

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNA PAULA BRANDT

Efeitos da sidnona SYD-1 sobre alguns parâmetros metabólicos ligados à provisão de energia em células de hepatoma (HepG2) e hepatócitos

CURITIBA
2012

ANNA PAULA BRANDT

Efeitos da sidnona SYD-1 sobre alguns parâmetros metabólicos ligados à provisão de energia em células de hepatoma (HepG2) e hepatócitos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências-Bioquímica

Orientadora: Prof^a. Dr^a Silvia Maria Suter
Correia Cadena

Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a Guilhermina
Rodrigues Noletto
Prof^a. Dr^a Maria Eliane
Merlin Rocha

CURITIBA
2012

TERMO DE APROVAÇÃO



Anna Paula Brandt

EFEITOS DA SIDNONA SYD-1 SOBRE ALGUNS PARÂMETROS METABÓLICOS LIGADOS À PROVISÃO DE ENERGIA EM CÉLULAS DE HEPATOMA (HEPG2) E HEPATÓCITOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Silvia Maria Suter Correia Cadena (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof.ª Dr.ª Alexandra Acco
Departamento de Farmacologia – UFPR

Prof.ª Dr.ª Glauca Regina Martinez
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, Fevereiro de 2012.

Dedico esse trabalho a razão do meu viver...
a pessoa que é minha fortaleza, o meu porto seguro ...
que sempre me incentivou, acreditou em mim ...
e que eu amo incondicionalmente ...
minha amada mãe ...
e à pessoa que mesmo não estando presente ...
está sempre em meu coração ...
meu amado pai (*in memoriam*)

Agradecimentos

À Deus, Pai eterno que me deu a vida, uma família maravilhosa, amigos especiais, a oportunidade de sonhar, lutar por eles e que sempre me conforta nos momentos mais difíceis.

À minha amada mãe, Neiva Brandt, que é razão do meu viver e meu exemplo de vida. A ela que sempre me amou verdadeiramente, me incentivou a lutar pelos meus sonhos, mesmo que para isso eu tivesse que abdicar da sua presença diária, apoiou incondicionalmente em todas minhas escolhas, vibrou com minhas vitórias e me confortou nos momentos de tristeza ...

À minha querida professora Sílvia Cadena, que sempre esteve ao meu lado não somente como uma orientadora, mas como uma amiga, me ouvindo, aconselhando, apoiando e incentivando, sempre com muita paciência e carinho. Que acreditou em mim quando nem eu mesmo acreditava. Que é um exemplo de pessoa sempre preocupada com meu bem estar e de todos que fazem parte do seu convívio, além de ser uma ótima profissional ética e correta. Obrigada por fazer parte da minha vida e espero que estejamos sempre próximas.

Ao meu tio Vilceu Bordignon, por estar sempre disponível em me ajudar, pelo apoio, pelas conversas tranquilizadoras, pelo envio de materiais e correções e pelo imenso carinho.

Às professoras Dras. Guilhermina Rodrigues Noleto e Maria Eliane Merlin Rocha pela orientação e ajuda nos experimentos, pela paciência, pelas conversas, pelo incentivo, por se preocuparem sempre com meu bem estar e pelo carinho.

À professora Dra. Gláucia Regina Martinez, pela correção do projeto.

As demais professoras do Laboratório de Oxidações biológicas e Cultivo celular por estarem sempre dispostas a ajudar.

À professora Dra. Alexandra Acco do Departamento de Farmacologia pela ajuda essencial na obtenção dos hepatócitos, pela paciência e por dividir comigo seu conhecimento.

As minhas amadas amigas Juliana Amorin, Carolina Lane, Marília Locatelli, Patrícia Peres e Carina Scoparo pelo aconchego das vossas amizades, por me receberem como integrantes das vossas famílias, pelos momentos de distração que são essenciais, pelo consolo quando os experimentos não davam certo, pelo carinho, amor e por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu amigo João Bento, por ser companheiro em todos os momentos.

À colega de laboratório Amanda pela ajuda no planejamento e execução dos experimentos e por dividir comigo suas experiências e seu conhecimento.

À Lyvia, Andréia, Elizabeth, Thiago, Paulo e Gláucio pela ajuda não só nos experimentos, mas nas dificuldades que surgiam no dia-a-dia, pelas conversas, risadas e conselhos.

Ao Carlos Eduardo do departamento de farmacologia pelo auxilio nos experimentos de isolamento de hepatócitos.

A todos que me ajudaram na realização deste trabalho.

A todos meus colegas da turma de mestrado.

À professora Áurea Echevarria pela gentil doação do composto foco deste estudo.

À técnica de laboratório Franciane

Aos funcionários do Biotério Setor de Ciências Biológicas da UFPR por fornecer os animais utilizados nesse estudo

Aos funcionários da Biblioteca

À secretaria da pós-graduação Irene

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação e professores do departamento de Bioquímica da UFPR.

A Agência financiadora CAPES/REUNI e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em diferentes momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado.

**Um Pouco de ciência nos afasta de Deus ..
Muito nos aproxima ..
‘Louis Pasteur’**

RESUMO

O carcinoma hepatocelular é uma das neoplasias malignas de maior incidência e, em relação às demais, representa a terceira causa de morte no mundo. No entanto, os medicamentos disponíveis para o seu tratamento são ineficazes, o que justifica a busca constante de novas drogas para este fim. Neste contexto, no presente estudo foram avaliados os efeitos da sidnona SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato), que apresenta importante atividade antitumoral contra Carcinoma de Erlich e Sarcoma 180, sobre células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e hepatócitos de rato, em suspensão e em cultivo. Ainda, investigou-se a liberação de óxido nítrico (NO^{\bullet}) a partir da estrutura de SYD-1, e seu envolvimento na inibição do estado 3 da respiração, efeito anteriormente atribuído ao mesoiônico. Em mitocôndrias isoladas, SYD-1 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) promoveu uma inibição de ~35% sobre o estado 3 da respiração, sendo esta parcialmente revertida em 14% pela adição de hemoglobina (Hb - $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Em sistema livre de mitocôndrias, utilizando a sonda fluorescente DAF-FM, evidenciou-se a liberação de $13,69 \pm 2,67 \text{ nmol.L}^{-1} \text{ NO}^{\bullet}/\text{min}$, a partir da estrutura de SYD-1 (3 mmol.L^{-1}). A viabilidade de células HepG2 cultivadas, avaliada pelo método do MTT, foi diminuída pelo SYD-1 ($25\text{-}100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) de maneira tempo e dose dependentes, chegando a ~96% de redução após 72h, para a maior concentração ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Por outro lado, o composto (25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) não afetou a viabilidade destas células em suspensão, após dois minutos de incubação, como determinado pelo método do azul de tripan. Nestas mesmas condições, SYD-1 não afetou a respiração celular, porém, promoveu a diminuição dos níveis de piruvato em ~38% e aumento dos níveis de lactato de ~17%, após 40 min de incubação ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Diferentemente, a respiração de células HepG2 cultivadas por 24h na presença de SYD-1 (25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi alterada. SYD-1 ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) reduziu o consumo de oxigênio durante o estado desacoplado da respiração em ~26%. Nestas condições, houve uma diminuição dos níveis de piruvato em ~56% e o aumento dos níveis de lactato em ~32%. Análises morfológicas destas células mostraram sofrimento, evidenciado pela vacuolização e projeções citoplasmática (*blebs*) e retração celular. SYD-1 (25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) não afetou a viabilidade, avaliada pelo método do azul de tripan, como também a respiração de hepatócitos em suspensão, após 2 minutos de incubação. No entanto, a produção de piruvato foi diminuída (~36%) e a de lactato aumentada (~22%), após 40 min de incubação ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Já nestas células em cultura, o mesoiônico ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) diminuiu a viabilidade, avaliada pelo método do MTT, em ~66% após 18 horas de incubação. Nestas mesmas condições, SYD-1 promoveu um aumento da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) de ~83% e 257% para as concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Ainda, alterações morfológicas observadas na concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foram sugestivas de sofrimento celular e os estados basal e desacoplado da respiração celular foram inibidos em ~79% e ~39%, respectivamente. Nestas células, a produção do piruvato e lactato foi aumentada na presença de SYD ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em ~83% e ~16%, respectivamente. Os resultados em mitocôndrias isoladas sugerem que o efeito inibitório do SYD-1 sobre o estado 3 da respiração seja, em parte, decorrente da liberação de NO^{\bullet} a partir de sua estrutura. Os efeitos sobre células HepG2 e hepatócitos sugerem que SYD-1 compromete significativamente funções metabólicas relacionadas a provisão de energia, em particular a via glicolítica e a fosforilação oxidativa e, quando considerada a menor concentração ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$), seus efeitos são mais pronunciados sobre as células tumorais.

Palavras chaves: Sidnonas, SYD-1, mitocôndrias, células HepG2, hepatócitos, metabolismo.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma is a malignant neoplasm of high incidence and, in comparison to the other cancers, represents the third cause of death in the world. However, the drugs available for treatment are ineffective, which justify the research for new therapies. In this context, the present study evaluated the effect of SYD-1, which was shown to have important antitumor activities against Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180, on human hepatocarcinoma cells (HepG2) and mouse hepatocytes maintained in suspension or in culture. It was also investigated the nitric oxide (NO•) release from the SYD-1 structure and its involvement in the inhibition of state 3, an effect previously described for this mesoionic. In isolated mitochondria, SYD-1 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) decreased the respiratory rate by ~35% during state 3, which was partially reversed (~14%) by the addition of hemoglobin (Hb - $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$). In assays using the fluorescent probe DAF-FM in a mitochondria-free system, it was verified the release of $13.69 \pm 2.67 \text{ nmol.L}^{-1}$ of NO•/ min from SYD-1 (3 mmol.L^{-1}). In HepG2 cultured cells, SYD-1 ($25\text{-}100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) reduced the cell viability in a time- and dose-dependent way, reaching up to 96% decreasing after 72 hours ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$), as determined by MTT method. The compound (25 and $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) did not change the viability of these cells in suspension after two min of incubation, as determined by Trypan blue. In this condition, SYD-1 did not affect respiratory parameters of HepG2 cells. However, SYD-1 treatment ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) decreased the levels of pyruvate (~38%) and increased lactate (~17%) after 40 min of incubation. In contrast, the respiration of HepG2 cultured cells was significantly affected by incubation with SYD-1 (25 and $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) for 24 h. The compound ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) reduced the oxygen consumption during the uncoupled state of respiration by ~26%. In this experimental situation, SYD-1 also promoted the reduction of pyruvate levels by ~56% and the increase in the lactate levels by ~32% (24h incubation at $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Morphological analysis of HepG2 cells in culture after treatment with SYD-1 (25 and $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) for 24 h showed cellular injury as evidenced by the occurrence of cytoplasmic vacuolization and cell shrinking. SYD-1 (25 and $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) did not affect the viability of hepatocytes in suspension, as evaluated by Tripan Blue, as well as respiratory parameters in these cells, after incubation for 2 min. However, the production of pyruvate was reduced (~36%) and lactate increased (~22%) after 40 min incubation with SYD-1 ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). After 18h of incubation, the compound ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) decreased cell viability of ~66% of cultured hepatocytes, as evaluated by MTT. At the same conditions, SYD-1 promoted an increase in the release of the enzyme lactate dehydrogenase by ~83% and ~257% for concentrations of 25 and $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively. Morphological changes seen in cultured cells treated with SYD-1 ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) were suggestive of cell distress. Basal and uncoupled states of cellular respiration were inhibited at ~79% and ~39%, respectively, by SYD-1 ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). The production of pyruvate and lactate was increased in the presence of SYD ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) at ~83% and ~16%, respectively. The results from isolated mitochondria suggest that the inhibitory effect of SYD-1 on the state 3 is partially due to the release of NO• from its structure. In addition, SYD-1 effects on HepG2 cells and hepatocytes indicate that this mesoionic impairs metabolic functions, particularly energy-linked functions involving oxidative phosphorylation and glycolysis. At the lowest concentration ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$), SYD-1 effects are more pronounced on tumor cells.

Key words: Sydnones, SYD-1, mitochondria, HepG2 cells, hepatocytes, metabolism.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	FÓRMULA GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO	22
FIGURA 2-	ESTRUTURAS DE RESSONÂNCIA DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS.....	22
FIGURA 3-	ESTRUTURA REPRESENTATIVA DAS SIDNONAS	24
FIGURA 4-	REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA ARIL SIDNONA 3-[4-X-3-NITROFENIL)-1,2,3-OXADIAZOLIUM-5-OLATES	25
FIGURA 5-	REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA E SUBSTITUINTES DOS COMPOSTOS <i>N</i> -(4'-X-3'-NITROFENIL) SIDNONAS	26
FIGURA 6-	REPRESENTAÇÃO DA REDUÇÃO ENZIMÁTICA DE SAIS DE MTT A SAIS DE FORMAZAN	37
FIGURA 7-	EFEITO DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO	48
FIGURA 8-	EFEITO DO SIN-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO	49
FIGURA 9-	LIBERAÇÃO DE NO [•] A PARTIR DE SYD-1 E SIN-1	50
FIGURA 10-	EFEITO DO SYD-1 SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2.....	54
FIGURA 11-	EFEITO DO SYD-1 SOBRE A VIABILIDADE DE HEPATÓCITOS	55
FIGURA 12-	EFEITO DO SYD-1 SOBRE A LIBERAÇÃO DE LDH EM CÉLULAS HEPG2 ...	56
FIGURA 13-	EFEITO DO SYD-1 SOBRE A LIBERAÇÃO DE LDH EM HEPATÓCITOS	57
FIGURA 14-	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 - COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA	59
FIGURA 15-	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 – CONTRASTE DE FASE	60
FIGURA 16-	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 TRATADAS COM SYD-1 – CONTRASTE DE FASE	61
FIGURA 17-	MORFOLOGIA DOS HEPATÓCITOS – CONTRASTE DE FASE	62
FIGURA 18-	MORFOLOGIA DOS HEPATÓCITOS TRATADOS COM SYD-1 – CONTRASTE DE FASE	63
FIGURA 19-	TRAÇADO DEMONSTRATIVO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO CELULAR EM OXÍGRAFO OROBOROS-2K.....	65

FIGURA 20-	EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS HEPG2 EM SUSPENSÃO	66
FIGURA 21-	EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM HEPATÓCITOS EM SUSPENSÃO	67
FIGURA 22-	EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS HEPG2 CULTIVADAS	69
FIGURA 23-	EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM HEPATÓCIDOS CULTIVADOS	70
FIGURA 24-	EFEITOS DO SYD-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE PIRUVATO E LACTATO EM CÉLULAS HEPG2 EM SUSPENSÃO	72
FIGURA 25-	EFEITOS DO SYD-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE PIRUVATO E LACTATO EM HEPATÓCITOS EM SUSPENSÃO	73
FIGURA 26-	EFEITOS DO SYD-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE PIRUVATO E LACTATO EM CÉLULAS HEPG2 CULTIVADAS	74
FIGURA 27-	EFEITOS DO SYD-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE PIRUVATO E LACTATO EM HEPATÓCITOS CULTIVADOS	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- EFEITO DO SYD-1 SOBRE O ESTADO 3 DA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL	50
TABELA 2- EFEITOS DO SYD-1 SOBRE CÉLULAS HEPG2 E HEPATÓCITOS EM SUSPENSÃO	78
TABELA 3- EFEITOS DO SYD-1 SOBRE CÉLULAS HEPG2 E HEPATÓCITOS EM CULTIVO	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA	-Albumina bovina sérica
CCR	-Coeficiente de controle respiratório
DAF-FM	-4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorocéina, Diaminofluorocéina
DMEM	-Meio Eagle's modificado Dubecco's
DMSO	-Dimetilsulfóxido
EGTA	-Ácido etileno glicol bis (éter 2-amino-etil) N,N,N',N' tetracético
FCCP	-Carbonil cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona
GSNO	-S-nitrosoglutationa
HBSS	-Solução salina balanceada de Hanks
HIF-1	-Fator induzido por hipóxia
CHC	-Carcinoma Hepatocelular
Hb	-Hemoglobina
HEPES	-N-(2-hidroxietil) piperina N' (ácido 2-etano sulfônico)
MCT	-Transportadores monocarboxilato
MTT	-Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NO [•]	-Óxido nítrico
NOR-3	-Doador de óxido nítrico
PBS	-Solução salina tamponada
SIN-1	-3-morfolinosidnonimina
SYD-1	-3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato
TUNEL	- <i>TdT mediated dUTP-biotin Nick end labeling</i>
Tris	-Tris (hidroximetil) amino metano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 METABOLISMO DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	16
2.2 CÂNCER HEPÁTICO	19
2.3 COMPOSTOS MESOIÔNICOS - CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ATIVIDADE BIOLÓGICA	21
2.3.1 Sidnonas	23
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	29
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 REAGENTES	31
5.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE SYD-1	31
5.3 ANIMAIS	32
5.4 EFEITOS DO SYD-1 SOBRE CÉLULAS EM CULTURA	32
5.4.1 Células	33
5.4.2 Soluções	33
5.4.2.1 Solução de Perfusão	33
5.4.2.2 Solução de Isolamento 1 – Hepatócitos	33
5.4.2.3 Solução de Isolamento 2 – Hepatócitos	34
5.4.2.4 Solução Salina Tamponada (PBS)	34
5.4.2.5 Solução Dispersante de células - Tripsina/EDTA	34
5.4.2.6 Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS)	34
5.4.3 Meios de cultura	35
5.4.4 Cultura Primária de Hepatócitos	35
5.4.5 Cultura de Células de Hepatoma Humano (HepG2)	37
5.4.6 Coleta de células	37
5.4.7 Contagem	38
5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	38
5.5.1 Determinação da Viabilidade Celular – Método do MTT	38
5.5.2 Determinação da Viabilidade Celular – Método do Azul de Tripan	39
5.5.3 Determinação da Viabilidade Celular através da atividade da enzima Lactato Desidrogenase	40
5.5.4 Análise da Morfologia	40
5.5.4.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina	40
5.5.4.2 Microscopia de Contraste de Fase	41
5.5.5 Determinação de Lactato e Piruvato	41
5.5.6 Determinação do Consumo de Oxigênio	42
5.5.7 Determinação da Liberação de NO [•] a partir da estrutura de SYD-1	43
5.5.7.1 Sistema livre de células/mitocôndrias	
5.5.7.2 Determinação da liberação de NO [•] a partir de SYD-1 em mitocôndrias isoladas	44
5.5.7.2.1 Isolamento de Mitocôndrias	44
5.5.7.2.2 Mitocôndrias Isoladas	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1 LIBERAÇÃO DE NO [•] A PARTIR DA ESTRUTURA DE SYD-1	46
6.1.1 Ensaios em Mitocôndrias Isoladas.....	46
6.1.2 Ensaios em Sistema Livre de Mitocôndrias	51

6.2 EFEITO DO SYD-1 SOBRE CÉLULAS HEPG2 E HEPATÓCITOS	52
6.2.1 Viabilidade Celular	53
6.2.2 Morfologia Celular	58
6.2.3 Respiração Celular	64
6.2.3.1 Células HepG2 e hepatócitos em suspensão	66
6.2.3.2 Células HepG2 e hepatócitos em cultura	68
6.2.4 Produção de Lactato e Piruvato	71
7. DISCUSSAO FINAL	76
8. CONCLUSÕES	82
9. REFERÊNCIAS	83
ANEXO 1	94

1. INTRODUÇÃO

O termo câncer é aplicado a mais de 100 diferentes doenças (INCA, 2010), responsáveis, no ano de 2007, por 7,6 milhões das mortes mundiais, com estimativas de 518.510 novos casos no Brasil, para os anos de 2012 e 2013 (IARC, 2010; BRASIL, 2011). Esta doença é caracterizada pelo descontrole no crescimento celular e falhas na regulação do processo de morte celular (VENKATARAMANA *et. al.*, 2010; HARRINGTON, 2007).

O câncer hepático se destaca dentre os demais por ser o terceiro responsável pelas mortes em nível mundial (FERLAY *et. al.*, 2010). Sua incidência é maior em homens com mais de 40 anos e está associado a vários fatores de risco, entre eles as infecções decorrentes dos vírus da hepatite B e C (KEW, 2010). Esta é uma doença grave para qual não há tratamento farmacológico efetivo, o que justifica as pesquisas realizadas na tentativa de encontrar novos compostos que possam levar a cura da doença, como alternativa à intervenção cirúrgica (ROSSI *et. al.*, 2010). Dentre os compostos estudados, têm merecido especial atenção os denominados mesoiônicos por apresentarem diversas atividades biológicas, entre as quais se destaca a antitumoral.

Considerando a importante atividade antitumoral do composto mesoiônico 3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato (SYD-1), pertencente à classe das sidnonas, contra Carcinoma de Erlich e Sarcoma 180, e, ainda, a inexistência de literatura que relate o efeito deste composto sobre linhagens de carcinoma altamente incidente nos dias atuais, no presente estudo foram avaliados seus efeitos sobre células HepG2 humanas (Carcinoma Hepatocelular) e hepatócitos de rato. Sabe-se, ainda, que SYD-1 compromete o processo de fosforilação oxidativa principalmente por promover uma importante inibição do transporte de elétrons através da cadeia respiratória, efeito possivelmente associado à liberação de óxido nítrico a partir da sua estrutura, o que poderia relacionar-se a sua atividade antitumoral. Com base nesta informação, ainda, neste estudo, foi avaliado o possível mecanismo envolvido no comprometimento da fosforilação oxidativa, particularmente na inibição do estado 3 da respiração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 METABOLISMO DAS CÉLULAS TUMORAIS

O relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC/OMS, 2010), publicado em 2008, aponta que o número de casos de câncer a nível mundial mais que dobrou em 30 anos, sendo responsável por 7,6 milhões das mortes mundiais no ano de 2007. Segundo a Organização Mundial da Saúde, essa incidência tende a aumentar ainda mais, atingindo 27 milhões de novos casos e 17 milhões de mortes por câncer no ano 2030, principalmente nas populações de países em desenvolvimento (INCA, 2010). Isso se deve principalmente as mudanças no estilo de vida dessa população, como o aumento do consumo de cigarros, de ácidos graxos saturados e de alimentos altamente calóricos, associados ao sedentarismo (JEMAL *et al.*, 2010).

No Brasil Estimativas para o ano de 2012/2013 apontam para a ocorrência de 518.510 novos casos, sendo que 257.870 acometeriam o sexo masculino e 260.640 o sexo feminino. Dessa forma, o câncer vem merecendo destaque nas últimas décadas, tornando-se um evidente problema de saúde pública mundial (BRASIL, 2011).

Atualmente entende-se o câncer como resultado de mutações no DNA, que levam a várias alterações somáticas em uma única célula, desregulando e induzindo falhas nos processos de divisão, bem como desequilíbrio no controle da morte celular programada (ALBERTSSON *et. al.*, 2003). Ainda, ocorrem alterações na interação entre as células o que permite a migração destas para tecidos vizinhos e conseqüentemente metástase, característica marcante dos tumores malignos (LANFRANCONE *et. al.*, 1994).

O termo câncer passou então a ser utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças (INCA, 2010), que possuem em comum a proliferação celular desregulada e a supressão de fatores que envolvem a morte celular (VENKATARAMANA *et. al.*, 2010; HARRINGTON, 2007).

Sendo assim, as células tumorais possuem metabolismo muito distinto das células saudáveis, como resultado de mutações que alteram a expressão e a atividade de enzimas que determinam a velocidade das vias metabólicas (CHEN *et. al.*, 2009).

A alteração metabólica mais conhecida e estudada é o chamado Efeito Warburg. Estudos iniciais a respeito desta alteração datam de 1920, quando Otto Warburg descobriu

que mesmo na presença de oxigênio, as células de diferentes tumores, oxidavam preferencialmente e parcialmente a glucose para obtenção de energia, com a produção de grande quantidade de lactato, mesmo sendo o rendimento energético desta via muito inferior ao da oxidação total do carboidrato através da fosforilação oxidativa (MATOBA *et. al.*, 2006).

O efeito Warburg confere diversas vantagens à célula tumoral, que ao utilizar a glucose como combustível aproveita os intermediários de sua via de oxidação para a biossíntese de nucleotídeos, lipídios, proteínas e, ainda, os equivalentes redutores como NADPH. A grande oxidação de glucose nestas células permite sua rápida proliferação e disseminação (LE MELLAY *et. al.*, 2002; DEBERARDINIS *et. al.*, 2008). Como consequência da rápida proliferação celular e da incapacidade do sistema vascular em prover uma quantidade de oxigênio suficiente, o ambiente se torna hipóxico. Então, para garantir sua sobrevivência, as células precisam se adaptar ao novo e desfavorável ambiente. Esta adaptação inclui a expressão da subunidade HIF-1 α do fator de transcrição HIF-1, regulada pela presença de oxigênio. Assim, quando as células estão bem oxigenadas, esta subunidade é hidroxilada e se liga a proteína supressora de tumor Von Hippel-Lindau que coordena sua degradação proteossomal. No entanto, sob condições de hipóxia, a hidroxilação é inibida e a subunidade HIF-1 α dimeriza-se com a constitutivamente expressa subunidade HIF-1 β (SEMENZA, 2010; CHUN *et. al.*, 2010), passando a favorecer a mudança do metabolismo oxidativo para o glicolítico, através da indução de genes responsáveis pelo aumento da expressão de enzimas integrantes da via glicolítica, de transportadores de glucose (GLUT) e lactato (MCT), da angiogênese e proliferação celular. Além disso, o HIF-1 inativa a fosforilação oxidativa através da indução de piruvato desidrogenase quinase-1 (PDK-1) e lactato desidrogenase A (LDH-A). A PDK-1 ao fosforilar o complexo piruvato desidrogenase promove sua inibição, o que diminui a descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA. Assim, as velocidades das reações do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa são diminuídas. O piruvato que não participa no ciclo de Krebs é reduzido a lactato, processo facilitado pela elevada concentração de LDH-A. O excesso de lactato, por sua vez, promove alterações no pH e parece favorecer a migração das células tumorais para outros tecidos, no entanto o mecanismo ainda não é totalmente compreendido (STUBBS; GRIFFITHS, 2010; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010; TENNAT; DURÁN; GOTTLIEB, 2010).

Ainda, estas mudanças metabólicas favorecem a diminuição da produção de EROS pela via mitocondrial, uma vez que esta organela está com sua função diminuída, o que por

sua vez, previne o desencadeamento de mecanismos de indução da morte celular (WELJIE; JIRIK, 2010; MORENO-SANCHES *et. al.*, 2007).

Essas mudanças metabólicas podem também ser ativadas por oncogenes ou pela perda de fatores supressores do tumor (HSU; SABATINI, 2008). Assim, mudanças metabólicas são também reguladas por outros fatores como PI3K, MYC e proteína quinase ativada por AMP (AMPK) entre outros (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011).

Além disso, as células cancerosas podem aumentar sua capacidade de biossíntese de macromoléculas através da expressão preferencial de uma isoforma da piruvato quinase, a PK-M2. Essa enzima catalisa a conversão irreversível do fosfoenolpiruvato a piruvato, porém, de forma mais lenta que outras isoformas, permitindo, assim, o desvio dos intermediários da via glicolítica para outras vias anabólicas, como a via da pentose fosfato (WON, *et. al.*, 2012; CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011).

A inativação de fatores supressores de tumor também altera o equilíbrio entre as vias glicolítica e da fosforilação oxidativa. A proteína p53 além de controlar o ciclo celular, regula a expressão gênica da citocromo c oxidase 2 (SCO2), que junto com a proteína citocromo c oxidase 1 (SCO1), é responsável pela formação do complexo proteico citocromo c oxidase, que por sua vez é essencial para que ocorra a fosforilação oxidativa. Portanto, mutações em p53 resultam na deficiência deste complexo, o que prejudica o processo de fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, promovem a mudança para o metabolismo glicolítico (FERREIRA, 2010; GOTTLIEB; VOUSDEN, 2010).

O alterado crescimento tumoral pode também relacionar-se com outras alterações nas funções mitocondriais. Quando isto ocorre, a tendência natural é que ocorra um aumento na atividade glicolítica, uma vez que esta passa a ser a única via geradora de ATP. Isto foi observado por Lopez-Rios *et al.* (2007), quando analisaram células de carcinoma de pulmão na presença de oligomicina e obtiveram como resultado um rápido aumento da glicólise anaeróbia, sugerindo, assim, que as células podem se tornar glicolíticas quando há perda da produção mitocondrial de ATP.

Vários mecanismos são propostos para explicar a diminuída atividade da fosforilação oxidativa nas células tumorais, entre estes: a diminuição do pH citosólico (como resultado do aumento na produção de ácido láctico), a competição entre fosforilação oxidativa e glicólise pelo ADP e fosfato inorgânico e, danos à membrana mitocondrial interna provocado por radicais livres, entre outros (DIAZ-RUIZ *et al.*, 2009).

Como bem estabelecido, as mitocôndrias têm fundamental importância nos processos de provisão de energia e na produção de EROS (SOLAINI; SGARBI; BARACCA, 2010).

Por sua vez, a superprodução ou acúmulo de EROS leva a disfunção mitocondrial (por lesar o DNA mitocondrial), a oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, além de facilitar o processo de instalação do tumor, ao promover lesões genéticas. Assim, danos oxidativos induzidos por EROS parecem ser os principais responsáveis pela instabilidade genética mitocondrial que resulta em disfunção da organela. Esta disfunção pode resultar na diminuição da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, conferindo a célula tumoral resistência ao processo de apoptose. (GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010).

2.2 CÂNCER HEPÁTICO

Dentre as mais freqüentes neoplasias malignas está o câncer hepático, representando a quinta maior incidência em homens e a oitava maior em mulheres. Em razão da alta mortalidade, esta patologia também representa, dentre as demais, a terceira principal causa de morte no mundo, com aproximadamente 630.000 novos caso anuais, e por isso, constitui um importante problema de saúde pública (KOLLER; GEEVARGHESE; GORDEN, 2007; FERLAY *et. al.*, 2010).

Sua incidência é maior em países pouco desenvolvidos e endêmicos para infecção do vírus da hepatite B, principalmente no continente Asiático, como China, Japão e Taiwan chegando a atingir 50% das causas de morte naqueles países. É também prevalente na África Sub-Saária, onde representa 89% dos casos de câncer. Lugares com elevadas taxas de infecção pelo vírus da hepatite C, como Europa e America do Norte também apresentam elevado número de casos desta patologia (KEW, 2010). No Brasil, este tipo de câncer representou um total de 7.580 mortes no ano de 2008 (INCA, 2010).

As diferenças na incidência desta neoplasia devem-se também a outros importantes fatores como obesidade, diabetes e padrões dietéticos, características demográficas, estilo de vida, influências ambientais, uso de contraceptivos orais e sobrecarga de ferro (CHUANG; LA VECCHIA; BOFFETTA, 2009). Além destes, outros conhecidos fatores de risco são mais fortemente associados a um tipo específico de câncer hepático, o carcinoma hepatocelular (CHC); sendo eles o tabagismo, consumo excessivo de álcool, cirrose, exposição a comidas contaminadas com aflotoxinas, histórico familiar de carcinoma hepatocelular e fatores virais (positividade para antígeno HbsAG). No entanto, estes fatores parecem atuar como co-fatores

na presença de infecção viral crônica (ENGSTROM, 2002; JEMAL *et al.*, 2010; MCCLUNE, TONG, 2010).

A íntima relação entre a infecção por vírus da Hepatite B (HBV) e hepatocarcinoma celular foi primeiramente relatada em 1975, sendo atualmente reconhecida como principal fator responsável pelo desenvolvimento desta doença. Hoje, estima-se que 350 a 400 milhões de pessoas estão infectadas cronicamente com este vírus em todo o mundo e que desse número, um quarto irá desenvolver CHC (KEW, 2010; MCCLUNE, TONG, 2010). O CHC por sua vez, é responsável por meio milhão de mortes anuais em todo o mundo (TSUJI *et al.*, 2010).

Embora a infecção viral possa ocorrer ainda na infância, como acontece em países endêmicos para esse vírus, adultos com mais de 40 anos estão mais susceptíveis, principalmente os do sexo masculino (JOHNSON, 2002).

O CHC acomete células do parênquima hepático, os hepatócitos, originando-se no próprio órgão, sendo por isto caracterizado como um câncer primário (GISH, 2010; AmericanCancerSociety). É resultado de mutações acumulativas em hepatócitos já maduros, estimulados por fatores externos, resultado em desregulada proliferação, morte celular ou produção de populações de células monoclonais, que podem formar nódulos e evoluir para tumor. Pode ainda ter origem a partir de células embrionárias. No entanto, o mecanismo pelo qual esse tumor desempenha sua patogênese é muito complexo e ainda desconhecido, visto a heterogeneidade desse câncer e a complexidade das funções desempenhadas pelos hepatócitos (BRUIX *et al.*, 2004).

Quando o diagnóstico é confirmado, o tratamento mais utilizado é a remoção cirúrgica do tumor, com aumento de sobrevida de até 70% dos pacientes. No entanto, a maioria dos portadores de CHC não pode ser tratada desta forma, principalmente por limitar muito as funções do órgão. Neste caso, a opção então é a radioterapia. Esta, por sua vez, não é adotada em muitos pacientes, justamente pela baixa tolerabilidade do fígado a radiação. Isto levou a pesquisa e implantação de novas técnicas radiológicas que já apresentam resultados promissores, entre outras, a radioterapia guiada por imagem, a radioterapia tridimensional conformacional, e a próton terapia, onde altas doses de radiação são usadas, mas o tecido hepático é preservado (WANG *et al.*, 2010).

O transplante de fígado ou o processo de ressecção é o único tratamento que pode curar pacientes com CHC ou cirrose, porém, não é aplicável a todos os pacientes, é preciso levar em conta o tamanho do tumor, sua profundidade e presença ou não de metástase. Somando-se a isto, existem situações onde estes tratamentos não são indicados, é o caso de

insuficiência hepática grave. Por fim, os pacientes ainda ficam na dependência de escassos doadores, estando sujeitos a possibilidade de reincidência do tumor, metástase e morte (CHOI *et. al.*, 2011; MCKILLOP *et. al.*, 2006; TSIM *et. al.*, 2010).

Em relação ao tratamento farmacológico, nenhuma terapia tem sido descrita como eficiente até o momento. No entanto, um novo medicamento chamado Sorafenib tem apresentado resultados promissores. O medicamento atua impedindo a proliferação e angiogênese tumoral, e aumentando a apoptose celular, por inibir diferentes quinases (LLOVET *et. al.*, 2008).

Devido à gravidade desta doença e a limitação nas formas de tratamento atualmente disponíveis, a pesquisa por novas drogas é essencial.

2.3 COMPOSTOS MESOIÔNICOS - CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Compostos heterocíclicos estão envolvidos em diversos tipos de reações químicas, algumas fundamentais à manutenção da vida, como a transmissão de impulsos nervosos, o metabolismo e a transferência de informação genética. Os processos de síntese química oferecem a possibilidade de gerar compostos com diferentes substituintes no anel heterocíclico, o que pode resultar em derivados de grande interesse para indústria farmacêutica, uma vez que apresentam importantes atividades biológicas (POZHARKÛ *et. al.*, 1997). Dentre estes, têm merecido destaque os denominados mesoiônicos.

Os compostos mesoiônicos são conhecidos há mais de um século, sendo o termo, resultante da combinação de mesomérico e iônico, primeiramente sugerido por Simpson em 1946, para descrever moléculas cuja representação por estrutura covalente foi questionada por outros pesquisadores (KIER; ROCHE, 1967).

Posteriormente, em 1955 Baker e Ollis sugeriram que os compostos mesoiônicos não poderiam ser representados por uma estrutura covalente, mas sim como um híbrido de ressonância. Eles propuseram, então, que este termo deveria ser aplicado a moléculas que apresentassem as seguintes características estruturais:

- um anel heterocíclico com cinco, seis ou sete elementos, que não pode ser representados unicamente por uma estrutura polar ou covalente;
- um sexteto de elétrons π , distribuídos por todos os átomos do anel;

- carga positiva ou negativa no anel heterocíclico, contrabalançada pela carga oposta localizada em um heteroátomo exterior ao mesmo;
- estrutura planar, ou próxima a isso, e ainda possuir considerável energia de ressonância.

No ano de 1976, Ollis e Ramsden propuseram uma modificação nesse conceito: “*um composto pode ser apropriadamente classificado como mesoiônico quando for constituído por um anel heterocíclico de cinco membros, o qual não pode ser representado satisfatoriamente por uma estrutura covalente ou polar, e que possuam um sexteto de elétrons π associados aos cinco átomos que formam o anel*”.

De acordo com essa definição, a fórmula geral aceita para representar compostos mesoiônicos está apresentada na FIGURA 1, onde as letras de a-f representam geralmente C, N, O, S ou Se, e seus respectivos substituintes (KAWASE; SAKAGAMI; MOTOHASHI, 2009).

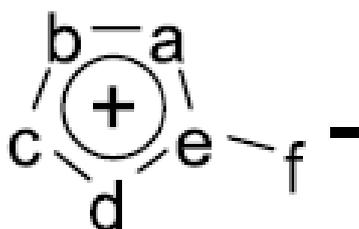


FIGURA 1: FÓRMULA GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO
FONTE: KAWASE; SAKAGAMI; MOTOHASHI, 2009

Atualmente, o conceito estabelecido por Ollis e Ramsden (1976) é consenso na literatura. A estrutura proposta e aceita permite que os mesoiônicos apresentem um momento dipolo na estrutura e, no entanto, sejam globalmente neutros. Devido às estas características os compostos mesoiônicos não podem ser representados unicamente por uma estrutura polar ou covalente, mas sim como híbridos de ressonância (FIGURA 2) (BADAMI, 2006).

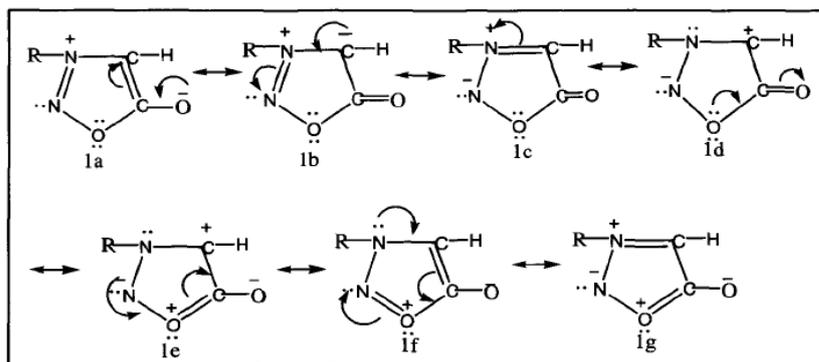


FIGURA 2: ESTRUTURAS DE RESSONÂNCIA DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS

FONTE: BADAMI, 2006

Nota: Estrutura de ressonância representativa de compostos mesoiônicos da classe das sidnonas

Assim, o valor destes compostos como substâncias biologicamente ativas, deve-se as suas características químicas (KIER; ROCHE, 1967). Uma vez que estes compostos são globalmente neutros, podem atravessar membranas biológicas e, por outro lado, como apresentam cargas parciais positiva e negativa, também podem interagir com biomoléculas. Devido a estas características, é crescente o interesse científico em torno destas moléculas, sendo que diversos compostos vêm sendo sintetizados, muitos dos quais apresentam relevante atividade biológica (KAWASE; SAKAGAMI; MOTOHASHI, 2009; MALLUR *et. al.*, 2007), entre as quais: anti-inflamatória, analgésica, antitumoral, antidepressiva, hipotensora, antimalárica e antibimicrobiana (BROWNE; HARRITY, 2010).

Os compostos mesoiônicos são agrupados em classes de acordo com a constituição do anel mesoiônico, sendo as principais: as sidnonas, sidinoniminas, oxatriazois, 1,3,4-tiadiazois e isosidionas (KAWASE; SAKAGAMI; MOTOHASHI, 2009). A seguir, esta revisão enfocará a classe das sidnonas, uma vez que o SYD-1, objeto deste estudo, pertence a esta classe de mesoiônicos.

2.3.1 Sidnonas

Os primeiros compostos mesoiônicos sintetizados pertenciam à classe das sidnonas. Devido a isto e também a importantes atividades biológicas apresentadas por alguns destes derivados, as sidnonas são os compostos mesoiônicos mais estudados. A primeira sidnona (1,2,3-oxadiazole-5-ona – FIGURA 3), foi sintetizada no ano de 1935 por Earl e Mackney na Universidade de Sydney, e foram assim nomeadas em homenagem a esta instituição.

(KAWASE; SAKAGAMI; MOTOHASHI, 2009; BADAMI, 2006, KIER; ROCHE, 1967; NEWTON; RAMSDEN, 1982).

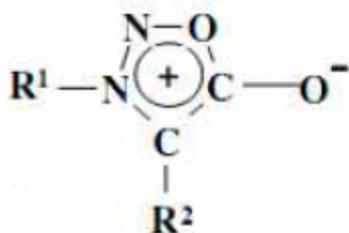


FIGURA 3: ESTRUTURA REPRESENTATIVA DAS SIDNONAS

FONTES: NEWTON; RAMSDEN, 1982

As sidnonas constituem uma classe definida de compostos anidro, cuja forma clássica de obtenção envolve apenas duas etapas: uma *N*-nitrosação seguida por uma ciclodesidratação. No entanto, várias modificações químicas têm sido introduzidas nestes compostos, tal como acilação, halogenação, bromação, litiação, cicloadição com alquenos e alquinos, entre outros. Estas alterações visam a síntese de compostos biologicamente ativos ou a potencialização de efeitos biológicos já conhecidos (BROWNE; HARRITY, 2010).

O primeiro relato de avaliação da atividade biológica das sidnonas data do ano de 1957. Naquele estudo, Brookes e Walker sintetizaram derivados 3-metil-4-alkil sidnonas e testaram seus efeitos sobre os microrganismos *Streptococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Leuconostoc mesenteroides*. Porém, as sidnonas não apresentaram atividade (KIER; ROCHE, 1967; OLLIS; RAMSDEN, 1976).

A partir de então, derivados de sidnonas vêm sendo largamente sintetizados e avaliados quanto sua atividade biológica e, ao contrário do observado no estudo pioneiro de Brookes *et al.* (1957), já foram comprovadas as atividades antibacteriana (MOUSTAFA *et al.*, 2004; ASUNDARIA; PATEL, 2010), antitumoral (GRECO; CHENG; NYBERG, 1962; GRYNBERG *et al.*, 1992; DUNKLEY; THOMAN, 2003), antiepiléptica (NEIDLEIN; EDER, 1982), antiviral (PANDEY; TRIVEDI; MUKESH, 2006), analgésica, antiinflamatória, antihelmíntica (KALLURAYA *et al.*, 2000; KALLURAYA; RAHIMAN, 2003), antifúngica (KALLURAYA; LINGAPPA; NOOJI, 2007), como seqüestradores de radicais livres (MALLUR *et al.*, 2007), e doadora de óxido nítrico (SCHONAFINGER, 1999).

Em relação à atividade antitumoral, no ano de 1964, Tinlok *et al.* sintetizaram o derivado aril-sidnona (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato) – SYD-1)

posteriormente testado *in vivo* por Greco *et al.* (1962), onde foi constatada atividade antitumoral sobre carcinoma 755 e inatividade sobre sarcoma 180 e leucemia 1210, em ratos.

Grynberg e colaboradores (1992), confirmaram a efetividade de sidnonas anteriormente estudadas por Greco *et al.* (1962). Foram avaliadas aril sidnonas contra Sarcoma 180, Carcinoma de Ehrlich, Histiocitoma fibroso (B10MCII) e células leucêmicas L1210. Os compostos testados foram 3-[4-X-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazolium-5-olatos (FIGURA 4), onde o X correspondia aos substituintes Cl (SYD-1), anel pirrolidino (SYD-2), anel piperidino (SYD-3) e anel morfolino (SYD-4). 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. Os autores demonstraram que o composto SYD-1, foi ativo (*in vivo*) contra Sarcoma 180, Carcinoma de Ehrlich e Histiocitoma fibroso (B10MCII), e SYD-2 ainda foi ativo contra células leucêmicas L1210 (*in vivo*). Os demais compostos avaliados (SYD-3 e SYD-4), só puderam ser testados *in vivo* em quantidades muito pequenas em função da sua toxicidade, não apresentando, assim, nenhuma atividade. É importante ainda destacar, que *in vitro*, o composto mais citotóxico contra todas as classes de tumores citadas acima foi o SYD-1 e, que tanto este composto quanto o SYD-2, não promoveram mudanças no perfil hematológico dos animais.

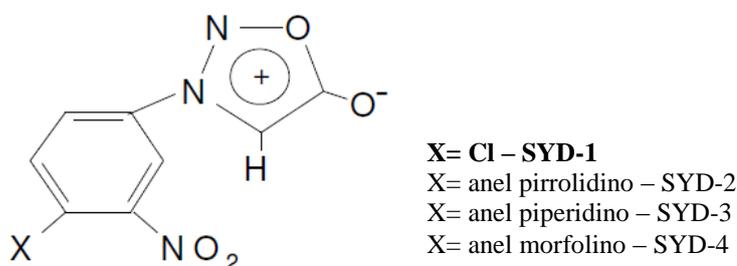


FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA ARIL SIDNONA 3-[4-X-3-NITROFENIL)-1,2,3-OXADIAZOLIUM-5-OLATES

FONTE: GRYNBERG *et al.*, 1992

Dunkley e Thoman (2003), dando prosseguimento aos estudos sobre a atividade antitumoral das sidnonas, sintetizaram e avaliaram a atividade biológica de seis compostos *para*-substituídos, análogos aqueles sintetizados por Grynberg *et al.* (1992). Inicialmente, o composto *N*-(4'-X-3'-nitrofenil) sidnonas foi substituído, onde R correspondia a: Cl (3a - SYD-1), F (3b), dietilamino (4a), azetidino (4b), indolino (4c) e isoindolino (4d), conforme demonstrado abaixo (FIGURA 5).

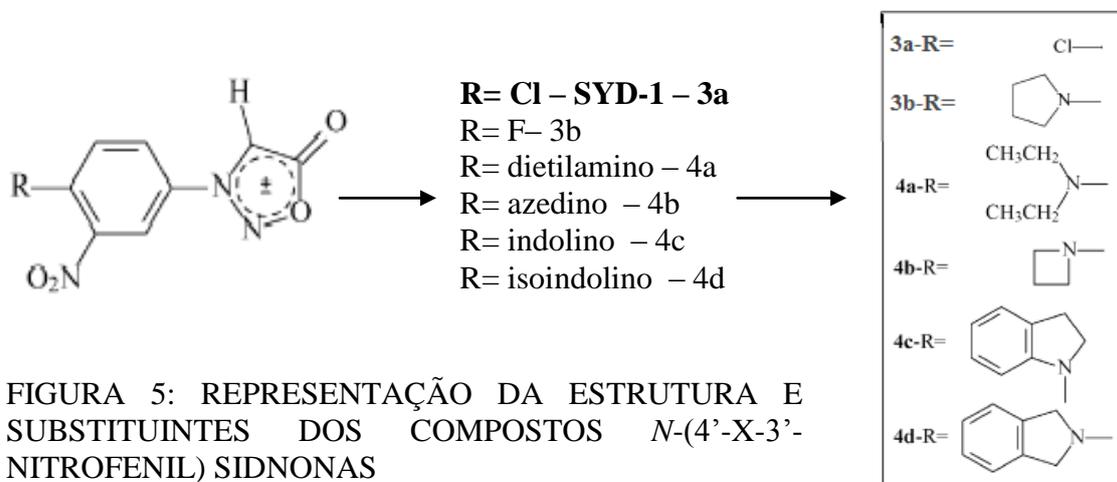


FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA E SUBSTITUÍNTES DOS COMPOSTOS *N*-(4'-X-3'-NITROFENIL) SIDNONAS

Posteriormente, os mesmos autores, testaram estes compostos contra três linhagens de células tumorais: MCF7 (câncer de mama), NCI-H460 (câncer de pulmão) e SF-268 (câncer de SNC). Como no trabalho anteriormente publicado por Grynberg *et al.* (1992), o composto que possuía o Cl como substituinte apresentou maior atividade antitumoral. Dunkley e Tomas (2003) testaram novamente este composto (3a-SYD-1) e compararam seus efeitos aqueles promovidos pelo composto que possuía o F como substituinte (3b), objetivando esclarecer se sua atividade devia-se ao efeito indutivo ou ao tamanho do substituinte. Observaram, que ambos os compostos inibiram o crescimento de pelo menos uma das linhagens em ~32%, enquanto o composto derivado 4'-fluorsidnona (composto 3b com substituição em 4') provou ser mais ativo que os primeiros, inibindo 100% do crescimento. Já, os demais compostos 4a-d não apresentaram atividade. Assim, sugeriu-se que o efeito indutivo seria o responsável pela atividade antitumoral dos compostos.

Embora o efeito antitumoral do composto SYD-1 já tenha sido demonstrado, os mecanismos envolvidos nesta atividade não foram esclarecidos. Neste contexto, considerando o envolvimento das mitocôndrias nos mecanismos de indução de morte celular, em particular na apoptose, no ano de 2007, Halila *et. al.*, avaliaram os efeitos do composto SYD-1 (FIGURA 6) sobre a bioenergética mitocondrial. Observaram que, o mesoiônico (1,5 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ proteína) inibiu o estado 3 da respiração em ~65% e ~40%, quando usados como substratos oxidáveis glutamato e succinato, respectivamente. A eficiência da fosforilação oxidativa também foi diminuída pelo composto (1,5 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ proteína), como verificado através do estímulo do estado 4 (~180% e ~40%, para o glutamato e succinato, respectivamente) e da atividade da ATPase (~450%) em mitocôndrias intactas. Como

consequência das alterações nos estados 3 e 4 da respiração, o coeficiente de controle respiratório (CCR) e a razão ADP/O foram significativamente reduzidos com ambos os substratos. Na mesma concentração ($1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína), SYD-1 reduziu o potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) em $\sim 50\%$. Experimentos de inchamento mitocondrial demonstraram que o composto altera a permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Análises da cadeia respiratória sugeriram, ainda, que SYD-1 promove a inibição do transporte de elétrons que ocorre após o complexo I, incluindo os complexos III e IV. Segundo os autores, os efeitos inibitórios do SYD-1 sobre o transporte de elétrons poderiam estar associados à liberação de óxido nítrico a partir de sua estrutura. Entretanto, esta hipótese não foi avaliada até o momento. Adicionalmente, o composto também foi capaz de inibir a enzima glutamato desidrogenase em $\sim 20\%$. Considerados todos os resultados, os autores concluíram que o SYD-1 compromete as funções mitocondriais ligadas à produção de energia, diminuindo a eficiência da fosforilação oxidativa. Neste contexto, o efeito mais significativo foi a inibição do transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória, o que poderia levar ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) e, como consequência, a indução do fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), o que poderia levar à morte celular por apoptose. Os autores sugeriram, então, que este efeito poderia relacionar-se a atividade antitumoral do SYD-1.

Dando continuidade aos estudos de Halila *et al.* (2007), Gozzi (2010) avaliou os efeitos do SYD-1 sobre fenômenos relacionados ao estresse oxidativo, especificamente a lipoperoxidação, a transição de permeabilidade mitocondrial, ao estado de oxidação dos nucleotídeos de piridina, ao transporte de cálcio, a capacidade sequestradora de ânions superóxido e a atividade das enzimas antioxidantes Catalase, Glutathione peroxidase (Gpx) e Glutathione reductase (Gred). O autor demonstrou que SYD-1 exerce tanto uma ação pró-oxidante, visualizado pela inibição das enzimas Gpx e Gred (~ 47 e 66% respectivamente, usando $1,0 \mu\text{mol}$ de SYD-1. mg^{-1} de proteína), e pelo aumento da captação de cálcio, quanto antioxidante, através do sequestro de radicais superóxido ($\sim 14\%$) e inibição da lipoperoxidação ferro-induzida (100%). No entanto, nenhuma alteração foi observada sobre as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Outro ponto a ser destacado, é a sugestão do autor de que este composto possa atuar pela interação com proteínas da membrana mitocondrial, uma vez que foi observado inibição do inchamento induzido por diamina em $\sim 78\%$, e, como já relatado anteriormente, o aumento na captação de cálcio. Através dos resultados obtidos, sugeriu-se que a ação antitumoral desta sidnona não está relacionada à indução de morte celular desencadeada por lipoperoxidação e formação do

poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), mas envolve outros mecanismos que precisam ser esclarecidos.

Recentemente, Bizetto *et. al.* (2011) avaliaram a atividade antiinflamatória e imunossupressora do SYD-1 em macrófagos isolados, uma vez que estas células estão diretamente relacionadas à resposta inflamatória. Os autores observaram diminuição de ~20% da viabilidade destas células na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ após 48 horas de incubação. Além disto, este composto aumentou a produção de ânion superóxido em ~150% e reduziu a capacidade fagocítica e produção de NO em ~65% e ~80%, respectivamente quando incubado por duas horas (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Após estimulação dos macrófagos por LPS, uma endotoxina presente na membrana de bactérias Gram-negativas e que estimula a produção de mediadores pró-inflamatórios, a diminuição na produção de NO chegou a ~98% e de IL-6 ~90% sob as mesmas condições. Com isto, os autores concluíram que o SYD-1 promove atividade antiinflamatória e imunossupressora semelhante à descrita para antiinflamatórios disponíveis no mercado, mas ressaltam que novos testes precisam ser realizados para clarificar o mecanismo envolvido neste processo.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Grynberg *et al.* (1992) e Dunkley e Tomas (2003), demonstraram a efetividade antitumoral do composto mesoiônico SYD-1 *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, enquanto Halila *et al* (2007) buscando informações relacionadas ao mecanismo de ação envolvido nesta atividade, relataram que o composto compromete o processo de fosforilação oxidativa, o que poderia induzir a morte celular. Ainda nesta linha de investigação, Gozzi (2010), demonstrou que embora esta sidnona atue de forma significativa sobre a bioenergética mitocondrial, não induz a formação do poro de permeabilidade mitocondrial, fenômeno reconhecidamente associado à ativação da via intrínseca da apoptose. Apesar da valiosa contribuição destes estudos, os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral do SYD-1 ainda não foram esclarecidos. Além disto, avaliações sobre uma possível seletividade do composto sobre células tumorais inexistem na literatura.

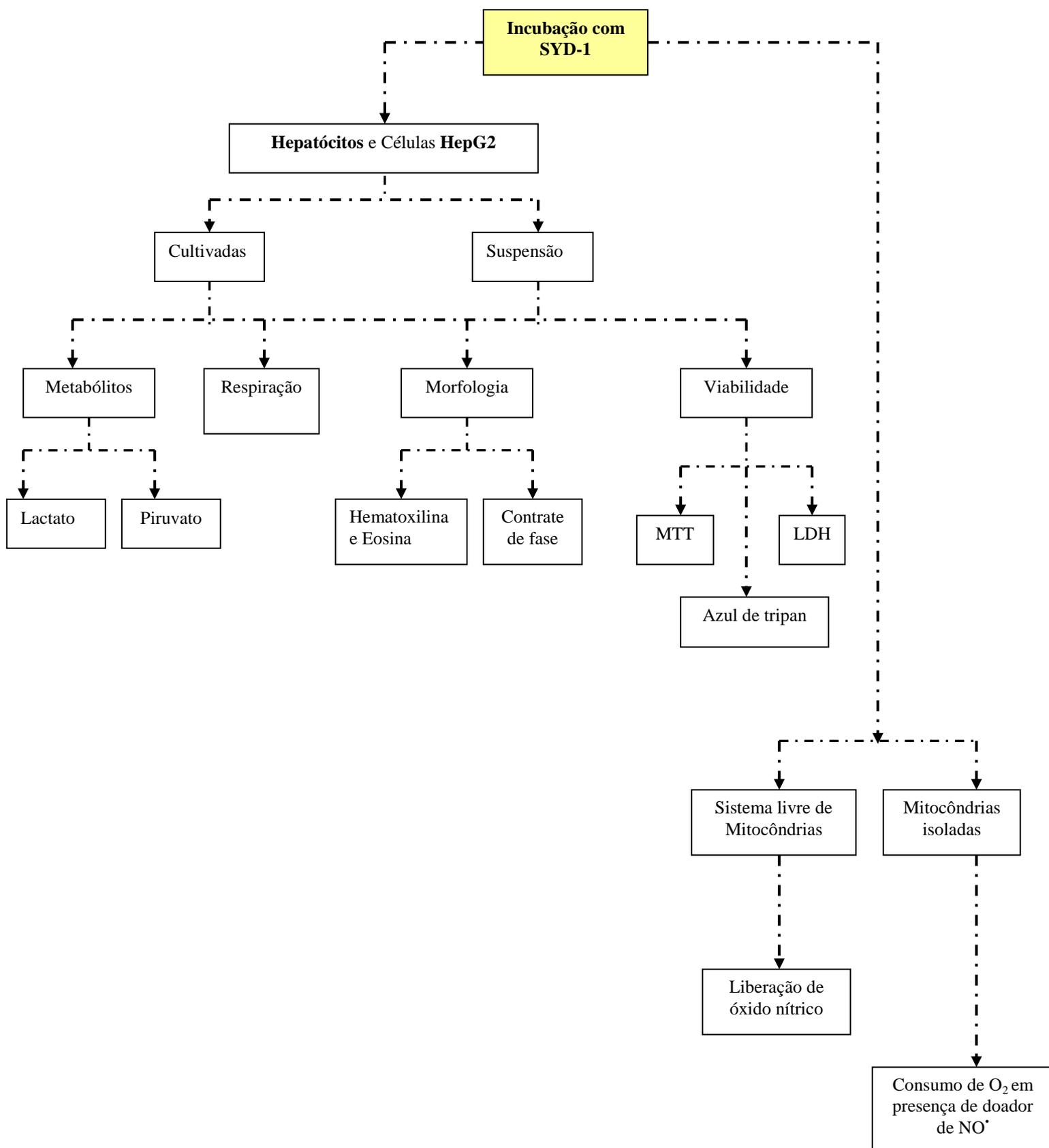
Considerando o exposto acima, a importância do desenvolvimento de compostos quimioterápicos mais eficazes, específicos e menos danosos, e, ainda, o fato de que o fígado é o principal órgão de metabolismo de xenobióticos, o presente estudo teve como um de seus objetivos avaliar os efeitos do SYD-1 sobre células de hepatoma humano (HepG2) e sobre hepatócitos de rato em cultura, buscando determinar as diferenças entre os efeitos causados pelo composto nas duas linhagens celulares e, ainda, estabelecer se há alguma seletividade para as células tumorais. Para este fim, foram objetivos específicos deste estudo avaliar os efeitos do SYD-1 sobre estas células em cultura quanto:

- A viabilidade;
- A morfologia;
- A análise de metabólitos (lactato e piruvato);
- Ao consumo de oxigênio.

Uma vez que os efeitos do SYD-1 sobre a bioenergética mitocondrial foram associados a uma possível liberação de óxido nítrico a partir de sua estrutura este estudo também teve como objetivo:

- Em mitocôndrias isoladas, avaliar os efeitos do SYD-1 sobre o consumo de oxigênio e parâmetros relacionados, em estudo comparativo com um conhecido doador de NO;
- Em sistema livre de mitocôndrias, avaliar a liberação de NO fazendo uso de sonda específica para detecção desse radical.

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

O composto mesoiônico SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato) foi sintetizado e gentilmente doado pela Professora 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 RMN¹H e ¹³C e espectroscopia de massas.

Os reagentes utilizados D-manitol, HEPES, EGTA, rotenona, ADP, ATP, NADH, NAD⁺, FCCP, oligomicina, L-glutamato desidrogenase, MTT, colagenase tipo IV e 1A, glucagon, insulina, fator de crescimento epidermal, eosina, hematoxilina, tripsina e Meio DMEM alta glucose, foram obtidos da Sigma Chemical Co.

Os reagentes seguintes foram obtidos dos laboratórios: soro fetal bovino e Hepatozyme – Gibco; fosfato de potássio monobásico – Synth; BSA, cloreto de potássio, sacarose, DMSO, Tris e os demais reagentes com alto grau de pureza, foram adquiridos da Merck.

5.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE SYD-1

O composto SYD-1 foi diluído em DMSO de forma a obter soluções estoque concentradas que variaram de 25 – 100 mmol.L⁻¹. Estas soluções foram mantidas congeladas a -18°C e utilizadas no prazo máximo de 1 mês. Como verificado através de análises de RMN¹H e ¹³C e espectroscopia de massas, nestas condições de armazenamento, são preservadas as características estruturais do composto por um mês (Echevarria, Comunicação pessoal).

Para cada experimento, também foi realizado um ensaio controle com o solvente DMSO, na maior concentração correspondente a de SYD-1 e nas mesmas condições experimentais, para fins de comparação. A concentração do DMSO não ultrapassou 0,01%.

5.3 ANIMAIS

Para os experimentos com células hepáticas, foram utilizados ratos machos albinos da raça Wistar, com peso variando entre 180-300g. Os mesmos foram mantidos no biotério do Setor de Biológicas da UFPR, alimentados com dieta balanceada Purina® e água a vontade, mantendo ciclo claro/escuro de 12 horas. Para obtenção do fígado, esses animais foram eutanasiados utilizando uma mistura de dois anestésicos, Cetamina (60 mg.Kg^{-1}) e Xilazina ($7,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$).

Para o isolamento de mitocôndrias de fígado de rato, foram utilizados ratos machos albinos Wistar com peso variando entre 180-200g, mantidos sob as mesmas condições, com a diferença que, previamente ao isolamento, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas permitindo-se água a vontade. Estes animais foram eutanasiados por decaptação.

Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com certificação de número 548 (Anexo 1).

5.4 EFEITOS DO SYD-1 SOBRE CÉLULAS EM CULTURA

Todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (VECO). O material de vidro utilizado para a manutenção das culturas, bem como tampas e pipetas foram esterilizadas em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão por quarenta e cinco minutos. O material plástico foi esterilizado em forno de microondas em potência média por 50 minutos. Após esterilização os materiais foram secos em estufa a 37°C . Todas as soluções utilizadas foram esterilizadas por filtração em membranas microporosas de acetato-nitrato de celulose com poros de $0,22 \mu\text{m}$, marca Millipore, em aparelho Sartorius ou em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão por quarenta e cinco minutos.

5.4.1 Células

Foram utilizadas células de hepatoma humano (HepG2) e hepatócitos. As primeiras foram provenientes da American Type Culture Collection e adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ, Rio de Janeiro, na passagem 85. Estas células crescem em monocamadas, sua morfologia é de natureza epitelial e diferem dos hepatócitos quanto a expressão de proteínas e fatores tumorais, possuindo ciclo celular com tempo médio de 20 horas (NATARANJAN; DARROUDI, 1991).

Os hepatócitos foram obtidas conforme item 5.4.4. Estas células possuem características cúbicas, crescem em monocamadas e possuem baixa viabilidade se mantidas por longo período em cultura (RAMOS, 1999).

5.4.2 Soluções

5.4.2.1 Solução de Perfusão

Constituída de solução de Krebs: NaCl 2,399 mol.L⁻¹, KCl 96 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 24 mmol.L⁻¹, MgSO₄ 24 mmol.L⁻¹ acrescida de NaHCO₃ 480 mmol.L⁻¹ e tampão Hepes 1 mol.L⁻¹, pH 7,4. Os componentes preparados como soluções estoque concentradas, foram autoclavados a 120°C e armazenados em geladeira até o momento do uso, quando foram diluídos (1x) em água bidestilada estéril.

5.4.2.2 Solução de Isolamento 1 – Hepatócitos

Esta solução foi constituída da solução de perfusão (item 5.4.2.1), acrescida de CaCl₂ 1,3 mol.L⁻¹ e colagenase 20 mg/mL.

5.4.2.3 Solução de Isolamento 2 - Hepatócitos

Constituída da solução de isolamento 1 (item 5.4.2.2) acrescida de BSA 20%.

5.4.2.4 Solução Salina Tamponada (PBS)

A Solução Salina tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque cinco vezes concentrada: Na_2HPO_4 1,15 g.L^{-1} , KH_2PO_4 0,2 g.L^{-1} , NaCl 7,95 g.L^{-1} e KCl 0,2 g.L^{-1} , autoclavada a 120°C, 1atm de pressão, e o pH ajustado para 7,4. Esta solução foi mantida sob refrigeração e no momento do uso diluída (5x) em água mili-Q estéril.

5.4.2.5 Solução Dispersante de Células – Tripsina/EDTA

A solução dispersante de células ou solução de tripsina foi utilizada para soltar as células da garrafa de cultura por ocasião dos repiques ou coleta para desenvolvimento dos experimentos.

Esta solução é constituída de tripsina 2,0 g.L^{-1} , NaCl 8 g.L^{-1} , KCl 0,4 g.L^{-1} , KH_2PO_4 0,06 g.L^{-1} , Dextrose 1,0 g.L^{-1} , vermelho de fenol 0,5%, NaHCO_3 0,195 g.L^{-1} e EDTA 0,25 g.L^{-1} . O pH (7,4) desta solução foi ajustado com HCl e sua esterilização feita por meio de filtração em membrana 0,22 μm , em aparelho Sartorius e mantida congelada -18°C em alíquotas. No momento da sua utilização, uma alíquota foi então descongelada em banho Maria a 37°C.

5.4.2.6 Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS)

A solução de HBSS constitui-se da mistura de duas soluções A e B, as quais foram preparadas como soluções estoque concentradas (20x) e armazenadas a 4°C. A solução A era

composta por NaCl 2,73 mol.L⁻¹, KCl 107 mmol.L⁻¹, CaCl₂ 25 mmol.L⁻¹ e MgSO₄.7H₂O 27 mmol.L⁻¹. A solução B era constituída por Na₂HPO₄ 8,5 mmol.L⁻¹ e glucose 110 mmol.L⁻¹. As duas soluções foram preparadas em água ultrapura em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. No momento do uso, as soluções foram misturadas (1:1) e diluídas em água ultrapura sendo o pH ajustado para 7,4. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana 0,22µm em aparelho Sartorius e armazenada a 4°C.

5.4.3 Meios de cultura

O meio utilizado para cultivar os hepatócitos e células HepG2 foi o Meio Eagle's modificado Dubecco's (DMEM alta glucose). Este meio disponível em forma de pó, foi resuspenso em água mili-Q e o pH ajustado para 7,4 com solução de bicarbonato de sódio. A esterilização do meio também foi realizada por filtração em membrana 0,22 µm, em aparelho Sartorius.

No momento da utilização, o meio foi aliqotado e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e gentamicina (50mg/mL) estéreis, sendo em seguida armazenado sob refrigeração. No caso específico dos hepatócitos, o meio foi suplementado com soro fetal bovino (3%), insulina (100 nmol.L⁻¹M), glucagon (10 nmol.L⁻¹), fator de crescimento epidermal (10 ng/mL), dexametasona (50 nmol.L⁻¹), penicilina (100 U/mL), e estreptomicina (100 ng/mL).

Ainda para o cultivo de hepatócitos foi utilizado o meio Hepatozyme®, disponível na forma líquida e estéril (pH 7,4). No momento da utilização, o meio foi aliqotado suplementado com glutamina 0,2 mmol.L⁻¹, penicilina (100 U/mL), e estreptomicina (100 ng/mL), sendo em seguida armazenado sob refrigeração.

5.4.4 Cultura Primária de Hepatócitos

Os hepatócitos foram isolados de fígado de rato de acordo com o método descrito por Seglen 1976, com modificações. O procedimento envolveu a perfusão do órgão com

colagenase, realizada no Departamento de Farmacologia da UFPR em colaboração com a Prof. Dra. Alexandra Acco.

O animal foi pesado e anestesiado por via intraperitoneal com a mistura dos anestésicos Cetamina (60 mg.Kg^{-1}) e Xilazina ($7,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Após anestesia, procedeu-se a abertura do abdome, isolamento do estômago e colédoco e a administração de heparina (5000 IU/mL) por via endovenosa (veia cava caudal), a fim de prevenir coagulação sanguínea. A veia porta foi então canulada e o fígado perfundido com a solução de perfusão (item 5.4.2.1) aerada com uma mistura de 95% de O_2 e 5% CO_2 (carbogênio) a 37°C sob um fluxo de 30 mL/min .

Após esta perfusão inicial, canulou-se a veia cava superior e o fígado foi novamente perfundido com a solução de isolamento 1 (item 5.4.2.2) acrescida de uma mistura de colagenase tipo IA (20 mg) e tipo IV (20 mg). Quando o fígado apresentou os primeiros sinais macroscópicos de perda de integridade tecidual (aproximadamente 10-20 minutos), o órgão foi cuidadosamente retirado e as células dispersas por ação mecânica. A suspensão celular foi então filtrada em malha de $50\mu\text{m}$ para retirar células maiores e a partir de então todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar a 4°C . A suspensão celular foi dividida em duas partes para o processamento que incluiu a adição da solução de isolamento 2 (item 5.4.2.3), centrifugação a 400rpm por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado, o pellet de células foi cuidadosamente ressuspense em meio de isolamento 2 (item 5.4.2.3), procedendo-se a nova centrifugação nas mesmas condições. Este processo foi repetido por 4 vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspense em DMEM alta glucose suplementado (item 5.4.3).

Por fim, foi verificada a viabilidade celular utilizando-se o corante azul de tripan ($0,4\% \text{ p/v}$) e a suspensão celular semeada em placa de cultura de 60cm^2 de diâmetro com meio DMEM alta glucose suplementado (item 5.5.2). As placas foram incubadas em estufa 37°C a 5% de CO_2 para adesão. Passadas 4 horas, o meio DMEM foi substituído pelo meio Hepatozyme®. As células foram mantidas em cultura nas mesmas condições por aproximadamente 18 horas, quando foram realizados os experimentos.

5.4.5 Cultura de Células de Hepatoma Humano (HepG2)

As células HepG2 foram cultivadas em garrafas com meio DMEM alta glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e gentamicina (50 µg/mL) (item 5.4.3). Estas garrafas foram mantidas em estufa 5% de CO₂ para adesão, crescimento e replicação até obtenção da quantidade de células necessárias para o desenvolvimento dos experimentos. Os repiques celulares foram feitos conforme observação da confluência celular, que ocorreu dentro de 48-72 horas. Todos os reagentes foram pré-aquecidos em banho Maria a 37°C. Após retirar o meio de cultura, a mesma foi lavada com aproximadamente 5 mL de PBS e foi adicionada a mesma quantidade de solução de tripsina-EDTA. Passados aproximadamente 2 minutos a solução dispersante foi removida com cuidado e acrescentado meio de cultura (5 mL) para descolar as células da superfície da garrafa com auxílio de uma pipeta acoplada a um pipetador automático.

A suspensão foi então transferida para uma nova garrafa de cultura de capacidade superior à posterior, sendo adicionado meio de cultura até o volume final correspondente à capacidade da garrafa.

5.4.6 Coleta de células

A coleta das células foi feita por tripsinização. Inicialmente foi retirado o meio de cultura e a monocamada de células lavada com PBS. Em seguida, foi adicionada a solução de tripsina-EDTA (item 5.4.2.5) e após o descolamento das células, foi adicionado meio de cultura e as células foram coletadas. A suspensão celular foi então destinada a uso conforme o experimento programado.

5.4.7 Contagem

Após coleta, a suspensão celular foi quantificada usando hemocitômetro NEUBAUER, utilizando-se o valor correspondente à média das duas Câmaras, com auxílio de microscópio invertido Olympus.

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.5.1 Determinação da Viabilidade Celular – Método do MTT

Este método colorimétrico baseia-se na capacidade de células viáveis e metabolicamente ativas, reduzirem enzimaticamente o MTT a sais de formazan de cor púrpura que podem ser quantificados por espectrofotometria após diluição com DMSO (FIGURA 7) (REILLY *et. al.*, 1998).

Portanto, para que esta reação ocorra há necessidade que a célula esteja viável e suas mitocôndrias funcionais, uma vez que as enzimas responsáveis pela reação de redução são as desidrogenases mitocondriais.

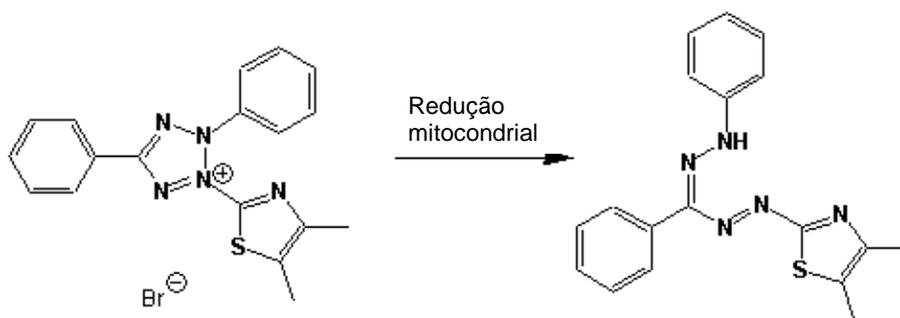


FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO DA REDUÇÃO ENZIMÁTICA DE SAIS DE MTT A SAIS DE FORMAZAN
 FONTE: REILLY *et. al.*, 1998

No procedimento, após plaqueamento das células de HepG2 em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^4 células por poço, estas foram incubadas para adesão em estufa a 37°C e

5% de CO₂ por 24 horas, em meio DMEM alta glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e antibiótico gentamicina (50 µg/mL). Decorrido este tempo, foram realizados os tratamentos com o SYD-1 em diferentes concentrações nos tempos 12, 24 e 48 horas. Findado o tempo de tratamento, as placas foram lavadas com HBSS e acrescentados 20µL de MTT (5mg.mL⁻¹) por poço, seguindo-se incubação por 3 horas em estufa 37°C e 5% de CO₂. A seguir, o MTT foi removido, e os cristais de formazam formados foram dissolvidos pela adição de 200µL de DMSO. Após homogeneização a absorbância foi lida em leitor de microplacas Tecan Infinite M200, em comprimento de onda de 550nm. A porcentagem de células viáveis frente ao tratamento em relação às células não tratadas (controle) foi calculada conforme a equação abaixo:

$$\text{Porcentagem de células viáveis} = \frac{\text{Abs. das células tratadas com SYD} \times 100}{\text{Abs. das células não tratadas}}$$

Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Esta mesma metodologia foi utilizada para avaliar a viabilidade das células de hepatócitos, com a diferença de que as mesmas foram plaqueadas em placas de 60 cm², na concentração de 1x10⁶ células por placa, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas para adesão, em meio DMEM alta glucose suplementado (item 5.4.3). Decorrido este tempo, o meio foi substituído pelo meio Hepatozyme® e realizado o tratamento com SYD-1 em diferentes concentrações pelo tempo de 18 horas. Os procedimentos subseqüentes foram os mesmos descritos acima para as células HepG2.

5.5.2 Determinação da Viabilidade Celular – Método do Azul de Tripán

A viabilidade celular por esta metodologia foi determinada segundo Philips (1973). Esta técnica avalia a integridade da membrana celular, uma vez que o corante azul de tripan não é permeável em células viáveis cujas membranas estão íntegras. Já em células não viáveis, este corante consegue permear as células, corando o citoplasma e núcleo em azul, como visualizado por microscopia óptica. A solução de azul de tripan (0,4% p/v) foi preparada em PBS. Para cada mL da suspensão celular foi utilizado 0,1mL da solução do corante, sendo efetuada a contagem em hemocitômero dentro do tempo de 4 minutos após a adição.

As porcentagem de células viáveis foi calculada conforme equação abaixo:

$$\text{Porcentagem de células viáveis} = \frac{\text{Número de células não coradas}}{\text{Número de células coradas} + \text{células não coradas}} \times 100$$

5.5.3 Determinação da Viabilidade Celular através da atividade da enzima Lactato Desidrogenase

Este ensaio foi realizado utilizando Kit para detecção de Desidrogenase Láctica (LDH) da LABTEST, seguindo-se as orientações do fabricante.

Esta enzima catalisa a redução do piruvato a lactato com a concomitante oxidação do NADH a NAD⁺. O decréscimo da absorbância em 340nm decorrente desta oxidação é proporcional a atividade da LDH na amostra.

5.5.4 Análise da Morfologia

5.5.4.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina

As células HepG2 foram plaqueadas em placas de 60 cm² (1x10⁶ células) deixadas aderir por 24 horas em estufa a 37°C e tratadas nas concentrações de 25 e 50 µmol.L⁻¹ pelo tempo de 24 horas. Posteriormente, foram lavadas com PBS e fixadas com solução de Bouin (formaldeído 4%, ácido pícrico saturado: ácido acético 4:15) por 5 minutos. Em seguida, as células foram desidratadas com álcool 70% e coradas com Hematoxilina e Eosina. A morfologia das células tratadas com SYD-1 foi observada em microscópio AXIOVERT 40CSFL.

A mesma metodologia foi aplicada para as células de cultura primária.

5.5.4.2 Microscopia de contraste de fase

Para esta análise as células foram cultivadas como descrito nos itens 5.4.4 e 5.4.5 e observadas em microscópio AXIOVERT 40CSFL.

5.5.5 Determinação de Lactato e Piruvato

Para determinação com as células em suspensão, as mesmas foram coletadas com tripsina, como descrito no item 5.5.1.5. A seguir, foram resuspensas em PBS e incubadas por 2 minutos com o SYD-1 em diferentes concentrações, a 37°C e mantidas sob agitação. Após esse período foi adicionada a solução glucose 5 mmol.L⁻¹, e coletadas alíquotas da amostra nos tempos 0, 20 e 40 minutos. Imediatamente após a coleta suspensão celular foi centrifugada por 1 minuto a 1000 rpm e no sobrenadante foram dosados Lactato e Piruvato, segundo Gutman e Wahlefeld (1974) e Czoc e Lampecht (1974), respectivamente.

O sistema para dosagem de lactato, em volume final de 300µL, foi constituído de tampão glicina 0,1 mol.L⁻¹ e hidrazina 0,4 mol.L⁻¹ em pH 9,5, NAD⁺ 1,5 mmol.L⁻¹, Lactato desidrogenase 1,5U e 150µL do sobrenadante. A quantidade de NADH formada foi determinada a 340nm em leitor de microplacas, após 90 minutos de incubação a 37°C. Os resultados foram expressos em nmol.L⁻¹ sendo a quantidade de lactato calculado a partir do coeficiente de extinção molar do NADH $\epsilon = 6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Os níveis de piruvato foram determinado em volume final de 300µL, em meio de reação contendo Tris-HCl 0,1M em pH 7,0, NADH 0,15mM, lactato desidrogenase 0,05U e 150 µL do sobrenadante. A quantidade de NADH oxidada foi determinada a 340nm em leitor de microplacas, após 20 minutos de incubação a 37°C. Os resultados foram expressos em nmol.L⁻¹ sendo a quantidade de piruvato calculada a partir do coeficiente de extinção molar do NADH $\epsilon = 6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Para a determinação com as células cultivadas, após plaqueamento e tratamento nas concentrações de 25 e 50 µmol.L⁻¹ pelo tempo de 24 horas, o sobrenadante foi retirado, centrifugado a 1000 rpm por 1 minuto e seguiu-se como acima citado.

5.5.6 Determinação do Consumo de Oxigênio

A respiração celular foi determinada em hepatócitos e células HepG2 provenientes de culturas tratadas ou não com o SYD-1 por 18 e 24 horas, respectivamente; como também em suspensões das duas linhagens celulares após 2 minutos de incubação com o SYD-1. A diferença nos tempos de tratamento entre as duas linhagens cultivadas derivou da dificuldade de manutenção da cultura primária por longos períodos de tempo, uma vez que o tratamento das mesmas em suspensão com o composto por dois minutos, foi motivado pela publicação de trabalhos prévios utilizando esse mesmo tempo de tratamento do SYD-1 sobre mitocôndrias isoladas.

Para as determinações em células HepG2, as células foram plaqueadas (1×10^6 células por placa) em placas de 60 cm^2 , seguindo-se adesão por 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO_2 e tratamento com SYD-1 em diferentes concentrações. Para os hepatócitos, após isolamento conforme item 5.4.4, seguindo-se tratamento com SYD-1 em diferentes concentrações por 18 horas em estufa a 37°C e 5% CO_2 .

Após a incubação da HEPG2 (25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) por 24 h a 37°C com o SYD-1, as mesmas foram lavadas com PBS e desaderidas com o uso de tripsina/EDTA (item 5.4.6). O consumo de oxigênio foi monitorado nas células em suspensão por respirometria de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). As medições foram feitas em duas câmaras a 37°C , sob suave agitação. Considerou-se o fator de solubilidade de oxigênio de 0,92 para o meio DMEM alta glucose e à pressão barométrica local (91 kPa), a concentração de oxigênio no ar de saturação foi de $172,421 \mu\text{mol.L}^{-1}$. O consumo de oxigênio foi avaliado em diferentes estados da respiração (GNAIGER, 2001; SCANDURA; GNAIGER, 2009) definidos como: Rotina (consumo de oxigênio na ausência de inibidores ou desacopladores, que reflete a respiração sobre condições normais de cultivo); *Leak* (a respiração na presença de oligomicina $2 \mu\text{g/mL}$, que corresponde ao consumo de oxigênio em resposta ao vazamento de prótons); Desacoplado (consumo de oxigênio na presença de desacoplador FCCP ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) que reflete a capacidade do sistema de transporte de elétrons no estado desacoplado da fosforilação oxidativa). O fluxo de oxigênio nestes estados foi corrigido pela subtração da respiração mitocondrial obtida após a adição de rotenona ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e antimicina ($6 \mu\text{g/ml}$). Os resultados são expressos como o fluxo de oxigênio/células [$\text{pmols/seg} \times 10^6$ células] como média \pm erro padrão.

Para os experimentos com as células em suspensão, a metodologia aplicada foi semelhante, com a diferença de que as células HepG2 foram cultivadas até a confluência necessária para o experimento, seguido pela desagregação das mesmas das garrafas, contagem e determinação do consumo de oxigênio em número de 1×10^6 células sendo posteriormente incubadas com o SYD-1 por 2 minutos, seguindo-se o protocolo experimental. Para os hepatócitos a metodologia acima se seguiu logo após isolamento destas células, descrito detalhadamente no item 5.4.4.

5.5.7 - Determinação da Liberação de NO^\bullet a partir da estrutura de SYD-1

5.5.7.1 – Sistema livre de células/mitocôndrias

Para determinar a liberação de NO^\bullet em sistema livre de células foi utilizada uma sonda específica para detecção deste radical, a DAF-FM (diaminofluoresceína). Segundo metodologia de KOJIMA *et. al.* 1998, a detecção da quantidade presente de NO com uso de sonda fluorescente DAF, baseia-se na reação desta sonda com o NO na presença de dióxigênio (O_2) para produzir compostos triazenos que são fluorescentes e podem ser medidos por análise fluorimétrica.

As medições fluorimétricas foram realizadas em espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF 5301, com controle de temperatura e agitação. Para detecção da mudança na fluorescência foi utilizada fenda de 3nm tanto para excitação (495nm) quanto emissão (515nm).

Antes de iniciar as medições, a sonda foi solubilizada em DMSO, aliqüotada e armazenada a -20°C . Em uma cubeta de quartzo transparente foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 100 mmol.L^{-1} e a sonda DAF-FM 1 mmol.L^{-1} . Posteriormente foi adicionado SYD-1 $1,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ou SIN-1 $3 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ou DMSO e a emissão de fluorescência acompanhada por 600 segundos.

5.5.7.2 - Determinação da liberação de NO^{*} a partir de SYD-1 em mitocôndrias isoladas

5.5.7.2.1 Isolamento de Mitocôndrias

As 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⁻¹, tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), EGTA 1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1 g% e foi suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L⁻¹, malato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 1,6 mmol.L⁻¹, ADP 0,2 mmol.L⁻¹ e 2,0 mg de proteína mitocondrial. Inicialmente, para obtenção das mitocôndrias, os animais foram sacrificados por decapitação e imediatamente o fígado foi retirado e transferido para o meio de extração a 4°C. Posteriormente, o órgão foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador de Van Potter Elvehjen, utilizando-se pistilo frouxo e normal, sucessivamente por 3 e 2 vezes.

O homogeneizado obtido foi então centrifugado a 2500xg a 4°C em centrífuga Hitach modelo Himac CR-21E, durante 5 minutos, para eliminação de células intactas, membranas, núcleos presentes no sedimento. A seguir, o sobrenadante foi centrifugado a 12.500xg, 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 10.000g durante 10 minutos a 4°C. A suspensão de mitocôndrias foi mantida a 4°C até a determinação da concentração de proteína mitocondrial e realização dos experimentos.

5.5.7.2.2 Mitocôndrias isoladas

O oxido nítrico (NO^{*}) é um radical livre gasoso, que desempenha o papel de segundo mensageiro intracelular e está envolvido na regulação de inúmeras funções celulares, mas devido as suas características é de difícil detecção (MORO *et al.*, 1998). Neste estudo a liberação deste radical a partir da estrutura do SYD-1 foi determinado de maneira indireta pelo monitoramento do consumo de oxigênio em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). A reação, em volume final de 2,0 mL, foi mantida sob agitação em câmara fechada termostatzada, a temperatura de 28°C (VOSS *et al.*, 1963).

O sistema de reação continha D-manitol 125 mmol.L^{-1} , tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), KCl 65 mmol.L^{-1} , EGTA $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ e BSA 0,1g%, e foi suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L^{-1} , malato de sódio $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$, ADP $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ e 2,0 mg de proteína mitocondrial .

As medições foram feitas em duas câmaras a 28°C , sob leve agitação. Considerou-se o fator de solubilidade de oxigênio de 0,92 para o meio acima citado e à pressão barométrica local (91 kPa), a concentração de oxigênio no ar de saturação foi de $172,421 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. As velocidades respiratórias foram calculadas em pmol de O_2 consumidos por mg de proteína. 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). Utilizamos para os experimentos as preparações mitocondriais que apresentaram CCR superiores ou iguais a 4,0.

É importante ressaltar que estes experimentos foram realizados na presença e ausência de doador de óxido nítrico (SIN-1) e Hb.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 LIBERAÇÃO DE NO[•] A PARTIR DA ESTRUTURA DE SYD-1

6.1.1 Ensaio em Mitocôndrias Isoladas

Buscando esclarecer os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral do SYD-1, Halila *et. al.* (2007), avaliaram os efeitos do composto sobre a bioenergética mitocondrial, considerando a participação das mitocôndrias nos mecanismos de indução de morte celular (JAESCHKE; MCGILL; RAMACHANDRAN, 2012). Os autores demonstraram que dentre os efeitos do SYD-1, o mais significativo foi a inibição do transporte de elétrons através da cadeia respiratória. Ao investigar tal inibição, verificou-se, ainda no mesmo trabalho, que esta não era decorrente unicamente de um efeito direto do composto sobre complexos da cadeia respiratória, mas que poderia relacionar-se com a liberação de NO[•] a partir da estrutura do SYD-1, uma vez que esta liberação é descrita para derivados desta mesma classe de mesoiônicos (KHMEL'NITSKAYA *et. al.*, 2004).

O NO[•] é um radical livre, muito reativo e altamente difusível que afeta particularmente o complexo IV da cadeia respiratória, promovendo uma inibição reversível e competitiva (em relação ao oxigênio), do consumo de oxigênio por se ligar ao sítio binuclear a₃/Cu_B deste complexo (BROOKES *et. al.*, 2003; BRUNORI *et. al.*, 2004). Fisiologicamente, o NO[•] origina-se durante a conversão celular da arginina à citrulina, reação catalisada por NO sintases citoplasmáticas (LACZA *et. al.*, 2006). Este radical possui a função de segundo mensageiro e está envolvido com a regulação de várias funções biológicas como neurotransmissão, resposta imune, apoptose, vasodilatação e agregação plaquetária (STUEHR; NATHAN, 1989; BOKHARI; MURRELL, 2012).

Com base no descrito por Halila *et. al.* (2007) e com a finalidade de investigar a possibilidade de liberação de NO[•] a partir da estrutura do SYD-1, no presente estudo determinaram-se os efeitos do composto sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias intactas na presença e ausência de um conhecido doador de NO[•], o SIN-1, um composto também mesoiônico, pertencente à classe das sidnoniminas, para fins de comparação. Nestes

experimentos utilizou-se hemoglobina com a função de sequestrar o NO^\bullet formado (SHIVA *et. al.*, 2001).

Os resultados destes ensaios estão apresentados nas FIGURAS 7-8 que representam traçados demonstrativos do consumo de oxigênio obtidos em oxígrafo-2K OROBOROS (Materiais e Métodos - item 5.5.7.2.2). As linhas sobrepostas da mesma cor referem-se aos traçados obtidos de forma independente nas duas câmaras do aparelho, onde as linhas azuis (cheia e tracejada) representam a concentração de oxigênio e as linhas vermelhas (cheia e tracejada) o fluxo de oxigênio.

A FIGURA 7 A (linhas cheias e tracejadas) representa ensaios controle realizados com mitocôndrias acopladas ativamente oxidando glutamato e malato de sódio, na ausência de SYD-1 ou SIN-1. Para estas preparações o valor de CCR, calculado como descrito em materiais e métodos (item 5.5.7.2.2) foi de $\sim 4,0$, indicando que as mitocôndrias estavam acopladas e funcionais. Ainda nesta figura observa-se que a adição de hemoglobina ($80 \mu\text{mol.L}^{-1}$), que possui a capacidade de sequestrar NO^\bullet com afinidade maior em relação ao O_2 , não promoveu alterações na velocidade respiratória. Na FIGURA 7 B, linhas cheias, está representado o ensaio controle (sem adição de SYD-1, SIN-1 ou Hb) e nas linhas tracejadas o ensaio em presença de SYD-1. Observa-se que a incubação da suspensão mitocondrial com o composto por 2 minutos, antes da adição de ADP, promoveu uma significativa diminuição do consumo de oxigênio. Na FIGURA 7 C (linhas cheias e tracejadas) observa-se que a adição de hemoglobina é capaz de reverter parcialmente a inibição do consumo de oxigênio promovido pelo SYD-1. Ensaios comparativos realizados com SIN-1, nas mesmas condições experimentais, no entanto, com concentração 10 vezes maior que a concentração usada do SYD-1 nestes ensaios, demonstraram resultados semelhantes (FIGURA 8). A concentração utilizada de SIN-1 foi baseada na descrita na literatura por vários autores.

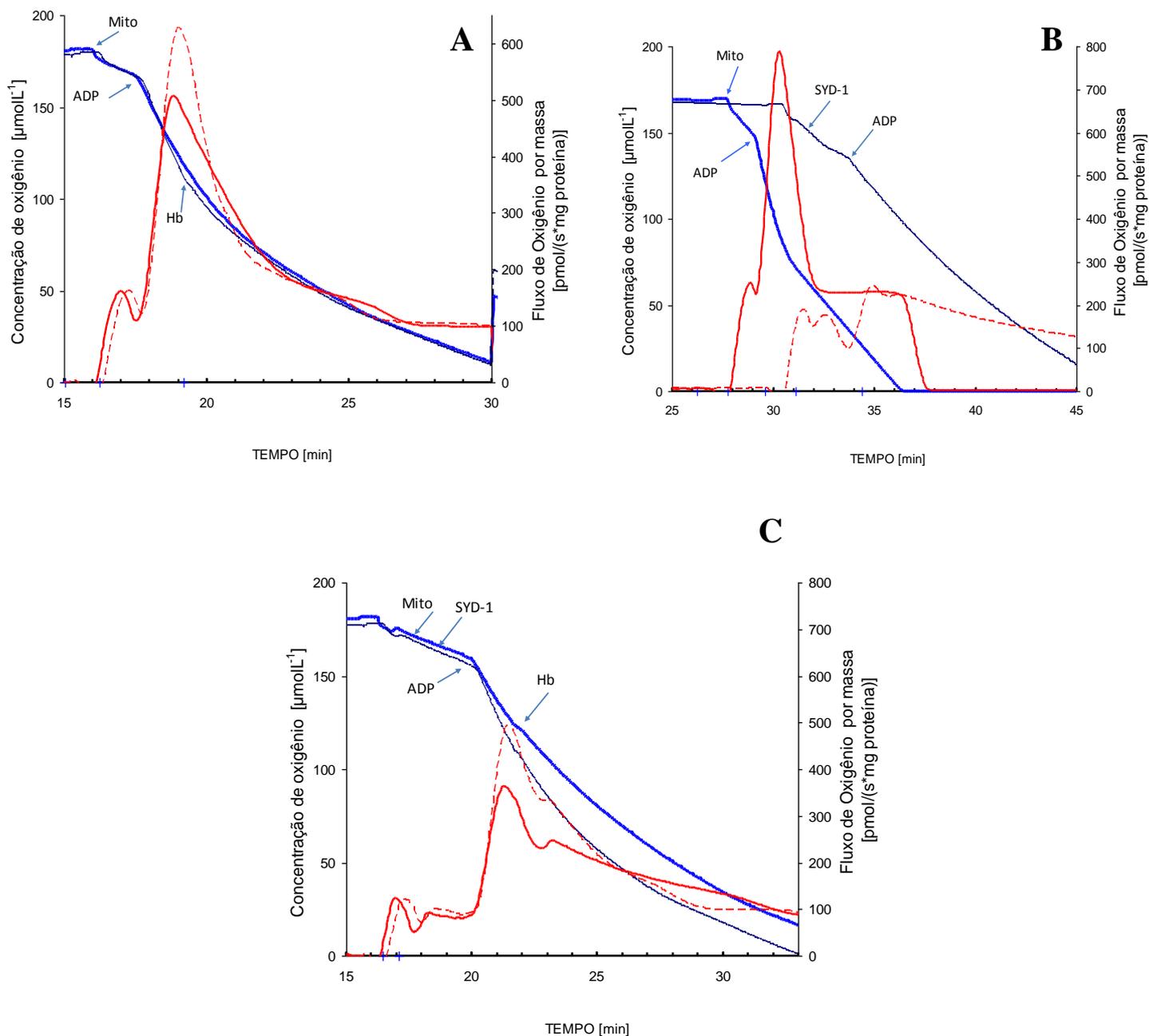


FIGURA 7: EFEITO DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO

FONTE: O autor 2012

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, no item 5.5.7.2.2. O sistema de reação composto por: D-manitol 250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, tampão HEPES 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7,2), EGTA 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e BSA 0,1 g% foi suplementado com glutamato de sódio 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, malato de sódio 2,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 1,6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e ADP 0,2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. As linhas azuis correspondem a concentração de oxigênio e as vermelhas ao fluxo de oxigênio.

A. Ensaio controle realizado na presença de Hb (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). As linhas contínuas e tracejadas correspondem a duas avaliações independentes (câmaras distintas).

B. Experimentos realizados na presença (linhas tracejadas) e ausência (linhas cheias) do composto SYD-1 (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) incubado por 2 minutos com a preparação mitocondrial.

C. Experimentos realizados na presença (linhas tracejadas e contínuas) do composto SYD-1 (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) incubado por 2 minutos com a preparação mitocondrial e posterior adição de Hb (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

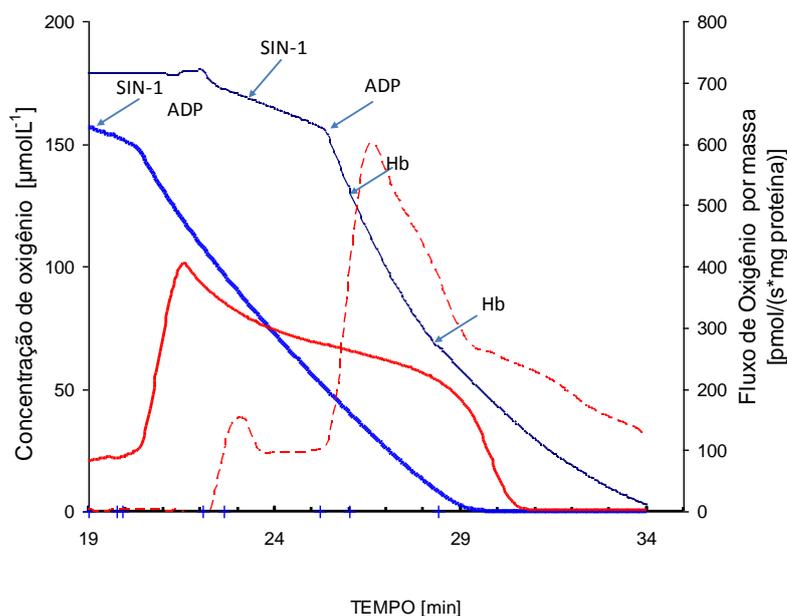


FIGURA 8: EFEITO DO SIN-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO

FONTE: O autor 2012

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, no item 5.5.7.2.2 O sistema de reação composto por: D-manitol 250 mmol.L^{-1} , tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2), EGTA 1 mmol.L^{-1} e BSA $0,1 \text{ g\%}$ foi suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L^{-1} , malato de sódio $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ e ADP $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. As linhas azuis correspondem a concentração de oxigênio e as vermelhas ao fluxo de oxigênio. Linhas cheias – experimento realizado na presença de SIN-1 (1 mmol.L^{-1}) incubado por 2 minutos com a preparação mitocondrial; Linhas tracejadas – experimento realizado na presença de SIN-1 (1 mmol.L^{-1}) incubado por 2 minutos com a preparação mitocondrial e posterior adição de Hb (80 μmol.L^{-1} cada adição)

Os resultados demonstrados nas figuras 7-8 estão resumidos na TABELA 1. Observa-se que a respiração mitocondrial durante o estado 3, que na ausência dos compostos era de $312,35 \pm 20,13 \text{ pmols O}_2/\text{s*mg}$ de proteína passou a ser de $200,6 \pm 52,3 \text{ pmols O}_2/\text{s*mg}$ de proteína e de $267,14 \pm 55,8 \text{ pmols O}_2/\text{s*mg}$ de proteína, em presença de SYD-1 (100 μmol.L^{-1}) e SIN-1 (1 mmol.L^{-1}) representado uma inibição de $\sim 35\%$ e $\sim 15\%$, respectivamente. Quando se adicionou a hemoglobina ao sistema esta inibição foi revertida parcialmente, permanecendo em aproximadamente 21% e 6% para o SYD-1 e SIN-1, respectivamente. Estes resultados confirmam os descritos por Halila *et al.* (2007), ou seja, que o efeito inibitório do SYD-1 sobre o estado 3 da respiração é decorrente em sua maior parte da inibição do transporte de elétrons através da cadeia respiratória que representou 60% (21% após adição da Hb dos 35% da inibição total). Em adição, é possível sugerir que o restante desta inibição ($40\% - 14\%$ restantes de 35% da inibição total) deve-se à presença de NO^\bullet liberado a partir da estrutura do composto. Já para o SIN-1, seguindo o mesmo raciocínio,

observam-se resultados opostos, ou seja, seu efeito inibitório sobre o estado 3 da respiração é decorrente em maior parte da liberação de NO^\bullet (60% - representado por 9% dos 15% da inibição total). Os outros 40% (representado pelos 6% que persistiram após a adição da Hb) poderia decorrer de uma ação direta do SIN-1 sobre: os componentes da cadeia respiratória, ou transportadores dos substratos ou até mesmo sobre a ATP sintase. Até o momento não existem relatos na literatura que demonstrem os efeitos de SIN-1 sobre estes parâmetros. Na interpretação destes resultados deve-se ainda considerar: a) utilizando uma concentração maior de Hb, o sequestro de NO^\bullet poderia ser melhor evidenciado (DUNGEL *et. al.*, 2011) e b) a concentração utilizada de SYD-1 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) é menor do que a de SIN-1 (1mmol.L^{-1}), porém foi a mesma utilizada por Halila et al. (2007), permitindo, desta forma, uma correlação com os efeitos descritos por aqueles autores. Como conclusão, estes experimentos sugerem que SYD-1 é capaz de liberar NO^\bullet a partir de sua estrutura e que este radical pode ser responsável por parte da inibição do transporte de elétrons promovida por este composto.

TABELA 1: EFEITO DO SYD-1 SOBRE O ESTADO 3 DA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL

Respiração Mitocondrial - Estado 3 (Fluxo de O_2 [pmol/s*mg de proteína])				
Controle	SYD-1 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$)	SYD-1 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) +Hb (80mmol.L^{-1})	SIN-1 (1mmol.L^{-1})	SIN-1 (1mmol.L^{-1}) +Hb (80mmol.L^{-1})
312,35±20,1	200,6±52,3	245,7±66,3	267,14±55,8	294,23±18,6

FONTE: O autor 2012

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, no item 5.5.7.2.2. O sistema de reação composto por: D-manitol 250mmol.L^{-1} , tampão HEPES 10mmol.L^{-1} (pH 7,2), EGTA 1mmol.L^{-1} e BSA 0,1 g% foi suplementado com glutamato de sódio 5mmol.L^{-1} , malato de sódio $2,5 \text{mmol.L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1,6 \text{mmol.L}^{-1}$ e ADP $0,2 \text{mmol.L}^{-1}$. Controle: fluxo de oxigênio durante o estado 3 em mitocôndrias na ausência de SIN-1, SYD-1 ou Hb. As concentrações de SYD-1, SIN-1 e Hb estão especificada na tabela

Ainda para confirmar a liberação de NO^\bullet a partir de SYD-1 foram realizados experimentos em sistema livre de mitocôndrias. Os resultados estão apresentados no item a seguir.

6.1.2 Ensaio em Sistema Livre de Mitocôndrias

Estes ensaios foram realizados utilizando a sonda DAF-FM, conforme item 5.5.7.1 de materiais e métodos. Essa sonda reage com o NO^\bullet na presença de dióxigênio, originando compostos triazenos fluorescentes (KOJIMA *et. al.* 1998).

Os resultados estão apresentados na FIGURA 9, que relaciona a emissão de fluorescência com o tempo. Observa-se que nos experimentos com DMSO (mesmo volume utilizado para o SYD-1), não houve aumento na emissão da fluorescência, indicando que o solvente dos compostos não interfere no ensaio. Já em presença de SYD (3 mmolL^{-1}) e SIN-1 ($3,16 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$), observa-se um aumento do sinal de fluorescência. A partir deste gráfico foram obtidos os valores de liberação de NO^\bullet de $13,69 \pm 2,67 \text{ nmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $28,68 \pm 2,26 \text{ nmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para o SYD-1 e SIN-1, respectivamente.

HOOGG *et. al.* 1992, utilizaram SIN-1 como gerador de radicais NO^\bullet para comprovar que a geração destes radicais, em condições fisiológicas, poderia levar à formação de peroxinitrito e, ainda que a quebra homolítica deste último levaria à formação de radicais hidroxila, em reações distintas da reação de Fenton. Naquele estudo, os autores utilizaram SIN-1 na concentração de 1 mmol.L^{-1} e estimaram que a quantidade de NO^\bullet gerada a partir desta concentração era de $3,68 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de $\text{NO}^\bullet.\text{min}^{-1}$, valor comparável ao anteriormente descrito por Feelisch *et al.* (1989) de $2,39 \text{ } \mu\text{M}$ de $\text{NO}^\bullet.\text{min}^{-1}$ para a mesma concentração do doador. Portanto, o valor de NO^\bullet liberado $28,677 \pm 2,26 \text{ nmol. L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ obtidos no presente estudo a partir de $3,16 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de SIN-1 está de acordo aos descritos na literatura, validando os ensaios realizados.

Desta forma, os resultados obtidos reforçam a proposta de Halila *et. al.* (2007) de que os efeitos do SYD-1 sobre a bioenergética mitocondrial, em especial a inibição do transporte de elétrons, estão relacionados à liberação de NO^\bullet a partir da estrutura do composto.

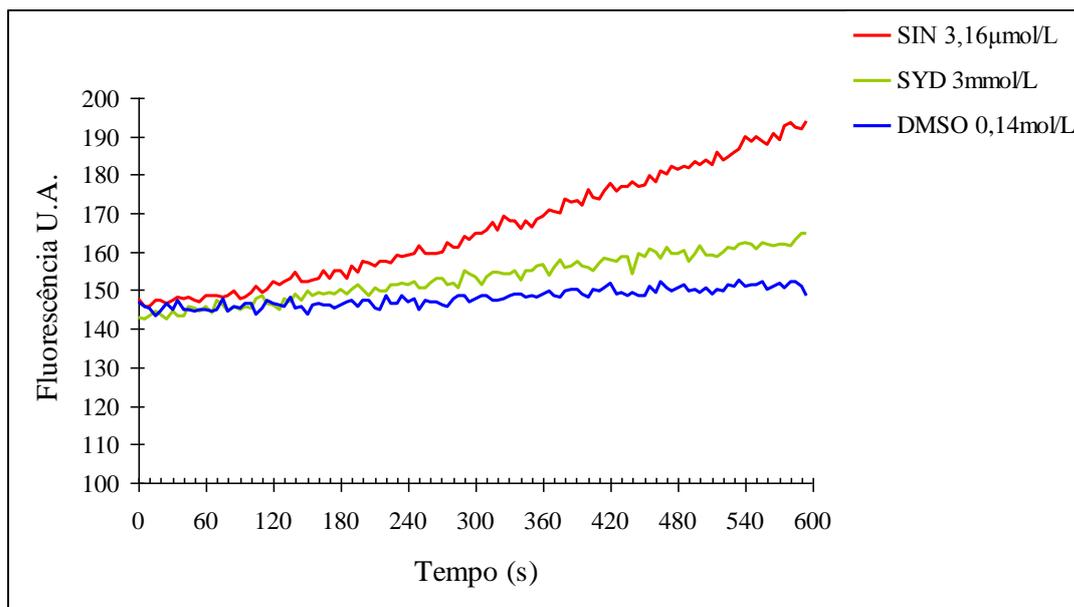


FIGURA 9: LIBERAÇÃO DE NO⁺ A PARTIR DE SYD-1 E SIN-1

FONTE: O autor 2012

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, no item 5.5.7.1. O sistema de reação foi composto por: Tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,4) e DAF-FM 1 μmol.L⁻¹ suplementado com SYD-1 3 mmol.L⁻¹ e SIN-1 3,16 μmol.L⁻¹. O sistema foi mantido sobre temperatura e agitação constantes e a leitura efetuada em 495nm de excitação e 515nm de emissão com slit de 3nm para ambos comprimentos de onda

6.2 EFEITO DO SYD-1 SOBRE CÉLULAS HEPG2 E HEPATÓCITOS

Embora a atividade citotóxica e antitumoral do SYD-1 tenha sido descrita para diferentes linhagens celulares (GRYNBERG *et. al.*, 1992; DUNKLEY; THOMAN, 2003), ainda não foram avaliados os efeitos deste mesoiônico sobre neoplasias malignas de alta incidência na atualidade. Além disso, seus efeitos sobre linhagens não tumorais não são descritos. Isto motivou a realização do presente estudo utilizando como modelos experimentais células tumorais HepG2, provenientes de hepatocarcinoma celular humano e, hepatócitos isolados de fígado de rato.

As células HepG2 mantém muitas das propriedades das células hepáticas saudáveis, possuem um crescimento contínuo, um tempo de vida praticamente ilimitado e um fenótipo estável. Além disso, em relação à cultura primária de hepatócitos, suas condições de cultivo são mais simples e estabelecidas com maior facilidade (BOKHARI *et al.*, 2007). No entanto, esta linhagem possui a desvantagem de apresentar algumas enzimas em níveis inferiores em relação às células hepáticas normais. Dentre estas, as enzimas de metabolização de fase I ou enzimas citocromos P450, diretamente envolvidas nos processos de metabolismo de drogas e

xenobióticos. Estas enzimas são responsáveis por adicionar um grupo funcional (OH, SH ou NH₂) ao substrato através de reações hidrolíticas, de oxidação, redução. Posteriormente em uma segunda fase, os grupos funcionais adicionados são modificados de maneira a aumentar sua solubilidade dos substratos e facilitar sua excreção, promovendo, assim, a detoxificação do fígado (DONATO *et. al.*, 2008; RODRÍGUEZ-ANTONA *et. al.*, 2002).

Por sua vez, os hepatócitos são células totalmente competentes, que quando intactas, mantêm a expressão de enzimas tanto de fase I quanto de fase II, e são capazes de apresentar um perfil de absorção e metabolização muito similar ao encontrado *in vivo*. No entanto, a obtenção destas células e sua manutenção em cultura apresentam uma série de dificuldades. São necessários meios de cultura e reagentes específicos de alto custo. Após a obtenção das células, sua manutenção em cultura é limitada uma vez que a viabilidade é comprometida com o passar do tempo (SHIRYAEVA *et. al.*, 2008; WILKENING; STAHL; BADER, 2003; JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, 2000; KLAUNIG *et. al.*, 1981; SEGLEN, 1976).

Além disso, a utilização de células de origem humana é desestimulada devido a dificuldade de obtenção do tecido (biópsia) e da necessidade de um imediato processamento, que nem sempre é possível considerando que a obtenção da amostra é realizada em ambiente hospitalar. Deve-se ainda levar em consideração os aspectos éticos.

No presente estudo foram utilizadas, com fins comparativos células HepG2 humanas e hepatócitos de rato em suspensão e em cultura.

6.2.1 Viabilidade Celular

Ensaio preliminares foram realizados para determinar a sensibilidade das células frente a diferentes concentrações e tempos de incubação com o SYD-1. Utilizou-se para tanto o método do MTT, amplamente utilizado para determinar a citotoxicidade de diferentes compostos. Este método colorimétrico baseia-se na redução dos sais de tetrazólio (MTT) a formazan, através de reações enzimáticas catalisadas por desidrogenases mitocondriais de células viáveis. É importante ressaltar a faixa de concentração de SYD-1 para estes ensaios foi estabelecida com base em experimentos anteriores com mitocôndrias isoladas (HALILA *et al.*, 2007; GOZZI, 2010).

São apresentados inicialmente os resultados de experimentos realizados com as células HepG2 (FIGURA 10). As concentrações de SYD-1 variaram de 25-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e os tempos

de tratamento foram de 24, 48 e 72 horas. Observa-se que SYD-1 promoveu uma diminuição da viabilidade celular, de forma dose e tempo dependentes. Na menor concentração ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) o composto causou uma redução de aproximadamente $\sim 20\%$ para todos os tempos testados. Já na maior concentração ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$), o efeito foi ainda mais pronunciado, chegando a redução da viabilidade a $\sim 62\%$, $\sim 93\%$ e $\sim 96\%$, para os tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

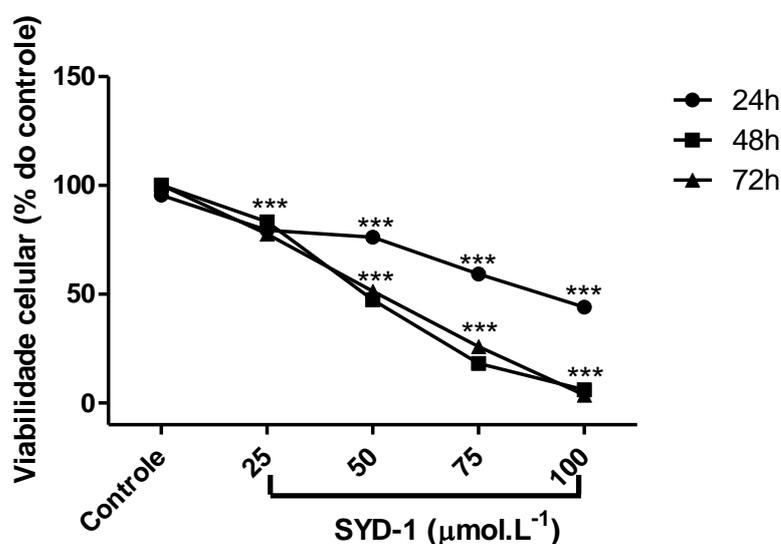


FIGURA 10: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2

FONTE: O autor (2012)

Nota: As células foram plaqueadas (1×10^4 células por poço) e deixadas para adesão em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. Posteriormente foi realizado o tratamento com SYD-1 nas concentrações de 25, 50, 75 e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ nos tempos 24, 48 e 72 horas. A seguir, as placas foram lavadas com HBSS e acrescentados $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MTT (5mg/mL) por poço, seguindo-se incubação por 3 horas. Decorrido este tempo, foram adicionados $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DMSO para dissolução dos cristais de formazam e realizada a leitura a 550 nm. Como controle foi utilizado meio na presença de DMSO (0,01%). Conforme item 5.5.1 de materiais e métodos. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão em relação ao controle (100%). *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,0001$

A partir destes resultados estabeleceu-se as concentrações de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e tempo de incubação de 24 horas para os ensaios subsequentes, tanto com as células HepG2 quanto com os hepatócitos.

Resultados semelhantes foram obtidos usando compostos mesoiônicos de outra classe, dos 1,3,4-tiadiazóis em células HepG2, previamente descrita por Pires, *et. al.*, 2011. A autora utilizou as mesmas concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e tempo de incubação (24 horas) para testar a ação do MI-J, MI-4F MI-2,4diF e MI-D, compostos que se diferenciavam somente em relação ao substituinte do grupamento cinamoil. Dentre os derivados testados, o MI-D, cujo

substituinte era o grupamento NO_2 , se mostrou o menos citotóxico, reduzindo a viabilidade em ~28% para a concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, enquanto os demais compostos reduziram em ~50%. Já para a concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, todos os derivados reduziram em ~50% da viabilidade.

Os resultados referentes aos hepatócitos em cultura estão representados na FIGURA 11. SYD-1 não foi citotóxico para estas células na concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ após 18 horas de incubação. No entanto, na maior concentração ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e mesmo tempo de tratamento, a viabilidade celular foi reduzida em ~66%. Estes resultados quando comparados aos das células HepG2 (FIGURA 10), sugerem que os hepatócitos são menos sensíveis aos efeitos do SYD-1 em relação as células HepG2, quando o mesoiônico estava presente na menor concentração ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Por outro lado, isto se inverte para a maior concentração de SYD-1 ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$), com redução de ~66% e ~30% para hepatócitos e células HepG2, respectivamente.

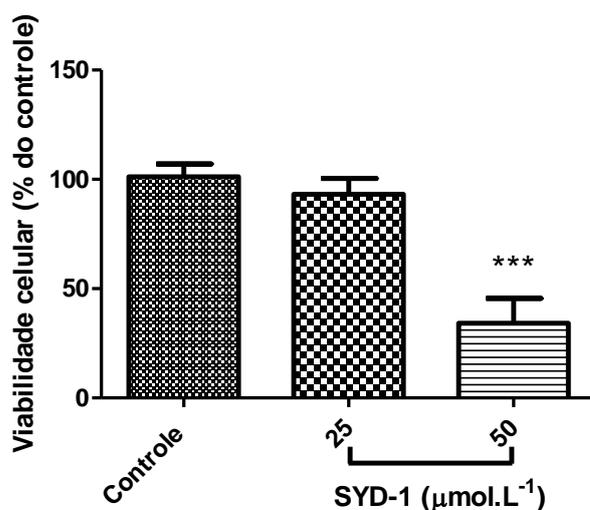


FIGURA 11: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A VIABILIDADE DE HEPATÓCITOS

FONTE: (O autor 2012)

Nota: As células foram plaqueadas (1×10^6 células por placa) e deixadas para adesão em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 4 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído e foi realizado o tratamento com SYD-1 nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pelo tempo de 18 horas. A seguir, as placas foram lavadas com HBSS e acrescentados $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MTT (5 mg.mL^{-1}) por placa, seguindo-se incubação por 3 horas. Decorrido este tempo, foi adicionado 1 mL de DMSO para dissolução dos cristais de formazam e realizada a leitura a 550nm. Como controle foi utilizado meio na presença de DMSO (0,01%). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$

A viabilidade das duas linhagens celulares frente ao SYD-1 também foi avaliada por outra metodologia, baseada na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das células em cultura.

A LDH é uma proteína tetramérica que possui duas subunidades, denominadas cardíaca (H) e muscular (M) (BERNSTEIN; EVERSE, 1973). Estas duas subunidades são combinadas para formar cinco isoenzimas distribuídas em diferentes tecidos. Esta é uma enzima citosólica que participa da última etapa da glicólise anaeróbia e catalisa a redução reversível do piruvato a lactato com a oxidação do NADH a NAD^+ . Por ser uma enzima de localização essencialmente intracelular, quando seus níveis apresentam-se elevados no meio de cultura é um indicativo de lesão irreversível na membrana celular e conseqüentemente de morte celular (RAMOS, 1999).

As figuras 12 e 13 apresentam os resultados para as células de HepG2 e Hepatócitos, respectivamente. Observa-se na figura 12 que não houve diferença significativa na liberação de LDH nas células HepG2, diferentemente do verificado quando foi utilizado o MTT (FIGURA 10).

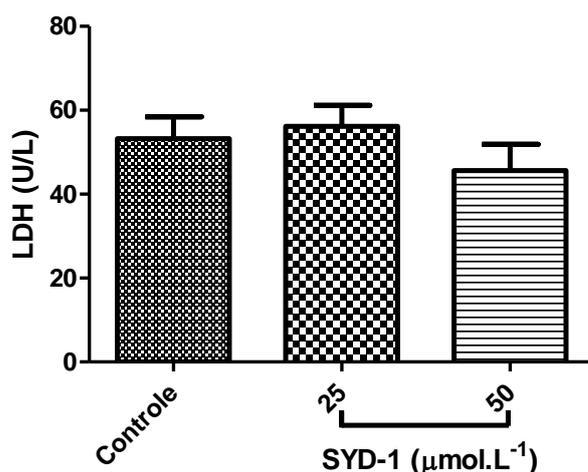


FIGURA 12: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A LIBERAÇÃO DE LDH EM CÉLULAS HEPG2

FONTE: O autor (2012)

Nota: As células foram plaqueadas (1×10^6 células por placa) em placas de 60cm^2 e deixadas para adesão em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. Posteriormente foi trocado o meio e realizado o tratamento com SYD-1 nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pelo tempo de 24 horas. A seguir, o sobrenadante foi coletado, centrifugado dosada LDH a 340nm, conforme descrito no item 5.5.3. Como controle foi utilizado meio reacional na presença de DMSO (0,01%). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão

No entanto, para os hepatócitos em cultura o ensaio de liberação de LDH mostrou um significativo comprometimento da viabilidade (FIGURA 13). Nestes experimentos, ao contrário do observado no ensaio do MTT, SYD-1 já em menor concentração ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) diminuiu a viabilidade celular em $\sim 84\%$ e na maior concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em

~269%. Estes resultados evidenciam as diferenças na suscetibilidade das duas linhagens frente ao SYD-1.

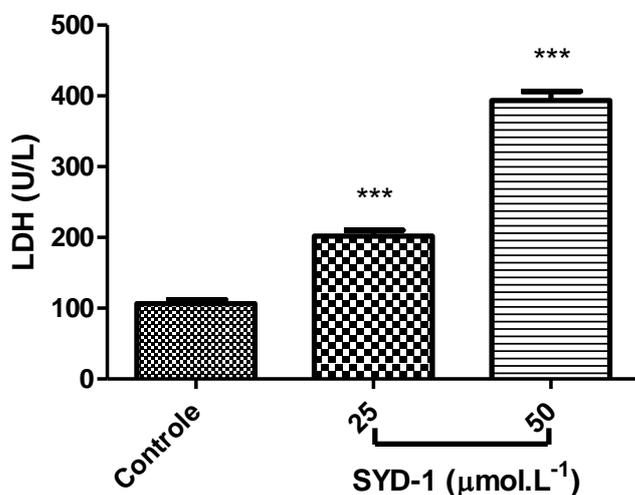


FIGURA 13: EFEITO DO SYD-1 SOBRE A LIBERAÇÃO DE LDH EM HEPATÓCITOS

FONTE: O autor (2012)

Nota: As células foram plaqueadas (1×10^6 células por placa) em placas de 60 cm^2 e deixadas para adesão em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 4 horas. Posteriormente foi trocado o meio e realizado o tratamento com SYD-1 nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pelo tempo de 18 horas. A seguir, o sobrenadante foi coletado, centrifugado e dosada LDH a 340nm, conforme descrito no item 5.5.3 de materiais e métodos. Como controle foi utilizado meio reacional na presença de DMSO (0,01%). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,0001$

Para os hepatócitos e HepG2 em suspensão o método utilizado para avaliação da viabilidade celular foi o do azul de tripan. Este método baseia-se na exclusão do corante azul de tripan por células viáveis. Esse corante possui coloração azul escura tornando as células não viáveis azuladas, principalmente em seu núcleo (PUVIANI *et. al.*, 1999).

Para estes ensaios as células foram incubados por 2 minutos com o SYD-1 nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, foi adicionado o corante azul de tripan (0,4 g%) e realizada a contagem das células em microscópio invertido Olympus com auxílio de câmara de hemocítmetro. As porcentagem de células viáveis foi calculada conforme equação abaixo:

$$\text{Porcentagem de células viáveis} = \frac{\text{Número de células não coradas}}{\text{Número de células coradas} + \text{células não coradas}} \times 100$$

Os resultados deste ensaio (dados não mostrados) não revelaram comprometimento da viabilidade sobre as duas linhagens celulares nestas condições.

6.2.2 Morfologia Celular

Uma vez que o SYD-1 mostrou-se citotóxico para as células HepG2 e hepatócitos, possíveis alterações na morfologia destas células, após o tratamento com o mesoiônico, foram avaliadas através de microscopia óptica de contraste de fase (sem coloração) e após coloração com hematoxilina e eosina.

A hematoxilina por ser um corante básico e, portanto, carregado positivamente, reage com componentes ácidos das células e tecidos, tal como grupamentos fosfato e ácidos nucleicos. Desta forma, o núcleo celular é corado em azul pela hematoxilina. Utilizado de maneira complementar, a eosina, um corante ácido, reage com componentes básicos das células, corando em rosa o citoplasma, filamentos citoplasmáticos e fibras extracelulares (LARSON *et. al.*, 2011; RAPHAEL, 1986). A coloração com hematoxilina e eosina permite visualizar algumas alterações morfológicas celulares decorrentes da presença de compostos citotóxicos, como: retração celular com aumento da relação núcleo-citoplasma, formação de projeções citoplasmáticas (*blebs*) e corpos apoptóticos. Estas alterações são características do processo de apoptose (PAGLIARA *et. al.*, 2003).

A morfologia das HepG2 visualizada por microscopia óptica após coloração com hematoxilina/eosina está apresenta na FIGURA 14 A-D. Estas imagens foram adquiridas utilizando ampliação de 40x. As barras mostram em escala microscópica o tamanho real. As figuras A e B representam os ensaios controle (na ausência de SYD-1) e em presença do solvente do composto (DMSO 0,01%), respectivamente. Nestas imagens observa-se que as células apresentam-se justapostas em monocamada contínua, com morfologia semelhante a células epiteliais, apresentam um único núcleo bem delimitado e com citoplasma homogêneo. Não são observadas diferenças significativas entre o experimento controle (FIGURA 14 A) e o com DMSO (FIGURA 14 B). No entanto, as células tratadas com SYD-1, por 24 horas, nas concentrações de concentrações de 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente, apresentam alterações morfológicas significativas em relação ao controle (FIGURA 14 C e D, FIGURA 14 A). Já na menor concentração (25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, FIGURA 14 C), é possível visualizar significativas alterações celulares, como retraimento do citoplasma com núcleo picnótico e prolongamentos globosos do citoplasma indicando *blebs*. Nas células tratadas com SYD em maior concentração (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ FIGURA 14 D), estas alterações foram ainda mais pronunciadas, sendo possível observar também a diminuição do número de células e desorganização da monocamada.

Comparando com os ensaios de viabilidade pelo método do MTT e LDH, o SYD-1 promoveu a morte das células HepG2 em ~20% para ambas concentrações após 24 horas de incubação pelo primeiro método (FIGURA 10), enquanto que pelo segundo não foi observada diferença estatística em relação ao controle (FIGURA 12). No entanto, o composto parece afetar de forma significativa estas células, conforme a análise morfológica.

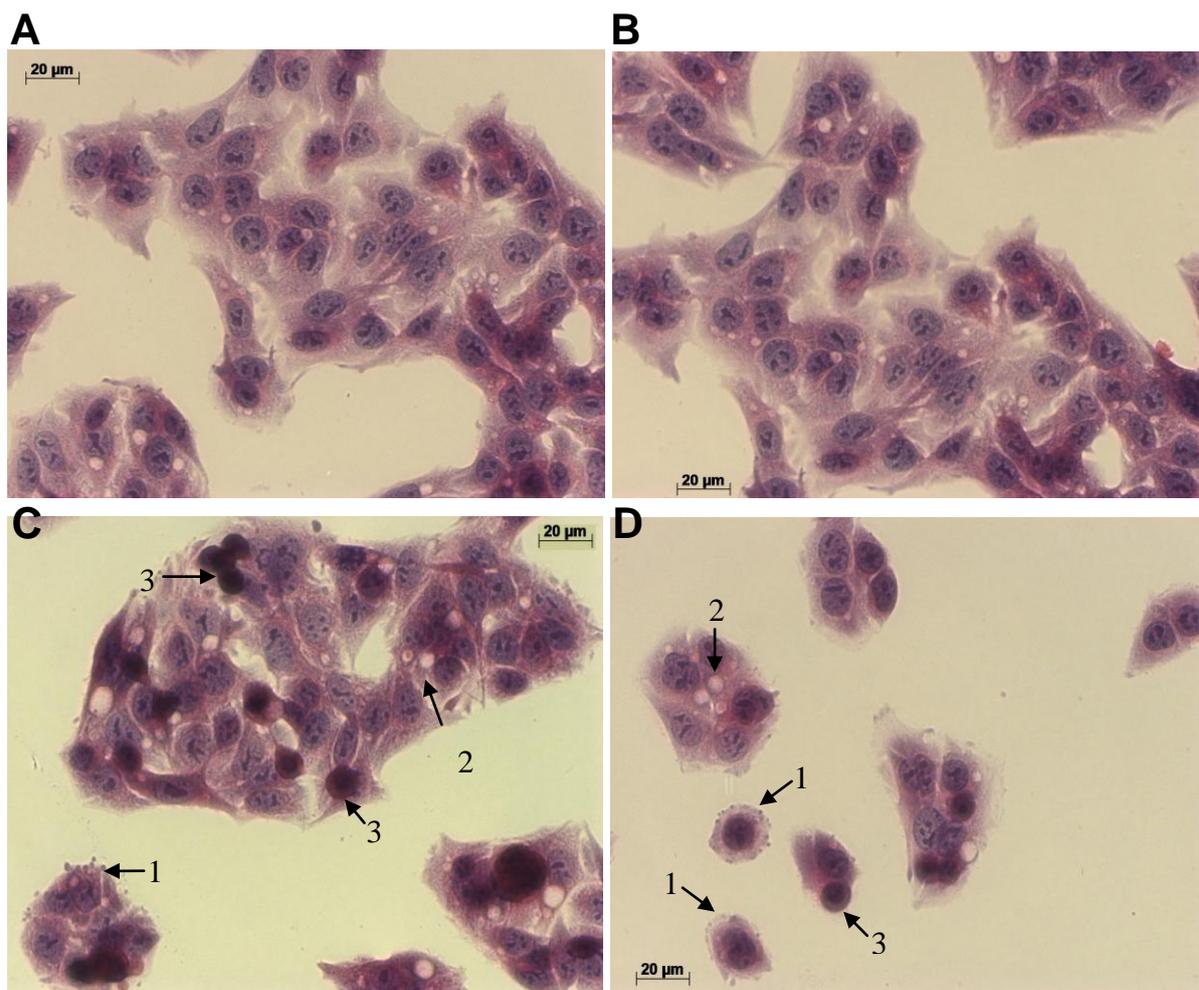


FIGURA 14: MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 - COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA

FONTE: O autor (2012)

Nota: Imagens da monocamada observada por microscopia após tratamento (24 horas) e coloração com hematoxilina e eosina nas seguintes condições: A- Controle (ausência de SYD-1), B- DMSO (0,01%), C- SYD 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e D- SYD 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.5.4.1. As setas indicam alterações morfológicas: 1. projeções citoplasmáticas (*blebs*), 2. aumento dos vacúolos citoplasmáticos e 3. retraimento celular e núcleo picnótico. Em todas as fotografias, a escala mostra magnificação real

A morfologia dos hepatócitos não foi avaliada utilizando a coloração com hematoxilina e eosina uma vez que estas células não resistiram as etapas de processamento.

As imagens obtidas das culturas das células HepG2 não coradas, obtidas por microscopia de contraste de fase com ampliação de 10 e 20x, na ausência (controle) e na presença de SYD-1 estão mostradas nas FIGURAS 15 e 16. Em todas as imagens, as barras mostram em escala microscópica o tamanho real. A figura 15 **A-B** mostra os ensaios controle com amplificação de 10 e 20x, respectivamente. Observa-se que as células estão justapostas em monocamada contínua, com morfologia semelhante a células epiteliais e com aparente presença de vacúolos. As Figuras 15 **C-D** representam as células tratadas com o solvente da droga (DMSO) que não apresentaram alterações morfológicas em relação ao controle.

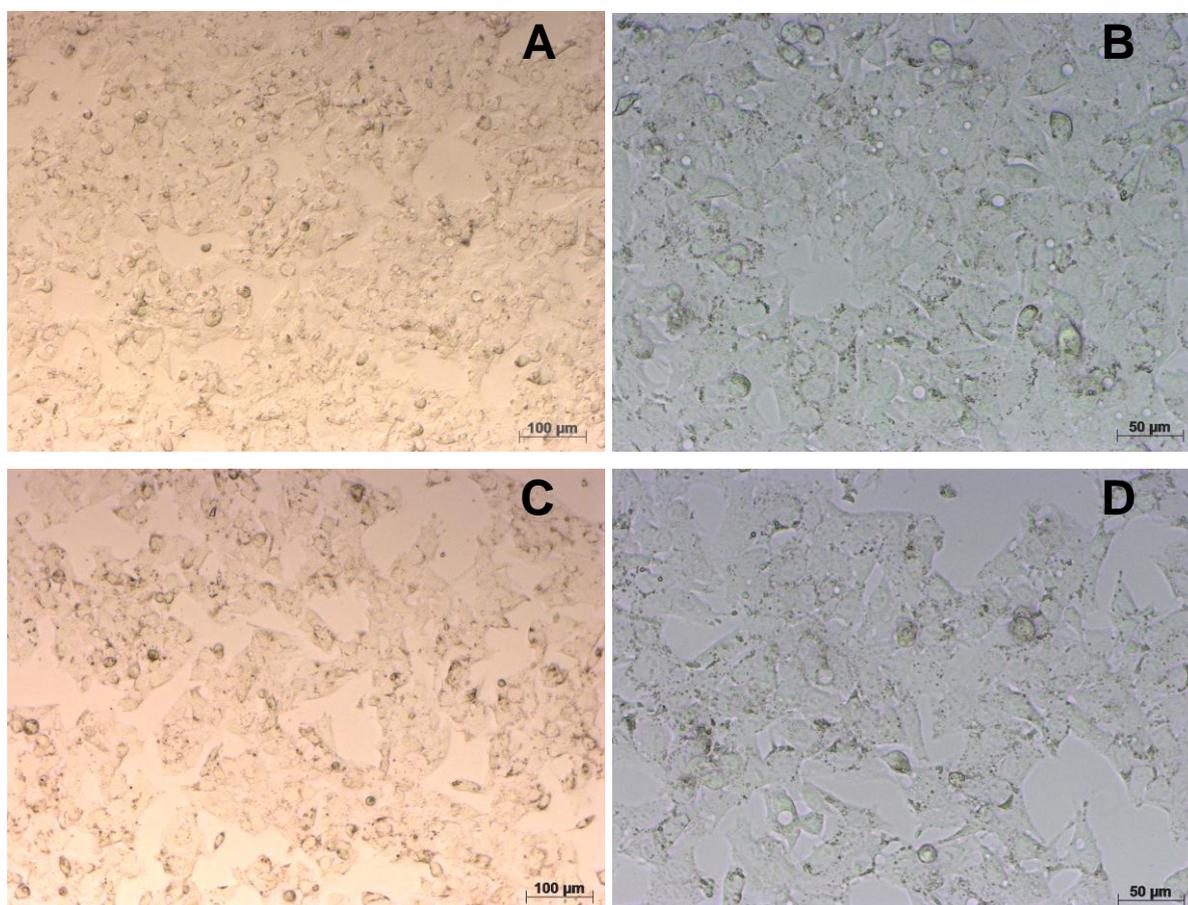


FIGURA 15: MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 – CONTRASTE DE FASE

FONTE: O autor (2012)

Nota: Imagens da monocamada observada por microscopia de contraste de fase. As células foram plaqueadas (1×10^6) em placas de 60cm^2 de diâmetro e deixadas aderir em estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 por 24 horas. Após, foi realizado tratamento com o DMSO (0,01%) por 24 horas e as imagens obtidas em microscópio Axiovert 40CSFL

A,B – Controle; C,D – DMSO

A figura 16 mostra as células HepG2 após o tratamento com SYD-1. Na menor concentração ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, FIGURA 16 **A-B**), observa-se que muitas células apresentam-se

arredondadas e com vacúolos aumentados, alterações indicativas de perda da aderência e de sofrimento celular. Já na maior concentração ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ FIGURA 16 C-D), visualiza-se, ainda, diminuição na confluência celular com comprometimento da monocamada.

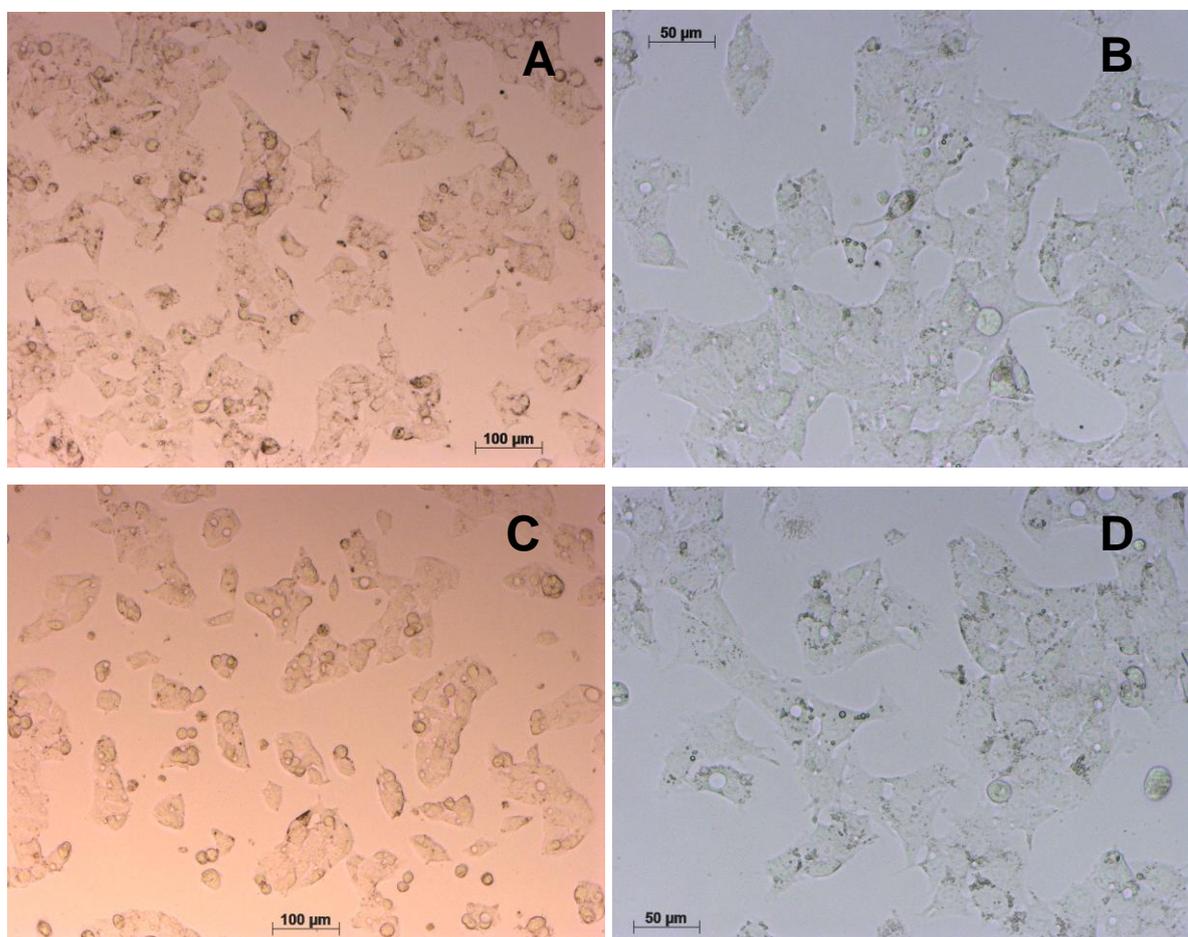


FIGURA 16: MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 TRATADAS COM SYD-1 – CONTRASTE DE FASE

FONTE: O autor (2012)

Nota: Imagens da monocamada observada por microscopia de contraste de fase após tratamento com o SYD-1 (24 horas). As células foram plaqueadas (1×10^6) em placas de 60cm^2 de diâmetro e deixadas aderir em estufa a 37°C em atmosfera de $5\% \text{CO}_2$ por 24 horas. Em seguida, foi realizado tratamento com o composto por 24 horas e as imagens obtidas pelo uso de microscópio Axiovert 40CSFL.

A,B – SYD-1 $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$; C,D – SYD-1 $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$

A morfologia dos hepatócitos tratados ou não com SYD-1 também foi analisada por microscopia de contraste de fase. As imagens correspondentes estão apresentadas nas FIGURAS 17 A-D. As imagens A e B da FIGURA 17 representam o experimento controle (ausência de SYD-1), em aumentos de 10 e 20x respectivamente. Observa-se a organização das células de aspecto cúbico em monocamada. Em algumas células mais de um núcleo pode ser observado. As células tratadas com o DMSO (solvente da droga), não apresentaram alterações morfológicas em relação ao controle, conforme visualizado nas imagens C e D.

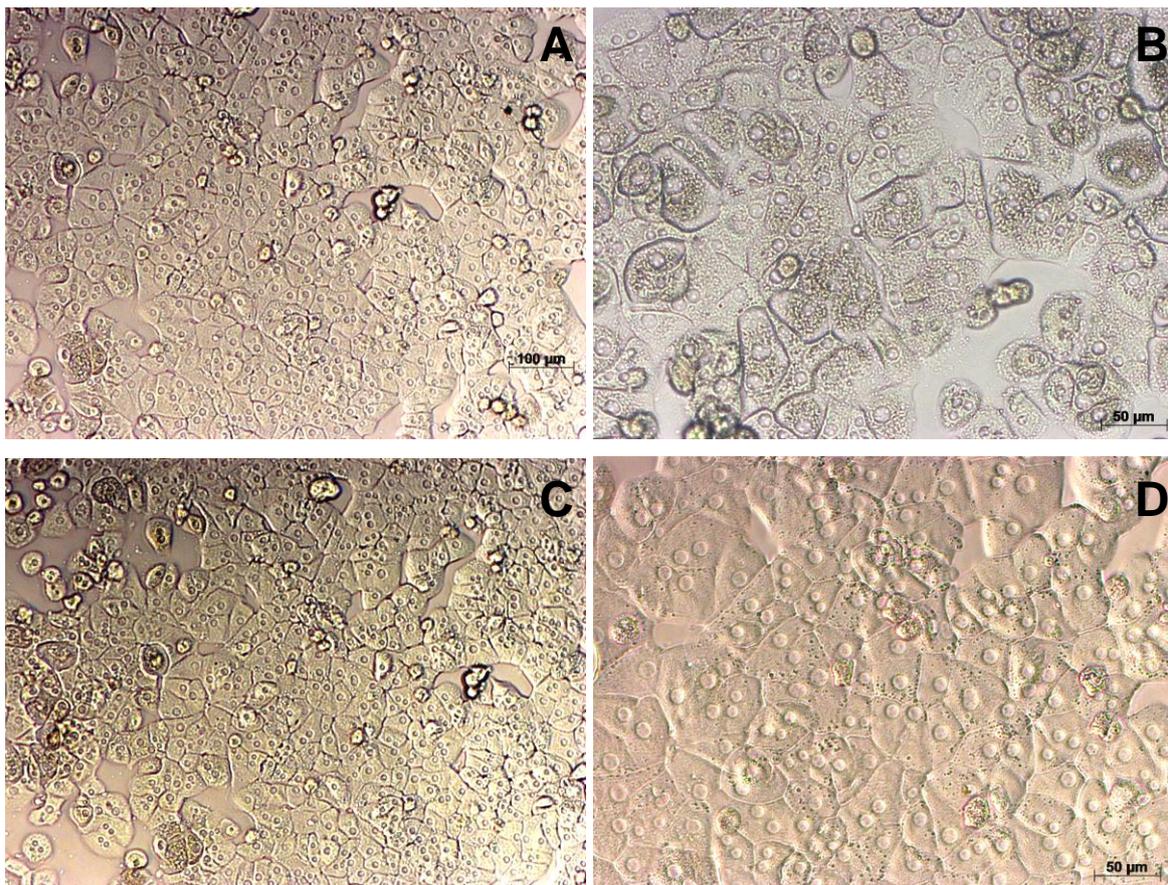


FIGURA 17: MORFOLOGIA DOS HEPATÓCITOS – CONTRASTE DE FASE

FONTE: O autor (2012)

Nota: Imagens da monocamada observada por microscopia de contraste de fase. As células foram plaqueadas (1×10^6) em placas de 60 cm^2 de diâmetro e deixadas aderir em estufa a 37°C em atmosfera de $5\% \text{ CO}_2$ por 4 horas. Em seguida, foi realizado tratamento com o DMSO ($0,01\%$) por 18 horas e as imagens obtidas em microscópio Axiovert 40CSFL

A,B – Controle, C,D – DMSO

A FIGURA 18 apresenta imagens da cultura primária de hepatócitos após tratamento com o SYD-1. Na concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (FIGURA 18 A) o composto não promoveu alterações na organização da monocamada. No entanto, é possível visualizar algumas células com aspecto arredondado. Já na FIGURA 18 C-D que representa experimentos realizados na maior concentração de SYD-1, pode-se visualizar um grande número de células arredondadas, alguns fragmentos celulares e alterações na organização da monocamada.

Estes resultados estão de acordo com os de viabilidade utilizando o MTT (FIGURA 11), nos quais o SYD-1 foi citotóxico de maneira dose dependente, comprometendo em $\sim 66\%$ a viabilidade destas células somente na maior concentração ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Por outro lado, é discordante dos resultados obtidos pela atividade da LDH no sobrenadante das culturas (FIGURA 13), uma vez que nestes ensaios, apesar da viabilidade ter sido reduzida de maneira

dose dependente, foi significativa em relação ao controle nas duas concentrações do mesoiônico.

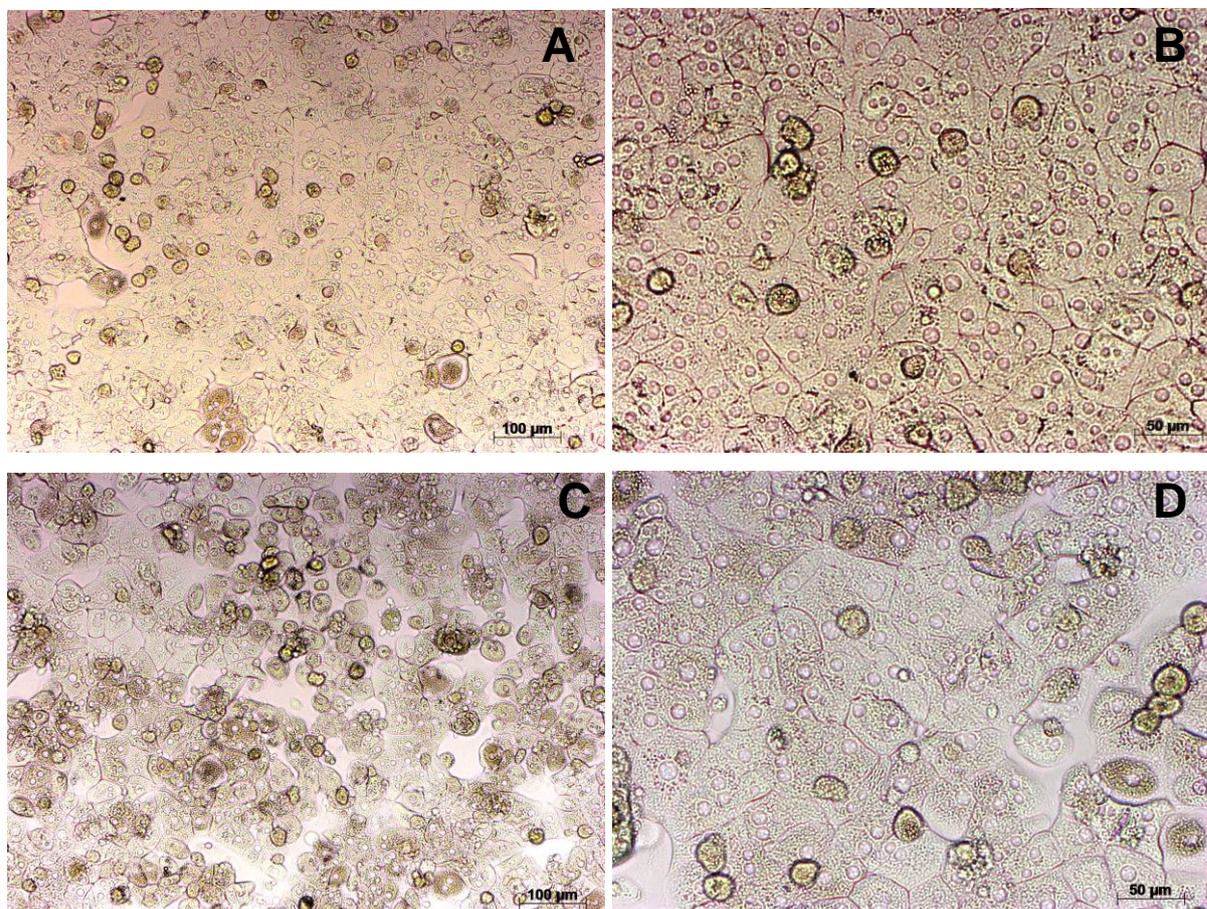


FIGURA 18: MORFOLOGIA DOS HEPATÓCITOS TRATADOS COM SYD-1 – CONTRASTE DE FASE

FONTE: O autor (2012)

Nota: Imagens da monocamada observada por microscopia de contraste de fase após tratamento com o SYD-1. As células foram plaqueadas (1×10^6) em placas de 60 cm^2 de diâmetro e deixadas aderir em estufa a 37°C em atmosfera de $5\% \text{ CO}_2$ por 4 horas. Em seguida, foi realizado tratamento com o composto por 18 horas e as imagens obtidas em microscópio Axiovert 40CSFL

A,B – SYD-1 $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$; C,D – SYD-1 $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$

Embora alterações morfológicas tenham sido observadas para os hepatócitos em cultura, estas foram menos pronunciadas do que as observadas em células HepG2. No entanto, a impossibilidade de realizar a coloração com hematoxilina e eosina para os hepatócitos prejudicou a comparação entre os efeitos sobre as duas linhagens celulares.

Apesar desta dificuldade metodológica, as alterações observadas pelo tratamento com o SYD-1 sobre as células HepG2 e hepatócitos são indicativas de sofrimento e morte celular, particularmente por apoptose (ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Neste contexto, Gozzi (2010) ao testar os efeitos do SYD-

1 sobre a bioenergética mitocondrial, observou que o composto não era capaz de induzir a formação/abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP) associado com a ativação da via intrínseca da apoptose. No entanto, a indução da via extrínseca da apoptose pelo composto não foi avaliada até o momento.

6.2.3 Respiração Celular

Considerando a diminuição da viabilidade e as alterações morfológicas celulares resultantes do tratamento com SYD-1 e, com objetivo de avaliar aspectos metabólicos destas células, foram determinados os efeitos do mesoiônico sobre a respiração celular. Para tanto, foram realizados ensaios utilizando as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SYD-1 para as duas linhagens celulares, tanto em suspensão quanto em cultura. Os tempos de incubação com o composto foram de 2 min para as células em suspensão e, 24h e 18h para as células HepG2 e hepatócitos em cultura, respectivamente.

Estes ensaios foram realizados com células não permeabilizadas com o objetivo de aproximar as condições experimentais às fisiológicas e também permitir a visualização dos efeitos do SYD-1 decorrentes de sua interação com a membrana celular. Para isto, todos os reagentes utilizados eram permeáveis, e como meio de reação utilizou-se o próprio meio de cultura.

A respiração celular foi determinada em quatro estados (HÜTTER, *et. al.*, 2006), definidos a seguir:

- Basal: correspondente ao consumo de oxigênio pelas células na ausência de substratos exógenos, de inibidores ou do desacoplador FCCP;
- Leak: correspondente ao consumo de oxigênio pelas células na ausência de substratos exógenos e na presença de oligomicina, um inibidor da ATPsintase (HAO, *et al.*, 2010). Este estado reflete o transporte de elétrons que ocorre em resposta a entrada de prótons na matriz mitocondrial via membrana mitocondrial interna, impulsionada pelo gradiente eletroquímico de prótons. O consumo de oxigênio durante este estado da respiração é maior em resposta ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons.
- Desacoplado: correspondente ao consumo de oxigênio, na ausência de substratos exógenos e em presença de oligomicina e do desacoplador FCCP. Caracterizado pelo consumo de oxigênio de forma independente da síntese de ATP, uma vez que o desacoplador promove a

reciclagem de prótons através da membrana mitocondrial interna e a velocidade máxima do transporte de elétrons (MONTEIRO *et. al.*, 2011) e, conseqüentemente, o aumento do consumo de oxigênio.

- Inibido (Rotenona e Antimicina): corresponde ao consumo de oxigênio, na ausência de substratos exógenos e na presença de oligomicina, FCCP, rotenona e antimicina, sendo estes últimos inibidores do transporte de elétrons a partir do complexo I e III da cadeia respiratória, respectivamente.

Para facilitar a interpretação destes experimentos, na FIGURA 19 está representado o traçado demonstrativo de um ensaio na ausência de SYD-1 (controle), onde a concentração de oxigênio (linha azul) e fluxo de oxigênio (linha vermelha) estão representados durante os estados da respiração especificados acima. Observa-se, inicialmente, o consumo de oxigênio basal que foi significativamente diminuído com a adição de oligomicina, como esperado. No entanto, observa-se que, embora em baixa velocidade, o consumo de oxigênio ainda ocorre em resposta à reentrada de prótons na matriz mitocondrial (Estado *Leak*). A adição de FCCP promove o aumento do consumo de oxigênio (Estado desacoplado). Finalmente, a respiração mitocondrial é totalmente inibida pela adição de rotenona e antimicina (Estado inibido). Os resultados obtidos destes traçados foram analisados pelo Software DataLab4 e são representados nos gráficos a seguir em três estados: Basal, *Leak* e Desacoplado obtidos após a subtração da respiração verificada na presença de antimicina e rotenona. Esta subtração é necessária para que se represente o consumo de oxigênio restrito à respiração mitocondrial.

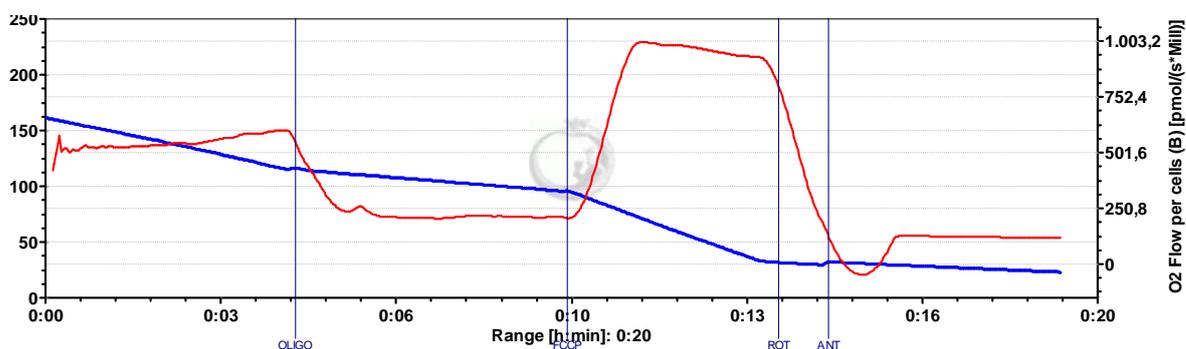


FIGURA 19: TRAÇADO DEMONSTRATIVO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO CELULAR EM OXÍGRAFO OROBOROS-2K

FONTE: O autor (2012)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, no item 5.5.6. O sistema de reação foi o próprio meio de cultivo das células. Adições: FCCP; Oligo- oligomicina; ROT – rotenona; ANT – antimicina. Linha azul: concentração de O₂; Linha vermelha – fluxo de O₂

6.2.3.1 Células HepG2 e hepatócitos em suspensão

Nas figuras 20 e 21 estão representados os resultados quantitativos do consumo de oxigênio por células HepG2 e Hepatócitos em suspensão. Observa-se na FIGURA 20 que, em células HepG2, o SYD-1 ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) não promoveu alterações significativas no consumo de oxigênio durante os três estados da respiração. No entanto, para maior concentração ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$), os resultados sugerem uma inibição para os estados basal e *leak*.

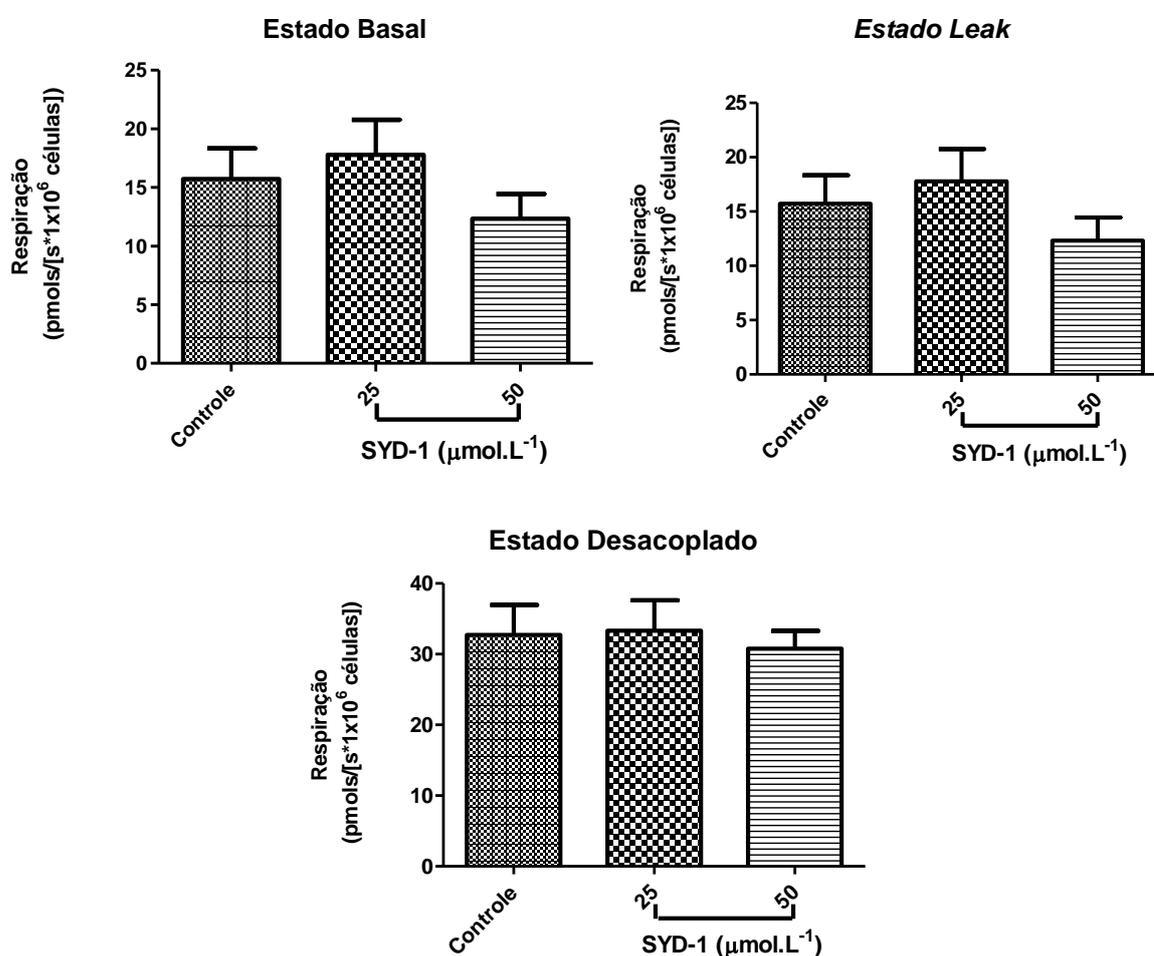


FIGURA 20: EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS HEPG2 EM SUSPENSÃO

FONTE: O autor (2012)

Nota: Os experimentos de consumo de oxigênio em células HepG2 foram realizados conforme item 5.5.6 de materiais e métodos. As células (1×10^6) foram transferidas para as câmaras do oxigrafo e o consumo de oxigênio determinado na ausência de inibidores ou desacopladores (Estado Basal), na presença de oligomicina (Estado *Leak*); na presença de FCCP (Estado Desacoplado). Os ensaios foram realizados a 37°C com agitação constante. Os valores representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes

Os resultados para os hepatócitos em suspensão estão representados na FIGURA 21 e são muito semelhantes aos observados para as células HepG2 (FIGURA 20). SYD-1 não alterou significativamente os estados da respiração destas células e, também na maior concentração (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), parece promover uma discreta inibição sobre o consumo de oxigênio para os estados basal e desacoplado.

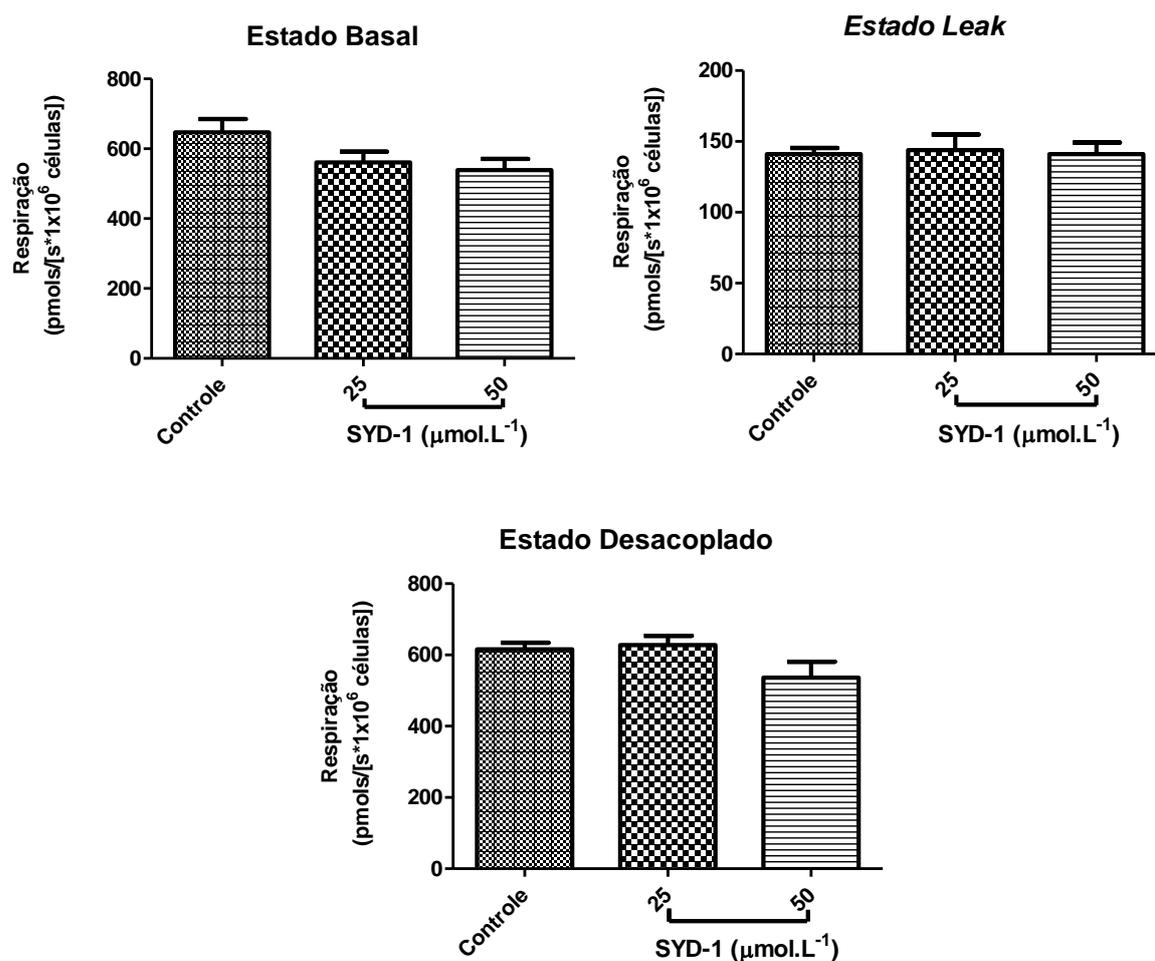


FIGURA 21: EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM HEPATÓCITOS EM SUSPENSÃO

FONTE: O autor (2012)

Nota: Os experimentos de consumo de oxigênio em células de hepatócitos foram realizados conforme item 5.5.7 de materiais e métodos. As células (1×10^6) foram transferidas para as câmaras do oxígrafo e o consumo de oxigênio determinado na ausência de inibidores ou desacopladores (Estado Basal), na presença de oligomicina (Estado *Leak*); na presença de FCCP (Estado Desacoplado). Os ensaios foram realizados a 37°C com agitação constante. Os valores representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes

6.2.3.2 Células HepG2 e hepatócitos em cultura

Para estes experimentos, células HepG2 e hepatócitos foram cultivados em presença do SYD-1 (25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 24 e 18 horas, respectivamente. Após a coleta das células por tripsinização, o consumo de oxigênio foi determinado nas mesmas condições descritas no item anterior. Os resultados destes experimentos estão representados nas FIGURAS 22 e 23 para as células HepG2 e Hepatócitos, respectivamente.

Diferentemente do observado para as células em suspensão, o tratamento com SYD-1 (25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 24 horas promoveu uma diminuição do consumo de oxigênio em células HepG2 de ~12% e ~21% para os estados *leak* e desacoplado, respectivamente. Para este último estado, na maior concentração de SYD-1 (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) a inibição foi de ~26%.

Pode-se observar com os resultados obtidos, que o composto inibiu o transporte de elétrons através da cadeia, uma vez que houve diminuição significativa em relação ao controle dos estados *leak* e desacoplado. No entanto, na maior concentração avaliada (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), a inibição apresentada no estado desacoplado não foi visualizada no estado *leak*. Isto pode ser decorrente de um efeito do composto sobre a membrana mitocondrial interna, tornando-a mais susceptível a entrada de prótons, e assim ocultando a inibição existente.

Por sua vez, o efeito do composto em células hepáticas saudáveis (FIGURA 23), foi semelhante ao observado para as células HepG2, porém somente para a maior concentração (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), quando verificou-se uma diminuição do consumo de oxigênio em ~79% e ~39%, para os estados basal e desacoplado, respectivamente.

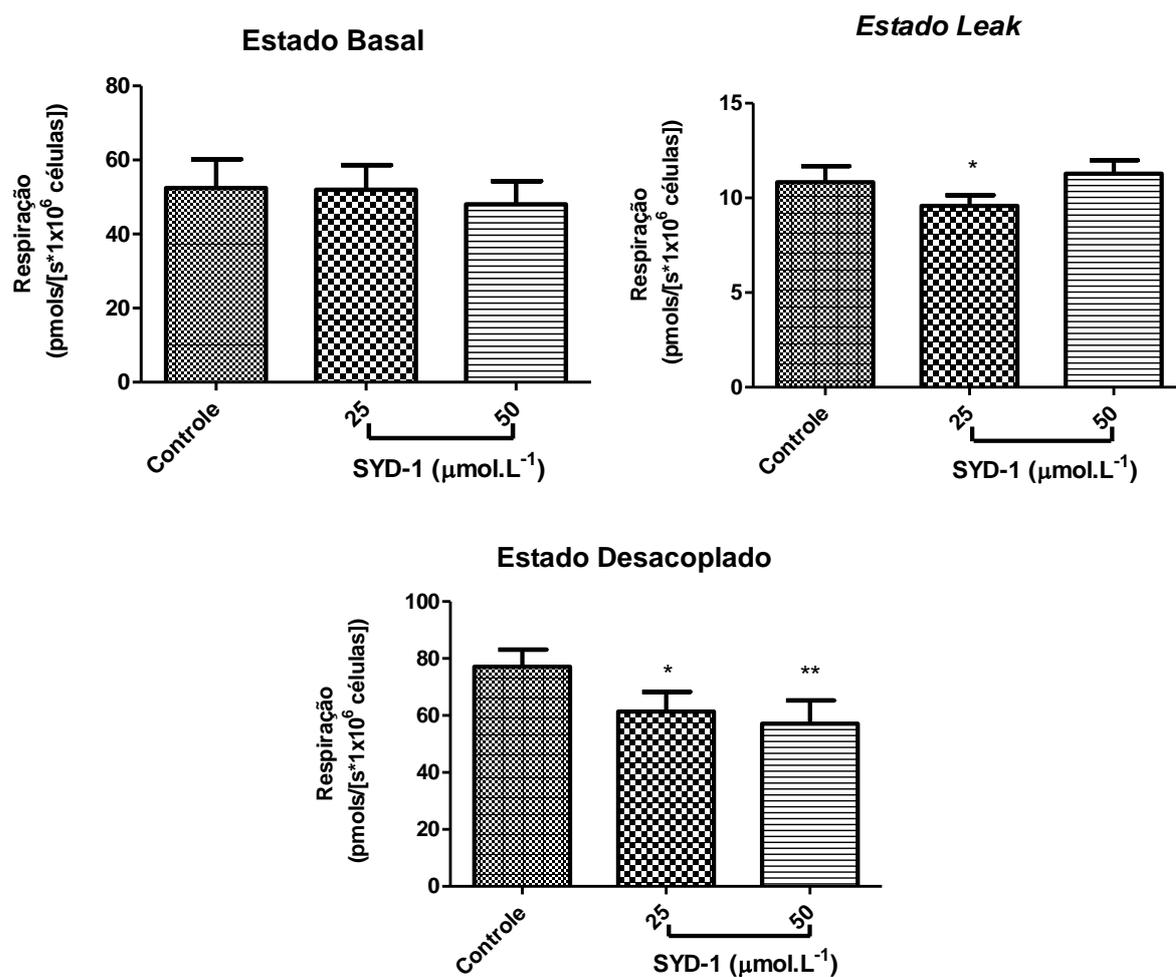


FIGURA 22: EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS HEPG2 ADERIDAS

FONTE: O autor (2012)

Nota: O consumo de oxigênio em células HepG2 foi determinado conforme item 5.5.6 de materiais e métodos. Células plaqueadas (1×10^6 células por placa), na ausência ou presença de SYD-1, foram coletadas após 24 horas e o consumo de oxigênio determinado na ausência de inibidores ou desacopladores (Estado Basal), na presença de oligomicina (Estado *Leak*); na presença de FCCP (Estado Desacoplado) em Oxígrafo-2K OROBOROS. Os ensaios foram realizados a 37°C com agitação constante. Os valores representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes

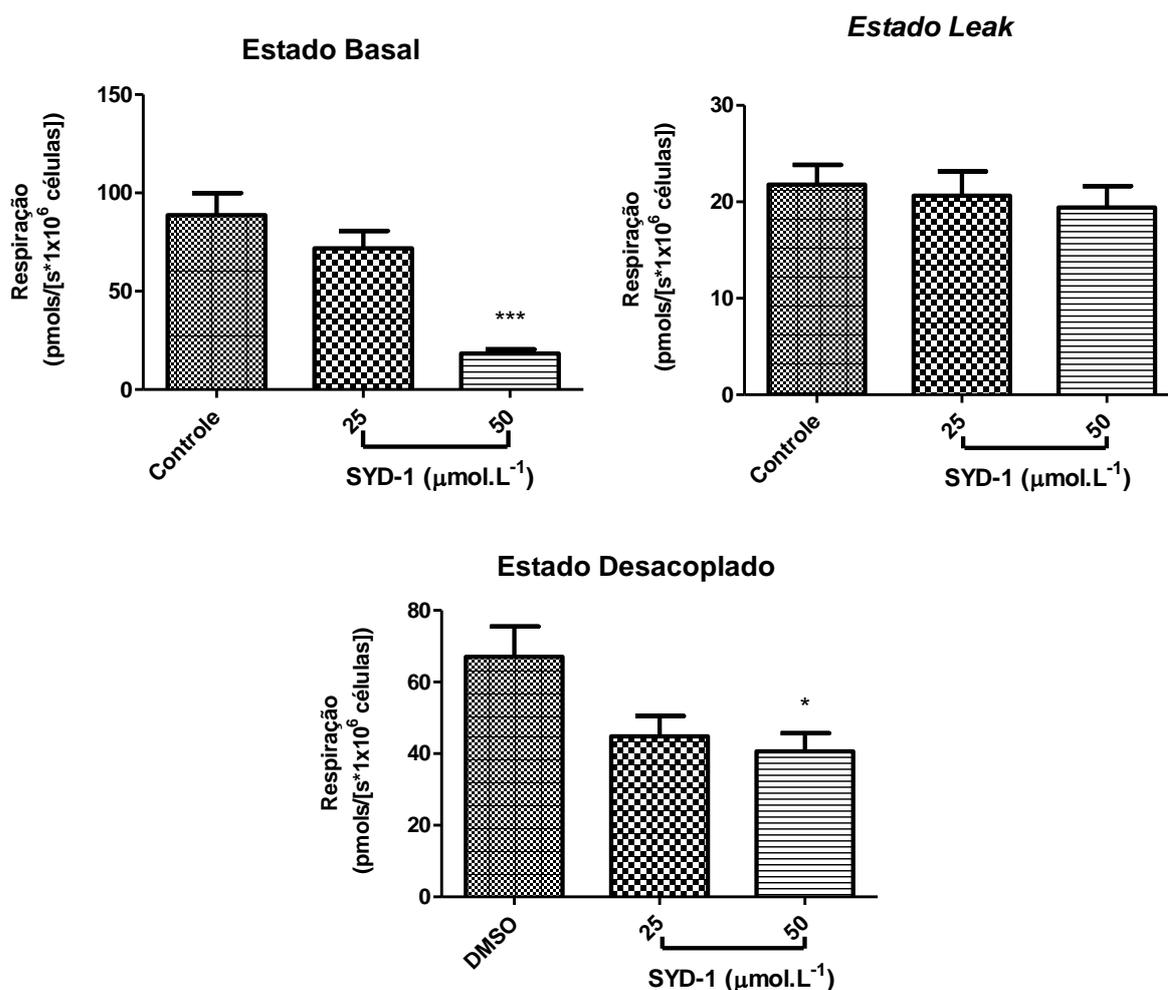


FIGURA 23: EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM HEPATÓCITOS CULTIVADOS

FONTE: O autor (2012)

Nota: O consumo de oxigênio em hepatócitos foi determinado conforme item 5.5.6 de materiais e métodos. Hepatócitos plaqueados (1×10^6 células por placa) na ausência ou presença de SYD-1, foram coletados após 18 horas e o consumo de oxigênio determinado na ausência de inibidores ou desacopladores (Estado Basal), na presença de oligomicina (Estado *Leak*); na presença de FCCP (Estado Leak) em Oxígrafo-2K OROBOROS. Os ensaios foram realizados a 37°C com agitação constante. Os valores representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes

Os efeitos do SYD-1 sobre a respiração das células HepG2 e hepatócitos (FIGURAS 22 e 23) são compatíveis aos de viabilidade para estas células utilizando o MTT (FIGURAS 10 e 11 respectivamente). Na concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, o SYD-1 não afetou a viabilidade dos hepatócitos enquanto que diminuiu a viabilidade das células HepG2 em $\sim 20\%$. Já na maior concentração ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) o mesoiônico promoveu a diminuição da viabilidade das células HepG2 e hepatócitos em $\sim 30\%$ e 66% , respectivamente. Estes resultados são importantes na medida em que evidenciam que na concentração em que é citotóxico para as células de hepatoma ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$), o SYD-1 não tem efeito sobre as células hepáticas

saudáveis. Estes resultados são também concordantes com as alterações morfológicas observadas após o tratamento com SYD-1 (FIGURA 18), as quais foram mais significativas nas células HepG2 em relação aos hepatócitos. Ainda, estes resultados complementam os obtidos por Halila *et al.* (2007). Naquele trabalho, os autores obtiveram como efeito mais expressivo do SYD-1 sobre mitocôndrias isoladas a inibição do transporte de elétrons ao longo da cadeia mitocondrial, resultado este também observado no presente estudo, visualizado pela inibição nos estados respiratórios *leak* e desacoplado tanto das células HepG2 como dos hepatócitos.

6.2.4 Produção de Lactato e Piruvato

Sabe-se que nas células neoplásicas a via glicolítica anaeróbica é estimulada, mesmo em condições normais de provisão de oxigênio (KYU *et al.*, 2012). Diante desta conhecida alteração metabólica e, considerando que SYD-1 inibiu alguns estados da respiração celular (FIGURA 22), o que poderia desviar ainda mais o metabolismo para a oxidação parcial da glicose, foi avaliada a produção de lactato e piruvato em células HepG2 e também em hepatócitos, tanto em suspensão quanto em cultivo, na presença e ausência do composto.

Para os experimentos com as células HepG2 e hepatócitos em suspensão, foram utilizadas as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do SYD-1 e dosados piruvato e lactato nos tempos de 0, 20 e 40 minutos de incubação da suspensão celular com o mesoiônico. Os resultados destes experimentos estão representados nas figuras 28 e 29 para as células HepG2 e Hepatócitos, respectivamente.

A FIGURA 24 demonstra que em suspensão houve diminuição na produção de piruvato de maneira dose e tempo dependentes, sendo de ~16%, ~18% e ~25% para os tempos 0, 20 e 40 minutos, respectivamente para a concentração de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e de ~32%, ~26% e ~38% para a concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, nos mesmos tempos. No entanto, o aumento na produção de lactato só foi visualizado para a maior concentração nos tempos de 20 (~13%) e 40 minutos (~17%).

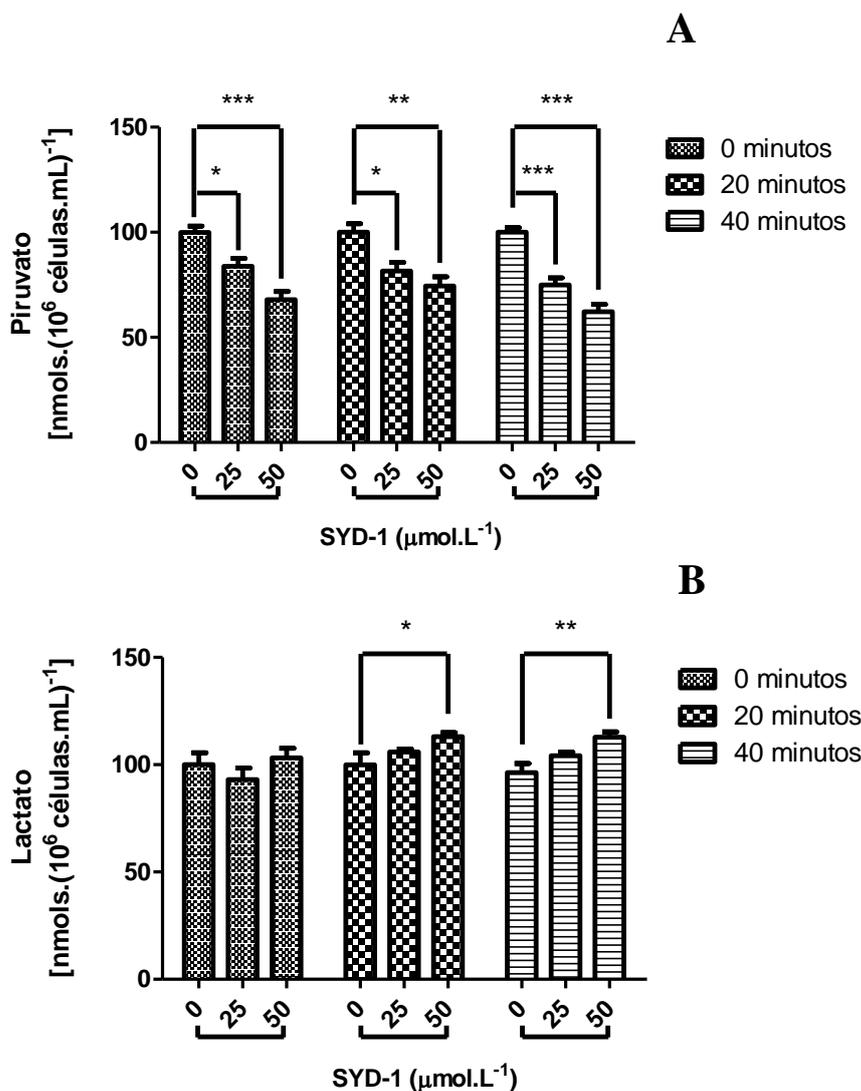


FIGURA 24: EFEITOS DO SYD-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE PIRUVATO E LACTATO EM CÉLULAS HEPG2 EM SUSPENSÃO

FONTE: O autor (2012)

Nota: A produção de piruvato (A) e lactato (B) em células HepG2 foi quantificada conforme item 5.5.5 de materiais e métodos. As células (1×10^6 células por mL) foram coletadas e mantidas em PBS a 37°C sob agitação constante, tratadas com SYD-1 nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por 2 minutos. Decorrido o tempo de tratamento, a reação foi disparada com adição de glicose 5 mmol.L^{-1} . Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 20 e 40 minutos e piruvato e lactato foram dosados no sobrenadante. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. *, **, *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,0001$

Resultado semelhante foi obtido com os hepatócitos, conforme visualizado na FIGURA 25. Para a concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a produção de piruvato diminuiu em $\sim 15\%$, $\sim 25\%$ e $\sim 27\%$ para os tempos 0, 20 e 40 minutos, respectivamente. Já para a maior concentração de SYD-1 ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) a redução dos níveis de piruvato foi de $\sim 27\%$ já no tempo zero e de $\sim 36\%$ para os tempos de 20 e 40 min. Contudo, o aumento na produção de lactato só foi visualizado nos tempos 20 ($\sim 21\%$ e $\sim 27\%$ para as concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente) e 40 minutos ($\sim 22\%$ para a concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

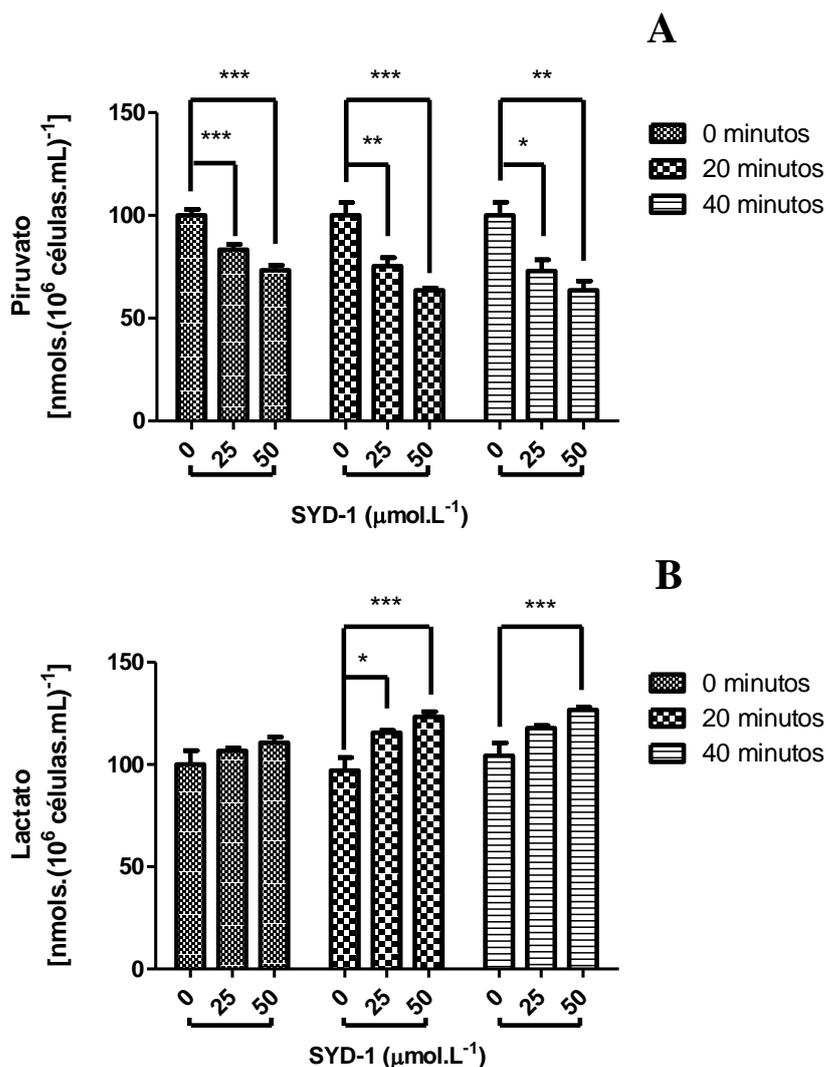


FIGURA 25: EFEITOS DO SYD-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE PIRUVATO E LACTATO EM HEPATÓCITOS EM SUSPENSÃO

FONTE: O autor (2012)

Nota: A produção de piruvato (A) e lactato (B) em hepatócitos foi quantificada conforme item 5.5.5 de materiais e métodos. As células (1×10^6 células por mL) foram coletadas e mantidas em PBS a 37°C sob agitação constante, tratadas com SYD-1 nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por 2 minutos. Decorrido o tempo de tratamento, a reação foi disparada com adição de glucose 5 mmol.L^{-1} . Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 20 e 40 minutos e piruvato e lactato foram dosados no sobrenadante. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. *, **, *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$, $p < 0,01$, e $p < 0,0001$

Embora o SYD-1 pareça estimular a oxidação parcial da glucose nas células HepG2 e hepatócitos, nenhum comprometimento da respiração celular foi observadas nestas células para as mesmas concentrações do mesoiônico (FIGURAS 20 e 21, respectivamente).

Os resultados para as células HepG2 e hepatócitos cultivados estão apresentados nas figuras 26 e 27, respectivamente. Como observado para as células de HepG2 em suspensão, observa-se na FIGURA 26, que em células HepG2 o SYD-1 promoveu uma diminuição nos níveis de piruvato em $\sim 25\%$ e $\sim 56\%$ nas concentrações de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$,

respectivamente. Esta diminuição foi acompanhada do aumento na produção de lactato em ~20% (25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e ~32% (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

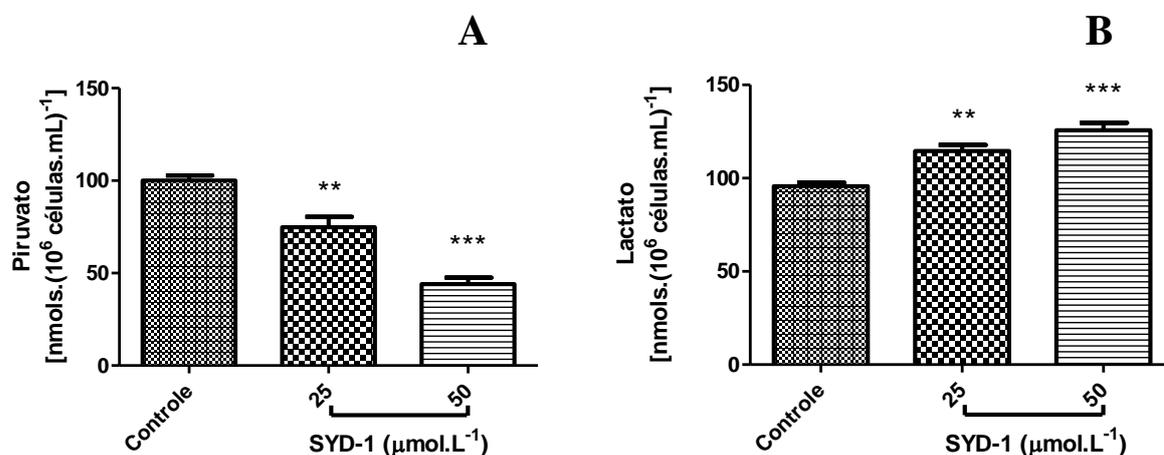


FIGURA 26: EFEITOS DO SYD-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE PIRUVATO E LACTATO EM CÉLULAS HEPG2 CULTIVADAS

FONTE: O autor (2012)

Nota: A produção de piruvato (A) e lactato (B) em células HepG2 foi quantificada conforme item 5.5.5 de materiais e métodos. As células (1×10^6 células por mL) foram plaqueadas, tratadas com SYD-1 nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ por 24 horas. Controle – ausência de SYD-1 e presença de DMSO 0,01%. Decorrido o tempo de tratamento piruvato e lactato foram dosados no sobrenadante. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. **, *** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,01$ e $p < 0,0001$

Para os hepatócitos, os efeitos do SYD-1 foram ainda mais pronunciados quando comparados aos observados para as células HepG2, mas ocorreram somente na maior concentração do mesoiônico (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Observa-se na FIGURA 27, que SYD-1 promoveu um aumento, tanto na produção de piruvato (~84%) quanto na de lactato (~16%), sugerindo uma importante ativação da glicólise anaeróbica nestas células. Este efeito do mesoiônico é concordante com a inibição sobre o consumo de oxigênio (FIGURA 25), também observada somente para a maior concentração. Como já visualizado anteriormente, os resultados obtidos com as células cultivadas foram mais expressivos do que com as mesmas em suspensão. Isto pode ser decorrente da diferença no tempo de incubação com o composto, sendo de apenas 2 minutos nesta última condição, ou ainda, este efeito pode ser derivado da ação de metabólitos secundários oriundos da metabolização do composto, o que não seria provável no tempo de 2 minutos de incubação.

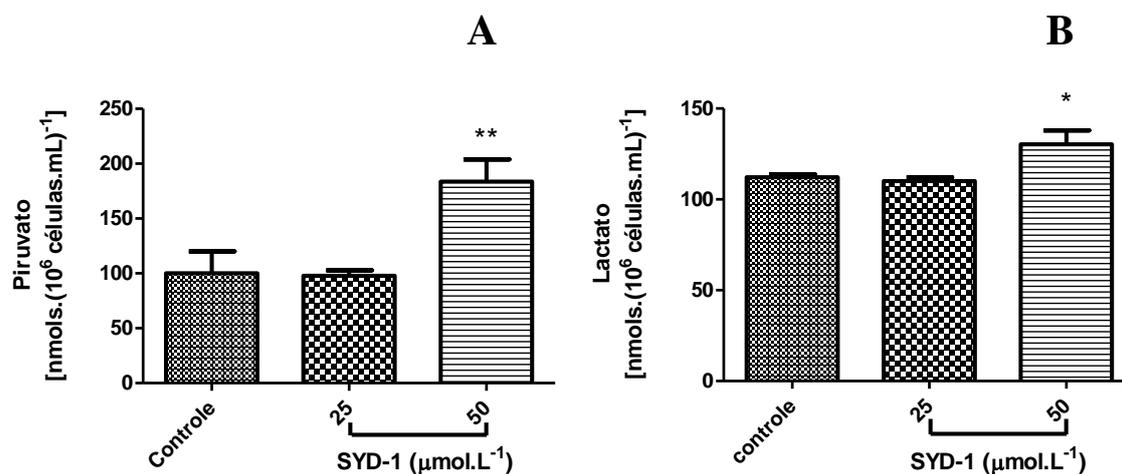


FIGURA 27: EFEITOS DO SYD-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE PIRUVATO E LACTATO EM HEPATÓCITOS CULTIVADOS

FONTE: O autor (2012)

Nota: A produção de piruvato (A) e lactato (B) em células de hepatócitos foi quantificada conforme item 5.5.5 de materiais e métodos. As células (1×10^6 células por mL) foram plaqueadas, tratadas com SYD-1 nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por 24 horas. Controle – ausência de SYD-1 e presença de DMSO 0,01%. Decorrido o tempo de tratamento piruvato e lactato foram dosados no sobrenadante. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. *, ** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$ e $p < 0,01$

7. DISCUSSAO FINAL

Halila e colaboradores (2007) demonstraram que SYD-1 promove uma importante diminuição da velocidade do transporte de elétrons através da cadeia respiratória, representado pela significativa inibição do estado 3. Os autores sugeriram que parte desta inibição seria decorrente da liberação de NO^{\bullet} a partir da estrutura do SYD-1, uma vez que esta característica é descrita para derivados desta mesma classe (SCHONAFINGER, 1999). No presente estudo confirmamos esta hipótese utilizando duas abordagens experimentais: a determinação do consumo de oxigênio durante o estado 3 da respiração em mitocôndrias isoladas (FIGURAS 7-8) e a detecção de NO^{\bullet} com sonda fluorescente DAF-FM em sistema livre de mitocôndrias/células (FIGURA 9). Observamos que a inibição no estado 3 da respiração, promovida pelo SYD-1, foi similar a verificada em presença de SIN-1, um conhecido doador de NO^{\bullet} (FIGURAS 7-8) e que esta foi parcialmente revertida quando a Hb foi adicionada ao sistema (TABELA 1). Sabendo-se que a Hb é capaz de sequestrar NO^{\bullet} , este resultado sugere que este radical foi liberado a partir da estrutura do SYD-1, o que foi confirmado nos experimentos utilizando a sonda DAF-FM (FIGURA 9).

Nesta mesma linha de investigação, já em 1994, Cleeter *et. al.* demonstraram a inibição reversível do estado 3 da respiração em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de rato, oxidando ativamente glutamato, succinato ou ascorbato, quando incubadas com S-nitrosoglutationa – GSNO, um composto doador de NO^{\bullet} em diferentes concentrações (0-500 $\mu\text{mol. L}^{-1}$). Os autores observaram, ainda, que a adição de hemoglobina (24 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) prevenia esta inibição, que tinha como alvo o complexo IV da cadeia respiratória. De fato, sabe-se que a ação inibitória do NO^{\bullet} sobre este complexo ocorre através da ligação competitiva com o oxigênio ao sítio binuclear a_3/Cu_B (BRUNORI *et. al.*, 2004).

Os resultados dos experimentos com as células HepG2 e hepatócitos estão apresentados de forma resumida nas tabelas 2 e 3. Observa-se que o composto, nas concentrações de (25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) foi mais efetivo nas células cultivadas, provavelmente devido ao tempo de incubação nas primeiras, que foi de apenas 2 min. Por outro lado, o comprometimento da viabilidade nas células em cultura foi significativo. Estes ensaios foram realizados inicialmente em células HepG2 utilizando o método do MTT e definiram as concentrações (25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e tempo de incubação (24h), utilizados nos experimentos subsequentes.

Adicionalmente, outra metodologia, baseada na atividade da enzima LDH, foi empregada para analisar a citotoxicidade de SYD-1, porém, seus resultados não foram concordantes com os do MTT. Curiosamente, enquanto o MTT evidenciou uma redução de ~20% na viabilidade das células HepG2 nas duas concentrações utilizadas de SYD-1, de acordo com a liberação de LDH o composto não foi citotóxico para estas células. O resultado também foi discordante em relação aos hepatócitos, mas de maneira inversa, ou seja, de acordo com a última metodologia a viabilidade destas células teria sido mais comprometida pelo mesoiônico (TABELAS 2-3).

Para explicar esta diferença deve-se considerar o fundamento de cada método bem como as diferenças entre as linhagens. Enquanto a liberação de LDH para o meio de cultura é dependente do comprometimento da permeabilidade da membrana celular, o ensaio do MTT baseia-se em sua redução por desidrogenases mitocondriais, fenômenos que podem ocorrer em diferentes momentos. Fotakis e Timbrell (2006), com objetivo de determinar qual seria a melhor metodologia para detecção de citotoxicidade, compararam os ensaios de MTT, vermelho neutro e de liberação de LDH em células HepG2 e HTC (linhagens de hepatoma de rato) tratadas com cloreto de cádmio ($0-300 \mu\text{mol.L}^{-1}$), por diferentes tempos. A partir dos resultados, os autores concluíram que o ensaio do MTT foi o mais sensível, enquanto que o de liberação de LDH foi o menos sensível. Na verdade, existe controvérsia na literatura em relação aos métodos para a determinação da viabilidade celular, recomendando-se pelo menos a realização de dois métodos. No entanto, quando há um desacordo nos resultados, é ainda importante que os demais dados sejam considerados de forma criteriosa para que se faça uma correta interpretação.

O comprometimento da viabilidade celular pelo SYD-1 poderia envolver a liberação de NO^{\bullet} a partir de sua estrutura. Neste contexto, Chimenti *et. al.* (2007), testaram o efeito da liberação de óxido nítrico sobre a viabilidade e o consumo de oxigênio de culturas de células hepáticas de ratos, utilizando diferentes concentrações (10, 50, 100, 150 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) de um conhecido doador de NO^{\bullet} (NOR-3). Os autores obtiveram como resultado uma diminuição expressiva na viabilidade celular após 2 horas de exposição ao NOR-3 nas concentrações de 50, 100, 150 μM e diminuição na respiração após 40 minutos de tratamento com o composto na concentração de 0,1 $\mu\text{mol. L}^{-1}$.

TABELA 2: EFEITOS DO SYD-1 SOBRE CÉLULAS HEPG2 E HEPATÓCITOS EM SUSPENSÃO

Células HepG2 (2 min de incubação com SYD-1)		
	SYD-1	
	25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol. L}^{-1}$
Respiração celular	Sem efeito	Sem efeito
Piruvato	Redução de ~16%, ~18% e ~25% para os tempos 0, 20 e 40 minutos, respectivamente.	Redução de ~32%, ~26% e ~38% para os tempos 0, 20 e 40 minutos, respectivamente
Lactato	Sem efeito	Aumento de ~13% e ~17% para 20 e 40 minutos, respectivamente.
Hepatócitos (2 min de incubação com SYD-1)		
Viabilidade – Azul de tripan	Sem efeito	Sem efeito
Respiração celular	Sem efeito	Sem efeito
Piruvato	Redução de ~15%, ~25% e ~27% para os tempos 0, 20 e 40 minutos, respectivamente	Redução de ~27% para o tempo zero e de ~36% para os tempos de 20 e 40 min, respectivamente.
Lactato	Aumento de ~20% para o tempo de 20	Aumento de ~27% e ~22% no tempo de 20 e 40 minutos respectivamente.

FONTE: O autor (2012)

TABELA 3: EFEITOS DO SYD-1 SOBRE CÉLULAS HEPG2 E HEPATÓCITOS EM CULTIVO

Células HepG2 (24h de incubação com SYD-1)		
	SYD-1	
	25 $\mu\text{mol. L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol. L}^{-1}$
Viabilidade – MTT	↓ 20%	↓ 20%
Viabilidade – LDH	Sem efeito	Sem efeito
Morfologia (Hematoxilina e eosina e contraste de Fase)	Retraimento do citoplasma, núcleo picnótico, prolongamentos globosos do citoplasma (<i>blebs</i>) e aumento do número de vacúolos	Retraimento do citoplasma; núcleo picnótico, prolongamentos globosos do citoplasma (<i>blebs</i>), aumento do número de vacúolos, diminuição do número de células e desorganização da monocamada.
Respiração celular	Inibição do estado Leak (~12%) e desacoplado (~21%)	Inibição do estado Desacoplado (~26%)
Piruvato	↓~25%	↓~56%
Lactato	↑~20%	↑~32%
Hepatócitos (24h de incubação com SYD-1)		
Viabilidade – MTT	Sem efeito	↑~66%
Viabilidade – LDH	↑~84%	↑~269%
Morfologia (contraste de Fase)	Poucas células com aspecto arredondado.	Maior número de células arredondadas, fragmentos celulares.
Respiração celular	Sem efeito	Inibição dos estados basal (~79%) e desacoplado (~39%)
Piruvato	Sem efeito	↑~84%
Lactato	Sem efeito	↑~16%

FONTE: O autor (2012)

As análises morfológicas realizadas neste estudo sugerem que o SYD-1 é citotóxico para as duas linhagens celulares. No entanto, estas alterações nas células tumorais foram mais significativas (FIGURAS 16-18, TABELA 3) para as duas concentrações do composto (25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), enquanto que para os hepatócitos efeitos significativos foram observados somente na maior concentração. Estes resultados estão de acordo com os ensaios de viabilidade. Entretanto, deve-se considerar que a impossibilidade de realizar a coloração com hematoxilina e eosina para os hepatócitos em cultura dificultou a comparação entre os efeitos do SYD-1 sobre as duas linhagens celulares. Embora esta técnica de coloração seja a mais

difundida e utilizada para avaliar alterações morfológicas (LARSON *et. al.*, 2011), trabalhos recentes vêm utilizando metodologias alternativas mais sensíveis como: microscopia eletrônica, imunohistoquímica (marcadores específicos de função), microscopia de fluorescência (marcação por anexina e iodeto de propídio) e método de TUNEL. Assim, além de possibilitar a visualização das alterações morfológicas com maior riqueza de detalhes, estas metodologias permitem que se avance no entendimento de seus mecanismos de indução (TÖRÖK *et. al.*, 2011; KAMOSHIMA *et. al.*, 2011). Desta maneira, como perspectiva futura, estas metodologias poderiam ser utilizadas para confirmar se SYD-1 é capaz de induzir a morte celular e, ainda, indicar possíveis mecanismos envolvidos neste efeito.

Diante do comprometimento da viabilidade celular e das alterações morfológicas causados pelo SYD-1 nas células em cultura, foram avaliados os efeitos do mesoiônico sobre a respiração celular. SYD-1 não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre os estados da respiração nas duas linhagens em suspensão (FIGURAS 20 e 21 TABELA 2). Porém, nas células HepG2 em cultura SYD-1 foi efetivo já na menor concentração (inibição dos estados *leak* e desacoplado – TABELA 3) enquanto que nos hepatócitos, também em cultura, o composto teve efeito somente na maior concentração ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) com inibição significativa dos estados basal e desacoplado (TABELA 3). Estes resultados estão de acordo com os ensaios de viabilidade e morfologia e sugerem que as células tumorais são mais sensíveis aos efeitos do composto, se considerada a menor concentração ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Os ensaios de consumo de oxigênio levam ao seguinte questionamento: uma vez que a respiração mitocondrial parece ser inibida pelo composto, a via glicolítica estaria estimulada de maneira compensatória? Para as células HepG2 cultivadas, os resultados indicam que houve este estímulo da via glicolítica, como sugerido pela diminuição na produção de piruvato e aumento na produção de lactato. Perfil semelhante foi observado para as mesmas células em suspensão (TABELA 2). No entanto, nesta última condição, não se observou inibição estatisticamente significativa da respiração celular, embora haja uma tendência (FIGURA 20).

Curiosamente, em hepatócitos cultivados foi observado um aumento pronunciado da produção de piruvato e em menor extensão de lactato (TABELA 3). Este resultado sugere que embora a via glicolítica esteja ativada, como indicado pelo aumento da produção de piruvato, a redução deste a lactato está, de alguma forma, sendo prejudicada. Se retomados os resultados da viabilidade pela medida da liberação de LDH, quando a atividade da enzima foi expressivamente aumentada no sobrenadante destas células, é possível sugerir que a redução de piruvato a lactato nos hepatócitos em cultura foi deficiente devido a falta da enzima nestas

células. Esta hipótese deve ser confirmada futuramente. Por sua vez, este perfil não se reproduziu para as células em suspensão. Nesta situação houve uma redução na produção de piruvato para as concentrações 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e aumento na produção de lactato, mais pronunciado para a concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (TABELA 2).

Quando considerados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que SYD-1 (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) é tóxico tanto para células HepG2 quanto para hepatócitos, comprometendo de maneira significativa a respiração celular. No entanto, na menor concentração (25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) estes efeitos parecem ser mais pronunciados para as células tumorais, o que motiva a continuidade dos estudos com este composto.

8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- 1) O efeito inibitório do SYD-1 sobre o estado 3 da respiração mitocondrial está relacionado com a liberação de óxido nítrico a partir de sua estrutura;
- 2) Os efeitos do SYD-1 são mais pronunciados em células HepG2 e hepatócitos em cultura, em relação a estas células em suspensão;
- 3) SYD-1 diminui a viabilidade de células HepG2 em cultura de forma dose (25-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e tempo (24, 48 e 72 horas) dependentes conforme visualizado pelo método do MTT;
- 4) Na maior concentração utilizada (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) SYD-1 é mais efetivo em diminuir a viabilidade de hepatócitos em comparação às células HepG2 (método MTT);
- 5) O mesoiônico causa alterações morfológicas características de sofrimento celular. Tais modificações foram mais pronunciadas para as células tumorais na maior concentração de SYD-1 (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$);
- 6) SYD-1 compromete a respiração celular, efeito mais pronunciado para os hepatócitos cultivados para a maior concentração (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$);
- 7) O comprometimento da respiração celular causado pelo SYD-1 parece ser compensado pelo aumento da atividade da via glicolítica;
- 8) SYD-1, na menor concentração (25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), exerce efeitos mais pronunciados sobre as células HepG2.

9. REFERÊNCIAS

ALBERTSSON, P. A.; BASSE, P. H.; HOKLAND, M.; GOLDFARB, R. H.; NAGELKERKE, J. F.; NANNMARK, U.; KUPPEN, P. J. K. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. **Trends in Immunology**, v. 24, N.11, p. 603-609, 2003.

American Cancer Society. What is liver cancer? Disponível em: http://www.cancer.org/docroot/cric/content/cric_2_2_1x_what_is_liver_cancer_25.asp. Acesso em janeiro de 2011.

ASUNDARIA S. T.; PATEL, K. Synthesis and characterization of some sulfonamide based bis-sydnone and their *in vitro* antimicrobial activity. **Indian Journal of Chemistry**, v.49B, p. 960-964, 2010.

BADAMI, B. V. Mesoionic Compounds An Unconventional Class of Aromatic Heterocycles. **Resonance**, p. 40-48, 2006.

BAKER, W.; OLLIS, W. D. Meso-Ionic Compounds. **Chemistry and Industry**, 1955.

BERNSTEIN, L. H.; EVERSE, J. Determination of the Isoenzyme Levels of Lactate Dehydrogenase. **Enzyme Assay Procedures**, p. 47-52, 1973.

BIZETTO, E. L.; NOLETO, G. R.; ECHEVARRIA, A.; CANUTO, A. V.; CADENA, S. M. S. C. Effect of sydnone SYD-1 on certain functions of LPS-stimulated macrophages, **Mol Cell Biochem**, v. 360, p. 15-21, 2012.

BOKHARI, A. R.; MURRELL, G. A. C. The role of nitric oxide in tendon healing. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery Board of Trustees**, v. 21, p. 238-244, 2012.

BOKHARI, M.; CARNACHAN, R. J.; CAMERON, N. R.; PRZYBORSKI, S. A. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. **Journal Anatomy**, v. 211, p. 567-576, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

BROOKES, P. S.; KRAUS, D. W.; SHIVA, S.; DOELLER, J. E.; BARONE, M. C.; PATEL, R. P.; LANCASTER JR.; DARLEY-USMAR, V. Control of mitochondrial respiration by NO, effects of low oxygen and respiratory state, **J. Biol. Chem.**, v. 278 (2003) p.31603-31609, 2003.

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**, p. 4409-4416, 1957.

BROWNE, D. L.; HARRITY, J. P. A. Recent developments in the chemistry of sydnones. **Tetrahedron**, v. 66, n. 897, p. 553-568, 2010.

BRUIX; J.; BOIX, L.; SALA, M.; LLOVET, J. M. Focus on hepatocellular carcinoma. **Cancer Cell**, v. 5, p. 215-219, 2004.

BRUNORI, M.; GIUFFREÉ, A.; FORTE,E; MASTRONICOLA, D.; BARONE, M. C.; SARTI. Control of cytochrome c oxidase activity by nitric oxide, *Biochim. Biophys. Acta* v. 1655, p.365-371, 2004.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature**, v. 11, p. 85-95, 2011.

CHEN, Y.; CAIRNS, R.; PAPANDREO, L.; KOONG, A.; DENKO, N. C. Oxygen Consumption Can Regulate the Growth of Tumors, a New Perspective on the Warburg Effect. **Plos One**, v. 4, 2009.

CHIMENTI, R.; MARTINO, G.; MAZZULLA, S.; SESTI, S. Effect of Nitric Oxide Release from NOR-3 on Urea Synthesis, Viability and Oxygen Consumption of Rat Hepatocyte Cultures. **Physiological Research**, v. 56, p. 427-432, 2007.

CHOI, S. B.; KIM, H.; KIM, S. H. PARK, Y. N.; KIM, K. S. Solitary Extrahepatic Intraabdominal Metastasis from Hepatocellular Carcinoma after Liver Transplantation. **Yonsei University College of Medicine**, v. 52, n. 1, p. 199-203, 2011.

CHUANG, S.-C.; LA VECCHIA, C.; BOFFETTA, P. Liver cancer: Descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. **Cancer Letters**, v. 286, p. 9-14, 2009.

CHUN, S. Y.; JOHNSON, C.; WASHBURN, J. G.; CRUZ-CORREA, M. R.; DANG, D. T.; DANG, L. H. Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer

cells by inducing HIF-1 α and HIF-2 α target genes. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 293, p. 1-11, 2010.

CLEETER, M. W. J.; COOPEFIB, J. M.; DARLEY-USMARD, V. M.; MONCADAD, S.; SCHAPIRA, A. H. V. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS Letters**, v. 345, p. 50-54, 1994.

COHNHEIM, J. C. Quergestreiftes Muskelsarkon der Nieren. **Virchows Arch**, v. 65, p. 64, 1875.

CZOC, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. **Methods Enzyme Anal., Weinheim**, p. 1446-1451, 1974.

DEBERARDINIS, R. J.; LUM, J. J.; HATZIVASSILIOU, G.; THOMPSON, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v.7, 2008.

DIAZ-RUIZ, R.; URIBE-CARVAJAL, S.; DEVIN, A e RIGOULET, M. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1796, p.252-65, 2009.

DONATO, M. T.; LAHOZ, A.; CASTELL, J. V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Cell Lines: A Tool for In Vitro Drug Metabolism Studies. **Current Drug Metabolism**, v. 9, p. 1-11, 2008.

DUNGEL, P.; HAINDL, S.; BEHLING,T.; MAYER, B.; REDL, H.; KOZLOV, A. V. Neither Nitrite Nor Nitric Oxide Mediate Toxic Effects of Nitroglycerin on Mitochondria. **J Biochem Molecular Toxicology**, v. 25, n. 5, 2011.

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**, v. 13, n. 17, p. 2899-2901, 2003.

ENGSTROM, P. F. Hepatocellular Carcinoma (HCC). **Encyclopedia of Cancer**, v. 2, p. 363-371, 2002.

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

FERLAY J.; SHIN H. R.; BRAY F.; FORMAN D.; MATHERS C.; PARKIN D. M. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: CancerBase. **International Agency for Research on Câncer**, n. 10, 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/liver.asp>

FERREIRA, L. M. R. Cancer metabolism: The Warburg effect today. **Experimental and Molecular Pathology**, p. 1-9, 2010.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-177, 2006.

GISH, R. G. Overview of Hepatocellular Carcinoma. **Clinical Roundtable Monograph**, p.1-5, 2010.

GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 60-74, 2010.

GOTTLIEB, E.; VOUSDEN, K. H. p53 Regulation of Metabolic Pathways. The Beatson Institute for Cancer Research. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, p. 1-11, 2010.

GOZZY, G. J. **Efeitos da sidnona SYD-1 sobre parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e transição de permeabilidade mitocondriais**. 110f. Dissertação(mestrado em Ciências-Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2010.

GNAIGER, E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. **Respiration Physiology**, v. 128, p. 277-297, 2001.

GRECO, C. V.; CHENG, C. C.; NYBERG, W. H. Synthesis of Sydnones and Sydnone Imines. **Journal of Medicinal e Pharmaceutical Chemistry**, v. 5, n. 4, 1962.

GRYNBERG, N. *et al.* Some New Aryl-Sydnones - Effects on murine tumors. **Anticancer Research**, v. 12, n. 3, p. 1025-1028, 1992.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. A. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. **Methods Enzym. Anal. Weinheim**, p. 1464-1469, 1974.

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

HAO, W.; CHANG, C-P. B.; TSAO C-C; XU, J. Oligomycin-induced Bioenergetic Adaptation in Cancer Cells with Heterogeneous Bioenergetic Organization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12647–12654, 2010.

HARRINGTON, K. J. Biology of cancer. **Cancer Biology and Imaging**, v. 36, v.1, p. 1-4, 2007.

HOGG, N.; DARLEY-USMAR, V. M.; WILSON, M. T.; MONCADA, S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem. J.*, v.291, p.419-424, 1992.

HSU, P. P.; SABATINI, D. M. Cancer Cell Metabolism:Warburg and Beyond. **Cell**, n. 134, p. 703-707, 2008.

HÜTTER, E.; UNTERLUGGAUER, H.;GAREDEW, A.; JANSEN-DÜRR, P.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry—a modern tool in aging research. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 103-109, 2006.

IARC- International Agency for Cancer Research. **CANCER**Mondial. Disponível em: <http://www-dep.iarc.fr>. Acesso em dezembro 2010.

INCA, <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acesso em 21 de outubro de 2010.

JAESCHKE, H.; MCGILL, M. R.; RAMACHANDRAN, A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. **Drug Metabolism Reviews**, v. 44, n.1, p. 88-106, 2012.

JESUS, R. P. de; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Revista Associação Médica Brasil**, v. 46, n. 3, p. 242-54, 2000.

JOHNSON, P.J. The molecular biology of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. **Viruses and Liver Câncer**, 2002.

JEMAL, A.; CENTER, M. M.; DESANTIS, C.; WARD, E. M. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. **Câncer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, n. 19, v. 8, p. 1893-1907, 2010.

KALLURAYA, B.; LINGAPPA, B.; NOOJI, S. R. Synthesis and biological study of some novel 4-[5-(4,6-disubstituted-2-thiomethylpyrimidyl)-4'-amino-1,2,4-triazol-3'-yl] thioacetyl-3-arylsydnonones. **Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements**, v. 182, n. 6, p. 1393-1401, 2007.

KALLURAYA, B.; RAHIMAN, A. M.; BANJI, D.; ISLOOR, A. M.; RAI, G. Sydnone derivatives part-III: Synthesis and pharmacological study of 3-aryl-4-[substituted piperonylidene hydrazino-4-thiazolyl] sydnones. **Indian Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 217-222, 2000.

KALLURAYA, B.; RAHIMAN, A. M. Sydnone derivatives: Part X - Synthesis and pharmacological activity of some novel cyclohexenones and indazolinones. **Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1141-1148, 2003.

KAMOSHIMA, Y.; TERASAKA, S.; KURODA, S.; IWASAKI, Y. Morphological and histological changes of glioma cells immediately after 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy. **Neurological Research**, v. 33, n. 7 p. 739-746, 2011.

KAWASE, M.; SAKAGAMI, H.; MOTOHASHI, N. The Chemistry of Bioactive Mesoionic Heterocycles. **Top Heterocycle Chemistry**, v. 16, p. 135-152, 2009.

KEW, M. C. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. **Phatologie Biologie**, v. 58, p. 273-277, 2010.

KHMEL'NITSKAYA, E. Y.; LEVINA, V. I.; TRUKHACHEVA, L. A.; GRIGORIEV, N. B.; KALININ, V. N.; CHEREPANOV, I.A.; LEBEDEV, S. N.; GRANIK, V. G. Sydnonimines as exogenous NO donors. **Russian Chemical Bulletin**, v.53, n. 12, p. 2840-2844, 2004.

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

KLAUNIG, J. E.; GOLDBLATT, P. J.; HINTON, D. E.; LIPSKY, M. M.; CHACKO, J.; TRUMP, B. F. Mouse liver cellculture. I. Hepatocyte isolation. *In Vitro*; v.17, n. 10, p. 913-25, 1981.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KITKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGARO, T. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 13, 1998.

KOLLER, F. L.; GEEVARGHESE, S. K.; GORDEN, D. L. Liver Transplantation for hepatocellular Carcinoma: Current Role and Future Opportunities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 32, p. 3265-3273, 2007.

LACZA, Z.; PANKOTAI, E.; CSORDÁS, A.; GEROÖ, D.; KISS, L.; HORVÁTH, E. M.; KOLLAI, M. BUSIJA, D. W.; SZABÓ, C. Mitochondrial NO and reatives nitrogen species production: Does mtNOS exist? *Nitric Oxide*, v. 14, p. 162-168, 2006.

LANFRANCONE, L.; PELICCI, G.; PELICCI, P. G. Cancer Genetics. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 4, p.109-119, 1994.

LARSON, K.; ANUMOLU, P. L.; CHEN, T. M. Hematoxylin and Eosin Tissue Stain in Mohs Micrographic Surgery: A Review. **Dermatol Surg**, v. 37, p.1089–1099, 2011.

LE MELLAY, V.; HOUBEN, R.; TROPPEMAIR, J.; HAGEMANN, C.; MAZUREK, S.; FREY, U.; BEIGEL, J. U.; WEBER, C.; BENZ, R.; EIGENBRODT, E.; RAPP, U. R. Regulation of glycolysis by Raf protein serine/threonine kinases. **Advances Enzyme Regulation**, n. 42, p. 317–332, 2002.

LLOVET, J. M. *et al.* Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 378-90, 2008.

LÓPEZ-RÍOS, F., SÁNCHEZ-ARAGO, M.; GARCÍA-GARCÍA, E., ORTEGA, A. D.; BERRENDERO, J. R.; POZO-RODRÍGUEZ, F.; LÓPEZ-ENCUENTRA, A.; ALLESTÍN, C.; CUEZVA, J. M. Loss of the Mitochondrial Bioenergetic Capacity Underlies the Glucose Avidity of Carcinomas. **Cancer Research**; v. 67, n. 19, p. 9013-9017, 2007.

MALLUR, S. G. *et al.* Synthesis and evaluation of phenyl substituted sydnone as potential DPPH-radical scavengers. **Indian Journal of Chemistry**, v. 46B, p. 1686-1689, 2007.

MATOBA, S.; KANG, J.-G.; PATINO, W. D.; WRAGG, A.; BOEHM, M.; GAVRILOVA, O.; HURLEY, P. J.; BUNZ, F.; HWANG, P. M. p53 Regulates Mitochondrial Respiration. **Science**, v. 312, 2006.

MCCLUNE, A. C., TONG M. J. Chronic Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma. **Clinic in Liver Disease.**, v. 14, p.461–476, 2010.

MCKILLOP, I. H.; MORAN, D. M.; JIN, X.; KONIARIS, L. G. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Surgical Research**, v. 136, p. 125–135, 2006.

MONTEIRO, J. P.; MARTINS, A. F.; LÚCIO, M.; REIS, S.; GERALDES, C. F.; OLIVEIRA, P. J.; JURADO, A. S. Interaction of carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) with lipid membrane systems: a biophysical approach with relevance to mitochondrial uncoupling. **J Bioenerg Biomembr**, v. 43, n. 3, p. 287-98, 2011.

MORENO-SANCHEZ, R.; RODRIGUES-ENRIQUEZ, S.; MARIN-HERNANDEZ, A.; SAAVEDRA, A. Energy metabolism in tumor cells. The **EBS Journal**, v. 274, p. 1393–1418, 2007.

MORO, M. A.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, P.; LEZA, J.C.; LORENZO, P.; LIZASOAIN, I. Neuronal death induced by SIN-1 in the presence of superoxide dismutase: protection by cyclic GMP. **Neuropharmacology**, v.37, p. 1071–1079, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

MOUSTAFA, M. A.; GINEINAH, M. M.; NASR, M. N.; BAYOUMI, W. A. H. Synthesis and biological testing of novel analogues of sydnone as potential antibacterial agents. **Arch. Pharm**, v. 337, n. 3, p. 164-170, 2004.

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis.**, v. 6, p. 399-403, 1991.

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**, Kidlington, v.38, n.20, p. 2965-3011, 1982.

OLLIS, W. D.; RAMSDEN, C. A. Meso-ionic compounds. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v.19, n. 1, p. 1-121, 1976.

ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.; ZHIVOTOVSKY, B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology, **Toxicol. Sci.**, v. 119, p. 3-19, 2011.

PAGLIARA, P.; CARLÀ, E. C.; CAFORIO, S.; CHIONNA, A.; MASSA, S.; ABBRO, L.; DINI, L. Kupffer cells promote lead nitrate-induced hepatocyte apoptosis via oxidative stress. **Comparative Hepatology**, p.1-13, 2003.

PANDEY, V. K.; TRIVEDI, N.; MUKESH. Synthesis and antiviral activity of quinazolinyl sydnones. **Indian Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 339-400, 2006.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion test for viability. In _____. **Tissue culture: methods and applications**. New York: Academic Press, p. 406-408, 1973.

PIRES, A. do R. A. Derivados 1,3,4-Tiadiazóis Mesoiônicos: Disfunção mitocondrial e toxicidade em células HepG2. Trabalho de Tese de doutorado em Ciências-Bioquímica- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

POZHARSKÜ, A. F.; SOLDATENKOV, A. T.; KATRITZKY, A. R. In _____ **Heterocycles in life and society**. Chichester: John Wiley e Sons, 1997, p. 301.

PUVIANI, A. C.; OTTOLENGHI, C.; TASSINARI, B.; PAZZI, P.; MORSIANI, E. An update on high-yield hepatocyte isolation methods and on the potential clinical use of isolated liver cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 99-109, 1999.

RAMOS, M. G. S. ESTUDO DA HEPATOTOXICIDADE DE UM MEDICAMENTO EM HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1999.

RAPHAEL, S.S., **Lynch: Técnicas de laboratório**, 4º ed., Manole, p. 988-994, 1986.

REILLY, T. P.; BELLEVEUE, F. H.; WORSTER, P. M.; SVESSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology** v. 55, p. 803-808, 1998.

RODRÍGUEZ-ANTONA, C.; DONATO, M. T.; BOOBIS, A.; EDWARDS, R. J.; WATTS, P.S.; VICENTE CASTELL, J.; GÓMEZ-LECHÓN, M.-J. Cytochrome P450 expression in

human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica*, v. 32, n. 6, p. 505-520, 2002.

ROSSI, L.; ZORATTO, F.; PAPA, A.; IODICE, F.; MINOZZI, M.; FRATI, L.; TOMAO, S. Current approach in the treatment of hepatocellular Carcinoma. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 2, n.9, p. 348-359, 2010.

SCANDURRA, F. M.; GNAIGER, E. Cell respiration under hypoxia: Facts and artefacts in mitochondrial oxygen kinetics. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 2009.

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

SEGLIN, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biology*, v. 13, p. 29-83, 1976.

SEMENZA, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. **Genetics & Development**, v. 20, p. 51–56, 2010.

SHIRYAEVA, A.; BAIDYUK, E.; ARKADIEVA, A.; OKOVITYY, S.; MOROZOV, V.; SAKUTA, G. Hepatocyte mitochondrion electron-transport chain alterations in CCl₄ and alcohol induced hepatitis in rats and their correction with simvastatin. *J Bioenerg Biomembr*, v. 40, p. 27–34, 2008.

SHIVA, S.; BROOKES, P. S.; PATEL, R. P.; ANDERSON, P.G.; DARLEY-USMAR, V. M. Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *PNAS*, v. 98, n. 13, 2001.

SOLAINI, G.; SGARBI, G.; BARACCA, A. Oxidative phosphorylation in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2010.

STUBBS, M; GRIFFITHS, J. R. The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 50, p. 44–55, 2010.

STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J Exp Med**, v. 169, p. 1543-55, 1989.

TENNANT, D. A.; DURÁN, R. V.; GOTTLIEB, E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature*, v.10, p. 267-277, 2010.

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

TÖRÖK, E.; Marc LUTGEHETMANN, M.; BIERWOLF, J.; MELBECK, S.; DÜLLMANN, J.; NASHAN, B.; POLLOK, J. M. Primary Human Hepatocytes on Biodegradable Poly(L-Lactic acid) Matrices: A Promising Model for Improving Transplantation Efficiency With Tissue Engineering. **Liver Transplantation**, v. 17, p. 104-114, 2011.

TSIM, N. C.; FRAMPTON, A. E.; HABIB, N. A.; JIAO, L. R. Surgical treatment for liver cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 8, p. 927-933, 2010.

TSUJI, K.; YASUI, K.; GEN, Y.; ENDO, M.; DOHI O.; ZEN, K.; MITSUYOSHI, H.; MINAMI, M.; ITOH, Y.; TANIWAKI, M.; TANAKA, S.; ARII, S.; OKANOUE, T.; YOSHIKAWA, T. PEG10 is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 198, p. 118-125, 2010.

VENKATARAMANA, S.; DIRKS, R. M.; UEDA, C. T.; PIERCE, N. A. Selective cell death mediated by small conditional RNAs. **PNAS**, v. 107, n. 39, p. 16777–16782, 2010.

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

WANG, W.; FENG, X.; ZHANG, T.; JIN, J.; WANG, S.; LIU, Y.; SONG, Y.; LIU, X.; YU, Z.; LI, Y. Prospective evaluation of microscopic extension using whole-mount preparation in patients with hepatocellular carcinoma: Definition of clinical target volume for radiotherapy. **Radiation Oncology** , v. 5, p. 73-79, 2010.

WELJIE, A. M.; JIRIK, F. R. Hypoxia-induced metabolics hifts in cancer cells: Moving beyond the Warburg effect. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2010.

WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A. Comparison of Primary Human Hepatocytes and Hepatoma Cell Line HepG2 with Regard to their Biotransformation Properties. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 8, p. 1035-1042, 2003.

WON, K. Y.; LIM, S-J.; KIM, G. Y.; KIM, Y. W.; HAN, S-A.; SONG, J. Y.; LEE, D-K. Regulatory role of p53 in cancer metabolism via SCO2 and TIGAR in human breast cancer. **Human Pathology**, v. 43, p. 221–228, 2012.

ZIEGLER, U; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News physiol. Sci.**, v. 19, p. 124-128, 2004.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 548

CERTIFICADO

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

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA); and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.085654/2011-98

APROVADO: 09/08/2011 – R.O. 07/2011

TÍTULO: Envolvimento da via mitocondrial na atividade antitumoral de derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos e sidnonas e sua seletividade celular

AUTORES: Sivia Maria Suter Correia Cadena, Guilhermina Rodrigues Noleto, Amanda do Rocio Andrade Pires, Alexandra Acco, Maria Eliane Meriin Rocha, Anna Paula Brandt, Lyvia Petz

DEPARTAMENTO: Bioquímica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEUA