

**GUSTAVO JABOR GOZZI**

**EFEITOS DA SIDNONA SYD-1 SOBRE PARÂMETROS RELACIONADOS  
AO ESTRESSE OXIDATIVO E TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE  
MITOCONDRIAIS**

**CURITIBA  
2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**GUSTAVO JABOR GOZZI**

**EFEITOS DA SIDNONA SYD-1 SOBRE PARÂMETROS RELACIONADOS  
AO ESTRESSE OXIDATIVO E TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE  
MITOCONDRIAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Maria S. C. Cadena  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Guilhermina R. Noletto

**CURITIBA  
2010**

“Devemos julgar um homem mais pelas  
suas perguntas que pelas respostas.”

Voltaire

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a meus pais, que me deram a encantadora oportunidade de conhecer a vida, me apoiando incondicionalmente em todos os meus desejos, por mais que estes resultassem em estar longe de suas presenças acolhedoras.

À professora Silvia Maria Suter Correia Cadena, uma pessoa iluminada por Deus, que soube com abnegação compreender a humanidade nos momentos mais difíceis deste processo turbulento. Sem dúvidas, uma pessoa na qual me inspirarei para ser sempre melhor, tanto nas relações profissionais quanto pessoais. Uma orientadora dedicada, preocupada com o bem estar do próximo e comprometida com a ética que tão pouco se encontra atualmente. Só é possível dizer que conheci um ser humano raro e desejo profundamente que nossos caminhos estejam sempre próximos. Obrigado sempre professora.

A todas as professoras do grupo de oxidações biológicas, especialmente à professora Maria Eliane Merlin Rocha, a qual pude ter maior proximidade durante estes dois anos de mestrado. Obrigado por mostrar-se sempre interessada com meu trabalho, minha saúde, e minhas emoções, isto tornou-se um forte incentivo para o desempenho de minhas tarefas da melhor maneira possível.

Ao curso de pós-graduação em Ciências-Bioquímica, que me proporcionou a realização deste sonho, e especialmente a senhora Marilza Lamour, que sempre esteve dedicada em responder minhas dúvidas sobre o processo de seleção ainda por e-mail.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À professora Áurea Echevarria da UFRRJ pela síntese e fornecimento do SYD-1.

À professora Lenita Brunetto Bruniera, coordenadora do curso de farmácia onde me graduei, responsável por me apresentar a disciplina de bioquímica de forma serena e encantadora, me incentivando assim na escolha do programa de mestrado.

Aos inesquecíveis amigos da turma de mestrado e laboratório, especialmente a Juliana Silveira, Monica M. K. Marcolino e Thiago Jacomasso. A Amanda R. Andrade

pela ajuda experimental e ao Paulo R. Worfel e Jonas G. da Silva pelo sacrifício dos animais.

A Nicole Dalonso, amiga conhecida no mestrado, que nos momentos mais difíceis e alegres esteve ao meu lado, enchendo de cor os dias cinzentos e frios nesta cidade.

As minhas amigas de Londrina Ana Carolina Delchiaro e Ana Elisa S. Vercelheze, pela paciência enquanto estudava para a seleção do mestrado e pela compreensão da ausência devido ao tempo despendido neste trabalho.

E a Deus, finalmente, por me proporcionar tantas felicidades através de pessoas tão maravilhosas, me fazendo sentir especial e forte para realização de futuros sonhos.

## RESUMO

Os compostos mesoiônicos têm despertado interesse devido as suas ações antitumorais *in vivo* e *in vitro*. Alguns destes, como a sidnona SYD-1 3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato), tiveram sua atividade antitumoral relacionada a alterações que promovem na bioenergética mitocondrial, o que poderia levar a indução da via intrínseca da apoptose. Neste estudo avaliou-se o efeito do SYD-1 sobre parâmetros de estresse oxidativo relacionados as funções mitocondriais, no sentido de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na ação antitumoral do composto. Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, SYD-1 inibiu a lipoperoxidação induzida por  $\text{Fe}^{+3}/\text{ADP-oxogluturato}$ , que foi total na maior concentração analisada ( $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  de prot.). No entanto, quando a lipoperoxidação foi iniciada por radicais peroxil gerados a partir do azocomposto AAPH, a sidnona na mesma concentração, não promoveu alteração no perfil de peroxidação lipídica. Em relação aos efeitos antioxidantes, SYD-1 apresentou uma capacidade seqüestradora de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  de ~14%, enquanto que nenhuma alteração foi observada sobre as atividades da enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). No entanto, glutathiona redutase (Gred) e glutathiona peroxidase (Gpx), apresentaram reduções de suas atividades em ~47 e 66% ( $1,0\mu\text{mol}$  de SYD-1. $\text{mg}^{-1}$  de prot.), respectivamente; efeito refletido na menor oxidação de NADPH (~48%  $-1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  de prot.) durante o estresse oxidativo induzido por cálcio. Entretanto, na ausência do íon o mesoiônico promoveu o aumento da oxidação de NADPH em ~11% na mesma concentração ( $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  de prot.). Os efeitos da sidnona sobre o inchamento mitocondrial dependente da formação/abertura do PTPM também foram avaliados. SYD-1 ( $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  de prot.) inibiu a formação/abertura do PTPM induzido por  $\text{Ca}^{+2}/\text{Pi}$  em ~30%. Quando cálcio e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou cálcio e diamida foram utilizados como indutores do inchamento mitocondrial, SYD-1 reduziu o fenômeno em ~12 e 78% ( $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  de prot.) respectivamente, sugerindo a interação do composto com os componentes do PTPM. O transporte de cálcio foi analisado espectrofotometricamente na mesma condição experimental de formação/abertura do PTPM, utilizando arsenazo III. SYD-1 aumentou a captação do íon, evidenciando que a inibição da transição de permeabilidade causada pelo composto não é decorrente da diminuição da concentração de cálcio na matriz mitocondrial. Em relação à velocidade de efluxo do íon, o mesoiônico promoveu um aumento da mesma quando induzido pelo desacoplador FCCP e redução quando por vermelho de rutênio (VR). O último efeito está possivelmente associado com a ação desacopladora e inibição do PTPM por SYD-1. A partir destes resultados conclui-se que os efeitos de SYD-1 sobre a bioenergética mitocondrial e fenômenos associados a condições de estresse oxidativo são complexos. Alguns destes, como a inibição das enzimas Gred e Gpx são pró-oxidantes, enquanto outros como a atividade seqüestradora de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e a inibição da lipoperoxidação são antioxidantes. A possível ação pró-oxidante de SYD-1 justifica estudos futuros no sentido de esclarecer a ação antitumoral do composto, enquanto que os efeitos antioxidantes podem ser explorados no sentido da utilização do composto em combinação com agentes antineoplásicos já reconhecidos, que possuem como efeito adverso a promoção de estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Mesoionic compounds have attracted interest because of their antitumor action in vivo and in vitro. Some of them, such as the sydnone SYD-1 (3 - [4-chloro-3-nitrophenyl] -1,2,3-oxadiazólio-5-olate), have had its antitumor activity related to alterations on mitochondrial bioenergetics, which could induce the intrinsic pathway of apoptosis. This study evaluated the effect of SYD-1 on parameters of oxidative stress related to mitochondrial functions, in order to contribute to the elucidation of the mechanisms involved in the antitumoral activity of the compound. In rat liver mitochondria SYD-1 inhibited the lipoperoxidation induced by  $\text{Fe}^{+3}/\text{ADP-oxoglutarate}$ , which was total at the highest concentration of the compound ( $1.0\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{prot.}$ ). However, when the lipoperoxidation was initiated by peroxy radicals generated from the azocompound AAPH, the sydnone, at the same concentration, did not affect the lipoperoxidation. In relation to antioxidant effects, the mesoionic compound showed ability of scavenging superoxide radical ( $\sim 14-1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{prot.}$ ), while no changes were observed on activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). However, glutathione reductase (Gred) and glutathione peroxidase (Gpx) had their activities reduced around 47% and 66% by SYD-1 ( $1.0\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{prot.}$ ), respectively. This effect was showed in the oxidation of NADPH, which was decreased by  $\sim 48\%$  ( $1.0\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{ de prot.}$ ) during the oxidative stress induced by calcium. In the ion absence, SYD-1, at the same concentration promoted the increase of NADPH oxidation ( $\sim 11\%$ ). The effects of the sydnone on mitochondrial swelling dependent on the formation/opening of PTPM were also evaluated. SYD-1 ( $1.0\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{ prot.}$ ) inhibited the formation/opening of PTPM induced by  $\text{Ca}^{+2}/\text{Pi}$  in  $\sim 30\%$ . When calcium and  $\text{H}_2\text{O}_2$  or calcium and diamide were used as inducers of mitochondrial swelling, SYD-1 reduced the phenomenon by  $\sim 12$  and  $78\%$  ( $1.0\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{ prot.}$ ) respectively, suggesting that the compound is able to interact with components of PTPM. The calcium transport was analyzed spectrophotometrically in the same experimental condition of formation/opening of PTPM, using arsenazo III. SYD-1 increased the ion uptake, indicating that the inhibition of permeability transition promoted by the compound is not caused by decreasing of calcium in the mitochondrial matrix. Regarding to calcium efflux, the mesoionic promoted an increase of it when induced by uncoupler FCCP and their reduction when used ruthenium red (VR). The latter effect is possibly associated with uncoupling action and inhibition of PTPM by SYD-1. These results pointed that the effects of SYD-1 on mitochondrial bioenergetics and phenomena associated with oxidative stress conditions are complex. Some of these, such as the inhibition of enzymes Gred and GPX are pro-oxidants, others such as the scavenging activity of  $\text{O}_2^-$  and the inhibition of lipid peroxidation are antioxidants. The pro-oxidant action of SYD-1 justifies further studies to clarify the antitumor action of the compound, while its antioxidants effects can be explored to the use of the compound in combination with anticancer agents already known, which have as adverse effect the promotion of oxidative stress.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Controle mitocondrial do estresse oxidativo	23
FIGURA 2	Principais reações no processo de lipoperoxidação	25
FIGURA 3	Estrutura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM)	27
FIGURA 4	Vias de sinalização apoptóticas	30
FIGURA 5	Representação genérica de um composto mesoiônico	34
FIGURA 6	Representação estrutural do deidroitizona	34
FIGURA 7	Representação estrutural das sidnonas	35
FIGURA 8	Estrutura química do 3-(4-cloro-3-nitrofenil)-1,2,3-oxadiazólio-5-olato	36
FIGURA 9	Efeito do SYD-1 sobre a lipoperoxidação ferro-induzida em mitocôndrias isoladas de fígado de rato	50
FIGURA 10	Decomposição do AAPH na presença de O <sub>2</sub>	52
FIGURA 11	Efeito do SYD-1 sob a lipoperoxidação induzida por AAPH em mitocôndrias	53
FIGURA 12	Capacidade seqüestradora de radicais superóxido por SYD-1	55
FIGURA 13	Estrutura química do ácido [2-(3-hidropiridin-2-il)-4-metil-4,5 diidrotiazol-4-carboxílico (DFT)	58
FIGURA 14	Espectro de absorção de SYD-1 na presença de FeCl <sub>3</sub>	58
FIGURA 15	Efeito do SYD-1 sobre a atividade da superóxido dismutase mitocondrial	60
FIGURA 16	Capacidade seqüestradora de radicais superóxido por SYD-1	61
FIGURA 17	Influência da purificação da fração mitocondrial sobre a atividade da catalase	63
FIGURA 18	Efeito do SYD-1 sobre a atividade da catalase	64
FIGURA 19	Efeito do SYD-1 sobre a atividade da glutaciona peroxidase	65
FIGURA 20	Efeito do SYD-1 sobre a atividade da glutaciona redutase	67

FIGURA 21	Efeito do SYD-1 sobre a oxidação espontânea de nucleotídeos de piridina	70
FIGURA 22	Efeito do SYD-1 sobre a oxidação de nucleotídeos de piridina induzida por cálcio	73
FIGURA 23	Efeito do SYD-1 sobre o inchamento mitocondrial induzido por fosfato	76
FIGURA 24	Efeito do SYD-1 sobre o inchamento mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio	79
FIGURA 25	Efeito do SYD-1 sobre o inchamento mitocondrial induzido por diamida	80
FIGURA 26	Efeito do SYD-1 sobre o transporte de cálcio. Efluxo induzido por FCCP	83
FIGURA 27	Efeito do SYD-1 sobre o transporte de cálcio. Efluxo induzido por VR	84
FIGURA 28	Efeito do SYD-1 sobre o transporte de cálcio. Efluxo induzido por FCCP	85
FIGURA 29	Efeito do SYD-1 sobre o transporte de cálcio. Efluxo induzido por VR	86

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1	Reação de decomposição de $H_2O_2$ catalisada pela glutathione peroxidase-1	22
ESQUEMA 2	Reação de decomposição de hidroperóxido catalisada pela glutathione peroxidase-1	22
ESQUEMA 3	Redução de glutathione oxidada catalisada pela enzima glutathione reductase	22
ESQUEMA 4	Reação de Fenton	23
ESQUEMA 5	Conversão de hidroperóxido lipídico a radical alcóxila por $Fe^{+2}$	57
ESQUEMA 6	Conversão de hidroperóxido lipídico a radical peróxila por $Fe^{+3}$	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$	Gradiente eletroquímico de prótons
$\Delta\psi_m$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
$\Delta pH$	Diferença de pH
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albumina bovina sérica
CAT	Catalase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
CypD	Ciclofilina D
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol bis(éter 2-aminoetil)-N, N, N', N' tetracético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FCCP	Carbonilcianida p-trifluorometoxifenilhidrazona
Gpx	Glutathione peroxidase
Gred	Glutathione reductase
Grx	Glutaredoxina
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
HK-II	Hexoquinase II
HO•	Radical hidroxila
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LO•	Radical alcoxila
LOO•	Radical peroxila
LPO	Lipoperoxidação

MAC	Canais mitocondriais induzidos por apoptose
MDA	Malondialdeído
MI-D	Cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4- tiadiazólio-2-fenilamina
mRNA	RNA mensageiro
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotideo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotideo reduzida
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato oxidada
NBT	Nitroblue tetrazolium
NP	Nucleotídeo de piridina
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
PiC	Translocador de fosfato
PMS	Metasulfato de fenazina
Prx	Peroxiredoxina
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
R-OOH	Hidroperóxido lipídico
SYD-1	(3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato)
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano
Trx	Tioredoxina
TrxR	Tioredoxina redutase
UQ	Ubiquinona
UQ <sup>•-</sup>	Semiquinona
UQH <sub>2</sub>	Ubiquinol
VDAC	Canal aniônico voltagem-dependente
VR	Vermelho de rutênio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	17
2.1 BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)	17
2.1.1 Fontes de radicais livres de oxigênio na mitocôndria	18
2.1.2 Espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes mitocondriais	20
2.1.3 Radicais livres e peroxidação lipídica mitocondrial	23
2.2 MITOCÔNDRIA E MORTE CELULAR APOPTÓTICA	25
2.2.1 Transporte mitocondrial de cálcio e formação do PTPM	31
2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS	33
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	39
<b>4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b>	40
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	41
5.1 REAGENTES	41
5.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE SYD-1	41
5.3 ANIMAIS	42
5.4 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS	42
5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	43
5.5.1 Determinação do consumo de oxigênio	43
5.5.2 Determinação da lipoperoxidação mitocondrial induzida por ferro ou AAPH	44
5.5.3 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes	45
5.5.3.1 Superóxido dismutase (SOD)	45
5.5.3.2 Glutaciona peroxidase (Gpx)	45
5.5.3.3 Glutaciona redutase (Gred)	46
5.5.3.4 Catalase	46
5.5.4 Determinação do estado redox dos nucleotídeos de piridina (NP)	46
5.5.5 Análise da transição de permeabilidade mitocondrial	47

5.5.6 Análise do Transporte Mitocondrial de Cálcio	47
5.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	48
5.7 ENSAIO EM SISTEMA LIVRE DE MITOCÔNDRIAS	48
5.7.1 Determinação da capacidade seqüestradora de radicais superóxido	48
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	49
6.1 EFEITO DO SYD-1 SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO INDUZIDA POR FERRO E RADICAIS PRODUZIDOS PELA CTE	49
6.2 EFEITO DO SYD-1 SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO INDUZIDA POR AAPH	52
6.3 EFEITO DO SYD-1 SOBRE O SEQUESTRO DE RADICAIS SUPERÓXIDO	54
6.4 CAPACIDADE QUELANTE DE FERRO DO SYD-1	57
6.5 EFEITOS DE SYD-1 SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	59
6.5.1 Mn-Superóxido dismutase	59
6.5.2 Catalase	62
6.5.3 Glutationa peroxidase	64
6.5.4 Glutationa redutase	66
6.6 EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O ESTADO REDOX DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA.	69
6.7 EFEITOS DE SYD-1 SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL	74
6.8 EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE CÁLCIO	82
<b>7. DISCUSSÃO FINAL</b>	89
<b>8. CONCLUSÕES</b>	93
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	94
<b>10. ANEXO</b>	109

## 1 INTRODUÇÃO

Em 2009 as estimativas apontavam 466.730 novos casos de câncer no Brasil. Somente em 2007 a doença foi responsável por 7,6 milhões das mortes ocorridas no mundo, enquanto que em 2005 representou 13% dos 58 milhões de óbitos notificados. Estima-se que em 2020 o número de novos casos mundiais alcance a ordem de 15 milhões, sendo que 60% destes deverão ocorrer nos países em desenvolvimento (BRASIL, 2007; CHEN; HU, 2008).

A maioria dos agentes quimioterápicos empregados para o tratamento de câncer é altamente citotóxica, e por falta de seletividade em relação às células tumorais, resistência e baixo índice terapêutico, possuem uso restrito. Este fato tem direcionado pesquisas para o desenvolvimento de drogas mais efetivas e com efeitos colaterais sistêmicos reduzidos (CHEN; HU, 2008).

Alguns compostos mesoiônicos têm demonstrado ações antitumorais *in vitro* e *in vivo* por mecanismos que estariam relacionados à indução da apoptose (GRYNBERG, *et al.*, 1992; GRYNBERG; SANTOS; ECHEVARRIA, 1997; SENFF-RIBEIRO, *et al.*, 2003; SENFF-RIBEIRO, *et al.*, 2004), a qual é em alguns casos um mecanismo vantajoso para indução da morte de células tumorais (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005; RALPH; NEUZIL, 2009).

Em 1992 foi demonstrada uma pronunciada atividade antitumoral *in vivo* do composto mesoiônico SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato) contra tumores ascíticos de carcinoma de Ehrlich, sarcoma 180 e histiocitoma fibroso B10MCII, analisada pelo tempo de sobrevivência de camundongos tratados com a sidnona (GRYNBERG, *et al.*, 1992). Também foram observados efeitos citotóxicos deste composto em linhagens celulares de câncer de mama, pulmão e do sistema nervoso central (DUNKLEY; THOMAN, 2003).

Halila *et al.* (2007) demonstraram o comportamento do SYD-1 sobre as funções energéticas de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, encontrando diminuição do potencial de membrana, da velocidade respiratória no estado 3 e do inchamento, além do aumento da atividade ATPásica e da respiração no estado 4. Estudos *in vitro* sugerem que alterações na permeabilidade das membranas mitocondriais e



conseqüentemente de sua bioenergética são importantes desencadeadores da apoptose (HAIL JUNIOR; LOTAN, 2009). Neste sentido SYD-1 despertou interesse para o desenvolvimento deste trabalho, visto que crescentes estudos têm considerado a apoptose como um mecanismo de maior eficácia e seletividade para o tratamento de tumores em diferentes tecidos (HAIL JUNIOR; LOTAN, 2009).

Neste contexto o presente estudo pretende ampliar o conhecimento sobre as alterações promovidas pelo SYD-1, na bioenergética mitocondrial, em fenômenos reconhecidamente envolvidos na indução da morte celular por apoptose, particularmente sobre a transição de permeabilidade mitocondrial e estresse oxidativo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção de energia celular, suprindo variavelmente os diferentes tecidos conforme suas especialidades. A integridade de sua membrana interna torna-se imprescindível, primeiramente, ao se considerar que os complexos transportadores de elétrons estão nela internalizados (WALLACE, 2008), e em análise mais criteriosa devido ao acoplamento obrigatório entre a transferência de elétrons e a síntese de ATP (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

A energia resultante da transferência de elétrons é utilizada para o bombeamento de prótons da matriz em direção ao espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ) resultante da diferença de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) e do potencial elétrico de membrana ( $\Delta\psi_m$ ), sendo este último o maior contribuinte para sua formação (AKERMAN; WIKSTROM, 1978; NICHOLLS; FERGUSON, 2002; WILLEMSA, 2009). Os prótons retornam à matriz através do complexo  $F_1F_0$  ATP sintase, tornando possível a liberação do ATP sintetizado a partir de ADP e fosfato inorgânico em suas subunidades  $\beta$ . Em situações onde o vazamento de prótons pela membrana mitocondrial interna é mínimo, obtém-se o máximo acoplamento entre as bombas de prótons da cadeia respiratória e a fosforilação do ADP, representando uma grande eficiência mitocondrial. Quando requerido para provisão energética, o ATP sintetizado nas mitocôndrias é exportado para o citosol através do translocador denominado adenina nucleotídeo translocase (ANT) (AON, *et al.*, 2009).

Como visto, a produção de ATP através da fosforilação oxidativa é dependente do potencial de membrana mitocondrial, e por este motivo sua avaliação é um excelente indicativo da função da organela. A perda do  $\Delta\psi_m$  está entre os principais fatores que ocasionam rápida falência na função mitocondrial e celular, podendo direcionar a célula a morte (AON, *et al.*, 2009).

Sabe-se, por outro lado, que altos potenciais de membrana são acompanhados de diminuição da velocidade respiratória, aumentando o tempo em que os complexos

transportadores de elétrons permanecem reduzidos e a probabilidade de redução parcial do oxigênio, o que promove a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a geração de estresse oxidativo (KOWALTOWSKI, *et al.*, 2001). Este foi um dos mecanismos moleculares propostos para justificar os danos ocasionados na microvasculatura decorrente da hiperglicemia induzida pelo diabetes. Inicialmente, o excesso de glucose nos vasos conduz a uma superprodução de coenzimas reduzidas pelo ciclo do ácido crítico, elevando o gradiente de prótons acima de seu limiar, e conseqüentemente aumentando a produção de radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) no tecido (BROWNLEE, 2001).

A formação de EROS é um processo fisiológico natural e representa um importante mecanismo de defesa do organismo contra agentes externos, desempenhando atividades antibacterianas e antiparasitárias. As EROS também contribuem para atividades antitumorais e estão envolvidas na detoxificação de xenobióticos (SHUVAEVA, *et al.*, 2009). Entretanto, vários fatores patológicos podem desencadear um aumento transitório no potencial de membrana e aumentar a formação de EROS direcionando a célula à morte. Dentre eles incluem-se as altas concentrações de  $H_2O_2$  e glucose, a exposição a citostáticos, fungicidas e irradiação, o aumento na quantidade de lipoproteínas de baixa densidade, a estimulação de receptores de células imunes e o aumento de cálcio citosólico. Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a hiperpolarização decorrente destes fatores, como a disfunção da  $F_1F_0$  ATP sintase; o inadequado suprimento de ADP, limitando a reentrada de prótons pela ATP sintase; o aumento do suprimento de NADH e a alcalinização do meio intracelular (KADENBACH, *et al.*, 2009).

### 2.1.1 Fontes de radicais livres de oxigênio na mitocôndria

Devido ao vazamento de elétrons da cadeia respiratória, as mitocôndrias são consideradas as principais fontes de  $O_2^{\bullet-}$  nas células (HERMES-LIMA, 2004). A CTE consiste em quatro complexos protéicos multiméricos localizados na membrana mitocondrial interna, além do citocromo *c* e um pequeno carreador de elétrons, a coenzima  $Q_{10}$ , ou ubiquinona (UQ) (MANCUSO, *et al.*, 2009). O complexo I (NADH-

UQ oxirredutase) catalisa a transferência de dois elétrons de NADH para ubiquinona, numa reação associada à translocação de prótons através da membrana interna. Os elétrons são transferidos, posteriormente, do ubiquinol (forma reduzida da ubiquinona) para o citocromo *c* através do complexo III (UQ-Citocromo *c* oxirredutase), e finalmente o citocromo *c* reduz o oxigênio formando duas moléculas de H<sub>2</sub>O, numa reação que envolve 4 elétrons catalisada pelo citocromo *c* oxidase (complexo IV). O complexo II (succinato desidrogenase) reduz ubiquinona através da transferência de elétrons do FADH<sub>2</sub> sem envolver bombeamento de prótons (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

A formação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pelo complexo I é favorecida quando a razão NADH/NAD<sup>+</sup> está aumentada, visto que o fenômeno decorre da reação entre o oxigênio e o elétron entregue por NADH ao grupo prostético flavina mononucleotídeo contido neste transportador. Portanto, em condições onde há inibição da cadeia respiratória por dano, mutação, isquemia ou perda de citocromo *c*, ou ainda exacerbada produção de NADH, devido à baixa demanda de ATP, a razão NADH/NAD<sup>+</sup> estará aumentada, conduzindo a formação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (MURPHY, 2009).

O complexo III também é uma fonte bem documentada de formação de EROS. Este complexo recebe elétrons do ubiquinol (UQH<sub>2</sub>) e os transfere ao citocromo *c* por um complexo conjunto de reações denominado ciclo Q. Neste processo, UQH<sub>2</sub> transfere 1 elétron à proteína Rieske, que seguidamente reduz o citocromo *c*. Como resultado UQH<sub>2</sub> é parcialmente oxidado, formando um intermediário radicalar semiquinona (UQ<sup>•-</sup>) no lado Q<sub>p</sub> do complexo (superfície voltada para membrana externa). Este radical transfere seu segundo elétron para grupos heme, que o transferem para uma UQ ligada no lado Q<sub>n</sub> (voltado para matriz), onde passa a forma radicalar UQ<sup>•-</sup>. Num segundo ciclo, quando a UQ<sup>•-</sup> for formada no lado Q<sub>p</sub> do transportador, seu elétron será utilizado para reduzir o radical formado no ciclo anterior (sítio Q<sub>n</sub>). O resultado destas reações é que UQ<sup>•-</sup> é formada em ambos os sítios do complexo III, e o par altamente redutor UQ<sup>•-</sup>/UQ pode facilmente formar O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (NICHOLLS; FERGUSON, 2002; KADENBACH, 2009; KOWALTOWSKI, 2009; LISA, *et al.* 2009).

O Citocromo *c* oxidase (complexo IV) é o componente terminal da CTE, sendo sua função reduzir uma molécula de O<sub>2</sub> a duas de H<sub>2</sub>O por meio de quatro reações de redução eletrônica (NICHOLLS; FERGUSON, 2002; KOWALTOWSKI, 2009; KADENBACH, 2009; LISA, *et al.* 2009). Apesar de intermediários reativos serem produzidos dentro deste complexo enzimático, a liberação destas espécies para o meio não é relatada. O citocromo *c*, doador de elétrons para o citocromo *c* oxidase, também não é uma fonte documentada de EROS. Ao contrário, algumas evidências experimentais indicam que este complexo protéico pode atuar como um antioxidante mitocondrial, promovendo a oxidação do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) a oxigênio (NICHOLLS; FERGUSON, 2002; KOWALTOWSKI, 2009).

### 2.1.2 Espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes mitocondriais

Embora a mitocôndria seja exposta constantemente a EROS, a organela mantém suas funções devido à existência de um sistema de defesa antioxidante eficiente, que previne os danos decorrentes do metabolismo aeróbio (MARÍ, *et al.*, 2009). Um desbalanço entre a produção de ROS e os sistemas de defesa conduz ao estresse oxidativo, condição associada a um grande número de eventos fisiológicos e patológicos (SANTIAGO, *et al.*, 2008). Neste contexto sabe-se que o estresse oxidativo pode ocorrer como consequência do aumento total de EROS, da depressão dos sistemas antioxidantes, ou de ambos (ROBERTS; SINDHU, 2009)

O radical superóxido pode ainda sofrer ação de uma enzima antioxidante mitocondrial, a Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD), formando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estudos em células superexpressando Mn-SOD demonstram que o acúmulo intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, devido ao desbalanço entre a sua formação e remoção pela catalase - que decompõe o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> -, resulta em aumento nos níveis de mRNA da enzima metaloprotease-1, responsável pelo remodelamento do citoesqueleto de tecidos danificados (MARÍ, *et al.*, 2009).

Em mamíferos existem três formas de SOD: CuZn-SOD ou SOD1, localizada no citoplasma, espaço intermembranas mitocondrial e núcleo; Mn-SOD ou SOD2, localizada na matriz mitocondrial; e SOD3, encontrada na membrana plasmática e

fluidos extracelulares (FAILLI, *et al.* 2009). Estruturalmente SOD1 é um homodímero, contendo cobre e zinco em seus centros reativos. SOD2 apresenta-se na forma de tetrâmero, como SOD3, e contém magnésio no centro reativo. SOD3, assim como SOD1, possui cobre e zinco em seus centros reativos. A reação catalisada pelas três enzimas envolve um ciclo catalítico com duas meias-reações: uma onde o substrato é oxidado a dióxigênio, e a segunda envolvendo a redução do superóxido a  $H_2O_2$  (VIVES-BAUSA; STARKOV; GARCIA-ARUMI, 2007; MIAO; CLAIR, 2009).

Estudos envolvendo pelo menos três modelos de sistemas diferentes têm demonstrado que Mn-SOD é absolutamente essencial para sobrevivência de organismos na atmosfera terrestre. Foi observado que células de *E. coli* B crescidas sobre 100% de oxigênio expressaram altos níveis de Mn-SOD, sendo mais resistentes a toxicidade do oxigênio em altas pressões quando comparado a células crescidas em condições atmosféricas normais (HOLLEY, *et al.*, 2009).

Em particular, a expressão alterada de Mn-SOD, quando comparada a células normais, tem sido reportada em várias formas de câncer, incluindo o gástrico, o esofágico e o pulmonar. Em linhagens de câncer de mama não-agressivo (MCF-7) e agressivos (BT-549 e 11-9-14) foi observado um aumento na expressão e atividade da Mn-SOD quando comparado a linhagens de células epiteliais de mama não-tumorigênicas (MCF-12A e MCF-12F).

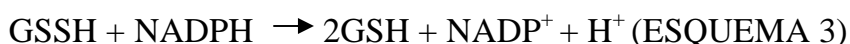
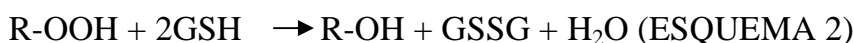
Peroxidases como a catalase e glutathiona peroxidase atuam para decompor o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  ou  $H_2O$ , respectivamente, evitando a formação de radical hidroxila na presença de metais de transição. Em tecidos murinos a atividade da catalase é maior no fígado, seguida por rins, pulmões, coração e cérebro, sendo de grande importância sua presença nas mitocôndrias (SANTIAGO, *et al.*, 2008).

A catalase tem sido implicada como um importante fator na prevenção da apoptose, e quando sua atividade está diminuída representa um estímulo para a mutagênese e desenvolvimento de vários tumores (ALFONSO-PRIETO, *et al.*, 2009).

Atualmente cinco isoenzimas de glutathiona peroxidase (Gpx-1 – Gpx-5) são conhecidas, exibindo diferentes perfis de expressão conforme o tecido e especificidade variável ao substrato. Exceto para Gpx-3, secretada no plasma, todas Gpx são

localizadas intracelularmente, enquanto na mitocôndria estão presentes Gpx-1 e Gpx-4 (SCHNEIDER, *et al.*, 2009; STEINBRENNER; SIES, 2009).

A reação catalisada pela Gpx-1 está demonstrada no esquema 1 e 2, onde a enzima utiliza glutatona reduzida (GSH) como fonte de elétrons para reduzir  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  ou hidroperóxidos (R-OOH) a seus alcoóis correspondentes (R-OH). Neste sistema, a enzima glutatona redutase (Gred) restaura a glutatona oxidada (GSSG) utilizando NADPH como equivalente redutor, como mostrado no esquema 3. A Gpx-4 reduz somente hidroperóxidos lipídicos (ALEXEYEV, 2009; SCHNEIDER, *et al.*, 2009; STEINBRENNER; SIES, 2009).



O sistema tioredoxina, o qual inclui a proteína tioredoxina 2 (Trx) e a enzima tioredoxina redutase (TrxR), também contribui para remoção de hidroperóxidos e manutenção de proteínas tiólicas nas mitocôndrias. Quando reduzida, Trx-2 doa elétrons para redução de dissulfetos em um grande número de proteínas na organela, e sua restauração é realizada pela TrxR, que utiliza como equivalente redutor a coenzima NADPH. Junto a este sistema estão as peroxiredoxinas III (Prxs), que em reações conjuntas a Trx-2 catalisam a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e hidroperóxidos lipídicos (RIBEIRO, *et al.*, 2005; MARÍ, *et al.*, 2009).

A glutaredoxina 2, que contém um dissulfeto redox ativo e um sítio de ligação para GSH, participa da defesa antioxidante mitocondrial reduzindo proteínas tiólicas oxidadas como o sistema tioredoxina (RIBEIRO, *et al.*, 2005). Na figura 1 estão resumidos os sistemas antioxidantes mitocondriais de forma integrada.

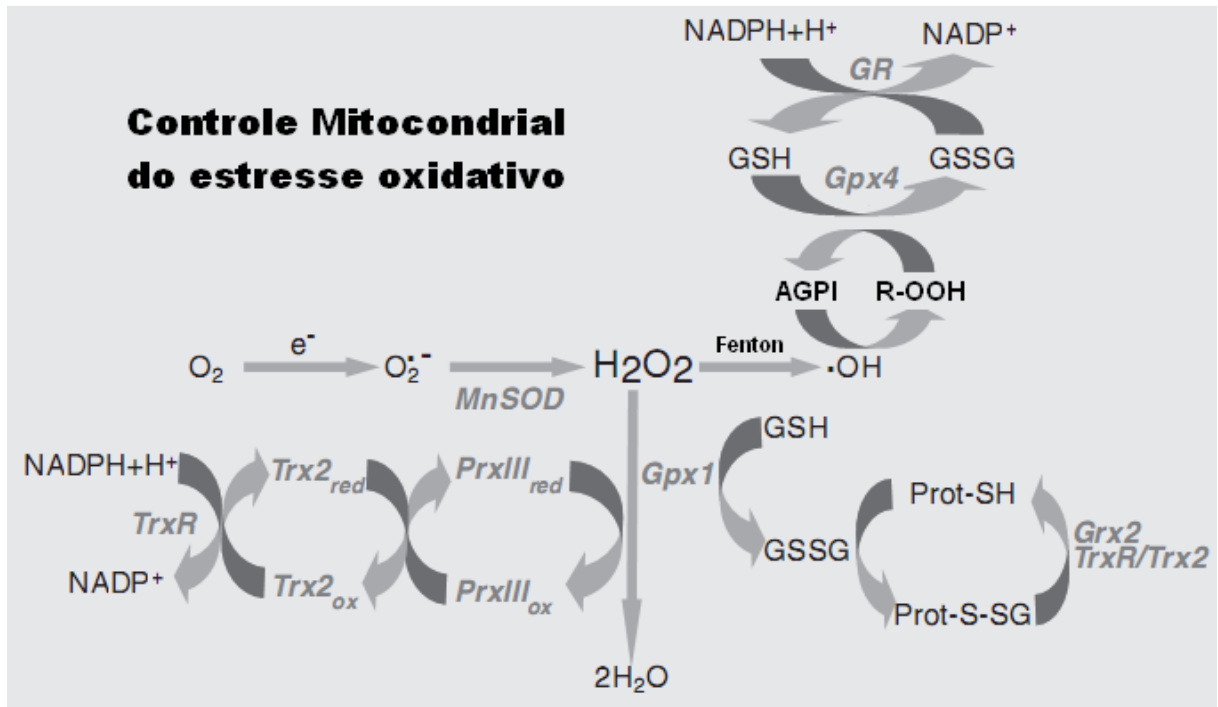


FIGURA 1. Controle mitocondrial do estresse oxidativo.

Fonte: Adaptado de MARÍ, *et al.*, (2009)

NOTA:  $O_2^{\bullet-}$ , radical superóxido;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrogênio,  $\cdot OH$ , radical hidroxila, MnSOD, Mn-Superóxido dismutase; R-OOH, hidroperóxido lipídico; Gpx, glutatona peroxidase, GSH, glutatona reduzida; GSSH, glutatona oxidada; GR, glutatona redutase; Prx, peroxiredoxina; Trx, tioredoxina; TrxR, tioredoxina redutase; Prot-SH, proteína tiólica reduzida; Prot-S-SG, proteína tiólica oxidada; Grx, glutaredoxina; AGPI, ácido graxo poliinsaturado.

### 2.1.3 Radicais livres e peroxidação lipídica mitocondrial

Embora o  $O_2^{\bullet-}$  reaja fracamente com biomoléculas como lipídios, DNA e proteínas, sua reação com  $Fe^{+3}$  livre produz um intermediário perferril (HERMES-LIMA, 2004; SALVADOR; HENRIQUES, 2004) capaz de oxidar ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) de membranas. O  $H_2O_2$ , apesar da baixa capacidade oxidante, pode difundir-se ao citosol e/ou produzir na presença de  $Fe^{+2}$  ou  $Cu^+$ , através da reação de Fenton (ESQUEMA 4), uma espécie radicalar bastante reativa; os radicais hidroxila ( $HO\cdot$ ) (HERMES-LIMA, 2004; MARÍ, *et al.*, 2009). Tanto peroxil quanto  $HO\cdot$  podem induzir a peroxidação lipídica nas mitocôndrias e nas células, sendo este um importante processo envolvido na injúria e morte celular (HERMES-LIMA, 2004).





A lipoperoxidação (LPO) pode ser dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação. Na primeira um átomo de hidrogênio é abstraído de um grupo metileno do AGPI pela espécie oxidante, formando um radical de carbono estabilizado por um rearranjo molecular a dieno conjugado. Seguidamente, este radical de AGPI reage com  $O_2$  produzindo um radical peroxila, responsável pela ampliação da LPO na segunda fase do processo, a propagação. Neste momento o radical formado reage com um grupo metileno de outra molécula de AGPI não oxidada, produzindo um radical de carbono na molécula atacada, podendo reiniciar o processo lipoperoxidativo. A reação entre o radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído origina um hidroperóxido lipídico (HERMES-LIMA, 2004; LIMA; ABDALLA, 2001), que na presença de  $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$  pode produzir radicais alcóxila e peroxila, respectivamente, alimentando a fase de propagação (FIGURA 2). Peróxidos cíclicos também podem ser formados quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a LPO (LIMA; ABDALLA, 2001). A terminação do processo acontece quando dois radicais lipídicos reagem entre si, ou um antioxidante estabiliza o radical peroxila formado no lipídio. Os hidroperóxidos, quando na ausência de ferro, são decompostos à aldeídos, alcanos e isoprostanos (HERMES-LIMA, 2004).

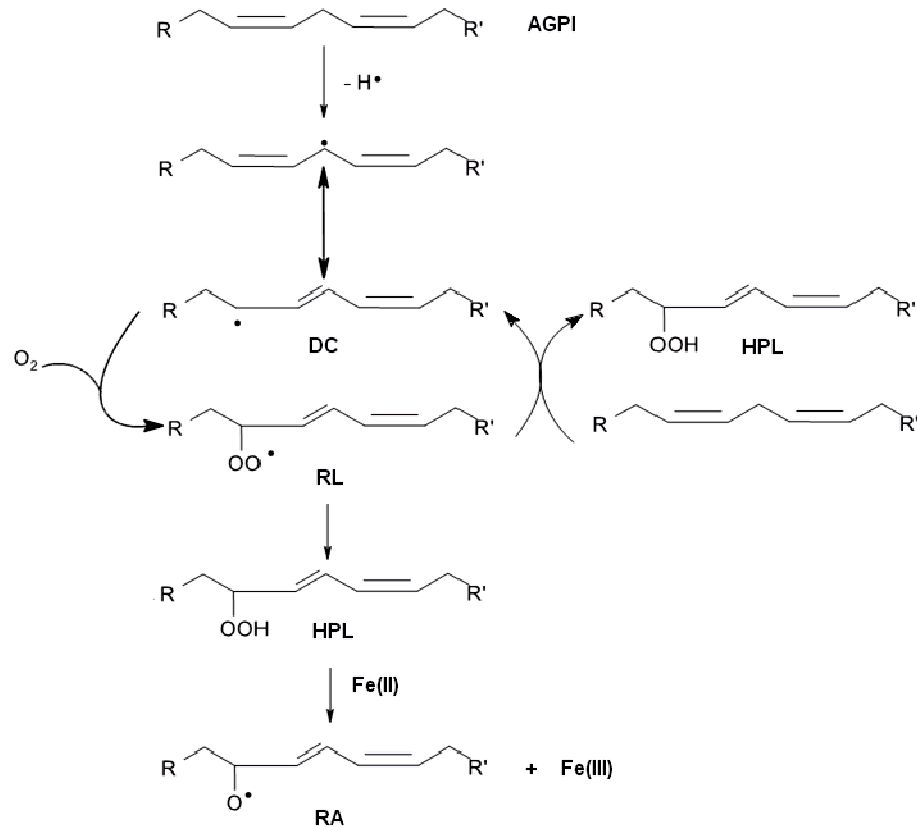


Figura 2. Principais reações no processo de lipoperoxidação.

FONTE: Modificado de LIMA E ABDALLA (2001)

NOTA: AGPI, ácido graxo poliinsaturado; DC, dieno conjugado; RL, radical peroxila; HPL, hidroperóxido lipídico; RA, radical alcoxila.

O malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2(E)-nonenal são os principais produtos carbonílicos originários da decomposição de hidroperóxidos de AGPI. Esses compostos são capazes de difundir-se através das células, ocasionando danos e interferindo em suas funções metabólicas. Eles podem, por exemplo, ligarem-se aos grupos nucleofílicos de aminoácidos, desestabilizando estruturas tridimensionais de proteínas, o que resulta em potente efeito inibitório sobre enzimas (SANTOS, 2006).

## 2.2 MITOCÔNDRIA E MORTE CELULAR APOPTÓTICA

Após os fenômenos desencadeantes da transformação maligna, o processo resultante que caracteriza o desenvolvimento do câncer é a desbalanço do equilíbrio normal entre a proliferação e a morte celular (FULDA, 2009). A apoptose promove a

homeostase dos tecidos ativando a morte celular de maneira altamente ordenada (TONISSEN; TRAPANI, 2009), porém quando desregulada pode implicar no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e até mesmo câncer (JOURDAIN; MARTINOU, 2009).

A apoptose pode ser ativada por um grande número de estímulos originados fora ou dentro das células (FULDA, 2009). Classicamente é dividida em duas principais vias; a extrínseca, a qual é mediada pela interação entre ligantes a receptores de morte Fas, um membro da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral; e a intrínseca (mitocondrial), onde o evento chave para sua ativação é a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MME) (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005; CAROPPI, *et al.*, 2009; FULDA, 2009; JOURDAIN; MARTINOU, 2009; TONISSEN; TRAPANI, 2009).

Diferentes modelos têm sido propostos para explicar a permeabilização da MME, dentre eles os melhores descritos são o poro de transição de permeabilidade (PTPM) e os canais mitocondriais induzidos por apoptose, conhecidos por MAC (CAROPPI, *et al.*, 2009).

A composição do PTPM é altamente discutida, porém a maioria dos pesquisadores sugerem a participação do canal aniônico voltagem-dependente (VDAC), do translocador de adenina nucleotídeo (ANT) e da ciclofilina D (CypD) como constituintes do poro (LEUNG; HALESTRAP, 2008; MUKHERJEE, *et al.*, 2008; YUAN, *et al.*, 2008; JAVADOV; KARMAZYN; ESCOBALES, 2009; KUMARSWAMY; CHANDNA, 2009; MARTIN, 2010). Outras proteínas também têm sido pesquisadas quanto a seus papéis reguladores ou estruturais do PTPM, merecendo destaque a hexoquinase II (HK-II) e o translocador de fosfato (PiC) (LEUNG; HALESTRAP, 2008; KUMARSWAMY; CHANDNA, 2009; MARTIN, 2010) (FIGURA 3). Normalmente estas proteínas desempenham outras funções nas mitocôndrias, e quando sofrem alterações no estado de oxidação, frequentemente ocasionadas pelo estresse oxidativo, modificam suas conformações resultando na formação/abertura do poro (KROEMER *et al.*, 2007; KOWALTOWSKI, 2009).

Ligações cruzadas entre grupos tiólicos parecem ser essenciais para estas mudanças conformacionais (KOWALTOWSKI, 2009), fenômeno este que pode ser

evidenciado através da indução do PTPM como o uso de mersalil e diamida, reconhecidos por interferir no estado redox de grupos tiólicos (ZORATTI; SZABÒ, 1995).

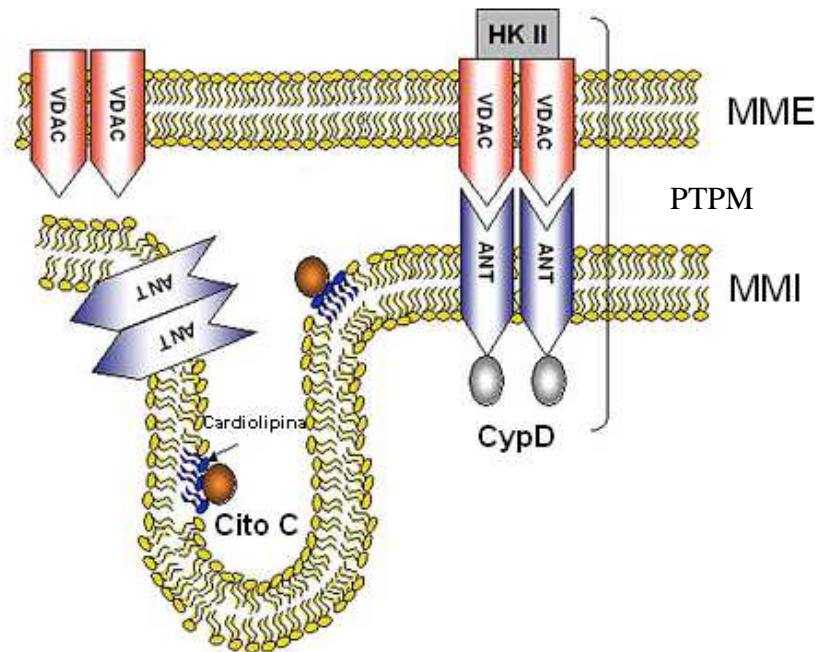


FIGURA 3. Estrutura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM).

FONTE: Adaptado de KUMARSWAMY E CHANDNA (2009).

**NOTA:** MME, membrana mitocondrial externa; MMI, membrana mitocondrial interna; HK II, hexoquinase II; VDAC, canal aniônico voltagem-dependente; CypD, ciclofilina D; Cito C, citocromo c; ANT, translocador de adenina nucleotídeo.

O PTPM permite a passagem não seletiva de moléculas menores que 1.5kDa, incapacitando a manutenção de  $\Delta pH$  e  $\Delta \psi_m$ , a síntese de ATP e a compartimentalização iônica. Como os prótons também se tornam permeáveis um conseqüente desacoplamento da fosforilação oxidativa é observado (HALESTRAP, 2006; MUKHERIEE, *et al* ,2008). Água e solutos de baixo peso molecular atingem o equilíbrio ao redor da membrana interna, através do PTPM, resultando em inchamento da organela – *swelling*. Como as proteínas da matriz estão mais concentradas em relação ao citosol, o aumento do volume de água pode ser explicado devido a grande pressão osmótica coloidal exercida pelas mesmas. O inchamento pode ser acomodado pela abertura das cristas, porém a membrana externa se rompe liberando fatores

apoptóticos para o citosol, como citocromo *c*, proteínas Smac/Diablo e fator indutor de apoptose (LEUNG; HALESTRAP, 2008). O citocromo *c* juntamente com o fator citoplasmático Apaf-1 e hidrólise de ATP formam um apoptossomo capaz de clivar proteoliticamente procaspase-9 em caspase-9, (NICHOLLS; FERGUSON, 2002; TONISSEN; TRAPANI, 2009), a qual ativa caspase 3 responsável por indução de fragmentação do DNA e consequente morte celular (TONISSEN; TRAPANI, 2009). O fator indutor de apoptose, por outro lado, promove intensa fragmentação do DNA de maneira independente de caspases, enquanto as proteínas Smac/DIABLO promovem ativação de caspases por neutralizar a ação de proteínas inibidoras de apoptose (FULDA, 2009; TONISSEN; TRAPANI, 2009).

Os MAC estão localizados na MME e são regulados pela família de proteínas BCL-2. Estudos sugerem que estes canais também possam conter componentes adicionais, porém sua completa identidade molecular permanece desconhecida (KINNALLY; ANTONSSON, 2007). Esta família de proteínas pode ser dividida em três grupos principais; os membros antiapoptóticos (como BCL-2, BCL-xL e MCL-1), os quais contem 4 domínios BH; os membros pro-apoptóticos multidomínio (como BAX e BAK), possuindo 3 domínios BH; e por fim as proteínas pro-apoptóticas BH3 (como BAD, BID e BIM), cuja homologia reside apenas no domínio BH3 (CAROPPI, *et al.*, 2009; JOURDAIN; MARTINOU, 2009). As proteínas BAX e BAK são os constituintes mais conhecidos do poro, e atualmente existem dois modelos que descrevem sua ativação para formação de MAC. No modelo de ativação direta proteínas pro-apoptóticas BH3 (t-BID e BIM, por exemplo) ativam diretamente BAX e BAK, permitindo sua oligomerização e formação do canal na MME. O modelo de ativação indireta, por sua vez, propõe a ativação de BAX e BAK por ligação de proteínas BH3 à proteínas antiapoptóticas, libertando BAX e BAK para formação do canal (FULDA, 2009).

Ainda é controverso os efeitos exercidos por BAX e BAK na mitocôndria. Alguns pesquisadores sugerem que a formação dos MAC é específica para liberação de citocromo *c*, enquanto outros relatam a permeabilização tanto da MME quanto da membrana mitocondrial interna (KINNALLY; ANTONSSON, 2007; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; TELLES, *et al.*, 2008). Alterações na

bioenergética mitocondrial, como despolarização da membrana e desacoplamento da fosforilação oxidativa, parecem ocorrer em tempo posterior quando comparado a formação do PTPM (KINNALLY; ANTONSSON, 2007), e inibição da respiração mitocondrial também é observada (TELLES, *et al.*, 2008). Após a liberação de citocromo *c* a morte é mediada da mesma forma como descrito para o PTPM.

É importante mencionar que, como demonstrado por WATERHOUSE *et al.* (2001), a liberação de citocromo *c* não afeta a integridade da membrana interna, e na ausência da ativação de caspases a produção de ATP e manutenção de  $\Delta\Psi_m$  podem ser mantidos pela mitocôndria. No entanto, cuidadosas observações têm demonstrado perda do potencial de membrana mitocondrial em tempo posterior à liberação do citocromo *c* em células sob apoptose, num processo não simultâneo (BOUCHIER-HAYES, *et al.*, 2008).

A via extrínseca da apoptose é ativada por ligantes a receptores, os quais ativam caspase 8 capaz de atuar tanto em BID quanto em caspase 3. BID ativado, denominado t-BID, promove a permeabilização de MME através de BAK e BAX, resultando em liberação de citocromo *c* e formação de apoptossomo. Caspase 3 induz a fragmentação do DNA de forma independente da mitocôndria (FULDA, 2009; TONISSEN; TRAPANI, 2009).

Estresse oxidativo e outros estímulos também podem desencadear a apoptose através da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos, conhecidas por MAPK. Estas quinases fosforilam e ativam proteínas pro-apoptóticas, incluindo BIM e BAX, o que pode resultar na permeabilização da MME (TONISSEN; TRAPANI, 2009). As vias de sinalização apoptótica estão resumidas na figura 4.

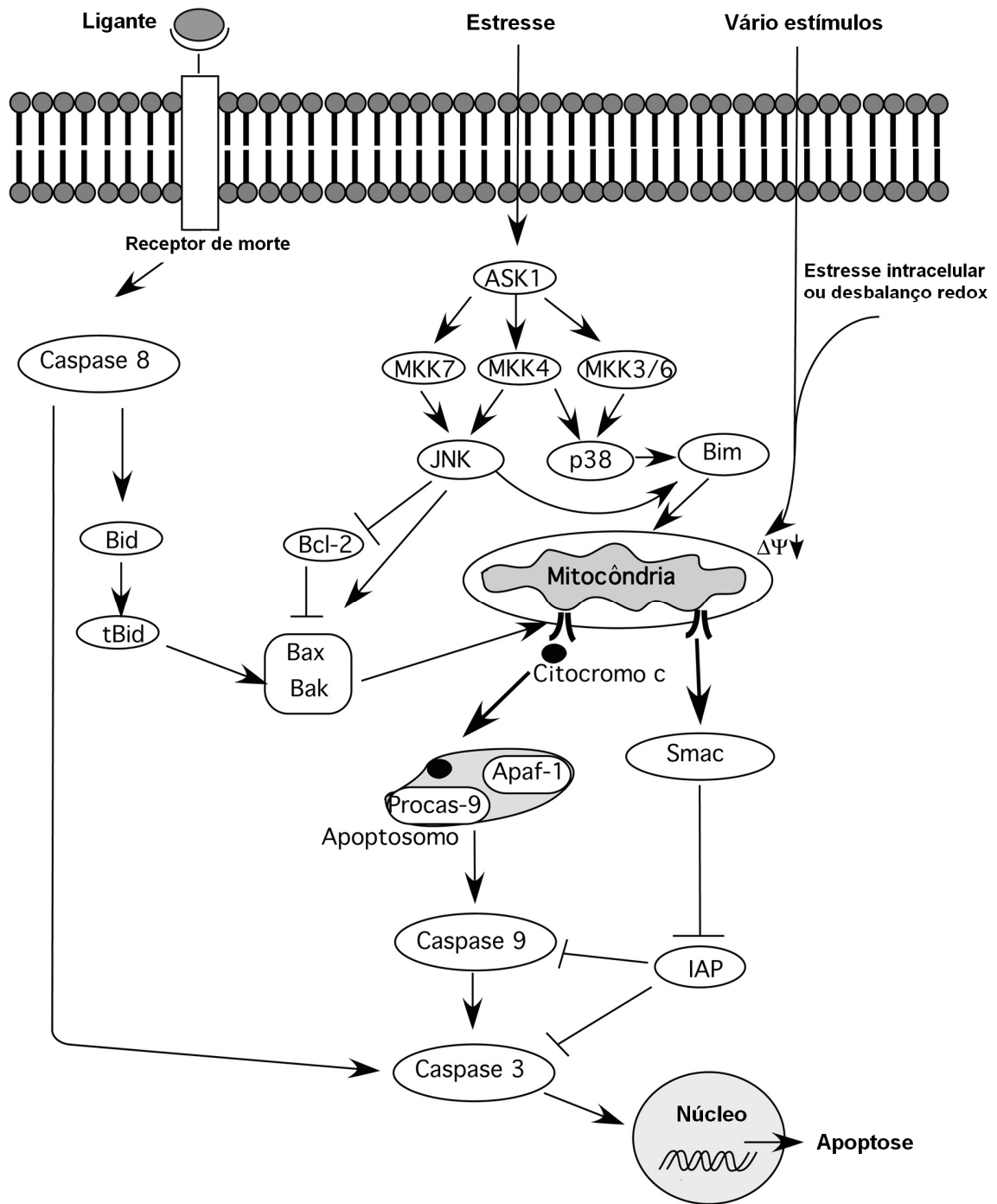


FIGURA 4. Vias de sinalização apoptóticas.

FONTE: Adaptado de TONISSEN E TRAPANI (2009).

Nota: ASK, quinase reguladora de ativação apoptótica; JNK, c-Jun N-terminal quinase; p38 e MKK, proteínas quinases ativadas por mitógenos; IAP, inibidor da apoptose; Procasp-9, pró-caspase 9; Apaf-1, fator indutor de apoptose; Bid, Bim, Bax, Bak e Smac são proteínas pró-apoptóticas; t-Bid, Bid ativado; Bcl-2, proteína anti-apoptótica.

Conforme Ghobrial e Witzig e Adjei (2005), os compostos com potencial terapêutico para o câncer que operam na via intrínseca da apoptose podem atuar diretamente na membrana mitocondrial interna, antagonizar membros anti-apoptóticos ou aumentar a atividade de membros pró-apoptóticos.

Novos compostos com potente atividade indutora de PTPM têm sido desenvolvidos como tentativa de aumentar a efetividade da quimioterapia em células tumorais (LEE, 2000), uma vez que, neste sentido, a consequente apoptose é um promissor mecanismo de ação para estas drogas (MAKIN; HICKMAN, 2000; BREMER, 2006).

Em 2008, Yuan *et al.* realizaram um estudo que pode explicar o efeito anti-angiogênico do Endostatin em células endoteliais microvasculares humanas. Os pesquisadores observaram que o composto induz a formação de PTPM via VDAC1, resultando em apoptose pela liberação de citocromo *c* e ativação de caspase-9.

Ainda neste contexto, Liu *et al.* (2008) demonstram a importância do PTPM para translocação do supressor de tumor p53 em células JB6 da epiderme de camundongos, observando que a apoptose supressor-induzida foi suprimida nas células tratadas com bloqueadores da formação do PTPM.

Em 2006, GAO *et al.* propôs que a atividade antitumoral da Solanina, um alcalóide esteroidal de tubérculo de batata, deve-se à indução da apoptose via PTPM, evidenciado através da diminuição do potencial de membrana e do aumento na concentração de cálcio intracelular em células HepG2.

### 2.2.1 Transporte mitocondrial de cálcio e formação do PTPM

Na membrana mitocondrial interna são encontrados canais para o transporte de íons que podem afetar o comportamento bioenergético celular, como o cálcio, considerado o principal segundo-mensageiro celular implicado na atuação de fatores de crescimento e sinalização hormônio-sensível de enzimas (CALDERON-CORTES, *et al.*, 2008).

O papel da mitocôndria na sinalização celular mediada por  $\text{Ca}^{+2}$  relaciona-se com sua habilidade em armazenar o cátion proveniente do citosol. O potencial de



membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) próximo de - 200mV dirige o íon do citosol para a matriz mitocondrial através de um sistema uniporte localizado na membrana interna, e sua liberação é realizada por trocadores  $\text{Ca}^{+2}/2\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}/2\text{H}^+$  (CHAKRABORTI, *et al.*, 1999; KISELYOV; MUALLEM 2008). Esta capacidade pode justificar a localização estratégica de mitocôndrias ao redor no núcleo em alguns tipos celulares, visto que neste compartimento há várias quinases, repressores e ativadores transcricionais  $\text{Ca}^{+2}$  – dependentes, que podem afetar profundamente as funções celulares (BRUCE, *et al.*, 2004).

Segundo Hemes-Lima (2004), a lipoperoxidação dos retículos endoplasmáticos e sarcoplasmáticos pode ocasionar um fluxo incontrolado de cálcio para o citoplasma, ativando proteases, fosfolipases e endonucleases  $\text{Ca}^{+2}$  – dependentes, resultando em degradação de enzimas, membranas e DNA.

A capacidade citoplasmática de acúmulo de cálcio livre é bastante limitada, sendo este mantido no intervalo de concentração de 0,05-0,5 $\mu\text{M}$ . Para maioria das células o limite superior a esta faixa corresponde ao valor no qual se inicia o influxo de cálcio para mitocôndria (NICHOLLS; FERGUSON, 2002). Nesta condição, o transporte de íons pela membrana mitocondrial interna se equilibra termodinamicamente resultando em sobrecarga de  $\text{Ca}^{+2}$  mitocondrial (CROMPTON, 1999).

Foi demonstrado que o  $\text{Ca}^{+2}$  pode interagir com a porção aniônica da cardiolipina, lipídeo encontrado em alta concentração na membrana mitocondrial interna, alterando assim sua organização. Estas mudanças podem afetar o funcionamento da cadeia respiratória, inclusive a mobilidade do citocromo *c*, favorecendo a redução parcial do oxigênio (KOWALTOWSKI, *et al.*, 2001; GUNTER; SHEU, 2009). Desta forma, o transporte de cálcio pela mitocôndria pode desencadear a morte celular por induzir o estresse oxidativo através de alterações no metabolismo energético (GUNTER; SHEU, 2009).

Em mitocôndrias sob condições normais a sobrecarga de cálcio de forma isolada pode não resultar em danos, porém, quando acompanhada de outros fatores como altas concentrações de fosfato – que se complexa ao  $\text{Ca}^{+2}$  tornando-o mais

acessível à matriz mitocondrial -, baixas concentrações de ADP e estresse oxidativo, é capaz de desencadear a TPM (HALESTRAP, 2006; MUKHERIEE, *et al.*, 2008).

A relação entre espécies reativas de oxigênio e a formação do PTPM induzido por cálcio foi objeto de estudo de Hansson *et al.* (2008), que observaram um aumento na produção de peróxido de hidrogênio durante o processo de TPM em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato e fígado humano. Contrariamente, mitocôndrias isoladas de ratos transgênicos, superexpressando a enzima mitocondrial antioxidante tioredoxina-2, apresentaram proteção contra formação do PTPM-peróxido induzido, quando comparado às mitocôndrias isoladas de ratos sem a mutação (HE, *et al.*, 2008).

### 2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS

Um grande número de compostos e mesoiônicos tem exibido importantes atividades antitumorais *in vitro* e *in vivo* por mecanismos que parecem estar relacionados à apoptose (GRYNBERG, 1992; GRYNBERG; SANTOS; ECHEVARRIA, 1997; SENFF-RIBEIRO, *et al.*, 2003; SENFF-RIBEIRO, *et al.*, 2004).

Os compostos mesoiônicos são definidos como heterocíclicos constituídos de cinco membros, que não podem ser representados satisfatoriamente por uma estrutura covalente ou polar, e um sexteto de elétrons em associação com os cinco átomos presentes no anel. Além disto, estes compostos apresentam carga negativa em um átomo ou grupo exocíclico, capaz de balancear a carga positiva do anel, resultando em caráter global neutro da molécula (FIGURA 5) (NEWTON; RAMSDEN, 1982). Esta característica permite que o composto atravesse membranas biológicas *in vivo*, e junto ao alto momento dipolo decorrente da presença de regiões distintamente carregadas e variação eletrônica em torno do anel, os mesoiônicos podem interagir com biomoléculas como DNA e proteínas para exercer seus efeitos (KIER; ROCHE, 1967; OLLIS; RAMSDEN, 1976; NEWTON; RAMSDEN, 1982).

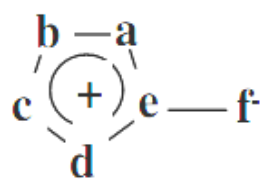


FIGURA 5. Representação genérica de um composto mesoiônico.

FONTE: NEWTON e RAMSDEN, 1982; OLLIS e RAMDEN, 1976.

O primeiro relato de síntese de um composto mesoiônico na literatura refere-se a preparação do deidroditizona (FIGURA 6) por Emil Fischer e Emil Besthorn em 1882 (NEWTON; RAMSDEN, 1982). Já o termo mesoiônico foi inicialmente sugerido durante a tentativa de representação estrutural das sidnonas (1,2,3 – oxadiazólio-5-olato) (FIGURA 7) (BAKER; OLLIS, 1955), um composto derivado do sistema heterocíclico oxadiazol (OLLIS; RAMSDEN, 1976; NEWTON; RAMSDEN, 1982).

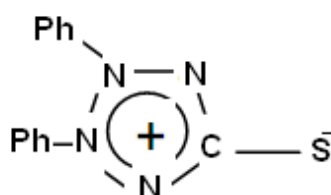


FIGURA 6. Representação estrutural do deidroditizona.

FONTE: NEWTON e RAMSDEN, 1982

No anel heterocíclico das sidnonas (FIGURA 7) existe um total de sete elétrons nos orbitais  $2p_z$  dos cinco átomos do qual é composto, e um elétron associado ao átomo de oxigênio exocíclico. Um elétron do anel paria-se com um do oxigênio formando um sexteto de elétrons  $\pi$  parcialmente positivo em relação ao átomo exocíclico, o que confere estabilização aromática ao anel (BAKER; OLLIS, 1955). Desta forma, a carga global do composto torna-se neutra, possibilitando sua passagem por membranas biológicas e uma conseqüente interação com biomoléculas intracelulares (KIER; ROCHE, 1967).

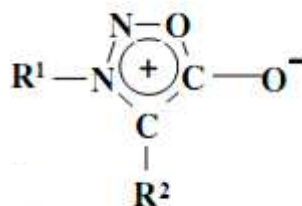


FIGURA 7. Representação estrutural das sidnonas.

FONTE: NEWTON e RAMSDEN, 1982

As sidnonas foram a primeira classe de compostos mesoiônicos para qual se observou importantes atividades biológicas (BROOKES; WALKER, 1957), sendo sintetizada pela primeira vez em 1935 por Earl e Mackney, através de uma reação envolvendo o tratamento de um ácido *N*-nitroso- $\alpha$ -amino com um anidrido, como o anidrido acético ou trifluoracético (KIER; ROCHE, 1967). Em 1957, Brooks e Walker relataram pela primeira vez uma possível atividade biológica das sidnonas como antagonistas naturais de aminoácidos (KIER; ROCHE, 1967; OLLIS; RAMSDEN, 1976). No mesmo ano, Daeniker e Druey reportaram que alguns polimetileno-bis-sidnonas e polimetileno-bis-hidrazinas apresentavam uma discreta atividade antitumoral *in vivo*, despertando o interesse de Greco, Nyberg e Cheng para a atividade antitumoral de 3-benzilsidnonas e compostos relacionados (GRECO, *et al.*, 1962). Os pesquisadores encontraram atividade com o 3-(*p*-metoxibenzil)sidnona frente ao carcinoma 755 em ratos (KIER; ROCHE, 1967).

Em 1964, Tinlok *et al.* sintetizaram o derivado aril-sidnona (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato) – SYD-1 (FIGURA 8) –, e em 1992 Grynberg *et al.* testaram sua atividade *in vivo* contra tumores ascíticos de Sarcoma 180, carcinoma de Ehrlich, histiocitoma fibroso (B10MCII) e leucemia L1210 em camundongos. O composto foi administrado por via intraperitoneal 24 horas após a inoculação do tumor, e a avaliação foi baseada no aumento do tempo de sobrevivência dos animais tratados. O SYD-1 apresentou pronunciada atividade antitumoral contra carcinoma de Ehrlich, sarcoma 180 e B10MCII, e os animais não apresentaram alterações hematológicas significativas. O trabalho ainda analisou a citotoxicidade do composto em culturas de células obtidas do líquido ascíticos dos camundongos com os tumores induzidos,

determinando a concentração de SYD-1 necessária para produzir 50% dos efeitos inibitórios de crescimento tumoral ( $IC_{50}$ ) e a incorporação de [3H]timidina em cultura de células de leucemia L1210. Os valores encontrados foram baixos, representando 19, 17 e 15,5 $\mu$ g/mL para carcinoma de Ehrlich, sarcoma 180 e B10MCII, respectivamente, o que indicou uma potente ação citotóxica do SYD-1. Para incorporação de [3H]timidina os autores encontraram uma diminuição menor que 10% em relação às células não tratadas, quando utilizaram 12,5 e 25 $\mu$ g/mL do composto.

Também neste mesmo estudo os autores discutem a relação estrutura-atividade do SYD-1, sugerindo que o caráter nucleófilo do substituinte torna-se essencial para atividade do composto, uma vez que na droga similarmente estrutural, o SYD-2, onde um grupo pirrolidinico substitui o átomo de cloro presente em SYD-1, os efeitos foram menos acentuados.

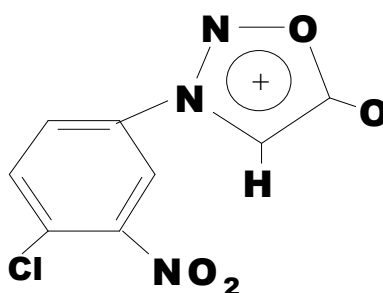


FIGURA 8. Estrutura química do 3-(4-cloro-3-nitrofenil)-1,2,3-oxadiazólio-5-olato.  
 FONTE: GRYNBERG *et al.*, 1992.

Em 2003 Dunkley e Thoman sintetizaram o 4'-cloro-3'-nitrofenilsidnona, um análogo *para*-substituído de SYD-1, e um composto 4'-fluor-3'-nitrofenilsidnona, com o objetivo de verificar se o tamanho do substituinte ou seu efeito indutivo eram importantes para atividade antitumoral. As drogas foram testadas *in vitro* contra três linhagens celulares: câncer de mama (MCF7), câncer de pulmão (NCI-H460) e câncer do sistema nervoso central (SF-268). Embora as linhagens MCF7, NCI-H460 e SF-268 tratadas com 4'-cloro-3'-nitrofenilsidnona tenham crescido 44%, 91% e 9% em relação ao controle, respectivamente, o derivado com flúor mostrou-se mais eficiente para cada linhagem celular, inibindo 100% o crescimento das células tumorais.

Visto que o mecanismo de ação promovido por certas drogas quimioterápicas é a apoptose, e que esta pode ser desencadeada por uma via intrínseca mitocondrial, Halila *et al.* (2007) avaliaram o efeito do SYD-1 sobre as funções energéticas de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Observou-se neste estudo uma diminuição da velocidade respiratória do estado 3 em aproximadamente 65% e 40%, quando os substratos utilizados foram glutamato e succinato, respectivamente. O efeito foi justificado pela inibição do transporte de elétrons nos níveis do complexo I, III e IV, prejudicando subseqüentemente a formação do potencial de membrana em 50% na maior concentração do composto, com o succinato como substrato. Observou-se também redução do inchamento mitocondrial na presença de acetato de sódio. Quando o glutamato foi utilizado, a maior concentração de SYD-1 diminuiu 100% o inchamento mitocondrial, enquanto que com succinato a redução foi de 80%, sugerindo fortemente que o composto mesoiônico atue na membrana mitocondrial interna e possua um efeito mais pronunciado com substratos relacionados ao NADH. No estado 4 da respiração notou-se um aumento de 180% no consumo de oxigênio com glutamato, que somado ao aumento da atividade ATPase em 450% sugerem uma atividade desacopladora do composto.

Além das atividades antitumorais já descritas (SHINZATO, *et al.*, 1988; GRYNBERG ; SANTOS ; ECHEVARRIA, 1998; DUNKLEY e THOMAN, 2003; MATYSIAK 2006; MATYSIAK, *et al.*, 2006), os compostos mesoiônicos de diferentes classes são alvos de pesquisas para atividades antiepilética (NEIDLEIN; EDER, 1982), leishmanicida (RODRIGUES, *et al.*, 2007; SOARES-BEZERRA, 2008), antimicrobiana (GLENNON; COBURN, 1973; GUPTA; PRAKASH, 1993; PILLI, *et al.*, 1993, MONTANARI, *et al.*, 1996; BRITTO, *et al.*, 1999), antitricomoníase (WALKER, 1985), tripanossomicida (SEM, *et al.*, 1993; FERREIRA, *et al.*, 2008), cardiotônica, anti-anginal e anti-hipertensiva (KIKUCHI, *et al.*, 1978; KAPPE; KAPPE, 1991), inibidora de fosfodiesterase cAMP (adenosina monofosfato cíclica) (ROGERS, *et al.*, 1981), anti-trombótica e anti-plaquetária (REHSE; MARTENS, 1993; REHSE; KONIG, 1995; COREL, *et al.*, 1994; HELLBERG; STUBBINS; GLENNON, 2000), liberadora de óxido nítrico

(SCHONAFINGER, 1999), anti-inflamatória (CARDOSO, *et al.*, 2004) e inibidora de 11- $\beta$ hidroxiesteróide desidrogenase (SUTIN, 2007).

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As mitocôndrias possuem um papel fundamental na sinalização apoptótica, o que tem despertado a atenção para drogas que alterem a bioenergética mitocondrial e possuam ações antitumorais. Estes compostos parecem direcionar a morte de células tumorais por mecanismos mais seletivos, tornando-os menos citotóxicos (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005; HAIL JUNIOR; LOTAN, 2009; RALPH; NEUZIL, 2009).

Foi demonstrado por Grynberg *et al.* (1992), que o SYD-1 possui atividade antitumoral *in vivo*, e em 2007 Halila *et al.* observaram alterações na bioenergética mitocondrial que parecem relacionar-se à ação antitumoral do composto. Entretanto, os mecanismos pelos quais isto ocorreria ainda permanecem indeterminados.

Considerando a importância do desenvolvimento de compostos quimioterápicos mais eficazes, e que SYD-1 apresenta aspectos promissores para esta finalidade, o objetivo geral deste trabalho é:

Determinar os mecanismos envolvidos nos efeitos do SYD-1 sobre a bioenergética mitocondrial, particularmente sobre os eventos relacionados a transição de permeabilidade mitocondrial e ao estresse oxidativo, no sentido de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de ação antitumoral do composto. Para tanto são objetivos específicos deste estudo:

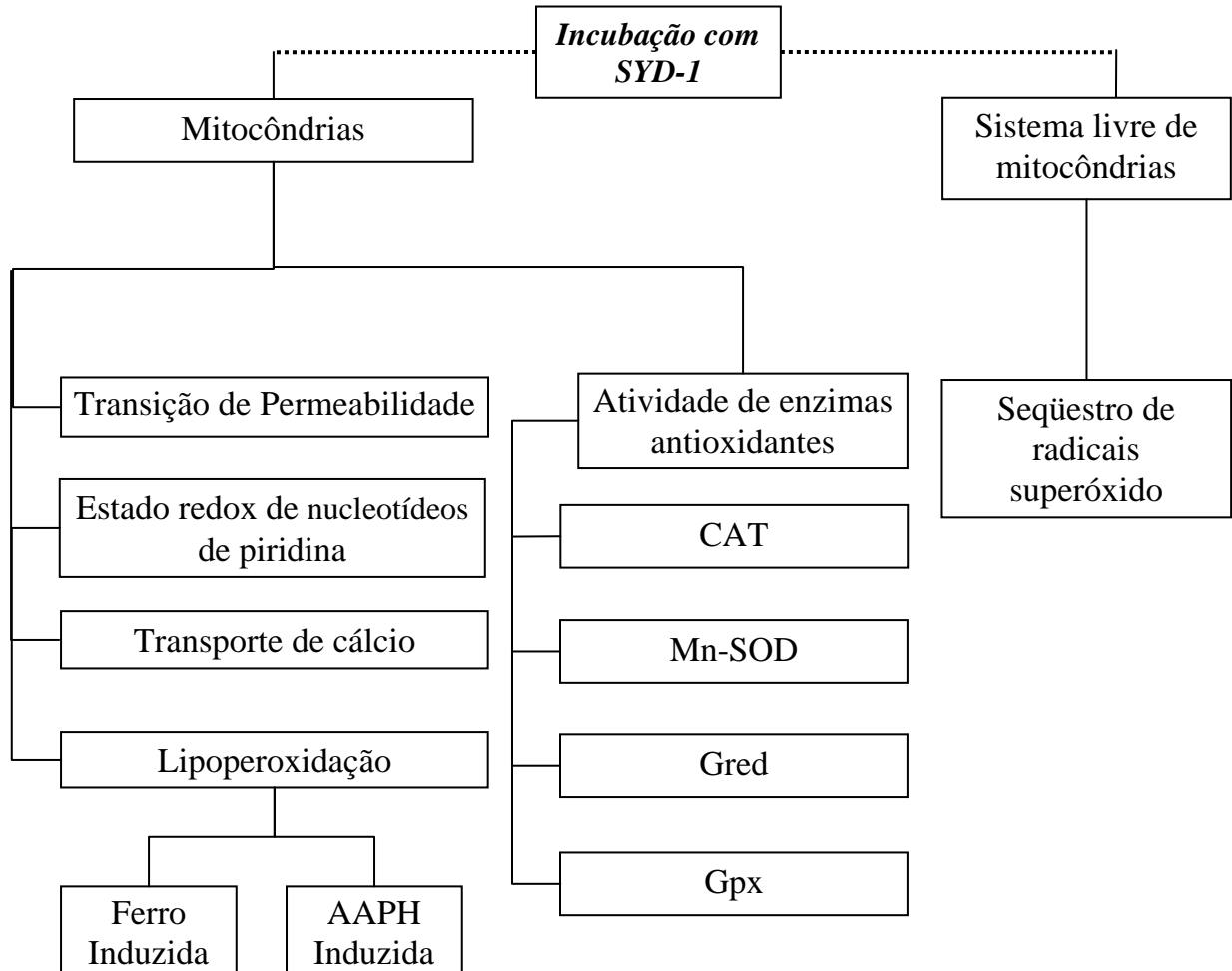
Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, avaliar:

- A lipoperoxidação mitocondrial induzida;
- A transição de permeabilidade mitocondrial;
- O transporte de cálcio;
- O estado redox de nucleotídeos piridina.
- A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (Mn-SOD), glutathione redutase (Gred), glutathione peroxidase (Gpx) e catalase (CAT).

Em sistemas livres de mitocôndrias avaliar a capacidade sequestradora de radicais superóxido.



#### 4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 REAGENTES

Os reagentes, D-manitol, HEPES, EGTA, EDTA, rotenona, BSA, ácido glutâmico, ATP, ADP, NADH, NADPH e arsenazo III foram obtidos do laboratório Sigma Chemical Co.

Fosfato de potássio monobásico e ácido tricloroacético foram obtidos da Synth. Ácido succínico foi obtido da Aldrich Chemical. Sacarose, cloreto de potássio, DMSO, TRIS e os demais reagentes, também com alto grau de pureza, foram obtidos da Merck.

O composto mesoiônico SYD-1 (3-4[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato) foi sintetizado e gentilmente doado pela Profa. 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 RMH  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia de massas (GRYNBERG *et al.*, 1992).

### 5.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE SYD-1

Para a utilização nos experimentos, foi preparada uma solução de SYD-1 em DMSO à concentração final de 50 ou 100  $\text{mmol.L}^{-1}$ . A solução estoque foi mantida congelada a  $-18^\circ\text{C}$  e utilizada no prazo máximo de 1 mês. Como verificado através de análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia de massas, a solução estoque armazenada nestas condições mantém suas características estruturais por dois meses (ECHEVARRIA, Comunicação pessoal). Para a utilização nos ensaios, a solução estoque foi diluída em meio de reação a fim de obter-se a concentração final desejada para cada situação experimental. Em todos os ensaios, o composto foi previamente incubado durante 2 minutos com as preparações. Para cada experimento realizou-se também um ensaio controle com o solvente DMSO, na maior concentração correspondente a de SYD-1, nas mesmas condições experimentais.

### 5.3 ANIMAIS

Para o isolamento de mitocôndrias de fígado de rato, foram utilizados ratos machos albinos Wistar, com peso variando entre 220-330g, mantidos no biotério do Setor de Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com dieta balanceada Purina® e água a vontade e, para o isolamento das mitocôndrias, foram submetidos a jejum prévio de 12 horas permitindo-se água a vontade. Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. (Certificado CEEA nº 403, em anexo).

### 5.4 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS

Mitocôndrias de fígado de ratos foram isoladas através da metodologia adaptada de VOSS *et al.* (1961), utilizando-se como meio de extração: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão HEPES 10mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2), EGTA 1mmol.L<sup>-1</sup> e BSA 0,1g%. Para obtenção das mitocôndrias, os animais foram sacrificados por decapitação. O fígado foi imediatamente retirado e imerso em meio de extração gelado. Depois de lavado, o órgão foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador de van Potter Elvehjen, utilizando-se sucessivamente pistilo frouxo e normal. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 3200 x g a 4°C em centrífuga Hitach modelo Himac CR-21E, durante 5 minutos, para eliminação de células intactas, membranas e núcleos. Desprezou-se o sedimento enquanto o sobrenadante foi centrifugado a 12.600 x g, durante 10 minutos, a 4°C. O precipitado obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspenso e lavado duas vezes em meio de extração por centrifugação a 8.100 x g durante 10 minutos a 4°C. As mitocôndrias obtidas foram suspensas em meio de extração e a concentração de proteína mitocondrial contida foi determinada. Para os experimentos descritos nos itens (5.5.4-5.5.6), a última centrifugação foi realizada com meio de extração sem a presença de EGTA.

Para obtenção de mitocôndrias purificadas, utilizou-se o método proposto por Rigobello *et al.* (2001) com pequenas modificações. A suspensão mitocondrial obtida

como descrito acima foi adicionada a tubos de ultracentrífuga contendo solução de sílica coloidal recoberta com polivinilpirrolidina (Percoll) a 30% (v/v) em meio de isolamento sem EGTA. Procedeu-se então uma centrifugação a 40.000 X g por 1 hora em rotor P502A, em ultracentrífuga Himac CP 90β. A suspensão mitocondrial foi coletada na fração correspondente a densidade relativa de 1.070-1.100g/mL seguindo-se duas centrifugações a 8.100 x g durante 10 minutos a 4°C. A fração mitocondrial foi mantida em meio de isolamento a 4°C até a realização dos experimentos.

## 5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 5.5.1 Determinação do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas foi monitorado polarograficamente com eletrodo de oxigênio tipo Clark, em oxígrafo Gilson. A reação, em volume final de 1,3mL, foi mantida sob agitação em câmara fechada termostatizada, a temperatura de 28°C (VOSS *et al.*, 1963). O sistema de reação continha D-manitol 125 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão HEPES 10mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2), KCl 65 mmol.L<sup>-1</sup>, EGTA 0,1mmol.L<sup>-1</sup> e BSA 0,1g%, e foi suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L<sup>-1</sup>, malato de sódio 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,6mmol.L<sup>-1</sup>, ADP 0,2mmol.L<sup>-1</sup> e 2,0 mg de proteína mitocondrial.

As velocidades respiratórias foram calculadas em nmol de O<sub>2</sub> consumidos. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína, considerando-se que a solubilidade do O<sub>2</sub> na água, a 28°C e 1 atm é de 235μmol.L<sup>-1</sup> (ESTABROOK, 1967). O coeficiente de controle respiratório (CCR) foi obtido através da razão entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado 3) e a velocidade após o consumo de ADP (estado 4). Utilizou para os experimentos as preparações mitocondriais que apresentaram CCR ≥ 4,0.

### 5.5.2 Determinação da lipoperoxidação mitocondrial induzida por ferro ou AAPH

A peroxidação de lipídios em mitocôndrias foi avaliada através da reação de produtos da lipoperoxidação com o ácido tiobarbitúrico, principalmente o malondialdeído (MDA). A quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) formada foi monitorada a 535nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 2450UV/VIS.

Duas metodologias de lipoperoxidação induzida foram realizadas. Na primeira adicionou-se ADP 2 mmol.L<sup>-1</sup>, FeCl<sub>3</sub> 0,2mmol.L<sup>-1</sup> e 2-oxoglutarato 5mmol.L<sup>-1</sup> para induzir a produção de radicais livres provenientes da cadeia respiratória (BUEGE ; AUST, 1978). Na segunda utilizou-se o  $\alpha$ - $\alpha'$ -Azodiisobutiramidina dihidroclorato, AAPH (10mmol.L<sup>-1</sup>), como indutor de radicais livres de fase aquosa (TAKAYANAGI *et al.*, 1980).

As mitocôndrias foram incubadas sob agitação, a 37°C, em meio de reação constituído de D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2) e os indutores (ADP, FeCl<sub>3</sub> em presença de 2-oxoglutarato ou AAPH) (BUEGE; AUST, 1978; TAKAYANAGI, *et al.*, 1980).

Após 45 minutos de reação, alíquotas foram retiradas e acrescidas de 2 mL de reativo constituído de ácido tricloroacético (TCA) 15% (m/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,4% (m/v) em HCl 0,25N e solução etanólica de butil-hidroxi toluento (BHT) 0,01% (m/v). A mistura foi submetida à fervura por 15 minutos em banho-maria, resfriada e centrifugada em centrífuga Hitachi modelo himac CR-21E a 12.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi submetido à leitura em 535 nm e os resultados expressos em % do controle. Para calcular a quantidade absoluta de MDA utilizou-se o coeficiente de extinção molar de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (BUEGE e AUST, 1978).

### 5.5.3 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

#### 5.5.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada de acordo com o método proposto por NISHIMIKI *et al.* (1972). Neste ensaio mitocôndrias obtidas como descrito no item 5.4 foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento (a  $-196^{\circ}\text{C}$ ) a fim de obter-se mitocôndrias rompidas e, desta forma, permitir a realização do ensaio enzimático. O sistema de reação mantido a  $25^{\circ}\text{C}$  foi constituído de tampão TRIS-HCl  $10\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 8,0), NADH  $340\mu\text{mol.L}^{-1}$ , nitroblue tetrazolium – NBT –  $72\mu\text{mol.L}^{-1}$ , metassulfato de fenazina (PMS)  $30\mu\text{mol.L}^{-1}$  e proteína mitocondrial em quantidade adequada para inibir em 50% a redução do NBT.

A reação foi iniciada pela adição de NADH e acompanhada a 560 nm durante 1 minuto em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 2450UV/VIS. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle, considerando que 1 unidade de SOD corresponde à inibição de 50% da redução do NBT.

#### 5.5.3.2 Glutationa peroxidase (Gpx)

A atividade da Gpx foi avaliada de acordo com a técnica proposta por FLOHÉ; GUNZLER (1984), em mitocôndrias permeabilizadas com deoxicolato 0,5%. Neste ensaio a Gpx catalisa a oxidação de GSH, em presença de peróxidos, gerando glutatona oxidada (GSSG). A GSSG na presença de NADPH e Gred reduz novamente a glutatona. A atividade enzimática foi acompanhada pelo decréscimo da absorvância do NADPH a 340 nm. O sistema de reação foi composto de tampão fosfato  $100\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,0), EDTA  $1\text{mmol.L}^{-1}$ , GSH  $2\text{mmol.L}^{-1}$ , NADPH  $0,15\text{mmol.L}^{-1}$ , Gred purificada 0,2 U, *t*-butil hidroperóxido  $0,5\text{mmol.L}^{-1}$  e  $250\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial. A reação que ocorreu a  $25^{\circ}\text{C}$  foi iniciada pela adição de *t*-butil hidroperóxido e acompanhada durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em consumo de NADPH em  $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH ( $6220\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

### 5.5.3.3 Glutationa redutase (Gred)

Avaliou-se a atividade da Gred de acordo com a técnica proposta por SIES *et al.* (1979). Neste ensaio, a Gred catalisa a redução da glutatona na presença de NADPH em sistema de reação constituído de tampão fosfato  $100\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,0), EDTA  $1\text{ mmol.L}^{-1}$ , GSSG  $0,66\text{ mmol.L}^{-1}$  e NADPH  $0,075\text{mmol.L}^{-1}$ . As mitocôndrias obtidas como descrito no item 5.4 foram rompidas pela adição de deoxicolato 0,5% e  $250\mu\text{g}$  da suspensão foi utilizada no sistema de reação. A reação foi mantida a  $25^{\circ}\text{C}$  e iniciada pela adição de GSSG. A oxidação de NADPH foi acompanhada durante 5 minutos a  $540\text{nm}$  em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV – 2450UV/VIS. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH ( $6220\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

### 5.5.3.4 Catalase

A atividade da catalase foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância a  $240\text{nm}$  como proposto por AEBI (1984). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato  $50\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7),  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10\text{mmol.L}^{-1}$  e  $500\mu\text{g}$  proteína. $\text{mL}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . A reação foi iniciada pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e acompanhada durante 60s. Os resultados foram expressos em U de catalase, onde 1U corresponde a  $1\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposto ( $\text{mg}$  proteína. $\text{min}^{-1}$ ) considerando-se o coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $0,394\text{ mmol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$ ).

### 5.5.4 Determinação do estado redox dos nucleotídeos de piridina (NP)

O estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais foi monitorado fluorimetricamente em espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF 5301 PC. O sistema de reação foi constituído de sacarose  $125\text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $65\text{mmol.L}^{-1}$  e HEPES-KOH  $10\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,4), e suplementado com rotenona  $2,5\mu\text{mol.L}^{-1}$ , proteína mitocondrial  $1\text{mg}.\text{mL}^{-1}$  e isocitrato de potássio  $1\text{mmol.L}^{-1}$ . A reação ocorreu a  $30^{\circ}\text{C}$  e foi iniciada com a adição de succinato  $5\text{mmol.L}^{-1}$ . Foram utilizados os comprimentos

de onda de excitação 366nm e emissão 450 nm (fenda de 5,0 nm) na ausência e na presença de  $\text{CaCl}_2$  40-50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (PIGOSO, *et al.*, 1998).

#### 5.5.5 Análise da transição de permeabilidade mitocondrial

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) foi acompanhada como recomendado por Gunter e Pfeiffer (1990), analisando o decréscimo na absorbância em 540 nm devido ao inchamento mitocondrial como consequência da formação/abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial induzida por cálcio. Para tanto utilizou-se espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 2450UV/VIS.

O meio de reação era constituído de D-manitol 250  $\text{mmol.L}^{-1}$ , tampão HEPES 10 $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,2), rotenona 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg.mL}^{-1}$ , succinato de potássio 3 $\text{mmol.L}^{-1}$  e  $\text{CaCl}_2$  40-50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . O volume final da reação de 1mL foi mantido a 28°C. Como indutores do inchamento foram utilizados fosfato de potássio 0,3 $\text{mmol.L}^{-1}$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ou diamida 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Adições individuais de EGTA 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  e CsA 0,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  foram realizadas para confirmar que o inchamento observado era decorrente da formação do poro de transição de permeabilidade.

#### 5.5.6 Análise do transporte mitocondrial de cálcio

O transporte de cálcio foi estimado em sistema de reação a 28°C contendo sacarose 250 $\text{mmol.L}^{-1}$ , HEPES 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,2) e 0,1 g% de BSA . Este meio foi tratado por, no mínimo, 4 horas com resina Chelex-100 antes do uso. Ao sistema foram adicionados  $\text{CaCl}_2$  40-50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 $\text{mmol.L}^{-1}$ , rotenona 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 0,5 $\text{mg prot.mL}^{-1}$ . A captação de cálcio foi iniciada com a adição de succinato de potássio 3 $\text{mmol.L}^{-1}$  e o efluxo induzido por FCCP 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ou vermelho de rutênio 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Monitorou-se a reação pela variação na absorbância de arsenazo III nos comprimentos de onda 675-685nm em espectrofotômetro Beckman (SCARPA, 1979).



## 5.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão. As leituras foram realizadas a 700nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 2450UV/VIS.

## 5.7 ENSAIO EM SISTEMA LIVRE DE MITOCÔNDRIAS

### 5.7.1 Determinação da capacidade seqüestradora de radicais superóxido

A capacidade seqüestradora do radical superóxido foi avaliada pelo método descrito por Nishimiki *et al.* (1972) com algumas modificações. O sistema de reação foi constituído de tampão TRIS-HCl 10mmol.L<sup>-1</sup> (pH 8,0), NADH 340 µmol.L<sup>-1</sup>, NBT 72 µmol.L<sup>-1</sup> e metassulfato de fenazina, 30 µmol.L<sup>-1</sup>. A redução do NBT pelo ânion superóxido foi acompanhada a 560 nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 2450UV/VIS, durante 5 minutos. A capacidade seqüestradora do radical foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Capacidade Seqüestradora (\%)} = 1 - \left( \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \right) * 100$$

(QI, *et al.*, 2005).

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos com média ± desvio padrão 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  $p \leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 EFEITO DO SYD-1 SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO INDUZIDA POR FERRO E RADICAIS PRODUZIDOS PELA CTE.

A lipoperoxidação é um processo complexo que envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, consumo de oxigênio, rearranjo de duplas ligações em ácidos graxos insaturados e produção de uma variedade de compostos que incluem alcoóis, cetonas, aldeídos e éteres (BUEGE; AUST, 1978; HERMES-LIMA, 2004).

As membranas biológicas são ricas em lipídios poliinsaturados e, por encontrarem-se num ambiente provido de oxigênio e metais, tornam-se facilmente susceptíveis ao ataque peroxidativo (BUEGE; AUST, 1978).

Neste ensaio, os produtos da lipoperoxidação ferro-induzida foram quantificados através da reação com o ácido tiobarbitúrico, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, na presença de diferentes concentrações de SYD-1 (FIGURA 9). No experimento, a suspensão de mitocôndrias é energizada com 2-oxoglutarato, sendo que o vazamento de elétrons da cadeia respiratória dá origem ao ânion superóxido. Este, por sua vez, é convertido por ação da Mn-SOD a  $H_2O_2$ , que ao reagir com o ferro, através da reação de Fenton, origina radicais hidroxila iniciadores do processo lipoperoxidativo. Os produtos finais deste, como o malondialdeído, reagem com o ácido tiobarbitúrico formando substâncias que absorvem luz em 535 nm. Este método é freqüentemente utilizado como medida da extensão lipoperoxidativa (LEFEVRE, *et al.*, 1998).

Observa-se que na menor concentração ( $0,25\mu\text{mol.mg}^{-1}$  de proteína) o composto não promove efeito sobre a lipoperoxidação quando comparado ao controle (ausência de SYD-1). Contudo, nas concentrações de 0,5 e  $0,75\mu\text{mol.mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial, o composto causou uma redução da lipoperoxidação em aproximadamente 78% em relação ao controle, chegando a mesma a 100% na maior concentração testada ( $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  proteína).

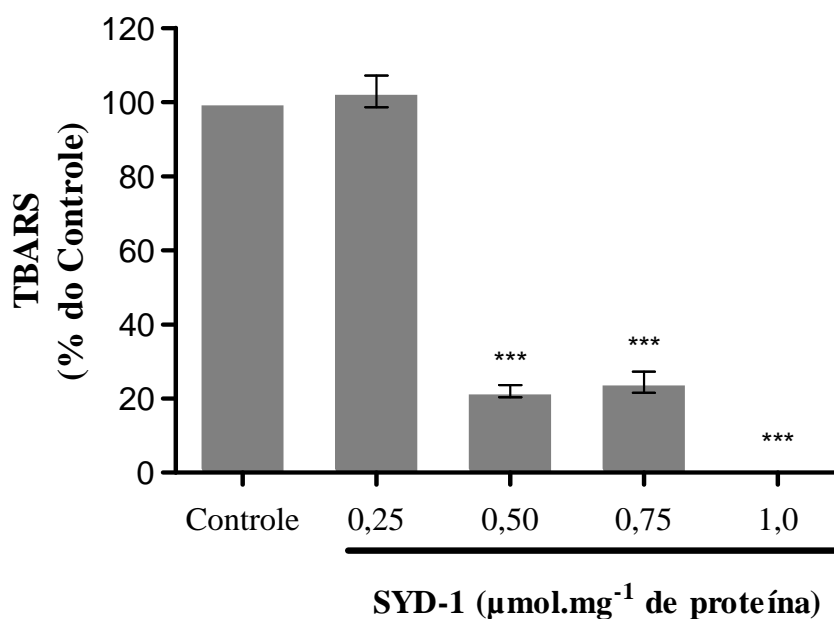


Figura 9. Efeito do SYD-1 sobre a lipoperoxidação ferro-induzida em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, FeCl<sub>3</sub> 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>, e 1 mg prot.mL<sup>-1</sup>, a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 2-oxoglutarato 6mmol.L<sup>-1</sup> na ausência (controle) e na presença de SYD-1 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 5.5.2. Os valores representam a média ± dp de 7 experimentos independentes, onde 100% corresponde a 6,23 ± 0,66 nmol de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial. \*\*\* Significativamente diferente do controle ao nível de p < 0,001.

Inicialmente a lipoperoxidação fora descrita apenas como um processo danoso para a célula. Atualmente sabe-se que este fenômeno pode, além de controlar a divisão celular, produzir moléculas sinalizadoras que dirigem mudanças estruturais e metabólicas nas células, direcionando-as à apoptose (BARONZIO, 1995; MACCARRONE, *et al.*, 2001). O papel dos hidroperóxidos originados na lipoperoxidação sobre a indução apoptótica parece relacionar-se com o aumento de cálcio intracelular, provocado pela permeabilização da membrana mitocondrial e retículos endoplasmáticos. Desta maneira, há liberação de citocromo *c* por mecanismos independentes da formação do PTPM e ativação de pró-caspases da via de morte celular programada (MACCARRONE; MELINO; FINAZZI-AGRO, 2001).

A estes relatos somam-se ainda outros diversos que relacionam a lipoperoxidação com a indução de morte celular por apoptose (YUKI 2003; MACCARRONE; TACCONE-GALLUCC; FINAZZI-AGRÒ, 2003; MAHÉO *et al.*, 1995; EVANGELOU, 2002). Considerando esta relação extensivamente descrita, e a ação inibidora da CTE promovida por SYD-1 (HALILA *et al.*, 2007), que poderia aumentar a formação de EROS e induzir a lipoperoxidação, o resultado apresentado na figura 9 é um tanto curioso, já que o composto parece proteger a organela deste processo.

Por outro lado, alguns estudos apontam que a proteção ao processo lipoperoxidativo pode evitar o desenvolvimento de tumores associados a condições de estresse oxidativo (TOYOKUNI, *et al.*, 1990; ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991). Este é o caso do estudo realizado por Matos, Di Mascio e Medeiros (2000), no qual sugeriu-se que a atividade protetora do licopeno na promoção de tumores associados ao estresse oxidativo induzido por sobrecarga de ferro - condição similar ao ensaio de lipoperoxidação aqui realizado -, deve estar relacionada à redução da lipoperoxidação de membranas e DNA. Neste sentido, o resultado observado para o SYD-1 parece promissor, já que o composto reduziu a lipoperoxidação induzida em mitocôndrias isoladas (FIGURA 9). No entanto, é importante ressaltar que a redução da lipoperoxidação promovida pelo SYD-1 em mitocôndrias isoladas (FIGURA 9), não significa que este efeito se reproduza em células, uma vez que nas mesmas outros mecanismos estão envolvidos na produção, bem como na defesa contra EROS (USHIO-KUKAI; NAKAMURA, 2008). Neste sentido, Mendez-Sanchez (2009) observou, que o mesoiônico MI-D (4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina cloreto), apesar de inibir a lipoperoxidação em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, promoveu aumento na produção de peróxidos em células HeLa.

A partir do resultado apresentado (FIGURA 9), resta esclarecer por qual mecanismo SYD-1 inibiria a lipoperoxidação. Sabe-se que o aumento da velocidade do transporte de elétrons na cadeia respiratória leva a uma diminuição da formação de EROS, como consequência da diminuição do vazamento de elétrons (KOWALTOSKI, *et al.*, 2001). O SYD-1 poderia inibir a lipoperoxidação ao promover o aumento nesta velocidade. Na verdade, esta é uma hipótese aceitável uma vez que mitocôndrias de

fígados de ratos tratadas com  $1,5 \mu\text{mol.mg}^{-1}$  de SYD-1 apresentaram um aumento de  $\pm 4$  vezes na velocidade respiratória durante o estado 4 da respiração (Halila *et al.*, 2007), caracterizando um efeito desacoplador comparável ao do protonóforo FCCP. Com o objetivo de investigar esta possibilidade, foi conduzido o experimento seguinte, no qual o processo lipoperoxidativo foi induzido pela adição de um gerador de radicais, que promove tal efeito de maneira independente ao funcionamento da CTE.

## 6.2 EFEITO DO SYD-1 SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO INDUZIDA POR AAPH

A susceptibilidade de mitocôndrias isoladas de fígado de rato ao evento lipoperoxidativo induzido por radicais não provenientes da cadeia transportadora de elétrons foi avaliada utilizando-se AAPH como desencadeador do processo. O azo-composto termolábil solúvel em água, AAPH - 2,2\*-azobis(2-amidinopropano) - (FIGURA 10), é utilizado para este fim devido a sua capacidade de decompor-se, a  $37^\circ\text{C}$ , em radicais centrados no carbono, que ao reagirem com o oxigênio formam radicais peroxil capazes de abstrair o hidrogênio de lipídios peroxidáveis (HANLON; SEYBERT, 1997).

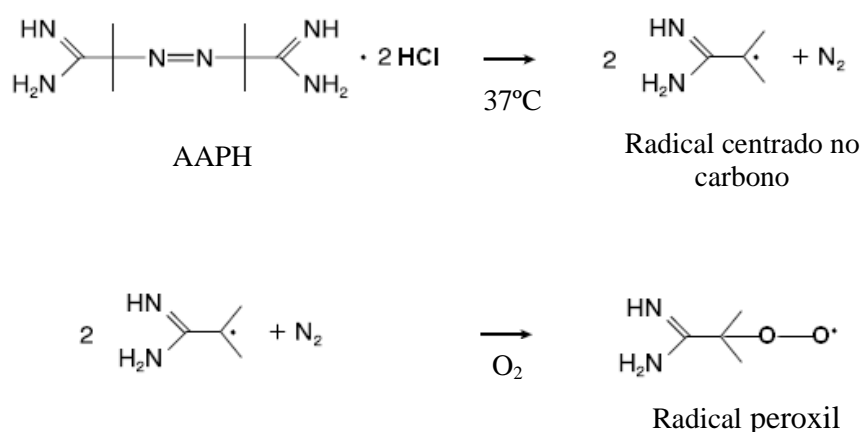


FIGURA 10. Decomposição do AAPH na presença de O<sub>2</sub>.

FONTE: HANLON e SEYBERT (1997).

NOTA: Estrutura química do AAPH - 2,2\*-azobis(2-amidinopropano) diidrocloreto, do radical gerado quando o mesmo é exposto a  $37^\circ\text{C}$  e do radical peroxil gerado quando o radical de carbono reage com o oxigênio.

Observou-se nesta condição, que o SYD-1 não foi capaz de inibir a lipoperoxidação de maneira significativa em nenhuma das concentrações testadas quando comparadas ao controle (ausência de SYD-1) (FIGURA 11).

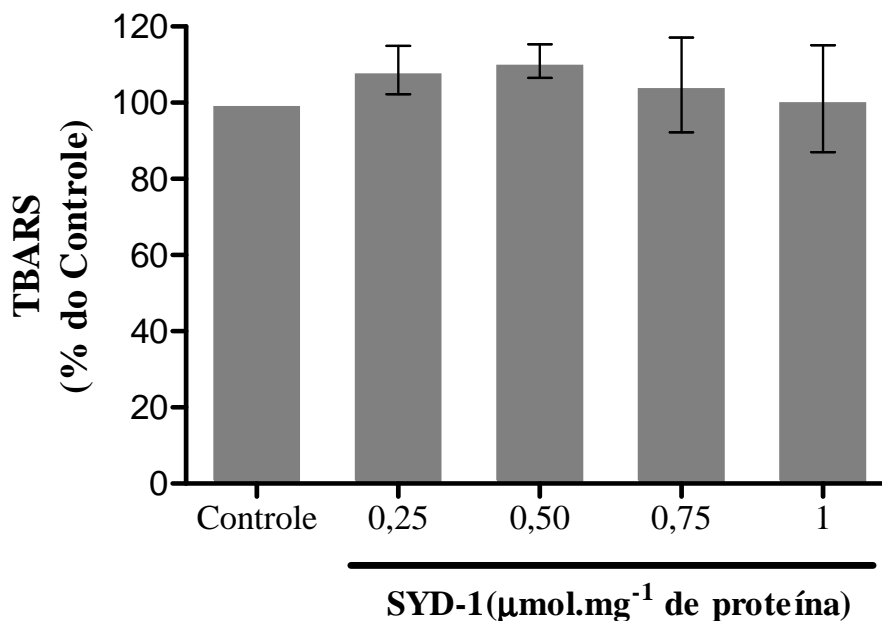


Figura 11. Efeito do SYD-1 sob a lipoperoxidação induzida por AAPH em mitocôndrias.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2 e  $1 \text{ mg prot.mL}^{-1}$ , a  $37^\circ\text{C}$ . A reação foi iniciada pela adição de AAPH  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$  na ausência (controle) e na presença de SYD-1 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 5.5.2. Os valores representam a média  $\pm$  dp de 4 experimentos independentes, onde 100% corresponde a  $2.76 \pm 0,2 \text{ } \eta\text{mol}$  de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por  $\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.

Mendez-Sanchez *et al.* (2009) observaram efeitos semelhantes aos do SYD-1 em ensaios de lipoperoxidação com o composto mesoiônico MI-D. Apesar de encontrar diminuições significativas na lipoperoxidação induzida com o azocomposto ( $\sim 22\%$  para maior concentração de MI-D -  $80 \text{ nmol.mg}^{-1}$  proteína), uma inibição de  $\sim 98\%$  foi observada para a mesma concentração do mesoiônico no ensaio induzido por

radicais gerados durante a respiração mitocondrial, sugerindo que o desacoplamento atribuído ao MI-D, anteriormente descrito por Cadena *et al.* (1998), poderia justificar em parte os resultados observados sobre a lipoperoxidação. Como mencionado anteriormente, também para o SYD-1 foi evidenciado um efeito desacoplador (Halila *et al.*, 2007). Por outro lado, os mesmos autores descreveram que a sidnona é capaz de inibir o transporte de elétrons em níveis de complexo I, III e IV, o que poderia aumentar a produção de radicais superóxido e induzir a lipoperoxidação (JONES, 2006; NICHOLLS; FERGUSON, 2002). Similarmente, MI-D é capaz de inibir o transporte de elétrons, porém em sítios diferentes da CTE, entre os complexos I e III. Desta forma, para os dois mesoiônicos, MI-D e SYD-1, a ação desacopladora parece sobrepor-se a inibição promovida pelos compostos sobre o transporte de elétrons, quando se trata da lipoperoxidação.

De posse da informação de que o SYD-1 é capaz de inibir a lipoperoxidação induzida pela respiração mitocondrial, e sabendo-se que o principal produto radicalar deste processo, fundamental para iniciar a lipoperoxidação, é o  $O_2^{\bullet-}$ , investigou-se a possibilidade de seqüestro desta espécie pelo composto, como descrito a seguir.

### 6.3 EFEITO DO SYD-1 SOBRE O SEQUESTRO DE RADICAIS SUPERÓXIDO

Para investigar a capacidade seqüestradora de radicais superóxido pelo SYD-1, utilizou-se o sistema não-enzimático PMS/NADH livre de mitocôndrias. Neste ensaio NADH promove a redução do PMS, que é reoxidado pelo  $O_2$  formando  $O_2^{\bullet-}$ . A reação é acompanhada através da redução do NBT a diformazan pelo radical formado.

Como observado na figura 12, SYD-1 foi capaz de seqüestrar  $O_2^{\bullet-}$  em aproximadamente 6, 10, 12 e 14% para as concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e  $1,0\mu\text{mol.mL}^{-1}$ , respectivamente. Embora o composto tenha apresentado esta capacidade, a magnitude do efeito ( $\sim 14\%$  -  $1,0\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) não justifica a inibição da lipoperoxidação observada quando os radicais foram originados pela CTE ( $\sim 100\%$  -  $1,0\mu\text{mol.mL}^{-1}$ , FIGURA 9). Deve-se ainda considerar as diferenças experimentais, uma vez que no ensaio de lipoperoxidação em mitocôndrias estão presentes as enzimas antioxidantes. Desta forma, a sobreposição dos efeitos de desacoplamento e seqüestro

de radicais  $O_2^{\cdot -}$  pode justificar o efeito inibitório do SYD-1 sobre a lipoperoxidação ferro-induzida dependente da CTE.

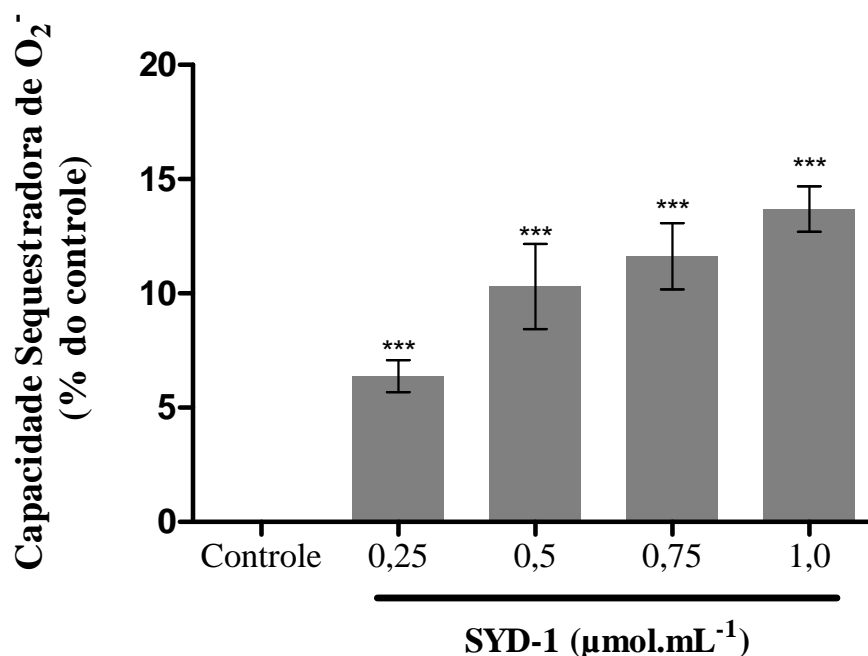


Figura 12. Capacidade sequestradora de radicais superóxido por SYD-1

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl  $10\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 8, NADH  $340\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ , NBT  $72\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ , PMS  $30\ \mu\text{mol.L}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . A reação foi iniciada pela adição do NADH e acompanhada a  $560\text{nm}$  durante 1 minuto na ausência (controle) e na presença de SYD-1 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.7.1 Os valores estão expressos em porcentagem de radical superóxido sequestrado em relação ao controle (ausência de SYD-1) de 4 experimentos independentes em quadruplicata. \*\*\* Significativamente diferente do controle ao nível de  $p < 0,001$ .

As espécies reativas de oxigênio têm recentemente emergido como alvo de pesquisas para o desenvolvimento de drogas antitumorais, uma vez que o entendimento sobre a relação das alterações redox e a progressão tumorigênica estão cada vez mais evidentes. Mudanças na homeostase redox e nos níveis de EROS podem afetar a viabilidade celular através da abertura do PTPM, seguida da liberação de citocromo *c* e ativação de pró-caspases. Desta forma, a sinalização para sobrevivência ou morte celular depende da regulação dos mecanismos de defesa antioxidantes disponíveis (WONDRAK, 2009).



Em determinados casos a geração de radicais livres pode representar um fator limitante para a utilização de agentes antineoplásicos. Este é o caso da Doxorubicina, fármaco amplamente utilizado numa variedade de neoplasias humanas, que promove a geração de radicais livres no coração, levando ao desenvolvimento de cardiomiopatias por mecanismos de peroxidação lipídica, dano mitocondrial, injúria ferro-induzida a macromoléculas, acúmulo de superóxido e formação de peroxinitrito (OSMAN, *et al.*, 2009). Em 2009, Osman *et al.* avaliou o uso da Doxorubicina em ratos com carcinoma de Erlich em associação com o Metimazol, na tentativa de diminuir os efeitos colaterais desencadeados pela primeira. O Metimazol, embora seja normalmente utilizado para o tratamento de hipertireoidismo, tem apresentado resultados promissores na redução da toxicidade de vários quimioterápicos nefrotóxicos, efeito que deve-se a sua potente atividade antioxidante. Através de marcadores bioquímicos e exame histopatológico do tecido cardíaco, os pesquisadores puderam concluir que a co-administração de Metimazol reduziu os danos cardíacos induzidos por Doxorubicina.

A atividade seqüestradora de radicais superóxido do SYD-1 (FIGURA 12) pode representar um importante diferencial no mecanismo de ação deste composto. Neste sentido, seria interessante avaliar sua utilização em associação com outras drogas antineoplásicas que promovem como efeito indesejado condições de estresse oxidativo, em estudo similar ao descrito por Osman *et al.* (2009).

A capacidade de seqüestrar radicais superóxido dos compostos mesoiônicos não é restrita a classe das sidnonas. Mendez-Sanchez *et al.* (2009), utilizando MI-D nas mesmas condições experimentais descritas neste estudo, demonstraram que o composto apresenta uma capacidade seqüestradora de ~31% ( $80\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), valor que exclusivamente também não foi capaz de justificar a inibição da lipoperoxidação ferro-induzida (~98%).

Outros compostos heterocíclicos também são capazes de seqüestrar  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , como demonstrado por Kagawa *et al.* (2004), que utilizou o sistema Xantina/Xantina Oxidase para estimar a atividade superóxido dismutase da flavona e seus metabólitos flavonona, 2,3-trans-flavonol e isoflavona. O derivado 2,3-trans-flavonol apresentou a maior capacidade seqüestradora, alcançando em torno de 25% na concentração de 100

$\mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto, os restantes apresentaram valores em torno de 10% para a mesma concentração.

Ainda buscando esclarecer os mecanismos pelo qual SYD-1 inibiu a lipoperoxidação dependente da CTE, determinou-se a capacidade de SYD-1 quelar íons ferro ao considerar sua importância nas reações de propagação lipoperoxidativa e na formação de EROS.

#### 6.4 CAPACIDADE QUELANTE DE FERRO DO SYD-1

No experimento discutido no item 6.1, o ferro adicionado na forma de  $\text{FeCl}_3$  possui o papel de catalisar a fase de propagação da lipoperoxidação. Neste processo, o ferro converte hidroperóxidos lipídicos em radicais altamente reativos (alcoxila e peroxila) que, por sua vez, iniciam uma nova cadeia de reações, denominada ramificação. Estas podem ser rápidas ou lentas, dependendo da valência do ferro, como mostrado nos esquemas 5 e 6 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HERMES-LIMA, 2004):



SYD-1 apresenta em seu anel oxadiazol um substituinte de oxigênio com carga líquida negativa (FIGURA 8), o que poderia impedir a propagação da reação de lipoperoxidação, uma vez que átomos doadores de elétrons, como oxigênio e nitrogênio, são capazes de ligar-se fortemente ao ferro. É reconhecida a capacidade quelante de heterocíclis, como o Desferrithiocin (DFT) - ácido [2-(3-hidropiridin-2-il)-4-metil-4,5-diidrotiazol-4-carboxílico (FIGURA 13) – através da ligação do metal ao oxigênio fenólico o ao átomo de nitrogênio tiazólico (KALINOWSKI; RICHARDSON, 2005).

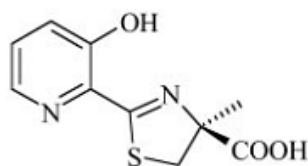


Figura 13. Estrutura química do ácido [2-(3-hidropiridin-2-il)-4-metil-4,5 diidrotiazol-4-carboxílico (DFT).

FONTE: KALINOWSKI e RICHARDSON (2005)

Para avaliar esta possibilidade, foi realizado um espectro de varredura de SYD-1 na presença de  $\text{FeCl}_3$  (FIGURA 14), afim de observar se há alguma mudança no perfil de absorção que indique a formação de complexo entre o mesoiônico e o ferro.

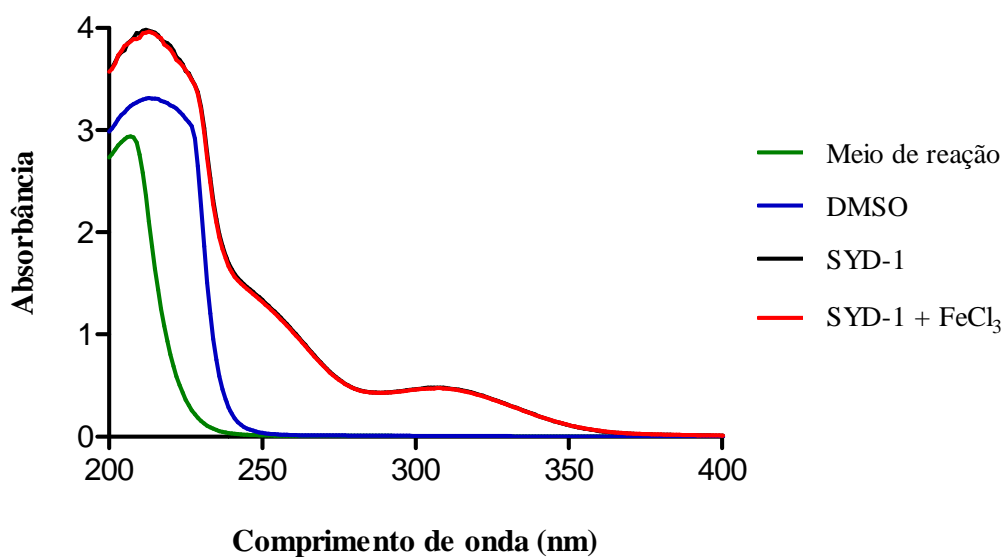


Figura 14. Espectro de absorção de SYD-1 na presença de  $\text{FeCl}_3$ .

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2,  $\text{FeCl}_3$   $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  de SYD-1.

A figura 14 mostra que o espectro de absorção do SYD-1 (~300-340nm) não se modifica em presença de  $\text{FeCl}_3$ , sugerindo que o mesoiônico não interfere nas reações de propagação do processo lipoperoxidativo.

## 6.5 EFEITOS DE SYD-1 SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Os resultados apresentados até o momento sugerem que a ação inibitória de SYD-1 sobre a lipoperoxidação deve-se ao seu efeito desacoplador, e em menor extensão à captura de radicais responsáveis pela fase de iniciação do processo peroxidativo. No entanto, torna-se importante avaliar os efeitos da sidnona sobre as defesas antioxidantes, particularmente sobre as atividades de Mn-SOD, CAT, Gpr e Gpx, que estão entre as enzimas intracelulares mais importantes na defesa antioxidante em humanos (STEINBRENNER; SIES, 2009). Os resultados destes experimentos são descritos a seguir.

### 6.5.1 Mn-Superóxido dismutase (Mn-SOD)

Para avaliar os efeitos do SYD-1 sobre a Mn-SOD, mitocôndrias rompidas por ciclos de congelamento e descongelamento foram utilizadas como fonte da enzima, a qual é responsável pela dismutação do radical superóxido produzido pelo sistema PMS/NADH, como descrito no item 5.5.3.1. Para garantir que as outras isoformas de SOD não interferissem nos valores de atividade encontrados para Mn-SOD, incubou-se as mitocôndrias com KCN para inibir a ação de Cu e Zn-SOD.

Na figura 15 observa-se que SYD-1 não interfere significativamente na atividade da Mn-SOD quando comparado ao controle (ausência de SYD-1). Neste resultado chama a atenção a ausência de atividade sequestradora de  $O_2^{\bullet-}$  de SYD-1 demonstrado na figura 12 (~14% na maior concentração de  $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  prot.). No entanto, é importante ressaltar que existem importantes diferenças experimentais nos ensaios realizados. Para avaliação da atividade da SOD foram utilizadas concentrações menores de NBT, NADPH e PMS (5.5.3.1– materiais e métodos). Sendo assim, com o objetivo de verificar se a atividade sequestradora de  $O_2^{\bullet-}$  do SYD-1 também ocorreria nestas concentrações, realizaram-se novos experimentos nesta condição. Observa-se na figura 16 uma capacidade sequestradora de ~9, 14, 13 e 19% para as concentrações de

0,25; 0,50; 0,75 e 1,0  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  de SYD-1, respectivamente, efeito similar ao observado na figura 12.

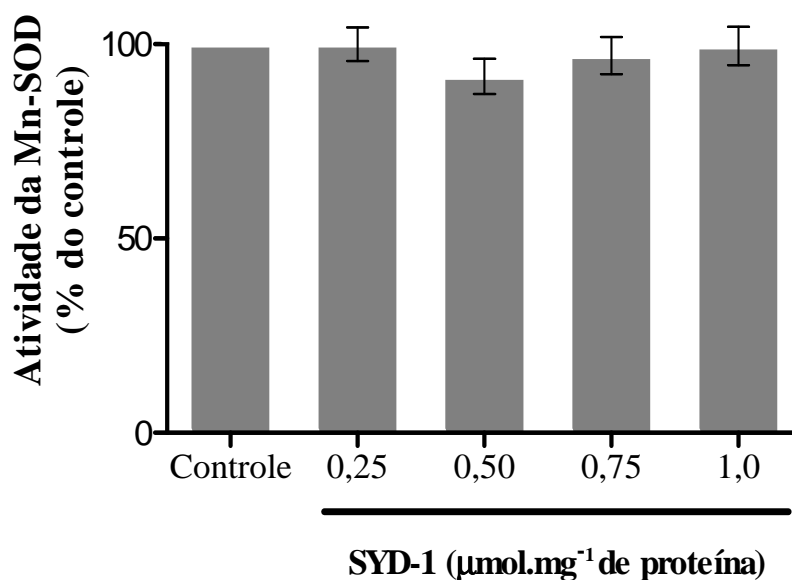


Figura 15. Efeito do SYD-1 sobre a atividade da superóxido dismutase mitocondrial. (Mn-SOD)

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl  $10\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 8, NADPH  $70\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ , NBT  $21\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ , PMS  $9\ \mu\text{mol.L}^{-1}$  e KCN  $6\text{mmol.L}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . A reação foi iniciada pela adição do NADPH e acompanhada a  $560\text{nm}$  durante 1 minuto. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.5.3.1. Os valores estão expressos em porcentagem de atividade com relação ao controle (ausência de SYD-1) e representam a média  $\pm$  dp de 5 experimentos independentes em quadruplicata. 100% corresponde a 1 unidade de SOD, que equivale a inibição de 50% da taxa de redução do NBT.

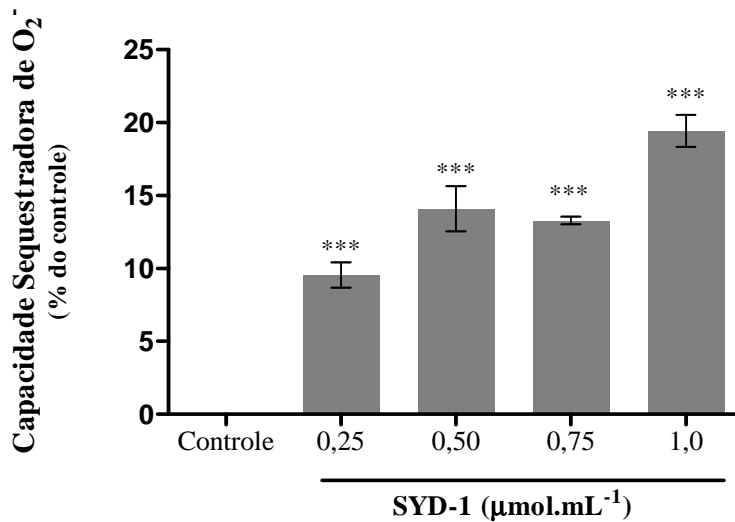


Figura 16. Capacidade seqüestradora de radicais superóxido por SYD-1.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl 10mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8, NADPH 70 µmol.L<sup>-1</sup>, NBT 21 µmol.L<sup>-1</sup>, PMS 9 µmol.L<sup>-1</sup> a 25°C. A reação foi iniciada pela adição do NADPH e acompanhada a 560nm durante 1 minuto na ausência (controle) e na presença de SYD-1 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.7.1. Os valores estão expressos em porcentagem de radical superóxido sequestrado em relação ao controle (ausência de SYD-1) de 2 experimentos independentes em quadruplicata. \*\*\* Significativamente diferente do controle ao nível de p< 0,001.

Diante deste resultado restou ainda a questão: se a atividade seqüestradora pode ser observada mesmo em concentrações menores dos reagentes, por que não pode ser vista no ensaio de atividade da SOD? Para responder a esta pergunta é importante considerar que o ensaio de atividade seqüestradora de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é realizado em sistema “limpo”, ou seja, na ausência de proteínas e lipídeos, enquanto que no ensaio de atividade da SOD mitocôndrias rompidas foram utilizadas como fonte da enzima. Desta forma, uma possível interação do SYD-1 com lipídeos e proteínas, o que é plausível devido as suas características estruturais, poderia diminuir a disponibilidade/habilidade do composto para seqüestrar O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Neste contexto, Halila *et al.* (2007), atribuíram a inibição do estado 3 da respiração em baixas concentrações de SYD-1 às suas características lipofílicas, que favoreceriam sua interação com os componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Ainda no mesmo estudo, a diminuição do inchamento induzido por valinomicina-K<sup>+</sup> e a alteração na habilidade

de contração das mitocôndrias tratadas, sugeriram que SYD-1 compromete a integridade das membranas mitocondriais.

Mendez-Sanchez (2009) também avaliou o efeito de um composto mesoiônico, o MI-D, sobre a atividade da SOD utilizando extrato de células HeLa como fonte da enzima. O composto não apresentou efeito nas concentrações utilizadas (5, 15 e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e, também como o SYD-1, apresentava atividade seqüestradora de radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

### 6.5.2 Catalase (CAT)

Como mencionado anteriormente, a CAT possui um papel fundamental na proteção contra o estresse oxidativo, considerando que a disponibilidade de seu substrato favorece a produção de  $\text{OH}^{\cdot}$  na presença de metais (HERMES-LIMA, 2004). O acúmulo de peróxido de hidrogênio pode ocasionar, além da peroxidação lipídica, abertura do PTPM com liberação de citocromo *c* e ativação da cascata pró-apoptótica. (SALVI, *et al.* 2007).

Também tem sido proposto, que o estresse oxidativo está envolvido na etiologia e progressão do câncer, e neste contexto, Lin e Yin (2009) demonstraram que pacientes com vários estágios de metástase de hepatocarcinoma celular apresentaram atividade diminuída de CAT, Gpx e SOD, favorecendo o acúmulo de radicais livres, fato evidenciado pelo aumento da lipoperoxidação no plasma destes pacientes.

Para avaliar os efeitos de SYD-1 sobre a catalase, inicialmente foi realizada uma purificação mitocondrial com Percoll para certificar-se que a suspensão mitocondrial obtida por centrifugação diferencial não continha contaminantes de CAT citoplasmática.

Percoll é um meio para centrifugação em gradiente de densidade utilizado para separação de células, vírus e partículas subcelulares. É composto por partículas de sílica coloidal recobertas em polivinilpirrolidina (VINCENT; NADEAU, 1984) onde na densidade de 1.070-1.100g/mL encontra-se as mitocôndrias purificadas (RIGOBELLO, *et al.* 2001).

A concentração de proteínas mitocondriais diminuiu de  $85,50\text{mg.mL}^{-1}$  para  $75\text{mg.mL}^{-1}$  após a purificação, e o CCR reduziu-se de 5 para 4,5, contudo a atividade da CAT não foi alterada significativamente (FIGURA 17). Por este motivo, não foram realizadas purificações mitocondriais para determinação da atividade desta enzima.

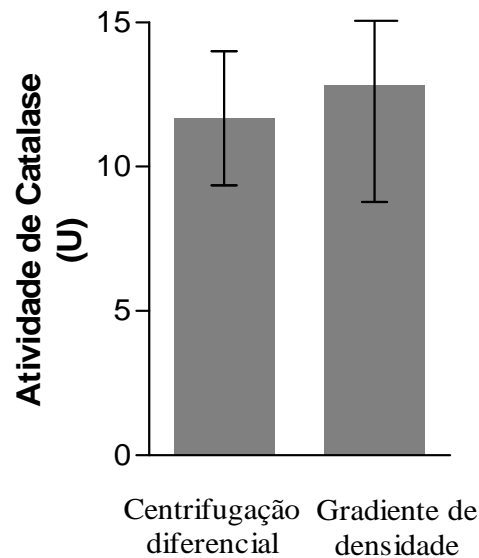


Figura 17. Influência da purificação da fração mitocondrial sobre a atividade da catalase.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: Tampão fosfato  $50\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10\text{mmol.L}^{-1}$ , e  $500\mu\text{g}$  proteína. $\text{mL}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . A reação foi iniciada pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e acompanhada a  $240\text{nm}$  durante 60 segundos na ausência (controle) e na presença de SYD-1 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos 5.5.3.4. Os valores estão expressos em unidade de atividade (U). 1U corresponde a  $1\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposto ( $\text{mg}$  proteína. $\text{min}^{-1}$ ) considerando o coeficiente de extinção molar  $0,394\text{mmol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$ ).

Para determinar a atividade da enzima, mitocôndrias intactas foram incubadas com ou sem SYD-1 na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e sua decomposição foi acompanhada em  $240\text{nm}$ . Os resultados estão representados na figura 18, onde se observa que o composto não promoveu alteração significativa em relação ao controle (ausência de SYD-1).



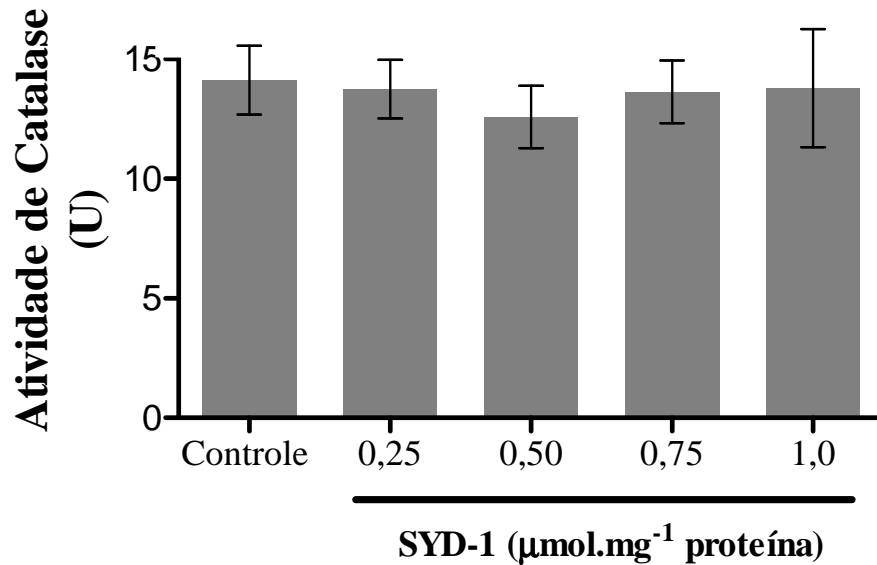


Figura 18. Efeito do SYD-1 sobre a atividade da catalase.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: Tampão fosfato 50mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mmol.L<sup>-1</sup>, e 500µg proteína.mL<sup>-1</sup> a 25°C. A reação foi iniciada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e acompanhada a 240nm durante 60 segundos na ausência (controle) e na presença de SYD-1 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos 5.5.3.4. Os valores estão expressos em unidade de atividade (U) e representam a média ± dp de 5 experimentos independentes em quadruplicata. 1U corresponde a 1µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposto (mg proteína.min<sup>-1</sup>) considerando o coeficiente de extinção molar 0.394mmol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-1</sup>).

### 6.5.3 Glutationa peroxidase (Gpx)

Com o objetivo de prevenir as conseqüências deletérias da reação de Fenton, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também é detoxificado na matriz mitocondrial através da Gpx-1 (ALEXEYEV, 2009), enquanto Gpx-4 atua na organela como redutor de hidroperóxidos lipídicos. Estudos *in vitro* demonstraram que a superexpressão de Gpx-1 ou Gpx-4 aumentam a resistência celular ao estresse oxidativo ocasionado por diferentes mecanismos de morte celular, assim como o aumento da resistência de ratos à letalidade induzida pelos agentes geradores de radical superóxido Paraquat e Diquat (STEINBRENNER; SIES, 2009).

Neste estudo a atividade da Gpx foi estimada através de um ensaio onde a glutatona oxidada (GSSG), produzida durante a redução do hidroperóxido (R-OOH) pela enzima (ESQUEMA 2), foi reciclada a seu estado reduzido pela ação da Gred

(ESQUEMA 3). A velocidade de oxidação do NADPH foi acompanhada na ausência (controle) e em diferentes concentrações de SYD-1 (FIGURA 19).

Observou-se uma diminuição significativa de aproximadamente 29, 42, 60 e 66% na atividade da Gpx para as concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0  $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente (FIGURA 19).

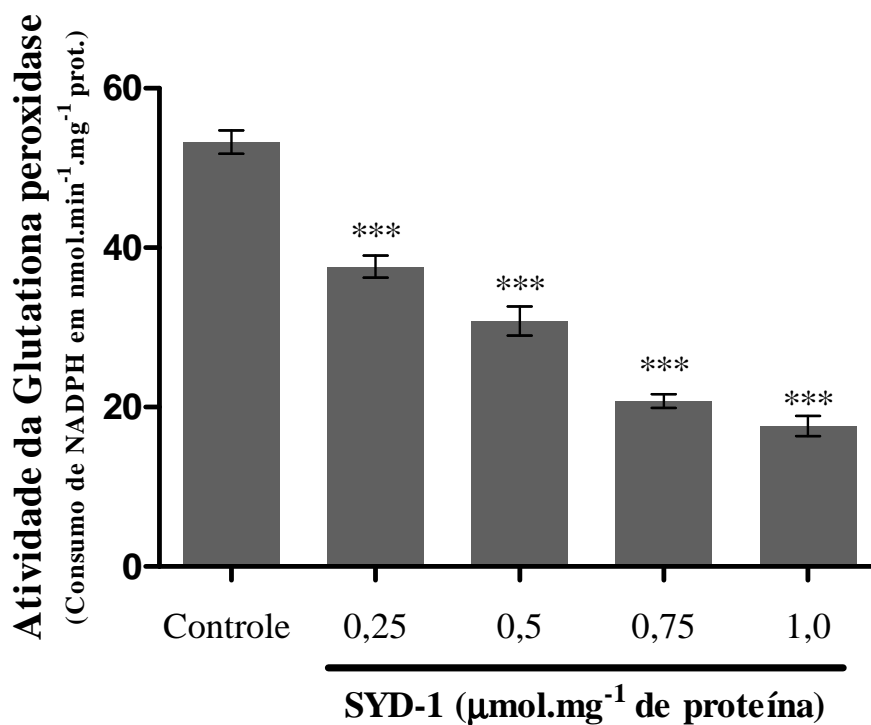


Figura 19. Efeito do SYD-1 sobre a atividade da glutaciona peroxidase.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: Tampão fosfato  $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7, EDTA  $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , GSSG ( $0,66 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), NADPH ( $0,075 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $200 \mu\text{g} \text{proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . A reação foi iniciada pela adição de GSSG e acompanhada a  $340 \text{nm}$  durante 5 minutos na ausência (controle) e na presença de SYD-1 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos 5.5.3.2. Os valores estão expressos em consumo de NADPH em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  prot., considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH ( $6220 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) e representam a média  $\pm$  dp de 4 experimentos independentes em quadruplicata. \* Significativamente diferente do controle ao nível de  $p < 0,05$ .

A importância da atividade de Gpx para sobrevivência celular pode ser evidenciada por estudos envolvendo ratos transgênicos, onde embriões homozigotos

para Gpx-4 (-/-), obtidos de cruzamento de heterozigotos Gpx-4 (+/-), apresentam morte por apoptose 7,5 a 8,5 dias após sua fixação no útero murino (IMAI, *et al.*, 2003).

Enzimas envolvidas no processo de lipoperoxidação têm demonstrado mecanismos de regulação associados à atividade de Gpx-4. As lipoxigenases e cicloxigenases, por exemplo, necessitam ser oxidadas para sua ativação completa, e por regular os níveis celulares de peróxido, Gpx-4 participa no controle de suas atividades (SEILER, *et al.*, 2008). Utilizando um sistema induzível de knockout *in vitro* em fibroblastos embrionários de ratos, Seiler *et al* (2008) observaram que a suplementação com substratos específicos para as enzimas lipoxigenases e cicloxigenases em células Gpx-4 (-/-) resultou no aceleração da morte celular. Os autores também demonstraram colapso no potencial de membrana mitocondrial e translocação do fator indutor de apoptose por via independente de caspase-3. Neste sentido, ao inibir a Gpx, SYD-1 poderia induzir a lipoperoxidação via ativação de lipoxigenases e cicloxigenases, promovendo morte celular por apoptose. Embora tenha-se observado um efeito inibitório sobre a lipoperoxidação mitocondrial ferro-induzida, são necessários outros experimentos envolvendo sistemas celulares completos para averiguar esta possibilidade.

Méndez-Sánchez (2009) observou um aumento de ~30% na produção de peróxidos em células HeLa tratadas com 20 e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D, e na mesma proporção (~30% - 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), observou um aumento na atividade de Gpx. Estes mesmos efeitos podem ocorrer no caso do SYD-1, uma vez que inibição da Gpx mitocondrial pode acarretar em aumento na concentração de peróxidos em nível celular, elevando a atividade de Gpx citoplasmáticas.

#### 6.5.4 Glutationa redutase

A enzima glutaciona redutase, pertencente a uma família de flavoproteínas redutases, desempenha uma importante função no processo redox intracelular ao disponibilizar tióis livres na forma reduzida da glutaciona. A Gred catalisa a redução reversível, dependente de nucleotídeo de piridina, da glutaciona oxidada, formando

duas moléculas de glutatona reduzida (ANDRÉS, *et al.* 1996), como mostrado no esquema 3.

Para avaliar a atividade desta enzima, acompanhou-se o consumo de NADPH em 340nm na presença de glutatona oxidada e mitocôndrias rompidas com deoxicolato 0,5% como fonte de Gred (item 5.5.3.3).

Como mostrado na figura 20, SYD-1 foi capaz de reduzir a atividade da Gred significativamente em relação ao controle (ausência de SYD-1). Foi observada uma redução de ~13, 30, 41 e 47% na atividade enzimática com as concentrações de SYD-1 em 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente.

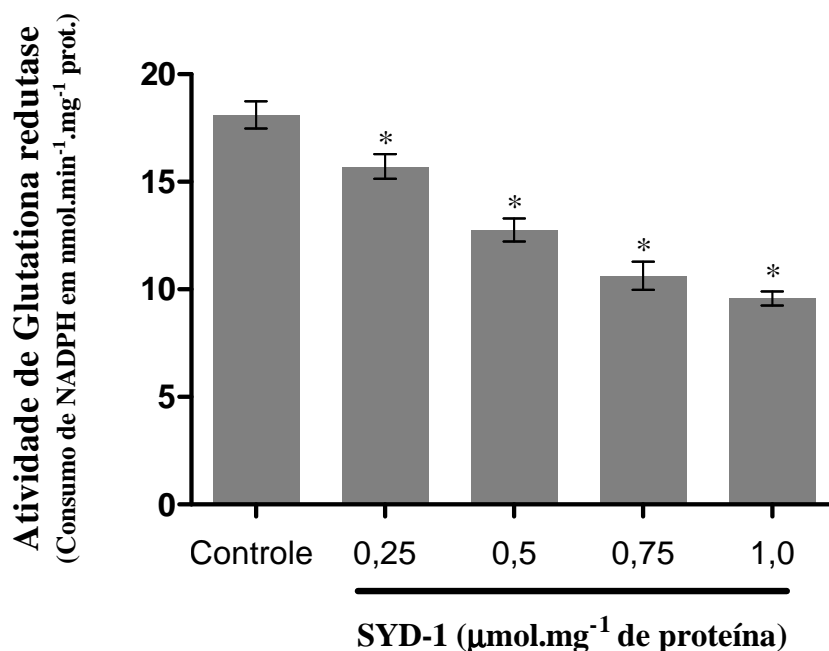


Figura 20. Efeito do SYD-1 sobre a atividade da glutatona redutase.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: Tampão fosfato  $100\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7, EDTA  $1\text{mmol.L}^{-1}$ , GSSG ( $0,66\text{mmol.L}^{-1}$ ), NADPH ( $0,075\text{mmol.L}^{-1}$ )  $200\mu\text{g proteína.mL}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . A reação foi iniciada pela adição de GSSG e acompanhada a 340nm durante 5 minutos na ausência (controle) e na presença de SYD-1 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos 5.5.3.3. Os valores estão expressos em consumo de NADPH em  $\text{nmol.min}^{-1}.\mu\text{g}^{-1}$  prot., considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH ( $6220\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) e representam a média  $\pm$  dp de 4 experimentos independentes em quadruplicata. \* Significativamente diferente do controle ao nível de  $p < 0,05$ .

Como demonstrado no item 6.5.3, os valores obtidos para a atividade de Gpx são resultantes da oxidação de NADPH catalisada pela Gred adicionada ao sistema. Neste contexto, o efeito inibitório da Gpx pode decorrer da diminuição da atividade de Gred promovida por SYD-1. Entretanto, os valores desta redução não podem justificar os efeitos sobre a Gpx, indicando que o composto também atue sobre esta enzima. Para esclarecer estes resultados, ensaios que não envolvam a participação de Gred devem ser realizados.

Interessantemente, as enzimas participantes do sistema glutathiona peroxidase possuem em comum nos seus centros catalíticos resíduos de selenocisteína, considerado o 21º aminoácido de ocorrência natural devido a sua presença em proteínas. A eficiente catálise desempenhada por selenoproteínas deve-se, principalmente, às propriedades bioquímicas deste aminoácido, pois o grupo selenol ( $pK_a \sim 5,2$ ) é mais ácido que o grupo tiol na cisteína ( $pK_a \sim 8,5$ ), que o torna um nucleófilo mais reativo, decorrente de sua desprotonação em pH fisiológico (STEINBRENNER; SIES, 2009). SYD-1 interage facilmente com grupos nucleofílicos de biomoléculas para exercer seu efeito tóxico, devido ao caráter nucleófilo do substituinte de cloro (GRYNBERG, *et al.*, 1992; DUNKLEY; THOMAN, 2003), e por esta característica, seu efeito inibidor na Gpx e Gred poderia ser justificado pela provável interação da sidnona com os grupos altamente nucleofílicos no centro catalítico da enzima.

Dentre os mecanismos de ação propostos para a ciclofosfamida, uma das drogas antineoplásicas alquilantes mais utilizadas no mundo, a indução do estresse oxidativo têm emergido de forma singular. Em trabalho envolvendo rins de ratos tratados com o composto, foi observada uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes como Cu, Zn-SOD, CAT, Gpx e Gred, decorrente de modificações estruturais promovidas por EROS (STANKIEWICZ; SKRZYDLEWSKA, 2003). Neste sentido, é possível que SYD-1 possa diminuir a atividade das enzimas CAT e Mn-SOD se analisadas em nível celular. Uma vez que SYD-1 inibe Gpx e Gred, o acúmulo de peróxido está favorecido, assim como mudanças estruturais e na atividade de enzimas antioxidantes.

Sabe-se que a coenzima NADPH é fundamental para a atividade das enzimas mitocondriais Gred e Gpx, e que sua ausência ou diminuição promove o aumento do

estresse oxidativo induzido por cálcio devido ao favorecimento do acúmulo de peróxido de hidrogênio (ZAGO, *et al.*, 2000). Uma vez o SYD-1 diminuiu a atividade destas enzimas, foram realizados experimentos para avaliar o estado redox dos nucleotídeos de piridina em mitocôndrias tratadas com o composto, na presença e ausência de cálcio, como descrito a seguir.

## 6.6 EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O ESTADO REDOX DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA.

A fluorescência intrínseca do NADH, a principal molécula transportadora de elétrons tanto no citosol como na mitocôndria, é um indicador sensível das mudanças no metabolismo energético e estresse oxidativo (KAHRAMAN; FISKUM, 2007). A forma reduzida desta molécula absorve luz em 320-380nm e emite fluorescência no alcance de 420-480nm. Sabendo-se que a forma oxidada não absorve luz nestes comprimentos de ondas, é possível avaliar seu estado redox na mitocôndria monitorando a absorbância do NADH na luz UV ou através da fluorescência azul emitida pela espécie (MAYEVSKY; CHANCE, 2007). Apesar do perfil de fluorescência do NADPH ser indistinguível ao do NADH, a contribuição do NADPH para a fluorescência intrínseca celular é pequena quando comparada ao do NADH (KAHRAMAN; FISKUM, 2007). Neste experimento, o sinal inicial de fluorescência deve-se a presença de NADH e NADPH, mas as alterações do mesmo refletem modificações no estado redox do NADPH, uma vez que a oxidação do NADH via complexo I foi bloqueada pelo uso de rotenona, e o substrato oxidável para CTE foi succinato.

O NADPH é a maior fonte mitocondrial de equivalentes redutores para os sistemas antioxidantes Gpx/Gred e tioredoxina peroxidase/redutase. Distúrbios em seu estado redox conduzem a uma condição de estresse oxidativo, como evidenciado em mitocôndrias isoladas de ratos “knockout” para receptores de LDL. Naquele trabalho evidenciou-se que a diminuição da razão NADPH/NADP<sup>+</sup>, ocasionada pela intensa atividade lipogênica em condições de hipercolesterolemia, direciona um aumento de

proteínas carbolinadas e produção de  $H_2O_2$  em mitocôndrias, além de reduzir a razão GSH/GSSG no fígado (PAIM, *et al.*, 2008).

Na figura 21 está representada a oxidação espontânea de nucleotídeos de piridina na presença e ausência (controle) de SYD-1. Como pode ser observado, o estado reduzido dos nucleotídeos de piridina permanece constante no controle e nas mitocôndrias tratadas com a menor concentração de SYD-1 ( $0,25\mu\text{mol.mg}^{-1}$  prot.). Contudo, há um aumento de ~5, 9 e 11 % na oxidação destes nucleotídeos quando as mitocôndrias são incubadas por 2 minutos com 0,5, 0,75 e  $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  de SYD-1, respectivamente.

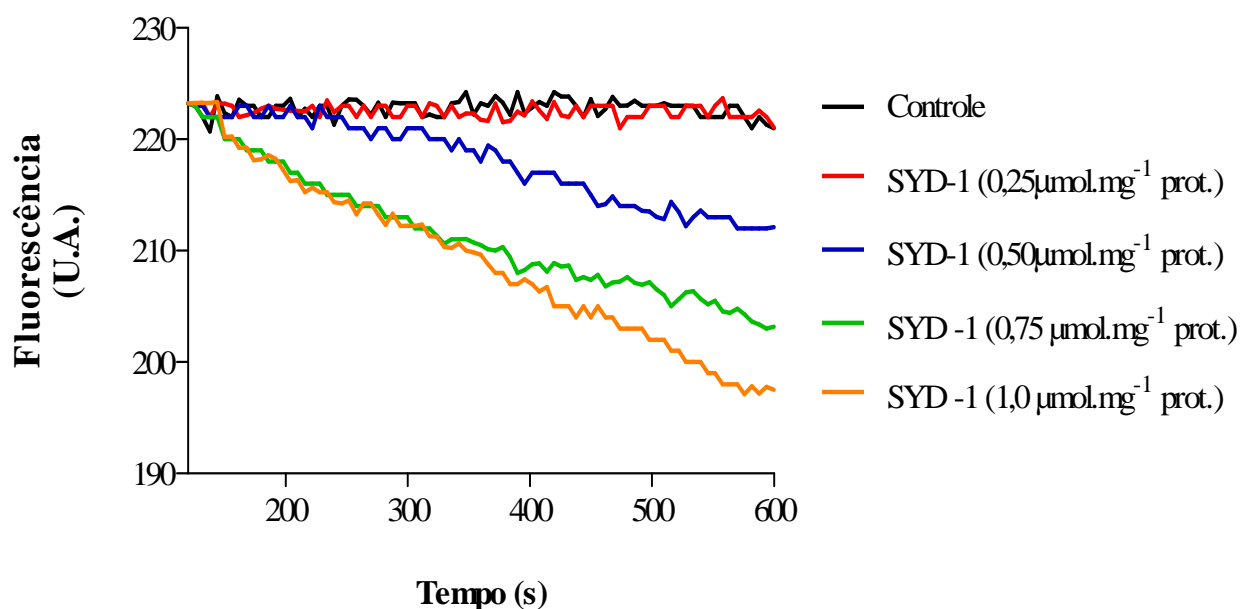


Figura 21. Efeito do SYD-1 sobre a oxidação espontânea de nucleotídeos de piridina.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: Sacarose  $125\text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $65\text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES-KOH  $10\text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7,4), rotenona  $2,5\text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $1\text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína mitocondrial,  $1\text{ mmol.L}^{-1}$  de isocitrato, e  $5\text{ mmol.L}^{-1}$  de succinato a  $30^\circ\text{C}$ . A reação foi disparada com succinato e acompanhada em 366nm de excitação e 450nm de excitação por 10 minutos na ausência (controle) e na presença de SYD-1 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.5.4. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e os traçados são representativos de 6 experimentos independentes em triplicata.

O efeito do SYD-1 sobre o estado de oxidação de nucleotídeos de piridina também tem sido descrito para outros compostos com atividade antitumoral. Santos *et*

*al.* (2007) ao analisar o efeito da cisplatina, uma droga antitumoral de platina amplamente utilizada no tratamento de câncer de cabeça, ovário e testículos, sobre a oxidação de nucleotídeos de piridina em mitocôndrias isoladas de córtex renal de ratos, encontraram uma redução de ~4 vezes no sinal da fluorescência de NADPH em relação às mitocôndrias não tratadas com o composto. Martins *et al.* (2008) realizou o mesmo experimento e observou efeito semelhante em mitocôndrias de fígado de rato, com o valor de redução da fluorescência muito próximo ao encontrado no trabalho de Santos *et al.* (2007).

As enzimas antioxidantes mitocondriais que utilizam NADPH como equivalente redutor estão envolvidas na remoção de peróxidos da organela (RIBEIRO, *et al.*, 2005) e, como observado nos itens 6.5.3 e 6.5.4, SYD-1 inibe a atividade de Gred e Gpx. Este fato pode favorecer o acúmulo de peróxidos e, conseqüentemente, a oxidação de NADPH, com observado nas mitocôndrias tratadas com as maiores concentrações de SYD-1. Para cisplatina, este efeito foi encontrado durante análise em homogeneizados de rins de ratos, onde a inibição significativa na atividade de Gpx (SADZUKA; SHOJI; TAKINO, 1991) e Gred resultou em acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KADIKOYLU, *et al.* 2004).

Além da glutathione peroxidase, uma família de selenoenzimas denominadas tioredoxinas redutases (TrxR) também é capaz de degradar hidroperóxidos através da redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos lipídicos (STEINBRENNER; SIES, 2009), restaurando ligações dissulfeto formadas em proteínas (MARÍ, *et al.*, 2009). Presente na mitocôndria, TrxR-2 reduz tioredoxina e vários outros substratos em uma complexa reação em cascata, requerendo a transferência de elétrons do NADPH (STEINBRENNER; SIES, 2009). A tioredoxina atua como doadora de hidrogênio para redução de peróxidos através da enzima peroxiredoxina (Prx), cuja isoforma III é detectada exclusivamente na mitocôndria (MARÍ, *et al.*, 2009).

Considerando estes sistemas antioxidantes presentes na mitocôndria, e o fato de que o SYD-1 promoveu a diminuição das atividades das enzimas Gpx e Gred (FIGURAS 19 e 20), a oxidação de NADPH observada na figura 21 poderia ser resultante da utilização deste equivalente redutor como co-fator da enzima TrxR. Como descrito anteriormente, o fato do SYD-1 inibir GPx pode ser devido a uma



interação seletiva com esta enzima devido aos resíduos de selenocisteína presentes em sua estrutura e ausentes na SOD e catalase, sobre as quais o composto não teve qualquer efeito. No entanto é importante salientar que, apesar de TrxR também possuir resíduos de selenocisteínas, suas localizações diferem ao longo da estrutura protéica. Na TrxR, o resíduo é encontrado próximo a região C-terminal da enzima, enquanto na Gpx está localizado no segmento N-terminal (LOBANOV; HATFIELD; GLADYSHEV, 2009), portanto se a inibição de Gpx por SYD-1 decorrer da ligação a este resíduo, o comportamento do composto em relação a TrxR não deve ser necessariamente semelhante. Este fato pode ser evidenciado pelo trabalho de Rigobello *et al.* (2004), que observaram o efeito da Auranofina, um composto à base de ouro utilizado no tratamento de artrite reumatóide e ultimamente testado para o tratamento de câncer, sobre a atividade das enzimas Gpx, Gred TrxR, encontrando um potente efeito de inibição apenas para última. No caso do SYD-1, esta suposta seletividade seria confirmada somente com ensaios específicos de atividade da TrxR na presença do composto.

Outro fator que deve ser considerado ao analisar os resultados encontrados na figura 21 é a capacidade inibitória de SYD-1 ao nível dos complexos transportadores de elétrons I, III e IV, descrito por Halila *et al.* (2007). É conhecido que inibidores do transporte de elétrons podem aumentar a produção de EROS, outro mecanismo pelo qual o composto poderia induzir a oxidação de NP.

A sobrecarga de cálcio na mitocôndria, como um fenômeno isolado, é capaz de induzir a geração espécies reativas, porém na presença de indutores como oxidantes de nucleotídeos de piridina, o estresse oxidativo é aumentado, conduzindo à formação do PTPM devido à exaustão de NADPH e GSH (ZAGO, *et al.*, 2000), este último considerado o antioxidante intracelular mais abundante que desempenha um papel crucial na morte por apoptose (LIUZZI, *et al.*, 2003). O mecanismo pelo qual este processo ocorre parece estar relacionado com o favorecimento da formação de  $H_2O_2$  decorrente da falta de substratos para as enzimas Gpx e Gred (ZAGO, *et al.*, 2000).

Neste sentido, avaliou-se o comportamento de SYD-1 na oxidação de nucleotídeos de piridina durante a sobrecarga de cálcio, como apresentado na figura 22. Com a adição de cálcio é possível observar um aumento na oxidação de NP

decorrente da indução do estresse oxidativo (ZAGO, *et al.*, 2000), quando comparado ao controle sem cálcio. Contudo, em suspensões mitocondriais incubadas com 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 $\mu\text{mol}$  de SYD-1 por miligrama de proteína mitocondrial, observa-se reduções de 11, 18, 36, e 48% na oxidação de NP, respectivamente. Este efeito está de acordo com a redução na atividade de Gred descrita no item 6.5.4, nesta situação limitando a oxidação da coenzima durante o estresse oxidativo induzido pela sobrecarga de cálcio.

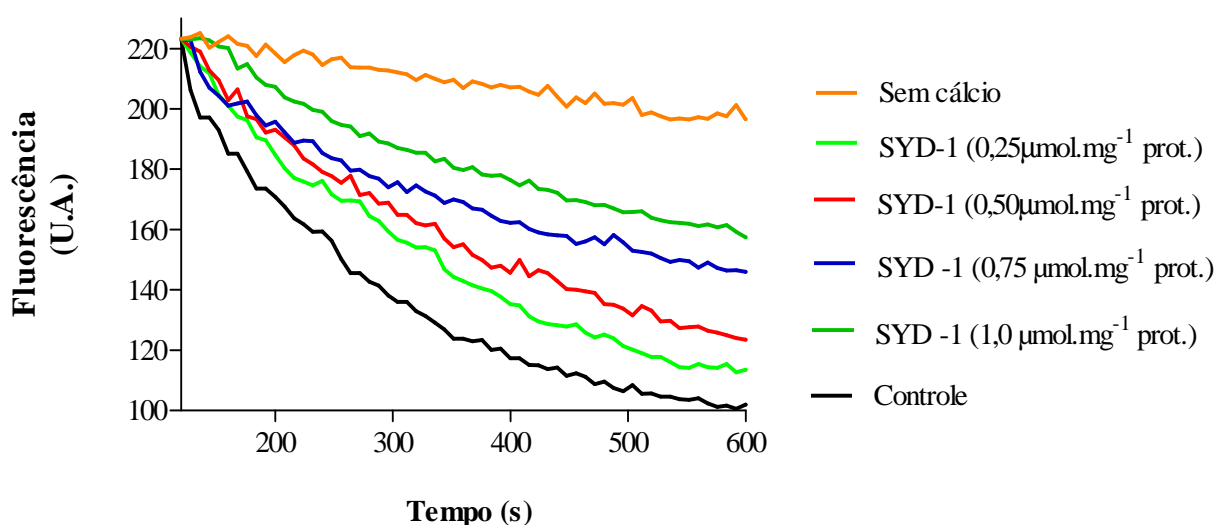


Figura 22. Efeito do SYD-1 sobre a oxidação de nucleotídeos de piridina induzida por cálcio.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: Sacarose 125  $\text{mmol.L}^{-1}$ , KCl 65 $\text{mmol.L}^{-1}$ , HEPES-KOH 10 $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,4), rotenona 2,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  de proteína mitocondrial, 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  de isocitrato, 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de succinato e 45-50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$  a 30°C. A reação foi disparada com succinato e acompanhada em 366nm de excitação e 450nm de excitação por 10 minutos na ausência (controle) e na presença de SYD-1 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item.5.5.4 Os valores estão expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e os traçados são representativos de 6 experimentos independentes em triplicata.

Outro fato que deve ser considerado ao interpretar os resultados apresentados na figura 22 é o efeito que o SYD-1 promove sobre o potencial de membrana. Como descrito por Halila *et al.* (2007), a sidnona nas mesmas concentrações aqui utilizadas diminui significativamente o potencial de membrana, o que poderia diminuir também

a redução do  $\text{NADP}^+$  na matriz mitocondrial. Sabe-se que o potencial de membrana relaciona-se diretamente com redução do  $\text{NADP}^+$  na matriz mitocondrial através da enzima NADH/NADP transidrogenase. Esta enzima, localizada na membrana mitocondrial interna, funciona com uma bomba de prótons, utilizando o gradiente eletroquímico de prótons gerado durante a respiração para deslocar a reação no sentido de formação de NADPH a partir da oxidação do NADH. Portanto, se a mitocôndria não estiver totalmente acoplada, ou seja, se o potencial de membrana estiver diminuído, a energia necessária para ativar a NADH/NADP transidrogenase pode não responder prontamente a altos níveis de oxidação de NADPH. Em adição aos efeitos sobre a transidrogenase, o SYD-1 ao colapsar o potencial de membrana poderia também comprometer de forma significativa a captação de cálcio, uma vez que a mesma é dependente do potencial de membrana (CHAKRABORTI, *et al.*, 1999; KISELYOV; MUALLEM 2008).

Tem sido evidenciado que os grupos tióis da adenina nucleotídeo translocase podem ser oxidados quando os níveis de NAD(P)H estão baixos, uma condição que favorece a abertura do PTPM (CATISTI; VERCESI, 1999). Outros estudos mostraram, entretanto, que o PTPM e o estado redox de NP estão dissociados, ou ainda, que a oxidação destes pode ser consequência ao invés de causa da transição de permeabilidade. Estes dados, por enquanto, permanecem contraditórios na literatura (COSTANTINI, *et al.*, 1996; BRUNNER; MOESLINGER; SPIECKERMAN, 2001; BATANDIER, *et al.*, 2004). Visto a provável relação entre oxidação de NP e formação do PTPM, avaliou-se o efeito de SYD-1 na transição de permeabilidade em presença de diferentes indutores, como descrito no próximo item.

## 6.7 EFEITOS DE SYD-1 SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

Como discutido anteriormente, a permeabilização da membrana mitocondrial interna conduz a liberação de proteínas do espaço intermembranas, como citocromo *c*, as quais conduzem, por fim, na morte celular via apoptose. Desta forma, a avaliação da

transição de permeabilidade mitocondrial pode ser utilizada como indicador inicial da apoptose (YANG, *et al.*, 2009).

Neste ensaio foi possível observar o inchamento mitocondrial através da diminuição da absorbância em 540nm, representando a formação do PTPM ao considerar que, na presença do imunossupressor ciclosporina A – responsável pela inibição da atividade peptidil-prolil cis-trans-isomerase de CyP-D (JAVADOV; KARMAZYN; ESCOBALES, 2009) – não há inchamento mitocondrial (FIGURA 23).

O estresse oxidativo é aparentemente o mais poderoso indutor da abertura do PTPM (JAVADOV; KARMAZYN; ESCOBALES, 2009), e diversos compostos dispõem de mecanismos baseados na interferência com a bioenergética mitocondrial para formação de EROS que conduzem à morte celular. Neste sentido, avaliou-se o comportamento de SYD-1 na presença de cálcio e fosfato, conhecidos indutores da formação do PTPM via geração de espécies reativas de oxigênio (CUSTÓDIO; MORENO; WALLACE, 1998).

Na figura 23, observa-se no experimento controle a redução da absorbância decorrente da formação/abertura do PTP induzida por cálcio e fosfato. Já em presença de ciclosporina e EGTA, conhecidos inibidores da TPM, os valores de absorbância permaneceram constantes. SYD-1 foi capaz de proteger o inchamento mitocondrial induzido por cálcio e fosfato em ~ 12, 22 e 30% nas concentrações de 0,50; 0,75 e 1,0 $\mu$ mol de SYD-1 por miligrama de proteína.

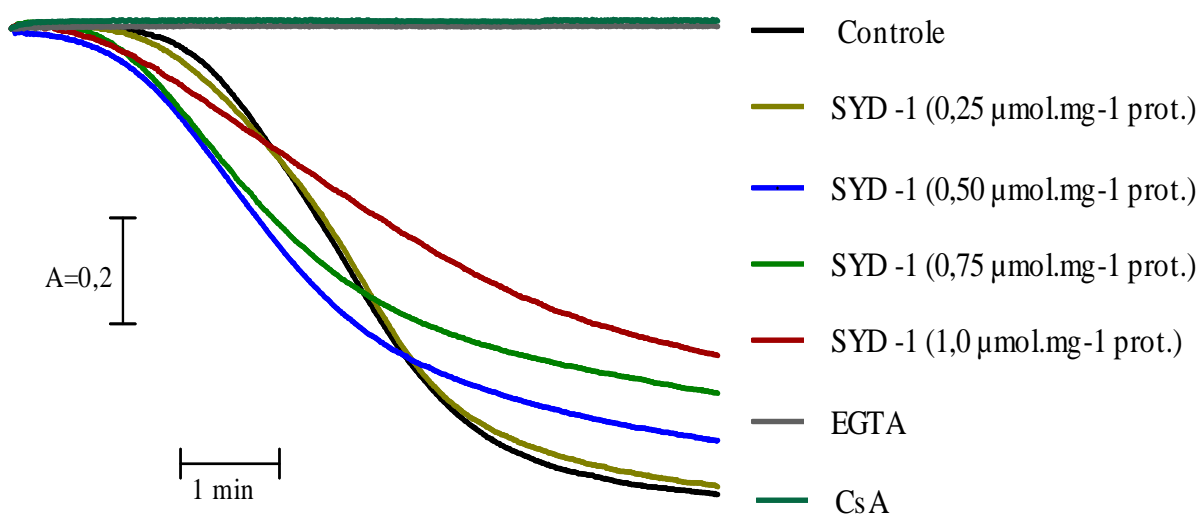


Figura 23. Efeito do SYD-1 sobre o inchamento mitocondrial induzido por fosfato.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7,2),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $40\text{-}50 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg prot. mL}^{-1}$  a  $28^\circ\text{C}$ . O inchamento foi iniciado pela adição de succinato de potássio  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  na ausência de SYD-1 (controle) ou na presença de EGTA  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , CsA  $0,5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  ou SYD-1 nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.5.5. Os traçados são representativos de 5 experimentos independentes em quadruplicata.

O tamoxifeno é uma droga antiestrogênica não-esteroidal amplamente utilizada na quimioterapia e prevenção do câncer de mama, cujo mecanismo de ação antiproliferativo não está restrito apenas ao clássico modelo de ligação ao receptor de estrogênio (CUSTÓDIO; MORENO; WALLACE, 1998). Por afetar potencialmente as funções mitocondriais, atuando como agente desacoplador e inibidor da CTE, além de induzir liberação de citocromo *c* em mitocôndrias isoladas de fígados de ratos (MOREIRA, *et al.*, 2004), seus efeitos sobre a formação do PTPM têm sido amplamente estudados. Cardoso, Almeida e Custódio (2004) observaram que a pré-incubação de mitocôndrias de fígado de ratos com tamoxifeno inibiu a formação do PTPM induzido por cálcio e *t*-BOOH ou óxido de fenilarsina. Na presença de fosfato, como analisado por Custódio *et al.* (1998), o mesmo efeito foi observado, assim sugerindo uma via independente do PTPM para apoptose induzida pelo composto (CARDOSO; ALMEIDA; CUSTÓDIO, 2004). É importante ressaltar que mesmo sem

a formação do PTPM os pesquisadores encontraram liberação de citocromo *c* em mitocôndrias isoladas, ou seja, de forma independente da ativação da apoptose por vias citoplasmáticas. Neste contexto, SYD-1 apresenta fortes indícios de um mecanismo semelhante, considerando a proximidade dos efeitos observados nas mitocôndrias.

Em relação a compostos com atividade antitumoral e efeitos semelhantes aos de SYD-1 nas funções mitocondriais, pode-se citar o alcalóide bisbenzilisquinolona tetrandrine, extraído da raiz seca da erva chinesa *Stephania tetrandra*. Entre as concentrações de 50 e 100nmol.mg<sup>-1</sup> proteína, tetrandrine induz significativo colapso de  $\Delta\Psi_m$  decorrente de suave desacoplamento e inibição da lipoperoxidação induzida por Fe<sup>+2</sup> /ADP em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. Abaixo de 20 nmol.mg<sup>-1</sup>, o alcalóide inibe a formação do PTPM induzido por cálcio e fosfato devido a estas ações antioxidantes, também evidenciada pela diminuição na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os autores Fernandes *et al.* (2006) discutem em seu trabalho, no entanto, que outros pesquisadores têm observado apoptose induzida por tetrandrine, decorrente de estresse oxidativo e formação do PTPM em linhagens de células tumorais e hepatócitos primários de ratos. Esta discrepância sugere, portanto, que não se pode excluir efeitos contraditórios de um composto ao considerar diferentes sistemas de análise, e logo não seria surpreendente encontrar estes efeitos em relação a SYD-1, haja vista a similaridade de ação com o alcalóide.

A ativação patológica do PTPM representa um passo fundamental no desenvolvimento de neurotoxicidade e neurodegeneração e, neste sentido, compostos que suprimem a formação do PTPM pesquisados para a proteção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como o câncer, representam uma importante vantagem por apresentarem presumível ação neuroprotetora (OXENKRUG, 2005). SYD-1, neste contexto, possui um promissor mecanismo de ação.

Santos *et al.* (2007), apesar de evidenciar a morte de células renais por apoptose com o tratamento de cisplatina, não observou indução da formação do PTPM em mitocôndrias isoladas de rins de ratos. Contrariamente, o efeito do antitumoral em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, analisado por Custódio *et al.* (2009), demonstrou aumento na formação do PTPM induzido por cálcio e fosfato. Desta

maneira, o fato de SYD-1 inibir a formação do PTPM em mitocôndrias de fígado pode não ser verdadeiro ao considerar sua ação em outros tecidos.

Apesar do PTPM reconhecidamente desencadear a apoptose, a indução da morte de células tumorais também pode ser resultado do fechamento do PTPM, o que protegeria a mitocôndria do choque osmótico, conseqüentemente permitindo a liberação periódica de cálcio, e desta forma auxiliando na capacidade da organela em controlar o sistema de transdução de sinais dirigidos pelo íon nas células (CARDOSO; ALMEIDA; CUSTÓDIO, 2004). Apesar deste mecanismo ser pouco discutido na literatura, uma análise observando a influência de SYD-1 no transporte celular e de compartimentos específicos de cálcio pode sugerir uma relação entre inibição do PTPM e sua ação antitumoral.

Mendez-Sanchez (2009) analisou o efeito de MI-D sobre o PTPM induzido por cálcio e fosfato nas concentrações de 5 a 80nm.mg<sup>-1</sup> prot. em mitocôndrias isoladas de fígado rato, observando inibição do inchamento em aproximadamente 25, 35 e 42% para as concentrações de 25, 65 e 80nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína. Este resultado foi inicialmente associado à capacidade do composto colapsar o potencial de membrana e diminuir a entrada de cálcio na organela, porém experimentos analisando a captação do íon não justificaram o efeito de MI-D sobre o PTPM.

Uma das formas pelo qual o cálcio participa na formação do PTPM constitui-se na desorganização da membrana mitocondrial interna, por interação com a cardiolipina, favorecendo a formação de EROS e mudanças no estado redox dos constituintes do poro (KOWALTOWSKI, 2009). Os fortes indícios de atuação de SYD-1 na membrana mitocondrial interna (HALILA *et al.*, 2007) sugerem que o composto interfira neste processo, ou ainda que seu efeito desacoplador compense a formação de EROS induzida pelo cálcio.

Uma vez demonstrada a capacidade sequestradora de radicais superóxidos e o efeito inibidor do SYD-1 sobre a lipoperoxidação ferro-induzida, analisou-se o efeito do composto sobre o inchamento mitocondrial induzido por cálcio e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (FIGURA 24). Neste sistema, o indutor promove a liberação de ferro das proteínas ferro-enxofre presentes na cadeia respiratória, levando a reação de Fenton, a qual através da formação de radicais hidroxila favorece a formação do PTPM.

Como observado na figura 24, somente na presença de  $H_2O_2$  (ausência de cálcio) não houve inchamento mitocondrial, porém com o cálcio e o indutor (controle), observou-se uma grande diminuição da absorbância. Este inchamento, contudo, foi 40% menor quando comparado ao inchamento induzido por cálcio/fosfato (FIGURA 23). Em relação ao controle, SYD-1 na menor concentração ( $0,25\mu\text{mol.mg}^{-1}$  prot.) apresentou o mesmo perfil de inchamento, e para as concentrações de 0,50; 0,75 e  $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  prot., inibiu em ~3, 3 e 12% o inchamento, respectivamente. Apesar da pequena magnitude de proteção quando comparado ao PTPM  $Ca^{+2}/Pi$ -induzido, o fato de SYD-1 inibir o inchamento induzido por  $H_2O_2$  pode ser indício que o composto proteja, por sua possível ação na membrana mitocondrial interna, as proteínas ferro-enxofre da ação do peróxido, ou ainda capture diretamente radicais hidroxila inibindo a reação de Fenton.

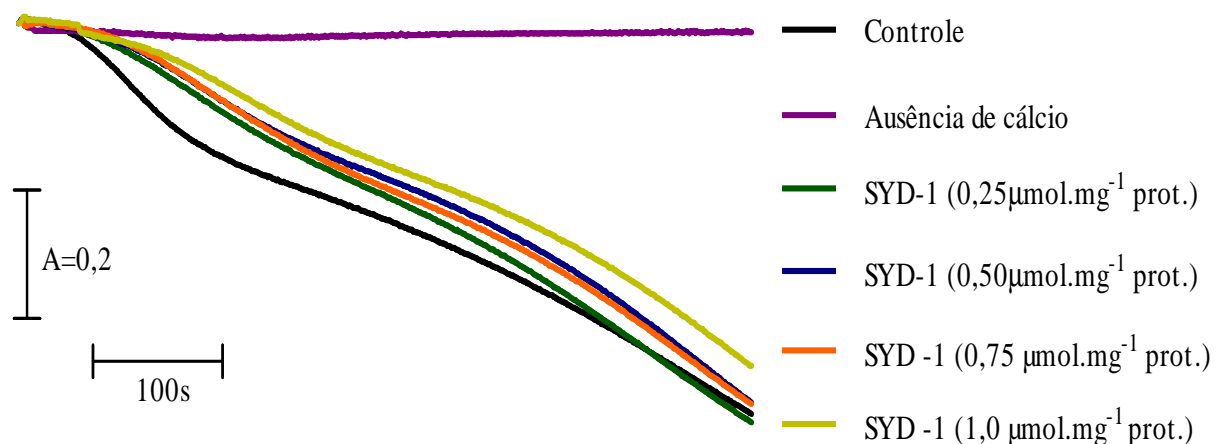


Figura 24. Efeito do SYD-1 sobre o inchamento mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: D-manitol  $250\text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10\text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2,  $CaCl_2$   $40\text{-}50\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  (com exceção do indicado na legenda),  $0,5\text{ mg prot..mL}^{-1}$  e  $5\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $H_2O_2$  a  $28^\circ\text{C}$ . O inchamento foi iniciado pela adição de succinato de potássio  $3\text{ mmol.L}^{-1}$  e  $H_2O_2$  na ausência de SYD-1 (controle) ou nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.5.5 Os traçados são representativos de 3 experimentos independentes em duplicata.



Para melhor esclarecer o mecanismo de proteção do SYD-1 sobre a formação/abertura do PTP, optou-se então por utilizar diamida como indutor, um reconhecido oxidante de grupos tióis que ocasiona a formação de grupos dissulfeto do poro (KOSOWER; KOSOWER; WERTHEIM, 1969).

O inchamento observado na presença de cálcio e diamida (controle) foi 15% menor quando comparado ao induzido por  $\text{Ca}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ , porém, neste experimento, SYD-1 apresentou maior efeito protetor, alcançando 43, 65, 70 e 78% para as concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e  $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  prot., respectivamente, em relação ao controle (FIGURA 25).

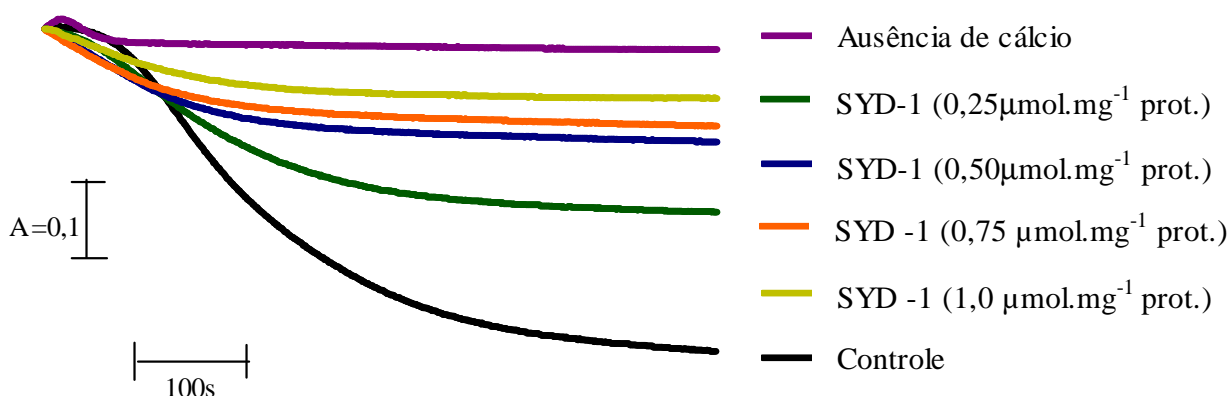


Figura 25. Efeito do SYD-1 sobre o inchamento mitocondrial induzido por diamida.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: D-manitol  $250\text{mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,2),  $\text{CaCl}_2$   $40\text{-}50\mu\text{mol.L}^{-1}$  (com exceção do indicado na legenda),  $0,5\text{mg prot.}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $1\text{mmol.L}^{-1}$  de diamida  $28^\circ\text{C}$ . O inchamento foi iniciado pela adição de succinato de potássio  $3\text{mmol.L}^{-1}$  e diamida na ausência de SYD-1 (controle) ou nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.5.5. Os traçados são representativos de 3 experimentos independentes em duplicata.

Oxidantes de grupos tiólicos podem regular a transição de permeabilidade por controlar os níveis de GSH mitocondriais ou ocasionar mudanças diretas no estado redox de proteínas tiólicas do PTPM (KOWALTOWSKI, *et al.*, 2001). SYD-1, devido à inibição das enzimas Gpx e Gred, possivelmente não permite a reciclagem dos

níveis de GSH mitocondriais, também evidenciado pela falta de oxidação de NP na presença de cálcio (item 6.6); fato que provavelmente induziria a formação do PTPM. Desta forma, evidencia-se a proteção que SYD-1 possivelmente exerça sobre a oxidação dos componentes do PTPM.

ANT apresenta um resíduo de cisteína crítico na posição 56, que quando oxidado dirige a formação do PTPM (KOWALTOWSKI, *et al.*, 2001). Tem-se atribuído a este translocador um papel mais regulatório que estrutural do PTPM, e por estar localizado na membrana mitocondrial interna (JAVADOV; KARMAZYN; ESCOBABLES, 2009), um dos sítios de atuação indicado para composto, sua interação com SYD-1 merece ser investigada.

Buterol, um análogo sintetizado a partir da progesterona, possui efeito semelhante ao de SYD-1 por sua ação inibitória sobre a formação do PTPM. Foi sugerido, através do uso de diferentes indutores, que Buterol reage com os grupos tióis de cisteína de ANT, modulando a formação do PTPM. Como discutido pelos autores, apesar de parecer contraditório a um efeito citotóxico, este resultado pode estar relacionado à diminuição da resistência multidroga em células tumorais promovida pelo composto. A relação entre estes fenômenos está na interação de buterol aos domínios de ligação a nucleotídeos, presentes tanto na mitocôndria, através do ANT, quanto na membrana plasmática, pelos transportadores ABC (FEDOTCHEVA, *et al.* 2009). Considerando os indícios de interação do SYD-1 com resíduos críticos de cisteína, tanto discutido aqui como no item 6.5.3, a investigação do mesoiônico para o uso na diminuição da resistência de células tumorais à quimioterápicos desperta atenção para trabalhos futuros.

Mendez-Sanchez (2009) analisou o efeito de MI-D sobre o PTPM induzido por cálcio e fosfato nas concentrações de 5 a 80nmol.mg<sup>-1</sup> prot. em mitocôndrias isoladas de fígado rato, observando inibição do inchamento em aproximadamente 25, 35 e 42% para as concentrações de 25, 65 e 80nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína. Este resultado foi associado, em parte, com a discreta diminuição que o composto promove sobre a captação de cálcio, possivelmente por colapsar o potencial de membrana, e por sua capacidade seqüestradora de radicais superóxido; porém outros mecanismos não foram excluídos. Neste contexto, considerando que o SYD-1 também inibe a formação do

potencial de membrana (HALILA *et al.*, 2007) e o cálcio possui um papel essencial na formação do PTPM, analisou-se o transporte de cálcio pela mitocôndria na presença da sidnona, com a mesma condição utilizada para formação do PTPM induzido por  $\text{Ca}^{+2}/\text{Pi}$ , como será descrito no item a seguir

## 6.8 EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE CÁLCIO

Para analisar o movimento de cálcio pela mitocôndria, utilizou-se o indicador metalocrômico arsenazo III, que na presença do íon forma um complexo capaz de modificar o comprimento de onda em que o composto livre absorve luz (SCARPA, 1979). As mitocôndrias, tratadas ou não com SYD-1, foram incubadas inicialmente com fosfato e rotenona. Adicionou-se cálcio em quantidade suficiente para induzir a formação do PTPM, e succinato foi utilizado para energização, permitindo a entrada do cálcio pelo uniporte  $\Delta\psi_m$  – dependente. O efluxo do íon foi induzido pela adição de vermelho de rutênio, através do trocador  $\text{Ca}^{+2}/2\text{H}^+$ , ou FCCP, direcionado pelo reverso do uniporte  $\Delta\psi_m$  – dependente (BERNADI, *et al.* 1984) .

Através dos controles apresentados nas figuras 26-29 é possível observar que a adição de  $\text{CaCl}_2$  no sistema contendo arsenazo resulta em aumento nos valores de absorbância, representando a quantidade total de cálcio no espaço externo a matriz mitocondrial. Com a adição de succinato, o potencial de membrana é formado permitindo a captação do íon pela organela, o que resulta na diminuição da absorbância devido à dissociação do complexo indicador-cálcio. O segundo aumento, agora de menor magnitude, indica o efluxo do íon através dos mecanismos anteriormente citados, inclusive através do PTPM quando o FCCP é utilizado (PETRONILLI , *et al.* 1993). Em todas as análises, as mesmas condições descritas para o experimento de TPM (item 5.5.5) foram mantidas, exceto pela adição de VR, FCCP e arsenazo III.

As figuras 26-29 mostram que o SYD-1 promoveu um aumento na captação de cálcio em relação ao controle, de forma dependente da concentração. A velocidade do efluxo induzido por VR sofreu aparente diminuição (FIGURAS 27 e 29) com as duas

concentrações do composto, enquanto que para o FCCP, ao utilizar  $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  prot. de SYD-1, observou-se um aumento na velocidade de efluxo íon (FIGURA 28).

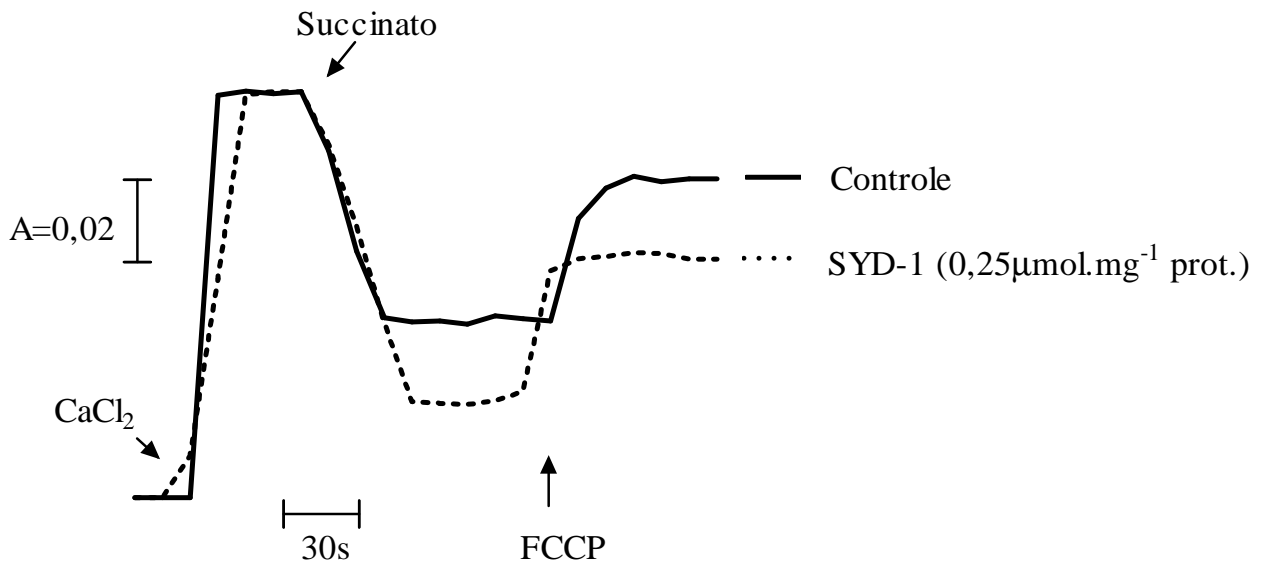


Figura 26. Efeito do SYD-1 sobre o transporte de cálcio. Efluxo induzido por FCCP.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: Sacarose  $250\text{mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, e 0,1 g% de albumina sérica bovina., CaCl<sub>2</sub>  $40\text{-}50\mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $0,3\text{mmol.L}^{-1}$  de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, rotenona  $10\mu\text{mol.L}^{-1}$ , FCCP  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $0,5\text{mg prot.mL}^{-1}$  a 28°C. O influxo de cálcio pela mitocôndria foi iniciado pela adição de  $3\text{mmol.L}^{-1}$  de succinato de potássio na ausência de SYD-1 (controle) ou na concentração indicada do composto. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.5.6 e os traçados são representativos de 3 experimentos independentes.

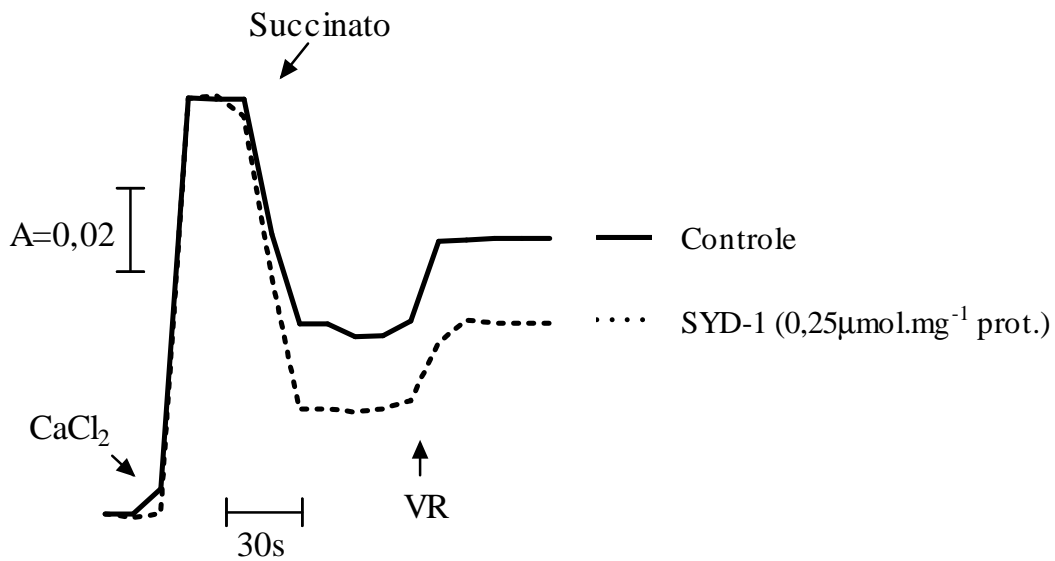


Figura 27. Efeito do SYD-1 sobre o transporte de cálcio. Efluxo induzido por VR.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: Sacarose 250mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, e 0,1 g% de albumina sérica bovina., CaCl<sub>2</sub> 40-50 μmol.L<sup>-1</sup>, 0,3mmol.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, rotenona 10μmol.L<sup>-1</sup>, VR 10 μmol.L<sup>-1</sup> e 0,5mg prot.mL<sup>-1</sup> a 28°C. O influxo de cálcio pela mitocôndria foi iniciado pela adição de 3mmol.L<sup>-1</sup> de succinato de potássio na ausência de SYD-1 (controle) ou na concentração indicada do composto. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.5.6 e os traçados são representativos de 3 experimentos independentes.

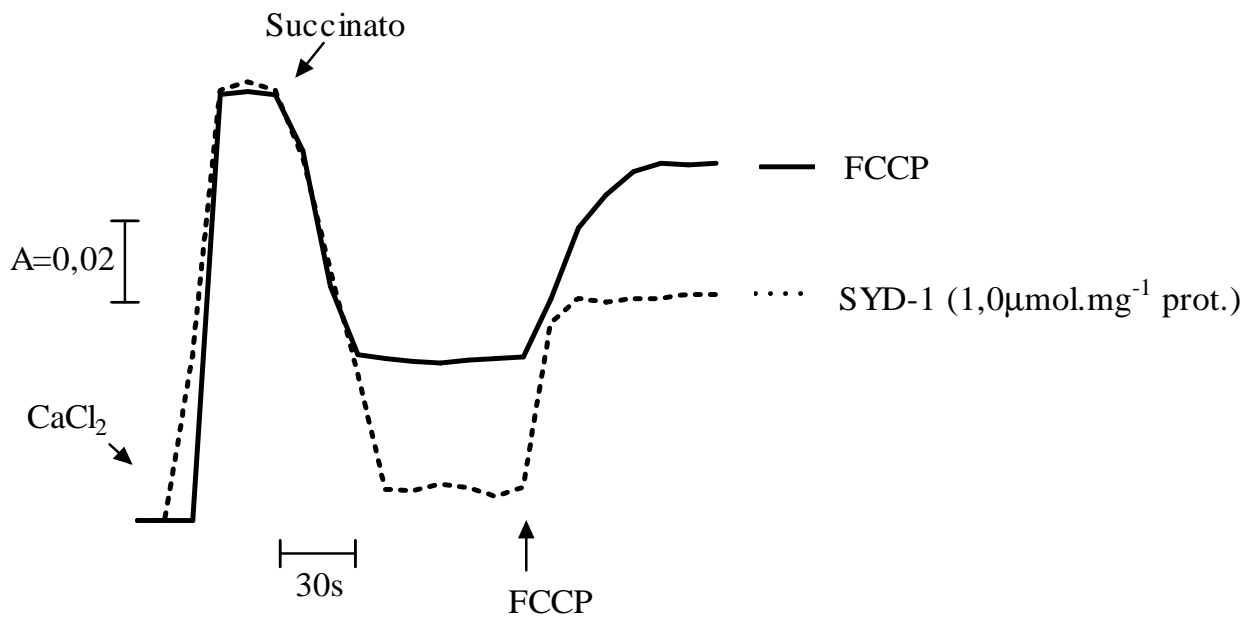


Figura 28. Efeito do SYD-1 sobre o transporte de cálcio. Efluxo induzido por FCCP.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: Sacarose  $250\text{mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, e 0,1 g% de albumina sérica bovina.,  $\text{CaCl}_2$   $40\text{-}50\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $0,3\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , rotenona  $10\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ , FCCP  $1\ \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $0,5\text{mg prot.mL}^{-1}$  a  $28^\circ\text{C}$ . O influxo de cálcio pela mitocôndria foi iniciado pela adição de  $3\text{mmol.L}^{-1}$  de succinato de potássio na ausência de SYD-1 (controle) ou na concentração indicada do composto. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.5.6 e os traçados são representativos de 3 experimentos independentes.

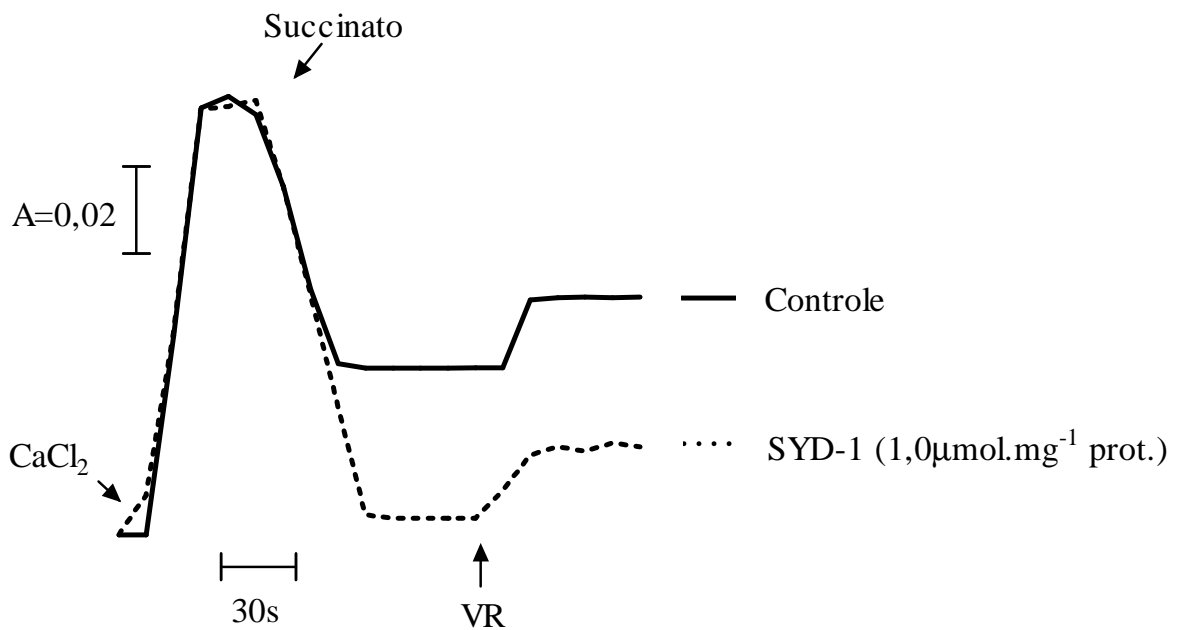


Figura 29. Efeito do SYD-1 sobre o transporte de cálcio. Efluxo induzido por VR.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: Sacarose 250mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, e 0,1 g% de albumina sérica bovina., CaCl<sub>2</sub> 40-50 μmol.L<sup>-1</sup>, 0,3mmol.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, rotenona 10μmol.L<sup>-1</sup>, VR 10 μmol.L<sup>-1</sup> e 0,5mg prot.mL<sup>-1</sup> a 28°C. O influxo de cálcio pela mitocôndria foi iniciado pela adição de 3mmol.L<sup>-1</sup> de succinato de potássio na ausência de SYD-1 (controle) ou na concentração indicada do composto. As condições exeperimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.5.6 e os traçados são representativos de 3 experimentos independentes.

Como já mencionado, o acúmulo de cálcio na matriz mitocondrial é essencial para formação do PTPM, e neste contexto, o mecanismo pelo qual o SYD-1 promove a inibição deste fenômeno não possui relação direta com o transporte mitocondrial de cálcio, como observado pelo aumento na captação do íon. Este fato, por outro lado, reforça o indício da interação direta entre o mesoiônico e os componentes do poro, evidenciado principalmente pela marcante inibição do inchamento mitocondrial induzido por diamida (FIGURA 25).

A alta reatividade atribuída às características químicas da molécula de SYD-1 merece destaque em trabalhos futuros, principalmente em relação a suas possíveis interações com proteínas da membrana mitocondrial interna. Neste sentido, o efeito da sidnona sobre a captação de cálcio poderia ser explicado pelo comprometimento do

uniporte  $\Delta\psi_m$  – dependente, resultando em aumento no transporte do íon pelo transportador.

Petronilli *et al* (1993) analisaram o efluxo de cálcio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato na presença de VR ou Pi mais FCCP, demonstrando que a saída do íon sobre estas condições decorre principalmente da formação do PTPM. Como observado por Halila *et al* (2007), SYD-1 possui ação desacopladora comparada ao FCCP, e ao sugerir que nas condições deste experimento (Pi+desacoplador) a saída do cálcio acontece através do PTPM, o efeito do mesoionico sobre a velocidade de efluxo induzido por VR poderia ser justificada pela inibição da formação do PTPM.

No sistema onde o efluxo é induzido por FCCP, entretanto, a mesma interpretação não é válida, pois surpreendentemente o efeito inibitório do SYD-1 sobre a transição de permeabilidade não foi observada. É importante ressaltar que os experimentos de TPM foram conduzidos com mitocôndrias energizadas, e a realização destes na presença de FCCP poderiam auxiliar na interpretação dos resultados. A elevação da velocidade na saída do íon, no entanto, corrobora com a possibilidade de aumento da permeabilidade ao cálcio pelo uniporte  $\Delta\psi_m$  – dependente, observado com a maior concentração de SYD-1 ( $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  prot.).

Devido a complexidade destes efeitos, torna-se necessária a confirmação destes resultados com outras metodologias de transporte de cálcio, como por exemplo derivados Fura-2, muito utilizados na literatura para esta finalidade (BAINS, *et al.*, 2009; JAISWAL, *et al.*, 2009; KLOSE, *et al.*, 2009; GONZALEZ, *et al.*, 2010).

É conhecido que altas concentrações de cálcio na mitocôndria podem aumentar a atividade das enzimas do ciclo do ácido cítrico, elevando a razão  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  (GUNTER; SHEU, 2009) e a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pelo complexo I da CTE (MURPHY, 2009), além de competir com o citocromo *c* pelo local de ligação à cardiolipina (FEISSNER, *et al.*, 2009) e direcionar mudanças na morfologia da organela (cisão, principalmente), favorecendo assim a liberação de fatores apoptóticos para o citoplasma e a formação de EROS. O estresse oxidativo é um importante indutor da apoptose por ativação de proteínas quinases (TONISSEN; TRAPANI, 2009), e considerando os efeitos pró-oxidantes promovidos por SYD-1 (inibição de Gpx e



Gred, inibição da CTE e aumento na captação de cálcio) esta possibilidade também merece ser investigada.

Mendez-Sanchez (2009) encontrou resultados opostos ao de SYD-1 quando analisou a captação de cálcio em mitocôndrias tratadas com MI-D, observando discreta diminuição na captação do íon. A magnitude daquela redução, no entanto, não pôde justificar exclusivamente o comportamento do mesoiônico sobre a inibição do PTPM descrita no mesmo trabalho. Apesar dos efeitos distintos, ambos mesoiônicos parecem atuar por outros mecanismos para inibir a formação do PTPM.

Quando o efluxo de cálcio foi induzido com FCCP ou VR, os efeitos foram semelhantes aos de SYD-1, demonstrado pela diminuição na velocidade da saída do íon. MI-D também possui efeito desacoplador (CADENA *et al.*,1998), e desta forma o efluxo de cálcio com a adição de VR foi atribuído a formação do PTPM, sugerindo que o resultado observado decorreu da inibição da TPM promovida pela composto. Ao comparar o MI-D com o SYD-1 em relação a este parâmetro, é possível notar um efeito bastante proeminente com o uso do primeiro; fato que também pode ser atribuído a superior capacidade desacopladora desempenhada por MI-D (CADENA *et al.*,1998).

## 7. DISCUSSÃO FINAL

Alterações na bioenergética celular são importantes indícios do surgimento de cânceres, sendo a mitocôndria a principal responsável por estas modificações. Esta organela, portanto, tem sido alvo de várias pesquisas para o desenvolvimento de terapias antitumorais baseadas na regulação da apoptose, através da utilização de compostos desacopladores da fosforilação oxidativa, inibidores da CTE e modificadores do estado redox (PATHANIA E MILLARD e NEAMATI, 2009). Neste contexto, o presente estudo foi motivado pela ação antitumoral *in vivo* (GRYNBERG, *et al.*, 1992) e *in vitro* de SYD-1 (GRYNBERG, *et al.*, 1992; DUNKLEY, C. S.; THOMAN), possivelmente relacionada aos efeitos do composto sobre a bioenergética mitocondrial (HALILA *et al.*, 2007).

Foram avaliados os efeitos de SYD-1 sobre parâmetros de estresse oxidativo relacionados a mecanismos de morte celular, particularmente por apoptose. Observou-se inicialmente que SYD-1, na maior concentração ( $1,0\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  prot.), promoveu inibição total da lipoperoxidação (FIGURA 9), fato que pode relacionar-se a diminuição do vazamento de elétrons como consequência da ação desacopladora do composto (HALILA *et al.*, 2007). Esta sugestão foi reforçada pela ausência de efeitos quando o indutor empregado foi o AAPH, que independe da CTE para iniciar o processo peroxidativo. (FIGURA 11).

Por outro aspecto, uma vez que foram utilizadas mitocôndrias íntegras para realização dos experimentos de lipoperoxidação, foi necessário considerar um possível efeito do SYD-1 sobre as enzimas antioxidantes presentes na organela. O composto não apresentou efeito sobre Mn-SOD e CAT, mas inibiu significativamente os efeitos da Gpx e Gred, que possuem importante papel na sinalização da morte celular por via apoptótica (IMAI *et al.*, 2003; SEILER *et al* 2008) (FIGURAS 15,18-20). Nesta condição, o acúmulo de peróxidos e estresse oxidativo estariam favorecidos, assim como a ativação de enzimas envolvidas no processo de lipoperoxidação celular. Portanto, apesar de SYD-1 inibir a peroxidação lipídica em mitocôndrias isoladas, é possível que em nível celular o processo esteja favorecido. Também é possível que a atividade de CAT e Mn-SOD estejam alteradas considerando uma análise no sistema

celular, visto que o acúmulo de peróxidos contribui para o dano em estruturas protéicas (STANKIEWICZ; SKRZYDLEWSKA, 2003).

Interessantemente, Gpx e Gred possuem uma singularidade em suas estruturas, quando comparadas a CAT e SOD, que poderia justificar a ação inibitória de SYD-1 sobre estas enzimas. Um resíduo de selenocisteína, presente em seus centros catalíticos, torna-o mais reativo em reações nucleofílicas (STEINBRENNER; SIES, 2009), e acredita-se que SYD-1, para exercer seus efeitos tóxicos, interaja facilmente com grupos nucleofílicos de biomoléculas (GRYNBERG, *et al.*, 1992; DUNKLEY; THOMAN, 2003). Neste sentido, a interação da sidnona ao centro ativo das enzimas poderia prejudicar suas ações, refletindo na diminuição de suas atividades.

Pensando na redução da atividade de Gred, que utiliza NADPH como equivalente redutor de sua reação, verificou-se o estado redox de nucleotídeos de piridina, principalmente NADPH, na presença de SYD-1. Foi observado, que ao induzir o estresse oxidativo com a adição de cálcio, SYD-1 impediu a oxidação de NADPH em ~48% na maior concentração utilizada ( $1,0\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  prot.), efeito que representa a mesma magnitude encontrada para inibição da enzima Gred (47% na mesma concentração). Quando o estresse oxidativo não foi induzido, SYD-1 promoveu aumento de ~11% a oxidação de NADPH na maior concentração do composto ( $1,0\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  prot.), efeito que pode ser decorrente da utilização desta espécie para a defesa antioxidante promovida por TrxR (MARÍ, *et al.*, 2009) em resposta ao possível aumento de EROS desencadeado pela inibição da CTE (HALILA, *et al.*, 2007) exercida pela sidnona.

Outro importante mecanismo de ativação da morte por apoptose foi avaliado com a indução do PTPM na presença de SYD-1. Neste fenômeno o cálcio, através da formação de EROS ou mudanças diretas no estado redox dos componentes do poro, promove um inchamento mitocondrial com liberação de citocromo *c* e ativação de pró-caspases (KOWALTOWSKI, *et al.*, 2001). O primeiro indutor utilizado foi o Pi, onde o mesoiônico demonstrou diminuição do inchamento em ~30% na maior concentração ( $1,0\mu\text{mol.mg}^{-1}$  proteína – FIGURA 23). Este efeito pode decorrer da diminuição da produção de EROS pelo efeito desacoplador e sequestrador de radicais  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por SYD-1 (FIGURA 12), ou ainda de uma possível interação da sidnona com a membrana

mitocondrial interna, impedindo a oxidação dos componentes do poro. Para esclarecer tais questionamentos, realizou-se a indução do PTPM com o uso de outros indutores de mecanismos claramente conhecidos, como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a diamida. SYD-1 promoveu inibição com ambos indutores, porém com diamida reduziu em ~78% ( $1,0\mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ) o inchamento mitocondrial, enquanto que com  $\text{H}_2\text{O}_2$  inibiu em ~12% o fenômeno na mesma concentração (FIGURAS 24 e 25). Diamida é um reconhecido oxidante de grupos tióis do PTPM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  mobiliza ferro de proteínas ferro-enxofre presentes na CTE, disponibilizando-o para formação de  $\text{HO}^\bullet$  através da reação de Fenton. Neste contexto, SYD-1 parece inibir a formação do PTPM, em grande parte, por regular diretamente o estado redox dos constituintes do poro, indicando que sua atuação na membrana da mitocôndria é crucial para o exercício de seus efeitos. O componente que mais tem sido demonstrado regular a formação do PTPM é o ANT, através do estado redox de um resíduo crítico de cisteína (FEDOTCHEVA, *et al.* 2009), e esta informação reforça as idéias propostas de interação entre SYD-1 e as enzimas contendo selenocisteína, além da atuação da sidnona na membrana interna da mitocôndria, como proposto por Halila *et al.*(2007). Não se pode, de qualquer forma, excluir a possibilidade do composto seqüestrar radicais  $\text{HO}^\bullet$ , visto a inibição do inchamento  $\text{H}_2\text{O}_2$ - induzido, e mesmo por todos estes efeitos não descreveram a forma clássica de ativação apoptótica por via mitocondrial, não é possível descartar esta hipótese, uma vez que autores têm demonstrado ativação de caspases e alterações na bioenergética mitocondrial característicos, dirigindo a apoptose celular PTPM-independente (FERNANDES *et al.* 2006; CUSTÓDIO *et al.* 2009).

Analísou-se também o transporte de cálcio pelas mitocôndrias durante a formação do PTPM  $\text{Ca}^{+2}/\text{Pi}$ - induzido. SYD-1 promoveu aumento na captação do íon, demonstrando que a inibição do PTPM é independente da entrada de cálcio, o que reforçou a possibilidade de interação do mesoiônico com os componentes do poro e sua ação pró-oxidante na organela. Em relação ao efluxo, o composto diminuiu a velocidade de saída do íon quando induzido por VR e aumenta quando por FCCP (FIGURAS 26-29), evidenciando a inibição do PTPM e a ação desacopladora descrita por Halila *et al* (2007).

Embora tenha-se encontrado grandes relações entre as alterações na bioenergética mitocondrial e os resultados apresentados neste trabalho, muitos esforços devem ser somados para compreender os mecanismos pelos quais SYD-1 desempenha seu papel antitumoral. De forma geral, SYD-1 promove alterações no estado redox mitocondrial que podem conduzir a ativação da apoptose, e pesquisas envolvendo sistemas mais complexos de análise, como cultura de células, podem ser um bom início para compreender o contexto dos efeitos aqui observados.

## 8. CONCLUSÕES

SYD-1 atua de forma complexa sobre a bioenergética mitocondrial. Se por um lado o mesoiônico demonstrou uma ação pró-oxidante - como demonstrado pela inibição das enzimas Gpx e Gred e aumento da captação de cálcio -, também promoveu efeitos antioxidantes como a captação de radicais superóxido e inibição da lipoperoxidação ferro-induzida. Também foram observados neste trabalho indícios de que o composto atue por interação direta com proteínas da membrana mitocondrial, demonstrado pelo aumento na captação de cálcio e marcante inibição do inchamento dimadia-induzido.

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a ação antitumoral desta sidnona não resulta da indução de morte celular desencadeada por lipoperoxidação e formação do PTPM.

## 9. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *In Vitro*. *Methods in Enzymology*, v.105, p.121-126, 1984.
- AKERMAN, K. E. O. e WIKSTROM, M. K. F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *Febs Letters*. v.68, n.2, , p.191-197. Oct 1978.
- ALEXEYEV, M. F. Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? *Febs Journal*, v. 276, n. 20, p. 5768-5787, 2009.
- ALFONSO-PRIETO, M. *et al.* The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, v 131, p. 11751–11761, 2009.
- ANDRÉS, J. *et al.* On transition structures for hydride transfer step in enzyme catalysis. A comparative study on models of glutathione reductase derived from semiempirical, HF, and DFT methods. *J. Org. Chem.*, v. 61, n. 22, 1996.
- AON, M. A. From mitochondrial dynamics to arrhythmias. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.41, p.1940–1948, 2009.
- BAINS, R. *et al.* Sevoflurane and propofol depolarize mitochondria in rat and human cerebrocortical synaptosomes by different mechanisms. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, v. 53, n. 10, p. 1354-1360, 2009.
- BAKER, W.; OLLIS, W. D. Meso-Ionic Compounds. *Chemistry and Industry*. July 1955.
- BARONZIO, et al. Adjuvant therapy with essential fatty acids (EFAS) for primary liver tumors: Some hypotheses. *Medical Hypotheses*, v. 44, p. 149-154, 1995.
- BATANDIER, C; LEVERVE, X; FONTAINE, E. Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Reactive Oxygen Species Production at the Level of the Respiratory Chain Complex I. *The journal of biological chemistry*, v. 279, n. 17, p. 17197–17204, 2004.
- BERNARDI, P. *et al.* Pathway for uncoupler-induced calcium efflux in rat liver mitochondria: inhibition by ruthenium red? *American Chemical Society*, v.23, n. 8, p. 1645-1651, 1984.
- BOUCHIER-HAYES, L. Measuring apoptosis at the single cell level. *Methods*, v. 44, p. 222–228, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

BREMER, E. *et al.* Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: current progress and prospects. **Trends in Molecular Medicine** [S.I.], v. 12, n. 8, p. 382-393, Aug 2006.

BRITTO, M. M. *et al.* On the partitioning of some newly synthesized mesoionic 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide and precursors evaluated by RP-HPLC. **Journal of Liquid Chromatography e Related Technologies**, v. 22, n. 3, p. 357-366, 1999.

BROOKES, P.; WALKER, J. Formation and Properties of Sydnone Imines, a New Class of Meso-Ionic Compound, and some Sydnones Related to natural Alpha-Amino-Acids. **Journal of the Chemical Society** [S.I.], n. NOV, p. 4409-4416, 1957.

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

BRUCE, J. I. E. Modulation of  $[Ca^{2+}]_i$  signaling dynamics and metabolism by perinuclear mitochondria in mouse parotid acinar cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12909-12917, 2004.

BRUNNER, M; MOESLINGER, T.; SPIECKERMANN, P. G. Regulation of cyclosporin A sensitive mitochondrial permeability transition by the redox state of pyridine nucleotides. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, v. 128, p.31-41, 2001.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. IN: Fleischer, S.; Packer, L. **Methods Enzymol.** Academic Press, 1978, v. 52; Biomembranes, Part C.

CADENA, S.M.C. *et al.* Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **FEBS Letters**, v.440, p.46-50, 1998.

CALDERON-CORTES, E.; CORTES-ROJO, C. *et al.* Changes in mitochondrial functionality and calcium uptake in hypertensive rats as a function of age. **Mitochondrion**, v.8, n.3, p.262-272. Jun 2008.

CARDOSO, J. C. *et al.* Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound, MI-D, on the acute inflammatory response. **Drug Development Research**, v. 61, n. 4, p. 207-217, Apr 2004.

CARDOSO, C. M. P.; ALMEIDA, L. M.; CUSTÓDIO, J. B. A. Protection of tamoxifen against oxidation of mitochondrial thiols and NAD(P)H underlying the permeability transition induced by prooxidants. **Chemico-Biological Interactions**, v. 148, p. 149-161, 2004.



CAROPPI, *et al.* Apoptosis and human diseases: Mitochondrion damage and lethal role of released. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 4058-4065, 2009.

CATISTI, R.; VERCESI, A. E. The participation of pyridine nucleotides redox state and reactive oxygen in the fatty acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria. **FEBS Letters**, v.464, p. 97-101, 1999.

CHAKRABORTI, T. *et al.* Oxidant, mitochondria and calcium: An overview. **Cell. Signal**, v. 11, n. 2, p. 77-85, 1999.

CHEN, Y.; HU, L. Q. Design of Anticancer Prodrugs for Reductive Activation. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 1, p. 29-64, Jan 2009.

CORELL, T. *et al.* Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. **Polish Journal of Pharmacology**, v.46, n.6, p.553-66, Nov-Dec 1994.

COSTANTI, P. *et al.* Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n.12, p. 6746–6751, 1996.

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochemical Journal**, v.341, p.233-249. Jul 1999.

CUSTÓDIO, J. B. A. *et al.* Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: Prevention by thiol group protecting agents. **Toxicology**, v.259, p.8–24, 2009.

CUSTÓDIO, J. B. A.; MORENO, A. J. M.; WALLACE, K. B. Tamoxifen inhibits induction of the mitochondrial permeability transition by  $\text{Ca}^{2+}$  and inorganic phosphate. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, p.10–17, 1998.

DUNKLEY, C. S.; THOMAN, C. J. Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone series as potential antitumor agents. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters** [S.I.], v. 13, n. 17, p. 2899-2901, Sep 2003.

ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. **Methods.Enzymol.**, v.10, p. 41-47, 1967.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v.11, p. 81-128, 1991

EVANGELOU, A. M. Vanadium in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.42, p.249–265, 2002.

FAILLI, P. *et al.* A novel manganese complex effective as superoxide anion scavenger and therapeutic agent against cell and tissue oxidative injury. **J. Med. Chem.**, v. 52, p. 7273–7283, 2009.

FEDOTCHEVA, N. I. Effect of progesterone and its synthetic analogues on the activity of mitochondrial permeability transition pore in isolated rat liver mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 1060–1068, 2009.

FEISSNER, R. F. Crosstalk signaling between mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 1197-1218, 2009.

FERNANDES, M. A. S. Tetrandrine concentrations not affecting oxidative phosphorylation protect rat liver mitochondria from oxidative stress. **Mitochondrion**, v.6, p. 176–185, 2006

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FERREIRA, W. D. *et al.* Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: Chemical and biological studies. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 2984-2991, Mar 2008.

FLOHÉ, L.; Günzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 105, 1984. Assays of glutathione peroxidase, p.114-120.

FULDA, S. Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic cancer. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 13, n. 7, p. 1221-1227, 2009.

GAO, S.Y. *et al.* The effect of Solanine on the Membrane Potential of mitochondria in HepG2 Cells and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in the Cells. **World J. Gastroenterology**, v. 12, n.21, p.3359-3376. Jun 2006.

GHOBRIA, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. **CA Cancer J Clin** v. 55, n.3, p.178-194, 2005.

GLENNON, R. A.; COBURN, R. A. Mesoionic purinone analogs - syntheses and in-vitro antimicrobial activity of various mesoionic xanthine analogs. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, n. AUG26, p. 71-71, 1973.

GONZALEZ, D. *et al.* Caspase-3 and-9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 333, n.1-2, p. 151-157, 2010.

GRECO, C. V. et al. Synthesis of Sydnones and Sydnone Imines. **Journal of Medicinal e Pharmaceutical Chemistry** [S.I.], v. 5, n. 4, 1962.

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**, v.8, p.88-9, 1997.

GRYNBERG, N. et al. Some New Aryl-Sydnones - Effects on Murine Tumors. **Anticancer Research** [S.I.], v. 12, n. 3, p. 1025-1028, May-Jun 1992.

GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **American Journal of Physiology**, v. 258, n. 5, p. C755-C786, May 1990.

GUNTER, T. E.; SHEU, S. Characteristics and possible functions of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, p. 1291-1308, 2009.

GUPTA, A.; PRAKASH, L. Synthesis of some new mesoionic heterocycles and their antimicrobial activity. **Indian Journal of Chemistry**, Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, v. 32, n. 9, p. 989-990, 1993.

HAIL JUNIOR, N.; LOTAN, R. Cancer chemoprevention and mitochondria: targeting apoptosis in transformed cells via the disruption of mitochondrial bioenergetics/redox state. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 59, p.49-67, 2009.

HALESTRAP, A. P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. **Biochemical Society Transactions**, v.34, p.232-237. Apr 2006.

HALILA, G. C. et al. Effect of sydnone SYD-1, energy-linked functions a mesoionic compound, on of rat liver mitochondria. **Chemico-Biological Interactions** [S.I.], v. 169, n. 3, p. 160-170, Sep 2007.

HANLO, M. C.; SEYBERT, D. W. The pH Dependence of Lipid Peroxidation using Water-Soluble Azo Initiators. **Free Radical Biology & Medicine**, v.23, n. 5, p. 712-719, 1997.

HANSSON, M. J.; MANSSON, R. et al. Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition. **Free Radical Biology and Medicine**, v.45, n.3, p.284-294. Aug 2008.

HE, M.; CAI, J. Y. et al. Identification of thioredoxin-2 as a regulator of the mitochondrial permeability transition. **Toxicological Sciences**, v.105, n.1, , p.44-50, Sep 2008.

HELLBERG, M.; STUBBINS, J. F.; GLENNON, R. A. A preliminary investigation of mesoionico xanthine analogues as inhibitors of platelet aggregation. **Bioorg. Med. Chem.** v.8, p.1917-1923, 2000.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry**: Role of free radicals. In: K.B. Storey, Editor, *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, Wiley-Liss, Hoboken, NJ 2004.

HOLLEY, et al. Progesterone stimulation of manganese superoxide dismutase and invasive properties in T47D human breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.** v. 117, p. 23-30, 2009

IMAI, H. et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 278–286, 2003.

JAISWAL, M. K. *et al.* Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. **Bmc Neuroscience**, v.10, n. 64, p. 1-16, 2009.

JAVADOV, S.; KARMAZYN, M.; ESCOBALES, N. Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 30, n.3, p. 670-678, 2009.

JONES, D. P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. **Chemico-Biological Interaction**, v. 163, p. 38-53, 2006.

JOURDAIN, A.; MARTINOU, J-C. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41, p. 1884–1889, 2009.

KADENBACH, B.; RAMZAN, R.; VOG, S. Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function. **Trends in Molecular Medicine**, v.15, n.4, p.139-147, 2009.

KADIKOYLU, G. The effects of desferrioxamine on cisplatin- induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, p. 29-34, 2004.

KAGAWA, H. *et al.* Oxidation and rearrangements of flavanones by mammalian cytochrome P450. **Xenobiotica.** v. 34, n. 9, p. 797–810, 2004.

KAHRAMAN, S.; FISKUM, G. Anoxia-induced changes in pyridine nucleotide redox state in cortical neurons and astrocytes. **Neurochem Res.**, v. 32, p. 99–806, 2007.

KALINOWSKI, D. S; RICHARDSON, D. R. The Evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v.57, p. 547-583, 2005.

KAPPE, C. O.; KAPPE, T. Cross-conjugated and pseudo-cross-conjugated mesomeric betaines .18. Bicyclic mesoionic pyrimidines with cardiovascular activity. **Archiv Der Pharmazie**, v. 324, n. 11, p. 863-866, Nov 1991.

KIER, L. B.; ROCHE, E. B. Medicinal Chemistry of the Mesoionic Compounds. *Journal of Pharmaceutics Sciences*. v. 56, n.2, p. 149-168. Feb 1967.

KIKUCHI, K. *et al.* Cardiovascular action of mesoionic compounds, 3-substituted sydnonimines. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 23-e, 1970.

KINNALLY, K. W.; ANTONSSON, B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. **Apoptosis**, v. 12, p. 857–868, 2007.

KISELYOV, K. e MUALLEM, S. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in lysosomal storage diseases. **Cell Calcium**, v.44, n.1, p.103-111. Jul 2008.

KLOSE, *et al.* Role of ATP-Dependent Calcium Regulation in Modulation of Drosophila Synaptic Thermotolerance. **Journal of Neurophysiology**, v. 102, n. 2, p. 901-913, 2009.

KOSOWER, N. S.; KOSOWER, E. M.; WERTHEIM, B. Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. **Biochem Biophys. Res. Comm.**,v. 37, p. 593-596, 1969.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASRILHO, R. F. *et al.* Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **Febs Letters**, v.495, n.1-2, p.12-15. Apr 2001.

KOWALTOWSKI, A. J. *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p.333–343, 2009.

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

KUMARSWAMY, R.; CHANDNA, S. Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them? **Mitochondrion** , v. 9, n. 1, p. 1-8, Feb 2009.

LEE, M. G. *et al.* Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome C release. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 3, p. 303-306, Mar 2001.

LEFEVRE, *et al.* Evaluation of lipid peroxidation by assaying the thiobarbituric acid-reactive substances. **Annales de Biologie Clinique**, v. 53, n. 3, p. 205-319, 1998.

LEITE, S. **Estudo da toxicidade induzida pelo antiinflamatório sulindaco e seus metabólitos sulfona e sulfeto**. Tese (Doutorado em Toxicologia, área de concentração: Toxicologia) – Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto.

LEUNG, A. W. C.; HALESTRAP, A. P. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v.1777, n.7-8, p.946-952. Jul-Aug 2008.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, 293-303, 2001.

LIN, C.C.; YIN, M.C. B vitamins deficiency and decreased anti-oxidative state in patients with liver cancer. **Eur J Nutr.** v.46, p.293–299, 2007.

LISA, F. D.; KALUDERCIC, N.; CARPI, A.; MENABO, R.; GIORGIO, M. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66Shc and monoamine oxidase. **Basic Res Cardiol**, v.104, p.131–139, 2009.

LIU, J. F.; CLAIR, D. K. S. et al. Blocking mitochondrial permeability transition prevents p53 mitochondrial translocation during skin tumor promotion. **Febs Letters**, v.582, n.9, p.1319-1324. Apr 2008.

LIUZZI, F. et al. Rescue of cells from apoptosis by antioxidants occurs downstream of GSH extrusion. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1010, p.441-445, 2003.

LOBANOV, A. V.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, p. 1424–1428, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. C.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

MACCARRONE, M.; TACCONE-GALLUCCI, M.; FINAZZI-AGRO, A. 5-lipoxygenase-mediated mitochondrial damage and apoptosis of mononuclear cells in ESRD patients. **Kidney International**, v. 63, n. 84, p. S33-S36, 2003.

MACCARRONE, M., MELINO, G. FINAZZI-AGRO, A. Lipoxygenases and their involvement in programmed cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 8, p. 776-784, 2001.

MAHÉO, K. et al. Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA:

A role for lipoperoxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.39, p. 742-751, 2005.

MARÍ, *et al.* Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p. 2685-2700, 2009.

MAKIN, G.; HICKMAN, J.A. Apoptosis and cancer chemotherapy. **Cell Tissue Res.** v. 301, p.143–152. 2000.

MANCUSO, M. *et al.* Diagnostic approach to mitochondrial disorders: the need for a reliable biomarker. **Current Molecular Medicine**, v.9, p.1095-1107, 2009.

MARTINS, N. M. *et al.* Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. **Journal of Applied Toxicology**, v.28, p.337-344, 2008.

MARTIN, L. J. The mitochondrial permeability transition pore: A molecular target for amyotrophic lateral sclerosis therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1802, p. 186–197, 2010.

MATOS, H. R.; Di MASCIO, P. MEDEIROS, M. H. G. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 383, n. 1, p. 56–59, 2000.

MATYSIAK, J. Evaluation of antiproliferative effect in vitro of some 2-amino-5-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole derivatives. **Chemical e Pharmaceutical Bulletin [S.I.]**, v. 54, n. 7, p. 988-991, Jul 2006.

MATYSIAK, J. *et al.* Synthesis and antiproliferative activity of some 5-substituted 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 475-482, Apr 2006.

MAYEVSKY, A.; CHANCE, B. FORM. Oxidation–reduction states of NADH in vivo: From animals to clinical use. **Mitochondrion**, v.7, p. 330–339, 2007.

MENDEZ-SANCHEZ, S. C. **Efeito do composto mesoiônico MI-D e da imida cíclica S2.2 sobre mecanismos relacionados à indução de morte celular por via mitocondrial.** 2009 Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MENDEZ-SANCHEZ, S. C. *et al.* The inhibition of lipoperoxidation by mesoionic compound MI-D: A relationship with its uncoupling effect and scavenging activity. **Chemico-Biological Interactions**, v 179, p. 125-130, 2009.

MIAO, L.; CLAIR, D. K. S. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 344–356, 2009.

MONTANARI, C. A. et al. Mesoionic 1,3,4-oxadiazolium-2-aminide and 1,3,4-oxadiazolium-2-olate: Synthesis, geometry, electronic structure and antibiotic activity. **Heterocyclic Commol.Lunications**, v. 2, n. 1, p. 71-79, 1996.

MUKHERIEE, R. *et al.* Mitochondrial injury in pancreatitis. **Cell Calcium**, v.44, n.1, p.14-23. Jul 2008.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biohem. J.**, v.471, p. 1-13, 2009.

NEIDLEIN, R.; EDER, T. Biotransformation and pharmacokinetics of mesoionic didehydro-4-methyl-5-phenyl-1,3,4-thiadiazolidine-2-thione (lu 2443) - studies on the biotransformation in rats. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 32-2, n. 10, p. 1292-1298, 1982.

NEWTON, C. G; RAMSDEN, C. A. Meso-Ionic Heterocycles. **Tetrahedron**. v.38, n.20, p. 2965-3011. 1982

NICHOLLS, D. G. e FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 3**. San Diego: Academic Press, cap.1,2,4,5 e 9. 2002.

NISHIMIKI, M.; RAO, N.A.; YAGI, K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochemical and Biophysical Research Commol.Lunication**. v. 46, p. 849–853, 1972.

OLLIS, W. D.; RAMSDEN, C. A. Meso-Ionic Compounds\*. **Adv. Heteroc. Chemistry**. 1976.

OSMAN, A. M. M. Effect of methimazole treatment on doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.2425–2430, 2009.

OXENKRUG, G. Antioxidant effects of n-acetylserotonin: possible mechanisms and clinical implications. **Annals New York Academy of Sciences**, v.1053, p.334-347, 2005.

PAIM, B. A. *et al.* Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p.444–451, 2008.

PATHANIA, D.; MILLARD, M.; NEAMATI, N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, p.1250–1275, 2009.



PETRONILLI, V.; COLA, C.; BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore, v. 268, n. 2, p. 1011-1016, 1993.

PIGOSO, A. A.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; RODRIGUES, T.; MINGATTO, F. E.; CURTI, C. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on calcium efflux in isolated rat renal cortex mitochondria and aspects of the mechanisms involved. **International Journal of Biochemical e Cell Biology**, v. 30, p.961-965, 1998.

PILLI, H. G. et al. Sydnone derivatives - synthesis and antimicrobial activity. **Archiv Der Pharmazie**, v. 326, n. 9, p. 559-561, 1993.

QI, H.; ZHAO, T.; ZHANG, Q.; LI, Z.; XING, R. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). **J Appl Phycol**, v. 17, p.527-534, 2005.

RALPH, J. S.; NEUZIL, J. Mitochondria as targets for cancer therapy. **Mol. Nutr. Food Res.** v.53, p.9-28, 2009.

REHSE, K.; KONIG, P. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, XII: Mesoionic oxatriazoles and related noncyclic nitrosohydrazine derivatives. **Archiv der Pharmazie**, v. 328, n.2, p.137-42, Feb 1995.

REHSE, K.; MARTENS, A. Platelet aggregation inhibiting and anticoagulant effects of oligoamines, XXII: Bisoxazol-, bisimidazol-, bisthiazol- and oligo-1,2,4-thiadiazolimines. **Archiv der Pharmazie**. v.326, n.7, p.:399-404, Jul. 1993.

RIBEIRO, S. M. R., *et al.* A formação e os efeitos da espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIGOBELLO, M. P. *et al.* Distribution of protein disulphide isomerase in rat liver mitochondria. **Biochem. J**, v.356, p.567-570, 2001.

RIGOBELLO, M. P. *et al.* Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of permeability transition and release of cytochrome c. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 689-696, 2004.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v.84, p. 705-712, 2009.

RODRIGUES, R. F. *et al.* A comparative study of mesoionic compounds in *Leishmania* sp. and toxicity evaluation. **European journal of medicinal chemistry**, v.42, n.7, p. 1039-43, 2007.

ROGERS, M. E. *et al.* Mesoionic Purinone analogues as inhibitors of cyclic-AMP phosphodiesterase: a comparison of several ring systems. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 24, n.11, p.1284-87, 1981.

SADZUKA, Y; SHOJI, T.; TAKINO, T. Mechanism of the increase in lipid peroxide induced by cisplatin in the kidneys of rats. **Toxicology Letters**, v. 62, p.293-300, 1992.

SALVADOR, M; HENRIQUES, J A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA, 2004.

SALVI, M. *et al.* Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 24407-24415, 2007.

SANTIAGO, A. P. S. A., *et al.* Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: Correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. **Biochimie**, v. 90, p.1566-1577, 2008.

SANTOS, N. A. G. *et al.* Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Arch Toxicol**, v. 81, p. 495-504, 2007.

SANTOS, N. A. G. **Efeito da cisplatina na função, estresse oxidativo e estado redox mitochondrial renal em ratos: efeito protetor da dimetiltiouréia**. 2006. (Doutorado em Toxicologia, área de concentração: Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP Ribeirão Preto.

SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. In: FLEISCHER, S.; PACKER, L. (Eds.). **Methods in Enzymology**. New York:Academic Press, v. 56, p.301-352, 1979.

SCHNEIDER, *et al.*, Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. **The FASEB Journal**, v. 23, p. 3233- 3242, 2009.

SCHONAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. **Farmaco**, v. 54, n. 5, p. 316-320, May 1999.

SEILER, A. *et al.* Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. **Cell Metabolism**, v.8, p. 237–248, 2008.

SEN, D. K. *et al.* Effects of mesoionic xanthine analogs on trypanosoma-musculi development in mice. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 259-262, May-Jun 1993.

SEFFF-RIBEIRO, A., *et al.* Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16+F10 murine melanoma. **Melanoma Research**, v.13, n.5, Oct, p.465-471. 2003.

SEFFF-RIBEIRO, A. *et al.* Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **British Journal of Cancer**, v.91, n.2, Jul, p.297-304. 2004.

SHINZATO, T. O. *et al.* Antitumor-activity of a new mesoionic compound of the 1,3,4-triazolium-5-thiolate class. **Anticancer Research**, v. 8, n. 5, p. 1098-1098, 1988.

SHUVAEVA, T. M. *et al.* Peroxiredoxins, a New Family of Antioxidant Proteins. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.35, n.5, 2009.

SIES, H., O. R., *et al.* Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **Febs Letters**, v.103, n.2, p.287-290. 1979.

SOARES-BEZERRA, R. J. *et al.* Effect of mesoionic 4-phenyl-5-(cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylaminechloride derivative salts on the activities of the nitric oxide synthase and arginase of *Leishmania amazonensis*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal**, v.23, n.3, p. 328-333, 2008.

STANKIEWICZ, A.; SKRZYDLEWSKA, E. Protection against cyclophosphamide-induced renal oxidative stress by amifostine: the role of antioxidative mechanisms. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v.13, p. 301–308, 2003.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, p.1478–1485, 2009.

SUTIN, L. *et al.* Oxazolones as potent inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 17, p. 4837-4840, Sep 2007.

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

TELLES, *et al.* Bcl-xL inhibits Bax-induced alterations in mitochondrial respiration and calcium release. **Neuroscience Letters**, v. 442, p. 96–99, 2008.

TINLOK, C. *et al.* SN Mechanism in Aromatic Compounds .Part 30. Sydnone Ring. **Journal of the Chemical Society**, APR 1964.

TONISSEN, K. F.; TRAPANI, G. D. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 53, p. 87-103, 2009.

TOYOKUNI, *et al.* Combined histochemical and biochemical analysis of sex hormone dependence of ferric nitrilotriacetate-induced renal lipid peroxidation in ddY mice. **Cancer Research**, v. 50, p. 5574-5580, 1990.

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

VINCENT, R.; NADEAU, D. Adjustment of the osmolality of Percoll for the isopycnic separation of cells and cell organelles. **Analytical Biochemistry**, v. 141, p. 322-328. 1984.

VIVES-BAUSA, C.; STARKOV, A.; GARCIA-ARUMI, E. Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase. **Methods in Cell Biology**, v. 80, p. 379-393, 2007.

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

VOSS, D. O.; COWLES, J. C.; BACILA, M. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. **Anal. Biochem.**,v. 6, p.211-222, 1963.

WALKER, K. A. M. et al. Antitrichomonal activity of mesoionic thiazolo[3,2-a]pyridines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 1673-1679, 1985.

WALLACE, K. B. Mitochondrial off targets of drug therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.29, n.7, p.361-366. Jul 2008.

WATERHOUSE, N. J.; GOLDSTEIN, J. C. et al. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic. **Journal of Cell Biology**, v.153, n.2, p.319-328. Apr 2001.

WILLEMSEA, P.H.G.M., SMEITINKB, J.A.M., KOOPMAN W.J.H. Mitochondrial dynamics in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41, p.1773–1782, 2009.

WONDRAK, G. T. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 12, 2009.

YANG, J. *et al.* Mechanism of free zn(2+) enhancing inhibitory effects of EGCG on the growth of pc-3 cells: interactions with mitochondria. **Biol Trace Elem Res**, v. 131, p.298–310, 2009.

YUAN, S. P.; FU, Y. *et al.* Voltage-dependent anion channel 1 is involved in endostatin-induced endothelial cell apoptosis. **Faseb Journal**, v.22, n.8, p.2809-2820. Aug 2008.

YUKI, H. *et al.* A free radical initiator, 2,2-azobis (2-aminopropane)dihydrochloride enhances hyperthermia-induced apoptosis in human uterine cervical cancer cell lines. **Free Radical Research**, v. 37, p. 631-643, 2003.

ZAGO, E. B. *et al.*. The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. **FEBS Letters**, v.478, p.29-33, 2000.

ZORATTI, M.; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1241, p. 139-176, 1995.

**10. ANEXO**

# 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](#)