

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELA APARECIDA PEREIRA

A TOXICIDADE DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D  
EM CÉLULAS HEPG2 ESTÁ RELACIONADA AOS SEUS EFEITOS SOBRE A  
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

CURITIBA

2018

RAFAELA APARECIDA PEREIRA

A TOXICIDADE DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D  
EM CÉLULAS HEPG2 ESTÁ RELACIONADA AOS SEUS EFEITOS SOBRE A  
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Bioquímica, no programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena  
Co-orientadora: Dra. Amanda do Rocio Andrade Pires

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Pereira, Rafaela Aparecida

A toxicidade dos derivados 1,3,4 -tiadiazóis mesoiônicos MI-J e MI-D em células HepG2 está relacionada aos seus efeitos sobre a bioenergética mitocondrial. / Rafaela Aparecida Pereira. – Curitiba, 2018.  
85 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Sílvia Maria Suter Correia Cadena

Co-orientadora: Amanda do Rocio Andrade Pires

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Bioenergética. 2. Fígado - Cancer. 3. Tiadiazóis. Título. II. Cadena, Sílvia Maria Suter Correia. III. Pires, Amanda do Rocio Andrade. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.19121



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA)

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **RAFAELA APARECIDA PEREIRA** intitulada: **A toxicidade dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos MI-J e MI-D em células HepG2 está relacionada aos seus efeitos sobre a bioenergética mitocondrial**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Março de 2018.

  
SILVIA MARIA SUTER-CORREIA CADENA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
FRANCISCO FILIPAK NETO

Avaliador Externo (UFPR)

  
GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Avaliador Interno (UFPR)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais,  
por todo o amor, incentivo e dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu alicerce na jornada, concedendo toda a força para superar as dificuldades e alcançar os objetivos.

Aos meus amados pais Antonio e Felomena, pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas. Vocês são essenciais em minha vida.

Aos meus irmãos Anderson e Fábio e as minhas cunhadas Zilda e Priscila, por incentivarem e compartilharem todas as minhas conquistas com entusiasmo.

À minha sobrinha Andressa, por todo o carinho, companheirismo e pela compreensão nos períodos de ausência.

Agradeço aos meus queridos amigos: Alyni, Angela, Camila, Claudinei, Eliani, Ethyellen, Gustavo, Jéssica, Maiza, Maysa, Michele e Sabrina, por todo o carinho e amizade. E aos demais membros do movimento Jornada Jovem Campo Largo muito obrigada pela solidariedade e apoio em momentos importantes de minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dr.<sup>a</sup> Silvia M. S. C. Cadena, inicialmente por me aceitar como aluna. Obrigada pela dedicação, carinho, paciência e compreensão em todos os momentos. Serei sempre grata pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de conhecer uma pessoa tão maravilhosa, exemplo de profissional.

À minha co-orientadora Dr.<sup>a</sup> Amanda do Rocio Andrade Pires pela dedicação, amizade e paciência, e por prontamente me ajudar sempre que precisei. Muito obrigada por todos os ensinamentos no laboratório e auxílio na realização dos experimentos. Eu realmente aprendi muito com você.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Guilhermina Rodrigues Noletto, pelas contribuições na correção do projeto e relatório e na banca de defesa.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Francisco Filipak Neto pelas considerações e apontamentos pertinentes na banca de defesa.

Às demais professoras do laboratório de oxidações biológicas e cultivo celular: Gláucia, Maria Eliane e Sheila por estarem sempre dispostas a ajudar.

A todos os colegas e amigos do laboratório de oxidações biológicas, pela amizade e disponibilidade em todos os momentos. Em especial aos colegas do laboratório 1: Ana, Juan, Elaine, Stephane, Juliana, Marília e Diego, pelos momentos de alegria e descontração, que tornaram a convivência do dia-a-dia muito agradável.

Aos colegas de mestrado Aline, Ana Paula, Bianca e Leonardo por serem tão prestativos no auxílio das atividades e experimentos.

Às técnicas de laboratório Mônica, Elizabete e Jainy por todo o suporte técnico, além das boas conversas e risadas.

À Dr<sup>a</sup>. Andreia Akemi Suzukawa do Instituto Carlos Chagas (Fio Cruz – Paraná) por pela ajuda na utilização do equipamento de luminescência para realizar os experimentos de ATP.

À Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Áurea Echevarria pela gentil doação dos compostos mesoiônicos.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Morais Leme pela gentil doação das células HepG2.

A todos meus colegas da turma de mestrado.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

À Universidade Federal do Paraná, À Coordenação do Curso de Pós-Graduação e aos professores do departamento de Bioquímica da UFPR.

À CAPES pelo apoio financeiro.

*“O insucesso é apenas uma oportunidade para  
recomeçar de novo com mais inteligência.”*

Henry Ford

## RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é considerado um dos mais incidentes e representa a segunda causa de morte por câncer no mundo. Uma vez que poucas terapias são eficazes para esse tipo de câncer, é essencial a busca por novas opções de tratamento. Neste contexto, os derivados mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis são promissores por apresentarem atividade citotóxica e antitumoral contra diferentes linhagens de células tumorais. Neste estudo foram avaliados os efeitos dos derivados 1,3,4-tiadiazóis MI-J e MI-D em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), cultivadas em dois meios de cultura, um com alta concentração de glicose (MEIO AG), para direcionar o metabolismo para a via glicolítica e, outro sem glicose e com glutamina e galactose (MEIO GAL), para favorecer a fosforilação oxidativa. Em meio AG, no tempo de 24h, pelo método do MTT a viabilidade foi reduzida em ~23% por ambos derivados na concentração de 25  $\mu$ M. Pelo método do cristal violeta nessas mesmas condições, a redução foi mais pronunciada (~47%) aumentando a redução nos outros tempos avaliados (48h e 72h). Na maior concentração (50  $\mu$ M), a redução foi de ~90% para ambos compostos nos dois métodos. Essa citotoxicidade, na concentração de 50  $\mu$ M, foi confirmada pelo aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), no meio de cultura, em ~90% após 24h de incubação. Em meio GAL, neste mesmo tempo de incubação, observou-se uma redução na viabilidade pelo método do MTT de ~57% para o MI-J e de ~20% para o MI-D, na menor concentração (5  $\mu$ M), chegando a ~67% de redução para ambos os compostos na concentração de 50  $\mu$ M. Pelo método do cristal violeta, na concentração de 5  $\mu$ M, a citotoxicidade foi de ~19%, aumentando para ~49% na concentração intermediária (25  $\mu$ M), com perfil semelhante para ambos os compostos em 24h. A enzima LDH apresentou maior atividade no tempo de 72h, com ~41% de aumento para o MI-J e ~36% para o MI-D, na concentração de 50  $\mu$ M. Ensaios de respiração celular evidenciaram que o fluxo de oxigênio nas células HepG2 foi alterado com o aumento da concentração dos derivados, sendo estes efeitos mais pronunciados no meio GAL. Foi observada a diminuição nos níveis de ATP (~38%) na concentração de 25  $\mu$ M do MI-J em meio GAL, enquanto que, em meio AG a redução observada para esse composto foi menos pronunciada (~27%). Nessa mesma concentração, o MI-D reduziu os níveis de ATP apenas em meio GAL (~15%). Em meio AG, ambos os compostos promoveram um aumento de ~32% nos níveis de lactato na concentração de 25  $\mu$ M. Nessa concentração em meio GAL, os níveis de lactato aumentaram cerca de ~46% com o MI-J e ~35% com o MI-D. No mesmo meio, os níveis de piruvato diminuíram em ~15% após a exposição ao MI-J e ~9% com o MI-D. Em conjunto, estes resultados confirmam a toxicidade dos derivados MI-J e MI-D para as células HepG2. Também sugerem que o comprometimento de funções mitocondriais está relacionado à toxicidade dos derivados nestas células, uma vez que foram mais pronunciados em meio contendo galactose e glutamina.

Palavras-chave: Células HepG2. Bioenergética mitocondrial. Adaptação metabólica. Derivados 1,3,4- Tiadiazóis Meso-iônicos.

## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is considered the most prevalent liver cancer and represents the second cause of cancer death worldwide. Since few therapies are effective for this type of cancer, the research for new treatments is essential. In this context, mesoionic derivatives from 1,3,4-thiadiazolium class are promising due to their cytotoxic and antitumor activities against different tumor cells. This study evaluated the effects of 1,3,4-thiadiazoles derivatives MI-J and MI-D on human hepatocarcinoma cells (HepG2). Two culture media were used, the first one containing glucose at high concentration (AG medium), with the aim of directing the metabolism to glycolic pathway and the other not containing glucose and supplemented with glutamine and galactose (GAL medium), to favoring the oxidative phosphorylation. In AG medium, MTT method showed a reduction of ~ 23%, for both derivatives, MI-J and MI-D (25 $\mu$ M). At the same conditions, crystal violet method also evidenced a reduction in the cells viability; however, it was more pronounced (at ~ 47%, 48h and 72h of incubation). At the highest concentration (50  $\mu$ M), the derivatives reduced the viability around 90%, as showed by MTT and crystal violet methods. This cytotoxicity was confirmed by the increased activity of Lactate Dehydrogenase (LDH) for both culture media (~ 90%, 24h of incubation). In the GAL medium, the viability was reduced at ~ 57% and ~ 20%, for MI-J and MI-D (5  $\mu$ M), respectively, as observed by MTT method, after 24h of incubation. This reduction reached to ~ 67% for both compounds at the concentration of 50  $\mu$ M. When the method was crystal violet staining, the cytotoxicity of both derivatives was similar (~19%) at the lowest concentration (5  $\mu$ M), increasing to ~ 49% at the intermediate concentration (25  $\mu$ M). The LDH activity was increased after 72 h of incubation with the derivatives, by around 41% and 36%, for MI-J and MI-D (50  $\mu$ M), respectively. The assays of cellular respiration in AG medium showed that the derivatives promoted a decrease in oxygen flux of HepG2 cells, in a concentration dependent way. The cellular respiration was changed by both derivatives in a concentration dependent way, being this effect more pronounced in GAL medium. ATP levels decreased (~38%) in response to incubation with MI-J (25  $\mu$ M) after 24h of incubation in the GAL medium. In AG medium, this reduction was less pronounced (~27%). MI-D (25  $\mu$ M) reduced the ATP levels only in GAL medium (~15%). In AG medium, both derivatives (25  $\mu$ M) promoted an increase of ~ 32% in lactate levels, while in GAL medium the metabolite was increased about ~ 46% and 35% for MI-J and MI-D, respectively. In the same medium, pyruvate levels decreased at ~ 15% and 9% after 24h of exposure to MI-J and MI-D, respectively. Taken together, these results reinforce the toxicity of MI-J and MI-D on HepG2. The results also suggest that the impairment of mitochondrial functions is related to the toxicity of the derivatives in HepG2 cells, since their effects were more pronounced when these cells were cultured in medium supplemented with galactose and glutamine in the absence of glucose.

Key words: HepG2 cells. Mitochondrial bioenergetics. Metabolic adaptation. 1,3,4-thiadiazolium Mesoionic Derivatives.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DO CHC E ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO.....	22
FIGURA 2 – ESTRUTURA MOLECULAR DO REGORAFENIBE E SORAFENIBE.....	24
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO.....	25
FIGURA 4 – ESTRUTURAS REPRESENTATIVAS DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS COM DESTACADA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	26
FIGURA 5 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE DERIVADOS 1,3,4 TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS.....	28
FIGURA 6 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DO METABOLISMO NA CÉLULA TUMORAL.....	34
FIGURA 7 – EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 – MÉTODO DO MTT.....	49
FIGURA 8 – EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 – ATIVIDADE DA LDH.....	52
FIGURA 9 – EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 – MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA.....	55
FIGURA 10 – TRAÇADO DEMONSTRATIVO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO CELULAR EM OXÍGRAFO OROBOROS-2K.....	62
FIGURA 11 – EFEITOS DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-D E MI-J SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS HEPG2.....	63
FIGURA 12 – EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D SOBRE OS NÍVEIS DE LACTATO E PIRUVATO EM CÉLULAS HEPG2.....	68

FIGURA 13 –	EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D SOBRE	
	OS NÍVEIS DE ATP EM CÉLULAS	
	HEPG2.....	70

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2.....	59
TABELA 2 – EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 – COLORAÇÃO DO AZUL DE TRIPAN.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DOG	–	2-deoxiglicose
AAPH	–	2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloroto
ABCG2	–	ATP-binding Cassette Sub-family G Member 2
AFP	–	Alfafetoproteína
COX-2	–	Ciclooxigenase 2
CHC	–	Carcinoma Hepatocelular
DMEM	–	Meio Essencial Mínimo de Dulbecco
DMPC	–	Dimiristoil-fosfatidilcolina
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DPH	–	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPH-PA	–	3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenil-ácido propiônico
EDTA	–	Ácido Etileno Diamino Tetracético
FCCP	–	Carbonil Cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona
FDA	–	Food Drug and Administration
GLS	–	Glutaminase
HBSS	–	Solução Salina Balanceada de Hanks
HEPES	–	N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
IARC	–	International Agency for Research on Cancer
INCA	–	Instituto Nacional do Câncer
IPE	–	Injeção Percutânea de Etanol
LDH	–	Lactato Desidrogenase
MI-D	–	cloreto de 4-fenil-5-[4-nitro-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina
MI-J	–	cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxi-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina
MTT	–	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
MRP1	–	Proteína1 associada à resistência a múltiplas drogas
m-THPC	–	meso-Tetra(3-hidroxifenil)-cloreto
OMS	–	Organização Mundial da Saúde
PBS	–	Phosphate Buffered Saline
PDH	–	Piruvato Desidrogenase

PEI	–	Percutaneous Ethanol Injection
PGE2	–	Prostaglandina E2
PgP	–	Glicoproteína P
RF	–	Radiofrequência
RMN de <sup>13</sup> C	–	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	–	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
SLC	–	Solute Carrier
TPPS <sub>4</sub>	–	meso-tetra(4-sulfonatofenil)-porfina
TRIS	–	Tris (hidroximetil) amino metano

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
3.1	CARCINOMA HEPATOCELULAR .....	20
3.2	COMPOSTOS MESOIÔNICOS .....	25
3.2.1	Atividades biológicas dos compostos 1,3,4 - tiadiazóis mesoiônicos .....	26
3.3	METABOLISMO DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	31
<b>4</b>	<b>ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
5.1	REAGENTES .....	36
5.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS .....	36
5.3	CÉLULAS HepG2.....	36
5.3.1	Soluções.....	37
5.3.1.1	Solução Fosfato Salina Tamponada (PBS).....	37
5.3.1.2	Solução Dispersante de Células – Tripsina/EDTA .....	37
5.3.1.3	Solução salina balanceada de Hanks (HBSS) .....	38
5.3.2	Meios de cultura para células HepG2.....	38
5.3.2.1	DMEM AG .....	38
5.3.2.2	DMEM GAL .....	38
5.3.3	Cultivo das células HepG2 .....	39
5.4	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	40
5.4.1	Determinação da viabilidade celular.....	40
5.4.1.1	Redução do MTT.....	40
5.4.1.2	Atividade da enzima lactato desidrogenase no meio de cultura .....	40
5.4.1.3	Coloração com Cristal Violeta .....	41
5.4.1.4	Coloração com Azul de Tripán .....	42

5.4.2	Respiração Celular.....	42
5.4.3	Determinação dos níveis de Lactato e Piruvato .....	43
5.4.4	Determinação dos Níveis de ATP .....	44
5.4.5	Determinação da concentração de proteínas.....	44
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
6.1	VIABILIDADE CELULAR.....	46
6.2	RESPIRAÇÃO CELULAR .....	59
6.3	NÍVEIS DE LACTATO E PIRUVATO.....	66
6.4	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP .....	69
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO FINAL.....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO - LICENÇA DE USO DE MATERIAL PUBLICADO COM DIREITOS AUTORAIS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O termo câncer refere-se a um amplo grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo e caracteriza-se pela rápida multiplicação das células anormais, que podem invadir outros órgãos e tecidos (OMS, 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer e cerca de 8,8 milhões morrem vítimas da doença por ano. Esses índices elevados de mortalidade podem estar relacionados ao diagnóstico tardio e a dificuldade de tratamento (OMS, 2017).

Dentre os tipos mais comuns de câncer, o carcinoma hepatocelular ou câncer de fígado é o sexto mais diagnosticado e a segunda causa de mortalidade por câncer no mundo. Esse tipo de câncer tem maior incidência no sexo masculino e aumenta com a idade, sendo relacionado a fatores de risco como exposição aos vírus da Hepatite B e C, consumo de álcool, dentre outros (DIMITROULIS et al., 2017; TANG et al., 2017).

O tratamento para o carcinoma hepatocelular é considerado um desafio, pois a escolha da terapêutica depende das condições clínicas do paciente e do estágio do tumor. A opção mais indicada para os estágios avançados é a terapia sistêmica, porém atualmente existem poucas opções farmacológicas disponíveis para realizar o tratamento (DIMITROULIS et al., 2017). Assim, é importante o desenvolvimento de estudos sobre novas drogas para a terapêutica desta patologia.

As células tumorais utilizam a glicose como principal fonte de energia através da glicólise anaeróbica. No entanto, quando os níveis de glicose estão diminuídos as células passam a depender do metabolismo oxidativo de outros substratos para a produção de ATP. Esta mudança é evidenciada em células cultivadas em meio desprovido de glicose e com glutamina e galactose, devido ao aumento da fosforilação oxidativa, induzida pelo metabolismo desses substratos (WEBER et al., 2002; DOMENIS et al., 2012). Além disso, quando testados os efeitos de compostos que afetam a bioenergética mitocondrial, as células cultivadas em um meio onde a glicose é substituída por galactose e glutamina apresentam redução mais significativa da viabilidade, devido ao comprometimento da fosforilação oxidativa (MARROQUIN et al., 2007).

Neste contexto, considerando a importante atividade antitumoral já descrita para os derivados mesoiônicos da classe 1,3,4 – tiadiazóis, inclusive contra as

células de carcinoma hepatocelular (GOZZI et al., 2015) e, conhecendo seus efeitos sobre a bioenergética, relacionados a inibição da cadeia transportadora de elétrons e alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial interna (CADENA et al., 1998; CADENA et al., 2002; PIRES et al., 2010), esse estudo avaliou os efeitos de dois derivados (MI-J e MI-D) desta classe de compostos sobre alguns parâmetros metabólicos em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). Utilizou-se a estratégia de reprogramação metabólica para avaliar se os efeitos dos derivados na biogenética mitocondrial estão relacionados à sua toxicidade nas células HepG2. Nesta estratégia experimental, como mencionado, é possível direcionar o metabolismo celular através da utilização de dois meios de cultivo: um meio contendo alta concentração de glucose - que favorece a glicólise - e outro sem glucose e suplementado com galactose e glutamina – que favorece a fosforilação oxidativa (DOMENIS et al., 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os compostos 1,3,4- tiadiazóis mesoiônicos, MI-D, MI-J, MI-4F e MI-2,4diF são tóxicos para células HepG2, efeito possivelmente relacionado ao comprometimento da fosforilação oxidativa. Para avaliar esse efeito, experimentalmente é possível direcionar o metabolismo tumoral para a via glicolítica (preferencial nas células HepG2) ou glutaminolítica, sendo essa responsável por gerar equivalentes redutores para a cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa.

Em adição, Gozzi e colaboradores (2015) demonstraram que esses derivados mesoiônicos reduzem a viabilidade e induzem a apoptose em células de hepatocarcinoma humano, enquanto que em hepatócitos os compostos não exerceram efeito em concentração intermediária (25 $\mu$ M).

Assim, com o objetivo de determinar qual o significado do comprometimento da fosforilação oxidativa nos efeitos citotóxicos destes derivados em células HepG2, neste estudo estas células foram cultivadas em dois meios de cultura: um rico em glucose (meio AG), o outro sem glucose e com maior concentração de glutamina e galactose (meio GAL) para direcionar o metabolismo para a via glicolítica e fosforilação oxidativa, respectivamente.

Foram avaliados os efeitos dos compostos MI-D e MI-J em células HepG2 sobre a viabilidade, respiração, níveis de piruvato, lactato e ATP.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR

Dentre os vários tipos de câncer, o hepático é um dos mais comuns. O câncer de fígado é o sexto mais diagnosticado e a segunda causa de mortalidade por câncer no mundo, sendo mais comum em países com altos índices de infecção pelos vírus da Hepatite B e C e predominante após os 50 anos de idade (IARC, 2014; TANG et al., 2017). Os tumores malignos de fígado podem ser divididos em dois tipos: câncer primário, que tem sua origem no próprio órgão e, secundário ou metastático originado em outro órgão e que atinge também o fígado. Dentre os tumores originados no fígado, o mais frequente é o hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular (CHC), perfazendo 80% dos casos e caracterizado por ser altamente agressivo (INCA, 2018). Além da infecção pelos vírus da hepatite B e C, o desenvolvimento desta doença está associado a outros fatores de risco, como cirrose, tabagismo, alcoolismo e consumo de alimentos contaminados com aflotoxinas (LAFARO et al., 2015).

A patogênese do CHC envolve danos inflamatórios e necrose hepática associada à deposição fibrótica. Quando a cirrose está instalada, o risco de desenvolvimento do hepatocarcinoma aumenta em associação ao comprometimento progressivo da função hepática. O carcinoma é resultado do acúmulo de alterações genômicas e modificações epigenéticas (FORNER; REIG e BRUIX, 2018).

Atualmente, o diagnóstico precoce do CHC é viável em 30-60% dos casos, o que permite a aplicação de tratamentos considerados curativos como o transplante, ressecção cirúrgica e ablação. O desafio no diagnóstico é a detecção de nódulos pequenos que são difíceis de caracterizar por exames de imagem ou exame patológico e que podem apresentar, muitas vezes, um fenótipo maligno. Além do diagnóstico por imagem e biópsia, também podem ser utilizados marcadores sorológicos para o CHC, entre estes o mais comum é a alfafetoproteína (AFP) (EASL, 2015; LOU et al., 2017).

Estabelecer um tratamento para o CHC é um desafio, pois, a escolha terapêutica depende do estágio da doença, condições clínicas e físicas do paciente e recursos disponíveis. Para o tratamento e prognóstico é preciso levar em

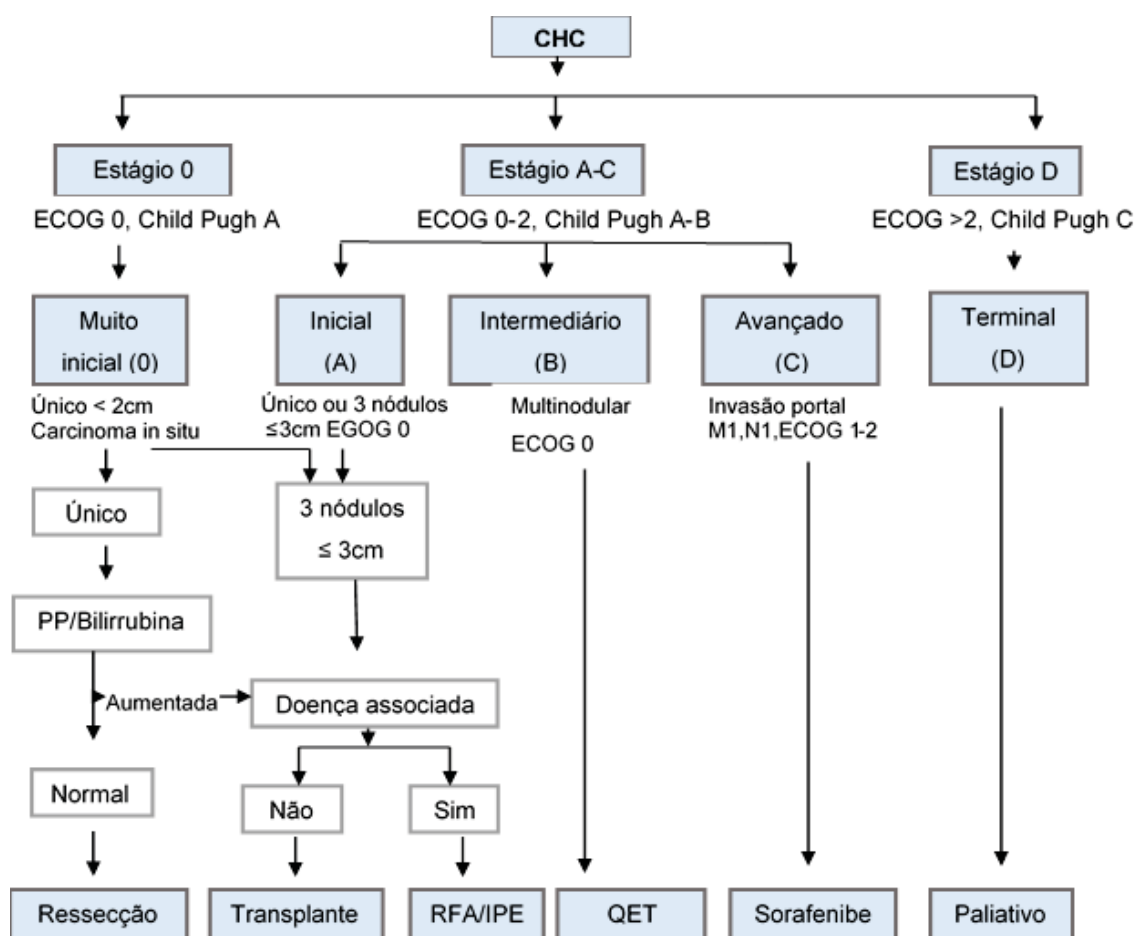
consideração o grau de evolução clínica do CHC, utilizando por base a classificação de Barcelona (FIGURA 1) (EASL, 2015). Para tumores menores ou iguais a 3 cm de diâmetro as opções mais indicadas são a ressecção cirúrgica, transplante de fígado e ablação (BENJAMIN et al., 2017).

Após a ressecção cirúrgica registra-se uma taxa de sobrevida de 60% após cinco anos da cirurgia e uma taxa de recorrência de 70%. Além disso, deve-se levar em consideração características como: tamanho do tumor, invasão vascular, não encapsulamento do tumor e presença de metástases, que também influenciam na recuperação pós-cirúrgica (BENJAMIN et al., 2017; DIMITROULIS et al., 2017; LEE et al., 2015). A ressecção hepática é considerada como o tratamento padrão de escolha para CHC em estágio inicial com função hepática preservada, embora o diagnóstico nessa fase seja difícil (NG et al., 2017).

O transplante de fígado é indicado para pacientes que possuem tumores isolados menores que 5 cm ou nódulos menores ou iguais a 3 cm, onde a cirurgia trata o tumor e diminui o risco de futuras recidivas. O transplante é um procedimento caro e requer imunossupressão por longo prazo, porém apresenta uma taxa de sobrevida de 80% após cinco anos de cirurgia, considerada maior quando comparada a ressecção cirúrgica (EASL, 2015; BENJAMIN et al., 2017).

A ablação consiste na injeção de substâncias no tumor (como exemplos, o etanol e o ácido acético), ou na mudança de temperatura (por radiofrequência, micro-ondas ou crioterapia a laser) (SASTRE et al., 2015). A mais utilizada é a ablação por radiofrequência (RF), um tratamento térmico projetado para destruição localizada do tumor pelo aquecimento do tecido tumoral a temperaturas superiores a 50° C, ocorrendo desnaturação de proteínas intracelulares e fusão das bicamadas lipídicas, resultando em morte celular (CURLEY et al., 2010). A ablação por RF é mais eficaz do que as injeções percutâneas de etanol (IPE) em tumores de 3 cm devido à melhoria da prevenção de recorrência tumoral na periferia do nódulo (CURLEY et al., 2000; EASL, 2012). A ablação por RF apresenta vantagens quando comparada ao tratamento cirúrgico pelos baixos índices de morbidade e mortalidade, preservação da função hepática, menor perda de sangue e supressão imune (NG et al., 2017).

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DO CHC E ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO



FONTE: Adaptado de (EASL-EORTC, 2012).

NOTA: A classificação do CHC proposta pela Clínica de Câncer Hepático de Barcelona divide os pacientes em 5 estágios (0, A, B, C e D), considerando variáveis do tumor (sistema TNM), função do fígado (escala Child-Pugh) e estado de saúde do paciente (ECGO). **Child-Pugh**: sistema utilizado para mensurar a função hepática, considerando a presença de encefalopatia, ascite, níveis de albumina e bilirrubina e tempo de atividade da protrombina, onde são pontuados cada critério de 1 a 3; **SISTEMA TNM (M1 e N1)** O sistema TNM é o mais utilizado no estadiamento de câncer. Indica o tamanho (T), presença de metástase nos linfonodos (N) e metástases (M); **ECGO** é uma escala de desempenho desenvolvida pelo Grupo Oriental de Oncologia Cooperativa, pontuando de 0 (totalmente ativo, desempenhando funções sem restrições) a 5 (morte); RFA: ablação por radiofrequência; IPE: injeção percutânea de etanol; QET: quimio-embolização transarterial; PP: pressão portal.

Outra técnica empregada é a quimioembolização arterial, que retarda a progressão do tumor e melhora sobrevivência em portadores de tumores de estágio intermediário. Essa opção terapêutica baseia-se na combinação de um quimioterápico injetado na artéria hepática seguida ou não de oclusão do fluxo arterial hepático por embolização, reduzindo o fluxo venoso no local do tumor (PENG et al., 2013; IPPOLITO et al., 2016). Esta terapia é considerada eficiente nos estágios intermediários do CHC, mas não é recomendada em pacientes com

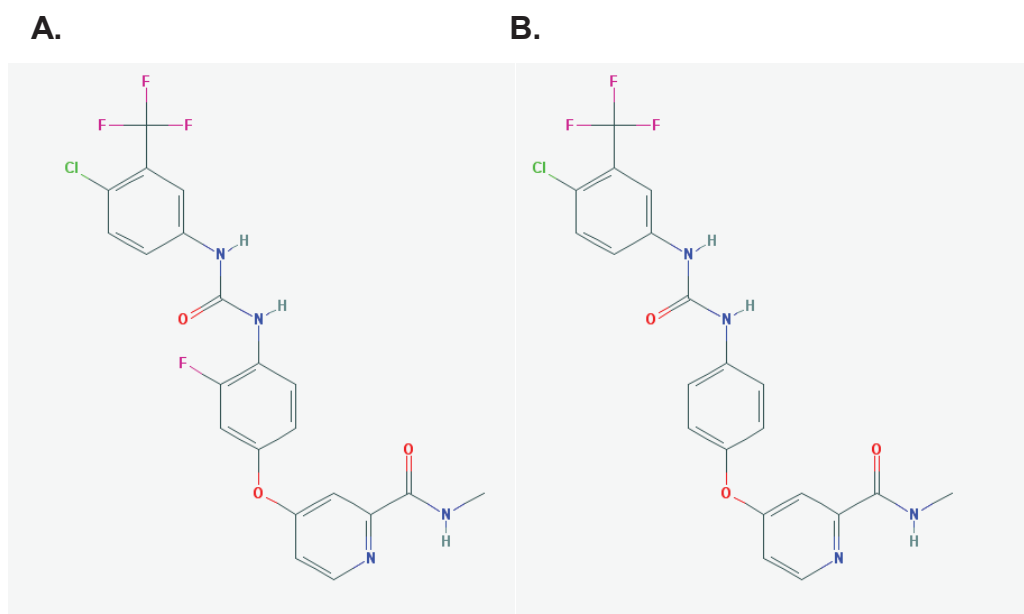
invasão vascular macroscópica por células tumorais, função hepática comprometida, trombose da veia porta e varizes esofagianas, pois pode gerar descompensação hepática após a isquemia induzida pelo procedimento (SASTRE et al., 2015; IPPOLITO, 2016)

A radioterapia é recomendada em pacientes que não tiveram sucesso no tratamento com outras opções e sem doenças extra-hepáticas, tumor limitado e função hepática preservada. Geralmente é utilizada em tumores pequenos que não podem ser tratados cirurgicamente ou por técnicas ablativas (SASTRE et al., 2015).

Em casos mais avançados da doença, com tumores grandes e invasão da veia porta, a terapia sistêmica é a opção mais indicada e, quando a função hepática está severamente comprometida, o tratamento indicado é paliativo (EASL 2015; SASTRE et al. 2015). O CHC é mais frequentemente diagnosticado em estágios tardios, o que dificulta as opções terapêuticas, uma vez que o comprometimento da função hepática torna o câncer resistente a maioria dos quimioterápicos, dificultando sua absorção e aumentando a sua toxicidade (DIMITROULIS et al., 2017). Atualmente existem dois fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de CHC, o sorafenibe e o regorafenibe (FDA, 2018). O sorafenibe, aprovado pela FDA em 2007, atua como inibidor multiquinase agindo contra o crescimento tumoral e angiogênese (GRAZIE et al., 2017). Apesar de ser recomendado em pacientes com estágio avançado, o melhor prognóstico ocorre quando a função hepática está preservada (OGAWA et al. 2017). Em estudo realizado para avaliar o tratamento com sorafenibe em 320 pacientes portadores de CHC, acompanhados por sete anos, demonstrou-se que 79% dos pacientes apresentaram efeitos colaterais como náuseas, diarreia, fadiga, erupções cutâneas e anorexia. Dentre estes pacientes, 31% necessitaram reduzir a dose e 32% tiveram o tratamento interrompido devido a gravidade dos efeitos colaterais (DOYLE et al., 2016). Além disso, alguns pacientes desenvolvem mecanismos de resistência ao sorafenibe, relacionados principalmente com as vias de sinalização (HE et al., 2015; CHEN et al., 2014). Estudos com o sorafenibe também promoveram a redução na expressão de genes dos transportadores multidrogas ABC, efeito que foi relacionado a capacidade do composto de inibir diferentes quinases celulares (HOFFMAN, 2010).

No ano de 2017 um novo fármaco foi aprovado para uso no tratamento contra CHC, o Regorafenibe. Sua estrutura difere do sorafenibe pela adição de um átomo de flúor no centro do anel fenil (FIGURA 2). Esse medicamento é recomendado para pacientes não responsivos ao tratamento com sorafenibe. O regorafenibe apresenta efeitos antiangiogênicos, antimetastáticos e de inibição do crescimento tumoral mais potentes (WILHELM et al., 2011; BRUIX et al., 2016). Em um ensaio randomizado com 573 pacientes anteriormente tratados com sorafenibe, a média de sobrevivência global para pacientes que tomaram Regorafenibe foi de 10,6 meses, em comparação com 7,8 meses para pacientes que tomaram um placebo. A taxa de redução tumoral parcial ou total para pacientes com Regorafenibe foi de 11%, em comparação com 4% para os pacientes do placebo. Os efeitos colaterais associados ao regorafenibe incluem dor abdominal, reação cutânea, fadiga, diarreia, diminuição do apetite, hipertensão arterial, febre, inflamação das mucosas (mucosite), perda de peso, erupções cutâneas, náuseas, dentre outros de maior gravidade, como sangramentos e hepatotoxicidade (BRUIX et al., 2016).

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO REGORAFENIBE E SORAFENIBE



FONTE: Adaptado de NCBI (2018).

NOTA: **A)** Estrutura química do Regorafenibe (Nome químico - 4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl) phenyl]carbamoylamino]-3-fluorophenoxy]-N-methylpyridine-2-carboxamide); **B)** Estrutura química do Sorafenibe (Nome químico - 4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoylamino]phenoxy]-N-methylpyridine-2-carboxamide).

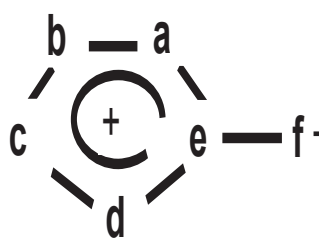
Devido à dificuldade no tratamento do CHC, é importante a pesquisa de novas drogas mais seletivas e específicas para as células tumorais, que causem menos efeitos colaterais indesejáveis aos pacientes. Neste contexto, destacam-se os compostos mesoiônicos, para os quais foram descritas importantes atividades biológicas (GRYNBERG; SANTOS; ECHEVARRIA, 1997; CADENA et al., 1998; DA SILVA et al., 2002; SENFF-RIBEIRO et al., 2003; GOZZI et al., 2015).

### 3.2 COMPOSTOS MESOIÔNICOS

Os compostos mesoiônicos tiveram sua estrutura descrita em 1955, por Baker e Ollis. Possuem um anel heterocíclico de cinco membros, que não pode ser representado por uma estrutura polar ou covalente, com carga positiva e com um átomo ou grupo de átomos ligados ao anel com carga oposta. Devem possuir também um sexteto de elétrons  $\pi$  em associação com todos os átomos que constituem o anel (BAKER; OLLIS, 1955; NEWTON; RAMSDEN, 1982).

A estrutura genérica que os representa está mostrada na figura 3 onde as letras de **a** até **f** representam átomos como: carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre seguidos de seus respectivos substituintes, específicos para cada tipo de composto (OLLIS; RAMSDEN, 1976; NEWTON; RAMSDEN, 1982).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO



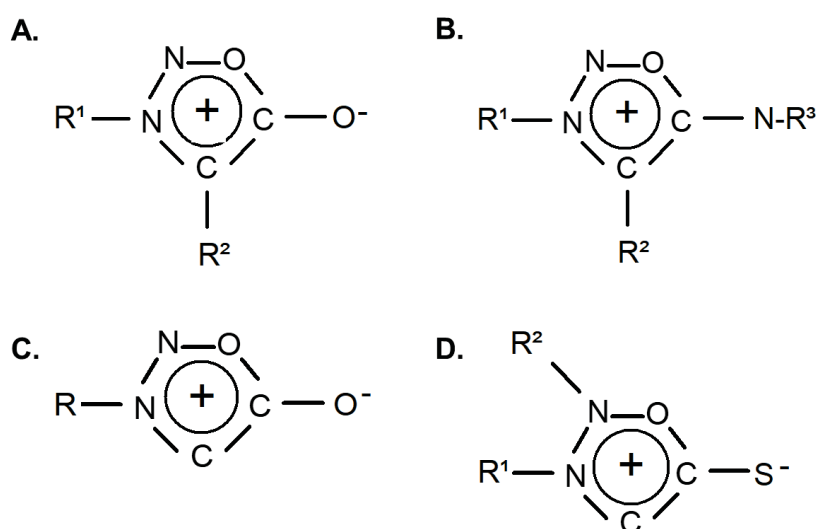
FONTE: O autor (2018).

A ausência de carga global permite que estes compostos atravessem membranas biológicas, e a presença de dipolo elétrico em sua estrutura favorece sua interação com biomoléculas, incluindo proteínas e DNA (KIER; ROCHE, 1967; NEWTON; RAMSDEN, 1982).

A composição atômica do anel heterocíclico dos mesoiônicos é utilizada para a sua classificação, com base na origem dos oito elétrons  $\pi$  que podem ser

distribuídos entre o anel mesoiônico (carga positiva) e o átomo ou grupo de átomos ligados ao anel (carga negativa) e as suas propriedades químicas dependem da natureza dos substituintes. Muitos compostos mesoiônicos apresentam atividade biológica, entre eles, quatro classes destacam-se: sidnonas, sidnoniminas, oxatriazóis e os 1,3,4-tiadiazóis (FIGURA 4) (KIER e ROCHE, 1967). A seguir serão descritas as propriedades dos compostos 1,3,4 – tiadiazóis, que são objeto desse estudo.

FIGURA 4 - ESTRUTURAS REPRESENTATIVAS DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS COM DESTACADA ATIVIDADE BIOLÓGICA



FONTE: O autor (2018).

NOTA: **A.** sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olato); **B.** sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminida); **C.** oxatriazóis (1,2,3,4 oxatriazólio-5-olato) e **D.** 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos (1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato) (KIER E ROCHE, 1967).

### 3.2.1 Atividades biológicas dos compostos 1,3,4 - tiadiazóis mesoiônicos

O primeiro relato na literatura da atividade biológica dos compostos 1,3,4 – tiadiazóis foi em 1965, por Stewart e Kier. Estes autores avaliaram a atividade in vitro dos derivados do 4-fenil-5-X-1,3,4-tiadiazólio mesoiônico contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. Os compostos com substituintes alquil de cadeia curta (metil, etil e isopropil) foram os mais eficientes em inibir o crescimento destas bactérias.

Os derivados mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis [3,2-a] pirimidinas tiveram sua atividade inibitória comprovada sobre a enzima adenosina 3' 5' – monofosfato

fosfodiesterase, sendo maior na presença dos substituintes maiores e mais hidrofóbicos, como o benzil e fenil (GLENNON et al., 1981).

Posteriormente foi testada, in vitro, a ação inibidora (receptor de adenosina A<sub>1</sub>) e/ou ativadora (receptor de adenosina A<sub>2</sub>) da enzima adenilato ciclase por compostos mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis[3,2-a] pirimidinas, semelhantes as xantinas. Muitos tiadiazóis mesoiônicos foram mais seletivos ao receptor de adenosina A<sub>1</sub> e não mostraram atividade frente ao receptor A<sub>2</sub> e tiveram efeitos menos potentes que a teofilina (GLENNON et al., 1984).

Lima e colaboradores em 1986, demonstraram a atividade antifúngica e antibactericida do 4,5-difenil-2-tiolato-1,3,4-tiadiazólio contra os microrganismos: *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus* e os seguintes fungos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula sp.*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium sp.*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*.

No ano de 1992, Montanari e colaboradores testaram os compostos 1,3,4-tiadiazólio quanto a sensibilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde foi observada uma atividade antifúngica discreta quando o grupo metoxi (OCH<sub>3</sub>) ou nitro (NO<sub>2</sub>) foram usados como substituintes. Em estudo posterior (1997), Montanari, Amaral e Giesbrecht descreveram a atividade antimicrobiana de alguns derivados 1,3,4-tiadiazóis-2-aminida contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*.

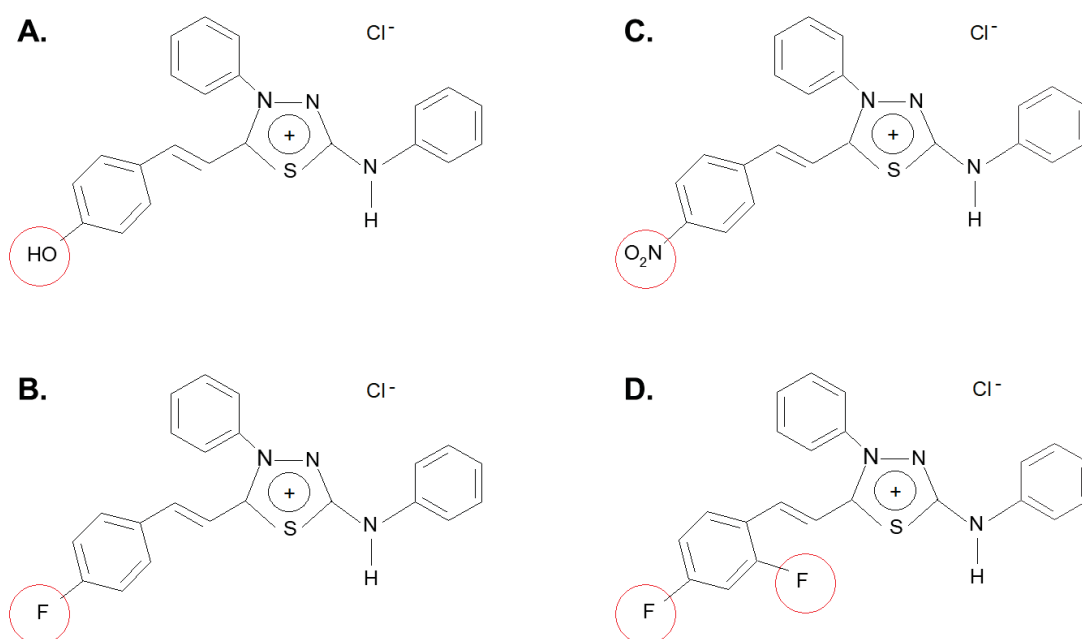
Para avaliar a atividade antitumoral dessa classe de mesoiônicos, Grinberg e Echevarria (1997) sintetizaram quatro novos compostos derivados do cloreto de 4-fenil-5-(4-X-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina. Os ensaios foram realizados in vivo em camundongos portadores de Sarcoma 180 (S180) e carcinoma de Ehrlich. Para os compostos com substituintes mais polares, como NO<sub>2</sub> (MI-D) e OH (MI-J) (FIGURA 5), a atividade de inibição do crescimento tumoral foi maior do que para aqueles com substituintes menos polares como X=H (MI-A) e X=OCH<sub>3</sub> (MI-C) (FIGURA 5). O MI-D apresentou a melhor atividade antitumoral para ambos os tumores testados. Não foi observada alteração dos parâmetros hematológicos nos animais tratados.

No sentido de elucidar os mecanismos envolvidos na ação antitumoral desses compostos, foram avaliados os efeitos do MI-D sobre as funções

mitocondriais relacionadas a conversão de energia. O composto inibe o transporte de elétrons entre os complexos II e III, colapsa o potencial elétrico transmembrana e estimula a atividade da ATPase em mitocôndrias intactas. No entanto, na presença do desacoplador FCCP, o mesoiônico inibiu a ATPase, o que levou os autores a sugerirem que o MI-D possa ser classificado como um desacoplador inibitório (CADENA *et al.*, 1998).

Em estudo posterior, observou-se que o MI-D é capaz de alterar a fluidez e permeabilidade da membrana mitocondrial interna através de estudos de inchamento mitocondrial induzido por valinomicina e nigericina, ambos em presença de potássio e de polarização de fluorescência das sondas DPH e DPH-PA em vesículas multilamelares sintéticas (DMPC) e mitocondriais. Os autores sugeriram que os efeitos sobre a bioenergética mitocondrial estão relacionados com os mecanismos de indução de morte celular em células tumorais (CADENA *et al.*, 2002).

FIGURA 5 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS



FONTE: O autor (2018).

NOTA: **A.** cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxi-cinamoil] -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-J); **B.** cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D); **C.** cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorcinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-4F) e **D.** cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-2,4diF). \*Os círculos destacam os substituintes do anel cinamoíl (GRYNBERG, SANTOS E ECHEVARRIA; 1997)

No sentido de avaliar outras atividades biológicas desses compostos, Da Silva e colaboradores (2002) testaram a atividade do MI-D contra *Leishmania amazonensis* nas formas promastigota e amastigota axônica. O MI-D apresentou atividade contra as duas formas evolutivas, sendo maior para a forma promastigota. Os autores sugerem que a diferença de sensibilidade entre as formas evolutivas se deve ao pH da solução, sendo que no meio de cultura da forma promastigota (pH 7,0) os derivados mesoiônicos encontram-se na forma desprotonada, enquanto que para a forma amastigota (pH 5,5) estes compostos se mantêm em sua forma hidroclorada como cátions heterocíclicos, associando essa característica com a maior eficiência do mesoiônico contra a forma promastigota (SILVA et al., 2002).

O MI-D apresentou também ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória in vivo. Segundo os autores, estes efeitos foram decorrentes da diminuição dos níveis de prostaglandina E2 (PGE2) sugerindo a inibição da ciclooxigenase 2 (COX-2) (CARDOSO et al., 2004). No mesmo estudo também se demonstrou que o composto estimula a glicogenólise e inibe o consumo de oxigênio em 37% em fígado de rato perfundido.

Em relação à atividade antitumoral, foi descrito um significativo efeito do MI-D contra melanoma murino (SENFF-RIBEIRO et al., 2003). Nessa mesma linhagem, para estabelecer uma relação entre estrutura química e atividade, foram avaliados os efeitos dos derivados mesoiônicos MI-D, MI-J, MI-4F, MI-2,4diF. Nas análises in vitro e in vivo, o MI-D foi o derivado que apresentou maior eficiência. In vitro o composto MI-4F foi mais efetivo que o MI-2,4diF, porém, in vivo não apresentou efeito. Já o composto MI-J não apresentou efeito significativo in vitro e in vivo (SENFF-RIBEIRO et al., 2004a). O composto MI-D ainda diminuiu a proliferação de células de melanoma humano de diferentes linhagens (MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO), com significativa atividade citotóxica e reduziu a adesão celular a componentes da matriz extracelular (laminina, fibronectina e matrigel). O derivado mesoiônico promoveu a redução na adesão das células MEL-85 de maneira dependente da concentração. As micrografias da adesão na fibronectina mostraram que o MI-D não apenas reduziu o número de células aderidas, mas também alterou a morfologia das células, que retraíram e se tornaram arredondadas. Essas mudanças também foram observadas quando as células foram testadas quanto à sua adesão em laminina e matrigel. Observou-se também uma reorganização dos

filamentos de actina do citoesqueleto, em função dos efeitos nas interações entre a célula e a matriz extracelular (SENFF-RIBEIRO et al., 2004b).

Ao avaliar o efeito do MI-D sobre o estresse oxidativo e sobre o processo de oxidação de lipídeos, demonstrou-se que o composto inibiu fortemente a lipoperoxidação induzida por  $\text{Fe}^{3+}$ -ADP/ 2-oxoglutarato em mitocôndria isolada de fígado de rato e em menor proporção, ocorreu a inibição da lipoperoxidação induzida por radicais de carbono gerados por AAPH. O composto também inibiu a lipoperoxidação induzida por  $\text{Fe}^{2+}$ /NADH em partículas submitocondriais acopladas e desacopladas. O MI-D ainda foi capaz de sequestrar radicais superóxido, o que levou os autores a sugerirem que a redução da lipoperoxidação promovida pelo mesoiônico deve-se a este efeito somado a sua ação desacopladora (MENDÉZ-SANCHÉZ et al., 2009).

Pires e colaboradores (2010) demonstraram nos experimentos de inchamento (*swelling*) mitocondrial, na ausência de substrato e em presença de valinomicina e potássio, o comprometimento da elasticidade da membrana mitocondrial interna pelos derivados. Através de ensaios de polarização de fluorescência, em lipossomas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), na presença de sondas específicas para as regiões polares e apolares, demonstrou-se que o MI-J diminuiu significativamente a fluidez destas membranas em ambas as regiões, hidrofílica e hidrofóbica, enquanto que os derivados fluorados (MI-4F e MI-2,4diF) diminuiram a fluidez da região hidrofóbica e aumentaram discretamente a fluidez das regiões mais superficiais (hidrofílicas) destas membranas. O MI-J promoveu efeitos semelhantes aos já descritos para o MI-D (CADENA et al., 2002). Ambos os derivados partilham características físico-químicas semelhantes, sendo substituídos por grupos mais polares, alterando a fluidez nas duas regiões da membrana.

Ao avaliar a lipoperoxidação induzida por  $\text{Fe}^{3+}$ -ADP/ 2-oxoglutarato em mitocôndrias de fígado de rato, o MI-J promoveu uma inibição menos significativa que os compostos fluorados (MI-4F e MI-2,4diF). Ao testar os efeitos sobre a lipoperoxidação iniciada por AAPH, a inibição foi ainda menor para os três compostos em relação a lipoperoxidação induzida por ferro. Os autores sugeriram que os derivados mesoiônicos são capazes de inibir o processo de lipoperoxidação mesmo quando a fonte de radicais livres não está relacionada ao transporte de

elétrons na cadeia respiratória. Os compostos fluorados ainda apresentaram capacidade de sequestrar ânions superóxido maior que o MI-J (PIRES et al., 2010)

Em relação aos demais derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, o MI-J reduziu a velocidade de consumo de oxigênio durante o estado 3 em presença succinato ou glutamato e malato como substratos, porém a redução não foi tão significativa quando comparada a dos derivados que apresentam substituintes menos polares (MI-4F, MI-2,4diF). A atividade da ATPase foi estimulada em mitocôndrias intactas e não sofreu alterações em mitocôndrias rompidas, apresentando características de inibidores do transporte de elétrons e desacopladores da fosforilação oxidativa (PIRES et al., 2011).

Em linhagens de hepatocarcinoma humano (HepG2), todos os compostos (MI-D, MI-J, MI-4F, MI-2,4diF) foram tóxicos e induziram a morte celular, segundo os autores, possivelmente por apoptose. Vale destacar que na mesma concentração (25 $\mu$ M), os compostos MI-J, MI-D, MI-4F não foram citotóxicos para hepatócitos não tumorais. Esses compostos também foram avaliados em células embrionárias de rim humano (HEK293) e fibroblastos embrionários de rato (NIH3T3), superexpressando os transportadores multidrogas ABC. Dos quatro derivados testados (MI-D, MI-J, MI-4F, MI-2,4diF), o MI-J foi o único que inibiu significativamente o efluxo de Rodamina 123 mediado pelo transportador Pgp. Quando avaliados os efeitos dos quatro compostos sobre o transportador ABCG2 observou-se que todos os derivados exerceram inibição significativa, sendo que o MI-D apresentou maior efeito, seguido do MI-J, MI-2,4diF e MI-4F, em ordem decrescente. Os diferentes derivados também inibiram o efluxo de drogas mediado por MRP1, usando calceína-AM como substrato, mas com diferentes relações estrutura-atividade quando comparadas ao ABCG2. Os autores sugeriram que a presença do substituinte OH (MI-J) foi mais eficiente do que o NO<sub>2</sub> (MI-D), enquanto que os derivados fluorados MI-4F e MI-2,4diF apresentavam potência intermediária de inibição (GOZZI et al., 2015).

### 3.3 METABOLISMO DAS CÉLULAS TUMORAIS

As células tumorais apresentam metabolismo diferenciado em relação às células não tumorais (FIGURA 6), de forma a garantir o suprimento de ATP, a manutenção do equilíbrio redox, o crescimento descontrolado e, assim, sua

sobrevivência (MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016). Um exemplo clássico dessa reprogramação metabólica é o efeito Warburg, descrito por Otto Warburg (1926). O pesquisador verificou que, mesmo em condições aeróbias, os tecidos tumorais metabolizam cerca de dez vezes mais glicose a lactato que os tecidos saudáveis. Desta forma, a via glicolítica é responsável pela maior parte do ATP gerado, além de ser importante para o fornecimento de intermediários para suprir as exigências metabólicas das células em proliferação (WARBURG, 1956; MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016).

Gajewski e colaboradores (2003) demonstraram que o ATP é compartimentalizado nas células e sua distribuição não é uniforme nas organelas, o que é importante para manter o suprimento adequado de ATP para os principais compartimentos celulares. Dessa maneira, as diferentes funções celulares são mantidas por diferentes “pools” de ATP. Como já foi citado, as células tumorais utilizam predominantemente a glicose para gerar ATP, através da via anaeróbica com rendimento energético de 2 mol de ATP por mol de glicose, uma produção significativamente menor que os 30 ou 32 mol de ATP por mol de glicose gerados através do ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Embora o rendimento da glicólise anaeróbica seja menor, deve-se considerar também a velocidade de suas reações que pode ser aumentada nas células tumorais, aumentando o fluxo glicolítico e gerando intermediários para a síntese de outras biomoléculas. Ainda, dependendo da disponibilidade de nutrientes, estas células podem utilizar outros substratos para a obtenção de energia, como os aminoácidos (MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016; GEBREGIWORGIS et al., 2017; WANG et al., 2017).

Com o intuito de compreender o metabolismo da célula tumoral, uma estratégia utilizada é variar os componentes do meio de cultura de forma a direcionar o metabolismo para vias metabólicas específicas, como a glicolítica e fosforilação oxidativa. Isto pode ser feito substituindo-se o meio rico em glicose, normalmente utilizado para culturas de células tumorais, por meio enriquecido com galactose e glutamina. A presença da galactose está relacionada com o aumento na expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons, como demonstrado em células HepG2 (DOMENIS et al., 2012). A glutamina é um nutriente crítico para a proliferação celular podendo ser utilizada na síntese de moléculas glicosiladas,

nucleotídeos e metabolizada via ciclo do ácido cítrico para produzir energia (DEBERARDINIS; CHENG, 2010).

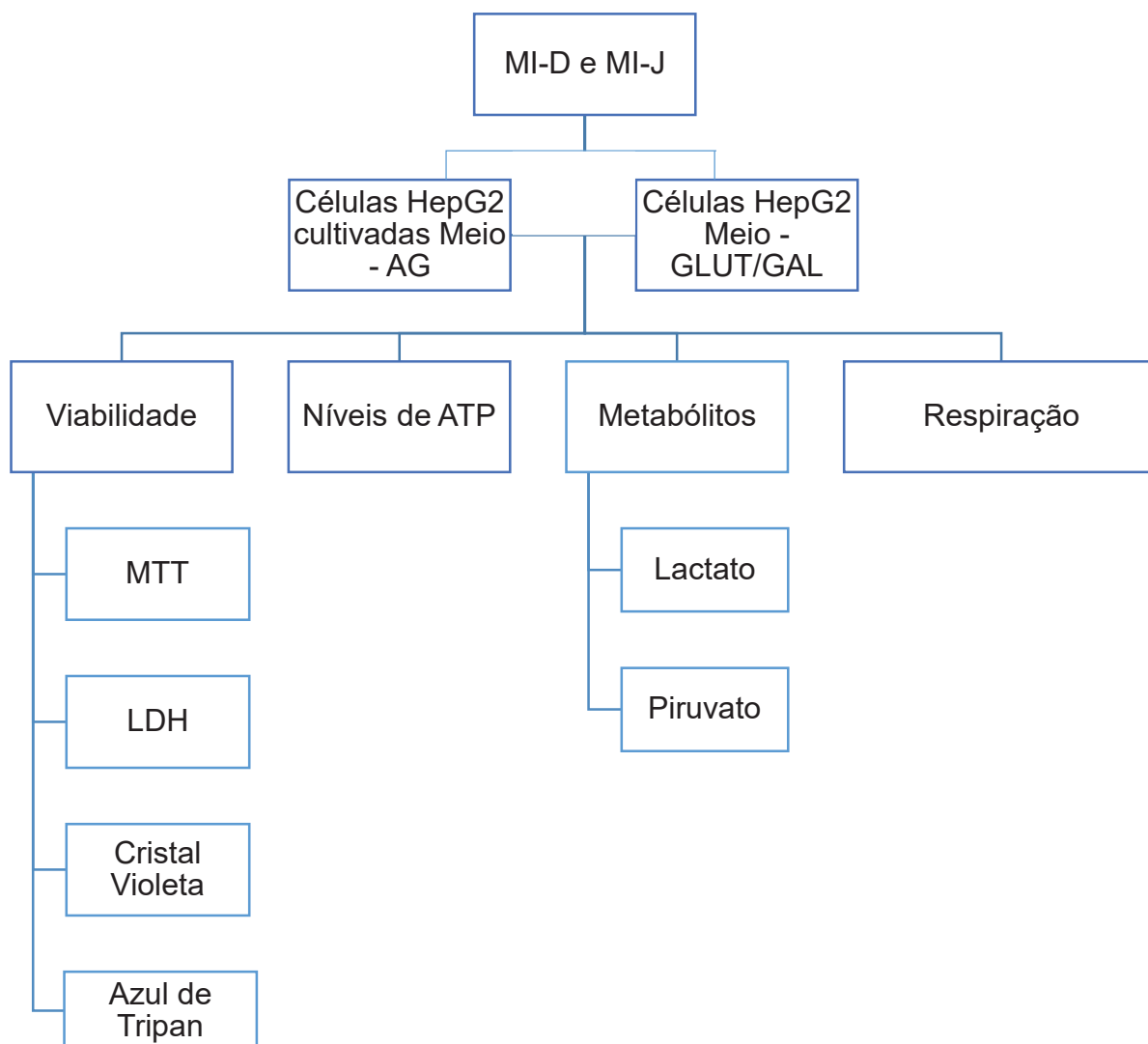
Grimm e colaboradores (2017) avaliaram o efeito metabólico da galactose em células HepG2 cultivadas em dois meios diferentes, alta glucose (10 mM) e galactose (10 mM), tratadas com Pioglitazona, um medicamento utilizado para tratar Diabetes tipo II. Os autores observaram que no tratamento com o antiglicêmico em células cultivadas em meio com galactose ocorre um aumento da fosforilação oxidativa, enquanto no meio com alta glucose ocorre um aumento significativo na glicólise e redução do fluxo de oxigênio, além de diminuir a proliferação dessas células.

Quando as células são altamente proliferativas, a necessidade de glutamina aumenta. O aminoácido entra na célula através de transportadores, derivados da família SLC (SLC1, SLC6, SLC7 e SLC38). Uma vez no interior das células, a glutamina pode participar da síntese de nucleotídeos como doadora de nitrogênio ou na mitocôndria ser convertida a glutamato em reações catalisadas por glutaminases (GLS ou GLS2). O glutamato, por sua vez, pode contribuir para a síntese de glutathione ou então ser convertido a  $\alpha$ -cetoglutarato, pelas enzimas glutamato desidrogenases ou aminotransferases. O  $\alpha$ -cetoglutarato é um intermediário do ciclo do ácido cítrico e sua oxidação nesta via aumenta os níveis intracelulares de ATP (ALTMAN et al., 2016; SCALISE et al., 2017). Essa mudança metabólica reflete na estrutura das organelas celulares, como demonstraram Domenis e colaboradores (2012). Os autores avaliaram as respostas metabólicas de células HepG2 em meios com diferentes concentrações de glucose (11mM e 25mM) e com galactose/glutamina (10Mm/6mM). Nas células cultivadas em meio galactose/glutamina observou-se um estímulo da atividade e aumento da massa mitocondriais, maior expressão de proteínas da fosforilação oxidativa, evidenciando que a glutamina e a galactose são importantes para a conversão de energia quando a glucose está indisponível.

Nesse contexto, Marroquin e colaboradores cultivaram células HepG2 em meio com galactose/glutamina (10mM/6mM) e, comparativamente, com alta (25mM) e baixa (5,5mM) concentrações de glucose. As células que cresceram em meio rico em galactose/glutamina apresentaram uma suscetibilidade maior a inibidores e desacopladores mitocondriais (oligomicina, rotenona e antimicina e FCCP), com



#### 4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 REAGENTES

Os compostos mesoiônicos MI-J (cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxi-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) e MI-D (cloreto de 4-fenil-5-[4-nitro-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) foram sintetizados no Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e gentilmente doados pela Prof. Dra. Aurea Echevarria. As estruturas dos compostos foram anteriormente confirmadas por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia de massas (DOS SANTOS; ECHEVARRIA, 2001).

Os reagentes utilizados HEPES, rotenona, ATP, NADH,  $\text{NAD}^+$ , FCCP, oligomicina, MTT, tripsina, meio DMEM alta glucose e sem glucose, foram obtidos da Sigma Chemical Co. Os reagentes seguintes foram obtidos dos laboratórios: soro fetal bovino – Gibco; DMSO, Tris e os demais reagentes com alto grau de pureza, foram adquiridos da Merck.

### 5.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS

Foram preparadas soluções estoque (5-50 mM) dos derivados MI-D e MI-J em DMSO estéril. Estas soluções foram mantidas congeladas a  $-20^\circ\text{C}$  e utilizadas no prazo máximo de 1 mês. Análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia de massas confirmaram que estes derivados mantêm suas características estruturais se armazenados nestas condições (ECHEVARRIA - comunicação pessoal). Para cada experimento foram também realizados ensaios controle com a mesma quantidade do solvente DMSO (1%), nas mesmas condições experimentais.

### 5.3 CÉLULAS HepG2

Foram utilizadas células de hepatoma humano (HepG2) provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), cedidas gentilmente pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Leme do Departamento de Genética da UFPR. Estas células crescem em

monocamadas e possuem tempo médio de completar um ciclo celular de 20h (NATARANJAN; DARROUDI, 1991).

Todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular foram realizados em 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 por 45 min. O material plástico foi esterilizado em forno de micro-ondas em potência média por 45 min. Após esterilização, os materiais foram secos em estufa a 37°C. Todas as soluções utilizadas foram esterilizadas por filtração em membranas de acetato-nitrato de celulose (0,22 µm), marca Millipore, em aparelho Sartorius ou em autoclave a 120°C por 45 min.

### 5.3.1 Soluções

#### 5.3.1.1 Solução Fosfato Salina Tamponada (PBS)

A solução de PBS foi preparada como solução estoque dez vezes concentrada: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/L, NaCl 7,95 g/L e KCl 0,2 g/L, autoclavada a 120°C, 1atm de pressão, e o pH ajustado para 7,4. Esta solução foi mantida em temperatura ambiente e, no momento do uso, diluída (10x) em água mili-Q estéril.

#### 5.3.1.2 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 para as passagens ou coleta para desenvolvimento dos experimentos. Esta solução é constituída de tripsina 2,0 g/L, NaCl 8 g/L, KCl 0,4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06 g/L, dextrose 1,0 g/L, vermelho de fenol 0,5%, NaHCO<sub>3</sub> 0,195 g/L e EDTA 0,25 g/L. O pH 7,4 desta solução foi ajustado com HCl e sua esterilização feita por meio de filtração em membrana de 0,22µm de poro, em filtro Sartorius e mantida congelada -18°C em alíquotas com volume de 50 mL. No momento da sua utilização, uma alíquota foi então descongelada em banho-maria a 37°C.

### 5.3.1.3 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) se constitui da mistura das soluções A e B, as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 10x). A solução A era composta de NaCl 2,73 M, KCl 107 mM, CaCl<sub>2</sub> 25 mM e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 27 mM. A solução B era constituída por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,5 mM e glucose 110 mM. As duas soluções foram preparadas em água ultrapura em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. Para o uso, as soluções A e B foram misturadas (1:1), diluídas com água ultrapura e o pH ajustado para 7,4. As soluções foram esterilizadas por filtração em membranas microporosas (0,22 µm), em filtro Sartorius e armazenada a 4°C.

### 5.3.2 Meios de cultura para células HepG2

#### 5.3.2.1 DMEM AG

Para o cultivo em alta glucose, foi utilizado o meio essencial mínimo modificado de Dulbecco (DMEM) disponível em forma de pó reconstituível e que apresenta entre seus componentes a glucose (25 mM) e glutamina (4 mM). Esse meio foi suplementado com: NaHCO<sub>3</sub> (44 mM); HEPES (10 mM) e Piruvato (1 mM). Após dissolução em água ultrapurificada, o pH foi ajustado em 7,4 com solução de bicarbonato de sódio e o meio esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm, em aparelho Sartorius, sendo posteriormente armazenado sob refrigeração. Para o crescimento das células este meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, penicilina (100 U/mL), e estreptomicina (100 µg/mL) estéreis.

#### 5.3.2.2 DMEM GAL

Para o cultivo das células em meio glutamina/galactose, foi utilizado o meio DMEM sem glucose disponível em pó para dissolução. Esse meio foi suplementado com: NaHCO<sub>3</sub> (44 mM); HEPES (10 mM); vermelho de fenol (0,04 mM); glutamina (6mM), galactose (10 mM) e piruvato (1 mM). O meio passou pelos mesmos procedimentos de ajuste de pH e filtração anteriormente descritos para o DMEM AG.

Para o cultivo foram adicionados soro fetal bovino (SFB) inativado (10%), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), sendo mantido a 8°C em geladeira até o momento do uso.

### 5.3.3 Cultivo das células HepG2

O cultivo foi realizado em incubadora a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para adesão, crescimento e proliferação celular. As passagens foram realizadas a cada 48h, observando-se a confluência celular máxima de 80%. Todos os reagentes utilizados para as passagens foram pré-aquecidos em banho-maria a 37°C. Após retirar o meio de cultura, a monocamada celular foi lavada com PBS e adicionou-se solução de tripsina/EDTA, sendo que o volume de solução utilizada variava de acordo com o tamanho da garrafa (~1,5 mL para garrafa pequena (25 cm<sup>2</sup>), ~3 mL para garrafa média (75 cm<sup>2</sup>) e ~5 mL para garrafa grande (175 cm<sup>2</sup>)), por 3 min. Decorrido este tempo, a solução dispersante foi removida cuidadosamente e acrescentou-se meio de cultura para inativar a tripsina e desaderir as células da superfície da garrafa. Após esse procedimento, o conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo tipo Falcon estéril e centrifugado por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em 1 mL de meio de cultura. As células foram então transferidas para uma nova garrafa de cultura de capacidade superior à anterior, sendo adicionado meio de cultura até o volume final correspondente à sua capacidade.

As células foram descongeladas e cultivadas em meio AG por no mínimo duas passagens. A mudança de meio de cultura foi realizada de forma gradual, iniciando em uma proporção de 25% de meio GAL e 75% de DMEM AG, no próximo repique a proporção mudou para 50% de cada meio, posteriormente 75% do meio GAL, até atingir 100%. As células foram mantidas neste novo meio em média por 3 dias antes do início dos ensaios. Após este tempo, as células cultivadas tanto em meio AG quanto GAL foram semeadas em placas com capacidade adequada para a realização dos experimentos.

## 5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 5.4.1 Determinação da viabilidade celular

#### 5.4.1.1 Redução do MTT

Este método colorimétrico baseia-se na capacidade de células viáveis e metabolicamente ativas reduzirem o MTT, que possui coloração amarela, a sais de formazan de cor púrpura, que podem ser quantificados por espectrofotometria após dissolução com DMSO (MOSMANN, 1983).

No procedimento, as células de HepG2 foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células por poço em placas de 96 poços), e incubadas para adesão a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24h, em meio DMEM AG ou GAL. Decorrido este tempo, foram realizadas as incubações com os derivados mesoiônicos MI-J e MI-D nas concentrações 5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  por 24h, 48h e 72h. Findado o tempo de tratamento, o sobrenadante foi retirado e reservado para outras análises e, acrescentado sobre as células aderidas, 200  $\mu\text{L}$  da solução de MTT 5 mg/mL em HBSS, seguindo-se incubação por 3h a  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . A seguir, o MTT foi removido, e os cristais de formazan dissolvidos pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. Após homogeneização a absorbância (A) foi lida em leitor de microplacas Epochi, em comprimento de onda de 550nm. A porcentagem de células viáveis após o tratamento em relação às células não tratadas (controle) foi calculada conforme a equação abaixo

Porcentagem de células viáveis:  $\frac{A \text{ das células incubadas com MI-J/MI-D}}{A \text{ das células não expostas aos derivados}} \times 100$

#### 5.4.1.2 Atividade da enzima lactato desidrogenase no meio de cultura

A lactato desidrogenase (LDH) catalisa a redução reversível do piruvato a lactato, com a concomitante oxidação do NADH a  $\text{NAD}^+$ . O decréscimo da absorbância em 340nm decorrente desta oxidação é proporcional à atividade da LDH na amostra.

Para este ensaio foi utilizado como amostra o sobrenadante do ensaio de viabilidade MTT. A atividade da enzima foi determinada utilizando Kit Analisa®, conforme as orientações do fabricante. Após o ensaio, a absorbância foi lida em leitor de microplacas Epochi em comprimento de onda de 340nm. A atividade da enzima foi monitorada por 4 min, onde foi calculada a média da variação da absorbância por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ). Na sequência, os valores foram multiplicados pelo coeficiente de linearidade da reação, conforme a equação abaixo:

$$\text{LDH (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 1058$$

Onde:

LDH (U/L) – Atividade da LHD (unidades/Litro).

$\Delta A$  – Variação média da absorbância por minuto.

1058 – Fator de correção (calculado com base no volume total do ensaio, volume da amostra, espessura da solução e absorbância milimolar do NADH em 340 nm).

Os resultados foram apresentados como porcentagem de LDH liberada em relação ao controle (ausência dos derivados).

#### 5.4.1.3 Coloração com Cristal Violeta

Este método baseia-se na propriedade do corante cristal violeta de ligar-se ao DNA de células que se encontram aderidas à placa, consideradas como células viáveis (SAOTOME *et al.*, 1989).

Para o procedimento, as células HepG2 foram semeadas ( $1 \times 10^4$  células por poço) em placas de 96 poços e incubadas para adesão a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24h, em meio DMEM AG ou GAL. Decorrido este tempo, foram realizadas as incubações com o MI-J e MI-D em diferentes concentrações (0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ) por 24h, 48h e 72h. Findado o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol (100%) por 10 min. Após, foi adicionado o corante cristal violeta (preparado 0,2% em etanol 2%) a cada poço, seguindo-se incubação por 2-3 min. Decorrido este tempo, o corante foi retirado e as

células lavadas exaustivamente (5x) com PBS. Em seguida, o corante retido nas células foi eluído com 200 µL de citrato de sódio 0,05 M (preparado em etanol 50%). Após homogeneização a absorbância foi lida em leitor de microplacas Epochi, em comprimento de onda de 550nm. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (ausência dos derivados), considerado como 100% de viabilidade.

#### 5.4.1.4 Coloração com Azul de Tripán

Este método avalia a integridade da membrana celular, uma vez que o corante azul de tripan é permeável apenas em células cujas membranas estejam comprometidas, ou seja, em células inviáveis que são coradas em azul.

As células HepG2 ( $1,0 \times 10^6$ ) foram semeadas em placas 60mm e deixadas aderir por 24h em incubadora, a 37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, foi feita a incubação com MI-D ou MI-J (0 µM, 5 µM e 25 µM) por 24h. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C para posteriormente realizar o ensaio dos níveis de Lactato e Piruvato. A monocamada de células foi lavada com PBS e tripsinizada. Após esse procedimento, as células soltas foram ressuspensas em meio de cultura. Para cada mL de suspensão celular de HepG2 foi utilizado 0,1 mL da solução do corante Azul de Tripán (0,4% p/v), sendo realizada imediatamente a contagem das células utilizando hemocitômetro de NEUBAUER.

A porcentagem de células viáveis foi calculada conforme equação abaixo:

$$\% \text{ de células viáveis: } \frac{\text{Número de células não coradas}}{\text{Número de células coradas + células não coradas}} \times 100$$

#### 5.4.2 Respiração Celular

A respiração celular foi determinada em células HepG2 mantidas em meio AG ou GAL, incubadas ou não com o MI-J e MI-D (0-25 µM) por 24h. O tempo de exposição das células aos compostos foi determinado a partir dos resultados de viabilidade celular.

Para os ensaios de respiração, as células foram semeadas ( $1 \times 10^6$  células) em placas de 60 mm. Após adesão a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e incubação com os compostos MI-J e MI-D ( $5 \mu\text{M}$  e  $25 \mu\text{M}$ ) por 24h, as células foram lavadas com PBS e coletadas com o uso de solução tripsina.

O consumo de oxigênio foi monitorado por respirometria de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). As medições foram feitas em duas câmaras a  $37^\circ\text{C}$ , sob suave agitação (500 rpm). O consumo de oxigênio foi avaliado em diferentes estados da respiração (HUTTER et al., 2006) definidos como: **Basal** - consumo de oxigênio na ausência de inibidores ou desacopladores-, que reflete a respiração em condições basais de cultivo; **Leak** -a respiração na presença de oligomicina ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) -, que corresponde a respiração em resposta ao vazamento de prótons para a matriz mitocondrial; **Desacoplado** - respiração na presença de desacoplador FCCP ( $1 \mu\text{M}$ ) -, que reflete o transporte de elétrons no estado desacoplado da fosforilação oxidativa. **Inibido** – corresponde a respiração não mitocondrial após a adição de rotenona ( $1 \mu\text{mol/L}$ ), inibidor do complexo 1, e antimicina ( $6 \mu\text{g/mL}$ ), inibidor do complexo 3. O fluxo de oxigênio foi corrigido pela subtração do fluxo de oxigênio obtido no estado inibido. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (ausência dos derivados).

#### 5.4.3 Determinação dos níveis de Lactato e Piruvato

As concentrações de lactato e piruvato no meio extracelular foram determinadas segundo Gutmann e Czoc (1974).

O sistema para dosagem de lactato, em volume final de  $200 \mu\text{L}$ , foi constituído de tampão glicina  $0,1 \text{ M}$  e hidrazina  $0,4 \text{ M}$  em pH 9,5,  $\text{NAD}^+$   $1,5 \text{ mM}$ , Lactato desidrogenase  $1,5 \text{ U}$  e  $100 \mu\text{L}$  do sobrenadante. A quantidade de NADH foi determinada a  $340\text{nm}$  em leitor de microplacas, após 90 min de incubação a  $37^\circ\text{C}$ . Os resultados foram expressos em  $\text{nmol/mL}$ , sendo a quantidade de lactato e piruvato avaliada de maneira indireta de acordo com a concentração de NADH presente no meio calculada 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 determinados em volume final de  $200 \mu\text{L}$ , em meio de reação contendo Tris-HCl  $0,1 \text{ M}$  em pH 7,0, NADH  $0,15 \text{ mM}$ , lactato

desidrogenase 0,05 U e 100  $\mu$ L do sobrenadante. A oxidação do NADH foi acompanhada a 340nm em leitor de microplacas, após 20 min de incubação a 37°C. Os resultados foram expressos em nmol/mL, 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 as determinações das concentrações de lactato e piruvato, as células foram semeadas ( $1 \times 10^6$  células) em placas de 60 mm. Após adesão a 37°C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e incubação com os compostos MI-J e MI-D (0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 25  $\mu$ M) por 24h. Decorrido o tempo de tratamento, o sobrenadante das células foi coletado e congelado a 4° C para posterior utilização. Para a dosagem, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. Os resultados foram apresentados como porcentagem de lactato ou piruvato em relação ao controle (ausência dos derivados).

#### 5.4.4 Determinação dos Níveis de ATP

Os níveis de ATP foram mensurados pelo kit de ensaio de ATP Bioluminescente da Sigma-Aldrich (FLAA). O ensaio é baseado na oxidação da D-luciferina catalisada pela enzima luciferase, que consome ATP com concomitante emissão de luz. Para este ensaio, as células HepG2 ( $1 \times 10^6$  por placa de 60 mm) foram inicialmente cultivadas em meio AG ou GAL e expostas ao MI-D e MI-J (0, 5 e 25  $\mu$ M) por 24h. Posteriormente as culturas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas (1500 rpm por 5 min), seguindo-se as recomendações do fabricante. A bioluminescência foi quantificada com leitor de microplaca TECAN infinity, e a concentração de ATP intracelular foi calculada utilizando uma curva padrão de ATP (0 a 1,25  $\mu$ mol/mL).

#### 5.4.5 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada através da metodologia descrita por Bradford, e utilizou-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976).

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados, expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média ou média  $\pm$  erro padrão da média, foram submetidos a testes de normalidade, análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação entre os grupos. Foram considerados estatisticamente significativos os valores com nível de significância  $< 0,05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das células HepG2, após exposição aos derivados mesoiônicos, foi avaliada por quatro métodos: redução do MTT, atividade da enzima LDH no meio de cultura e coloração com cristal violeta e azul de tripan, este último para os ensaios de respiração celular.

O método do MTT baseia-se na capacidade das desidrogenases de células viáveis de reduzir o sal de tetrazólio, de coloração característica amarela, a cristais de formazan de cor púrpura (CHUNG et al., 2015). Portanto, é considerado como um método que avalia a capacidade metabólica das células. Por sua vez, a presença da LDH, uma enzima intracelular, no meio de cultura indica alterações na permeabilidade da membrana plasmática (KORZENIEWSKI; CALLEWAERT, 1983). Já o cristal violeta cora o DNA de células aderidas. Como muitas células não viáveis perdem a sua capacidade de aderência, a quantidade do corante é reduzida em amostras de células não viáveis (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016). Por fim, o método do azul de tripan, assim como para a LDH, evidencia alterações na permeabilidade da membrana plasmática, uma vez que é excluído em células viáveis, enquanto que células inviáveis são coradas em azul.

Neste trabalho os compostos mesoiônicos foram utilizados nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  e os tempos de exposição foram de 24h, 48h e 72h, sendo esses valores estabelecidos com base em estudo anterior de GOZZI e colaboradores (2015).

No ensaio do MTT (FIGURA 7), observa-se que ambos compostos promoveram uma diminuição da viabilidade celular, de forma concentração dependente, considerando os dois meios de cultivo. Em meio AG, o composto MI-J na menor concentração (5  $\mu\text{M}$ ) causou uma redução de aproximadamente 10% após 24h e 48h de incubação e de ~18% para 72h. Na concentração de 25  $\mu\text{M}$  os efeitos do composto foram mais pronunciados. Após 24h de incubação, o MI-J reduziu a viabilidade das células HepG2 em ~29% para os tempos de 24h e 48h e em ~46% após 72h de incubação. Na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ), o MI-J reduziu a viabilidade em torno de 90% em todos os tempos de incubação. Comparando as

concentrações, os efeitos de 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  foram semelhantes para os tempos de 24h e 48h, sendo ambos diferentes (menos pronunciados) da maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ). Este perfil foi diferente somente para o tempo de 72h de incubação, em que se observa diferença estatística entre as três concentrações (5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ).

Quando utilizado o meio GAL, o efeito foi ainda mais pronunciado, com redução significativa da viabilidade já na menor concentração (5  $\mu\text{M}$ ) em ~56%, ~55% e ~44% para os tempos de 24h, 48h e 72h, respectivamente. Na concentração intermediária (25  $\mu\text{M}$ ), a citotoxicidade foi de ~65% nos tempos de 24h e 48h. Após 72h, o composto MI-J reduziu em ~56% a viabilidade. Curiosamente, na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , a redução da viabilidade foi menor do que a observada para o meio AG (62% em 24h e 48h e ~70% em 72h). Considerando as três concentrações, os efeitos do composto em 24h e 48h foram semelhantes, sem diferença estatisticamente significativa. Após 72h, observou-se diferença estatística entre as três concentrações (5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ). Em todos os tempos, o composto MI-J apresentou maior citotoxicidade em meio GAL quando comparado ao meio AG, sendo mais pronunciada nas menores concentrações (5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ ).

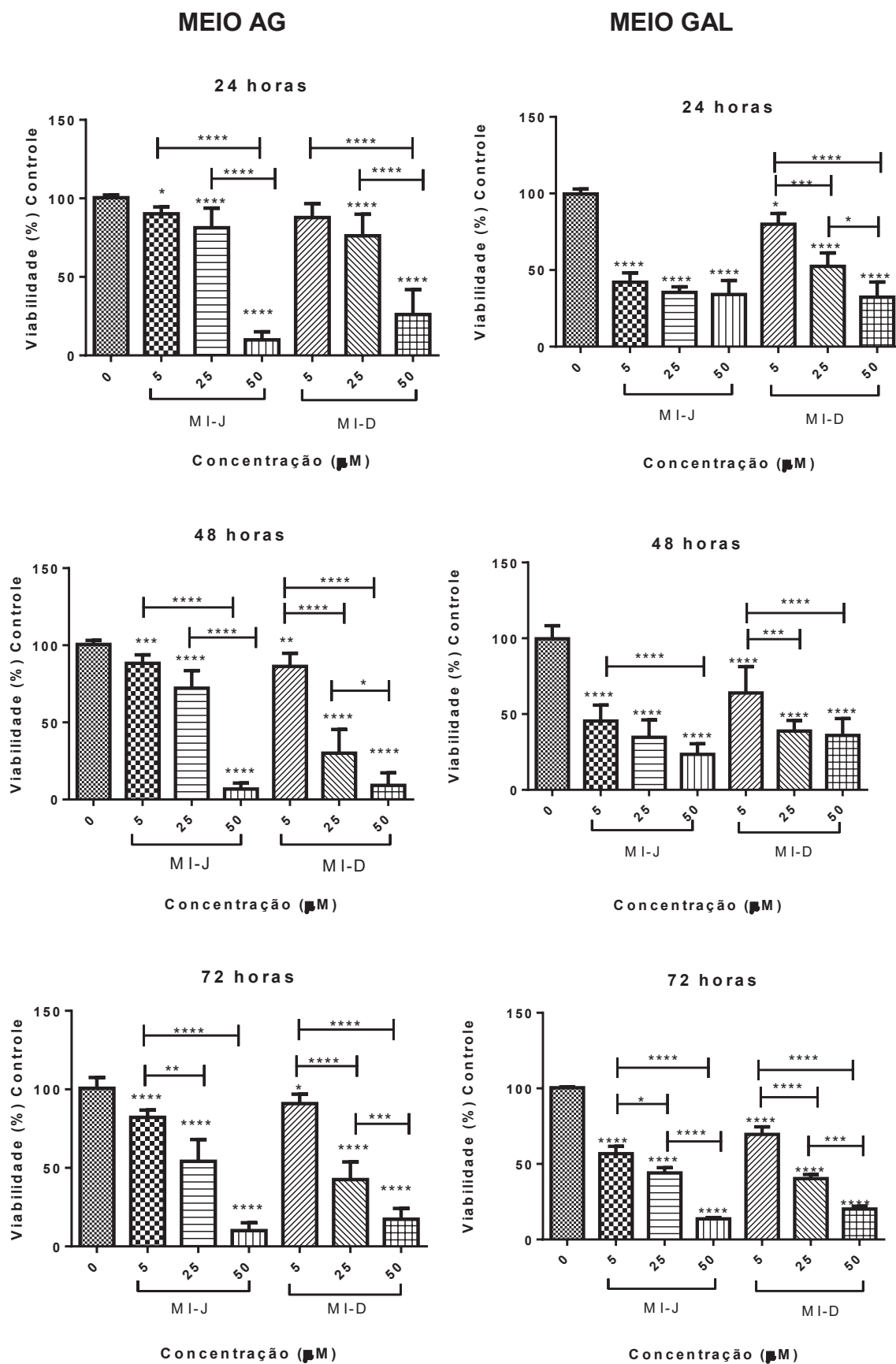
O MI-D também reduziu significativamente a viabilidade celular. Em meio AG, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , a diminuição foi em torno de 15% nos três tempos de incubação. Com 25  $\mu\text{M}$  nas primeiras 24h, a redução foi de ~24%. Após 48h a viabilidade diminuiu em cerca de 70%. Em 72h, houve uma redução de ~58% da viabilidade. Na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , o mesoiônico reduziu em ~74%, ~90% e ~83% nos tempos de 24h, 48h e 72h respectivamente. Estes efeitos sobre a viabilidade foram menos pronunciados quando comparados aos do MI-J. Os resultados nos tempos de 48h e 72h de incubação foram semelhantes e apresentaram maior significância estatística entre as três concentrações. Gozzi e colaboradores (2015) também avaliaram a citotoxicidade dos derivados mesoiônicos MI-J e MI-D, pelo método do MTT em células HepG2 cultivadas em meio AG. Os autores mostraram que 24h de exposição ao MI-J (5  $\mu\text{M}$ ) resultou em redução de ~15% na viabilidade, resultado semelhante ao presente estudo. Já para as concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , a redução foi de ~50% para ambas. Em relação ao composto MI-D, no mesmo tempo de exposição (24h), a redução da viabilidade nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  foi de ~5% e ~28%, respectivamente. Na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ), a citotoxicidade foi de 50% (GOZZI et al., 2015). Em

comparação com o presente estudo, a citotoxicidade do MI-D observada por Gozzi e colaboradores foi similar para a menor concentração (5  $\mu\text{M}$ ), enquanto que para maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ) a citotoxicidade do derivado foi maior. Embora os dois estudos tenham utilizado células HepG2, é importante ressaltar que os momentos do cultivo e a procedência das linhagens foram diferentes. Isto pode justificar em parte as diferenças observadas entre os dois estudos.

Nas células cultivadas em meio GAL, o composto MI-D na concentração de 5  $\mu\text{M}$  diminuiu a viabilidade de maneira tempo dependente em ~11%, ~19% e ~29% em 24h, 48h e 72h, respectivamente. Com 25  $\mu\text{M}$ , considerando as primeiras 24h de incubação, a redução na viabilidade celular foi de ~48%. Não houve diferença em relação aos tempos de 48h e 72h, observando-se uma redução de ~62% na viabilidade. Na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ), houve uma redução de ~62%, ~70% e ~80% após 24h, 48h e 72h, respectivamente. Comparando os tempos de incubação, a diferença estatística foi mais significativa entre as três concentrações nos tempos de 24h e 72h. Assim como no meio AG, o composto MI-J causou maior redução na viabilidade em meio GAL, quando comparado com o MI-D. A citotoxicidade do MI-D foi maior no meio GAL em relação ao meio AG, principalmente nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ .

Como mencionado, a viabilidade também foi avaliada pela determinação da liberação da enzima LDH no meio de cultura (FIGURA 8). Em meio AG, os efeitos foram mais pronunciados nas primeiras 24h de incubação, verificando-se um aumento de ~100% na liberação da enzima com a maior concentração do composto MI-J (50  $\mu\text{M}$ ). Em 48h e 72h, não houve alteração significativa da liberação da enzima na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , em acordo com os resultados dos ensaios com MTT (FIGURA 6). Nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , o aumento da liberação foi maior no tempo de 48h, sendo de ~47% e ~60%, respectivamente, para as duas concentrações. No tempo de 72h o aumento foi de ~17% e ~20%, para as mesmas concentrações, respectivamente. A liberação da enzima foi maior nas primeiras 24h, com diferença estatística entre as concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ . Após 48h, observou-se menor liberação da LDH, porém a diferença estatística foi maior entre as três concentrações, enquanto que no tempo de 72h não houve diferença estatística significativa entre as três concentrações.

FIGURA 7 - EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 – MÉTODO DO MTT



FONTE: O autor (2018).

NOTA: As células HepG2 ( $1 \times 10^4$ ) foram semeadas em placa de 96 poços com meio AG ou GAL para adesão por 24h. Após esse período, foram adicionados os derivados MI-D e MI-J (5,25 e 50 $\mu$ M) seguindo-se incubação por 24h, 48h e 72h. O grupo controle (C) foi estabelecido na ausência do mesoiônico e presença de DMSO 1%. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT como descrito no item 5.4.1.1 da sessão Material e Métodos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em quadruplicata. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* valores significativamente diferentes em  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , respectivamente. Em **A**. 100% corresponde a absorvância de  $0,8 \pm 0,05$  para 24h,  $0,7 \pm 0,06$  para 48h e  $0,7 \pm 0,05$  para 72h. Em **B**. 100% corresponde a absorvância de  $0,6 \pm 0,04$  para 24h,  $0,7 \pm 0,04$  para 48h e  $0,6 \pm 0,05$  para 72h.

Considerando ainda o meio AG, o MI-D, nas primeiras 24h, causou um aumento de ~50% na liberação da enzima na maior concentração (50  $\mu$ M). A liberação da LDH foi estatisticamente diferente entre as concentrações 25 e 50  $\mu$ M. Em 48h e 72h de incubação não foram observadas alterações significativas na liberação da LDH, apresentando menor variação em relação ao controle em comparação a 24h. Assim como no ensaio do MTT, o composto MI-J foi mais citotóxico que o MI-D.

A liberação da LDH em células HepG2 cultivadas em meio AG também foi avaliada por Gozzi e colaboradores (2015). O composto MI-J aumentou a liberação da enzima no meio de cultura em 55% na concentração de 25  $\mu$ M, enquanto o MI-D não aumentou significativamente a liberação da LDH em nenhuma concentração testada, considerando o tempo de 24h. Semelhante ao presente estudo, o composto MI-J promoveu o aumento da liberação da enzima, sugerindo maior citotoxicidade, enquanto que o MI-D não alterou sua liberação nas menores concentrações, de maneira similar ao estudo de Gozzi e colaboradores (2015). No entanto, diferentemente do descrito por Gozzi, na concentração de 50  $\mu$ M, os derivados foram mais citotóxicos.

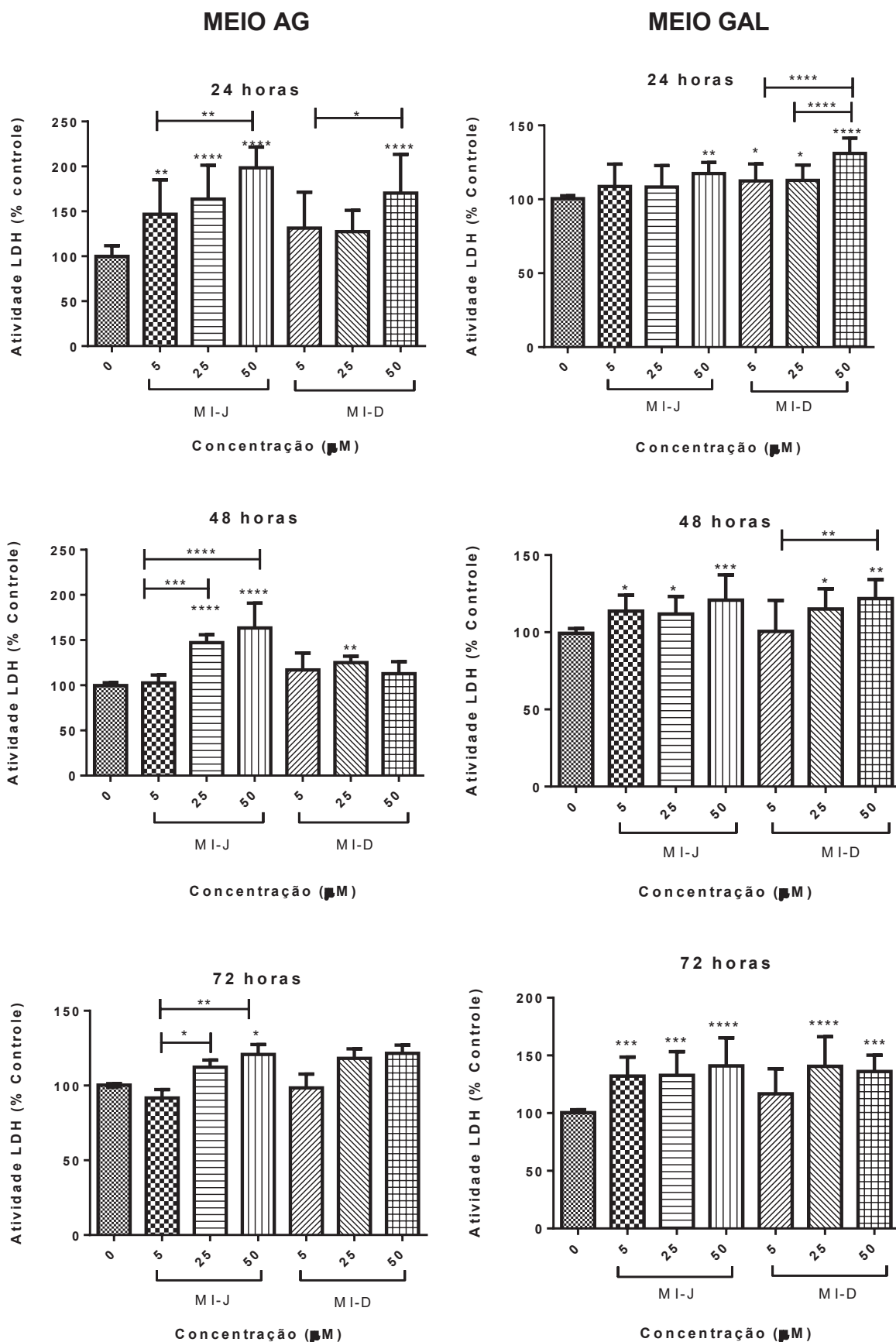
Em relação ao meio GAL, observou-se nas primeiras 24h na maior concentração (50  $\mu$ M), um aumento da liberação da enzima LDH em torno de 17% para o MI-J e de ~31% para o MI-D. Da mesma maneira, em 48h de exposição aos compostos, as alterações foram menos significativas na concentração de 50  $\mu$ M, sendo de ~12% para o MI-J e ~17% para o MI-D. Após 72h de incubação, o composto MI-J promoveu o aumento da liberação da LDH em ~32%, ~42% e ~34%, respectivamente para as três concentrações, 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M. A presença do MI-D, nas concentrações de 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M, aumentou em ~30% a liberação da enzima. Considerando as três concentrações, observou-se que a liberação da LDH foi semelhante para a exposição ao MI-J, sem diferença estatística entre as

concentrações, enquanto que para o MI-D houve diferença estatística entre as três concentrações nas primeiras 24h de incubação.

Os resultados de viabilidade com o corante cristal violeta (FIGURA 9), para as células HepG2 cultivadas no meio AG, foram semelhantes aos obtidos com o método do MTT, para a maior concentração utilizada (50  $\mu\text{M}$ ) dos compostos. A redução da viabilidade foi de quase 90% para todos os tempos (24h, 48h e 72h) e para os dois compostos. Com relação ao MI-J, na menor concentração (5  $\mu\text{M}$ ), a redução da viabilidade foi de ~15% para os tempos de 24h e 48h e de ~25% após 72h. Na concentração intermediária (25  $\mu\text{M}$ ), a redução da viabilidade foi de ~50%, ~30% e ~11% para os tempos de 24h, 48h e 72h, respectivamente. Considerando os três tempos de incubação, pode-se dizer que a redução da viabilidade foi dose e tempo dependente, apresentando diferença estatística entre quase todas as concentrações em cada tempo avaliado, com exceção das 72h, onde as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  não apresentaram diferença significativa entre si.

Após 24h de incubação, o MI-D reduziu a viabilidade em ~18% e ~50%, para as concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Com 48h de incubação, a redução na menor concentração (5  $\mu\text{M}$ ) foi de ~27% e na concentração intermediária (25  $\mu\text{M}$ ) houve diminuição de ~41%. No tempo de 72h, a citotoxicidade foi de ~25 e 53% para as concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e ~25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Esse composto também apresentou citotoxicidade concentração e tempo dependente, sendo que entre todas as concentrações observou-se diferença estatística, nos três tempos de incubação.

FIGURA 8 - EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 – LIBERAÇÃO DA LDH



FONTE: O autor (2018).

NOTA: As células HepG2 ( $1 \times 10^4$ ) foram adicionadas em placa de 96 poços com meio AG (**A.**) ou GAL (**B.**) para adesão por 24h. Após esse período, foram adicionados os derivados MI-D e MI-J (5,25 e 50  $\mu\text{M}$ ), seguindo-se incubação por 24h, 48h e 72h. O ensaio controle (C) foi realizado na ausência do mesoiônico e presença de DMSO 1%. A liberação da enzima LDH foi avaliada no sobrenadante das culturas como descrito no item 5.4.1.2 da sessão Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos como liberação em relação ao controle (media  $\pm$  desvio padrão) de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. Em **A.** 100% corresponde a U/L de  $62,09 \pm 6,8$  para 24h,  $61,90 \pm 3,3$  para 48h e  $72,23 \pm 2,3$  para 72h. Em **B.** 100% corresponde a U/L  $35,08 \pm 1,5$  para 24h,  $53,5 \pm 2,8$  para 48h e  $33,4 \pm 2,1$  para 72h. \*\*\*,\*\*\*\*,\*\*\*\*\* valores significativamente diferentes em  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$  respectivamente.

Com relação às células cultivadas em meio GAL, observou-se uma maior citotoxicidade nas menores concentrações do MI-J, em comparação ao meio AG. Na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , houve uma redução da viabilidade de ~24% já nas primeiras 24h, que se manteve em 48h. Uma redução de ~33% ocorreu após 72h de incubação. Quando a concentração foi de 25  $\mu\text{M}$ , a redução foi de ~50%, ~82% e ~60% para os tempos de 24h, 48h e 72h de incubação, respectivamente. Na maior concentração do MI-J (50  $\mu\text{M}$ ), a redução foi similar nos três tempos de incubação, sendo em torno de 80%. Nesse ensaio, no tempo de 24h observou-se maior diferença estatística entre as três concentrações e a citotoxicidade foi maior no meio GAL em relação ao meio AG.

De acordo com os resultados deste ensaio, o MI-D também foi menos citotóxico que o MI-J. Considerando as primeiras 24h, observou-se uma redução da viabilidade de ~27%, 53% e 70% para as três concentrações avaliadas 5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Após 48h de incubação com o composto, na menor concentração (5  $\mu\text{M}$ ) a redução foi de ~12%; para a concentração intermediária (25  $\mu\text{M}$ ) foi de ~42% e na maior (50  $\mu\text{M}$ ) a redução da viabilidade foi de ~77%. Em 72h de incubação, a viabilidade foi reduzida em 21%, 76% e 77% nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Considerando os três tempos, observou-se diferença estatística entre todas concentrações desse composto e da mesma forma que o MI-J, a citotoxicidade foi mais pronunciada em meio GAL.

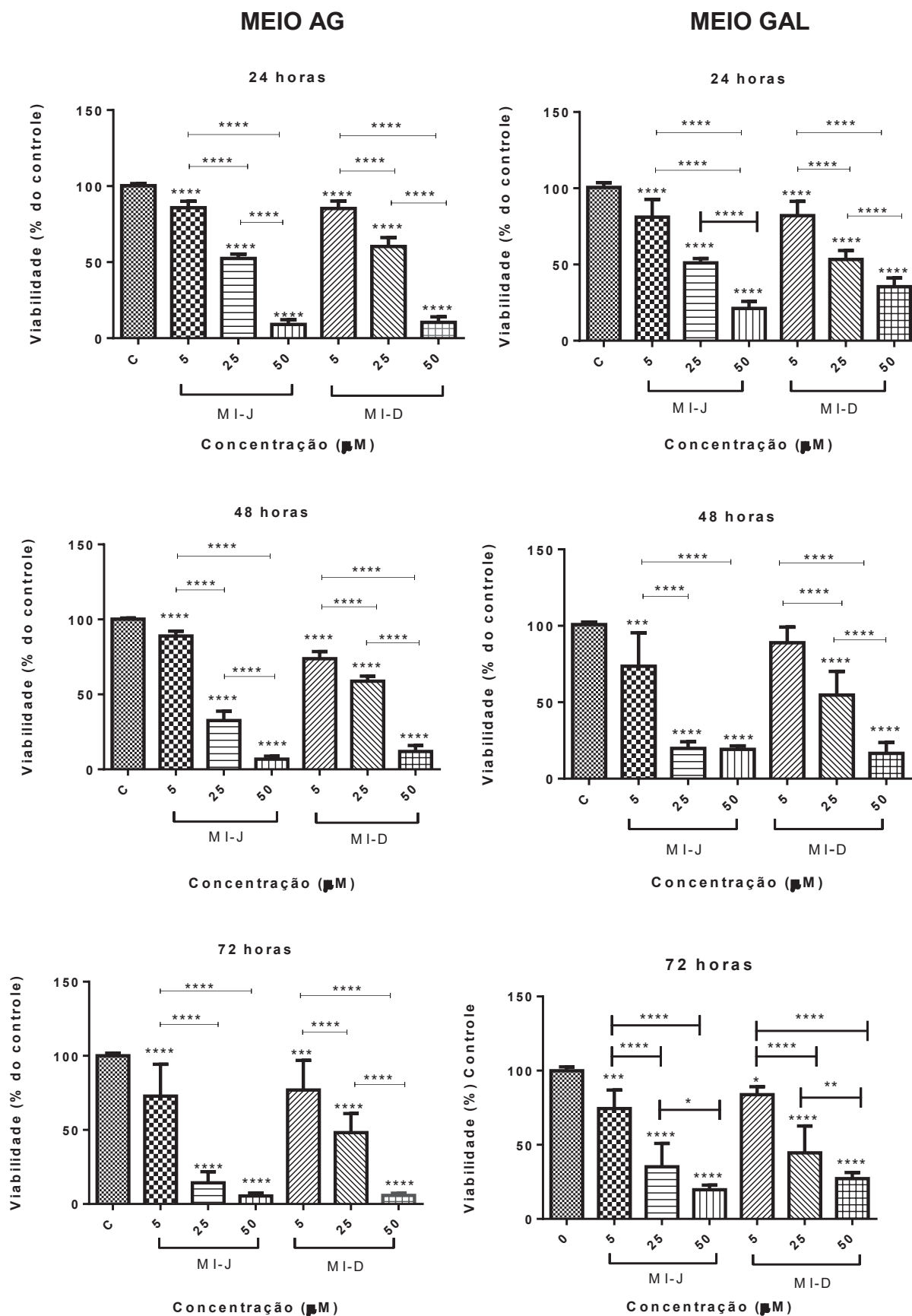
A citotoxicidade dos derivados MI-J e MI-D também foi avaliada em outras linhagens de células tumorais. Senff-Ribeiro e colaboradores (2003) demonstraram em células de melanoma murino (B16-F10), que a exposição ao MI-D (50  $\mu\text{M}$ ) causou a morte celular (redução de 100% da viabilidade) já nas primeiras 24h de incubação. Por outro lado, o composto MI-J não alterou significativamente a

viabilidade de células B16-F10 mesmo em maior concentração (75  $\mu\text{M}$ ) e tempo de exposição de 72h (SENFF-RIBEIRO et al., 2004a).

Em linhagens celulares de melanoma humano (MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO), o MI-D (50  $\mu\text{M}$ ) foi muito citotóxico. Em células MEL-85, a viabilidade foi reduzida em aproximadamente 80% em 24h e, em 48h, a citotoxicidade chegou a 100%. Na linhagem SK-MEL, a incubação com o MI-D a 25 e 50  $\mu\text{M}$ , reduziu a viabilidade em ~70% e 83% após 24h de incubação. Para as células A2058, em 24h de incubação a viabilidade foi reduzida em 88% e 93% nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A linhagem MEWO foi a menos sensível aos derivados, ocorrendo uma redução de 8% no número de células viáveis após a exposição ao MI-D (25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ), nas primeiras 24h de incubação (SENFF-RIBEIRO et al., 2004b).

Quando estes resultados são comparados ao do presente estudo, pode-se sugerir que o MI-D é mais citotóxico para as células de melanoma murino e humano do que para células de hepatocarcinoma (HepG2). Por outro lado, o MI-J é mais citotóxico para as células de hepatocarcinoma em comparação as células de melanoma murino. Estas diferenças podem se relacionar aos substituintes dos compostos e as características químicas decorrentes da substituição. Neste contexto, Pires et al. (2010) avaliaram os efeitos dos derivados mesoiônicos MI-J, MI-2,4 diF e MI-4F na bioenergética mitocondrial, e observaram que os efeitos dos compostos têm importante relação com os substituintes do anel heterocíclico. Os compostos fluorados exerceram efeitos mais intensos sobre a mitocôndria, do que o MI-J e o MI-D (CADENA et al., 1998; PIRES et al., 2010). Os autores sugerem que o efeito desses derivados, portanto, varia de acordo com a hidrofobicidade dos substituintes do anel heterocíclico, que interagem de maneira diferente com a membrana mitocondrial interna (PIRES et al., 2010). Ao avaliar os efeitos na fluidez das membranas, os compostos MI-2,4 diF e MI-4F diminuíram a fluidez apenas na região hidrofóbica, efeitos mais discretos em relação ao MI-J e MI-D, que diminuíram a fluidez das membranas nas regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (CADENA et al., 2002; PIRES et al., 2011).

FIGURA 9 - EFEITO DOS DERIVADOS MESOIOÑICOS MI-J E MI-D SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 EM MEIO AG E GAL – MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA



FONTE: O autor (2018).

NOTA: as células HepG2 ( $1 \times 10^4$ ) foram adicionadas a placas de 96 poços com meio AG (**A.**) ou GAL (**B.**) para aderência por 24h. Após esse período, foram adicionados os derivados MI-D e MI-J (0, 5, 25 e  $50 \mu\text{M}$ ) por 24h, 48h e 72h. O controle (C) foi realizado na ausência do mesoiônico e presença de DMSO 1%. Terminado o tempo de incubação, a viabilidade foi avaliada pelo método do cristal violeta como descrito no item 5.4.1.3 da sessão Material e métodos. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (media  $\pm$  desvio padrão) de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. Em **A** 100% corresponde a absorbância de  $2,6 \pm 0,06$  para 24h,  $2,5 \pm 0,03$  para 48h e  $2,3 \pm 0,02$  para 72h. Em **B** 100% corresponde a absorbância de  $0,8 \pm 0,05$  para 24h,  $1,3 \pm 0,06$  para 48h e  $0,8 \pm 0,04$  para 72h. \*, \*\*\*, \*\*\*\* valores significativamente diferentes em  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , respectivamente.

Comparando os efeitos do MI-J e MI-D, observa-se que no presente estudo o composto MI-J foi citotóxico para as células HepG2 cultivadas nos dois meios (AG e GAL), causando maior redução da viabilidade celular e aumento da liberação da enzima LDH, com efeitos mais pronunciados na maior concentração utilizada ( $50 \mu\text{M}$ ). Considerando os efeitos já relatados sobre a bioenergética mitocondrial, com a substituição dos meios de cultivo e reprogramação metabólica esperava-se que o MI-J apresentasse maior citotoxicidade em meio GAL, o que realmente ocorreu como evidenciado no ensaio do cristal violeta e MTT, principalmente nas concentrações de 5 e  $25 \mu\text{M}$ . Com relação a liberação da LDH, observa-se que no meio GAL os efeitos foram menos pronunciados. Analisando essas diferenças nos resultados entre os dois meios, deve-se considerar o fato de que as células em meio GAL apresentam menor aderência à superfície de cultivo, quando comparadas as cultivadas em meio AG. Isto se reflete nos valores correspondentes aos ensaios controle em cada ensaio (Legendas das FIGURAS 6, 7 e 8).

Em relação aos resultados de viabilidade em meio GAL, não há na literatura dados com os derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos para comparação. No entanto, Brandt e colaboradores (2016) avaliaram um composto também mesoiônico, mas da classe das sydnonas, o SYD-1, em células HepG2, nas mesmas condições de cultivo utilizadas no presente estudo. No ensaio do MTT, os autores demonstraram que SYD-1 em  $25 \mu\text{M}$ ,  $35 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$ , promoveu a redução da viabilidade celular em  $\sim 10\%$ ,  $\sim 13\%$  e  $\sim 22\%$ , respectivamente, após 24h de incubação. Por sua vez, quando as células foram cultivadas em meio GAL a redução foi mais acentuada, de  $\sim 13\%$ ,  $\sim 18\%$  e  $\sim 49\%$  nas mesmas concentrações. Em concordância com estes resultados, a liberação da LDH após 24h de exposição ao SYD-1 ( $50 \mu\text{M}$ ) aumentou em 8% para o meio AG e 18% para o meio GAL. Pelo método do cristal violeta os autores obtiveram resultados semelhantes ao do MTT, destacando-se a redução da

viabilidade mais acentuada quando as células foram cultivadas em meio GAL (BRANDT et al., 2016).

Em comparação ao trabalho de Brandt (2016), no presente estudo observa-se que os derivados da classe 1,3,4 – tiadiazóis mesoiônicos exercem efeito citotóxico mais significativo em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) que os derivados da classe das sydnonas, nos dois meios de cultivo testados, porém os compostos são de classes e estruturas diferentes, o que limita a comparação absoluta dos efeitos. Ainda, embora o SYD-1 também comprometa a fosforilação oxidativa, as concentrações que causam tal efeito ( $\mu\text{mol/mg}$  de proteína mitocondrial) são maiores do que as descritas para os derivados tiadiazóis MI-J e MI-D ( $\text{nmol/mg}$  de proteína mitocondrial) (HALILA et al.; 2007; PIRES et al.; 2010).

No presente estudo observou-se certa divergência em relação aos resultados dos ensaios de viabilidade celular. O único método que evidenciou redução da viabilidade com diferença significativa entre todas as concentrações foi o método do cristal violeta. A maior divergência foi observada para a concentração intermediária ( $25 \mu\text{M}$ ), que não apresentou um padrão de redução da viabilidade, variando em cada tempo de incubação e método utilizado. Em  $5 \mu\text{M}$  ambos compostos demonstraram pouco efeito citotóxico, enquanto com  $50 \mu\text{M}$  os efeitos na viabilidade foram bastante significativos.

Há controvérsias quanto ao melhor método para avaliar a viabilidade celular. Sabe-se que a redução do MTT a formazan, ao contrário do descrito em alguns estudos, ocorre não somente na mitocôndria, mas também em lisossomos e endossomos (LIU et al., 1997; STOCKERT et al., 2012). Este método apesar de muito utilizado para avaliar a viabilidade celular na presença de determinados agentes, possui interferentes. Neste sentido, sabe-se que a redução do MTT pode ser induzida pela presença de inibidores de transportadores de drogas, interferons, entre outros. A diminuição dos níveis de NADH ou NADPH e drogas que causam alterações mitocondriais também podem alterar os resultados do ensaio (SIMS; PLATTNER, 2009). Segundo Jakstys e colaboradores (2015), este ensaio, por avaliar a liberação metabólica celular, deve ser utilizado como complementar a outros ensaios de citotoxicidade.

Mickuviene e colaboradores (2004) sugeriram que a sensibilidade dos métodos de viabilidade celular está diretamente relacionada aos parâmetros nos

quais se baseiam. Os autores avaliaram a ação citotóxica de dois compostos fotosensibilizadores (m-THPC e TPPS<sub>4</sub>), que induzem danos na membrana celular, e dois compostos citostáticos, a Doxorubicina que se acumula no núcleo e Vincristina que se liga aos microtúbulos. As células utilizadas foram fibroblastos de rim de hamsters (BHK-21) e células epiteliais de hepatoma murino (MH-22A). Os métodos de viabilidade utilizados foram: MTT, coloração com cristal violeta, coloração com azul de tripan e avaliação da liberação da LDH. Na avaliação da viabilidade, o método do Cristal violeta apresentou maior sensibilidade na maioria dos testes, em ambas linhagens celulares. O MTT foi mais sensível para os testes com o m-THPC e a doxorubicina. Os resultados dos ensaios do azul de tripan e LDH foram menos expressivos e considerados pouco sensíveis. Assim os autores concluíram que os ensaios de liberação da LDH e coloração com azul de tripan são mais sensíveis quando há comprometimento da permeabilidade da membrana celular. Já a redução do MTT será sensível quando funções mitocondriais ou lisossomais são afetadas. Por fim, o método do cristal violeta poderá apresentar resultados mais significativos quando a aderência celular é comprometida (MICKUVIENE et al., 2004).

Ainda neste contexto, Forbes e colaboradores (2014) utilizaram linhagens de células de câncer de próstata (DU-145 e PC-3), para testar a citotoxicidade de 11 diferentes flavonoides. Os autores observaram que os compostos testados interferiram na metodologia do cristal violeta e superestimaram o número de células viáveis na metodologia do Azul de Alamar, reduzindo o corante mesmo na ausência de células. Nesse ensaio a coloração com azul de tripan foi considerada a mais confiável (FORBES et al., 2014).

Dessa forma é importante a realização de diferentes ensaios de viabilidade, para compreender melhor os resultados de citotoxicidade, uma vez que cada método possui suas particularidades e fundamentos, o que pode influenciar nos resultados. A tabela 2 apresenta um resumo dos resultados dos ensaios de viabilidade celular realizados neste estudo.

TABELA 1 - EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2

DMEM AG							
		MI-J			MI-D		
		5 µM	25 µM	50 µM	5 µM	25 µM	50 µM
MTT (% de <u>redução</u> da viabilidade em relação ao controle)	24h	~10%	~19%	~90%	~12%	~23%	~74%
	48h	~11%	~28%	~93%	~13%	~69%	~90%
	72h	~18%	~46%	~90%	~10%	~57%	~83%
Cristal Violeta (% de <u>redução</u> da viabilidade em relação ao controle)	24h	~14%	~47%	~90%	~15%	~39%	~89%
	48h	~11%	~67%	~93%	~26%	~41%	~88%
	72h	~27%	~85%	~94%	~23%	~52%	~94%
Liberação da LDH (% de <u>aumento</u> da liberação em relação ao controle)	24h	~14%	~48%	~90%	-	-	~89%
	48h	-	~68%	~93%	-	~25%	-
	72h	-	-	~20%	-	-	-
DMEM GAL							
		MI-J			MI-D		
		5 µM	25 µM	50 µM	5 µM	25 µM	50 µM
MTT (% de <u>redução</u> da viabilidade em relação ao controle)	24h	~57%	~64%	~66%	~20%	~47%	~67%
	48h	~54%	~65%	~76%	~36%	~61%	~64%
	72h	~43%	~66%	~86%	~30%	~60%	~80%
Cristal Violeta (% de <u>redução</u> da viabilidade em relação ao controle)	24h	~19%	~49%	~78%	~18%	~46%	~64%
	48h	~26%	~80%	~80%	~11%	~45%	~83%
	72h	~25%	~64%	~80%	~16%	~55%	~73%
Liberação da LDH (% de <u>aumento</u> da liberação em relação ao controle)	24h	-	-	~17%	~12%	~12%	~31%
	48h	-	~13%	~21%	-	~15%	~22%
	72h	~32%	~33%	~41%	-	~40%	~36%

FONTE: O autor (2018).

NOTA: Os símbolos (-) representam resultados não significativos estatisticamente.

## 6.2 RESPIRAÇÃO CELULAR

Para avaliar os efeitos dos compostos sobre a respiração das células HepG2 foram realizados ensaios com os derivados MI-J e MI-D, nas concentrações de 5 µM

e 25  $\mu\text{M}$  em 24h de incubação. O tempo e as concentrações foram definidos pelos resultados de viabilidade celular apresentados no item anterior. Foram utilizadas células não permeabilizadas e como meio de reação o próprio meio de cultivo das células (AG ou GAL). Para garantir que somente as células viáveis fossem avaliadas no ensaio, realizou-se o ensaio com o corante azul de Tripán, cujos resultados são apresentados na tabela 2. Esse ensaio foi realizado nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  dos compostos MI-J e MI-D, no tempo de 24h.

Os resultados do ensaio do azul de tripan também evidenciaram uma redução da viabilidade celular, porém, em menor intensidade da observada nos outros ensaios realizados (MTT, liberação de LDH e coloração com cristal violeta). No meio AG o composto MI-J reduziu a viabilidade em ~5% e ~12% nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Resultado semelhante foi obtido para o MI-D que reduziu a viabilidade em ~4% na menor concentração (5  $\mu\text{M}$ ) e 10% na maior (25  $\mu\text{M}$ ).

TABELA 2 - EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 – COLORAÇÃO DO AZUL DE TRIPAN

**Viabilidade (% em relação ao controle)**

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	DMEM AG		DMEM GAL	
	MI-J	MI-D	MI-J	MI-D
5	95,19 $\pm$ 1,3 <sup>***</sup>	96,62 $\pm$ 1,3 <sup>**</sup>	96,46 $\pm$ 0,6 <sup>****</sup>	96,47 $\pm$ 0,6 <sup>**</sup>
25	88,06 $\pm$ 2,4 <sup>****</sup>	90,37 $\pm$ 1,7 <sup>****</sup>	89,01 $\pm$ 1,2 <sup>****</sup>	90,63 $\pm$ 1,9 <sup>****</sup>

FONTE: O autor (2018).

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.4.1.4 da sessão de Material e Métodos. As células HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) foram distribuídas em placas de 60mm e cultivadas em meio AG ou GAL com os derivados MI-D e MI-J (0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ ) por 24h. Após estes tempos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas com meio de cultura. A contagem das células viáveis e não viáveis (coradas pelo azul de Tripán) foi realizada em câmara de Neubauer. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* valores significativamente diferentes em  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , respectivamente.

Também de forma diferente aos outros métodos de viabilidade, quando as células foram cultivadas em meio GAL, valores similares de redução de viabilidade foram obtidos em comparação ao meio AG. Também não houve diferença em

relação aos derivados, observando-se uma redução de ~4% e ~ 10%, para as concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente, para ambos os derivados.

O menor comprometimento da viabilidade das células HepG2 frente aos derivados avaliada pelo método do azul de Tripán pode ser decorrente do procedimento experimental. Neste ensaio, antes da tripsinização das células o meio de cultura foi descartado. Com isto células mortas ou em vias de morte, que não estavam aderidas, podem ter sido descartadas com o meio de cultura. De fato este, é um limitante do método que deve ser considerado (MICKUVIENE et al., 2004). Assim, o efeito de redução da viabilidade pode ter sido minimizado. No entanto, é importante ressaltar que para os ensaios de respiração as células devem estar viáveis e, portanto, o método do azul de Tripán foi adequado para este fim.

Com relação ao ensaio, foram avaliados quatro estados da respiração (HUTTER et al., 2006), descritos a seguir:

*Estado basal* – corresponde ao fluxo respiratório na ausência de inibidores, substratos exógenos ou desacopladores;

*Estado leak* - corresponde a respiração na presença de oligomicina, um inibidor a ATPsintase. Neste estado, o fluxo de oxigênio diminui em resposta ao vazamento de prótons para a matriz mitocondrial.

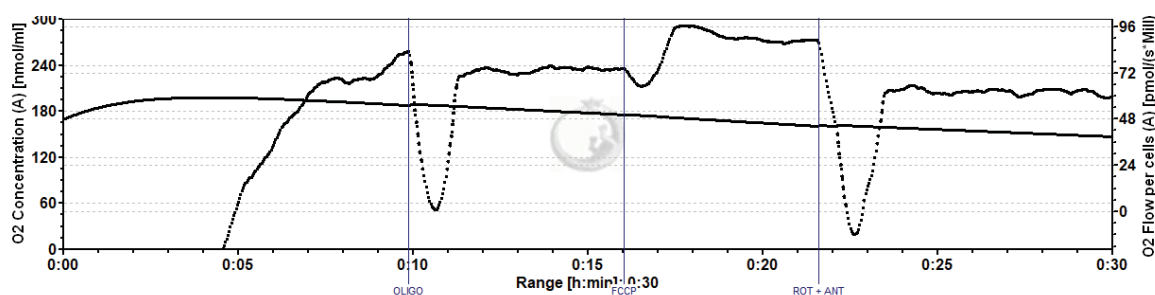
*Estado desacoplado* – corresponde ao fluxo respiratório na ausência de substratos e na presença de oligomicina e do desacoplador FCCP. O FCCP é um desacoplador que promove o colapso do potencial eletroquímico de prótons, aumentando o consumo de oxigênio.

*Estado inibido* - corresponde a respiração na ausência de substratos exógenos e na presença de oligomicina, FCCP, rotenona e antimicina. A rotenona e a antimicina inibem os complexos I e III da cadeia respiratória, respectivamente.

Os estados respiratórios (na ausência dos compostos) são apresentados na FIGURA 10, no qual a linha contínua representa a concentração de oxigênio ( $\text{nmol.mL}^{-1}$ ) e a linha pontilhada o fluxo de oxigênio [ $\text{pmols}/(\text{seg} \times 10^6 \text{ células})$ ]. Observa-se que a respiração durante o estado basal diminui após a adição de oligomicina, caracterizando o estado *leak*. Em seguida ocorre um aumento no fluxo (linha pontilhada), em resposta à adição de FCCP (Estado desacoplado), na tentativa de reestabelecer o gradiente eletroquímico de prótons. Após as adições de rotenona e antimicina, a respiração mitocondrial é totalmente inibida (Estado inibido)

e o fluxo de oxigênio restante corresponde ao consumo de oxigênio não mitocondrial. Os resultados obtidos a partir destes traçados foram analisados pelo Software DataLab4® e os estados Basal, *Leak* e Desacoplado obtidos após a subtração da respiração do estado Inibido, dados esses que correspondem apenas a respiração mitocondrial.

FIGURA 10 - TRAÇADO DEMONSTRATIVO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO CELULAR EM OXÍGRAFO OROBOROS-2K

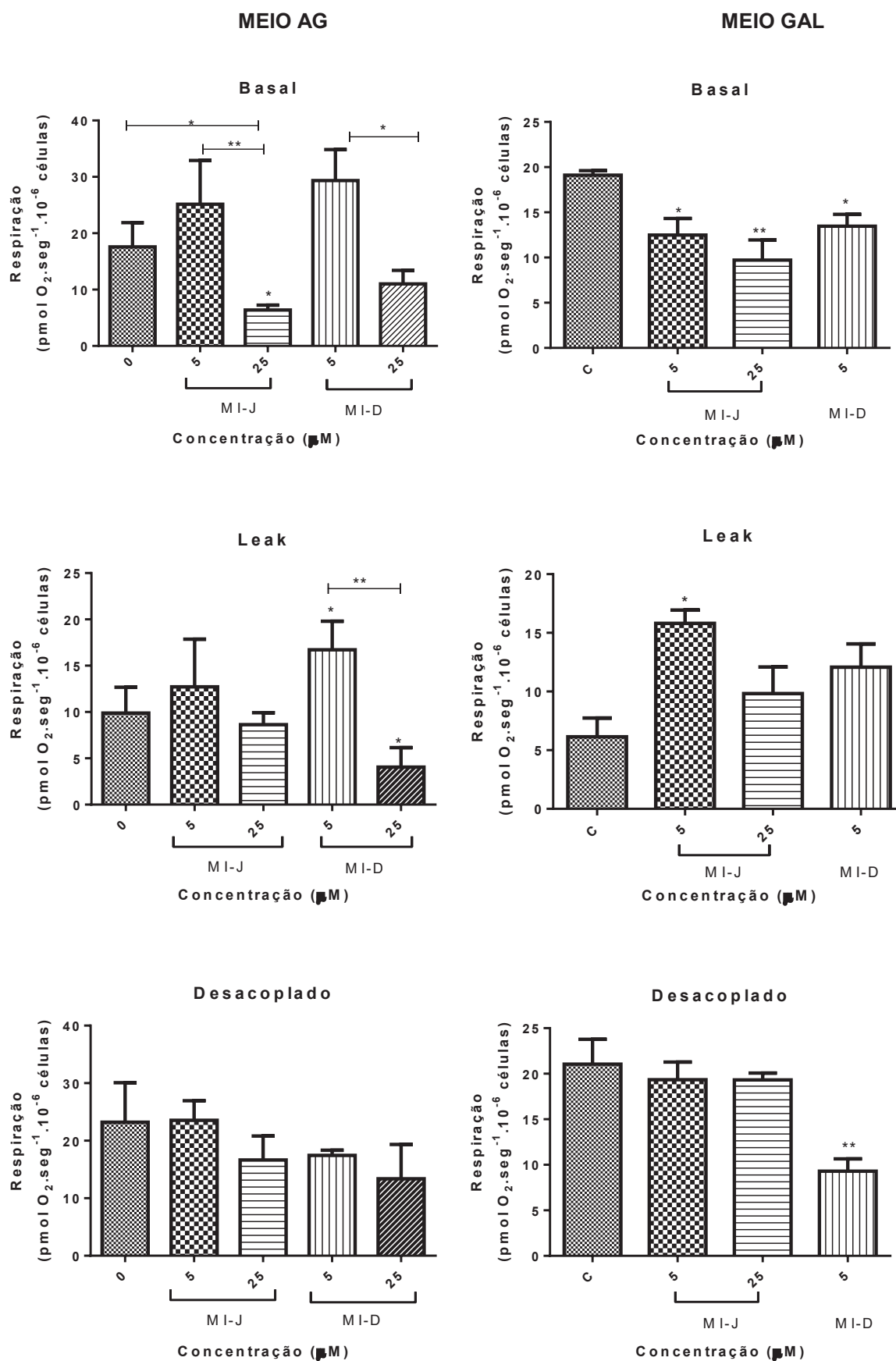


FONTE: O autor (2018).

NOTA: As condições experimentais estão descritas na seção de Material e métodos, no item 5.4.2. O sistema de reação foi o próprio meio de cultivo das células (AG ou GAL). Adições: FCCP; Oligo-oligomicina; ROT – rotenona; ANT – antimicina. Linha contínua: concentração de O<sub>2</sub>; Linha pontilhada – fluxo de O<sub>2</sub>.

Os resultados destes ensaios são mostrados na FIGURA 11. Em meio AG, no estado basal, o MI-J promoveu uma inibição significativa do consumo de oxigênio (~50%) na concentração de 25  $\mu$ M. Já no estado *leak*, este composto na menor concentração (5  $\mu$ M), causou um aumento na respiração. Nesse mesmo estado da respiração para o derivado MI-J é observada uma tendência de aumento, enquanto na concentração de 25  $\mu$ M, o derivado MI-D promoveu uma redução no consumo de oxigênio. No estado desacoplado não foram observadas alterações significativas. Em meio GAL, na concentração de 25  $\mu$ M, o composto MI-D reduziu acentuadamente o fluxo de oxigênio e não foi possível obter valores suficientes para análise estatística nos três estados da respiração (Basal, *Leak* e Desacoplado). No estado basal, ambos derivados promoveram uma inibição significativa do consumo de oxigênio (MI-J em 5  $\mu$ M e 25  $\mu$ M, MI-D 5  $\mu$ M), enquanto no estado *Leak* ocorreu um aumento da respiração apenas na concentração de 5  $\mu$ M do MI-J. No estado desacoplado, apenas o composto MI-D (5  $\mu$ M) causou uma redução (~50%) no consumo de oxigênio.

FIGURA 11 - EFEITOS DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-D E MI-J NA RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2



FONTE: O autor (2018).

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.4.2 da sessão de Material e Métodos. As células HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) foram cultivadas em meio AG (A) ou GAL (B), tratadas com os compostos MI-D e MI-J ( $5 \mu\text{M}$  e  $25 \mu\text{M}$ ) por 24h, coletadas e transferidas para as câmaras do oxígrafo Oroboros 2-K, onde o fluxo de oxigênio foi determinado na ausência de inibidores ou desacoplador (estado basal), na presença de oligomicina (estado leak) na presença de FCCP (estado desacoplado). Ensaios controle foram realizados na ausência de mesoiônicos e presença de DMSO 1%. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. \*, \*\*, \*\*\* valores significativamente diferentes em  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , respectivamente.

Resumidamente, com relação aos efeitos de cada composto, observa-se que o fluxo de oxigênio nas células HepG2 cultivadas em meio AG foi reduzido significativamente no estado basal para o derivado MI-J em sua maior concentração ( $25 \mu\text{M}$ ), enquanto para o MI-D no estado *Leak* foi observado um aumento na menor concentração ( $5 \mu\text{M}$ ), seguido de uma redução significativa no consumo de oxigênio na concentração de  $25 \mu\text{M}$ . Em meio GAL, no estado basal o MI-J exerceu uma inibição da respiração em ambas as concentrações testadas e um aumento significativo do estado *Leak* na concentração de  $5 \mu\text{M}$ , não exercendo alterações significativas no estado desacoplado. O derivado MI-D promoveu uma inibição dos estados basal e desacoplado. Esses efeitos mais pronunciados no meio GAL vão de acordo com os resultados de viabilidade onde esses compostos foram mais citotóxicos em células HepG2, cultivadas nesse meio onde a fosforilação oxidativa é considerada a via metabólica principal para a obtenção de energia.

Pires e colaboradores (2010) demonstraram que o MI-J promove a redução da velocidade do transporte de elétrons na cadeia respiratória durante o estado 3 (presença de ADP) e um pequeno aumento no estado 4 (ausência de ADP devido a síntese de ATP), uma característica de agentes desacopladores da fosforilação oxidativa. Para comprovar esse efeito, os autores realizaram experimentos de consumo de oxigênio na presença de oligomicina A, um inibidor da síntese de ATP e, portanto, do transporte de elétrons na cadeia respiratória, uma vez que estes processos são acoplados (LUZ et al., 2015). Nestas condições, o restabelecimento do fluxo de elétrons e consequente consumo de oxigênio somente ocorre se a reentrada de prótons para a matriz mitocondrial for facilitada devido a alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna ou na presença de um agente desacoplador, como por exemplo, o FCCP (LUZ et al., 2015). Quando avaliados os efeitos do MI-J em presença de oligomicina, Pires e colaboradores (2010) observaram um aumento no consumo de oxigênio semelhante ao promovido pelo

FCCP, quando adicionado nestas condições, efeito similar também demonstrado para o MI-D (CADENA et al. 1998). No presente estudo, observou-se um estímulo do estado *Leak* (em presença de oligomicina – meio GAL), que pode estar relacionado aos efeitos desacopladores demonstrados para esse composto.

Interessantemente, no presente estudo nota-se também uma inibição do estado desacoplado pelo derivado MI-D em meio GAL (FIGURA 11), o que pode estar relacionado com sua ação desacopladora da fosforilação oxidativa. Neste sentido, sabe-se que agentes desacopladores, em concentrações superiores àquelas que promovem o desacoplamento, reduzem a velocidade do transporte de elétrons (BERTINA; SLATER, 1975). Ainda neste contexto, Cadena e colaboradores (1998) avaliaram os efeitos do MI-D no consumo de oxigênio e observaram que o mesoiônico foi capaz de diminuir a velocidade do consumo de oxigênio em mitocôndrias desacopladas com FCCP, em que o transporte de elétrons ocorre em velocidade máxima. Na concentração de 50 nmol/mg de proteína mitocondrial o MI-D foi capaz de inibir em 62% a velocidade de consumo de oxigênio em relação ao controle. O derivado MI-J apresentou efeito menos pronunciado, diminuindo a velocidade de consumo de oxigênio em 26% em uma concentração de 65 nmol/mg de proteína mitocondrial (PIRES et al., 2010). No presente estudo observa-se que o MI-D exerceu uma inibição do estado desacoplado em sua menor concentração (5  $\mu$ M) no meio GAL, enquanto o MI-J não exerceu efeito, de forma semelhante aos achados de Pires e colaboradores, que descreveram efeitos menos pronunciados para este derivado quando comparado ao MI-D.

Em meio GAL, como esperado, os efeitos dos derivados foram mais pronunciados, principalmente o de inibição da respiração, já observado na menor concentração (estado basal – Figura 11). Também neste meio não foi possível determinar o fluxo de oxigênio para o MI-D na maior concentração (25 $\mu$ M), devido aos valores serem muito baixos. Além disso, observou-se que as células cultivadas em meio GAL apresentavam valores inferiores de respiração quando comparadas àquelas cultivadas em meio HepG2. Experimentos adicionais, com os derivados em concentrações intermediárias as utilizadas neste estudo, devem ser realizados esclarecer os efeitos destes mesoiônicos sobre a respiração celular.

### 6.3 NÍVEIS DE LACTATO E PIRUVATO

Considerando os efeitos dos derivados sobre a viabilidade e respiração das células HepG2, foram avaliados os níveis de lactato e piruvato em células cultivadas em meio AG ou GAL e expostas aos derivados MI-J e MI-D, nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , no tempo de 24h.

Em meio AG, o composto MI-J promoveu o aumento dos níveis de lactato em ~18% e ~32% nas respectivas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ . Já o MI-D não exerceu efeito significativo na menor concentração (5  $\mu\text{M}$ ) e aumentou em ~32% os níveis de lactato na concentração de 25  $\mu\text{M}$ . Os níveis de piruvato não foram alterados por ambos os compostos (FIGURA 12).

As células tumorais apresentam uma alta produção de lactato que resulta em acidificação do meio, o que favorece a invasividade destas células (ROSSIGNOL *et al.*, 2004). O lactato pode ser metabolizado como fonte de energia e/ou transportado para células tumorais vizinhas e células endoteliais vasculares por meio de transportadores específicos (MCT1, MCT2, MCT3, MCT4) que direcionam seu fluxo. No fígado, o lactato pode ser convertido a piruvato por uma isoforma da enzima LDH e dar continuidade a gliconeogênese ou participar do metabolismo oxidativo (DOHERTY; CREVELAND, 2013; GRAY; TOMPINKS; TAYLOR, 2014).

Em células tumorais o piruvato tem papel essencial no metabolismo e conversão de energia, estimulando o efeito Warburg (WARBURG, 1956). Vários mecanismos descritos estão relacionados com esse fenótipo, como a regulação da isoenzima piruvato quinase (PKM2) e a expressão reduzida de transportadores mitocondriais (MPC1) de piruvato em alguns tipos de cancer, favorecendo o aumento da glicólise. Além disso, as células tumorais aumentam a expressão da Piruvato desidrogenase quinase (PDK), que fosforila o complexo piruvato desidrogenase (PDH), impedindo a conversão de piruvato a Acetil-CoA, e consequentemente sua participação no ciclo do ácido cítrico (SCHELL *et al.*, 2014; GIAMPAZOLIAS; TAIT, 2016).

Considerando os resultados de respiração celular (FIGURA 11), no estado basal, os derivados mesoiônicos na maior concentração (25  $\mu\text{M}$ ) promoveram uma inibição no fluxo de oxigênio. Esses resultados estão de acordo com o aumento nos níveis de lactato, que foi maior para a concentração de 25  $\mu\text{M}$ , indicando que nessa

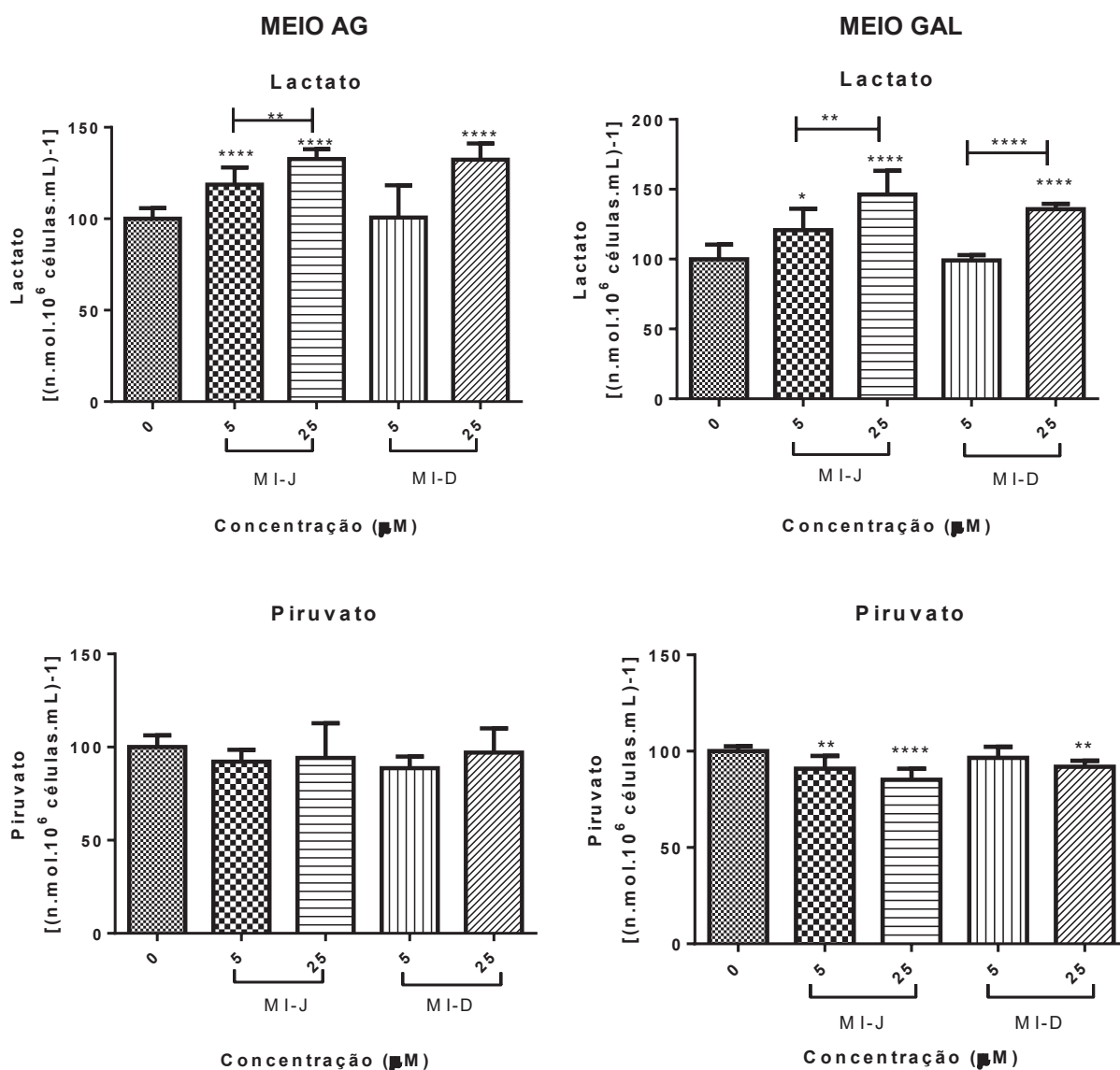
concentração pode estar ocorrendo uma inibição mais acentuada da respiração celular, desviando o metabolismo para a via glicolítica, para compensar a disfunção mitocondrial e garantir a produção de ATP. Esperava-se que os níveis de piruvato reduzissem, no entanto não foram alterados, o que sugere que os mesoiônicos podem exercer seus efeitos inibitórios não somente na mitocôndria, mas também na via glicolítica, hipóteses que necessitam ser melhor avaliadas por ensaios específicos como a mensuração da atividade das enzimas da via glicolítica.

O NADH formado principalmente na mitocôndria pelo ciclo do ácido cítrico é oxidado pelo complexo I, fornecendo elétrons para a cadeia respiratória, com a consequente síntese de ATP. A forma reduzida desta coenzima também é gerada no citosol pela glicólise, através da redução do piruvato a lactato. Sob condições de privação de oxigênio, como na isquemia, ocorre um aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup> mitocondrial, o que leva a ativação de outras vias metabólicas, como ativação da degradação do glicogênio, aumento da glicólise e produção de lactato, esta última promovendo a oxidação do NADH (ZHOU et al., 2005). Esse mecanismo poderia justificar o aumento da produção de lactato, acompanhando da redução da respiração durante o estado basal nas células HepG2 tratadas com os derivados mesoiônicos na concentração de 25  $\mu$ M (FIGURA 10).

Em meio GAL quando as células foram tratadas com o MI-J, os níveis de lactato aumentaram cerca de ~20% e ~46% nas concentrações de 5  $\mu$ M e 25  $\mu$ M, respectivamente. O MI-D não exerceu efeito significativo na concentração de 5  $\mu$ M, e em 25  $\mu$ M o composto aumentou em aproximadamente 35% os níveis de lactato. No mesmo meio, os níveis de piruvato diminuíram após a exposição ao MI-J, sendo a redução de 10% para a concentração de 5  $\mu$ M e 15% para 25  $\mu$ M. O MI-D promoveu a redução dos níveis de piruvato apenas na maior concentração (25  $\mu$ M), em ~9%. O aumento dos níveis de lactato e a redução do piruvato sugerem um aumento da glicólise anaeróbica nessas células, que ocorreria devido à inibição da fosforilação oxidativa, já descrita para os derivados (CADENA et al., 1998; PIRES et al., 2010). Tal inibição poderia estimular outras vias metabólicas para a produção de glucose, como a glutaminólise, que é considerada importante em células proliferativas em ambientes hipóxicos ou em células com disfunções mitocondriais (AHN; METALLO, 2015). A galactose presente no meio GAL também poderia ser fosforilada a galactose 1-fosfato, isomerizada a glucose 1-fosfato e utilizada na glicólise e via das

pentoses fosfato (MOKTADUZZAMAN et al., 2015). Deve-se considerar também que a redução dos níveis de piruvato no meio GAL pode resultar de sua utilização para a gluconeogênese, sendo essa via importante para manter o suprimento de glicose celular (NIN et al., 2013).

FIGURA 12 - EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D SOBRE OS NÍVEIS DE LACTATO E PIRUVATO EM CÉLULAS HEPG2



FONTE: O autor (2018).

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.4.3 da sessão Materiais e Métodos. As células HepG2 ( $1 \times 10^6$ /mL) foram plaqueadas e tratadas com MI-D e MI-J (5  $\mu$ M e 25  $\mu$ M) por 24h em meio AG (A) e GAL (B). Os níveis de piruvato e lactato foram dosados no sobrenadante. O controle foi realizado na ausência do mesoiônico e presença de DMSO 1%. Em **A**, 100% corresponde em nmol/mL  $616,40 \pm 5,80$  para o lactato e  $94,92 \pm 6,04$  para o piruvato. Em **B**, 100% corresponde em nmol/mL  $409,72 \pm 10,39$  para o lactato e  $100,21 \pm 2,51$  para o piruvato. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* valores significativamente diferentes em  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente.

#### 6.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP

Para avaliar se os efeitos promovidos pelo MI-J e MI-D seriam capazes de comprometer a disponibilidade de energia nas células HepG2, foram determinados os níveis de ATP nestas células incubadas com 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  dos derivados por 24h. Os resultados estão apresentados na FIGURA 13. Observa-se que em meio AG, o MI-J foi o derivado com efeito mais significativo nos níveis de ATP, causando uma redução de aproximadamente 27% em relação ao controle. O MI-D também promoveu uma redução, porém, os resultados não foram estatisticamente diferentes em relação ao controle. Esses resultados estão de acordo com os níveis de lactato e piruvato nessas células, sugerindo que os compostos alteram pouco a produção de ATP pela via glicolítica, favorecida no meio AG.

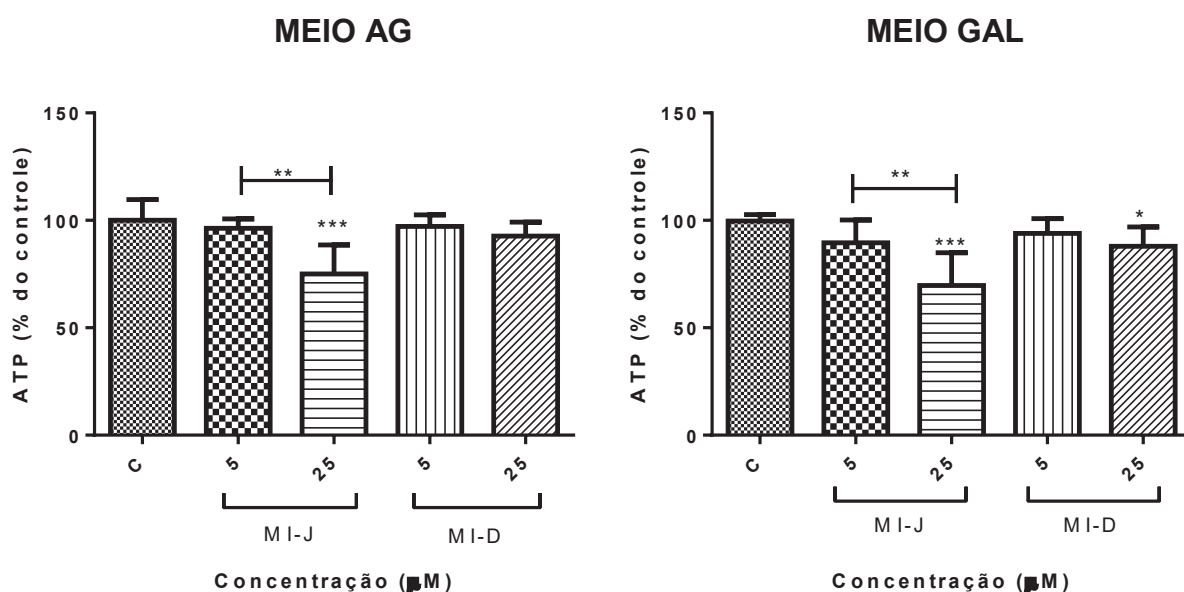
Em meio GAL, os efeitos foram mais significativos. O derivado MI-J novamente foi o mais efetivo, reduzindo os níveis de ATP em ~14% e ~38% nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O MI-D causou uma redução de ~7% na concentração de 5  $\mu\text{M}$  e 15% com 25  $\mu\text{M}$ . Considerando os resultados anteriores de viabilidade e níveis de lactato e piruvato, observa-se um perfil semelhante nos níveis de ATP, onde os efeitos do derivado MI-J foram mais acentuados, principalmente quando o meio de cultura foi o GAL.

Marroquin e colaboradores (2007) avaliaram as respostas metabólicas das células HepG2 cultivadas em meio com alta glucose (25mM) e sem glucose, este último suplementado com glutamina (6mM) e galactose (10mM). Os autores observaram que na ausência de glucose, as células tratadas com inibidores e desacoplador mitocondriais clássicos (oligomicina, rotenona e FCCP) diminuíram consideravelmente os níveis de ATP celular, comparado ao outro meio de cultivo. Segundo os autores, após 24h de tratamento as células cultivadas em alta glucose apresentaram concentrações de ATP, em relação ao controle, de aproximadamente 45, 60, 70 e 50% para rotenona, antimicina, oligomicina e FCCP, respectivamente. Nessas mesmas condições, em meio sem glucose e sem a adição do inibidor da glicólise 2-deoxiglicose (2-DOG) (10 $\mu\text{M}$ ), a concentração celular de ATP caiu para 34, 50 e 30% com rotenona, oligomicina e FCCP, respectivamente. Em células pré tratadas com o inibidor 2-DOG, em meio sem glucose (com galactose e glutamina), as concentrações de ATP caíram para 0, 0, 6 e 5% para a rotenona, antimicina,

oligomicina e células tratadas com FCCP, respectivamente. Deve-se ressaltar que no estudo de Marroquin, a concentração utilizada dos inibidores mitocondriais foi maior: FCCP (10 $\mu$ M), rotenona (10 $\mu$ M), antimicina (3.6 $\mu$ M), oligomicina (5 $\mu$ M), refletindo em efeitos mais pronunciados.

A glutamina estimula a respiração mitocondrial por meio da sua metabolização e entrada no ciclo do ácido cítrico, aumentando a produção de ATP por essa via nesse meio de cultivo (MARROQUIN et al., 2007). Assim, no presente estudo, pode-se sugerir que os derivados mesoiônicos por comprometerem as funções mitocondriais, reduzem a viabilidade e alteram a produção de lactato e piruvato, o que pode explicar a redução nos níveis de ATP nas células cultivadas em meio GAL.

FIGURA 13 - EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS MI-J E MI-D SOBRE OS NÍVEIS DE ATP EM CÉLULAS HEPG2



FONTE: O autor (2018).

NOTA: As condições experimentais estão descritas no item 5.4.4 da sessão de Materiais e Métodos. **A** - Células HepG2 cultivadas em meio AG. **B** - Células HepG2 cultivadas em meio GAL. Células HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) foram cultivadas e incubadas com MI-D e MI-J (5 e 25  $\mu$ M) por 24h. C – controle, ausência de derivados mesoiônicos e presença de DMSO 1%. Para mensurar os níveis de ATP foi utilizado Kit comercial, seguindo-se as instruções do fabricante. Em **A** - 100% corresponde a  $0,04 \pm 0,007 \mu$ mol de ATP/mg de proteína. Em **B** - 100% corresponde a  $0,06 \pm 0,004 \mu$ mol de ATP /mg de proteína. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* valores significativamente diferentes em  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente.

## 7 DISCUSSÃO FINAL

No presente estudo foram avaliados alguns parâmetros metabólicos das células HepG2 incubadas com MI-D e MI-J, em dois meios de cultivo (AG e GAL), com o intuito de induzir uma reprogramação metabólica das células e demonstrar a importância do comprometimento da fosforilação oxidativa na toxicidade desses derivados. A determinação de toxicidade mitocondrial induzida por compostos em ensaios de viabilidade pode ser avaliada através dessa substituição de meios de cultura, que redireciona o metabolismo da célula tumoral, evidenciando a disfunção mitocondrial, uma vez que as células cultivadas em meio GAL são mais dependentes da fosforilação oxidativa. Desta forma, se tornam mais suscetíveis a drogas que tem como alvo as mitocôndrias, em comparação as células cultivadas em meio AG, dependentes principalmente da glicólise (MARROQUIN et al., 2007).

De fato, neste estudo, uma importante contribuição dos efeitos mitocondriais dos derivados em sua toxicidade em células HepG2 foi evidenciada através dos ensaios de viabilidade. Em meio GAL, os compostos reduziram significativamente a viabilidade celular avaliada pelo método do MTT (FIGURA 7), sendo esse efeito demonstrado desde as 24h de incubação nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , diferentemente do meio AG, onde o efeito no menor tempo de incubação foi mais significativo somente na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ).

No método do cristal violeta (FIGURA 9), observou-se um efeito semelhante ao MTT, para as células cultivadas em meio AG, mas em relação ao meio GAL, os resultados foram menos expressivos. Esta diferença pode ser devido ao fato de que o método do MTT baseia-se na atividade metabólica, enquanto o cristal violeta tem como princípio a ligação do corante ao DNA e proteínas das células aderidas (viáveis). Assim, os resultados mais expressivos do MTT em relação ao cristal violeta em meio GAL, sugerem que o comprometimento mitocondrial induzido pelos compostos reduz ainda mais a viabilidade e a atividade metabólica das células HepG2, que nesse meio dependem quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa para obtenção de energia.

Os ensaios da liberação da LDH (FIGURA 8) demonstraram efeitos citotóxicos mais discretos, comparados aos outros métodos. Esse ensaio avalia indiretamente a permeabilidade da membrana plasmática. Os resultados obtidos

foram semelhantes aos demonstrados por Gozzi e colaboradores (2015), que demonstraram que o MI-J promoveu um aumento na liberação da enzima LDH, sugerindo sua maior citotoxicidade, em comparação ao MI-D que, nas menores concentrações, não causou a liberação da LDH para o meio de cultura. Embora já tenha sido demonstrado que os derivados reduzem a fluidez de membranas, (CADENA et al., 2002; PIRES et al. 2011), a composição das membranas plasmática e mitocondrial diferem entre si. Enquanto a membrana plasmática é composta por 40% de lipídeos e 60% de proteínas, a membrana mitocondrial interna possui 75% de proteínas e 25% de lipídeos (NICHOLLS, 2013). É provável que os derivados MI-D e MI-J interajam de maneira diferente com essas membranas.

Comparando os efeitos entre os compostos na viabilidade, observa-se que o MI-J foi mais citotóxico que o MI-D. Neste caso, deve-se considerar que por se tratar de células hepáticas, os compostos podem ter sido metabolizados a metabólitos mais ativos, no caso do MI-J ou, menos ativos, no caso do MI-D. Sabe-se que as células HepG2 apresentam alto nível de expressão de enzimas das fases 1 e 2, responsáveis pelo metabolismo da maioria das drogas, sendo consideradas um bom modelo de estudos de toxicidade e metabolismo de xenobióticos (KNASMULLER et al., 1997). Além disto, a hipótese de metabolização dos derivados nas células HepG2 é reforçada pelo trabalho de Romão et al. (2009). Os autores demonstraram através de ensaios enzimáticos em frações microssomais de hepatócitos de camundongos, que o MI-D é metabolizado pelo complexo enzimático citocromo P450 a um metabólito com características polares, identificado também nas análises de amostras de sangue e urina de animais após 1,2 e 3 horas de tratamento com o composto mesoiônico (ROMÃO et al., 2009).

Com relação ao metabolismo das células tumorais, como já mencionado, sabe-se que sofrem adaptações que propiciam rápido crescimento e proliferação em condições de baixo pH e tensão de oxigênio, produzindo ATP preferencialmente pela oxidação da glucose e quando a glucose não está disponível, as células tumorais utilizam substratos alternativos, como a glutamina (DEBERARDINIS; CHENG, 2010). Quando ocorre a mudança do meio de cultivo, as células alteram a obtenção de energia da glicólise para a fosforilação oxidativa. A presença de galactose também favorece o aumento do conteúdo do DNA mitocondrial e a expressão de proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa, em um processo de

remodelamento estrutural da mitocôndria para se adaptar ao substrato energético (ROSSIGNOL et al., 2004).

DeBerardinis e colaboradores (2007) avaliaram os destinos metabólicos da glucose em células de glioblastoma utilizando dois meios diferentes suplementados com [1,6-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]glucose e L-[3-<sup>13</sup>C]glutamina. Os autores observaram que as células utilizaram 90% do carbono da glucose para a produção de lactato e os 10% restantes foram utilizados para outras atividades metabólicas dependentes de glucose como síntese de ácidos graxos, biossíntese de nucleotídeos, oxidação do piruvato etc, enquanto que no meio contendo glutamina, ~60% do carbono foi convertido em lactato pela oxidação completa da glutamina. Essa via gera como subproduto o NADPH pela enzima málica, que pode suprir outros processos anabólicos como a produção de nucleotídeos. O carbono da glutamina também foi utilizado na biossíntese de ácidos graxos e intermediários do ciclo do ácido cítrico (DEBERARDINIS et al., 2007).

No presente estudo, observou-se no meio GAL uma maior produção de lactato, sugerindo que os derivados mesoiônicos inibem a fosforilação oxidativa, desviando o fluxo metabólico para a glutaminólise completa. Uma parte do lactato produzido pode ter sido desviado para o ciclo de Cori para produzir glucose por meio da gluconeogênese (DEBERARDINIS; CHENG, 2010). Ainda, a redução nos níveis de piruvato, observada somente em meio GAL, pode indicar que este metabólico está sendo utilizado também para a gluconeogênese nestas células.

Em concordância com os demais resultados, houve uma significativa redução dos níveis de ATP em meio GAL, sugerindo um comprometimento do metabolismo mitocondrial, e ativação da via glicolítica, aumentando os níveis de produção de lactato e redução de piruvato. No entanto, esta ativação não foi suficiente para normalizar os níveis de ATP.

Em relação aos ensaios de respiração celular, observa-se em meio AG, uma redução da respiração na concentração de 25 µM de MI-J no estado basal, enquanto no estado Leak o derivado MI-D promoveu um aumento da respiração na concentração de 5 µM, seguido por uma inibição significativa na maior concentração avaliada (25 µM). Em meio GAL, no estado basal ocorreu uma inibição do fluxo de oxigênio para ambos os compostos, enquanto no estado Leak, um aumento foi

observado na menor concentração do derivado MI-J (5  $\mu$ M). No estado desacoplado, o derivado MI-D promoveu uma redução significativa do consumo de oxigênio.

Apesar do fluxo de oxigênio ser menor no meio GAL (na ausência dos derivados – ensaios controle) observam-se alterações significativas no consumo de oxigênio, principalmente no estado basal, o que pode estar relacionado com a redução da eficiência da fosforilação oxidativa promovida pelos derivados (CADENA et al., 1998; PIRES et al., 2010). No entanto, ressalta-se que na concentração de 25  $\mu$ M dos derivados a variação experimental foi muito acentuada. Além disso, embora os ensaios de viabilidade (azul de tripan) não demonstrem uma redução significativa da viabilidade, na maioria dos ensaios as células não respiravam em níveis detectáveis. Embora os ensaios tenham sido realizados em oxígrafo de alta resolução, um número maior de células teve que ser utilizado nestes experimentos. Além disso, os ensaios foram realizados em células intactas, que não permitem que se avaliem respostas mitocondriais específicas para alguns substratos como glutamato/malato, succinato e ADP. Uma alternativa é a realização de ensaios com células permeabilizadas com digitonina, por exemplo, que possibilitariam a avaliação da atividade dos complexos da cadeia respiratória (SALABEI et al., 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a toxicidade dos derivados em células HepG2 relacionam-se ao comprometimento da bioenergética mitocondrial, como evidenciado pelos efeitos mais pronunciados obtidos nas células cultivadas em meio GAL. No entanto, são necessários mais estudos a fim de compreender os mecanismos metabólicos de ação do MI-J e MI-D, para posteriormente serem realizados estudos in vivo, a fim de avaliar o potencial uso terapêutico destes compostos no tratamento do HCC.

## 8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- 1) Os efeitos dos derivados MI-D e MI-J em células HepG2 são mais pronunciados quando o meio de cultura contém galactose e glutamina em substituição a glucose, indicando que o comprometimento da fosforilação oxidativa está relacionado à sua citotoxicidade;
- 2) O composto MI-J apresentou resultados mais significativos na redução da viabilidade, principalmente em meio GAL, indicando que esse composto exerce efeitos citotóxicos mais pronunciados nas células HepG2;
- 3) A respiração celular no estado basal foi significativamente inibida pelos derivados em meio GAL. No estado *Leak* houve um estímulo aparente da respiração em ambos os meios, o que é compatível com os efeitos desses derivados na bioenergética mitocondrial;
- 4) A citotoxicidade dos derivados reflete uma adaptação metabólica, observada pelo aumento dos níveis de lactato e redução dos níveis de piruvato dessas células, indicando ativação de outras vias metabólicas em células cultivadas em meio GAL;
- 5) Os derivados mesoiônicos promoveram redução nos níveis de ATP celular em meio GAL, sendo esses resultados mais pronunciados para o composto MI-J.

## REFERÊNCIAS

AHN, C.S.; METALLO, C.M. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. **Cancer & Metabolism**, v. 3, n. 1, p.1-10, 2015.

ALTMAN, B.J.; STINE, Z. E.; DANG, C. V. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p.619-634, 2016.

BAKER, W; OLLIS, W.D. Meso-ionic Compounds. **Chemical and Industry**, London, p. 910-911, 1955.

BENJAMIN, A.J.; BAKER, T.B.; TALAMONTI, M.S.; BODZIN, A.S.; SCHENEIDER, A.B.; WINCHESTER, D.; ROGGIN, K.K.; BENTREM, D.J.; SUSS, N.R.; BAKER, M. Liver transplant offers a survival benefit over margin negative resection in patients with small unifocal hepatocellular carcinoma and preserved liver function. **Surgery**, p.1-5, 2017.

BRANDT, A.P; GOZZI, G.J.; PIRES, A.R.A; MARTINEZ, G.R.; CANUTO, A.V.S.; ECHEVARRIA, A.; DI PIETRO, A.; CADENA, S.M.S.C. Impairment of oxidative phosphorylation increases the toxicity of SYD-1 on hepatocarcinoma cells (HepG2). **Chemico-Biological Interactions**, v. 256, p.154-160, 2016.

BRUIX, J.; QIN, S.; MERLE, P., GRANITO, A.; HUANG, Y-H.; BODOKY, G.; PRACHT, M.; YOKOSUKA, O.; ROSMORDUC, O.; BREDER, V.; GEROLAMI, R.; MASI, G.; ROSS, P.J.; SONG, T.; BRONOWICKI, J-P.; OLLIVIER-HOURMAND, I.; KUDO, M.; CHENG, A-L.; LLOVET, J.M.; FINN, R.S.; LEBERRE, M-A.; BAUMHAUER, A.; MEINHARDT, G.; HAN, G. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet**, v. 389, p. 56-66, 2017.

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

CADENA, S. M. S. C; CARNIERI, E. G; ECHEVARRIA, A; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 440, n. 1-2, p. 46-50, 1998.

CARDOSO, C.M.P; CUSTODIO, J.B.A; ALMEIDA, L.M; MORENO, A.J.M. Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on acute inflammatory response. **Drug Development Research**, Hoboken, v.61, n. 4, p. 207-217, 2004.

CHEN, W.; WU, J.; SHI, H.; WANG, Z.; ZHANG, G.; CAO, Y.; JIANG, C.; DING, Y. Hepatic Stellate Cell Coculture Enables Sorafenib Resistance in Huh7 Cells through HGF/c-Met/Akt and Jak2/Stat3 Pathways. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-10, 2014.

CHUNG, D.M.; KIM, J.H.; KIM, J.K. Evaluation of MTT and Trypan Blue assays for radiation-induced cell viability test in HepG2 cells. **International Journal of Radiation Research**. v. 13, n. 4, p.331-336, 2015.

CORBET, C.; FERON, O. Metabolic and mind shifts. **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, v. 18, n. 4, p.346-353, 2015.

CURLEY S.A.; IZZO, F.; ELLIS, L.M.; NICOLAS VAUTHEY, J.; VALLONE, P. Radiofrequency ablation of hepatocellular cancer in 110 patients with cirrhosis. **Annals of Surgery**. v. 232, p.381–391, 2000.

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

DEBERARDINIS, R. J.; MANCUSO, A.; DAIKHIN, E.; NISSIM, I.; YUDKOFF, M.; WEHRLI, S.; THOMPSON, C.B. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 104, n. 49, p.19345-19350, 2007.

DEBERARDINIS, R J; CHENG, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 3, p.313-324, 2010.

DIMITROULIS, D.; DAMASKOS, C.; VALSAMI, S.; DAYAKIS, S.; GARMPI, N.; SPARTALIS, E.; ATHANASIOU, A.; MORIS, D.; SAKELLARIOU, S.; KYKALOS, S.; TSOUROUFLIS, G.; GARMPI, A.; DELLADETSIMA, L.; KONTZOGLU, K.; KOURAKLIS, G.; . From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 23, n. 29, p.5282-5294, 2017.

DOHERTY, J. R.; CLEVELAND, J. L.. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 123, n. 9, p.3685-3692, 2013.

DOMENIS, R.; BISETTO, E.; ROSSI, D.; COMELLI, M.; MAVELLI, I. Glucose-Modulated Mitochondria Adaptation in Tumor Cells: A Focus on ATP Synthase and Inhibitor Factor 1. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p.1933-1950, 2012.

DOS SANTOS, A.C.S; ECHEVARRIA, A. Eletronic effects on <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of substituted 1,3,4-thiadiazolium salts. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, v. 39, p. 182-186, 2001.

DOYLE, A; MARSH, P.; GILL, R.; RODOY, M.; MOHSEN, W.; VARMA, P.; HONG, T.; STRASSER, S.; BELL, S.; RYAN, M.; NICOLL, A.; LUBEL, J.; GOW, P.J.; FINK, M.A.; ROBERTS, S.; KEMP, W.; KRONGORG, I.; ARACHCHI, N.; KNIGHT, V.; DEY, A. Sorafenib in the treatment of hepatocellular carcinoma: a multi-centre real-world study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v. 51, n. 8, p. 979-985, 2016.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE, L.; EUROPEAN ORGANISATION FOR, R.; TREATMENT OF, C. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 4, p. 908-943, 2012.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. pdb prot087379, 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA expands approved use of Stivarga to treat liver câncer**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm555608.htm>> Acesso em: 01 fev. 2018.

FORBES, A. M.; LIN, H.; MEADOWS, G. G.; MEIER, G. P. Synthesis and anticancer activity of new flavonoid analogs and inconsistencies in assays related to proliferation and viability measurements. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 2, p. 831-842, 2014.

FORNER, A.; REIG, M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **The Lancet**, p.1-14, jan. 2018.

GAJEWSKI, C. D.; YANG, L.; SCHON, E.A.; MANFREDI, G. New Insights into the Bioenergetics of Mitochondrial Disorders Using Intracellular ATP Reporters. **Molecular Biology Of The Cell**, v. 14, n. 9, p.3628-3635, 2003.

GEBREGIWORGIS, T.; PUROHIT, V.; SURENDRA, K.S.; TADROS, S.; CHAIKA, N.V.; ABREGO, J.; MULDER, S.E.; GUNDA, V.; SINGH, P.K.; POWERS, R. Glucose Limitation Alters Glutamine Metabolism in MUC1-Overexpressing Pancreatic Cancer Cells. **Journal Of Proteome Research**, , v. 16, n. 10, p.3536-3546, 2017.

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

GLENNON, R.A; TEJANI-BUTT, S.M; PADGETT, W; DALY, J.W. Mesoionic xanthine analogues: antagonists of adenosine receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington DC, v. 27, n. 10, p. 1364-1367, 1984.

GOZZI, G.J.; PIRES, A.R.A.; VALDAMERI, G.; ROCHA, M.E.M.; MARTINEZ, G.R.; NOLETO, G.R.; ACCO, A.; DE SOUZA, C.E.A.; ECHEVARRIA, A.; DOS REIS, C.M.; DI PIETRO, A.; CADENA, S.M.S.C. Selective Cytotoxicity of 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Derivatives on Hepatocarcinoma Cells (HepG2). **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 6, 17 jun. 2015.

GRAZIE, M.L.; BIAGINI, M.R.; TAROCCHI, M.; POLVANI, S.; GALLI, A. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future. **World Journal Of Hepatology**, v. 9, n. 21, p.907-920, 2017.

GRIMM, D.; ALTAMIRANO, L; PAUDEL, S.; WELKER, L.; KONKLE, M.E./ CHAKRABORTY, N.; MENZE, M.A. Modulation of cellular energetics by galactose and pioglitazone. **Cell And Tissue Research**, v. 369, n. 3, p.641-646, 2017.

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

HE, C.; DONG, X.; ZHAI, B.; JIANG, X.; DONG, D.; LI, B.; JIANG, H.; XU, S.; SUN, X. MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, p.28667-28881, 2015.

HOFFMANN, K.; CLEMENS, F.; XIAO, Z.; MOHR, E.; SERBA, S.; BÜCHLER, M.; SCHEMMER, P. Sorafenib Modulates the Gene Expression of Multi-drug Resistance Mediating ATP-Binding Cassette Proteins in Experimental Hepatocellular Carcinoma. **Anticancer research**.v 30. P. 4503-4508, 2010.

HUTTER, E.; UNTERLUGGAUER, H.; GAREDEW, A.; JANSEN-DURR, P.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. **Experimental Gerontology**. v. 41, n. 1, p. 103-109, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC**. Lyon, France: 2014.

IPPOLITO, D.; TRATTENERO, C.; TALEI, F.C.; CASIRAGHI, A.; LOMBARDI, S.; VACIRCA, F.; CORSO, R.; SIRONI, S. Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging With Gadolinium Ethoxybenzyl Diethylenetriamine Pentaacetic Acid for Quantitative Assessment of Vascular Effects on Hepatocellular-Carcinoma Lesions Treated by Transarterial Chemoembolization or Radiofrequency Ablation. **Journal Of Computer Assisted Tomography**, v. 40, n. 5, p.692-700, 2016.

JAKŁTYŚ, B.; RUZGYS, P.; TAMOŠIŪNAS, M.; ŠATKAUSKAS S. Different Cell Viability Assays Reveal Inconsistent Results After Bleomycin Electrotransfer In Vitro. **The Journal Of Membrane Biology**, v. 248, n. 5, p.857-863, 2015.

KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT D.M.; An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**. v. 64, n.3, p.313-320, 1983.

KIER, L.B; ROCHE, E.B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington DC, v. 56, n. 2, p. 149-168, 1967.

LAFARO, K. J.; DEMIRJIAN, A. N.; PAWLIK, T. M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 1, p. 1-17, 2015.

LEE, W.; LEE, C.F.; CHENG, C.H.; WU, T.J.; CHOU, H.S.; WU, T.H.; SOONG, R.S.; CHAN, K.M.; YU, M.C.; CHEN, M.F. Outcomes of liver resection for hepatocellular carcinoma in liver transplantation era. **European Journal Of Surgical Oncology**, v. 41, n. 9, p.1144-1152, 2015.

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

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**. p.581-593, 1997.

LOU, J.; ZHANG, L.; LV, S.; ZHANG, C.; JIANG, S. Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. **Biomarkers in Cancer**. p. 1 – 14, 2017.

MARROQUIN, L. D.; HYNES, J.; DYKENS, J. A.; JAMIESON, J. D.; WILL, Y. Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 97, n. 2, p. 539-547, 2007.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U.E.; PEIRIS-PAGÈS, M.; PESTELL, R.G; SOTGIA, F.; LISANTI, M.P. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 1, p.11-31, 2016.

MENDEZ-SANCHEZ, S. C.; MARTINEZ, G.R.; ROMÃO, S.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; ROCHA, M.E.M; NOLETO, G.R.; CARNIERI, E.G.S.; CADENA, S.M.S.C.; DE OLIVEIRA, M.B.M The inhibition of lipoperoxidation by mesoionic compound MI-D: A relationship with its uncoupling effect and scavenging activity. **Chemico-Biological Interactions**, v 179, p. 125-130, 2009.

MICKUVIENE, I.; KIRVELIENE, V.; JUODKA, B. Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. **Toxicology In Vitro**, v. 18, n. 5, p.639-648, 2004.

MONTANARI, C.A; BEEZER, A.E; SANDALL, J.P.B; MONTANARI, M.L.C; MILLER, J; GIESBRECHT, A.M. On the interaction of some mesoionic compounds with *Saccharomyces-cerevisiae* by biological microcalorimetry. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 274-278, 1992.

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

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

NG, K. K. C.; CHOK, K.S.H.; CHAN, A.C.Y.; CHEUNG, T.T.; WONG, T.C.L.; FUNG, J.Y.Y.; YUEN, J.; POON, R.T.P.; FAN, S.T.; LO, C.M. Randomized clinical trial of hepatic resection versus radiofrequency ablation for early-stage hepatocellular carcinoma. **British Journal Of Surgery**, v. 104, n. 13, p.1775-1784, 2017.

NICHOLLS, D. G. F., STUART J. . **Bioenergetics 4**. Elsevier, 2013.

NIN, V.; CHINI, C.C.; ESCANDE, C.; CAPELLINI, V.; CHINI, E.N. Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) Protein Regulates Hepatic Gluconeogenesis. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 289, n. 9, p.5518-5527, 2014.

OGAWA, C.; MORITA, M.; OMURA, A.; NODA, T.; KUBO, A.; MATSUNAKA, T.; TAMAKI, H.; SHIBATOGE, M.; TSUTSUI, A.; SENOH, T.; NAGANO, T.; TAKAGUCHI, K.; TANI, J.; MORISHITA, A.; YONEYAMA, H.; MASAKI, T.; MORIYA, A.; ANDO, M.; DEGUCHI, A.; KOKUDO, Y.; MINAMI, Y.; UESHIMA, K.; SAKURAI, T.; NISHIDA, N.; KUDO, M. Hand-Foot Syndrome and Post-Progression Treatment Are the Good Predictors of Better Survival in Advanced Hepatocellular Carcinoma Treated with Sorafenib: A Multicenter Study. **Oncology**, v. 93, n. 1, p.113-119, 2017.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <[www.who.int](http://www.who.int)>  
Acesso em: 31 jan. 2018.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Early cancer diagnosis saves lives, cuts treatment costs.** Disponível em:  
<<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/early-cancer-costs/en/>>  
Acesso em: 31 jan. 2018.

PENG, Z.; ZHANG, Y.J.; CHEN, M.S.; XU, L.; LIANG, H.H.; LIN, X.; GUO, R.; ZHANG, Y.; LAU, W.L. Radiofrequency Ablation With or Without Transcatheter Arterial Chemoembolization in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Randomized Trial. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 31, n. 4, p.426-432, 2013.

PIRES, A.R.A; OLIVEIRA, M.B.M.; ECHEVARRIA, A; SILVA, E.F.; ROCHA, M.E.M.; CARNIERI, E.G.S.; MARTINEZ, G.R.; NOLETO, G.R.; CADENA, S.M.S.C. Comparative study of the effects of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic derivatives on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, p. 1-8, 2010.

PIRES, A.R.A.; NOLETO, G.R.; ECHEVARRIA, A; REIS, C.M.; ROCHA, M.E.M.; CARNIERI, E.G.S.; MARTINEZ, G.R.; NOLETO, G.R.; CADENA, S.M.S.C. Interaction of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic derivatives with mitochondrial membrane and scavenging activity: involvement of their effects on mitochondrial energy-linked functions. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, p. 17-25, 2011.

PUBCHEM – Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

ROMÃO, S.; CADENA, S.M.S.C; AMORIM, J.C.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S.C.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; ROCHA, M.E.M.; NOLETO, G.R.; CARNIERI, E.G.S.; MARTINEZ, G.R.; OLIVEIRA, M.B. Metabolism of the Mesoionic Compound (MI-D) by mouse Liver Microsome, Detection of Its Metabolite In Vivo, and Acute Toxicity in Mice. **Journal Biochemical Molecular Toxicology**, v.23, n.6, p.395-405, 2009.

ROSSIGNOL, R.; GILKERSON, R.; AGGELER, R.; YAMAGATA, K.; REMINGTON, S. J.; CAPALDI, R. A. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. **Cancer Research**, v. 64, n. 3, p. 985-993, 2004.

SALABEI, J.K.; A GIBB, A.; HILL, B.G. Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis. **Nature Protocols**, v. 9, n. 2, p.421-438, 2014.

SAOTOME, K.; MORITA, H.; UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicology In Vitro**. v. 3, n. 4, p. 317-321, 1989.

SASTRE, J.; DIAZ-BEVERIDGE, R.; GARCIA-FONCILLAS, J.; GUARDEN, R.; LÓPEZ, C.; PAZO, R.; RODRIGUEZ-SALAS, N.; SALGADO, M.; SALUD, A.; FELIU, J. Clinical guideline SEOM: hepatocellular carcinoma. **Clinical And Translational Oncology**, v. 17, n. 12, p.988-995, 2015.

SCALISE, M.; PACHINI, L.; GALLUCCIO, M.; CONSOLE, L.; INDIVERI, C. Glutamine Transport and Mitochondrial Metabolism in Cancer Cell Growth. **Frontiers In Oncology**, v. 7, p.1-9, 2017.

SCHELL, J.; OLSON, K.; JIANG, L.; HAWKINS, A.J.; VRANKEN, J.G.V.; XIE, J.; EGNATCHIK, R.A.; EARL, E.G.; DEBERARDINIS, R.J. A Role for the Mitochondrial Pyruvate Carrier as a Repressor of the Warburg Effect and Colon Cancer Cell Growth. **Molecular Cell**, v. 56, n. 3, p.400-413, 2014.

SENEFF-RIBEIRO, A; ECHEVARRIA, A; SILVA, E.F; VEIGA, S.S; OLIVEIRA, M.B.M. Antimelanoma Activity of 1,3,4-thiadiazolium Mesoionics: a Structure-Activity Relationship Study. **Anti-Cancer Drugs**, London, v.15, n. 3, p. 269-275, 2004a.

SENEFF-RIBEIRO, A; ECHEVARRIA, A; SILVA, E.F; FRANCO, C.R.C; VEIGA, S.S; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic Effect of a new 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Compound (MI-D) on Cell Lines of Human Melanoma. **British Journal of Cancer**, London, v.91, p. 297-304, 2004b.

SENEFF-RIBEIRO, A; ECHEVARRIA, A; SILVA, E.F; VEIGA, S.S; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of a New 1,3,4-thiadiazolium Mesoionic Compound (MI-D) on B16-F10 Murine Melanoma. **Melanoma Research**, London, v. 13, n. 5, p. 465-472, 2003.

SIMS, J. T.; PLATTNER, R. MTT assays cannot be utilized to study the effects of STI571/Gleevec on the viability of solid tumor cell lines. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, v. 64, n. 3, p.629-633, 2009.

STEWART, TG.; KIER, LB. Synthesis of several mesoionic 1,3,4-Tiadiazoles. **J.Pharma. Sci.**, Washington DC, v. 54, n.5, p. 731-734, 1965.

STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CANETE, M.; HOROBIN, R.W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p.785-796, 2012.

TANG, A.N.; HALLOUCH, O.; CHERNYAK, V.; KAMAYA, A.; SIRLIN, C.B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. **Abdominal Radiology**, v. 43, n. 1, p.13-25, 2017.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**. v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.

WEBER, K.; RIDDESKAMP, D.; ALFERT, M.; HOYER, S.; WIESNER, R.J. Cultivation in Glucose-Deprived Medium Stimulates Mitochondrial Biogenesis and Oxidative Metabolism in HepG2 Hepatoma Cells. **The Journal Biological Chemistry**, v. 383, p. 283 – 290, 2002.

WILHELM, S.M.; DUMAS, J.; ADNANE, L.; LYNCH, M.; CARTER, C.A.; SCHUTZ, G.; THIERAUCH, K.H.; ZOPF, D. Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases

with potent preclinical antitumor activity. **International Journal Of Cancer**, v. 129, n. 1, p.245-255, 2011.

WANG, G.; GUAN, R.; DU, L.; GAO, J.; FU, X. Strategies to Target Glucose Metabolism in Tumor Microenvironment on Cancer by Flavonoids. **Nutrition And Cancer**, v. 69, n. 4, p.534-554, 2017.

ZHOU, L.; STANLEY, W.C.; SAIDEL, G.M.; YU, X.; CABRERA, M.E. Regulation of lactate production at the onset of ischaemia is independent of mitochondrial NADH/NAD<sup>+</sup>: insights from in silico studies. **The Journal Of Physiology**, v. 569, n. 3, p.925-937, 2005.

## ANEXO - LICENÇA DE USO DE MATERIAL PUBLICADO COM DIREITOS AUTORAIS

21/05/2018

RightsLink Printable License

### ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 21, 2018

This Agreement between Miss. Rafaela Pereira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4353750452728
License date	May 21, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Hepatology
Licensed Content Title	EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma
Licensed Content Author	European Association for the Study of the Liver, European Organisation for Research and Treatment of Cancer
Licensed Content Date	Apr 1, 2012
Licensed Content Volume	56
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	36
Start Page	908
End Page	943
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Original figure numbers	Figure 3
Title of your thesis/dissertation	THE TOXICITY OF THE 1,3,4-THIADIAZOLIUM MESOIONIC MI-J AND MI-D IN HEPG2 CELLS IS RELATED TO THEIR EFFECTS ON MITOCHONDRIAL BIOENERGETIC
Expected completion date	May 2018
Estimated size (number of pages)	83
Requestor Location	Miss. Rafaela Pereira Street Osvaldo de Melo Severino, No. 173  Campo Largo, Paraná 83606598 Brazil Attn: Miss. Rafaela Pereira
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

21/05/2018

RightsLink Printable License

**WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

May 21, 2018

This Agreement between Miss. Rafaela Pereira ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number	4353751249433
License date	May 21, 2018
Licensed Content Publisher	Wolters Kluwer Health, Inc.
Licensed Content Publication	Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care
Licensed Content Title	Metabolic and mind shifts: from glucose to glutamine and acetate addictions in cancer
Licensed Content Author	Cyril Corbet and Olivier Feron
Licensed Content Date	Jul 1, 2015
Licensed Content Volume	18
Licensed Content Issue	4
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Individual
STM publisher name	
Portion	Figures/table/illustration
Number of figures/tables/illustrations	1
Figures/tables/illustrations used	Figure 1
Author of this Wolters Kluwer article	No
Title of your thesis / dissertation	THE TOXICITY OF THE 1,3,4-THIADIAZOLIUM MESOIONIC MI-J AND MI-D IN HEPG2 CELLS IS RELATED TO THEIR EFFECTS ON MITOCHONDRIAL BIOENERGETIC
Expected completion date	May 2018
Estimated size(pages)	83
Requestor Location	Miss. Rafaela Pereira Street Osvaldo de Melo Severino, No. 173  Campo Largo, Paraná 83606598 Brazil Attn: Miss. Rafaela Pereira
Billing Type	Invoice
Billing Address	Miss. Rafaela Pereira Street Osvaldo de Melo Severino, No. 173  Campo Largo, Brazil 83606598 Attn: Miss. Rafaela Pereira
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

**Wolters Kluwer Terms and Conditions**

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>