.; GODINOT, C.; COMTE, J.; GAUTHERON, D. D. Vesicular preparation of highly coupled ATPase-ATP synthase complex from pig heart mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**. Amsterdam, v. 679, p 198-209, 1982.

PETRONILLI, V.; COLA, C.; BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporine A-sensitive permeability transition pore. **J Biol. Chem.** Bethesda, v. 268, p. 1011-1016, 1993.

PRADO, R.S.T. **Estudo dos efeitos de imidas cíclicas sobre o metabolismo mitocondrial e atividade antimelanoma**. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PRADO, S.R.T.; CECHINEL-FILHO, V.; CORRÊA, R.; CAMPOS-BUZZI, F. CADENA, S.M.S.C. AND OLIVEIRA, M.B.M. Biological evaluation of some selected cyclic imides: mitochondrial effects and cytotoxicity *in vitro*. **Z. Naturforsch.** Tuebingen, v. 59c, p.663-672, 2004.

PULLMAN, M. E.; PENEFSKY, H. S.; DATTA, A.; RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. **J. Biol. Chem.** Bethesda, v. 235, p. 3322-3329, 1960.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; CHENC, R.; ZHANG, H.; JIU, X.; LI, Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v 37, p 195–199, 2005.

REHSE, K.; KAMPFE, M.; SCHLEIFER, K. J. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, I: 3-arylalkyl-N-nitroso-5-sydnone imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 326, p. 791-797, 1993a.

REHSE, K.; SCHLEIFER, K. J.; CIBORSKI, T.; BOHN, H. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, II: 3-arylalkyl-N-nitroso-5-sydnone imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 328, p. 137-142, 1993b.

REHSE, K.; MARTENS, A. Platelet aggregation inhibiting and anticoagulant effects of oligoamines, XXXII: Bisoxazol-, bisimidazo-, bithiazol- and oligo-1,2,4-thiadiazolimines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 326, n. 7, p. 399-404, 1993.

REHSEN, K.; KONING, P. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, XII: Mesoionic oxatriazoles and related noncyclic nitrosohydrazine derivates. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 328, n. 2, p. 137-142, 1995.

RODRIGUES, R.F.; SILVA, E.F.; ECHEVARRIA, A.; FAJARDO-BONIN, R.; AMARAL, V.F.; LEON, L.L.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M. A comparative study of mesoionic compounds in *Leishmania* sp. and toxicity evaluation. **Eur. J Med Chem.** Paris, v. 42, p. 1039-1043, 2007.

SAELENS, X.; FESTJENS, N.; VANDE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene.** London, v. 23, p. 2861-2874, 2004.

SALVI, M.; TONINELLO, A. Effects of polyamines on mitochondrial Ca^{2+} transport. **Biochim. Biophys. Acta.** Amsterdam, v. 1661, p. 113-124, 2004.

SAOTOME, M.; KATOH, H.; SATOH, H.; NAGASAKAS.; YOSHIHARA, S.; TERADA, H.; HAYASHI, H. Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca^{2+} in rat ventricular myocytes. **Am. J. Physiol Hearth Circul. Physiol.** Bethesda, v. 288, p. 1820-1828, 2005.

SATYANARAYANA, K.; RAO, M. N. A. Synthesis and antiinflammatory, analgesics and antipyretic testing of 4-[1-oxo-(3-substituted aryl)-2-propenyl]-3-phenylsydnones and of 3-[4-[3-(substituted aryl)-2-propenyl]-3-phenylsydnones and of 3-[4-[3(substituted aryl)-1-oxo-2-propenyl] phenyl] sydnones. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v. 84, p. 263-266, 1995.

SCARPA, A. Measurement of cation transport with metalochromic indications. **Methods Enzymol.** New York, v. 61, p. 301-358, 1979.

SEFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARIA, A.; SILVA, E. F.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. **Melanoma Res.** Philadelphia, 13:1-7, 2003.

SEFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARIA, A.; SILVA, E. F.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure-activity relationship study. **Anti-Cancer Drugs.** Philadelphia, v. 15, p. 269-275, 2004a.

SENEFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; FRANCO, C.R.C.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic effect of a new 1,3,4 thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **Brit J Cancer**. London, v. 91, p. 297-304, 2004(b).

SHYONG, E.Q.; LU, Y.; GOLDSTEIN, A.; LEBWOHL, M.; WEI, H. Synergistic enhancement of H₂O₂ production in human epidermoid carcinoma cells by benzo[*a*]pyrene and ultraviolet A radiation. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** San Diego, v. 188, p. 104-109, 2003.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** Oxon, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS letters**. Amsterdam, v. 103, p. 287-290, 1979.

SIMIZU, S.; TAKADA, M.; UMEZAWA, K.; IMOTO, M. Requirement of Caspase-3(-like) Protease-mediated Hydrogen Peroxide Production for Apoptosis Induced by Various Anticancer Drugs. **J Biol. Chem.** Bethesda, v. 273, p. 26900-26907, 1998.

SKLAR, L.A.; HUDSON, B.S.; PETERSEN, M.; DIAMONO, J. Conjugated polyene fatty acids on fluorescent probes: spectroscopic characterization. **Biochemistry**. Washington, DC, v. 16, p. 813-819, 1977a.

SKLAR, L.A.; HUDSON, B.S.; SIMONI, R. D. Conjugated polyene fatty acids as fluorescent probes: synthetic phospholipids membrane studies. **Biochemistry**. Washington, DC, v. 16, p. 819-828, 1977b.

SINHA ROY, S.; HAJNÓCZKY. Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. **Methods**. San Diego, v. 46, p. 213-223, 2008.

SORTINO, M.; CECHINEL-FILHO, V.; CORREA, R.; ZACCHINO, S. N-Phenyl and N-phenylalkylmaleimides acting against *Candida* spp.: Time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. **Bioorg. Med. Chem.** Oxford, v. 16, p. 560-568, 2008.

SPARAGNA, G.C.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.S.; GUNTER, T. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. **J. Biol. Chem.** Bethesda, v. 46, p. 27510-27515, 1995.

SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1366, p. 151-165, 1998.

TAKAYANAGI, R.; TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. NADH and NADPH – dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. **Biochem. J.** London, v. 192, p. 853-860, 1980.

TAZAWA, H.; FUJITA, C.; MACHIDA, K.; OSADA, H.; OHTA, Y. Involvement of cyclophilin D in mitochondrial permeability transition induction in intact cells. **Arch. Biochem. Biophys.** New York, v. 481, p. 59-64, 2009.

TELES, A.V.F.; URESHINO, R.P.; DORTA, D.J.; LOPES, G.S.; HSUB, Y.T. SMAILI, S.S. Bcl-XL inhibits Bax-induced alterations in mitochondrial respiration and calcium release. **Neurosci Lett.** Ireland, v. 442, p. 96-99, 2008.

TESORIERE, L.; CIACCIO, M.; BONGIORNO, A.; RICCIO, A.; PINTAUDI, A.; LIVREA, M. Antioxidant activity of all-trans-retinol in homogeneous solutions and in phosphatidylcholine liposomes. **Arch. Biochem. Biophys.** New York, v. 307, p 217-23, 1993.

TORRES SUÁREZ, A. I.; CAMACHO, M. A. Photolability evaluation of the new cytostatic drug mitonafide. **Arzeim. Forsch / Drug Res.**, Aulendorf, v. 44, p. 81, 1994.

TSUJINOTO, Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. **J. Cell. Physiol.** New Jersey, v 195, p. 158-167, 2003.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol.** Oxon, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

TZAGOLOFF, A. **Mitochondria**, in: Plenum Press, New York, NY, 1982.

USHIO-FUKAI, M.; NAKAMURA, Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. **Cancer Letters.** Ireland, v. 266, p. 37-52, 2008.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL. J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem-Biol. Interact.** Ireland, v. 160, p. 1-40, 2006.

VAN DE WETERING, C.I.; COLEMAN, M.C.; SPITZ, D.R.; SMITH, B.J.; KNUDSON, M. Manganese superoxide dismutase gene dosage affects chromosomal instability and tumor onset in a mouse model of T cell lymphoma. **Free Rad. Biol. Med.** New York, v. 44, p. 1677-1686, 2008.

VAY, L.; HERNANDEZ-SAN MIGUEL, E.; LOBATON, C.D.; MORENO, A.; MORENO, M.; ALVAREZ, J. Mitochondrial free $[Ca^{2+}]$ levels and the permeability transition. **Cell Calcium**. Midlothian, in press, 2008. Disponível em www.sciencedirect.com

VEAL, E.A.; DAY, A.M.; MORGAN, B.A. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. **Molecular Cell**. Cambridge, v. 26, 2007.

VOLPP, G. P.; DOUNCHIS, H. Glutarimide antibiotics. Analogs of streptimidone. **J. Med. Chem.** Washington, v. 14, p. 241-242, 1971.

VOSS, O.D.; CAMPELO A.P.; BACILA M. The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** San Diego, v.4, n.1, p. 48-51, 1961.

WEYDERT, C.J.; WAUGH, T.A. RITCHIE, J.M. IYER, K.S.; SMITH, J.L.; LI, L.; SPITZ, D.R.; OBERLEY, L.W. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. **Free Rad. Biol. Med.** New York, v. 41, p. 226-237, 2006.

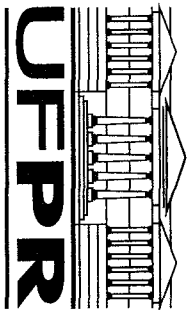
YEVICH, J. NEW, J.S. SMITH, D.W.; LOBECK, W.G.; CATT, J.D. MINIELLI, C.J.L.; EISON, M.S.; TAYLOR, D.P.; RIBLET, L.A.; TEMPLE, D.L.J. Synthesis and biological evaluation of 1-(1,2-benzisothiazol-3-yl)- and (1,2-benzisoxazol-3-yl)piperazine derivatives as potential antipsychotic agents. **J. Med. Chem.** Washington, v. 29, p. 359-369, 1986.

ZAWADOWSKI, T.; KOSSAKOWSKI, J.; RUMP, S.; JAKOWICZ, I.; PLAZNIK, A. Synthesis and anxiolytic activity of *N*-substituted cyclic imides *N*-{4-[(4-aryl)-1-piperazinyl]alkyl}-5,7-dioxabicyclo[2.2.2]octane-2,3-dicarboximide. **Acta Pol. Pharm. Drug. Res.** Warsaw, v. 52(1), p. 43-46, 1995.

ZIELONKA, J.; KALYANARAMAN, B. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis – a critical commentary. **Free Radic. Biol. Med.** New York, v. 45, p. 1217-1219, 2008.

10. ANEXOS

- Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA).
- Trabalho científico publicado resultante desta tese.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO

N.º 242

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIAN.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)":

APROVADO.

PROCESSO: 23075.026481/2007-90


RO 06/2007 - 31/07/2007

TÍTULO: Efeitos do cloroeto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaemoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) e da N-fenil-maleimida (S2.2) sobre a lipoperoxidação e a transição de permeabilidade

AUTORES: Maria Benigna Martinelli de Oliveira, Sílvia Maria Suter Correia Cadena, Stélia Carolina Méndez-Sánchez

DEPARTAMENTO: Bioquímica

Curitiba, 09 de agosto de 2007.

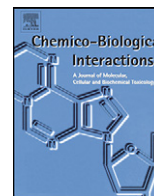

Prof.ª Ana Maria Caliman Filadelfi
Coordenadora do CEEA



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint



The inhibition of lipoperoxidation by mesoionic compound MI-D: A relationship with its uncoupling effect and scavenging activity

Stelia Carolina Mendez-Sanchez^a, Glaucia Regina Martinez^a, Silvia Romão^a, Aurea Echevarria^b, Edson Fernandes Silva^b, Maria Eliane Merlin Rocha^a, Guilhermina Rodrigues Noletto^a, Eva Gunilla Skare Carnieri^a, Silvia Maria Suter Correia Cadena^{a,*}, Maria Benigna Martinelli de Oliveira^a

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, C.P. 19046, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2008
Received in revised form
21 November 2008
Accepted 26 November 2008
Available online xxx

Keywords:

Mesoionic compound
Lipid peroxidation
Uncoupling effect
Scavenging activity

ABSTRACT

Important biological activities have been described for mesoionic compounds. We previously reported that MI-D (4-phenyl-5-(4-nitro-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride) inhibited the respiratory chain, collapsed the transmembrane potential, and stimulated ATPase activity in intact rat liver mitochondria. It is known that drugs that affect mitochondrial membrane potential may facilitate the induction of cell death by apoptosis. Mitochondria have also a central role in the generation of reactive oxygen species, therefore it would be important to investigate how MI-D could affect processes related to oxidative stress. In this work, we evaluated the effects of MI-D on the lipoperoxidation and its ability to scavenge free radicals. Interestingly, it was observed that MI-D promoted a strong inhibition of the lipoperoxidation induced by Fe³⁺-ADP/2-oxoglutarate in isolated mitochondria (95% ± 0.27 at the highest concentration of 80 nmol mg⁻¹ protein) in a dose-dependent manner. However, at the same concentration its effect was less intense (22% ± 3.46) when the lipoperoxidation was initiated by peroxy radicals generated from the azocompound AAPH. Lipid peroxidation in both coupled and uncoupled submitochondrial particles initiated with Fe²⁺/NADH was also inhibited by MI-D. The inhibition was about four times greater in coupled particles (~34% at 80 nmol mg⁻¹ protein) in relation to uncoupled. MI-D inhibited the soybean phosphatidylcholine liposomes lipoperoxidation in a dose-dependent manner (5–80 μM) regardless of the radical being generated in lipid or aqueous phase. The mesoionic compound showed ability of scavenging superoxide radical (7, 11 and 31% for 25, 38 and 80 μM, respectively). Our results strongly suggest that the inhibition of lipoperoxidation promoted by MI-D is due to its scavenger action and to its previously described uncoupling effect.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

MI-D (4-phenyl-5-(4-nitro-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride, Fig. 1) belongs to a special class of heterocyclic compounds which cannot be represented by covalent or

polar structure. This class of compounds, known as mesoionic, has regions of positive and negative charges associated with the polyheteroatomic system which enable them to interact with biomolecules such as DNA and proteins. In addition, their overall neutral character enables them to cross the biological membranes [1,2].

Several biological activities have been described for different classes of mesoionic compounds (sydnones, sydnominines and mesoionic 1,3,4-thiadiazoles), such as antiinflammatory, analgesic, antibacterial [3–5], antiplatelet, fibrinolytic, thrombolytic, broncholytic effects [6] and as anticancer agents [7–11].

In particular for MI-D, we demonstrated a range of activities similar to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), qualifying it as a potential anti-inflammatory drug. The compound inhibited the number of abdominal writhings induced by acetic acid in rats, reduced the febrile response induced by lipopolysaccharide (LPS) and the prostaglandin (PGE2) level in the cerebrospinal fluid of LPS-exposed mice [4].

Abbreviations: AAPH, α-α'-azodiisobutiramidina dihydrochloride; ABCPA, 4-cyanopentonic acid; BHT, butylhydroxytoluene; BSA, bovine serum albumin; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid; MI-D, 4-phenyl-5-(4-nitro-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride; NBT, nitroblue tetrazolium; PC, soybean phosphatidylcholine; PEP, phosphoenolpyruvate; PGE2, prostaglandin; PMS, phenazine methosulfate; ROS, reactive oxygen species; SMPs, submitochondrial particles; cSMP, coupled SMPs; uSMP, uncoupled SMPs; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

* Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1535; fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: silvia.cadena@ufpr.br (S.M.S.C. Cadena).

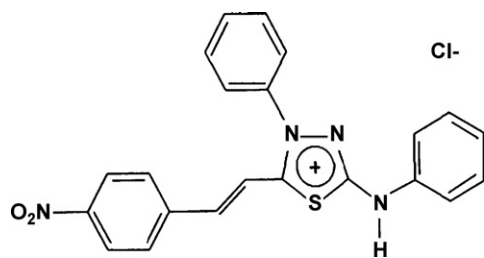


Fig. 1. Chemical structure of 4-phenyl-5-(4-nitrocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride (MI-D).

MI-D was able to enhance the survival of Ehrlich and Sarcoma 180 tumour-bearing mice [8]. In addition, experiments carried out by our laboratory evidenced an important antitumour activity against melanoma murine B16-F10. *In vitro*, the compound was cytotoxic, decreasing cell viability and proliferation and *in vivo*, it was able to inhibit tumor growth by ~85% [9,10]. In cell lines of human melanoma (MEL-85, SK-MEL, A2058 and MEWO), MI-D also decreased the viability and proliferation [11].

It is known that drugs that affect mitochondrial metabolism may facilitate the induction of cell death and overcome resistance to apoptosis in cancer cells [12,13]. The cell death by apoptosis mediated by mitochondria can occur as consequence of reactive oxygen species (ROS) production and dissipation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) [14]. In the presence of Ca^{2+} , this process can lead to mitochondrial permeability transition characterized by the opening of the permeability transition pore, which permits that apoptotic-inducing factors, such as cytochrome *c*, be released from mitochondria, promoting cell death [15,16]. We previously reported the effect of MI-D on the mitochondrial bioenergetics [17]. MI-D inhibited the respiratory chain, collapsed the transmembrane potential, and stimulated ATPase activity in intact rat liver mitochondria [17]. The interference of MI-D with both the elasticity and fluidity of the inner mitochondrial membrane was related to its effects on the energy-linked functions of mitochondria [18].

Although the pharmacological potential of MI-D has become evident, the molecular pathways involved are not well understood. In order to contribute to this understanding, we now describe the effects of MI-D on the lipid peroxidation in rat liver mitochondria, in submitochondrial particles and phosphatidylcholine vesicles, as well as its ability to scavenge radicals.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Bovine serum albumin (BSA), D-mannitol, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES), ethylene glycol-bis(β -aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ADP, ATP, soybean phosphatidylcholine (PC), nitroblue tetrazolium (NBT), phenazine methosulfate (PMS), pyruvate kinase, lactate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate (PEP) and butylhydroxytoluene (BHT) were purchased from Sigma. 4-Cyanopentonic acid (ABCPA) and α - α' -azodiisobutiramide dihydrochloride (AAPH) were purchased from Fluka. All other chemicals were of the highest commercially available purity.

MI-D 4-phenyl-5-(4-nitrocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride was synthesized by the Department of Chemistry of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil and its structure was confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and mass spectrometry [3]. For its current use, MI-D was dissolved in DMSO and then further diluted with the assay medium. Controls with DMSO were carried out in each assay.

2.2. Animals

Male Wistar rats (180–200 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Paraná (PR, Brazil). The animals were kept at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ under a 12-h light–dark cycle (lights on at 08:00), and had free access to standard laboratory food (Purina®) and tap water. All the animals were starved for 12 h before being killed by decapitation. The experiments were conducted following the recommendation of the Brazilian Law 6638, 05/11/1979 for the scientific management of animals and the procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee.

2.3. Isolation of rat liver mitochondria

For lipoperoxidation experiments, mitochondria were isolated from rat liver by differential centrifugation [19] using extraction medium consisting of 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES–KOH pH 7.2, 1 mM EGTA, and 0.1% BSA. Specifically for the preparation of submitochondrial particles, the extraction medium contained 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM Tris–HCl, pH 7.4 [20].

2.4. Preparation of submitochondrial particles (SMPs)

SMPs were prepared as described by Penin et al. [21], with minor modifications. Mitochondria isolated as described above were suspended in 20 mM potassium phosphate (pH 7.4) at protein concentration of 10 mg/mL. After 30 min at 0°C , the suspension was centrifuged at $105,000 \times g$ for 1 h. The pellet was suspended in 0.25 mM sucrose, 10 mM Tris–HCl (pH 7.4) and centrifuged at $11,500 \times g$ for 15 min. The mitoplasts (pellet) were suspended in 0.25 mM sucrose, 10 mM Tris– H_2SO_4 (pH 7.5), 1 mM ATP and 15 mM MgSO_4 . The suspension was maintained below 6°C and to obtain coupled SMPs (cSMP), it was sonicated for 3 min in 6 intervals of 30 s, at 40 W and centrifuged at $22,500 \times g$ for 10 min. Then, the supernatant was centrifuged again at $105,000 \times g$ for 75 min and the pellet (submitochondrial particles) was suspended in 0.25 mM sucrose, 10 mM Tris– H_2SO_4 , 10 mM MgSO_4 (pH 7.5) and centrifuged again in the same conditions. To obtain uncoupled SMPs (uSMP), frozen mitochondria (-169°C) were used, and they were submitted to the procedure described above. cSMP were differentiated of uSMP by ATPase activity, which was evaluated spectrophotometrically as previously described [22,23]. The enzyme was assayed at 30°C , in the presence or absence of $1 \mu\text{M}$ FCCP, using a medium consisting of 50 mM sucrose, 12 mM Tris–HCl, pH 7.4, 50 mM KCl, 0.2 mM NADH, 1.0 mM PEP, 4U pyruvate kinase, 3U lactate dehydrogenase, 3 mM ATP and $100 \mu\text{g}$ of SMPs. The concentration of NADH was estimated using the molar extinction coefficient of $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 340 nm and the results were expressed as nmol of Pi liberated per min per mg of protein, considering that 1.0 nmol of oxidized NADH corresponds to 1.0 nmol of Pi released.

2.5. Preparation of soybean phosphatidylcholine liposomes

2.5.1. Unilamellar liposomes

Unilamellar liposomes of soybean phosphatidylcholine (PC) (Sigma Chemical Co.) were prepared as described by Dinis et al. [24] with minor modifications. The lipids were dissolved in chloroform and the solvent was evaporated to dryness in a rotating evaporator under nitrogen flow at 37°C . Then, the lipid film was hydrated with 10 mM Tris–HCl (pH 7.4) in order to obtain a final lipid concentration of 5 mM. The mixture was slightly shaken in a water bath at 37°C obtaining multilamellar liposomes. Next, the preparation was filtered seven times through a polystyrene membrane (200 nm pore size) to obtain unilamellar liposomes [25].

2.5.2. Multilamellar liposomes coupled with ABCPA

Multilamellar liposomes of soybean phosphatidylcholine (PC) (Sigma Chemical Co.) were prepared as described by Tesoriere et al. [26] with modifications. Soybean phosphatidylcholine dissolved in chloroform was mixed with the inducer of free radicals of lipid phase 4-4'-azobis (4-cyanopentanoic acid). The solvent was dried with a stream of nitrogen gas, always kept in the ice bath. The film obtained was dissolved in phosphate buffer, pH 7.4, to obtain a concentration of 10 mM ABCPA and 800 μ M of phosphatidylcholine, and finally the solution was shaken in vortex for 10 min.

2.6. Determination of lipoperoxidation

2.6.1. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay

Two systems were used as inducers of lipoperoxidation. One consisting of α - α' -azodiisobutiramidine dihydrochloride, an inducer of free radicals of aqueous phase at the concentration of 10 mM and another consisting of 2 mM ADP, 0.2 mM FeCl₃ and 5 mM 2-oxoglutarate [27] which is able to induce the production of free radicals from the respiratory chain. The lipoperoxidation was carried out as described by Buege and Aust [28] in medium containing mitochondrial protein (1 mg/mL), 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM mannitol and a system inducer of free radicals. Lipid peroxidation was estimated by the absorbance of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) ($\epsilon_{535} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.6.2. Oxygen uptake

The oxidation of lipid membranes (submitochondrial particles) was followed by oxygen consumption in a 1.3-mL closed thermostatically controlled water-jacketed chamber under magnetic stirring. Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode connected to a Gilson oxygraph. The reactions occurred at 37 or 56°C being initiated with addition of the lipoperoxidation inducers.

2.7. Superoxide radical assay

The scavenging ability of superoxide radical was assessed by the method described by Nishimiki et al. [29], with some modifications. The reaction mixture consisted of 16 mM Tris-HCl, pH 8.0, 338 μ M NADH, 72 μ M NBT and 30 μ M PMS.

The reaction was followed at 560 nm for 5 min and the ability of scavenging superoxide radicals was calculated using the following equation [30]:

$$\text{scavenging effect (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs sample}}{\text{Abs control}}\right) \times 100$$

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out as analysis of variance and test of Tukey for average comparison. Mean values \pm S.D. were used; values were considered significant with $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of MI-D on lipoperoxidation in mitochondria

The effect of MI-D on lipoperoxidation in rat liver mitochondria is shown in Fig. 2. Two systems of lipoperoxidation induction were used. In the first (Fig. 2A), lipoperoxidation was induced by iron in mitochondria which were actively oxidizing substrate. In this case, the respiratory chain was responsible by production of O₂^{•-} and consequently of [•]OH by Fenton reaction [31–36]. In the second (Fig. 2B), the lipoperoxidation was initiated by alkyl radicals by the decomposition of the azocompound AAPH. In this situation,

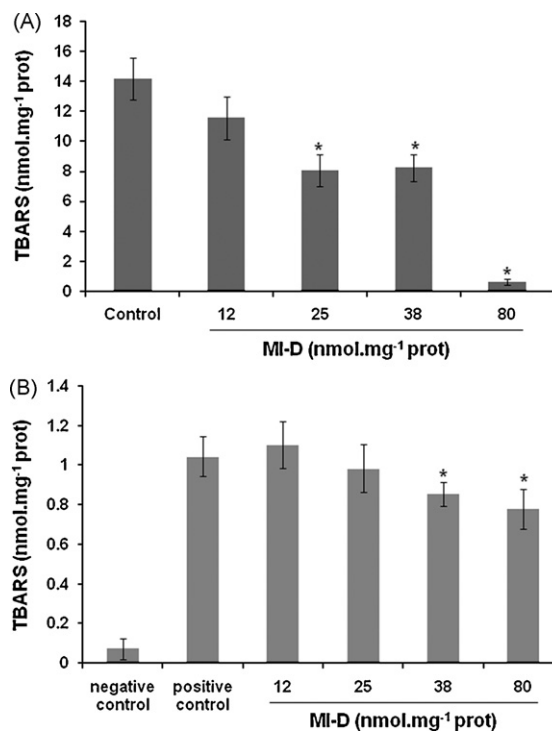


Fig. 2. Effect of MI-D on lipid peroxidation. (A) The incubation system containing 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM D-mannitol, 2 mM ADP, 0.2 mM FeCl₃ and mitochondrial protein (1 mg/mL) was kept under constant stirring, at 37 °C. The reaction was initiated by addition of 6 mM 2-oxoglutarate and was stopped with BHT (0.012%). Control refers to the experiment in the absence of MI-D and with DMSO 0.1%. (B) The incubation system containing 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM D-mannitol and mitochondrial protein (1 mg/mL) was kept under constant stirring, at 37 °C. The reaction was initiated by addition 10 mM AAPH. Positive control refers to the experiment in the absence of MI-D and with DMSO 0.1% and negative control refers to the experiment in the absence of AAPH and MI-D. For both, aliquots (0.5 mL) were taken at 45 min and mixed with TBARS reagent. Lipid peroxidation was estimated by the absorbance of TBARS ($\epsilon_{535} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Data are expressed as mean \pm S.D. ($n = 7$). *Significantly different from control ($P < 0.05$).

mitochondria were in the absence of oxidizable substrate. Independently of the source of free radicals, MI-D caused inhibition in lipoperoxidation, which was more evident in the system induced by iron in mitochondria actively oxidizing substrate. As can be observed in Fig. 2A, MI-D (25 nmol mg⁻¹ protein) inhibits ~48% the lipoperoxidation, reaching ~97% at the highest concentration of the mesoionic compound (80 nmol mg⁻¹ protein). On the other hand, the inhibition promoted by MI-D when the radicals were generated by AAPH was less intense, ~16% at 38 nmol mg⁻¹ protein and ~22% at the highest concentration (80 nmol mg⁻¹ protein). The more pronounced inhibition by MI-D on the lipoperoxidation dependent on the respiratory chain suggests that the compound could promote this effect by its uncoupling action shown in earlier work [17].

3.2. Effect of MI-D on lipoperoxidation in submitochondrial particles

To elucidate if the inhibitory effect of MI-D on lipoperoxidation dependent on the respiratory chain is related to its uncoupling effect (Fig. 2A) we carried out experiments using submitochondrial particles (SMPs). These small vesicles, which are formed by sonication of mitochondria in appropriate experimental conditions, have the proteins of the respiratory chain and ATP synthase directed to the external side. Respiration or ATP hydrolysis generate a proton-motive force, with the positive phase in the lumen of the vesicle. The advantage of this model is the possibility to adjust experimental conditions in order to obtain coupled or uncoupled

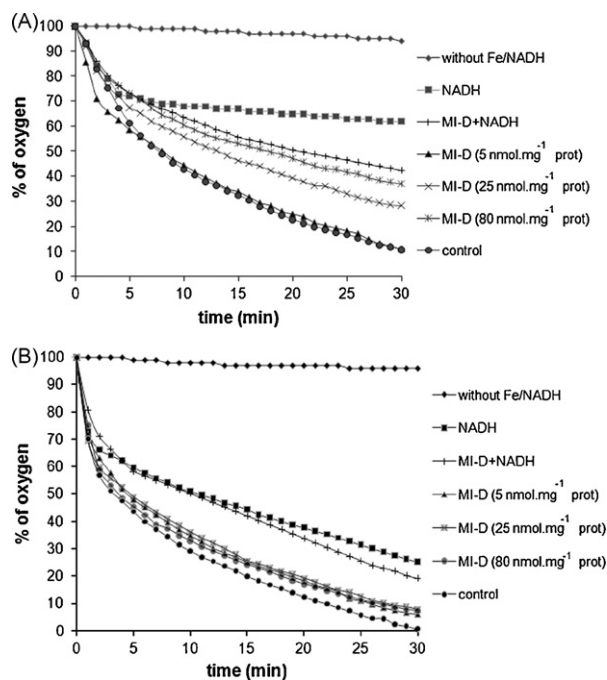


Fig. 3. Effect of MI-D on iron-dependent lipid peroxidation in submitochondrial particles (SMPs). The incubation system containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.2), KCl 125 mM and submitochondrial particles (0.5 mg) was kept under constant stirring, at 28 °C and the reaction was initiated by addition of 100 μ M NADH and 500 μ M FeSO₄. (A) Coupled (cSMP) and (B) uncoupled submitochondrial particles (uSMP) were incubated in the presence of MI-D at different concentrations. Control—absence of MI-D and with 0.1% DMSO; without Fe/NADH—SMPs in absence of FeSO₄ and NADH; NADH—SMPs in absence of FeSO₄ and with NADH; NADH plus MI-D—SMPs in absence of FeSO₄ and with NADH plus MI-D (80 nmol mg⁻¹ protein). The results are represented as the average of four experiments.

preparations. Coupled and uncoupled particles can be differentiated by their ATPase activity. As in mitochondrion, ATPase activity in coupled particle is lower than in uncoupled ones [23,37]. This property was used in our investigation to characterize the particles used in the assays. Actually, the ATPase activity in cSMP was \sim 4 times lower ($0.176 \pm 0.05 \mu$ mol of Pi released per min per mg of protein) than uSMP ($0.680 \pm 0.13 \mu$ mol of Pi released per min per mg of protein). FCCP strongly stimulated ATPase activity in cSMP (\sim 100%— $0.382 \pm 0.09 \mu$ mol of Pi released per min per mg of protein) as it would be expected. On the other hand, in uSMP, FCCP had no effect on the ATPase activity ($0.683 \pm 0.02 \mu$ mol of Pi released per min per mg of protein). It is well known that coupled particles have their ATPase activity increased in response to FCCP, while this activity does not modify in uncoupled particles, once it is already maximum [37].

The lipoperoxidation induced by Fe²⁺/NADH in SMPs was verified by oxygen consumption and the results are shown in Fig. 3. We conducted assays with coupled and uncoupled SMPs. Significant changes were not observed in oxygen consumption in the absence of Fe²⁺/NADH. As expected, the presence of NADH caused the oxygen consumption, which was lower in coupled particles (Fig. 3A). Controls with NADH plus MI-D in the highest concentration (80 nmol mg⁻¹ protein) were carried out to confirm the uncoupling effect of the mesoionic compound, which was previously described for isolated mitochondria [17]. As it would be expected, MI-D increases oxygen consumption in cSMP at \sim 35%, in 30 min of reaction. In contrast, in uSMP, it was observed only a slight increase on oxygen consumption at \sim 7%, which was not statistically significant (Fig. 3B).

In cSMP, an inhibitory effect of MI-D was evident from 25 nmol mg⁻¹ protein, when the inhibition was \sim 25%, reaching to \sim 42% at the highest concentration (80 nmol mg⁻¹ protein) in

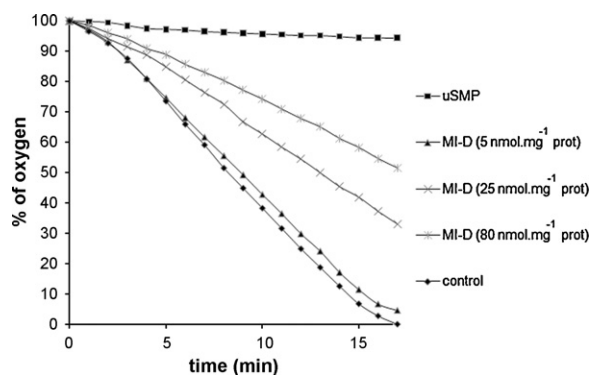


Fig. 4. Effect of MI-D on lipoperoxidation induced by AAPH in uncoupled submitochondrial particles (uSMPs). The incubation system containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.2), 125 mM KCl, 20 mM AAPH and mitochondrial protein (0.5 mg). Control—absence of MI-D and with 0.1% DMSO; uSMP—uncoupled submitochondrial particles in absence of AAPH and MI-D. The results are represented as the average of four experiments.

30 min of reaction (Fig. 3A). On the other hand, in uncoupled particles a small inhibition of \sim 7% from 25 nmol mg⁻¹ (Fig. 3B) was observed. These results are in agreement with those observed in intact mitochondria (Fig. 2A) and also confirm that the uncoupling effect of MI-D contributes to its inhibitory effect on lipoperoxidation.

To eliminate the influence of respiratory chain in generation of free radicals, we also evaluated the effect of MI-D on lipid peroxidation induced by AAPH in uncoupled SMPs (Fig. 4). As shown in Fig. 4, MI-D was also able to inhibit the lipid peroxidation by \sim 50% at 80 nmol mg⁻¹ protein. This result suggests that MI-D inhibits the lipoperoxidation not only due to its uncoupling effect but also by another mechanism, such as interacting with radicals generated in the process.

3.3. Scavenging capacity of MI-D

In order to clarify if MI-D is able to scavenge free radicals, specifically the superoxide anion, assays were carried out using nitroblue tetrazolium, in which the O₂^{•-} is generated during the reduction of NBT in presence of NADH and PMS. It can be observed in Fig. 5 that MI-D has the ability of scavenging superoxide radicals, in a dose-dependent manner.

3.4. Effect of MI-D on lipid peroxidation in liposomes of phosphatidylcholine

To elucidate if inhibition of lipoperoxidation by MI-D could be dependent on the phase where the radicals were being generated

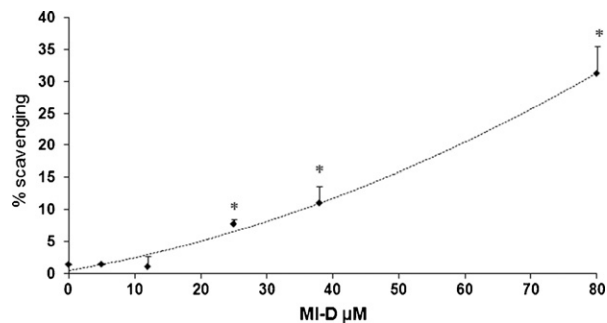


Fig. 5. Scavenging effect of MI-D on superoxide radicals production. Uncoupled submitochondrial particles were incubated in medium containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 338 μ M NADH, 72 μ M NBT and 30 μ M SMPs. The results are expressed as percentage of trapped superoxide radical with respect to control (absence of MI-D and with 0.1% DMSO). Each value represents the mean \pm S.D. of four different experiments. *Significantly different from control ($P < 0.05$).

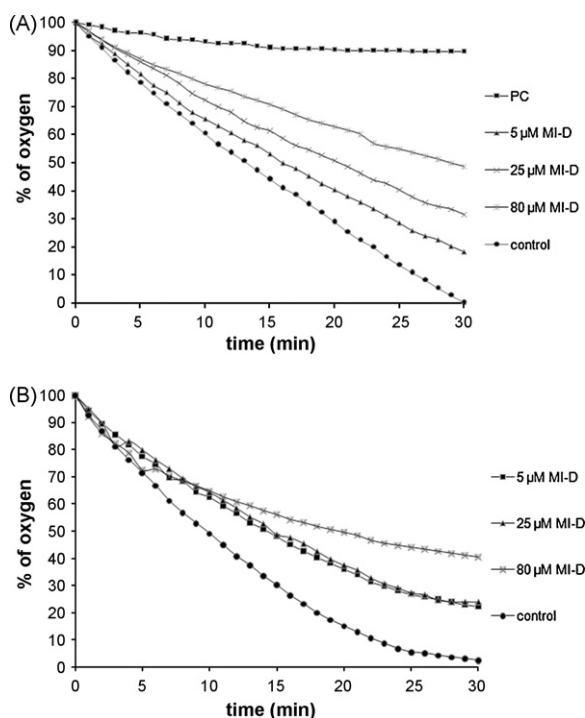


Fig. 6. Effect of MI-D on the lipoperoxidation induced by AAPH in phosphatidylcholine liposomes. (A) Reaction mixtures containing 16 mM Tris-HCl, pH 7.2, 200 μ M phosphatidylcholine and 10 mM AAPH were incubated at 37 °C in presence and absence of MI-D. PC: liposomes in the absence of AAPH. Control: liposomes in absence of MI-D and with 0.1% DMSO. (B) Reaction mixtures containing 16 mM Tris-HCl, pH 7.2, 800 μ M phosphatidylcholine and 10 mM ABCPA were incubated at 56 °C in presence of MI-D or absence of MI-D with 0.1% DMSO (control). The oxidation of lipid membranes was followed by determination of oxygen consumption using a Clark-type electrode. Each value represents the average of four different experiments.

and also to eliminate a possible interference of proteins, we evaluated the effect of MI-D on the lipid peroxidation in liposomes of phosphatidylcholine. As inducers, two azocompounds were tested, the AAPH, an inducer for aqueous phase and ABCPA, an inducer for lipidic phase, in unilamellar and multilamellar liposomes of phosphatidylcholine, respectively. These azocompounds have been routinely used to assess the ability of radical scavenging by several compounds of pharmacological interest [26,38,39]. The process was monitored by oxygen consumption (Fig. 6A and B). It was observed that MI-D inhibited lipid peroxidation, regardless of the origin of free radicals, which was dose-dependent reaching \sim 50% at the highest concentration (80 nmol mg^{-1} protein). This result reinforces the suggestion that MI-D is a scavenger of free radicals.

4. Discussion

The mesoionic compound MI-D has shown potential pharmacological activity, however, its mechanism of action is not fully known. Considering that this compound has an important antitumour activity, all efforts to clarify its biological properties are worth. In this regard, we have suggested that effects on mitochondria could be involved in its activity, probably mediating tumour cell death [10,17,18]. This hypothesis was supported by the dysfunction that MI-D promoted on the mitochondrial bioenergetics. Besides its uncoupling effect, this compound caused a strong inhibition of complexes of the respiratory chain [17]. This picture could be associated with an increase in the levels of ROS. However, the results from the current study indicate that MI-D could promote a decrease of ROS levels and processes associated, such as lipid peroxidation.

Now, our objective was to improve the knowledge about the action mechanism of MI-D in conditions of oxidative stress. We

demonstrated in this study that MI-D inhibits the lipid peroxidation probably as consequence of its uncoupling effect and scavenger action. The inhibition on lipoperoxidation by MI-D was more evident in the iron-induced systems (Figs. 2A and 3A), which were dependent on the respiratory chain. These results suggest that MI-D affects the electron transport rate due to its interaction with lipids or respiratory chain complexes of the mitochondrial membrane. This hypothesis is reinforced by our previous report which demonstrated that MI-D interacts with liposomes obtained from mitochondrial membranes, decreasing its fluidity [18]. In addition, this result is in agreement to the uncoupling effect of MI-D previously described [17]. It is well known that uncoupler agents of oxidative phosphorylation reduce the formation of ROS by accelerating the transport of electrons in the respiratory chain and as consequence lipid peroxidation is decreased [40–42].

The contribution of uncoupling effect of MI-D on inhibition of lipoperoxidation was also verified in coupled and uncoupled sub-mitochondrial particles. In agreement to that is observed in isolated mitochondria, the inhibition of lipoperoxidation in coupled particles was more pronounced (\sim 31 and \sim 41% at 25 and 80 nmol mg^{-1} protein, $P < 0.05$) when compared to uncoupled preparations (\sim 7% at 25 and 80 nmol mg^{-1} protein, $P < 0.05$), indicating that the uncoupling effect of MI-D is important but is not the only property responsible for the inhibition of lipoperoxidation. In fact, the observation that MI-D is able to scavenge superoxide radical (Fig. 5) reinforces this suggestion, and could also explain our previous results in which MI-D (15 μ M) decreased levels of $\text{O}_2^{\bullet-}$, in macrophages stimulated by phorbol ester [4]. Still in relation to a possible scavenging activity of MI-D, it is relevant to note that its scavenging percentages (7, 11 and 31% for 25, 38 and 80 μ M of MI-D, respectively) are similar to the values of inhibitions of the lipoperoxidation in mitochondria and uncoupled SMPs treated with the inducer AAPH (Fig. 2B and 4). This result suggests that MI-D could also scavenge other radicals. This possibility is under evaluation in our laboratory.

As occurred in SMPs, in liposomes of phosphatidylcholine, MI-D inhibited the lipoperoxidation in a dose-dependent manner, with the difference that the inhibition was observed already from 5 μ M MI-D (about 18% of inhibition), regardless of the phase of radical formation (Fig. 6A and B). This absence of specificity of MI-D action could be explained by its distribution in both the hydrophobic and hydrophilic phases of liposomes [18].

In conclusion, we demonstrated the inhibitory effect of MI-D on lipoperoxidation and we propose that this effect could be associated to its uncoupling effect and scavenger property. Although the experimental models used in this study are membrane systems, which do not represent the complexity of a cell, the results shown here are fundamental to clarify the biological molecular action of MI-D.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This investigation was supported by the Brazilian research funding agencies CNPq and CAPES. We wish to dedicate this paper to the late Prof. Dr. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, who was the mentor of this work.

References

- [1] K. Cheung, A. Echevarria, S. Galembeck, M.A.M. Maciel, J. Miller, V.M. Rumjanek, A.M. Simas, Mesoionic compounds. 3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-4-phenyl-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamide, *Acta Crystallogr. C* 48 (1992) 1471–1474.

- [2] D. Ollis, C.A. Ramsden, Meso-ionic compounds, *Adv. Heterocycl. Chem.* 19 (1976) 1–121.
- [3] K. Satyanarayana, M.N.A. Rao, Synthesis and antiinflammatory, analgesic and antipyretic testing of 4-[1-oxo-(3-substituted aryl)-2-propenyl]-3-phenylsydnones and 3-[4-(3-(substituted aryl)-1-oxo-2-propenyl) phenyl] sydnones, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 263–266.
- [4] J.C. Cardoso, S.M.S.C. Cadena, A. Zampronio, A.M.S. Arruda, E.G.S. Carnieri, A. Echevarria, J. Constantín, A. Bracht, M.B.M. Oliveira, Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound, MI-D, on the acute inflammatory response, *Drug Dev. Res.* 61 (2004) 207–217.
- [5] C.A. Montanari, A.E. Beezer, J.P.B. Sandall, M.C.L. Montanari, J. Miller, A.M. Giesbrecht, On the interaction of some mesoionic compounds with *Saccharomyces cerevisiae* by biological calorimetry, *Rev. Microbiol.* 23 (1992) 274–278.
- [6] T. Corell, S.B. Pedersen, B. Lissau, E. Moilanen, T. Metsä-Ketelä, H. Kankaanranta, P. Vuorinen, H. Vapaatalo, E. Rydell, R. Andersson, E. Marcinkiewicz, R. Korbut, R.J. Gryglewski, Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems, *Pol. J. Pharmacol.* 46 (1994) 553–566.
- [7] N. Grynberg, R. Gomes, T. Shinzato, A. Echevarria, J. Miller, Some new arylsydnones: effects on murine tumours, *Anticancer Res.* 12 (1992) 1025–1028.
- [8] N. Grynberg, A.C. Santos, A. Echevarria, Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class, *Anticancer Drugs* 8 (1997) 88–91.
- [9] A. Senff-Ribeiro, A. Echevarria, E.F. Silva, S.S. Veiga, M.B.M. Oliveira, Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure-activity relationship study, *Anticancer Drugs* 15 (2004) 269–275.
- [10] A. Senff-Ribeiro, A. Echevarria, E.F. Silva, S.S. Veiga, M.B.M. Oliveira, Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16F10 murine melanoma, *Melanoma Res.* 13 (2003) 465–471.
- [11] A. Senff-Ribeiro, A. Echevarria, E.F. Silva, C.R.C. Franco, S.S. Veiga, M.B.M. Oliveira, Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma, *Br. J. Cancer* 91 (2004) 297–304.
- [12] S.A. Susin, N. Zamzami, G. Kroemer, Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more, *Biochim. Biophys. Acta* 1366 (1998) 151–165.
- [13] P. Colombo, K. Gunnarsson, M. Iatrouopoulos, M. Brughera, Toxicological testing of cytotoxic drugs (review), *Int. J. Oncol.* 19 (2001) 1021–1028.
- [14] G. Kroemer, P. Petit, N. Zamzami, J. Vayssiere, B. Mignote, The biochemistry of programmed cell death, *FASEB J.* 9 (1995) 1277–1287.
- [15] J. Kowaltowski, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, Mitochondrial permeability transition and oxidative stress, *FEBS Lett.* 495 (2001) 12–15.
- [16] V. Gogvadze, B. Zhivotovsky, Alteration of mitochondrial function and cell sensitization to death, *J. Bioenerg. Biomembr.* 39 (2007) 23–30.
- [17] S.M.S.C. Cadena, E.G.S. Carnieri, A. Echevarria, M.B.M. Oliveira, Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria, *FEBS Lett.* 440 (1998) 46–50.
- [18] S.M.S.C. Cadena, E.G.S. Carnieri, A. Echevarria, M.B.M. Oliveira, Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes, *Cell Biochem. Funct.* 20 (2002) 31–37.
- [19] O.D. Voss, A.P. Campelo, M. Bacila, The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4 (1961) 48–51.
- [20] H. Low, I. Vallin, Succinate-linked diphosphopyridine nucleotide reduction in sub-mitochondrial particles, *Biochim. Biophys. Acta* 69 (1963) 361–368.
- [21] F. Penin, C. Godinot, J. Comte, D.D. Gautheron, Vesicular preparation of highly coupled ATPase-ATP synthase complex from pig heart mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 679 (1982) 198–209.
- [22] M.E. Pullman, H.S. Penefsky, A. Datta, E. Racker, Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 3322–3329.
- [23] O.B. Martins, M.T. Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, Pre-steady-state studies of the adenosine triphosphatase activity of coupled submitochondrial particles. Regulation by ADP, *Biochemistry* 27 (1988) 7552–7558.
- [24] T.C.P. Dinis, L.M. Almeida, V.M.C. Madeira, Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membranes: effect on functional and biophysical properties, *Arch. Biochem. Biophys.* 301 (1993) 256–264.
- [25] R.C. McDonald, R.I. McDonald, B.P.M. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao, L. HU, Small-volume extrusion apparatus for preparations of large, unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1061 (1991) 297–303.
- [26] L. Tesoriere, M. Ciaccio, A. Bongiorno, A. Riccio, A. Pintaudi, M. Livrea, Antioxidant activity of all-trans-retinol in homogeneous solutions and in phosphatidylcholine liposomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 307 (1993) 217–223.
- [27] R. Takayanagi, K. Takeshige, S. Minakami, NADH and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles, *Biochem. J.* 192 (1980) 853–860.
- [28] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Method Enzymol.* 52 (1978) 302–310.
- [29] M. Nishimiki, N.A. Rao, K. Yagi, The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46 (1972) 849–864.
- [30] H. Qi, Q. Zhang, T. Zhao, R. Cheng, H. Zhang, X. Jiu, Z. Li, Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro, *Int. J. Biol. Macromol.* 37 (2005) 195–199.
- [31] J.F. Turrens, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J. Physiol.* 552 (2003) 335–344.
- [32] V. Adam-Vizi, C. Chinopoulos, Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 639–645.
- [33] D.C. Luehrs, A.E. Roher, Demonstration of the fenton reaction, *J. Chem. Educ.* 84 (2007) 1290–1291.
- [34] A.S. Polla, L.L. Polla, B.S. Polla, Iron as the malignant spirit in successful ageing, *Ageing Res. Rev.* 2 (2003) 25–37.
- [35] P. Kovacic, J.D. Jacintho, Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 773–796.
- [36] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1–40.
- [37] A. Tzagoloff, *Mitochondria*, Plenum Press, New York, NY, 1982, pp. 134–146.
- [38] F.P. Mansani, T.C.P. Dini, E.G.S. Carnieri, V.M.C. Madeira, Neutrality of amiodarone on the initiation and propagation of membrane lipid peroxidation, *Cell. Biochem. Funct.* 17 (1999) 131–142.
- [39] B. Lakshmi, J.C. Tilak, S. Adhikari, T.P.A. Devasagayam, K.K. Janardhanan, Inhibition of lipid peroxidation induced by gg-radiation and AAPH in rat liver and brain mitochondria by mushrooms, *Curr. Sci. Ind.* 88 (2005) 484–488.
- [40] S.S. Korshunov, V.P. Skulachev, A.A. Starkov, High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.* 416 (1997) 15–18.
- [41] W.F. Maragos, A.S. Korde, Mitochondrial uncoupling as a potential therapeutic target in acute central nervous system injury, *J. Neurochem.* 91 (2004) 257–262.
- [42] V. Adam-Vizi, C. Chinopoulos, Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 639–645.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)