

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LYVIA LINTZMAIER PETIZ

**Efeitos da *N-N'*-difetil-4-metoxi-benzamidina
sobre parâmetros do metabolismo energético em
mitocôndrias e hepatócitos**

CURITIBA

2013

LYVIA LINTZMAIER PETIZ

Efeitos da *N-N'*-difeníl-4-metoxi-benzamidina sobre
parâmetros do metabolismo energético em
mitocôndrias e hepatócitos.

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

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

Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Alexandra Acco

Dr^a. Amanda do Rocio Andrade

CURITIBA

2013

Dedico este trabalho às duas pessoas que mais amo neste mundo.

Inspirações pra tudo que eu viver.

Meus pais, Adelina e Carlos Alberto.

Agradecimentos

Aos meus pais, Adelina e Carlos Alberto. Agradeço pelo apoio incondicional durante os dois anos de mestrado, apoio que veio de duas maneiras: como pais amorosos e como colegas de profissão. Compreenderam todo meu esforço, me incentivaram nas horas de cansaço, puxaram minha orelha nas horas de preguiça, valorizaram como ninguém todo meu trabalho. Por segurarem as pontas quando tudo parecia muito difícil. Por lembrarem que tudo ia valer muito a pena. Meus mestres em bioquímica, professores homenageados, inspiração pra tudo que eu viver. Muito obrigada.

Aos meus irmãos, Luiza, Laura e Alberto por me cuidarem e me amarem tanto, mais do que uma irmã mais nova pode querer.

À querida e atenciosa orientadora Silvia Cadena, um exemplo de profissional, querida e atenciosa como professora e orientadora, sempre disposta a ajudar. Muito obrigada por ter me aceitado, acreditado em mim, e viabilizado esse meu sonho.

À melhor co-orientadora do mundo, Amanda Pires, pelas incansáveis explicações, recepção calorosa e amorosa no laboratório, ajuda incondicional.

À professora Maria Eliane Merlin, sempre interessada e disposta a acrescentar meu trabalho. Obrigada pelas contribuições e pela correção do projeto.

Às demais professoras do grupo de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, sempre dispostas a ajudar.

À professora Alexandra Acco, pela contribuição essencial com os hepatócitos, pela vontade e esforço, pelas conversas sempre produtivas.

Ao querido amigo e colega Gustavo Gozzi, pela amizade e conselhos, e por ser, como eu, um apaixonado pela bioquímica e partilhar da visão romântica sobre vida acadêmica.

Aos meus amados amigos Maria Carolina Pellosi, Monique Meyemberg, Juliana Kenski, Leandro Ferreira Moreno. Amizade é um encontro de almas, e fico muito feliz que tenhamos nos encontrado nessa jornada.

Aos amigos queridos de laboratório, Camila, Amanda, Carol Valente, Anna Paula, Stephane e Aninha, pelo dia a dia especial que era conviver no Oxidações 1.

Ao Carlos Eduardo do Departamento de Farmacologia pela ajuda com os hepatócitos, por sempre estar disposto a contribuir e pelas risadas nos intermináveis dias de isolamento.

À professora Áurea Echevarria por ter gentilmente cedido o composto utilizado neste estudo.

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pelos animais utilizados neste estudo, e também pela paciência e compreensão.

Ao PPG-Bioquímica-UFPR pela oportunidade única de poder realizar este trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

As amidinas têm como característica química a presença de dois átomos de nitrogênios ligados ao mesmo átomo de carbono. Para estes compostos diversas atividades biológicas são descritas. A pentamidina, uma diamidina aromática, é eficaz no tratamento de *Pneumocystis carinii* e de leishmanioses, porém, causa graves efeitos colaterais. Por isso, novos derivados de amidina têm sido sintetizados, dentre estes a *N-N'*-difeníl-4-metoxi-benzamidina (metoxiamidina), que se mostrou efetiva contra *L. amazonensis* (LD₅₀ 20 µmol/L) e *T. cruzi* (LD₅₀ 59 nmol/L). Neste estudo, a toxicidade da metoxiamidina foi avaliada em mitocôndrias e hepatócitos isolados. Em mitocôndrias oxidando ativamente glutamato e malato, o composto inibiu o estado 3 da respiração (25 nmol/mg de proteína) em ~15%, sendo os sítios de inibição o complexo I e o segmento entre a ubiquinona e o complexo III. A metoxiamidina estimulou o estado 4, nas concentrações de 50 e 65 nmol/mg de proteína em ~32% e ~43%, respectivamente. Como consequência destes efeitos, os valores do coeficiente de controle respiratório (CCR) e a razão ADP/O foram diminuídos. O efeito desacoplador da metoxiamidina, sugerido pelo estímulo do estado 4, foi confirmado pelo aumento do consumo de oxigênio no estado 4 induzido por oligomicina, chegando a ~69% (65 nmol/mg de proteína), e pelo aumento da atividade ATPásica em mitocôndrias intactas, em ~27% e ~64% para 50 e 65 nmol/mg de proteína, respectivamente. Mitocôndrias na presença de acetato de sódio tiveram seu inchamento inibido nas maiores concentrações do composto (50-65 nmol/mg de proteína, em ~16 e 32% respectivamente). Também o inchamento de mitocôndrias desenergizadas, na presença de K⁺ e valinomicina, foi inibido em ~20% nas mesmas concentrações, sugerindo que a metoxiamidina altera a permeabilidade e fluidez da membrana mitocondrial. Em modelo experimental de hepatócitos isolados, foram comparados os efeitos da metoxiamidina e pentamidina, nas concentrações de 25 e 65 µmol/L. Nos ensaios de respiração em hepatócitos em suspensão, os resultados da metoxiamidina estão de acordo com os obtidos com mitocôndrias isoladas, com diminuição da respiração basal (~8% - 65 µmol/L) e desacoplado (~26% - 65 µmol/L) e aumento no estado *leak* (~47% - 65 µmol/L). Para a pentamidina, os resultados foram semelhantes, com exceção para o estado *leak*, ocorrendo diminuição do consumo de oxigênio no estado basal (~18% - 65 µmol/L) e desacoplado (~18% - 65 µmol/L). Nestas células, os níveis piruvato não foram alterados pela presença dos compostos, mas os níveis de lactato aumentaram em ~17% na maior concentração (65 µmol/L) de metoxiamidina no tempo de 40min. Em cultura de hepatócitos, o tratamento de 18h com metoxiamidina alterou a viabilidade celular, avaliada pelos métodos do MTT e atividade da enzima LDH, promovendo maior número de células viáveis (~68% para MTT e ~60% para LDH - 65 µmol/L). Já a pentamidina (65 µmol/L) diminuiu em ~68% e 258% a viabilidade dos hepatócitos, como resultados dos métodos do MTT e LDH, respectivamente. Conclui-se que a metoxiamidina, em concentração similar a LD₅₀ (20 µmol/L) para *L. amazonensis*, compromete de maneira discreta a bioenergética mitocondrial. Este efeito também foi observado em hepatócitos em suspensão, porém, nestas células em cultura, o composto parece exercer um efeito citoprotetor.

Palavras-chave: metoxiamidina; bioenergética mitocondrial, hepatócitos, toxicidade.

ABSTRACT

Amidines are chemically characterized by the presence of two nitrogen atoms bound to the same carbon atom in its structure. To these compounds several biological activities have been described. Pentamidine, an aromatic diamidine, is effective in the treatment of *Pneumocystis carinii* and leishmaniasis; however, this compound promotes severe side effects. For this reason, new amidine derivatives have been synthesized, among them the *N-N'*-diphenyl-4-methoxybenzamidine (methoxyamidine), which was effective against *L. amazonensis* (LD₅₀ 20 µmol/L) and *T. cruzi* (LD₅₀ 59 nmol/L). In the present study, the toxicity of methoxyamidine was evaluated in mitochondria and isolated hepatocytes, which was immediately used (suspension cells) or maintained in culture for 18 h. In mitochondria actively oxidizing glutamate and malate, the compound inhibited the state 3 respiration (25 nmol/mg of protein) by ~15% and the inhibition sites were the complex I and the segment between ubiquinone and complex III. Methoxyamidine also stimulated the state 4 respiration, at concentrations of 50 and 65 nmol/mg of protein by ~32% and ~43%, respectively. As a consequence of these effects, the respiratory control coefficient values (CCR) and the ADP/O ratio were decreased. The uncoupling effect of methoxyamidine, suggested by the stimulation of state 4 respiration, was confirmed by the dose dependent increase of oxygen consumption in state 4 induced by oligomycin, reaching to ~69% (65 nmol/mg of protein), and by the increased ATPase activity in intact mitochondria, by ~27% and ~64% to 50 and 65 nmol/mg of protein, respectively. Swelling supported by oxidation of glutamate plus malate in the presence of sodium acetate was inhibited by methoxyamidine by ~16 and 32% at concentrations of 50-65 nmol/mg of protein, respectively. Also the mitochondrial swelling in the absence of substrate and in the presence of K⁺ and valinomycin, was inhibited by ~20% at the same concentrations, suggesting that methoxyamidine affects the mitochondrial membrane permeability and fluidity. In isolated hepatocytes, the effects of methoxyamidine and pentamidine were compared, at concentrations of 25 and 65 µmol/L. In the respiration assays with suspension cells, the results of methoxyamidine were compatible with those obtained in isolated mitochondria, with a decrease in basal (~8% - 65 µmol/L) and uncoupled (~26% - 65 µmol/L) respiration states. Leak state was stimulated by ~47% by methoxyamidine (65 µmol/L). For pentamidine the results were similar. Basal and uncoupled cellular respiration was inhibited at ~18% by pentamidine (65 µmol/L). In suspension cells, pyruvate levels were not affected by the compounds whereas lactate levels were increased by ~17% in the highest concentration (65 µmol/L) of methoxyamidine after 40min of incubation. In hepatocytes maintained in culture, the methoxyamidine treatment (65 µmol/L – 18 h) increased the cell viability by ~68% and ~60%, evaluated by MTT and LDH activity, respectively. Pentamidine (65 µmol/L – 18 h) decreased in ~68% and 258% the hepatocyte viability, evaluated by MTT and LDH activity, respectively. Taken together these results show that methoxyamidine at concentration similar to LD₅₀ (20 µmol/L) for *L. amazonensis*, promotes discreet effects on mitochondrial bioenergetics. These effects were also observed in suspension hepatocytes; however, when these cells were maintained in culture, the compound seemed to exert a cytoprotector effect.

Key words: methoxyamidine; mitochondrial bioenergetics; hepatocytes; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Mitocôndria – decisão de vida ou morte celular	8
FIGURA 2 – Estrutura geral das amidinas	9
FIGURA 3 – Classificação geral das amidinas	10
FIGURA 4 – Forma tautomérica das amidinas.....	11
FIGURA 5 – Benzamidinas isoxazolinás N-substituídas com atividade antiplaquetária	12
FIGURA 6 – Isotiazóis benzamidinas com atividade antidegenerativa	13
FIGURA 7 – Amidinas cíclicas citotóxicas para linhagens de câncer de mama	14
FIGURA 8 – Benzamidazóis-5-carboxil com amidinas substituídas com atividade antibactericida e antifúngica.....	14
FIGURA 9 – Derivados de amidina com ação antiinflamatória e analgésica	15
FIGURA 10 – Derivados de amidina com atividade antitumoral.....	16
FIGURA 11 – Derivados de amidina com atividade neuroprotetora	16
FIGURA 12 – Estrutura da pentamidina.....	17
FIGURA 13 – Estrutura da N-N'-difeníl-4-metoxi-benzamidina	20
FIGURA 14 – Representação da redução enzimática de sais de MTT a sais de formazan	31
FIGURA 15 – Efeitos da metoxiamidina sobre os estados 3 e 4 da respiração.....	43
FIGURA 16 – Efeitos da metoxiamidina sobre o coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O.....	44
FIGURA 17 – Efeito da metoxiamidina sobre a respiração em presença de FCCP	47
FIGURA 18 – Efeito da metoxiamidina sobre a respiração em presença de oligomicina	48
FIGURA 19 – Efeitos da metoxiamidina sobre a atividade da F_1F_0 ATPase	54
FIGURA 20 – Efeitos da metoxiamidina sobre o inchamento de mitocôndrias energizadas	58
FIGURA 21 – Efeitos da metoxiamidina sobre a amplitude, velocidade de inchamento e contração de mitocôndrias energizadas.....	58
FIGURA 22 – Efeitos da metoxiamidina sobre a amplitude e a velocidade do inchamento de mitocôndrias desenergizadas	61
FIGURA 23 –Efeitos da metoxiamidina sobre o potencial elétrico de membrana	63
FIGURA 24 –Efeito da metoxiamidina e pentamidina sobre a viabilidade de hepatócitos em cultura – método do MTT	65

FIGURA 25 – Efeito da metoxiamidina e pentamidina sobre a viabilidade de hepatócitos em cultura – método da LDH.....	68
FIGURA 26 –Traçado demonstrativo do consumo de oxigênio por hepatócitos.....	70
FIGURA 27– Efeitos da metoxiamidina sobre a respiração de hepatócitos em suspensão.....	71
FIGURA 28 –Efeitos da pentamidina sobre a respiração de hepatócitos em suspensão	73
FIGURA 29 –Efeitos da metoxiamidina sobre os níveis de piruvato e lactato	75
FIGURA 30 –Efeitos da pentamidina sobre a produção de piruvato e lactato	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP/O – Número de moléculas de ADP fosforiladas a ATP quando dois elétrons são transferidos do substrato para a cadeia respiratória para reduzir um nano átomo de oxigênio ($1/2 O_2$)

BSA - Albumina de soro bovino

CCR - Coeficiente de controle respiratório

CI₅₀ – 50% da concentração máxima inibitória

CE₅₀ - Concentração efetiva de dada droga, anticorpo ou veneno para matar 50% de determinado microorganismo

LD₅₀ – Dose necessária para matar 50% de determinado microorganismo

DCPIP – 2,6-dicloro-fenol-indofenol

DMEM - Meio essencial mínimo de Dulbecco

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

EGTA - Ácido etileno glicol bis (éter 2-amino-etil) N, N, N', N' tetracético

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FCCP - Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona

HBSS - Solução salina balanceada de Hanks

HEPES - N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

NOS - NO sintase

PMS – fenazina metosulfato

PBS - Solução salina tamponada

Tris - (hidroximetil) amino metano

Δp – Força próton-motriz

$\Delta\mu_{H^+}$ – Gradiente eletroquímico de prótons

$\Delta\psi_m$ – Potencial transmembrana. Diferença no potencial elétrico entre as fases separadas pela membrana mitocondrial

ΔpH – Diferença de pH entre as fases encontradas no espaço intermembranas e a matriz mitocondrial

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	IX
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 Fígado e toxicidade de xenobióticos	3
2.2 Mitocôndria – aspectos funcionais e papel na hepatotoxicidade	4
2.3 Amidinas	9
2.3.1 Atividades biológicas	12
2.3.2 Pentamidina	17
2.3.3 N-N'-difênil-4-metoxi-benzamidina	19
3. Justificativa e objetivos	22
4. Materiais e métodos	24
4.1 Reagentes	24
4.2 Animais	25
4.3 Cultura primária de hepatócitos	26
4.3.1 Soluções	26
4.3.1.1 Solução de perfusão	26
4.3.1.2 Solução de isolamento 1	26
4.3.1.3 Solução de isolamento 2	27
4.3.1.4 Solução salina tamponada	27
4.3.1.5 Meios de cultura	27
4.3.2 Isolamento e cultura	28
4.4 Determinações em hepatócitos	29
4.4.1 Determinações em hepatócitos em suspensão	29
4.4.1.1 Determinação do consumo de oxigênio	29
4.4.1.2 Determinação de lactato e piruvato	30
4.4.2 Determinações em hepatócitos em cultura	31
4.4.2.1 Viabilidade celular	31
4.4.2.1.1 Método do MTT	31
4.4.2.1.2 Atividade da enzima LDH	32
4.5 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato	32

4.5.1 Isolamento de mitocôndrias para determinação do consumo de oxigênio, potencial transmembrana ($\Delta\psi_m$) e atividade ATPásica.....	32
4.5.2 Isolamento de mitocôndrias para determinação do grau de inchamento mitocondrial	33
4.5.3 Obtenção de mitocôndrias rompidas para avaliação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória	33
4.5.4 Determinação da concentração de proteínas	34
4.6 Determinação em mitocôndrias rompidas	34
4.6.1 Atividade das enzimas da cadeia respiratória	34
4.6.1.1 NADH oxidase (NADH:oxigênio óxido-redutase).....	34
4.6.1.2 NADH desidrogenase (NADH: Ferricianeto óxido-redutase)	34
4.6.1.3 NADH citocromo c redutase (NADH:citocromo c óxido-redutase)	35
4.6.1.4 Succinato oxidase (Succinato:oxigênio óxido-redutase).....	35
4.6.1.5 Desidrogenase succínica (Succinato: fenazina metassulfato óxido-redutase) ..	36
4.6.1.6 Succinato citocromo c redutase (Succinato: ferrocitocromo c óxido-redutase)	36
4.6.1.7 Citocromo c oxidase (Ferrocitocromo c: oxigênio óxido-redutase)	37
4.6.1.7.1 Obtenção do Ferrocitocromo c.....	37
4.6.1.7.2 Citocromo c oxidase.....	37
4.6.2 Determinação da atividade da F_1F_0 ATPase.....	38
4.7 Determinações em mitocôndrias intactas.....	38
4.7.1 Determinação do consumo de oxigênio, cálculo do coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O	38
4.7.2 Determinação da atividade da F_1F_0 ATPase	39
4.7.3 Determinação do inchamento (<i>swelling</i>).....	39
4.7.3.1 Inchamento em mitocôndrias desenergizadas na presença de valinomicina e K^+	40
4.7.3.2 Inchamento em mitocôndrias energizadas com glutamato e malato	40
4.7.4 Determinação do potencial de transmembrana	40
4.8 Análise estatística	41
5. Resultados e discussão	42
5.1 Efeitos da metoxiamidina sobre a mitocôndria	42
5.1.1 Efeitos da metoxiamidina sobre a respiração mitocondrial.....	42
5.1.2 Efeitos da metoxiamidina sobre a atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória	49
5.1.3 Efeitos da metoxiamidina sobre o complexo F_1F_0 ATPase	52
5.1.4 Efeitos da metoxiamidina sobre o inchamento mitocondrial	55

5.1.4.1 Efeitos da metoxiamidina sobre o inchamento mitocondrial dependente do transporte elétrons – <i>swelling</i> energizado	56
5.1.4.2 Efeitos da metoxiamidina sobre o inchamento de mitocôndrias desenergizadas na presença de valinomicina e K ⁺	60
5.1.5 Efeitos da metoxiamidina sobre o potencial de membrana	62
5.2 Efeitos da metoxiamidina e pentamidina sobre cultura primária de hepatócitos....	63
5.2.1 Efeitos da metoxiamidina e pentamidina sobre a viabilidade de hepatócitos em cultura.....	64
5.2.1.1 Método do MTT.....	64
5.2.1.2 Atividade da enzima LDH.....	66
5.2.2 Efeitos da metoxiamidina e pentamidina sobre parâmetros do metabolismo energético de hepatócitos em suspensão	69
5.2.2.1 Respiração.....	69
5.2.2.2 Níveis de lactato e piruvato	74
6. Discussão final	77
7. Conclusões	82
8. Referências Bibliográficas	83

1. INTRODUÇÃO

As amidinas são compostos que possuem como principal característica química a presença de dois átomos de nitrogênios ligados ao mesmo átomo de carbono em sua estrutura. São amplamente utilizados na síntese de compostos acíclicos e também heterocíclicos (SHRINER & NEUMANN, 1944), e possuem várias atividades biológicas descritas. Dentre estas: antiplaquetária (SIELECKI *et al.*, 2001), antidegenerativa (PANICO *et al.*, 2002), antitumoral (BIELAWSKA *et al.*, 2004), antimicrobiana (ÖZDEN *et al.*, 2005), anti-inflamatória (SONDHI *et al.*, 2009), neuroprotetora (ANZINI *et al.*, 2010), antitripanossomatídea (WISPELWEY & SCHELD, 1991), e antileishmania (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004).

A pentamidina, uma diamidina aromática, já é utilizada na terapêutica antiprotozoária no tratamento de *Pneumocystis carinii* e de leishmanioses. Este composto é bastante eficaz, no entanto, causa graves efeitos colaterais, relatados em cerca de 50% dos pacientes (WISPELWEY & SCHELD, 1991). Dentre estes efeitos, destacam-se: hipotensão, pancreatite e leucopenia, que podem ser dose e tempo dependentes e, ainda, irreversíveis (BOILOTT *et al.*, 1983).

Alguns compostos químicos podem afetar o funcionamento mitocondrial. Muitos sintomas característicos da intoxicação por fármacos, tais como hipotensão, fadiga, náusea, alucinações, entre outros, podem decorrer de danos às funções mitocondriais (WALLACE & STARKOV, 2000). A disfunção mitocondrial está associada a vários quadros de hepatotoxicidade, como a esteatose microvesicular, a esteato-hepatite não alcoólica, e a hepatite citolítica (PESSAYRE *et al.*, 2000).

Novos derivados de amidina têm sido sintetizados e avaliados quanto a atividade biológica. Dentre estes, destaca-se a *N-N'*-difeníl-4-metoxibenzamidina (metoxiamidina), uma amidina aromática simetricamente distribuída. Para a metoxiamidina são descritas as atividades antitripanossomatídea e antileishmania, sendo tão eficaz quanto a droga de referência, a pentamidina (CANTO-CAVALHEIRO *et al.*, 1997).

Considerando a importante toxicidade da pentamidina, o fato de que a metoxiamidina mostrou-se terapeuticamente tão eficaz quanto a primeira e, ainda, a escassez de estudos sobre os efeitos destes compostos sobre metabolismo hepático e a bionergética mitocondrial, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da *N,N'*-difetil-4-metoxi-benzamidina sobre o metabolismo energético em hepatócitos e mitocôndrias isoladas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fígado e toxicidade de xenobióticos

O fígado está frequentemente envolvido na toxicidade induzida por drogas em função da sua localização anatômica, aspecto particularmente importante quando se trata da administração oral e, também, devido as suas funções fisiológicas e bioquímicas, uma vez que neste órgão atuam importantes vias metabólicas (GRATTAGLIANO *et al.*, 2009). Cerca de 75% do sangue hepático provem diretamente do trato gastrointestinal e baço, via veia porta e conduz diretamente ao fígado xenobióticos absorvidos no intestino, em altas concentrações. As enzimas metabólicas presentes no fígado podem reduzir ou potencializar a toxicidade dos xenobióticos (JAESCHKE *et al.*, 2002).

A intensidade do dano hepático provocado por xenobióticos pode ser leve, com o comprometimento localizado de tecido hepático, ou severa, quando há uma destruição tecidual maciça. A hepatotoxicidade causada por xenobióticos pode ser classificada como intrínseca e idiossincrática. É considerada intrínseca a toxicidade dose-dependente e previsível acima de uma dose limite, enquanto que a idiossincrática ocorre sem dose evidente e de modo imprevisível (RUSSMANN *et al.*, 2009). Na maioria dos casos a hepatotoxicidade é idiossincrática (GRATTAGLIANO *et al.*, 2009).

O metabolismo hepático de xenobióticos pode resultar em dano tecidual. Uma vez danificado, o tecido hepático passa a acumular ácidos biliares, provocando citotoxicidade e, em casos mais extremos, levando à colestase. A colestase pode ocorrer devido ao bloqueio mecânico, com a obstrução dos canais que transportam a bile para fora do hepatócito, ou por distúrbios na formação da bile causados por alterações genéticas. Este é um processo patofisiológico que afeta o fígado devido a retenção dos ácidos biliares, que por sua vez, está associada à indução de apoptose do hepatócito. Ainda, o metabolismo de xenobióticos pode levar a um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em resposta a inflamações locais. Durante este processo ocorre o recrutamento de macrófagos e neutrófilos com objetivo de destruir microorganismos que estejam causando a inflamação, a fim

de iniciar a regeneração hepática. As células de Kupffer liberam mediadores citotóxicos, como as espécies reativas (óxido nítrico, com posterior formação de peroxinitrito), e os neutrófilos aderem às células parenquimais, o que induz a morte celular por necrose, através da liberação de espécies reativas e ação de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, células saudáveis podem ser afetadas durante este processo, o que pode agravar o dano hepático inicial (JAESCHKE *et al.*, 2002).

Vários fatores podem influenciar na resposta dos hepatócitos a um quadro de toxicidade e a dimensão dos danos é resultante da resposta celular à lesão. Normalmente, os hepatócitos reagem à agressão tóxica por ativação de mecanismos de defesa que incluem hipertrofia do retículo endoplasmático, indução de sistemas de proteção (como a glutatona), síntese de proteínas *heat shock* e de proteínas de fase aguda (GRATTAGLIANO *et al.*, 2009).

A disfunção mitocondrial é uma consequência comum da toxicidade de diferentes xenobióticos e assim é determinante da hepatotoxicidade (PESSAYRE *et al.*, 2000). Por este motivo, no próximo item segue uma breve revisão sobre este tema.

2.2 Mitocôndria – Aspectos funcionais e papel na hepatotoxicidade

A mitocôndria, organela que tem como principal função gerar energia através do processo de fosforilação oxidativa, é encontrada em quase todas as células eucarióticas. Por ter um papel tão importante, o mau funcionamento mitocondrial representa risco à sobrevivência celular, não apenas por uma eventual diminuição na produção de ATP, mas também pelo aumento na produção de ERO (PESSAYRE *et al.*, 2000).

Devido às suas características estruturais e funcionais, as mitocôndrias provêm uma série de alvos primários para xenobióticos indutores do “colapso bioenergético”; dependendo do nível e da extensão de mitocôndrias afetadas, a

célula pode sofrer uma grave *desenergização*, que por sua vez pode levar a um dano localizado ou a necrose celular. Existem muitos compostos naturais, comerciais, farmacêuticos e ambientais que apresentam sua toxicidade ao interferir na bioenergética mitocondrial, sendo importante o esclarecimento destes efeitos para o entendimento de seus mecanismos de ação (SCATENA *et al.*, 2007).

Compostos químicos podem afetar o funcionamento da mitocôndria de duas maneiras principais: interferindo na formação do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu_{H^+}$), através da inibição de um ou mais complexos da cadeia respiratória ou, por promover o desacoplamento, dissipando esse gradiente. Muitos sintomas característicos da intoxicação por fármacos, tais como hipotensão, fadiga, náusea, alucinações, entre outros, podem decorrer de danos às funções mitocondriais (WALLACE & STARKOV, 2000).

Os quatro complexos da cadeia respiratória podem sofrer modificações em suas atividades em decorrência dos efeitos de xenobióticos, sendo o complexo I o mais susceptível. Inibidores do complexo I podem ser classificados em três categorias: os que inibem em nível da interação NADH-flavina; os que envolvem antagonistas de quinonas, que inibem tanto o complexo I quanto o complexo III (citocromo bc_1); e o grupo de inibidores potentes e altamente específicos que, mesmo em concentrações mínimas, apresentam apenas efeito no complexo I e não demonstram nenhum efeito sobre outros complexos (WALLACE & STARKOV, 2000). Potentes inibidores do complexo I possuem grande similaridade com a ubiquinona, possuindo uma molécula com uma “cabeça” cíclica e uma “cauda” hidrofóbica (DEGLI, 1998). Mais de 60 tipos de compostos, naturais e sintéticos, já demonstraram atividade inibitória do complexo I da cadeia respiratória. Essa lista inclui pesticidas; neurolépticos e neurotoxinas naturais; drogas de ação antihistamínica, antiséptica e antiangina; poluentes fenólicos; corantes fluorescentes; antibióticos; entre outros (WALLACE & STARKOV, 2000).

Efeitos no complexo IV (citocromo *c* oxidase) são sempre mais danosos para a mitocôndria, uma vez que é neste complexo onde ocorre a redução do oxigênio a água. Inibições do complexo III frequentemente resultam na maior

formação de espécies reativas, devido às características de redução/oxidação da ubiquinona. O complexo II (succinato desidrogenase) é menos estudado com enfoque na toxicidade de drogas, apesar de sua importância, pois também participa no metabolismo do ciclo do ácido cítrico (SCATENA *et al.*, 2007).

Além do efeito direto sobre os complexos da cadeia respiratória, alguns xenobióticos causam um efeito chamado desacoplador, por aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Agentes desacopladores desfazem o gradiente eletroquímico de prótons, comprometendo assim a síntese de ATP (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Muitos xenobióticos exercem ação desacopladora, como: antiinflamatórios, antipsicóticos, antidepressivos, antimicóticos, inseticidas, herbicidas e drogas antitumorais (WALLACE & STARKOV, 2000). Este efeito também é comum a alguns antiinflamatórios não-estereoidais, como a indometacina, o diclofenaco e a aspirina, sendo, em alguns casos, observado tanto em mitocôndrias isoladas de humanos quanto em fígado de rato perfundido, em concentrações empregadas na terapêutica (KEMMELMEYER & BRACHT, 1989; PETRESCU & TARBA, 1997; MASUBUCHI *et al.*, 1999; MORENO-SANCHEZ *et al.*, 1999; JACOB *et al.*, 2001).

O comprometimento das funções mitocondriais obriga a célula a realizar adaptações metabólicas. A resposta para a menor capacidade na produção de ATP ocorre através da aceleração da glicólise, que resulta em um aumento dos níveis de lactato. Desta maneira, a acidose láctica denuncia o comprometimento mitocondrial, e os sinais clínicos incluem náusea, vômitos, dor abdominal e mal estar. A acidose láctica pode ser avaliada laboratorialmente através da detecção dos níveis de ácido láctico ou do balanço lactato/piruvato (DYKENS & WILL, 2007). A disfunção mitocondrial está associada a vários quadros de hepatotoxicidade, como a esteatose microvesicular, a esteato-hepatite não alcoólica, e a hepatite citolítica (PESSAYRE *et al.*, 2000).

A esteatose microvesicular é causada por um grave comprometimento na β -oxidação de ácidos graxos, via metabólica que ocorre na matriz mitocondrial. Os ácidos graxos que são parcialmente oxidados acumulam-se na forma de pequenas vesículas no hepatócito, causando o quadro de

esteatose. Isso não prejudica apenas a produção local de energia, mas também leva a uma redução na produção de corpos cetônicos e da liberação de glucose para tecidos periféricos (PESSAYRE *et al.*, 2000). Este comprometimento na via da β -oxidação pode ser causado por: dano oxidativo em componentes mitocondriais, incluindo o DNA mitocondrial (mtDNA), como consequência do metabolismo do etanol (MANSOURI *et al.*, 1997); dano na replicação ou transcrição do mtDNA (LEWIS & DALAKAS, 1995); sequestro da coenzima A (CoA), como descrito por exemplo no caso da administração de ácido salicílico (DESCHAMPS *et al.*, 1991), entre outros.

A esteato-hepatite não alcoólica é mais grave e ocorre em pacientes que possuem esteatose macro e microvesicular. Além da esteatose, as lesões incluem morte celular do hepatócito e cirrose. Algumas drogas catiônicas como a amiodarona se alojam na mitocôndria, inibindo a β -oxidação e o transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória. Isso tem como consequência a formação de muitos intermediários reativos, como o ânion superóxido. O estresse oxidativo resultante causa peroxidação lipídica, o que leva a um quadro de inflamação e pode levar à morte celular (PESSAYRE *et al.*, 2000).

A hepatite citolítica é uma lesão grave no fígado que pode levar a insuficiência hepática. Muitos xenobióticos causam lesões através de ações na mitocôndria, enquanto metabólitos reativos da própria droga podem também estar envolvidos nesses efeitos hepatotóxicos. A hepatite citolítica pode ser causada por inibição da respiração mitocondrial; desacoplamento da fosforilação oxidativa e abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial induzidas pelas drogas (LABBE *et al.*, 2008) Esses poros de permeabilidade causam *swelling* mitocondrial, ruptura da membrana externa e liberação de citocromo c. O citocromo c no citosol da célula causa a ativação de caspases, o que acaba levando a célula à apoptose (SUSIN *et al.*, 1998; PESSAYRE *et al.*, 2000)

Desta forma, sabe-se que a mitocôndria participa ativamente no controle da sobrevivência ou morte celular. De forma simplificada, danos no DNA nuclear, hipertrofia do retículo endoplasmático e permeabilidade dos lisossomos são sinais que convergem na mitocôndria. Nestas organelas a

intensidade de ativação de proteínas pró apoptóticas, como Bax e Bak, define pela morte ou não da célula (FIGURA 1) (PESSAYRE *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de várias drogas foi interrompido durante os testes clínicos por serem detectados danos mitocondriais associados com hepatotoxicidade (LABBE *et al.*, 2008). Algumas destas drogas levaram a danos como acidose não controlável, depleção de mtDNA, aumento da atividade de transaminases, sequestro de coenzima A e L-carnitina, aceleração do surgimento de poros de transição na membrana mitocondrial, entre outros (PESSAYRE *et al.*, 2007; FROMENTY & PESSAYRE, 1995; LEWIS *et al.*, 1996; ULRICH *et al.*, 2001; BERSON *et al.*, 2001).

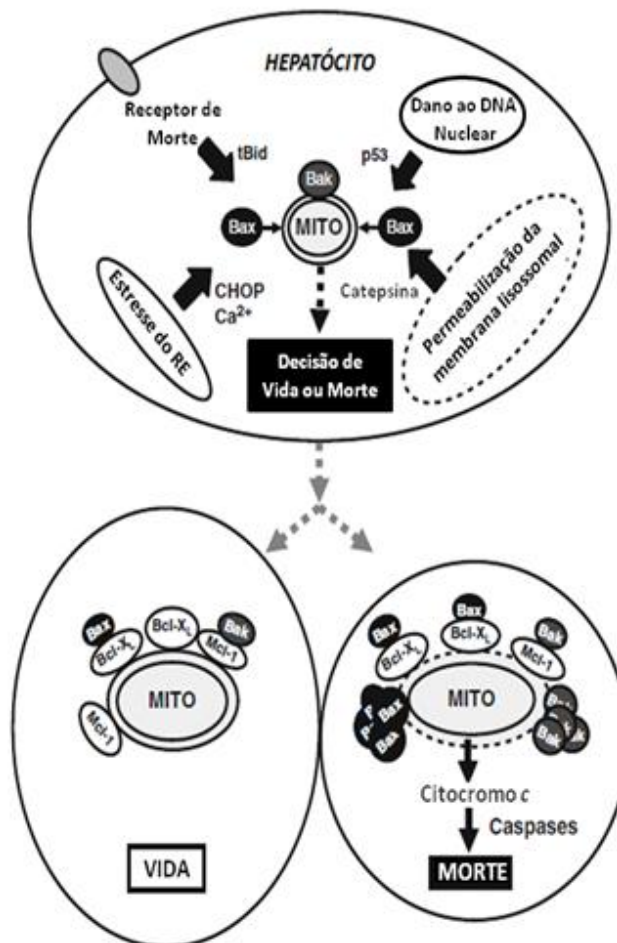


FIGURA 1: MITOCÔNDRIA – DECISÃO DE VIDA OU MORTE CELULAR

Nota: A mitocôndria reúne todos os sinais pré e pró apoptóticos e uma escolha entre a indução ou não de morte celular ocorre nesta etapa. Quando pouca quantidade de Bax e Bak é ativada, estas proteínas podem ser sequestradas e inativadas por proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2 e Mcl-1, e a célula permanece viável. Por outro lado, quando são ativadas

grandes quantidades de Bax e Bak, estas formam oligômeros que permeabilizam a membrana mitocondrial externa, liberando citocromo *c* para o citosol e ativando vias de apoptose.
FONTE: Adaptado de PESSAYRE *et al.*, 2010.

Na busca de novos fármacos, uma estratégia interessante consiste em realizar ensaios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que permitam estimar a capacidade da droga em questão de inibir ou desacoplar a fosforilação oxidativa, comprometer a β -oxidação, iniciar a formação de poros de transição de permeabilidade e depleção de mtDNA (LABBE *et al.*, 2008).

Dentre vários compostos que possuem atividades biológicas descritas e não tiveram seus mecanismos de interação esclarecidos, podem-se destacar as amidinas. Utilizadas originalmente na síntese de compostos heterocíclicos, as amidinas demonstram atividade biológica provavelmente devido a sua grande capacidade de substituições, e também por possuir ligações N-H, que permitem sua protonação e desprotonação (SINGH, 2009).

2.3 Amidinas

As amidinas são compostos caracterizados quimicamente por dois átomos de nitrogênio, que podem ser substituídos ou não, ligados ao mesmo carbono (DOS SANTOS *et al.*, 2006). Possuem uma ligação dupla C=N como as azometinas, e uma ligação simples C-N como as amidas, tendo um caráter parcial de ligação dupla. A estrutura geral das amidinas pode ser observada na figura 2 (SHRINER & NEUMANN, 1944). São análogas aos ácidos carboxílicos e ésteres e podem ter muitas funções, devido às suas diversas possibilidades de ligações (SINGH, 2009). As amidinas têm sido designadas como ácidos carbazílicos, amidinas ácidas, ácidos amônio-carboxílicos e iminoamidas.

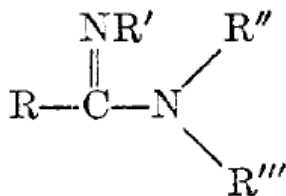


FIGURA 2: ESTRUTURA GERAL DAS AMIDINAS

FONTE: SHRINER & NEUMANN, 1944.

Em geral, as amidinas são nomeadas pelo ácido ou amida que podem ser obtidas pela hidrólise do composto. O átomo de carbono seguinte àquele ligado ao grupo amidínico é designado da mesma maneira que os átomos de carbono adjacentes ao grupo carbonil nos ácidos carboxílicos (α , β , γ). Os dois átomos de nitrogênio não referidos como N e N' , ou seja: na nomenclatura, o átomo de nitrogênio imino e o átomo de nitrogênio amino não são diferenciados (SHRINER & NEUMANN, 1944).

As amidinas são classificadas em cinco grupos, dependendo do número e da distribuição de suas substituições nos átomos de nitrogênio. Os grupos são: amidinas não substituídas, amidinas monossubstituídas, amidinas simetricamente distribuídas, amidinas assimetricamente distribuídas, e amidinas trissubstituídas (DOS SANTOS *et al.*, 2006). Na figura 3 podemos observar a estrutura geral de cada grupo.

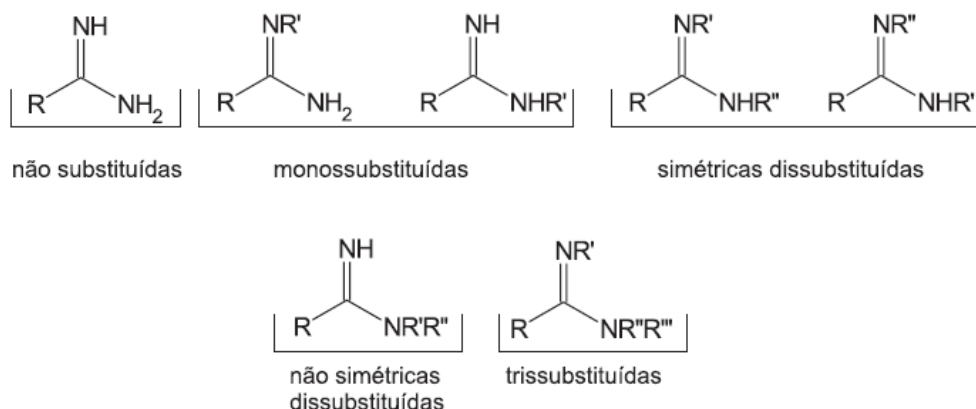


FIGURA 3: CLASSIFICAÇÃO GERAL DAS AMIDINAS
 FONTE: DOS SANTOS *et al.*, 2006.

Nas amidinas monossubstituídas e simetricamente distribuídas pode ocorrer tautomerismo do tipo prototrópico, onde ocorrem estados de protonação que formam moléculas de mesma fórmula e carga total (FIGURA 4).

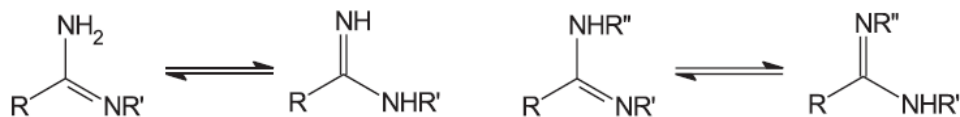


FIGURA 4: FORMA TAUTOMÉRICA DAS AMIDINAS.

FONTE: DOS SANTOS *et al.*, 2006.

Algumas amidinas são bases fortes, devido à ressonância que apresentam (FASTIER, 1962). A força de sua basicidade é influenciada pelas substituições localizadas tanto no átomo de carbono quanto nos átomos de nitrogênio. Embora contenha dois nitrogênios, a protonação do grupo amidínico fornece apenas um cátion (OSZCZAPOWICZ & RACZYNSKA, 1984). Por causa de sua carga positiva, os grupos amidínicos são atraídos por moléculas carregadas negativamente. Em meio biológico estes compostos não são apenas atraídos por ânions pequenos, mas também por macromoléculas aniônicas, como os grupamentos fosfato e carboxílicos de proteínas. Já que a amidina é constantemente atraída por várias moléculas carregadas negativamente, a interação com tais moléculas se dá muito rapidamente, a menos que ambas estejam interagindo através de outros tipos de ligação, como ligações covalentes (FASTIER, 1962).

Os principais métodos de síntese das amidinas envolvem o uso de nitrilas e amidas, e em menor proporção ésteres, ácidos carboxílicos e isonitrilas (DOS SANTOS *et al.*, 2006). Uma vez sintetizados, estes compostos são altamente utilizados como intermediários para a aquisição de compostos acíclicos, e podem ser empregados na síntese de compostos heterocíclicos como: aziridinas, pirróis, oxazóis e pirimidinas (SHRINER & NEUMANN, 1944).

Vários derivados de amidina, os quais possuem diferentes substituintes no grupamento amidínico, têm apresentado diversas atividades biológicas (GREENHILL & LUE, 1993). No item a seguir serão descritas as principais atividades atribuídas a estes compostos.

2.3.1 Atividades Biológicas

Em 2001, Sielecki et al. sintetizaram e avaliaram os efeitos antiplaquetários de benzamidinas isoxazolininas, e obtiveram resultados satisfatórios com amidinas *N*-substituídas (FIGURA 5). Os experimentos foram realizados em modelo canino, com enfoque em sua ação como antagonistas das glicoproteínas IIb/IIIa, receptores envolvidos na ativação da agregação plaquetária. Dois compostos, um *N*-etil substituído e outro *N*-metoxibenzil substituído demonstraram ser potentes inibidores das glicoproteínas IIb/IIIa. Neste caso, o composto com a maior atividade *N*-metoxibenzil obtendo uma inibição da agregação plaquetária em aproximadamente 80% por até 24h.

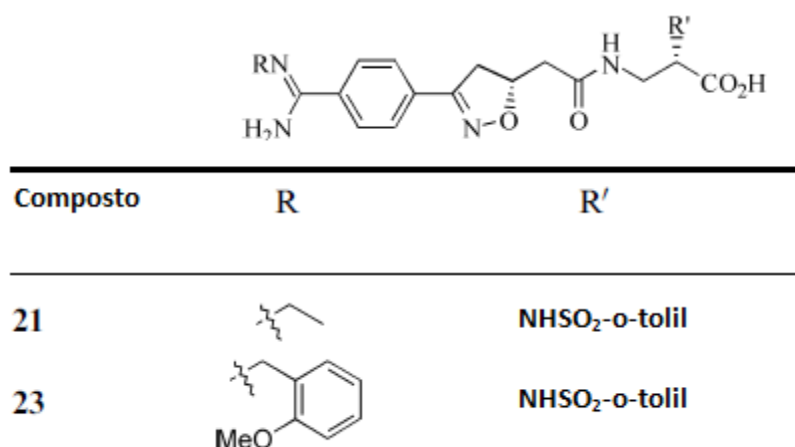
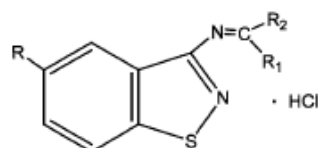


FIGURA 5: BENZAMIDINAS ISOXAZOLINAS *N*-SUBSTITUÍDAS COM ATIVIDADE ANTIPLAQUETÁRIA

FONTE: Adaptado de Sielecki *et al.*, 2001.

Ao analisar o efeito antidegenerativo de *N*-(benzo[*d*]isotiazol-3-il) amidinas, Panico *et al.* (2002) obtiveram resultados considerados promissores. Os experimentos foram conduzidos em cultura de cartilagem nasal suína, na presença de interleucina-1 β , citocina envolvida nas etapas iniciais do processo inflamatório. Determinou-se na cultura a quantidade de glicosaminoglicanos e a produção de óxido nítrico (NO \bullet), moléculas consideradas chave na degradação da cartilagem por estarem envolvidas com a ativação de proteases e

metaloproteinases de matriz. Os resultados mostraram que todos os compostos, na presença da interleucina-1 β , diminuíram a clivagem de cartilagem de maneira dose-dependente. Os compostos 1, 5 e 7 (FIGURA 6) mostraram efeitos similares a droga de referência indometacina, em relação a inibição da formação de NO $^{\bullet}$. Os compostos também foram testados em cartilagem articular humana, onde os resultados foram mais acentuados, com uma significativa diminuição na produção de NO $^{\bullet}$.



Composto	R	R ₁	R ₂
1	H	NH ₂	CH ₃
2	CH ₃	NH ₂	CH ₃
3	H	N(CH ₃) ₂	H
4	CH ₃	N(CH ₃) ₂	H
5	H	NH ₂	C ₆ H ₅
6	CH ₃	NH ₂	CH ₂
7	H	NH ₂	-CH=CH ₂ 2-piridil

FIGURA 6: ISOTIAZÓIS BENZAMIDINAS COM ATIVIDADE ANTIDEGENERATIVA

FONTE: Adaptado de Panico *et al.*, 2002

Bielawska *et al.* (2004) sintetizaram e avaliaram novos compostos derivados de amidinas e análogos ao clorambucil, quimioterápico utilizado no tratamento de leucemia linfocítica. Estes análogos foram testados quanto a toxicidade sobre duas linhagens celulares de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7. Dois compostos (FIGURA 7), que possuíam função amidínica e uma função 4,5-diidro-1*H*-imidazol, mostraram-se os mais citotóxicos para ambas as linhagens. Para o composto 9 o valor de IC₅₀ foi menor (22 \pm 2 μ mol/L para a linhagem MDA-MB-231 e 18 \pm 2 μ mol/L para MCF-7) do que o estimado para o clorambucil (92 \pm 2 e 97 \pm 2 μ mol/L, respectivamente).

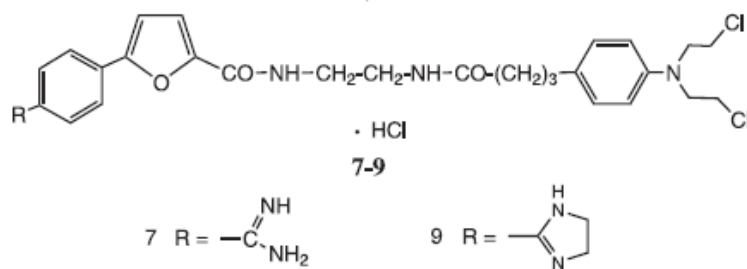


FIGURA 7: AMIDINAS CÍCLICAS CITOTÓXICAS PARA LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA.

FONTE: Bielawska *et al.*, 2004.

Em 2005, Özden *et al.* sintetizaram uma série de benzamidazóis-5-carboxil com substituições metil ou fenil no grupo amidínico (FIGURA 8). Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos derivados contra *S. aureus*, *S. aureus* resistente a metilina, *S. faecalis*, *S. epidermidis* resistente a metilina, *E. Coli* e *C. albicans*. Os resultados mostraram que amidinas aromáticas tiveram uma potente ação antibactericida. Os compostos 13f, 13g e 13h (FIGURA 8) foram os mais efetivos.

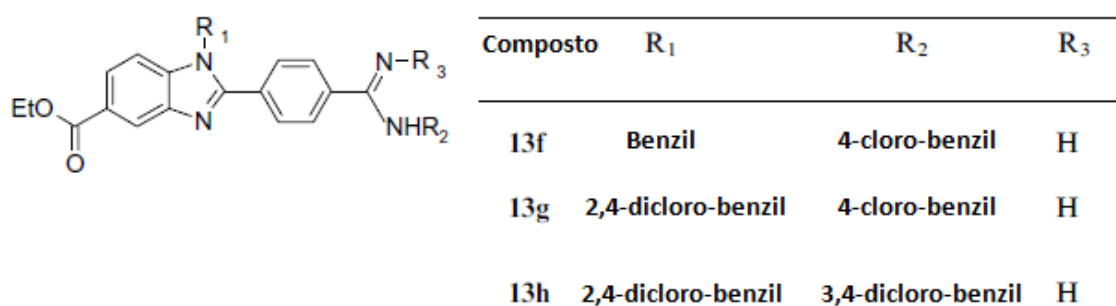


FIGURA 8: BENZAMIDAZÓIS-5-CARBOXIL COM AMIDINAS SUBSTITUÍDAS COM ATIVIDADE ANTIBACTERICIDA E ANTIFÚNGICA

FONTE: Adaptado de Özden *et al.*, 2005.

Sondhi *et al.* (2009a) sintetizaram e caracterizaram nove novos compostos derivados de amidina, a partir da condensação de 2-cianopiridina com vários 3,4-diaril-2-imino-4-tiazolinas (FIGURA 9). A atividade antiinflamatória destes compostos foi avaliada através da determinação dos níveis de inibição sobre a formação de edema em patas de ratos albinos

Foster. Na dose de 50mg/kg, o composto 2e apresentou uma inibição de 49%, superando as drogas aspirina (43%) e ibuprofeno (39%). Para atividade analgésica foi realizado o teste de contorções induzidas por ácido acético em ratos. Os derivados de amidina 2f e 2g reduziram as contorções em ~50%, comparando-se ao ibuprofeno (50%).

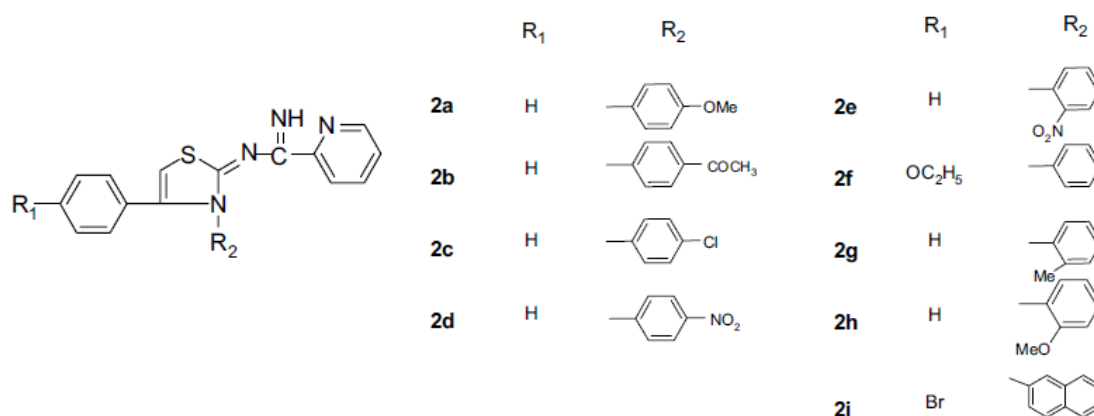


FIGURA 9: DERIVADOS DE AMIDINA COM AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA.

FONTE: Sondhi *et al.*, 2009a.

Os mesmos autores (SONDHI *et al.*, 2009b) realizaram a síntese de outros derivados de amidina, a partir de compostos 3,4-diaril-2-imino-4-tiazolinas (FIGURA 10). Os autores avaliaram a ação antitumoral *in vitro* destes compostos em linhagens de células tumorais de cólon, fígado, pulmão, neuroblastoma e próstata. O composto 3f inibiu em até 36% a proliferação celular na linhagem de câncer de cólon, enquanto que o 3h, que possuía dois grupos metoxi (OCH₃), inibiu em ~32% a proliferação de células de hepatoma e em ~47% de neuroblastoma.

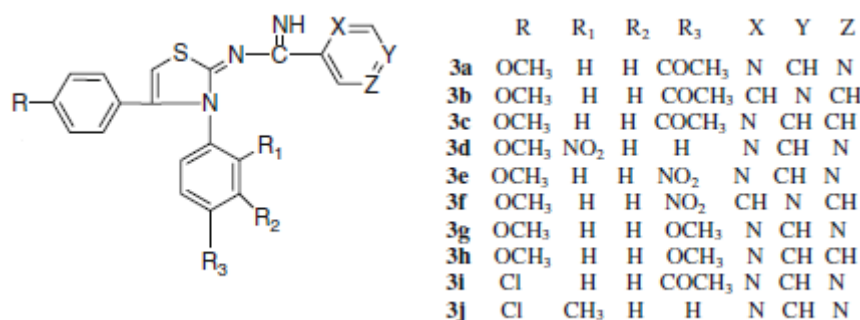


FIGURA 10: DERIVADOS DE AMIDINA COM ATIVIDADE ANTITUMORAL
 FONTE: Sondhi *et al.*, 2009b.

Anzini *et al.* (2010) demonstraram uma interessante atividade neuroprotetora para derivados de amidina sintetizados a partir de 2-amino-6-(trifluormetoxi)-benzotiazol (FIGURA 11). Os cinco novos derivados foram testados quanto a neutralização da ativação “excitotóxica” (liberação excessiva de glutamato) de receptores de glutamato, em um modelo *in vitro* de isquemia cerebral. Esta neutralização foi avaliada pela liberação de glutamato e da enzima LDH, o que evidenciaria dano celular. Como droga de referência foi utilizada o Riluzol (Rilutek®), usado para tratamento de esclerose lateral amiotrófica. Os testes foram realizados na parte cortical de cérebro de rato. O composto 2c promoveu uma importante neuroproteção, prevenindo a liberação de glutamato e LDH, apesar do efeito ter sido menor do que o Riluzol.

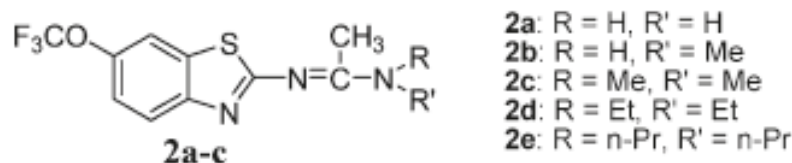


FIGURA 11: DERIVADOS DE AMIDINA COM ATIVIDADE NEUROPROTERORA
 FONTE: Anzini *et al.* (2010)

2.3.2 Pentamidina

A pentamidina (isotionato de pentamidina – FIGURA 12) é uma diamidina aromática utilizada na terapêutica antiprotozoária. É efetiva no tratamento de *Pneumocystis carinii* em pacientes imunodeprimidos (WISPELWAY & PEARSON, 1991) e é utilizada como segunda opção no tratamento de leishmanioses, caso o tratamento com antimoniais pentavalentes não possa ser realizado (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). A pentamidina já mostrou ter atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral (BERMAN, 1988).

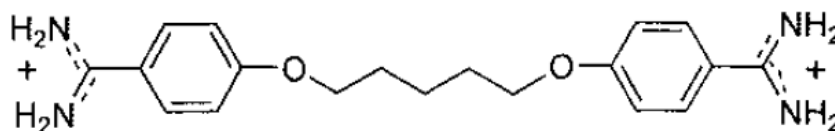


FIGURA 12: ESTRUTURA DA PENTAMIDINA

As diamidinas aromáticas são utilizadas no tratamento de leishmanioses desde 1939 e são tóxicas para diversos protozoários. Estes compostos interferem na síntese de poliaminas, impedindo que o protozoário utilize a S-adenosil-L-metionina, devido à inibição de enzimas como a ornitina descaboxilase e a espermidina sintetase. Por consequência, a síntese de moléculas importantes para a sobrevivência do parasita é impedida (BASSELIN *et al.*, 1996). A pentamidina é ainda capaz de se ligar ao DNA de maneira não intercalante em áreas ricas em AT e, esta ligação parece ocorrer preferencialmente em cinetoplastos de tripanossomas. Esta afinidade pelo DNA pode ser parcialmente explicada pela afinidade que as amidinas possuem por cargas negativas (no caso, pelos grupos fosfato), já que os dois nitrogênios ligados ao mesmo carbono, presentes no grupamento amidínico, realizam ressonância, formando um cátion temporário (WISPELWAY & PEARSON, 1991).

A administração venosa de pentamidina no combate de *Pneumocystis carinii* foi relatada pela primeira vez em crianças no ano de 1958 (WISPELWAY & PEARSON, 1991). Durante os anos 50 e 60, a terapia com pentamidina em crianças imunodeprimidas reduziu a mortalidade por infecção de *P. carinii* de 50 para 4%. A principal teoria do mecanismo de ação da pentamidina sobre *Pneumocystis carinii* é de que a droga interfira na fosforilação oxidativa e síntese de ácidos nucléicos. Ensaio com indivíduos adultos mostraram que a pentamidina altera a estrutura de proteínas nucléicas ao interagir com derivados de nucleotídeos di e tri-fosfato (GOA & CAMPOLI-RICHARDS, 1987).

Apesar da pentamidina se mostrar eficiente na terapia antiprotozoária, seu uso é restrito. A droga apresenta uma gama de efeitos adversos, o que acabou por restringir a utilização desta diamidina. A administração da pentamidina de modo intravenoso ou intramuscular está associada com efeitos adversos em pelo menos 50% dos pacientes. A toxicidade desta droga tem sido um importante fator limitante para o seu uso parenteral (WISPELWAY & PEARSON, 1991).

A pentamidina é administrada como isotionato de pentamidina, normalmente de forma parenteral através de injeções intramusculares ou administração intravenosa, porém também pode ser administrada na forma aerossólica. A dose geralmente utilizada na terapêutica é de 4mg/kg/peso corporal, não ultrapassando a dose diária de 300mg (COSTA, 1993). Existem poucas informações sobre sua farmacodinâmica e farmacocinética. O que se sabe é que sua maior absorção ocorre quando administrada de maneira intramuscular, e que seu pico plasmático ocorre após 1 hora da sua aplicação. Possui meia vida de eliminação de 6,4-9,4 horas, e 33-66% da pentamidina administrada é excretada na urina de forma intacta (LACY *et al.*, 2009).

Os efeitos tóxicos podem ser imediatos, como a hipotensão, taquicardia, náusea, vômito, sensação de gosto metálico, alucinações e síncope; localizados, como a aparecimento de protuberâncias na pele e coceira; e efeitos sistêmicos tardios, como leucopenia, trombocitopenia, elevação das enzimas hepáticas, febre, hipocalcemia, arritmia cardíaca, pancreatite,

hipoglicemia e nefrotoxicidade (WISPELWAY & PEARSON, 1991; BERMAN, 1988). Estudos com animais sugerem que estes efeitos adversos são dose e tempo-dependentes, e podem ser irreversíveis (SAI *et al.*, 1993).

Em estudos tanto em animais quanto em humanos, foi visto que a pentamidina acumula-se em alguns tecidos. As concentrações mais altas foram vistas no fígado, baço e rins (WISPELWAY & PEARSON, 1991). Donelly *et al.* (1988) avaliaram a distribuição da pentamidina administrada a pacientes imunodeprimidos. Foi visto que, na administração de baixas (0,5g/kg), médias (1-1,4g/kg) e altas (3,38-6,6g/kg) concentrações, o órgão que apresentou maiores níveis de acumulação da pentamidina foi o fígado, seguido por rins e baço, e pulmões.

Tendo em vista os efeitos adversos que a pentamidina pode causar, a síntese e avaliação de atividade biológica de novos compostos derivados de amidina é constante. Dentre estes, a triarilamidina *N-N'*-difetil-4-metoxibenzamidina.

2.3.3 *N-N'*-difetil-4-metoxibenzamidina

Em 1996, Echevarria *et al.* sintetizaram e avaliaram os efeitos anti-HIV de novos compostos triarilamidinas. Os compostos 2-*p*-X-fenil-1,3-*N,N'*-difetilamidinas variavam em suas substituições em X: H, OCH₃, CH₃, Br, Cl e NO₂. As triarilamidinas foram testadas quanto a sua habilidade em inibir a replicação do vírus HIV-1 em células C8166. O composto com o átomo de Cl como substituinte apresentou alta capacidade de reduzir a replicação viral, e elevado índice de seletividade para células infectadas em relação a viabilidade de células não infectadas.

Canto-Cavalheiro *et al.* (1997) avaliaram o efeito da 2-*p*-X-fenil-1,3-*N,N'*-difetilamidina com a substituição OCH₃ (metoxiamidina - FIGURA 13) sobre *Leishmania amazonensis* e *Trypanossoma cruzi*. O resultado foi promissor,

com uma LD₅₀ de 20 µM para *L. amazonensis*. O composto teve efeito significativo também contra *T. cruzi*, com a LD₅₀ de 59 nM . Posteriormente, Temporal *et al.* (2002) descreveram que a metoxiamidina foi capaz de diminuir a porcentagem de infecção *in vitro*, sem apresentar toxicidade para a célula hospedeira. Observou-se também que a concentração correspondente ao seu valor LD₅₀ impede a interiorização de *L. amazonensis* na célula hospedeira.

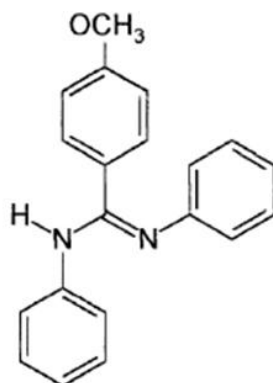


FIGURA 13: ESTRUTURA *N-N'*-DIFENIL-4-METOXI-BENZAMIDINA

Alguns estudos (AUGUSTO, LINARES & GIORGIO, 1996; GIORGIO *et al.*, 1996) mostram que ratos infectados com *L. amazonensis* apresentam altos níveis de NO[•]. A produção de NO[•] por *L. amazonensis* tem sido evidenciada nas formas infectantes e não infectantes do parasita e é atribuída a presença da enzima NO[•] sintase (NOS), identificada por ensaios de imunofluorescência. Acredita-se que produção de NO[•] pelo parasita promova a inibição da NOS dos macrófagos e, assim, proteja o parasita da destruição por estas células (FONSECA-GEIGEL, 2000).

Tendo em vista a efetividade da metoxiamidina contra *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, Genestra *et al.* (2003) avaliaram os efeitos da metoxiamidina na liberação de NO[•] por *L. amazonensis* na forma promastigota e amastigota. A metoxiamidina (LD₅₀ 20 µM) promoveu uma diminuição de ~23% na produção de NO[•], em comparação aos ~4% observados para a pentamidina (LD₅₀ 0,46 µM), na forma promastigota. Na forma amastigota a metoxiamidina promoveu uma inibição de ~53% nos níveis de NO[•] em comparação aos ~25% da pentamidina. Considerando que níveis

mais elevados de NO^{*}, produzido pelo parasita, podem favorecer o sua interiorização uma vez que modula negativamente a produção da espécie reativa pelos macrófagos (BALESTIERI *et al.*, 2002), o efeito da metoxiamidina no controle da infecção foi considerado mais importante do que o da pentamidina.

Seguindo nesta linha, Temporal *et al.* (2005) realizaram experimentos a fim de detectar os efeitos da metoxiamidina, em comparação a pentamidina, na interação parasita/célula hospedeira e na atividade da NOS purificada de *L. amazonensis*. O resultado mais relevante obtido no estudo foi que os parasitas pré-tratados com metoxiamidina não foram capazes de infectar os macrófagos (hospedeiro), o que não ocorreu para os parasitas pré-tratados com a pentamidina. Isso levou os autores a sugerirem que a metoxiamidina age nos mecanismos de defesa da *L. amazonensis*, como mostrado por Genestra *et al.* (2003). Nas mesmas condições, 24h após a infecção, foi observado que a metoxiamidina não interferiu na produção de NO pelos macrófagos (dados comparados ao controle). Na avaliação da enzima NOS purificada de *L. amazonensis*, foi observado que a metoxiamidina inibiu significativamente sua atividade, como demonstrado pelo menor consumo de NADPH na conversão de L-arginina a L-citrulina. Isto sugere que a ação da metoxiamidina está ligada a uma interferência direta com a NOS do parasita, através de um mecanismo ainda não esclarecido.

Apesar de já terem sido descritas atividades biológicas e possíveis mecanismos de ação da metoxiamidina, não existem trabalhos na literatura que descrevam sua possível toxicidade. Uma vez que o viés da utilização da pentamidina ocorre devido sua potente toxicidade e acúmulo em tecidos, como o fígado, torna-se pertinente a investigação do efeito da metoxiamidina em modelos de avaliação toxicológica, como o metabolismo energético hepático.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Para as amidinas são descritas diversas atividades biológicas. A pentamidina, por exemplo, é uma droga de referência para o tratamento de diferentes tipos de leishmanioses, entre outras doenças. Porém, causa importantes efeitos colaterais. Alguns destes efeitos, como a hipotensão, fadiga, náusea e alucinações, já foram descritos em casos de hepatotoxicidade com comprometimento de funções mitocondriais (WISPELWAY & PEARSON, 1991; BERMAN, 1988). Estudos demonstram que a pentamidina, liga-se preferencialmente ao DNA de cinetoplastos (organela correspondente à mitocôndria) de tripanossomas (WISPELWAY & PEARSON, 1991). O direcionamento preferencial para as mitocôndrias de alguns derivados de amidina também foi sugerido em modelo de células tumorais (LANSIAUX *et al.*, 2002).

Pertencente a mesma classe, a metoxiamidina mostrou-se efetiva *in vitro* contra *Leishmania amazonensis* e *Trypanossoma cruzi* (CANTO-CAVALHEIRO *et al.*, 1997, GENESTRA *et al.*, 2003, e TEMPORAL *et al.*, 2005) de maneira comparável a pentamidina.

Considerando a significativa toxicidade da pentamidina, os importantes efeitos da metoxiamidina contra *Leishmania amazonensis* e *Trypanossoma cruzi*, o fato de que compostos que possuem um grupamento amidínico têm aparente afinidade pelas mitocôndrias e, ainda, a ausência de estudos na literatura que avaliem a toxicidade da metoxiamidina em hepatócitos e mitocôndrias isoladas, este projeto teve como objetivo avaliar os efeitos deste composto sobre parâmetros do metabolismo energético nestes modelos experimentais.

Em mitocôndrias isoladas de fígado, foram avaliados os efeitos da metoxiamidina sobre:

- a) Respiração (estado 3 e 4, CCR e razão ADP/O)
- b) Atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons;

- c) Atividade da ATPase;
- d) Inchamento (*swelling*) mitocondrial;
- e) Potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi_m$).

Em hepatócitos, foram avaliados os efeitos da metoxiamidina e pentamidina sobre:

- a) Viabilidade
- b) Respiração celular
- c) Níveis de lactato e piruvato

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os reagentes DMSO, D-manitol, Hepes, EGTA, EDTA, BSA, rotenona, ácido glutâmico, ácido málico, ADP, ATP, NADH, citocromo c (tipo IV – coração de boi), fosfoenolpiruvato, piruvato quinase (tipo I – 100 U/mg/L de proteína), lactato desidrogenase (tipo I – 60 U/mg/L de proteína), FCCP, sulfato de magnésio, valinomicina, oligomicina, antimicina A, azul de tripan, MTT, colagenase tipo IV e 1A, glucagon, insulina, fator de crescimento epidermal, albumina de soro bovino, DMSO, meio essencial mínimo de Dubecco (DMEM) e isotionato de pentamidina foram obtidos do laboratório Sigma ChemicalCo, e meio específico para cultura primária de hepatócitos Hepatozyme® adquirido no laboratório Life Technologies.

Os seguintes reagentes foram adquiridos dos laboratórios indicados: ferricianeto de potássio – Riedel; cianeto de sódio – Baker; DCPIP – Eastman; fosfato de potássio monobásico - Synth e ácido succínico - Aldrich Chemical. O cloreto de potássio, sacarose, Tris, TCA juntamente com os demais reagentes com alto grau de pureza, foram adquiridos do laboratório Merck.

O derivado de amidina *N,N'*-difênil-4-metoxibenzamidina foi sintetizado e gentilmente doado pela Prof^a. Dra. Áurea Echevarria do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As estruturas dos compostos foram confirmadas por métodos espectroscópicos (ECHEVARRIA, 1996). Para utilização nos experimentos foram preparadas soluções estoque em DMSO nas concentrações de 5 mmol/L e 25 mmol/L. Estas soluções foram mantidas congeladas a -18°C e utilizadas por, no máximo, um mês após o preparo. Para a utilização nos ensaios, as soluções estoque foram diluídas em meio de reação para obter a concentração final desejada em cada situação experimental. Em experimentos preliminares estas concentrações foram estabelecidas, sendo nos experimentos com as preparações mitocondriais de 5; 25; 50 e 65 nmol/mg de proteína mitocondrial

e, nos experimentos com as culturas de hepatócitos de 25 e 65 μ M (para metoxiamidina e pentamidina). Essas doses foram baseadas na LD₅₀ (20 μ M) para *L. amazonensis* determinada por CANTO-CAVALHEIRO *et al.* (1997). Nos ensaios com mitocôndrias isoladas o composto foi incubado previamente por dois minutos com a preparação. Para cada experimento realizado foi feito também um ensaio controle contendo a mesma concentração de DMSO (solvente do composto) nas mesmas condições experimentais, atingindo concentração final máxima de 0,5%.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos machos albinos Wistar, com peso variando entre 180 - 220 g, mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com dieta balanceada Purina® e água à vontade, mantendo-se ciclo claro/escuro de 12 horas.

Especificamente para o isolamento das mitocôndrias, os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas permitindo-se água a vontade. Estes animais foram eutanasiados por decapitação. Para obtenção dos hepatócitos, os animais foram eutanasiados utilizando uma mistura de dois anestésicos, Cetamina (60 mg/Kg) e Xilazina (7,5 mg/Kg).

Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CERTIFICADO 548).

4.3 Cultura Primária de Hepatócitos

Todos os materiais utilizados para a cultura de hepatócitos eram estéreis. Os vidros foram autoclavados a 120°C e 1atm de pressão por 45 minutos, e os plásticos esterilizados em microondas em potência de 50% por 40 minutos e posteriormente secos em estufa a 37°C. Todos os procedimentos envolvendo células foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (VECO).

4.3.1 Soluções

4.3.1.1 Solução de Perfusão

Preparou-se uma solução concentrada 20x constituída de solução de Krebs: NaCl 2399 mmol/L, KCl 96 mmol/L, KH₂PO₄ 24 mmol/L, MgSO₄ 24 mmol/L acrescida de NaHCO₃ 480 mmol/L e tampão Hepes 1000 mmol/L, pH 7,4. Esta solução estoque concentrada foi posteriormente autoclavada a 120°C e armazenada em geladeira até o momento do uso, quando foi diluída 1x em água bidestilada estéril.

4.3.1.2 Solução de Isolamento 1

Esta solução foi constituída da solução de perfusão (item 4.3.1.1), acrescida de CaCl₂ 1300 mmol/L e colagenase 20 mg/mL.

4.3.1.3 Solução de Isolamento 2

Constituída da solução de isolamento 1 (item 4.3.1.2) acrescida de BSA 20%.

4.3.1.4 Solução Salina Tamponada

A Solução Salina tamponada (PBS), preparada como solução estoque cinco vezes concentrada: Na_2HPO_4 40,5 mol/L, KH_2PO_4 7,3 mol/L, NaCl 680mol/L foi autoclavada a 120°C, a 1atm de pressão e o pH foi ajustado para 7,4. Esta solução foi mantida sob refrigeração e no momento do uso diluída (5x) em água ultrapura estéril.

4.3.1.5 Meios de Cultura

O meio utilizado para a adesão dos hepatócitos às placas foi o meio essencial mínimo de Dubecco (DMEM), com alta concentração de glucose. Este meio, disponível em forma de pó, foi resuspenso em água ultrapura e teve seu pH ajustado para 7,4 com solução de bicarbonato de sódio. A esterilização do meio foi realizada por filtração em membrana 0,22 μm , em aparelho Sartorius. No momento da utilização, o meio DMEM foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, gentamicina (50 mg/mL), insulina (10 nmol/L), glucagon (10 nmol/L) e fator de crescimento epidermal (10 ng/mL) estéreis. Após adesão de 4h, o meio foi trocado para o meio comercial Hepatozyme®, específico para cultura primária de hepatócitos, suplementado com glutamina (0,2 mmol/L), penicilina (100 U/mL), e estreptomomicina (100 ng/mL).

4.3.2 Isolamento e Cultura

Os hepatócitos foram isolados de fígado de rato de acordo com o método de perfusão descrito por SEGLEN (1976), com modificações. Os procedimentos foram realizados no Departamento de Farmacologia da UFPR, em colaboração com a Prof. Dra. Alexandra Acco.

O animal foi pesado e anestesiado por via intraperitoneal com a mistura dos anestésicos cetamina (60 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg). Após anestesia, o abdômen do animal foi aberto e o estômago e colédoco isolados. Para que não ocorresse a coagulação sanguínea, realizou-se a administração de heparina (5000 UI/mL) por via endovenosa (veia cava caudal). A veia porta foi então canulada e o fígado perfundido com a solução de perfusão (item 4.3.1.1) aerada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% CO₂ (carbogênio) a 37°C sob um fluxo de 30 mL/min.

Após a perfusão inicial, a veia cava superior foi canulada e o fígado novamente perfundido com a solução de isolamento 1 (item 4.3.1.2) acrescida de uma mistura de colagenase tipo IA (20mg) e tipo IV (20mg). Quando o órgão apresentou sinais macroscópicos de perda de integridade tecidual, foi cuidadosamente retirado e as células dispersas por ação mecânica. A suspensão celular foi então filtrada em malha de 50 µm para retirada das células maiores. Todos os procedimentos seguintes foram realizados em capela de fluxo laminar a 4°C. A suspensão celular foi dividida em duas partes para o processo de centrifugação. Naquele momento foi adicionada a solução de isolamento 2 (item 4.3.1.3) e as células centrifugadas a 400rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o pellet de células ressuspense em meio de isolamento 2 (item 4.3.1.3), seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. Este processo foi repetido por quatro vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspense em DMEM alta glucose suplementado (item 4.3.1.5).

A viabilidade celular foi verificada através da utilização o corante azul de tripan (0,4% p/v), e somente foram utilizadas preparações com viabilidade superior a 80%. As células foram divididas em dois tubos, sendo um destinado aos experimentos com as células em suspensão e o outro em cultura. Para as culturas, as células foram plaqueadas (1×10^6 células) em placa de 60 cm^2 de diâmetro (p60) em meio DMEM alta glucose suplementado (item 4.3.1.5). As placas foram incubadas em estufa 37°C a 5% de CO_2 para adesão. Passadas 4 horas, o meio DMEM foi substituído pelo meio Hepatozyme (item 4.3.1.5). As células mantiveram-se em cultura nas mesmas condições por aproximadamente 18 horas, até a realização dos experimentos.

4.4 Determinações em Hepatócitos

4.4.1 Determinações em Hepatócitos em Suspensão

4.4.1.1 Determinação do Consumo de Oxigênio

O consumo de oxigênio foi monitorado nas células em suspensão por respirometria de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). As medições foram feitas em duas câmaras a 37°C , sob suave agitação. Considerou-se o fator de solubilidade de oxigênio de 0,89 para o meio DMEM alta glucose e a pressão barométrica local (91 kPa), a concentração de oxigênio no ar de saturação foi de $172,421 \mu\text{mol/L}$.

O consumo de oxigênio foram definidos como: Basal (correspondente à respiração basal da célula, sem a adição de substratos ou inibidores); *Leak* (correspondente a respiração celular na presença de oligomicina, inibidor da ATPsintase); Desacoplado (consumo de oxigênio na presença de $1 \mu\text{mol/L}$ do desacoplador FCCP (corresponde a respiração celular em resposta à adição de um desacoplador) (GNAIGER, 2008). Foi utilizado o equivalente a 1×10^5 células, devido a grande capacidade metabólica das mesmas. Os resultados

são expressos como o fluxo de oxigênio (pmols/seg/ 10^5 células) como média \pm desvio padrão.

4.4.1.2 Determinação de Lactato e Piruvato

Os hepatócitos recém isolados foram resuspenso em PBS a 37°C e mantidos sob agitação por 10 minutos. Após esse período foi adicionada a solução glicose 5 mmol/L, e coletadas alíquotas da amostra nos tempos 0, 20 e 40 minutos. Imediatamente após a coleta, a suspensão celular foi centrifugada por 1 minuto a 1000 rpm e no sobrenadante foram dosados Lactato e Piruvato, segundo Gutman & Wahlefeld (1974) e Czoc & Lampecht (1974), respectivamente.

O sistema de dosagem de lactato, em volume final de 300 μ L, foi constituído de tampão glicina 0,1 mmol/L e hidrazina 0,4 mmol/L em pH 9,5, NAD^+ 1,5 mmol/L, enzima Lactato Desidrogenase 3U e 150 μ L de amostra. A quantidade de NADH formado foi determinado a 340nm, após 90 minutos de incubação a 37°C (GUTMAN & WAHLEFELD, 1974). Os resultados foram expressos em nmol/L sendo a quantidade de lactato calculado a partir do coeficiente de extinção molar de $6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o NADH.

O piruvato foi dosado igualmente em volume final de 300 μ L, em meio de reação contendo Tris-HCl 0,1 mmol/L em pH 7,0, NADH 0,15 mmol/L, lactato desidrogenase 0,1U e quantidade adequada de amostra. A quantidade de NADH oxidado foi determinado a 340nm, após 20 minutos de incubação a 37°C (CZOC & LAMPECHT, 1974). Os resultados foram expressos em nmol/L sendo a quantidade de piruvato calculado a partir do coeficiente de extinção molar de $6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o NADH.

4.4.2 Determinações em Hepatócitos em Cultura

4.4.2.1 Viabilidade Celular

4.4.2.1.1 Método do MTT

Este método colorimétrico se baseia na redução enzimática do MTT a sais de formazan, realizado por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas e, portanto, consideradas viáveis. Os sais de formazan possuem cor púrpura, e podem ser quantificados por espectrofotometria em 550 nm (MOSMANN, 1983).

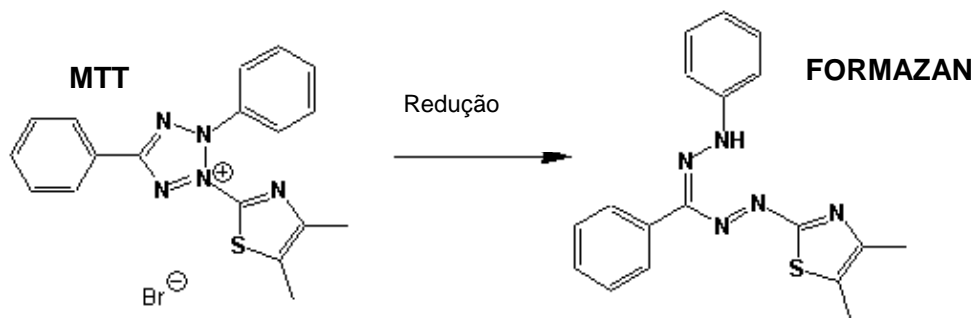


FIGURA 14: REPRESENTAÇÃO DA REDUÇÃO ENZIMÁTICA DE SAIS DE MTT A SAIS DE FORMAZAN

FONTE: REILLY *et. al.*, 1998.

Após a adesão dos hepatócitos (1×10^6 células) em meio DMEM suplementado em placas p60, o meio foi trocado para o Hepatozyme® contendo o composto avaliado e as placas foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por 18 horas. Ao término do tratamento, o meio foi retirado e foram acrescentados 2 mL de MTT (5mg/mL), seguindo-se incubação por 3 horas. Após a incubação, o MTT foi removido e os cristais de formazan formados dissolvidos pela adição de 1 mL de DMSO. Após homogeneização a absorbância foi lida em leitor de microplacas Tecan Infinite M200, em comprimento de onda de 550 nm. A porcentagem de células viáveis nos tratamentos em relação as células não tratadas (controle) foi calculada conforme a equação abaixo:

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

4.4.2.1.2 Atividade da Enzima LDH

A LDH catalisa a redução do piruvato a lactato com a concomitante oxidação do NADH a NAD⁺. O decréscimo da absorvância em 340nm decorrente desta oxidação é proporcional a atividade da LDH na amostra. A atividade da enzima foi determinada no sobrenadante das culturas celulares após o tratamento, como descrito acima.

O ensaio foi realizado utilizando o Kit para detecção da Desidrogenase Láctica (LDH) da LABTEST, seguindo as orientações do fabricante.

4.5 Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato

4.5.1 Isolamento de mitocôndrias para determinação do consumo de oxigênio, potencial transmembrana ($\Delta\psi_m$) e atividade ATPásica.

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por Voss *et al.* (1961), com algumas modificações, utilizando-se como meio de extração: D-Manitol 250 mmol/L, tampão Hepes 10 mmol/L pH 7,2, EGTA mmol/L e BSA 0,1 g%. Para a obtenção das mitocôndrias, os animais foram sacrificados por decapitação. O fígado foi imediatamente retirado e imerso em meio de extração gelado. Depois de lavado, o órgão foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador van Potter Elvehjen, passando o fígado 3x pelo pistilo frouxo e 2x pelo pistilo normal. O homogeneizado obtido foi então centrifugado a 3200 x g a 4°C em centrífuga Hitachi, modelo himac CR-21E, durante 5

minutos, para eliminação de restos de células intactas, membranas e núcleos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 12.600 x g, durante 10 minutos, a 4°C. O precipitado obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspenso e lavado em meio de extração por centrifugação a 8.100 x g, durante 10 minutos, a 4°C. As mitocôndrias assim obtidas forma ressuspenso em meio de extração à concentração aproximada de 50 mg/mL.

4.5.2 Isolamento de mitocôndrias para determinação do grau de inchamento mitocondrial

Para os experimentos de inchamento mitocondrial a técnica de isolamento foi a mesma descrita no item anterior, utilizando-se, porém, o meio de extração constituído de: sacarose 330 mmol/L, Tris-HCl 1,0 mmol/L, pH 7,5 e EDTA 1,0 mmol/L (MUSTAFA *et al.*, 1966). Na última lavagem o EDTA foi omitido.

4.5.3 Obtenção de mitocôndrias rompidas para avaliação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória

Mitocôndrias de fígado de rato, isoladas como descrito no item 4.5.1, foram congeladas em nitrogênio líquido até sua utilização. Para o seu rompimento, as mitocôndrias passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento. Os fragmentos de membrana obtidos foram utilizados para a avaliação da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória e da ATPase.

4.5.4 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As leituras foram realizadas a 700 nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U - 2001 UV/VIS.

4.6 Determinações em mitocôndrias rompidas

4.6.1 Atividade das enzimas da cadeia respiratória

4.6.1.1 NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade do complexo NADH Oxidase foi determinada polarograficamente como recomendado por Singer (1974). O sistema de reação, à temperatura de 28° C, foi constituído de: tampão fosfato 80 mmol/L, pH 7,4, EDTA 50 µmol/L, NADH 0,2 mmol/L e 2 mg de proteína mitocondrial em volume final de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de NADH, e acompanhada pelo fluxo de oxigênio em Oxígrafo Oroboros. Os resultados foram expressos como fluxo de oxigênio (pmols por segundo por miligrama de proteína mitocondrial).

4.6.1.2 NADH-Desidrogenase (NADH: Ferricianeto Óxido-Redutase)

A atividade do complexo NADH-Desidrogenase foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Singer (1974). A reação foi realizada a 28°C, em sistema de reação constituído de: tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,4,

EDTA 2 mmol/L, NADH 0,2 mmol/L, ferricianeto de potássio 0,6 mmol/L, rotenona 1 $\mu\text{mol/L}$ e 0,1 mg de proteína mitocondrial em volume final de 1 mL. A reação foi então monitorada a 420 nm e os resultados expressos em micromol de ferricianeto reduzido/min/mg de proteína, considerando o coeficiente de extinção molar do ferricianeto de $1.040 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (CREUTZ & SUTIN, 1973).

4.6.1.3 NADH citocromo c redutase (NADH: Citocromo c Óxido Redutase)

A atividade da NADH citocromo c redutase foi avaliada pelo método descrito por Somlo (1965). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,4, EDTA 2 mmol/L, NADH 50 $\mu\text{mol/L}$, citocromo c (oxidado) 40 $\mu\text{mol/L}$, NaCN 1 mmol/L e 0,1 mg de proteína mitocondrial e os experimentos realizados em volume final de 1 mL. A reação ocorreu a 28°C e foi iniciada pela adição de NADH. A velocidade de redução do citocromo c foi acompanhada a 550 nm e o resultado expresso em nmol de citocromo c reduzido/min/mg de proteína mitocondrial, considerando-se o coeficiente de extinção do citocromo c (red-ox) a 550 nm de $19.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (KEYHANI & KEYHANI, 1975).

4.6.1.4 Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade do complexo Succinato Oxidase foi determinada através do registro polarográfico do consumo de O_2 pelo método de Singer (1974). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 80 mmol/L pH 7,4, succinato de sódio 10 mmol/L, rotenona 5 mmol/L e 1mg de proteína mitocondrial em volume final de 2mL. A reação ocorrerá a 28°C e foi iniciada

pela adição do substrato. Os resultados foram expressos como fluxo de oxigênio (pmols por segundo por miligrama de proteína mitocondrial).

4.6.1.5 Desidrogenase succínica (Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido Redutase)

A atividade da desidrogenase succínica foi determinada pelo método de Singer (1974), utilizando-se DCPIP e PMS como aceptores artificiais de elétrons. O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,4, succinato de sódio 20 mmol/L, NaCN 1 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, rotenona 1 $\mu\text{mol/L}$ e 0,1 mg de proteína mitocondrial em volume final de 1,0 mL. A mistura foi incubada por 10 minutos a 28°C, iniciando a reação pela adição de DCPIP 60 $\mu\text{mol/L}$ e PMS 1 mmol/L. A velocidade de redução do DCPIP foi monitorada a 600 nm e os resultados expressos em nanomol de DCPIP reduzidos/min/mg de proteína mitocondrial, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $19.100 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o DCPIP reduzido (SINGER, 1974).

4.6.1.6 Succinato citocromo c redutase (Succinato: Ferrocitocromo c Oxidoredutase)

A atividade da succinato citocromo c redutase foi determinada pelo método de Somlo (1965), medindo-se a redução do citocromo c. A cadeia respiratória foi bloqueada com NaCN e rotenona. O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol/L pH 7,4, EDTA 2 mmol/L, NaCN 1 mmol/L, succinato de sódio 5 mmol/L, rotenona 2 $\mu\text{mol/L}$ e 0,1 mg de proteína mitocondrial em volume final de 1mL. Os reagentes presentes no sistema foram incubados por 10 minutos a 28°C e a reação iniciada pela adição de 40

$\mu\text{mol/L}$ do citocromo *c*. A redução do citocromo *c* foi acompanhada a 550 nm e a atividade enzimática expressa em nmol de citocromo *c* reduzido/min/mg de proteína mitocondrial, considerando-se o coeficiente de extinção do citocromo *c* (red-ox) a 550 nm de $19.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (KEYHANI & KEYHANI, 1975).

4.6.1.7 Citocromo *c* oxidase (Ferrocitocromo *c*: Oxigênio Óxido-redutase)

4.6.1.7.1 Obtenção do ferrocitocromo *c*.

Para a obtenção da forma reduzida do citocromo *c* foi utilizado o ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) como agente redutor. O ferrocitocromo *c* foi então separado do excesso de ditionito por cromatografia em coluna de Sephadex G-25 (YONETANI & RAY, 1965), e a concentração de citocromo *c* reduzido determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de $27.700 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 550 nm (MARGOLIASH, 1954). O ferrocitocromo preparado através deste procedimento continha menos de 5% da proteína oxidada e se mantém reduzido durante 24 horas.

4.6.1.7.2 Citocromo *c* oxidase

A atividade do complexo citocromo *c* oxidase foi determinada espectrofotometricamente segundo Mason *et al.* (1973). O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol/L pH 7,4, EDTA 2 mmol/L, ferrocitocromo *c* 30 $\mu\text{mol/L}$ e 0,1 mg de proteína mitocondrial, à 28°C em volume final de 1,0 mL. A atividade foi expressa em nmol de citocromo *c* oxidado/min/mg de proteína mitocondrial, considerando-se o coeficiente de extinção molar do citocromo *c* (red-ox) a 550 nm como descrito no item 4.6.1.3.

4.6.2 Determinação da atividade da F₁F₀ ATPase

A atividade da ATPase (ATP fosfohidrolase) foi determinada medindo-se a liberação de fosfato inorgânico decorrente da hidrólise do ATP, na presença de um sistema regenerador de ATP, de acordo com o descrito por Pulmann *et al.* (1960), com algumas modificações. O ensaio foi realizado a 37°C, em sistema de reação constituído de sacarose 50 mmol/L, Tris-acetato 50 mmol/L pH 7,4, acetato de magnésio 3 mmol/L, acetato de potássio 30 mmol/L, PEP 1 mmol/L, piruvato quinase 4 unidades, lactato desidrogenase 3 unidades, NADH 0,2 mmol/L, ATP 3 mmol/L e 0,1 mg de proteína mitocondrial em volume final de 1 mL. A reação foi iniciada com a adição de ATP e os resultados expressos em nmol de fosfato liberado/min/mg de proteína mitocondrial, considerando que 1 nmol de NADH oxidado corresponde a 1 nmol de fosfato liberado.

4.7 Determinações em Mitocôndrias Intactas

4.7.1 Determinação do consumo de O₂, cálculo do coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O.

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 28°C, sob agitação. Considerou-se o fator de solubilidade de oxigênio de 0,92 para o meio de reação e a pressão barométrica local (91,3 kPa). Nestas condições a concentração de oxigênio saturante foi de 201,95 µmol/L. O sistema de reação era constituído de: D-Manitol 125 mmol/L, tampão Hepes 10 mmol/L pH 7,2, KCl 65 mmol/L e BSA 0,1g%. Durante a reação, o meio foi suplementado com glutamato de sódio 5 mmol/L e malato de sódio 2,5 mmol/L, K₂HPO₄ 2 mmol/L e ADP 0,2 mmol/L (VOSS *et al.*, 1963). A quantidade de mitocôndrias utilizada em cada

experimento, expressa com relação à concentração de proteínas, foi de 2 mg.

As velocidades respiratórias foram expressas como fluxo de O_2 em pmols por segundo por miligrama de proteína. A razão ADP/O foi determinada como descrito por Chance & Williams (1955), a qual é obtida da razão entre quantidade de ADP adicionado no sistema em nmol e a quantidade de oxigênio consumido, em nátomos, durante a respiração na presença de ADP (estado 3). O coeficiente de controle respiratório (CCR) foi obtido da razão entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado 3) e a velocidade após o consumo de ADP (estado 4).

4.7.2 Determinação da atividade da F_1F_0 ATPase

A atividade da F_1F_0 ATPase em mitocôndrias intactas foi determinada através do método de Pullman *et al.* (1960), com algumas modificações. O sistema de reação foi constituído de: sacarose 50 mmol/L, tampão Tris-HCl 12 mmol/L pH 7,4, KCl 50 mmol/L e 2 mg de proteína mitocondrial em volume final de 1,0 mL mantendo a temperatura de reação em 30°C. A reação foi iniciada com a adição de ATP 3 mmol/L e mantida sob agitação constante. Após 10 minutos foi adicionado TCA, em concentração final de 5% (m/v), com o objetivo de finalizar a reação. Em seguida, o material foi centrifugado a 7.800 x g por 1 min, sendo o fosfato inorgânico presente no sobrenadante dosado segundo o método de Sumner (1944). Os resultados foram expressos em nanomol de fosfato liberado/min/mg de proteína mitocondrial.

4.7.3 Determinação do inchamento (*Swelling*)

Os experimentos de inchamento mitocondrial foram desenvolvidos em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV - 2450 UV/VIS, equipado com banho termostaticado EYELA, no comprimento de onda de 546nm.

4.7.3.1 Inchamento em mitocôndrias desenergizadas na presença de valinomicina e K⁺

O inchamento mitocondrial decorrente da entrada de K⁺ na matriz, mediada pelo ionóforo valinomicina, foi determinado como descrito por Moreno & Madeira (1990). O meio de reação, mantido a 28°C, é constituído de KNO₃ 135 mmol/L, tampão Hepes 5 mmol/L pH 7,4, EDTA 0,1 mmol/L, rotenona 1 µmol/L, antimicina A 2 µg, valinomicina 4 µg e 0,3 mg de proteína mitocondrial por mililitro de solução.

4.7.3.2 Inchamento em mitocôndrias energizadas com glutamato e malato

O inchamento mitocondrial, decorrente da entrada de íons sódio na matriz, foi monitorado pelo método descrito por Seppala *et al.* (1971). O meio de reação em volume final de 3mL, mantido a 28°C, foi constituído de sacarose 100 mmol/L, tampão Hepes 30 mmol/L, pH 7,5, EDTA 0,5 mmol/L, acetato de sódio 50 mmol/L e 1 mg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de glutamato de sódio na concentração de 15 mmol/L. Depois de atingido o novo ponto de equilíbrio, o meio de reação foi suplementado com 4 µmol/L de rotenona para observação da contração da organela.

4.7.4 Determinação do Potencial de Tranmembrana ($\Delta\Psi_m$)

O potencial elétrico transmembrana foi estimado em espectrofluorímetro RF-5031PC (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.) através da variação da fluorescência emitida pela safranina O em mitocôndrias energizadas com glutamato e malato de sódio. Os comprimentos de onda de excitação e

emissão foram 495 e 586 nm, respectivamente (WEICKOWSKI & WOJTCZAK, 1998). As fendas (slit) de excitação e emissão foram selecionadas em 3 nm. O sistema de incubação, em volume final de 2 mL, mantido a 28°C era constituído de: sacarose 250 mmol/L, MOPS 20 mmol/L, pH 7,2, NaH₂PO₄ 1mmol/L, safranina 5 µmol/L, glutamato de sódio 10 mmol/L, malato de sódio 5mmol/L e 1 mg de proteína mitocondrial.

4.8 Análise Estatística

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeitos da metoxiamidina sobre a mitocôndria

5.1.1 Efeitos da metoxiamidina sobre a respiração mitocondrial

Com o objetivo de avaliar os efeitos da metoxiamidina sobre a bioenergética mitocondrial, optou-se por utilizar como modelo experimental mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Foram avaliados os seguintes parâmetros: consumo de oxigênio na presença de ADP (estado 3 da respiração) e, após sua exaustão (estado 4 da respiração), coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O. Estes parâmetros foram obtidos utilizando os substratos oxidáveis glutamato e malato.

Na figura 15A estão representados os efeitos da metoxiamidina sobre o consumo de oxigênio durante o estado 3 da respiração. Nesta figura observa-se que embora o composto tenha promovido uma inibição em todas as concentrações testadas, apenas a correspondente a concentração intermediária (25nmol/mg de proteína), foi estaticamente significativa (~15%). Essa redução na velocidade do consumo de oxigênio durante o estado 3 pode ter resultado da inibição: de complexos da cadeia respiratória, das desidrogenases dos substratos; da ATPsintase e/ou do transporte de substrato.

Com relação aos efeitos da metoxiamidina sobre a velocidade de consumo de oxigênio após a exaustão de ADP, o estado 4 da respiração, observa-se na figura 15B que o composto promoveu um estímulo em todas as concentrações, sendo este estatisticamente significativo para as duas maiores concentrações (50 e 65 nmol/mg proteína). Para a concentração de 50 nmol/mg o estímulo foi de ~32%, chegando a ~43% na maior concentração (65 nmol/mg). Esses dados sugerem que, nas duas maiores concentrações, a metoxiamidina tem um efeito desacoplador, responsável pelo aumento na velocidade do transporte de elétrons e, conseqüentemente, do consumo de oxigênio. O efeito desacoplador da metoxiamidina nas maiores concentrações (50 e 65 nmol/mg proteína) poderia explicar o perfil de inibição sobre o estado 3 (FIGURA 15A). Neste caso, a reentrada de prótons na matriz mitocondrial promoveria o aumento do transporte de elétrons e consumo de oxigênio o que, por sua vez, poderia minimizar o efeito inibitório do composto nestas

concentrações. Isto também justificaria a inibição sobre o estado 3, observada apenas para a concentração intermediária de 25 nmol/mg proteína, a qual não promoveu estímulo sobre o estado 4.

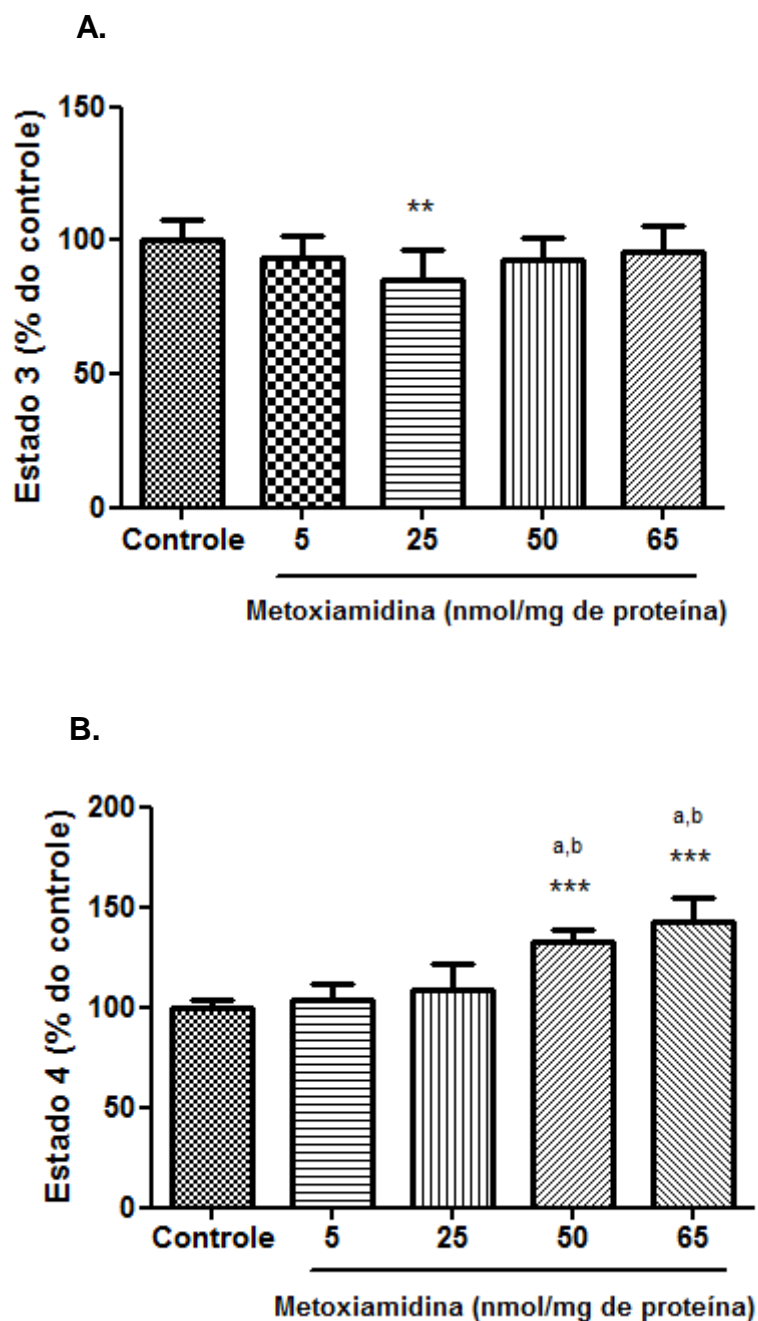


FIGURA 15: EFEITOS DA METOXIAMIDINA SOBRE OS ESTADOS 3 E 4 DA RESPIRAÇÃO

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, no item 4.7.1. Sistema de reação: D-manitol 125 mmol/L, tampão HEPES 10 mmol/L, pH 7,2, KCl 65 mmol/L, EGTA 0,1 mmol/L e BSA 0,1%. Suplementado com glutamato de sódio 5 mmol/L,

malato de sódio 2,5 mmol/L, K_2HPO_4 1,6 mmol/L e ADP 0,1 mol/L e 2 mg de proteína mitocondrial. Controle – experimentos realizados na ausência de metoxiamidina e DMSO.

A. Estado 3 da respiração: 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de $381,86 \pm 26,54$ pmol por segundo por miligrama de proteína mitocondrial.

B. Estado 4 da respiração: 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de $118,4 \pm 14$ pmol por segundo por miligrama de proteína mitocondrial.

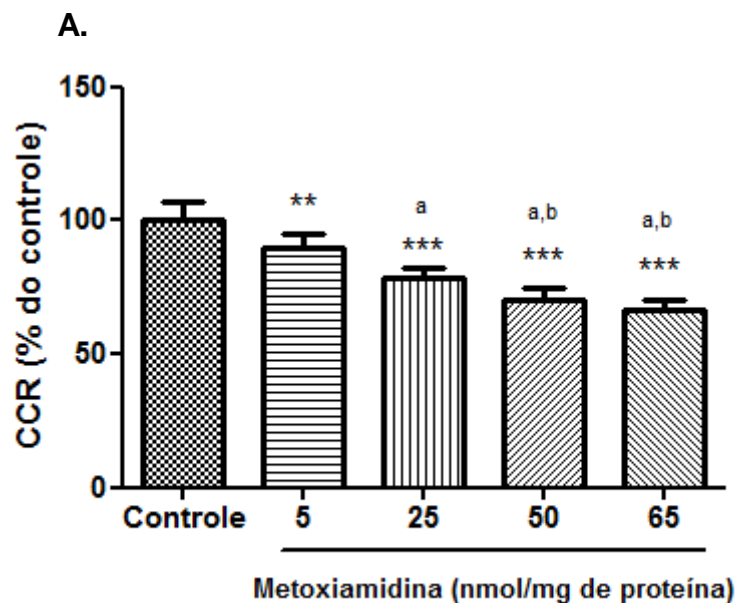
Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata.

** Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,01$).

^a Valores estatisticamente diferentes da concentração 5 nmol/mg de proteína ($p < 0,0001$).

^b Valores estatisticamente diferentes da concentração 25 nmol/mg de proteína ($p < 0,0001$).

Os valores do CCR e razão ADP/O estão representados nas figuras 16A e 16B, respectivamente. Em consequência da inibição do estado 3 e estímulo do estado 4, observa-se que os valores de CCR diminuíram em função do aumento da concentração da metoxiamidina, chegando a ~33% para a maior concentração (65 nmol/mg de proteína). Também como esperado, a razão ADP/O diminuiu em ~11% para as 3 maiores concentrações da metoxiamidina (25-60 nmol/mg proteína).



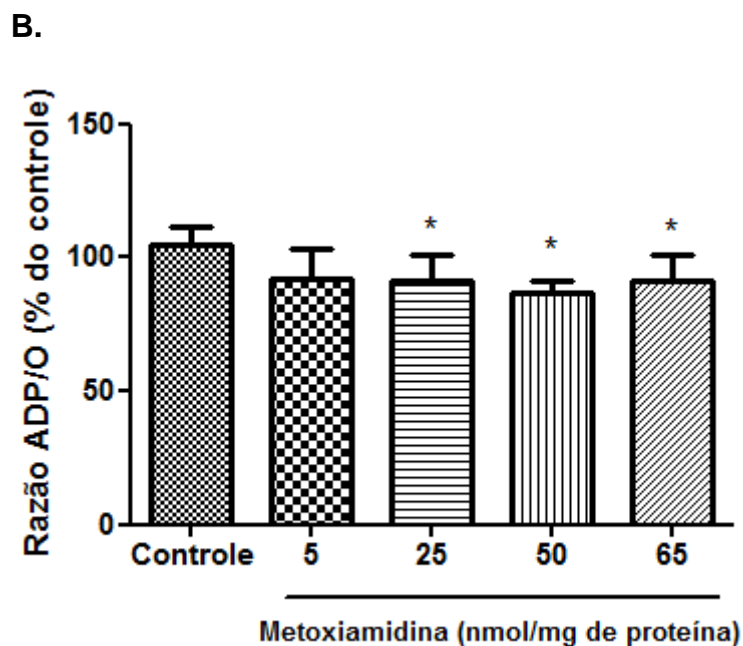


FIGURA 16: EFEITOS DA METOXIAMIDINA SOBRE O COEFICIENTE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO (CCR) E RAZÃO ADP/O

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, no item 4.7.1. Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol/L, tampão Hepes 10 mmol/L, pH 7,2, KCl 65 mmol/L, EGTA 0,1 mmol/L e BSA 0,1%. Suplementado com glutamato de sódio 5 mmol/L, malato de sódio 2,5 mmol/L, K_2HPO_4 1,6 mmol/L e ADP 0,1 mol/L e 2 mg de proteína mitocondrial. Controle – experimentos realizados na ausência de metoxiamidina e DMSO.

A. CCR: 100% corresponde a $3,5 \pm 0,15$.

B. ADP/O: 100% equivale $2,68 \pm 0,32$ para glutamato e malato.

Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata.

* Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$) *** ($p < 0,0001$)

^a Valores estatisticamente diferentes da concentração 5nmol/mg de proteína ($p < 0,0001$).

^b Valores estatisticamente diferentes da concentração 25nmol/mg de proteína ($p < 0,05$).

Em 1996, Moreno avaliou o efeito de outra amidina, a pentamidina, fármaco amplamente utilizado no tratamento de tratamento de *Pneumocystis carinii* e de leishmanioses, sobre alguns parâmetros da bioenergética mitocondrial. Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, o composto (100-400 $\mu\text{mol/L}$) não promoveu efeitos sobre o estado 3 da respiração. Por outro lado, causou um significativo aumento da respiração durante o estado 4. Para os experimentos utilizando succinato de sódio como substrato oxidável, a adição de pentamidina durante o estado 4 provocou um aumento de mais de 100% no consumo de oxigênio para a concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$, chegando a 400% para a concentração de 200 $\mu\text{mol/L}$.

Quando comparados os efeitos da pentamidina e metoxiamidina na mesma concentração (50nmol/mg de proteína), os efeitos da segunda sobre o estado 4 são mais discretos (estímulo de ~32% - FIGURA 15B). Já em relação ao estado 3, somente a metoxiamidina promoveu uma inibição significativa. Estes resultados sugerem que a presença do grupamento metoxi poderia ser o responsável pela diferença de efeitos. Ueno *et al.* (1996) sintetizaram vários análogos de rotenona e avaliaram seus efeitos como potenciais inibidores do complexo I em mitocôndrias de coração bovino. Foi observado que o composto dimetoxilado foi o que possui atividade mais favorável a inibição. Nesse sentido, pode-se sugerir que a metoxiamidina promove inibição no estado 3 devido a ação desse composto na cadeia respiratória, possivelmente devido a presença do grupamento metoxi, que não está presente na pentamidina.

Os resultados referentes ao estado 3 da respiração mitocondrial (FIGURA 15A) revelaram que a presença da metoxiamidina causou uma inibição no consumo de oxigênio. Para avaliar se esse efeito poderia relacionar-se a inibição do transporte de elétrons na cadeia respiratória, foram realizados experimentos na presença do desacoplador FCCP. O FCCP é um protonóforo que permeia a membrana mitocondrial interna tanto na forma protonada como desprotonada. Isso é possível devido à presença de orbitais π que permitem a deslocalização da carga em sua estrutura e, conseqüentemente, o seu livre trânsito pela membrana mitocondrial (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Uma vez na matriz mitocondrial, o FCCP a se desprotona e, como consequência, o gradiente eletroquímico de prótons se desfaz. Em resposta, o transporte de elétrons ocorre em velocidade máxima e a ATPsintase passa a atuar como ATPase, hidrolisando o ATP, na tentativa de restabelecer o gradiente eletroquímico de prótons (VALMAS, ZURYN & EBERT, 2008). Com o transporte de elétrons em velocidade máxima, é possível avaliar, em modelo experimental de mitocôndrias isoladas, o efeito de um composto sobre a cadeia transportadora de elétrons. No entanto, os possíveis efeitos sobre os transportadores dos substratos ainda se refletem no resultado observado, uma vez que a membrana mitocondrial interna permanece íntegra.

Nos resultados mostrados na figura 17 pode-se observar o efeito da metoxiamidina sobre o consumo de oxigênio na presença de FCCP. Embora haja uma inibição na concentração de 25 nmol/mg proteína, esta não foi estatisticamente significativa. No entanto, de maneira interessante, nas duas maiores concentrações do composto (50 e 65 nmol/mg de proteína), o consumo de oxigênio diminuiu em ~20%. Isso reforça a possibilidade de que o efeito desacoplador observado para estas concentrações (estado 4 – FIGURA 15B) esteja mascarando a inibição sobre o estado 3 (FIGURA 15A). Ainda, estes experimentos sugerem que a inibição do estado 3 promovido pela metoxiamidina seja decorrente de uma inibição dos complexos da cadeia respiratória.

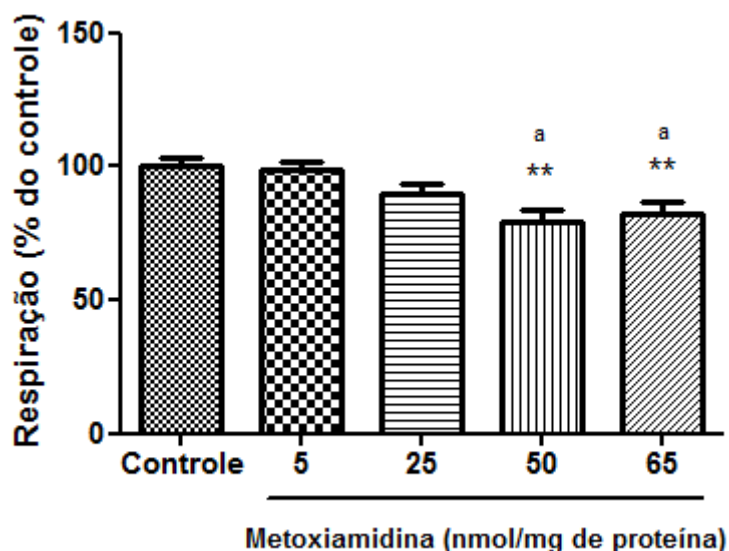


FIGURA 17: EFEITO DA METOXIAMIDINA SOBRE A RESPIRAÇÃO EM PRESENÇA DE FCCP

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, no item 4.7.1. Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol/L, tampão Hepes 10 mmol/L, pH 7,2, KCl 65 mmol/L, EGTA 0,1 mmol/L e BSA 0,1%. Suplementado com glutamato de sódio 5 mmol/L, malato de sódio 2,5 mmol/L, K_2HPO_4 1,6 mmol/L, FCCP 1 μ mol/L e 2 mg de proteína mitocondrial. Controle – experimentos realizados na ausência de metoxiamidina e DMSO.

100% corresponde ao fluxo de oxigênio de $550 \pm 61,8$ pmol por segundo por miligrama de proteína. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata.

** Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,01$).

^a Valores estatisticamente diferentes da concentração 5nmol/mg de proteína ($p < 0,05$).

Para avaliar se a metoxiamidina possui um efeito desacoplador, sugerido pelo aumento significativo no consumo de oxigênio durante o estado 4

(FIGURA 15B), foram realizados experimentos na presença de oligomicina. A oligomicina é capaz de ligar-se à porção F_o do complexo F_1F_o ATPsintase, impedindo o retorno de prótons a matriz mitocondrial e, desta forma, a síntese de ATP. Consequentemente, o potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi_m$) será máximo e o consumo de oxigênio mínimo, ocorrendo apenas em resposta ao vazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna para a matriz (*proton leak*). Assim, a adição de oligomicina durante o estado 3 da respiração induz a uma condição correspondente ao estado 4 (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Nestes experimentos, um composto que atue como um desacoplador será capaz, mesmo em presença de oligomicina, de aumentar o transporte de elétrons e, por consequência, o consumo de oxigênio.

Na figura 18 estão representados os resultados destes experimentos. Observa-se que para as concentrações de 25, 50 e 65 nmol/mg de proteína, ocorreu um aumento dose dependente no consumo de oxigênio após a adição de metoxiamidina, chegando a ~69% para a maior concentração testada. Estes resultados estão de acordo com o aumento do consumo de oxigênio durante o estado 4 da respiração mitocondrial (FIGURA 15B) e confirmam a hipótese de que a metoxiamidina apresenta um efeito desacoplador, mais pronunciado nas maiores concentrações.

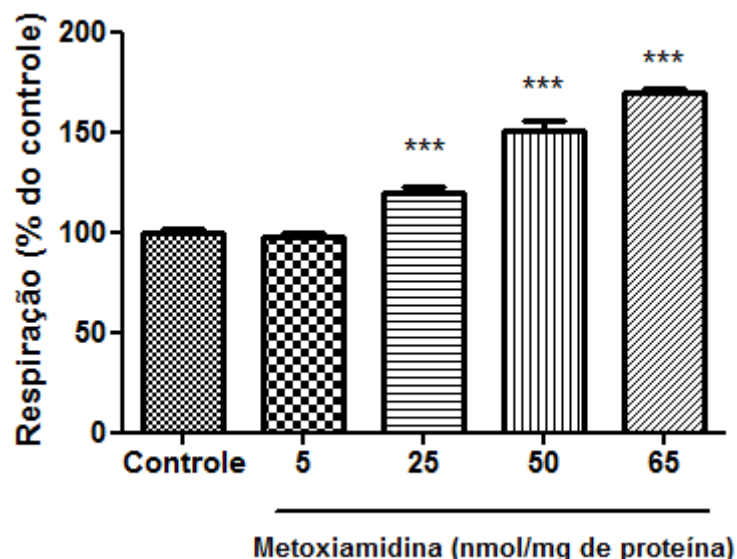


FIGURA 18: EFEITO DA METOXIAMIDINA SOBRE A RESPIRAÇÃO EM PRESENÇA DE OLIGOMICINA

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, no item 4.7.1. Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol/L, tampão Hepes 10 mmol/L, pH 7,2, KCl 65 mmol/L, EGTA 0,1 mmol/L e BSA 0,1%. Suplementado com glutamato de sódio 5 mmol/L, malato de sódio 2,5 mmol/L, K_2HPO_4 1,6 mmol/L e ADP 0,1 mol/L, Oligomocina 3,4 μ mol/L e 2 mg de proteína mitocondrial. Controle – experimentos realizados na ausência de metoxiamidina. 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de $77,4 \pm 7,6$ pmol por segundo por miligrama de proteína mitocondrial. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata.

*** Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,0001$).

^a Valores estatisticamente diferentes da concentração 5nmol/mg de proteína ($p < 0,0001$).

^b Valores estatisticamente diferentes da concentração 25nmol/mg de proteína ($p < 0,0001$).

^c Valores estatisticamente diferentes da concentração 50nmol/mg de proteína ($p < 0,0001$).

5.1.2 Efeitos da metoxiamidina sobre a atividade dos complexos enzimáticos da Cadeia Respiratória

A redução do consumo de oxigênio em mitocôndrias acopladas em presença de ADP (estado 3 - FIGURA 15A) e após a adição de FCCP (FIGURA 17), sugerem que a metoxiamidina compromete o transporte de elétrons na cadeia respiratória. Com o objetivo de confirmar e definir os possíveis sítios desta inibição foram realizados experimentos para avaliar a ação deste composto sobre os complexos da cadeia respiratória. Nestes ensaios foram utilizadas preparações de mitocôndrias rompidas, como descrito no item 4.5.3. Essas preparações são ideais para tais experimentos, uma vez que o acesso dos substratos aos complexos enzimáticos está facilitado e, ainda, descarta os possíveis efeitos do composto sobre a síntese de ATP. Desta forma, apenas o transporte de elétrons através dos complexos é avaliado. Foram determinadas as atividades dos complexos I (NADH Desidrogenase), II (Succinato Desidrogenase), IV (Citocromo c Oxidase) e os segmentos NADH oxidase (complexo I ao IV), NADH Citocromo c Redutase (complexo I ao III), Succinato Oxidase (complexo II ao IV), e Succinato Citocromo c Redutase (complexo II ao III).

Na tabela 1 estão apresentados os resultados destes experimentos. Verifica-se que a metoxiamidina inibiu de modo dose dependente o transporte de elétrons no segmento NADH Oxidase, que compreende o trajeto entre o complexo I até a redução do oxigênio a água. A inibição foi significativa a partir da concentração de 50 nmol/mg de proteína, chegando a ~18% para a maior concentração (65 nmol/mg de proteína). No estado 3 da respiração, o

composto promoveu uma inibição apenas na concentração de 25 nmol/mg de proteína (~15% - FIGURA 15A). Este resultado pode ser explicado pelo efeito desacoplador da metoxiamidina nas maiores concentrações (FIGURA 15B). Neste caso, em mitocôndrias intactas, o aumento da velocidade do transporte de elétrons em resposta ao desacoplamento, impediria a observação da inibição durante o estado 3 nas maiores concentrações.

Análises do complexo NADH Desidrogenase (complexo I), revelaram que a metoxiamidina promove uma inibição significativa de ~10% na maior concentração (65 nmol/mg de proteína). Já o segmento NADH citocromo *c* Redutase foi inibido em ~15% na mesma concentração (65nmol/mg proteína). O segmento succinato oxidase foi discretamente inibido pela metoxiamidina (~7% - 65 nmol/mg proteína). O complexo II (Succinato desidrogenase – TABELA 1) parece não colaborar nesta inibição já que sua atividade não foi modificada pelo composto. Ao contrário, o segmento Succinato citocromo *c* Redutase, que compreende a passagem de elétrons pelo complexo II e III, foi significativamente inibido nas concentrações de 50 nmol/mg de proteína (~17%) e 65 nmol/mg de proteína (~19%). O complexo IV da cadeia respiratória também não foi inibido pela metoxiamidina.

Estes resultados sugerem que os sítios de inibição da metoxiamidina compreendem o complexo I e o segmento entre a ubiquinona e o complexo III.

Os efeitos da pentamidina sobre os complexos enzimáticos da cadeia respiratória também já foram descritos, porém, em mitocôndria de *Leishmania donovani* (MUKHERJEE *et al.*, 2006). Os autores buscaram esclarecer o papel da mitocôndria na resistência ou suscetibilidade da *L. donovani* a pentamidina e, para isto, desenvolveram protozoários resistentes ao composto, com uma CI_{50} cinquenta vezes maior que o tipo selvagem. Observou-se que, para a estirpe resistente, a atividade do complexo I (NADH Desidrogenase) diminuiu drasticamente (~350%). Além disso, a atividade do complexo II (Succinato Desidrogenase) também foi reduzida, mas em menor escala (~50%). Isso mostra que alterações mitocondriais no parasita estão envolvidas no desenvolvimento de um fenótipo resistente a pentamidina, além de relação entre acúmulo do composto com alterações mitocondriais.

Como ponto comum entre o presente estudo e o de Mukherjee *et al.* (2006) está a inibição de complexos da cadeia respiratória pelas amidinas. No entanto, neste estudo o foco era o mecanismo de ação da pentamidina em fenótipos resistentes ao composto, e no presente estudo, o objetivo é estabelecer parâmetros de toxicidade da metoxiamidina. Ainda, os efeitos da pentamidina foram mais pronunciados no estudo de Mukherjee *et al.* (2006) em comparação aos efeitos aqui descritos.

Enzimas	% do controle (média ± desvio padrão)				
	METOXIAMIDINA (nmol/mg de proteína)				
	0	5	25	50	65
NADH Oxidase	100	98,2±6,3	91,2±8,7	86±6,6 *	82,3±8,9 *
NADH Desidrogenase	100	97±5,8	95±5,8	98,4±5,3	90,2±5,9 *
NADH Citocromo c Redutase	100	93,2±7,9	94,4±9,3	89,5±7,2 *	84,9±7,6 *
Succinato Oxidase	100	96,9±2,4	94,4±1,3	95,9±3,6	93,6±2,4 *
Succinato Desidrogenase	100	102±6,7	107,8±9,5	97±9,4	92,3±10
Succinato Citocromo c Redutase	100	92,4±9,3	94,8±18,4	82,7±13,1 *	81,4±15,2 *
Citocromo C Oxidase	100	94,5±11,7	92,6±6,5	101,3±6,6	98±8,9

TABELA 1: EFEITOS DA METOXIAMIDINA SOBRE OS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA

Nota: As condições experimentais estão descritas no item 4.5.1 da seção de Materiais e Métodos.

100% corresponde a atividade dos experimentos controle: **NADH Oxidase:** fluxo de oxigênio de $603,1 \pm 133,1$ pmol por segundo por miligrama de proteína mitocondrial. **NADH Desidrogenase:** $3,05 \pm 0,7$ μ mol de ferricianeto reduzido por minuto por miligrama de proteína mitocondrial. **NADH Citocromo c Redutase:** $483,1 \pm 16,7$ nmol de citocromo c reduzido por minuto por miligrama de proteína mitocondrial. **Succinato Oxidase:** fluxo de oxigênio de $307,6 \pm 34,2$ pmol por segundo por miligrama de proteína mitocondrial. **Succinato Desidrogenase:** $241,9 \pm 21,3$ nmol de DCPIP reduzido por minuto por miligrama de proteína mitocondrial. **Succinato Citocromo c Redutase:** $190,7 \pm 34,3$ nmol de citocromo c reduzido por minuto por miligrama de proteína mitocondrial. **Citocromo c Oxidase:** $345,4 \pm 68,3$ nmol de citocromo c oxidado por minuto por miligrama de proteína mitocondrial.

Cada valor representa a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes em triplicata.

* Valores estatisticamente diferentes controle ($p < 0,05$).

5.1.3 Efeitos da metoxiamidina sobre o Complexo F_1F_o ATPase

Na mitocôndria, a oxidação de NADH e $FADH_2$ resulta no transporte de elétrons na cadeia respiratória, com consequente bombeamento de prótons pelos complexos I, III e IV para o espaço intermembranas. Neste processo é gerada a força próton motriz (Δp), resultante da diferença de cargas ($\Delta\Psi_m$) e de pH (ΔpH) entre a matriz e o espaço intermembranas. Esses prótons retornam então à matriz mitocondrial através da porção F_o da ATPsintase, ocorrendo a síntese e liberação de ATP a partir da subunidade F_1 (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

Desacopladores da fosforilação oxidativa promovem o colapso do $\Delta\Psi_m$ e ΔpH e, em resposta a este efeito, a ATPsintase passa a hidrolisar o ATP (atividade de ATPase) na tentativa de reestabelecer Δp (FACCENDA & CAMPANELLA, 2012).

O estímulo do estado 4 (FIGURA 15B) e o aumento do consumo de oxigênio na presença de oligomicina (FIGURA 18) sugerem que a metoxiamidina possa atuar como um desacoplador. Assim, foi determinado o efeito do composto sobre a atividade ATPásica a fim de confirmar este efeito.

Estes experimentos foram realizados em suspensões de mitocôndrias intactas e rompidas. Os ensaios em mitocôndrias intactas foram realizados com o fim de avaliar indiretamente o efeito desacoplador da metoxiamidina, analisando a atividade de ATPase do complexo F_1F_o . Já os experimentos mitocôndrias rompidas, para verificar se o composto era capaz de interferir diretamente na atividade do complexo enzimático, descartando-se os eventos relacionados à fosforilação oxidativa.

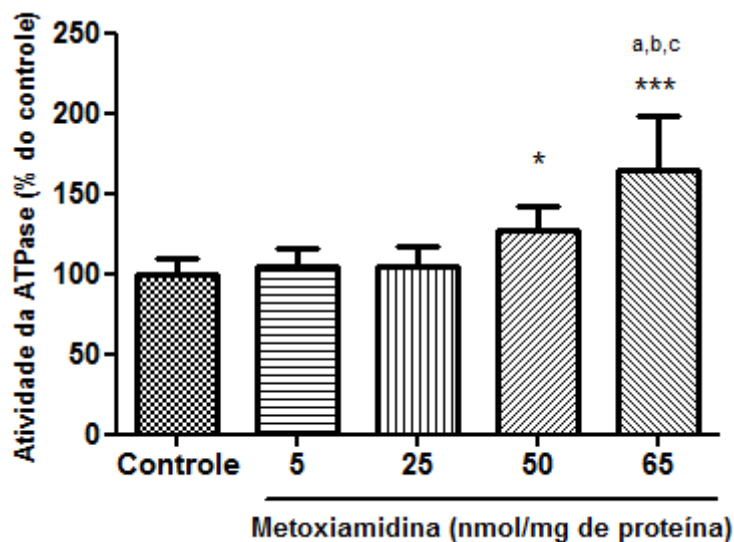
Com a finalidade de validar os experimentos foram realizados ensaios controle na ausência de mitocôndrias e de ATP e, na presença de oligomicina e do desacoplador clássico FCCP. Todos os resultados dos controles validaram a metodologia, sendo que nos ensaios com FCCP (1 $\mu\text{mol/L}$) a atividade da ATPase aumentou em ~540% (dados não mostrados).

A metoxiamidina causou um aumento significativo na atividade ATPásica somente nas maiores concentrações, 50 e 65 nmol/mg de proteína, que foram de ~27% e ~64%, respectivamente (FIGURA 19A). Moreno (1996) testou o efeito da pentamidina (50-600 $\mu\text{mol/L}$) sobre a atividade ATPásica de mitocôndrias isoladas de fígado de rato e demonstrou que o composto promoveu um aumento desta atividade a partir da concentração 50 $\mu\text{mol/L}$ (~100%) chegando a ~300% na concentração de 300 $\mu\text{mol/L}$. Ao compararmos os efeitos da pentamidina e metoxiamidina na mesma concentração 50 $\mu\text{mol/L}$ (equivalente a concentração de 50 nmol/mg para metoxiamidina) podemos concluir que o efeito da metoxiamidina é menos pronunciado (estímulo de ~27%), o que poderia ser vantajoso ao representar uma menor toxicidade para este composto. Os derivados de amidina, como a metoxiamidina e a pentamidina, formam cátions, e muitas das moléculas descritas com ação desacopladora são compostos catiônicos, que ao contrário dos ácidos fracos (como o FCCP), exigem a presença de Pi para sua ação (SHINOHARA *et al.*, 1998). O grupamento amidínico presente nestas moléculas, embora contenha dois nitrogênios, fornece apenas um cátion em sua protonação (OSZCZAPOWICZ e RACZYNSKA, 1984). A metoxiamidina possui apenas um grupamento amidínico (FIGURA 13), enquanto a pentamidina possui dois (FIGURA 12). Isso talvez contribua para o efeito desacoplador mais pronunciado da pentamidina.

Em mitocôndrias rompidas (FIGURA 19B) foi evidenciada uma inibição de aproximadamente 18% para todas as concentrações do composto, sugerindo que a metoxiamidina iniba diretamente este complexo. Este resultado deve ser interpretado considerando que em mitocôndrias rompidas o complexo enzimático é capaz somente de hidrolisar o ATP. Já em mitocôndrias acopladas em presença de substratos oxidáveis, ADP e Pi o complexo atua no sentido de síntese de ATP. O fato de a metoxiamidina inibir a enzima por interação direta levanta a possibilidade de que em mitocôndrias acopladas o composto possa inibir a função de síntese de ATP, o que poderia sugerir que parte da inibição do estado 3 da respiração (FIGURA 15A) seria atribuída a inibição da ATPsintase. Ainda, deve-se observar que a inibição de ~18% pode

haver reduzido a significância do estímulo sobre da ATPase, observado em mitocôndrias acopladas (FIGURA 19A).

A.



B.

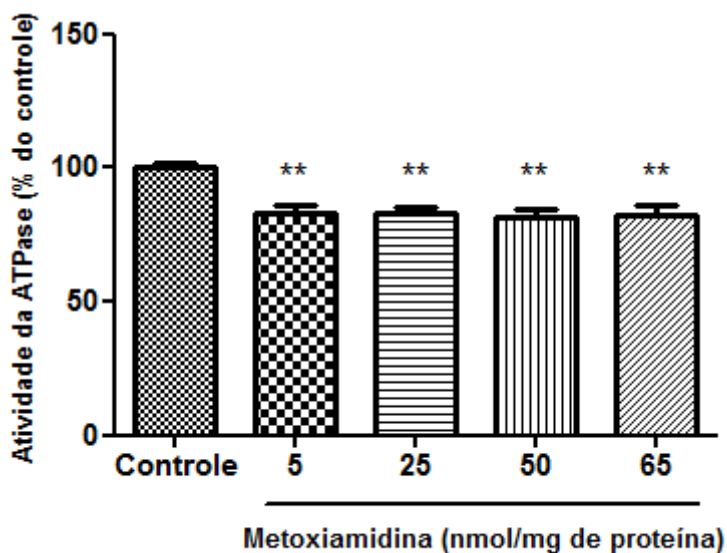


FIGURA 19: EFEITOS DA METOXIAMIDINA SOBRE A ATIVIDADE DA F_1F_0 ATPase

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, no item 4.7.2 e 4.6.2. Controle – experimentos realizados na ausência de metoxiamidina e DMSO.

A. Atividade ATPásica em mitocôndrias intactas. Sistema de reação: sacarose 50 mmol/L, tampão Tris-HCl 12 mmol/L pH 7,4, KCl 50 mmol/L, e 2 mg de proteína mitocondrial. 100% corresponde a 11,5 nmol de Pi liberado por minuto por miligrama de proteína mitocondrial.

B. Atividade ATPásica em mitocôndrias rompidas. Sistema de Reação: sacarose 50 mmol/L, Tris-acetato 50 mmol/L pH 7,4, acetato de magnésio 3 mmol/L, acetato de potássio 30 mmol/L, PEP 1 mmol/L, piruvato quinase 4 unidades, lactato desidrogenase 3 unidades, NADH 0,2 mmol/L, ATP 3 mmol/L e 0,1 mg de proteína mitocondrial. 100% corresponde a $275,2 \pm 17,7$ nmol de Pi liberado por minuto por miligrama de proteína mitocondrial. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes em triplicata.

* Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,0001$)

^a Valores estatisticamente diferentes da concentração 5nmol/mg de proteína ($p < 0,05$).

^b Valores estatisticamente diferentes da concentração 25nmol/mg de proteína ($p < 0,05$).

^c Valores estatisticamente diferentes da concentração 50nmol/mg de proteína ($p < 0,05$).

5.1.4 Efeitos da Metoxiamidina sobre o Inchamento Mitocondrial

A avaliação espectrofotométrica do inchamento mitocondrial (*swelling*) é uma técnica simples e amplamente utilizada na elucidação de vias e mecanismos de transporte de íons através da membrana mitocondrial interna. O inchamento da organela só é possível devido ao desdobramento das cristas da membrana interna à medida que o volume da matriz aumenta. Para que ocorra o inchamento da mitocôndria em meio iônico, o mesmo deve conter cátions e ânions permeáveis à membrana e o equilíbrio de cargas entre o meio e o conteúdo da matriz deve ser mantido. O acúmulo de íons na matriz mitocondrial promove um desequilíbrio osmótico, tendo como consequência o inchamento da organela devido à entrada de água na matriz mitocondrial. Sabe-se que suspensões mitocondriais dispersam a luz devido à diferença do índice de refração entre o meio e o conteúdo da matriz mitocondrial. Portanto, um aumento no volume da matriz, em consequência do fluxo de solutos permeáveis e água, resultam na diminuição da absorbância medida a 546 nm (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

Neste estudo foram realizados dois tipos de inchamento mitocondrial: o primeiro na presença de substrato oxidável, também conhecido como inchamento mitocondrial *energizado*, o qual é dependente do funcionamento da cadeia respiratória e o segundo na ausência de substrato ou *desenergizado*, dependente de um ionóforo que resulta na entrada de água e consequente inchamento da organela. Os resultados destes experimentos são descritos a seguir.

5.1.4.1 Efeitos da metoxiamidina sobre o inchamento mitocondrial dependente do transporte de elétrons – *Swelling energizado*

O grau de inchamento mitocondrial foi determinado na presença do substrato oxidável glutamato e malato, que geram NADH no interior da mitocôndria. O inchamento *energizado* foi feito como determinado por Mustafa *et al.* (1966), na presença de acetato de sódio. O acetato de sódio permeia a membrana mitocondrial externa, e se dissocia no espaço intermembranas formando acetato e Na^+ . O acetato permeia a membrana mitocondrial interna como ácido acético e, quando a mitocôndria é energizada com glutamato e malato, o potencial eletroquímico formado possibilita a ação de troca Na^+/H^+ e também a redistribuição do ácido acético, entre o espaço intermembranas e matriz. Uma vez dentro na matriz mitocondrial, o ácido acético se dissocia, devido ao pH mais alcalino em relação ao espaço intermembranas, e a presença de acetato e Na^+ promove a entrada de água na matriz e consequente inchamento da organela. Como este processo é dependente da cadeia transportadora de elétrons, a inibição do transporte de elétrons como, por exemplo, com a adição de rotenona, promove a contração da organela. Neste caso, com o uso de glutamato e malato, a adição de rotenona bloquearia o complexo I, interrompendo o transporte de elétrons comprometendo a formação do potencial de membrana, e consequentemente, causando a contração da mitocondrial.

Na figura 20 estão mostrados traçados demonstrativos dos experimentos de swelling energizado em presença da metoxiamidina. Observa-se que o composto, de forma dose dependente (25 – 65nmol/mg de proteína), promoveu uma redução no inchamento. Para melhor análise destes resultados, foram realizadas determinações da amplitude e velocidade do inchamento, bem como da contração da organela devido à adição de rotenona, inibidor do complexo I. A medida da amplitude do inchamento permite avaliar o funcionamento da cadeia respiratória bem como a capacidade de desdobramento das cristas da membrana interna. A medida da velocidade deste inchamento fornece informações sobre o comprometimento do transporte de elétrons nos

momentos iniciais, diretamente relacionado à entrada de sódio na matriz. Já as determinações da contração da organela, avaliam possíveis comprometimentos da elasticidade da membrana interna em resposta a presença da metoxiamidina. Desta forma, é importante ressaltar que nos experimentos de inchamento mitocondrial energizado em presença de acetato de sódio, é avaliado, além do funcionamento da cadeia respiratória, a permeabilidade e elasticidade da membrana mitocondrial interna.

A figura 21 A-C mostra os resultados referentes ao efeito da metoxiamidina sobre a amplitude, velocidade do inchamento e contração da organela, respectivamente. Em relação à amplitude (FIGURA 21A), o composto, nas maiores concentrações de 50 e 65 nmol/mg de proteína diminuiu significativamente o inchamento em aproximadamente 16% e 32%, respectivamente. Entretanto, a velocidade de inchamento (FIGURA 21B) foi reduzida já na concentração de 25nmol/mg de proteína em ~24%. Para as concentrações 50 e 65 nmol/mg de proteína, a diminuição na velocidade do inchamento foi de aproximadamente 46% e 65%, respectivamente. Os valores de contração (FIGURA 21C), induzida por rotenona, foram significativamente reduzidos apenas para as duas maiores concentrações, em ~20% (50 nmol/mg de proteína) e ~43% (65 nmol/mg de proteína), apontando para um comprometimento da elasticidade da membrana mitocondrial.

Os resultados das figuras 20-21 sugerem que a metoxiamidina possa interagir com a membrana mitocondrial interna dificultando o movimento dos íons e comprometendo o processo de inchamento. Além disso, considerando que o *swelling* energizado é um processo depende do transporte de elétrons pela cadeia respiratória, estes resultados corroboram a inibição observada para o estado 3 da respiração (FIGURA 15A) e para o segmento da NADH oxidase (TABELA 1).

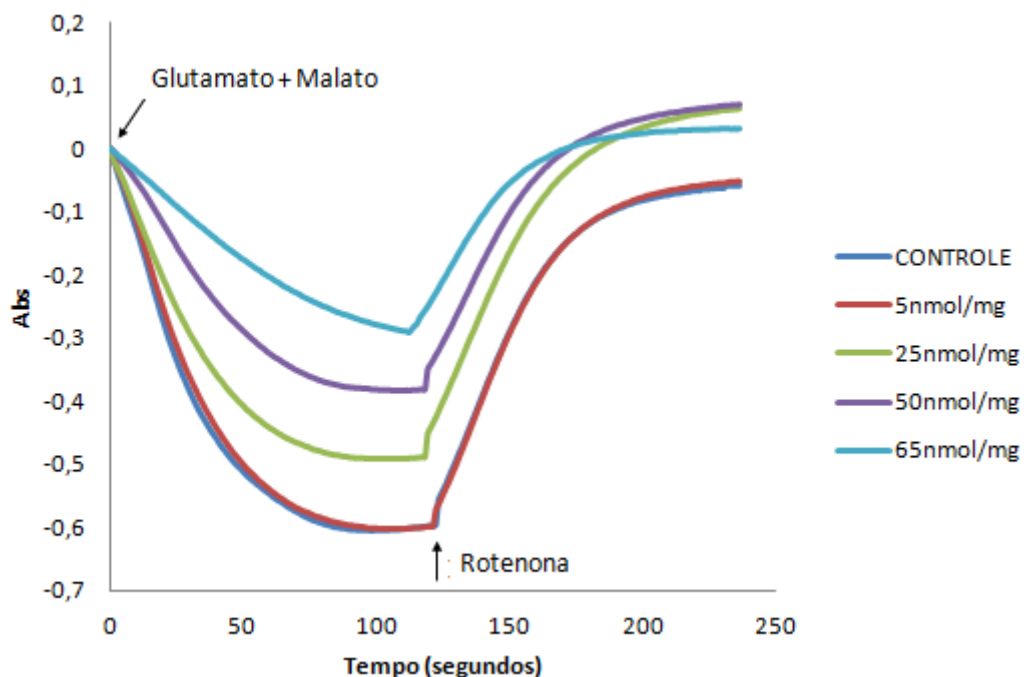
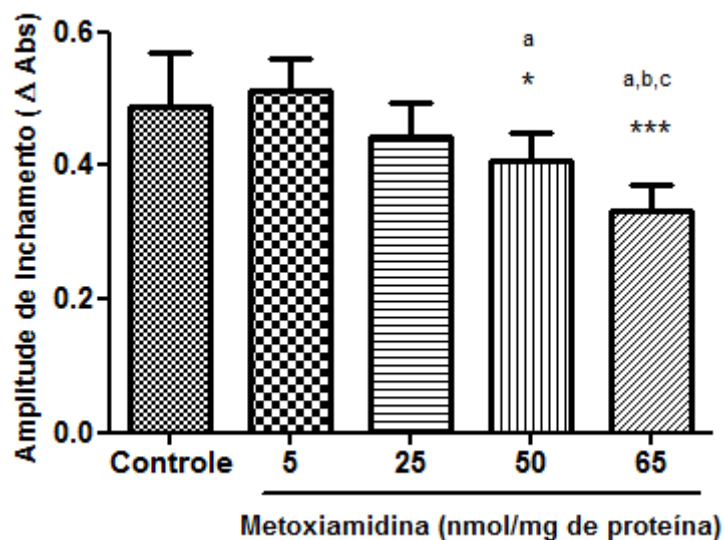


FIGURA 20 – EFEITO DA METOXIAMIDINA SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS

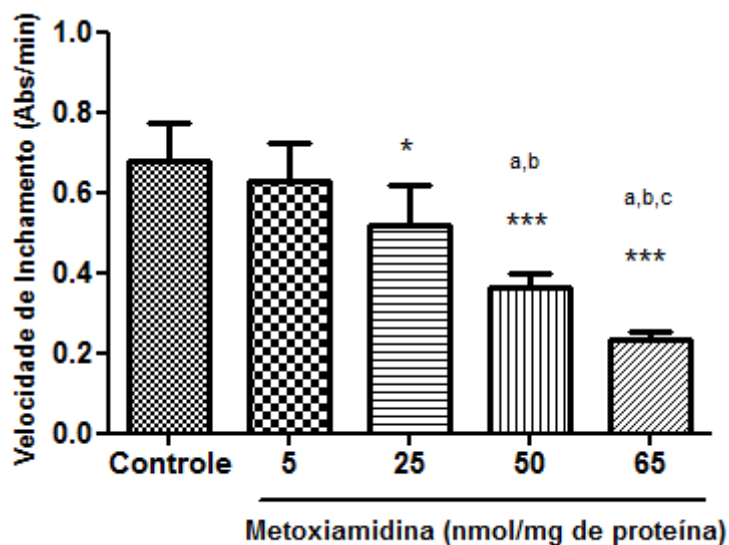
Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.7.3.2. Sistema de Reação: sacarose 100 mmol/L, Tris-HCl 30 mmol/L, pH 7,5, EDTA 0,5 mmol/L, acetato de sódio 50 mmol/L e 1 mg de proteína mitocondrial. Metoxiamidina estava presente no sistema de incubação nas concentrações indicadas. As setas indicam as adições de glutamato de sódio 10 mmol/L e malato de sódio 1 mmol/L para desencadear o inchamento, e rotenona 2 μ mol/L, para promover a contração da organela. Controle - ausência de metoxiamidina.

A.



B.



C.

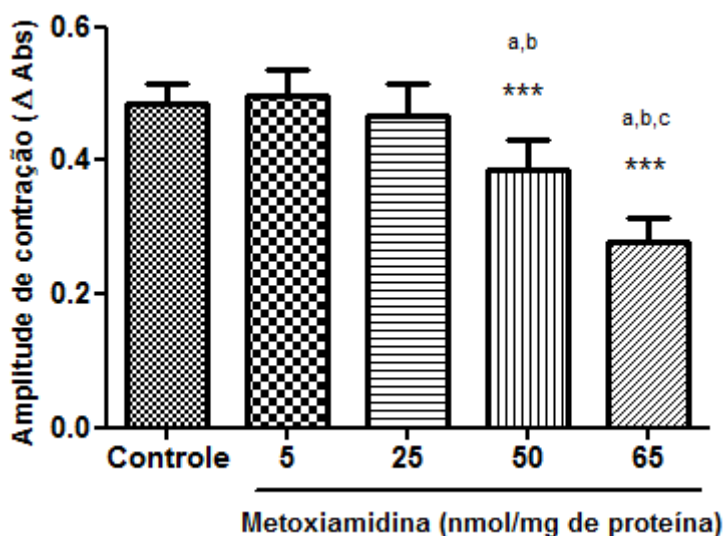


FIGURA 21: EFEITOS DA METOXIAMIDINA SOBRE A AMPLITUDE, VELOCIDADE DE INCHAMENTO E CONTRAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS

Fonte: (O autor, 2013)

As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.7.3.2. Sistema de Reação: sacarose 100 mmol/L, Tris-HCl 30 mmol/L, pH 7,5, EDTA 0,5 mmol/L, acetato de sódio 50 mmol/L, glutamato de sódio 10 mmol/L, malato de sódio 1 mmol/L, rotenona 2 μ mol/L e 1 mg de proteína mitocondrial. Controle – experimentos realizados na ausência de metoxiamidina e DMSO.

A. Amplitude do inchamento mitocondrial desencadeado pela adição de glutamato e malato de sódio.

B. Velocidade do inchamento mitocondrial energizado em unidades de absorvância por minuto.

C. Amplitude da contração mitocondrial desencadeada por rotenona em delta de absorvância.

Os valores representam o perfil de três experimentos independentes em triplicata.

* Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$) *** ($p < 0,0001$)

^a Valores estatisticamente diferentes da concentração 5nmol/mg de proteína ($p < 0,05$).

^b Valores estatisticamente diferentes da concentração 25nmol/mg de proteína ($p < 0,05$).

^c Valores estatisticamente diferentes da concentração 50nmol/mg de proteína ($p < 0,05$).

5.1.4.2 Efeitos da metoxiamidina sobre o inchamento de mitocôndrias desenergizadas na presença de valinomicina e potássio

O *swelling* desenergizado em mitocôndrias intactas é realizado na presença de ionóforos como a valinomicina. A valinomicina, um carreador móvel de cátions como Cs^+ , Rb^+ , K^+ e NH_4^+ , não possui carga ou grupo ionizável e adquire a carga do íon complexado. Ambas as formas, complexada ou não, difundem-se livremente através das membranas biológicas. Por sua vez, a membrana mitocondrial interna é impermeável a íons como o K^+ e a valinomicina pode ser utilizada para induzir tal permeabilidade (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Além disso, o movimento da valinomicina depende diretamente da fluidez da membrana. Desta maneira, experimentos de inchamento mitocondrial na presença de valinomicina e potássio avaliam o possível efeito de compostos sobre a fluidez da membrana mitocondrial.

Os experimentos de *swelling* desenergizado foram realizados na presença de nitrato de potássio e valinomicina e, para descartar qualquer interferência da cadeia transportadora de elétrons, foram feitas adições dos inibidores rotenona (inibidor do complexo I) e antimicina A (inibidor do complexo III).

A figura 22 mostra os efeitos da metoxiamidina sobre a amplitude e a velocidade de inchamento na ausência de substratos oxidáveis em mitocôndrias intactas. A metoxiamidina reduziu significativamente a amplitude do inchamento nas duas maiores concentrações (50 e 65 nmol/mg de proteína) em ~20%. Já a velocidade de inchamento foi afetada de maneira significativa por todas as concentrações testadas, chegando a aproximadamente 40% para a maior concentração. Estes resultados estão de acordo com os anteriormente mostrados e reforçam a hipótese que a metoxiamidina interage com a membrana mitocondrial interna, possivelmente afetando sua fluidez.

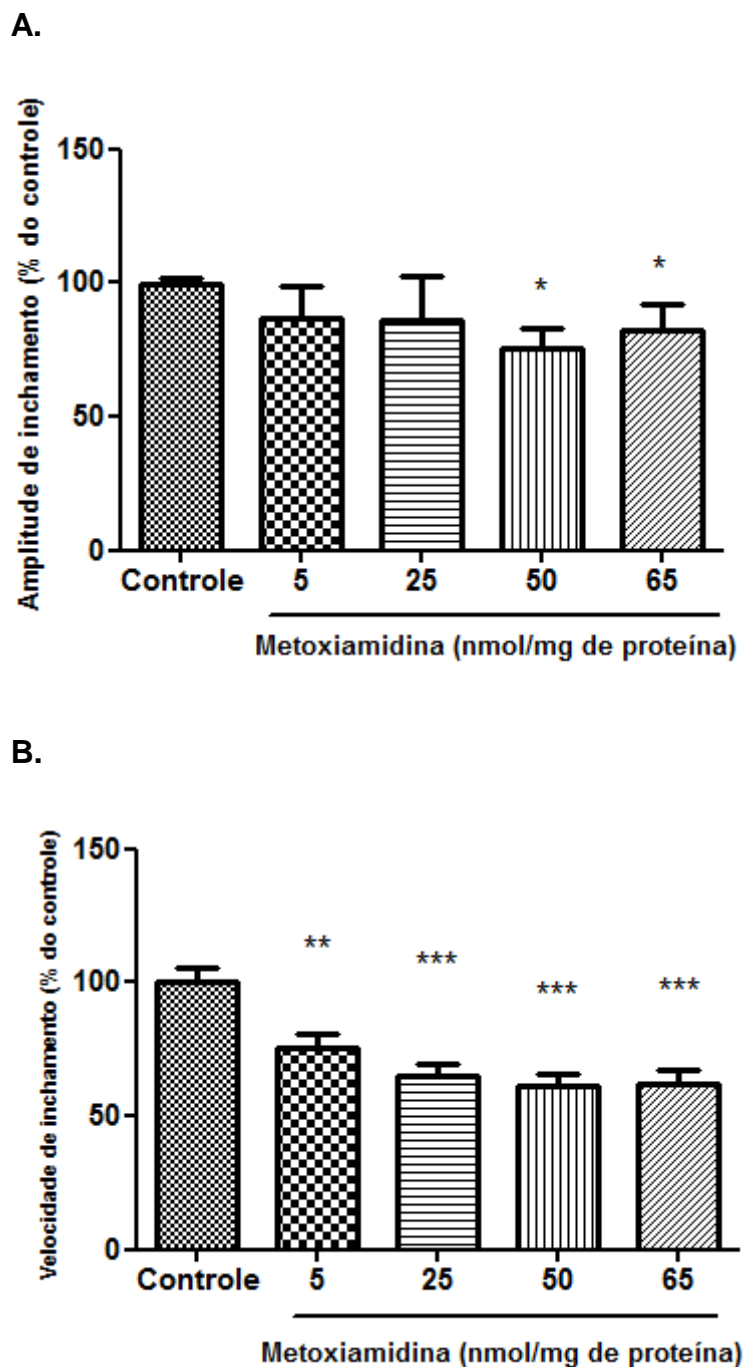


FIGURA 22 – EFEITOS DA METOXIAMIDINA SOBRE A AMPLITUDE E A VELOCIDADE DO INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DESENERGIZADAS

Fonte: (O autor, 2013)

As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.7.3.1. Sistema de Reação: KNO_3 135 mmol/L, HEPES 5 mmol/L, pH 7,4, EDTA 0,1 mmol/L, rotenona 4 $\mu\text{mol/L}$, antimicina A 2 μg , valinomicina 4 μg e 1 mg de proteína mitocondrial. Controle – experimentos realizados na ausência de metoxiamidina e DMSO.

A. Amplitude do inchamento mitocondrial. 100% equivale a Δ de absorvância (adição de valinomicina – inchamento total) de $0,224 \pm 0,02$ nm em 546nm.

B. Velocidade do inchamento mitocondrial induzido por valinomicina. 100% equivale a $0,217 \pm 0,04$ (unidades de absorvância por minuto por miligrama de proteína).

Os valores representam o perfil de três experimentos independentes em triplicata.

* Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$) *** ($p < 0,0001$)

5.1.5 Efeitos da metoxiamidina sobre o potencial de membrana ($\Delta\Psi$)

Como descrito anteriormente, o transporte de elétrons e consequente bombeamento de prótons pelos complexos da cadeia respiratória geram a força próton motriz, cujos componentes são ΔpH e o $\Delta\Psi_m$, sendo este último responsável por cerca de 90% do Δp (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Desta maneira, a força próton-motriz, principalmente constituída pelo $\Delta\Psi_m$, direciona a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico, através do complexo F_1F_0 ATPsintase (FACCENDA & CAMPANELLA, 2012; NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Como os resultados obtidos para estado 4 da respiração (FIGURA 15B) e respiração na presença de oligomicina (FIGURA 18) indicam um efeito desacoplador da metoxiamidina, considerou-se pertinente a avaliação do efeito do composto sobre a formação do $\Delta\Psi_m$.

Na figura 23 podemos observar o efeito da metoxiamidina sobre a formação de potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi_m$). O composto não afetou o $\Delta\Psi_m$ nenhuma das concentrações utilizadas. Este resultado parece contraditório quando comparado ao estímulo do estado 4 e a retomada da respiração mesmo na presença de oligomicina (FIGURAS 15B e 18). Isso pode ter decorrido em consequência da rápida ação compensatória da cadeia transportadora de elétrons, que funciona em maior velocidade, a fim de bombear mais prótons e restabelecer o potencial desfeito. Tal ação pode ser observada no estado 3 da respiração (FIGURA 15A), em que as inibições nas maiores concentrações da metoxiamidina (50 e 65 nmol/mg de proteína), comprovadas pelos experimentos de respiração na presença de FCCP (FIGURA 17) e avaliação dos complexos enzimáticos (TABELA 1), não puderam ser observadas. Ainda, deve-se considerar que o estímulo da metoxiamidina sobre o estado 4 da respiração e atividade ATPase em mitocôndrias intactas (FIGURA 19A) são considerados discretos quanto comparados ao FCCP, um desacoplador clássico da fosforilação oxidativa, que é capaz de promover o colapso total do $\Delta\Psi_m$.

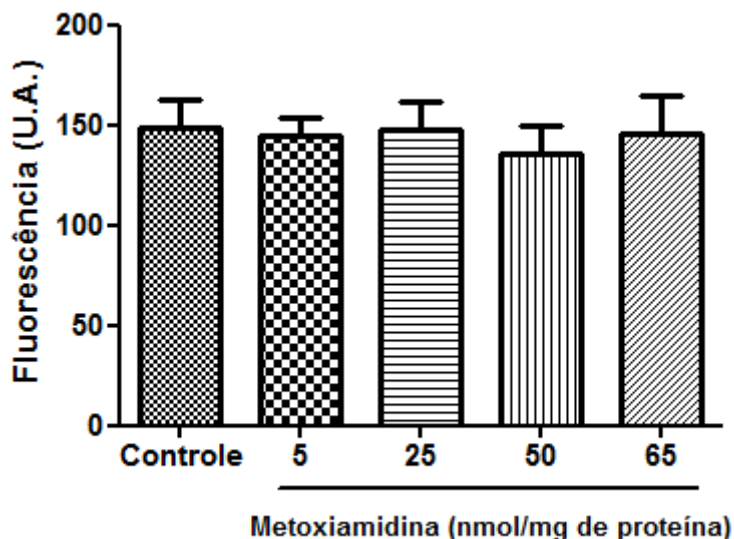


FIGURA 23: EFEITOS DA METOXIAMIDINA SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE TRANSMEMBRANA ($\Delta\Psi_m$)

Fonte: (O autor, 2013)

As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.7.4. Sistema de reação: sacarose 250 mmol/L, MOPS 20 mmol/L, pH 7,2, NaH_2PO_4 1mmol/L, safranina 5 $\mu\text{mol/L}$, glutamato de sódio 10 mmol/L, malato de sódio 5mmol/L e 1 mg de proteína mitocondrial. A reação ocorreu a 28°C e foi mantida em agitação constante. Controle – experimentos realizados na ausência de metoxiamidina e DMSO.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata.

5.2 Efeitos da metoxiamidina sobre cultura primária de hepatócitos

Hepatócitos isolados ou em cultura são amplamente utilizados em estudos *in vitro* para avaliar interações, metabolismo e toxicidade de xenobióticos. O fígado é um importante local de regulação metabólica e, desta forma, hepatócitos isolados constituem um modelo útil para investigação de diferentes doenças (ZHANG *et al.*, 2011). Estas células, quando intactas, mantêm a expressão de enzimas tanto da fase I quanto da fase II do metabolismo de xenobióticos e são capazes de apresentar um perfil de absorção e metabolização muito similar ao encontrado *in vivo* (KLAUNIG *et al.*, 1981).

Neste estudo, foram analisados os efeitos da metoxiamidina sobre a viabilidade e alguns parâmetros metabólicos de hepatócitos isolados, em

suspensão e em cultura. Em alguns ensaios foram avaliados também os efeitos da pentamidina, com o objetivo de comparar a toxicidade das duas amidinas.

5.2.1 Efeitos da metoxiamidina e pentamidina sobre a viabilidade de hepatócitos em cultura

5.2.1.1 Método do MTT

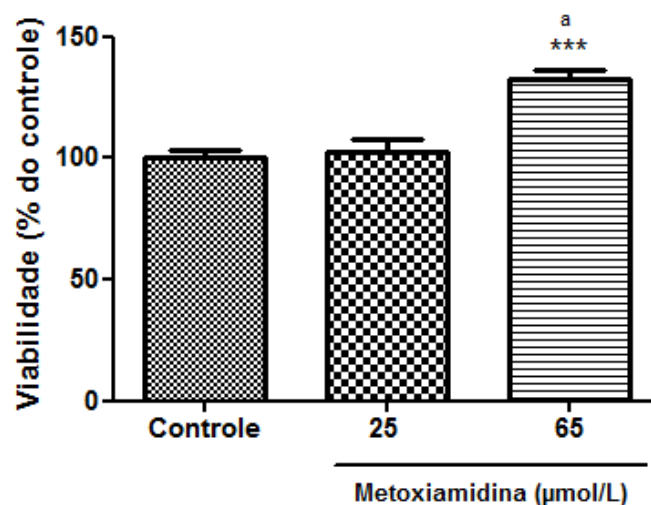
O método do MTT é amplamente utilizado para determinar a citotoxicidade de diferentes compostos e se baseia na capacidade de desidrogenases mitocondriais, de células viáveis, de reduzir os sais de tetrazólio (MTT) a formazan. Os cristais de formazan possuem uma coloração roxa e a sua formação pode ser acompanhada espectrofotometricamente em 550nm (MOSMANN, 1983).

Na figura 24A estão mostrados os efeitos da metoxiamidina sobre a viabilidade celular de hepatócitos em cultura. Pode-se observar que este composto não promoveu a diminuição da viabilidade celular e, para a maior concentração (65 $\mu\text{mol/L}$), surpreendentemente, foi observado um aumento deste valor, o que refletiria um maior número de células viáveis. Este resultado pode estar associado a metodologia utilizada. Como já mencionado, a redução do MTT é dependente da atividade das desidrogenases mitocondriais. Neste estudo evidenciou-se que o composto inibe de forma discreta o estado 3 (FIGURA 15A) e de forma mais significativa estimula o estado 4 (FIGURA 18) e a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas (FIGURA 19A). Estes últimos resultados sugerem que a metoxiamidina tenha um efeito desacoplador, que poderia promover o estímulo de desidrogenases responsáveis pela redução do MTT, na tentativa de fornecer elétrons à cadeia respiratória e, desta forma, restabelecer o Δp . Isto justificaria o resultado observado para a maior concentração (65 $\mu\text{mol/L}$ - FIGURA 24A), em que também se observou o maior estímulo sobre o estado 4 e a atividade da ATPase (FIGURAS 18 e 19A).

Os resultados de viabilidade para a pentamidina, nas mesmas concentrações (25 e 65 $\mu\text{mol/L}$), foram diferentes dos obtidos para a metoxiamidina. Na figura 24B observa-se que a pentamidina causa uma

significativa redução na viabilidade de hepatócitos cultivados, sendo que já na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$ a viabilidade foi reduzida em ~37% em relação ao experimento controle e a redução chegou a ~68% na maior concentração (65 $\mu\text{mol/L}$). Moreno descreve também para a pentamidina um efeito desacoplador (50-600 $\mu\text{mol/L}$). No entanto, a autora não mostra resultados referentes ao estado 3 da respiração nas diferentes concentrações do composto. Assim, não se pode descartar que o efeito de diminuição da viabilidade esteja relacionado a inibição de desidrogenases mitocondriais pelo composto.

A.



B.

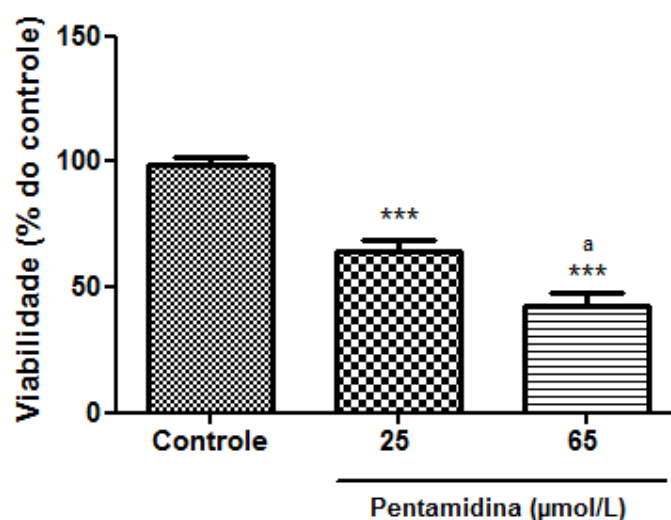


FIGURA 24: EFEITO DA METOXIAMIDINA E PENTAMIDINA SOBRE A VIABILIDADE DE HEPATÓCITOS EM CULTURA – MÉTODO DO MTT

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.4.2.1.1. As células foram plaqueadas (1×10^6 células por placa) e deixadas para adesão em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído pelo meio Hepatozyme suplementado ou não com metoxiamidina (**A**) ou pentamidina (**B**) nas concentrações de 25 e 65 $\mu\text{mol/L}$ pelo tempo de 18 horas. Em seguida, foi retirado o meio e acrescentado 2 mL de solução de MTT em HBSS (5 mg/mL) por placa, seguindo-se incubação por 3 horas. Decorrido este tempo, foi adicionado 1 mL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan formados e realizada a leitura a 550nm. Como controle foi utilizado meio Hepatozyme na presença de DMSO (0,25%). Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata.

** Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,01$) *** ($p < 0,0001$)

^a Valores estatisticamente diferentes da concentração 25 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$).

Considerando os efeitos da metoxiamidina sobre a bioenergética mitocondrial e que o método do MTT é relacionado à atividade de desidrogenases mitocondriais, decidiu-se utilizar um método adicional para avaliar a viabilidade de hepatócitos, a atividade da enzima LDH no sobrenadante da cultura.

5.2.1.2 Atividade da enzima LDH

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica que catalisa a reação reversível de redução do piruvato à lactato, com consequente oxidação do NADH a NAD⁺. Devido a sua localização, danos à membrana celular podem resultar no seu extravazamento para o meio extracelular. Portanto, a detecção do aumento da atividade dessa enzima no sobrenadante da cultura pode ser utilizada para avaliar indiretamente a integridade da membrana e, com isso, a viabilidade celular (ZHANG *et al.*, 2011).

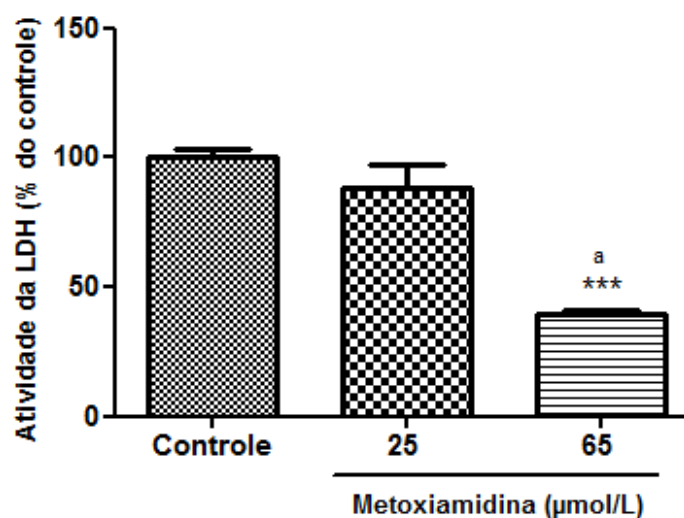
De acordo com a figura 25A, a atividade da enzima LDH no sobrenadante de hepatócitos não foi alterada pela metoxiamidina na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$. Curiosamente, na maior concentração do composto (65 $\mu\text{mol/L}$), observou-se uma diminuição (~60%) da atividade da enzima, ou seja, de sua liberação no meio de cultura. Esses resultados estão de acordo com os obtidos com o método do MTT, que mostraram um aumento de viabilidade para a mesma concentração (FIGURA 24A) e sugerem que a metoxiamidina estaria, de alguma forma, tornando as condições de cultura mais propícias à manutenção destas células.

Embora não existam relatos na literatura sobre um efeito citoprotetor da amidinas, outros compostos tem demonstrado este efeito. Rakba *et al.* (1999) descreveram um efeito citoprotetor para o quelante de ferro 1,1-bis-[(11-*N*-hidroxi)-2,5,11-triaza-1,6,10-trioxo-dodecanil] etano (KD). Em uma estratégia de avaliar a hepatotoxicidade do KD, os autores utilizaram, como no presente estudo, hepatócitos isolados de fígado de rato em cultura. Em concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, o composto diminuiu significativamente a liberação de LDH e da lipoperoxidação, determinada pelos níveis de malondialdeído em culturas expostas ao citrato de ferro, além de promover a diminuição da internalização de ferro pelos hepatócitos. No estudo, os autores sugerem que o efeito citoprotetor do KD deve-se a sua possível ação antioxidante, uma vez que o composto foi capaz de sequestrar radicais hidroxila em sistema livre de células (NYUGEN-VAN-DUONG *et al.*, 1998).

Os resultados de viabilidade dos hepatócitos tratados com a metoxiamidina sugerem que o composto possua um efeito citoprotetor o que motiva estudos subsequentes para avaliar esta possibilidade.

Na figura 25B estão apresentados os resultados relacionados à viabilidade pelo método da LDH em células tratadas com a pentamidina. Ao contrário do observado para a metoxiamidina, já na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$ de pentamidina, a atividade da LDH no meio de cultura aumentou em ~93% quando comparada ao controle, chegando a 258% para a maior concentração de 65 $\mu\text{mol/L}$. Estes resultados estão de acordo com os do método do MTT, que também demonstraram um significativo comprometimento da viabilidade celular para as concentrações testadas (FIGURA 24B). Estes resultados ainda reforçam o potencial tóxico deste fármaco, já bem descrito na literatura (WISPELWAY & PEARSON, 1991).

A.



B.

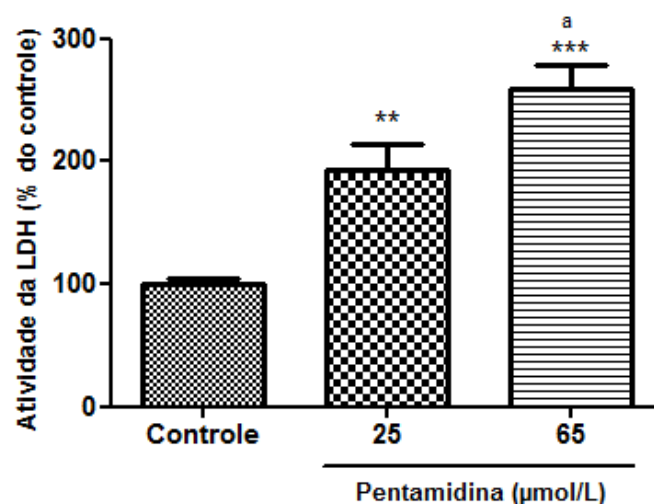


FIGURA 25: EFEITO DA METOXIAMIDINA E PENTAMIDINA SOBRE VIABILIDADE DE HEPATÓCITOS EM CULTURA – MÉTODO DA LDH

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.4.2.1.2. As células foram plaqueadas (1×10^6 células por placa) e deixadas para adesão em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído e realizado o tratamento com metoxiamidina (A) ou pentamidina (B) nas concentrações de 25 e 65 μmol/L pelo tempo de 18 horas. Após o tempo de tratamento, o sobrenadante foi coletado, centrifugado e os experimentos foram realizados seguindo as orientações do kit comercial. 100% equivale no controle a atividade da LDH de $1165,9 \pm 285,6$ U/L. Como controle foi utilizado meio Hepatozyme na presença de DMSO (0,25%). Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata.

** Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,01$) *** ($p < 0,0001$)

^a Valores estatisticamente diferentes da concentração 25 μmol/L ($p < 0,05$).

5.2.2 Efeitos da metoxiamidina e pentamidina sobre parâmetros do metabolismo energético de hepatócitos em suspensão

5.2.2.1 Respiração

Considerando os efeitos da metoxiamidina sobre a bioenergética mitocondrial e a viabilidade dos hepatócitos em cultura, tornou-se fundamental avaliar os efeitos do composto sobre a respiração destas células. Para a realização destes experimentos foi utilizada uma suspensão de hepatócitos recém-coletados, que foram utilizados logo após seu isolamento, em período não superior a 4 horas. As preparações de hepatócitos em suspensão apresentam, como vantagem, sua fácil obtenção e manipulação quando comparada aos hepatócitos em cultura. São indicadas para incubações de períodos curtos, permitindo a identificação de metabólitos maiores, sendo indicadas assim para a análise de perfis metabólicos (GEBHARDT *et al.*, 2003).

Os ensaios foram realizados após a incubação por 2 minutos com as suspensões celulares, como para os experimentos com mitocôndrias isoladas. Optou-se em utilizar hepatócitos não permeabilizados com o objetivo de aproximar as condições experimentais às fisiológicas. Para isto, os reagentes utilizados eram permeáveis e como meio de reação utilizou-se o próprio meio de cultura.

A respiração celular foi determinada em três estados (HÜTTER, *et. al*, 2006; GNAIGER, 2009), definidos a seguir:

- Basal: correspondente à respiração basal da célula, sem a adição de substratos ou inibidores;
- *Leak*: correspondente a respiração celular na presença de oligomicina, inibidor da ATPsintase. Este estado reflete o transporte de elétrons que ocorre em resposta a entrada de prótons na matriz mitocondrial via membrana mitocondrial interna, impulsionada pelo gradiente eletroquímico de prótons. O consumo de oxigênio durante este estado da respiração é maior em resposta ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons.
- Desacoplado: corresponde a respiração celular em resposta à adição de um desacoplador (FCCP), caracterizando o transporte de elétrons que ocorre em velocidade máxima e de forma independente à síntese de ATP.

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

Os estados da respiração celular estão representados na figura 26. As marcações foram realizadas nos locais mais estáveis de fluxo de oxigênio na respiração basal e após as adições.

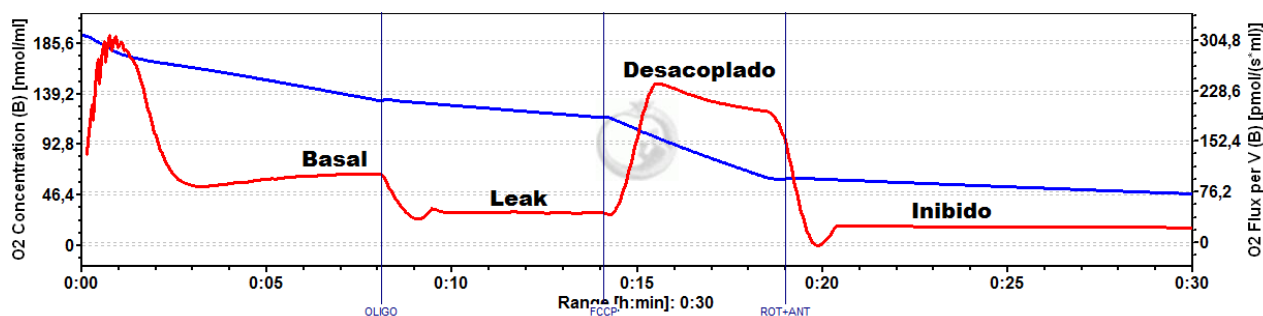


FIGURA 26: TRAÇADO DEMONSTRATIVO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO POR HEPATÓCITOS

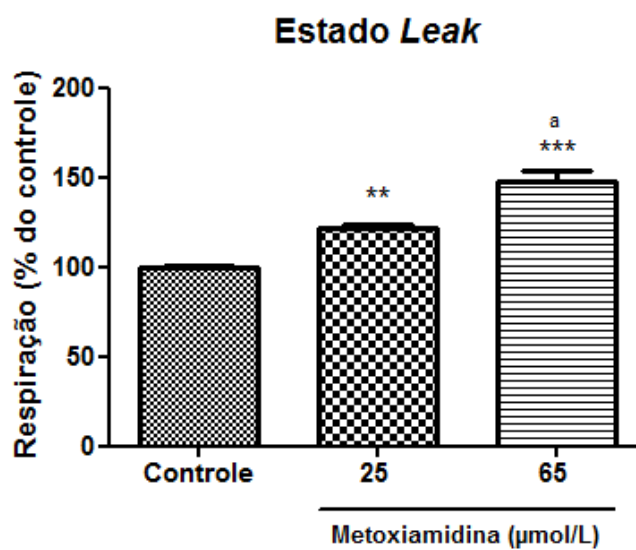
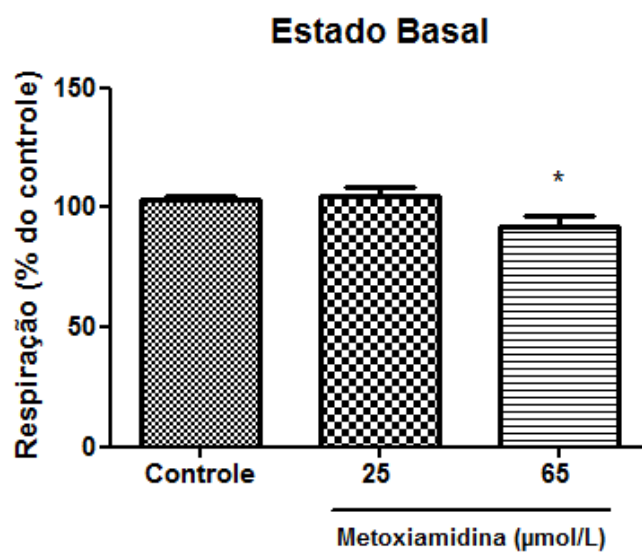
Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, no item 5.5.6. Sistema de reação meio DMEM alta glicose. Adições: Oligo- oligomicina; FCCP; ROT – rotenona; ANT – antimicina. Linha azul: concentração de O₂; Linha vermelha – fluxo de O₂.

Na figura 27 observamos o efeito da metoxiamidina sobre os três estados da respiração. Pode-se observar uma discreta diminuição no consumo de oxigênio basal (~8%) dos hepatócitos apenas para a maior concentração (65 $\mu\text{mol/L}$) de metoxiamidina. Já no estado *leak*, ambas as concentrações, de 25 e 65 $\mu\text{mol/L}$ promoveram um aumento no consumo de oxigênio de ~21% e ~47%, respectivamente. Esse resultado está de acordo com os experimentos de respiração na presença de oligomicina (FIGURA 18) em modelo de mitocôndrias isoladas, no qual, a partir da concentração de 25 nmol/mg de proteína (concentração correspondente a 25 $\mu\text{mol/L}$ em experimentos com hepatócitos), foi possível observar um aumento significativo no consumo de oxigênio. Tal estímulo sugere um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna induzido pela presença da metoxiamidina.

Por fim, a metoxiamidina na concentração de 65 $\mu\text{mol/L}$ promoveu uma diminuição significativa no consumo de oxigênio no estado desacoplado e,

portanto, no transporte de elétrons, de ~26%. Esse resultado também está de acordo com os dados obtidos nos experimentos de respiração na presença de FCCP em mitocôndrias isoladas, onde a concentração de 65 nmol/mg de proteína (equivalente a de 65 $\mu\text{mol/L}$ em experimentos com hepatócitos) foi observado uma inibição no consumo de oxigênio de ~18% (FIGURA 17).



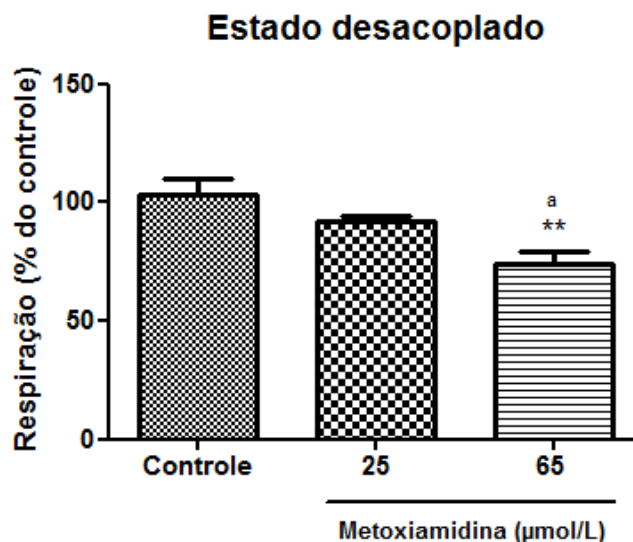


FIGURA 27: EFEITOS DA METOXIAMIDINA SOBRE A RESPIRAÇÃO DE HEPATÓCITOS EM SUSPENSÃO

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.4.1.1. Os hepatócitos (1×10^5 células) foram transferidos para as câmaras do oxígrafo e o consumo de oxigênio determinado na ausência de inibidores ou desacopladores (Estado Basal), na presença de oligomicina (Estado *Leak*) e na presença de FCCP (Estado Desacoplado). Os ensaios foram realizados a 37°C com agitação constante. 100% equivale aos valores no controle: **Basal:** $249,6 \pm 27,4$ pmol de oxigênio/min/ 1×10^5 células; **Leak:** $108,1 \pm 8,6$ pmol de oxigênio/min/ 1×10^5 células; **Desacoplado:** $321,8 \pm 50,3$ pmol de oxigênio/min/ 1×10^5 células. Controle – ausência de metoxiamidina e DMSO.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicada. * Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) *** ($p < 0,0001$)

^a Valores estatisticamente diferentes da concentração 25 µmol/L ($p < 0,05$).

Também foi avaliado o efeito da pentamidina (FIGURA 28) sobre os estados da respiração mitocondrial de hepatócitos em suspensão. Observou-se na respiração basal uma diminuição de ~18% para a maior concentração (65 µmol/L), 10% maior que para a metoxiamidina. Já no estado *leak* não foi observada diferença significativa, apesar de Moreno (1996) ter demonstrado um potente efeito desacoplador da pentamidina, em concentrações a partir de 50 µmol/L em mitocôndrias isoladas. Completando a avaliação sobre a respiração, resultados do estado desacoplado na presença da pentamidina mostram que na concentração de 65 µmol/L ocorreu uma diminuição no consumo de oxigênio (~18%), evidenciando uma possível ação direta do composto no sentido de inibir o transporte de elétrons.

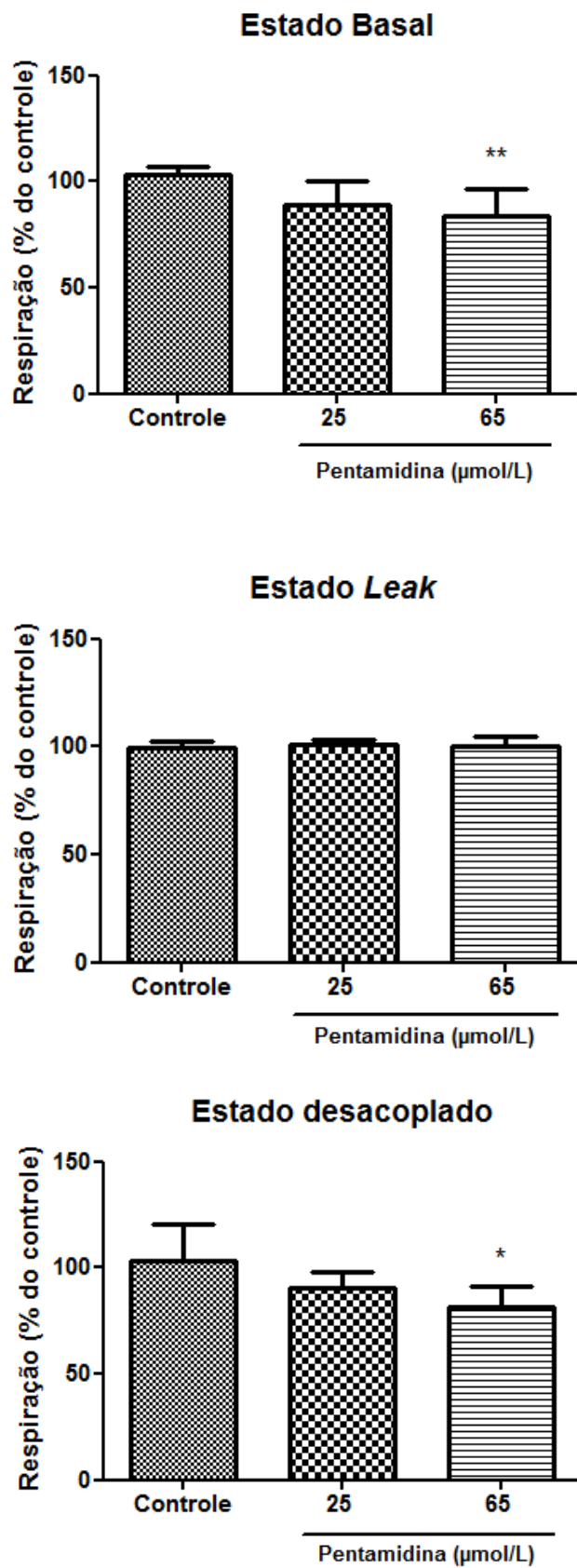


FIGURA 28: EFEITOS DA PENTAMIDINA SOBRE A RESPIRAÇÃO DE HEPATÓCITOS EM SUSPENSÃO

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.4.1.1. Os hepatócitos (1×10^5 células) foram transferidos para as câmaras do oxígrafo e o consumo de oxigênio determinado na ausência de inibidores ou desacopladores (Estado Basal), na presença de oligomicina (Estado *Leak*) e na presença de FCCP (Estado Desacoplado). Os ensaios foram realizados a 37°C com agitação constante. 100% equivale aos valores no controle: **Basal:** $249,6 \pm 27,4$ pmol de oxigênio/min/ 1×10^5 células; **Leak:** $108,1 \pm 8,6$ pmol de oxigênio/min/ 1×10^5 células; **Desacoplado:** $321,8 \pm 50,3$ pmol de oxigênio/min/ 1×10^5 células. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Controle – ausência de pentamidina e DMSO. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicada. * Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$)

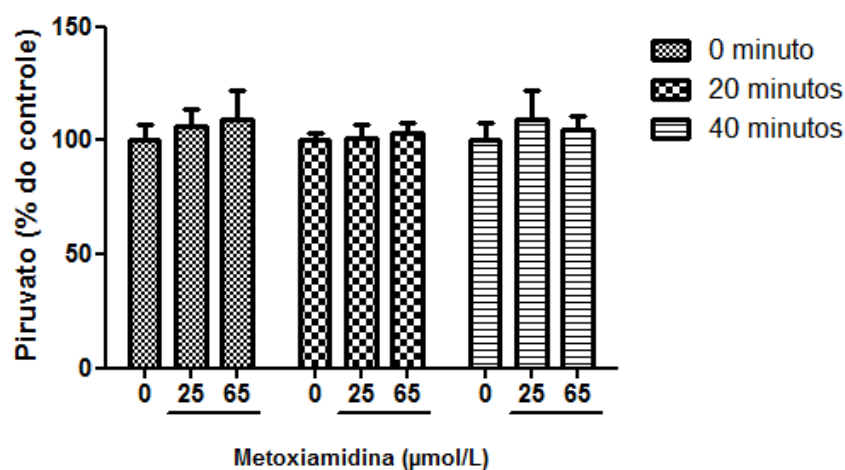
5.2.2.2 Níveis de lactato e piruvato

Os experimentos utilizando hepatócitos (FIGURA 27) e mitocôndrias isoladas (FIGURAS 18 e 19) sugerem que a metoxiamidina compromete a provisão de energia através da fosforilação oxidativa. Este comprometimento poderia levar a um aumento na atividade das enzimas da via glicolítica anaeróbica, cujo produto final é o lactato, numa tentativa de compensar a produção de ATP. Com o objetivo de avaliar esta possibilidade, foram determinados os níveis de piruvato e lactato. Nestes ensaios foram utilizadas células em suspensão, pré-incubadas com o composto por 2 minutos. Foram avaliados os níveis de piruvato e lactato nos tempos 0, 20 e 40 minutos após a incubação com a metoxiamidina.

A figura 29 mostra os efeitos da metoxiamidina sobre a produção de piruvato e lactato. A produção de piruvato não foi afetada em nenhuma concentração e tempo avaliados. Já a produção de lactato foi aumentada em ~17% somente na maior concentração ($65 \mu\text{mol/L}$) e maior tempo de incubação (40 minutos). Este aumento na produção de lactato é compatível aos efeitos mais pronunciados do composto sobre a respiração celular também na maior concentração (FIGURA 15), e sugerem uma ativação da via glicolítica em resposta ao comprometimento das funções mitocondriais relacionada a produção de ATP. Em consequência, era esperado que os valores de piruvato diminuíssem, mas não foi observado tal efeito em nenhum tempo ou concentração da metoxiamidina.

Foram realizados os mesmos experimentos com a pentamidina (FIGURA 30), porém não foram observadas diferenças significativas para esses resultados, apesar dos resultados dos experimentos de respiração (FIGURA 28) demonstrarem inibição da respiração mitocondrial na concentração de 65 $\mu\text{mol/L}$. Levando em consideração os dados apresentados por Moreno (1996), é possível sugerir que as concentrações testadas no presente estudo (25 e 65 $\mu\text{mol/L}$) foram insuficientes para promover um efeito mitocondrial expressivo, a ponto ativar a oxidação aneróbia da glicose. Vale lembrar que no estudo de Moreno (1996) foram utilizadas concentrações até 10 vezes maiores (50-600 $\mu\text{mol/L}$) do que as aqui avaliadas.

A.



B.

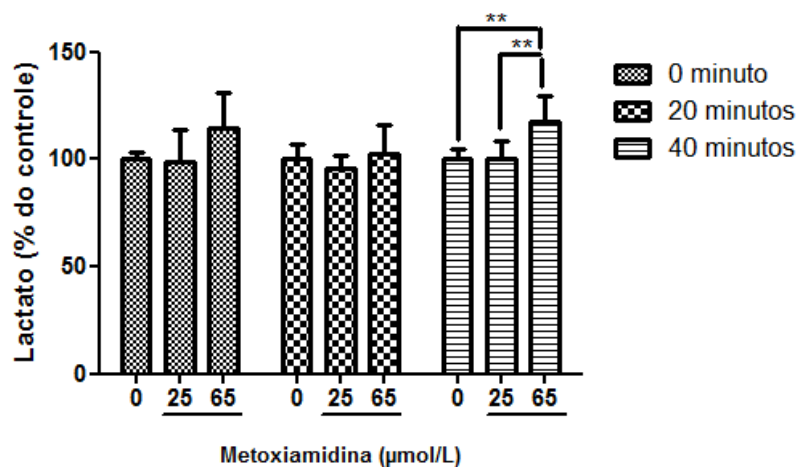


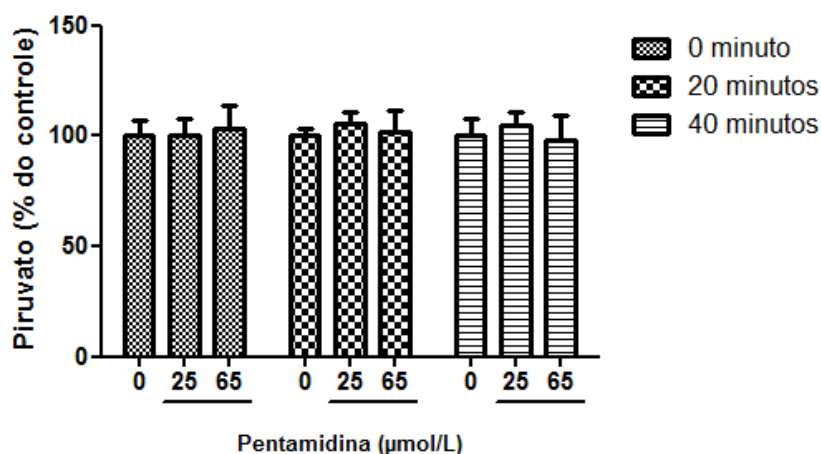
FIGURA 29: EFEITOS DA METOXIAMIDINA SOBRE OS NÍVEIS DE PIRUVATO E LACTATO

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.4.1.2 As células (1×10^6 células por mL) foram coletadas e mantidas em PBS a 37°C sob agitação constante por 10 minutos, e após isso, incubadas com metoxiamidina nas concentrações de 25 e 65 $\mu\text{mol/L}$ por 2 minutos. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi iniciada com a adição de glicose 5 mmol/L. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 20 e 40 minutos, posteriormente centrifugadas e dosadas para piruvato (**A**) e lactato (**B**). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Controle – ausência de metoxiamidina e DMSO. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicada.

** Valores estatisticamente diferentes ($p < 0,01$)

A.



B.

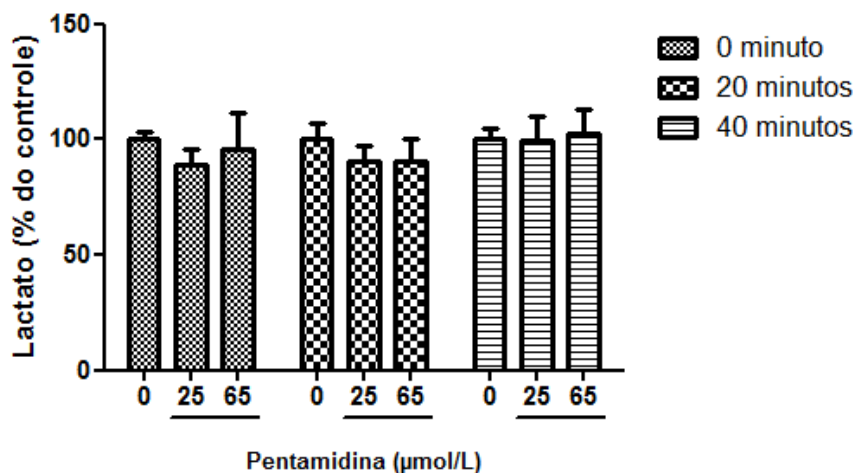


FIGURA 30: EFEITOS DA PENTAMIDINA SOBRE A PRODUÇÃO DE PIRUVATO E LACTATO

Fonte: (O autor, 2013)

Nota: As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.3.3.2. As células (1×10^6 células por mL) foram coletadas e mantidas em PBS a 37°C sob agitação constante por 10 minutos, e após isso, incubadas com pentamidina nas concentrações de 25 e 65 $\mu\text{mol/L}$ por 2 minutos. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi iniciada com a adição de glicose 5 mmol/L. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 20 e 40 minutos, posteriormente centrifugadas e dosadas para piruvato (**A**) e lactato (**B**). Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata.

6. DISCUSSÃO FINAL

O modelo experimental de mitocôndrias isoladas é amplamente utilizado em estudos de toxicidade de novos compostos. Por ser a organela responsável pela maior parte do ATP gerado na célula, seu perfeito funcionamento é de suma importância para a mesma manter-se viva. Além disso, a mitocôndria está diretamente ligada à liberação de sinais pré e pró apoptóticos, o que torna este modelo ainda mais importante quando se trata da investigação de xenobióticos como possíveis indutores de “colapso bioenergético” (PESSAYRE *et al.*, 2010).

Neste estudo, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, demonstrou-se que a metoxiamidina inibe discretamente o estado 3 da respiração (FIGURA 15A). Os resultados dos ensaios de respiração na presença de FCCP (FIGURA 17) e a avaliação dos complexos da cadeia respiratória (TABELA 1) sugerem que essa inibição se dá, em parte, devido a um efeito direto da metoxiamidina sobre o transporte de elétrons, tendo como prováveis alvos o complexo I e o segmento entre a ubiquinona e complexo III. DEGLI EPOSTI (1998) descreve que a maioria dos inibidores do complexo I é similar a ubiquinona, apresentando em sua estrutura uma “cabeça” cíclica e uma “cauda” hidrofóbica. O autor propõe três classificações para os inibidores do complexo I: tipo A, que possui estrutura similar a ubiquinona, com uma hidroxila presente na cabeça cíclica e na cauda hidrofóbica; o tipo B, que possui apenas ligações de hidrogênio como possíveis aceptores de elétrons na cabeça cíclica e nenhuma hidroxila na cauda hidrofóbica; e o tipo C, que possuem uma hidroxila ou um grupo amino na cabeça cíclica. O tipo B inclui moléculas inibidoras tanto do complexo I como do complexo III da cadeia respiratória, como é o caso da metoxiamidina. Esta amidina possui três anéis benzênicos em sua estrutura (FIGURA 13), que caracteriza sua porção hidrofóbica e poderia contribuir para o efeito inibitório observado sobre os complexos I e III.

Além disso, a metoxiamidina promoveu um aumento do consumo de oxigênio durante o estado 4 da respiração (FIGURA 15B) e em presença de oligomicina (FIGURA 18), evidenciando um possível efeito desacoplador do composto. Confirmando estes resultados, foi observado que a metoxiamidina

nas maiores concentrações (50 e 65 nmol/mg de proteína), promoveu um estímulo da atividade ATPásica (FIGURA 19A). Já foi descrito que compostos catiônicos, como o corante cianino e a pentamidina, promovem o desacoplamento da fosforilação oxidativa ao aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial interna a íons (TERADA *et al.*, 1983; MORENO, 1996). Os mecanismos moleculares da ação desses compostos ainda não são claros, porém, foi observado que o composto heterocíclico catiônico fenantrolina promove o desacoplamento ao induzir a formação de poros de transição de permeabilidade (WALLACE & STARKOV, 2000). Considerando que a metoxiamidina possui em sua estrutura três anéis benzênicos e o fato de que o grupamento amidínico pode apresentar um cátion, seria interessante avaliar seus efeitos sobre o fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos em seu efeito desacoplador.

No estudo de MORENO (1996), foi demonstrado que a pentamidina é um potente desacoplador, com efeito mais pronunciado em altas concentrações (200-600 $\mu\text{mol/L}$). A autora utilizou estas concentrações com base nos experimentos realizados por DAMPER & PATTON (1976), os quais demonstraram o acúmulo da pentamidina em tripanossomas, chegando a valores superiores a 1 mmol/L, após incubação extracelular com 45-95 $\mu\text{mol/L}$ do composto. No presente estudo, o objetivo não foi avaliar mecanismos de ação da metoxiamidina, ao contrário do que foi proposto por MORENO (1996) nos experimentos em modelo de mitocôndrias isoladas, mas sim de avaliar sua toxicidade. Desta forma, as concentrações utilizadas aqui não ultrapassaram 65 $\mu\text{mol/L}$, ou seja, 2,6 vezes maior que a LD_{50} estabelecida para a metoxiamidina (CANTO-CAVALHEIRO *et al.*, 1997).

Experimentos de inchamento mitocondrial mostraram que a metoxiamidina, nas maiores concentrações (50-65 nmol/mg de proteína), parece interagir com a membrana mitocondrial interna e alterar a sua fluidez (FIGURAS 21-22). Este feito pode ser justificado pela sua estrutura lipofílica, que permitiria a este composto se inserir nas membranas biológicas e, desta forma, alterar seu estado físico. No entanto, para confirmar esta interação outros experimentos devem ser feitos. Uma possibilidade seria a realização dos experimentos de polarização de fluorescência com as sondas DPH e DPH-PA

que monitoram as porções hidrofóbicas e hidrofílicas das membranas, respectivamente (PIRES, 2011).

Importantes atividades biológicas foram descritas para a metoxiamidina (CANTO-CAVALHEIRO *et al.*, 1997; TEMPORAL *et al.*, 2002; GENESTRA *et al.*, 2003) entre estas destaca-se a atividade contra *Leishmania Amazonensis*. Canto-Cavalheiro *et al.* estabeleceram a LD₅₀ da metoxiamidina contra esse protozoário de 20 µmol/L. No presente estudo, a dose de 25 µmol/L (equivalente a concentração 25 nmol/mg de proteína) não mostrou comprometer as funções mitocondriais avaliadas, o que do ponto de vista toxicológico, mostra-se ser um resultado promissor.

Hepatócitos isolados em cultura e em suspensão tem sido amplamente utilizados para estudos *in vitro*, como de citotoxicidade, interações farmacocinéticas de xenobióticos, transporte de lipídios e oxidação de ácidos graxos, biossíntese e regulação hormonal (ZHANG *et al.*, 2011). Neste estudo, foram avaliados parâmetros de citotoxicidade e metabolismo utilizando estes modelos experimentais.

Nos ensaios de respiração em hepatócitos isolados, os resultados foram compatíveis aos obtidos em mitocôndrias. A metoxiamidina na concentração de 65µM diminuiu o consumo de oxigênio na respiração basal (FIGURA 27), efeito semelhante ao observado em ensaios com mitocôndrias (FIGURA 15A), entretanto em menor intensidade, provavelmente devido a maior redistribuição do composto nas membranas celulares, o que diminuiria sua disponibilidade na mitocôndria. A concentração de 25 µmol/L também promoveu um discreto aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial, como evidenciado pelo aumento do consumo de oxigênio durante o estado *leak*, resultado que está de acordo com os experimentos de respiração mitocondrial na presença de oligomicina (FIGURA 18). Observou-se também uma redução do consumo de oxigênio no estado desacoplado, resultado compatível a inibição da respiração mitocondrial na presença de FCCP (FIGURA 17), onde foi observada inibição de aproximadamente 20%.

À medida que a função mitocondrial diminui, observa-se uma participação maior da glicólise na produção de ATP (DIKENS & WILL, 2007). A avaliação da produção de piruvato e lactato em hepatócitos (FIGURA 29)

mostrou que os efeitos vistos na mitocôndria não foram suficientes para desviar, de forma significativa, o metabolismo para a via anaeróbia, como forma de compensação para manter os níveis de ATP. Não houve diferença nos resultados para o piruvato, no entanto, os níveis de lactato aumentaram em ~17% no maior tempo (40 min) e concentração da metoxiamidina (65 $\mu\text{mol/L}$) (FIGURA 29B). Estes resultados são coerentes com o discreto comprometimento das funções mitocondriais promovidos pela metoxiamidina.

A metoxiamidina afetou as funções mitocondriais e o metabolismo dos hepatócitos de forma discreta. Do ponto de vista toxicológico, estes resultados são bastante promissores já que a metoxiamidina possui efeito antiprotozoário tão eficaz quanto a pentamidina (GENESTRA *et al.*, 2003), conhecidamente tóxica para vários tecidos (WISPELWAY & PEARSON, 1991). Neste sentido, um resultado muito interessante foi o de viabilidade dos hepatócitos, obtidos através de duas metodologias, ensaios com MTT (FIGURA 24) e determinação da atividade da enzima LDH (FIGURA 25). Os resultados desses experimentos mostraram que, além da metoxiamidina não promover diminuição na viabilidade de hepatócitos em cultura na dose correspondente a LD_{50} (25 $\mu\text{mol/L}$) contra *L. amazonensis*, a pentamidina, nesta mesma concentração, diminuiu significativamente a viabilidade dessas células.

As diferenças nos efeitos da pentamidina (MORENO, 1996) e metoxiamidina sobre a bioenergética mitocondrial e hepatócitos em cultura e em suspensão, podem relacionar-se aos mecanismos de ação destas amidinas. Sabe-se que o mecanismo de ação da pentamidina envolve a inibição da síntese de DNA e RNA do protozoário, com alvos que incluem a S-adenosil-L-metionina descarboxilase e topoisomerase mitocondrial II (BASSELIN *et al.*, 1996). Em relação à metoxiamidina, Temporal *et al.* (2005) propuseram que seu mecanismo antiprotozoário envolve a interação do composto com a NOS da *L. Amazonensis*, reduzindo a formação de NO^* pelo parasita, o que resultaria na redução da infecção causada pela internalização no hospedeiro. No entanto, muito ainda resta a ser esclarecido sobre o mecanismo de ação desta amidina.

Os resultados aqui apresentados sugerem que os efeitos da metoxiamina sobre os hepatócitos (em modelo *in vitro*), em concentrações nas

quais a mesma é efetiva contra *L. Amazonensis* (CANTO-CAVALHEIRO *et al.*, 1997), poderiam garantir a efetividade do composto sem trazer efeitos hepatotóxicos relacionados ao comprometimento das funções mitocondriais avaliadas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que a metoxiamidina em concentrações relacionadas à LD₅₀ estabelecida para o efeito contra *L. amazonensis*:

- 1) Promove efeitos discretos sobre as funções mitocondriais ligadas a provisão de energia, ao exercer inibição sobre o transporte de elétrons na cadeia respiratória e efeito desacoplador sobre a fosforilação oxidativa. Tais efeitos se refletem também na respiração de hepatócitos em suspensão;
- 2) Parece exercer um efeito citoprotetor em hepatócitos em cultura, como sugerido pelo aumento da porcentagem de células viáveis após tratamento com o composto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERMAN, K. E. O; WIKSTRÖM, M., F., K. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 191-197, 1976.

ANZINI, M; CHELINI, A; MANCINI, A; CAPPELLI, A; FROSINI, M; RICCI, L; VALOTI, M; MAGISTRETTI, J; CASTELLI, L; GIORDANI, A; MAKOVEC, F; VOMERO, S. Synthesis and Biological Evaluation of Amidine, Guanidine and Thiourea Derivates of 2-Amino-(6-trifluoromethoxy)benzothiazole as Neuroprotective Agents Potentially Useful in Brain Diseases. **J Med Chem**, v. 53, p. 734-744, 2010.

AUGUSTO, O; LINARES, E; GIORGIO, S. Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 29, p. 853–862, 1996.

BALESTIERI, F.M.P; QUEIROZ, A.R.P; SCAVONE, C; COSTA, V.M.A; BARRAL-NETTO, M; ABRAHAMSOHN, I.A. Leishmania (L.) amazonensis induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages, **Microbes Infect**, v. 4, p. 23–29, 2002.

BASSELIN, M; LAWRENCE, F; ROBERT-GERO, M. Pentamidine Uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* Promastigotes and Axenic Amastigotes. **Biochem J**, v. 315, p. 631-634, 1996.

BERMAN, J.D. Chemotherapy of Leishmaniasis: Biochemical Mechanisms, Clinical Efficacy, and Future Strategies. **Rev Infect Dis**, v. 10, n. 3, p. 560-586, 1988.

BERSON, A; DESCATOIRE, V; SUTTON, A. *et al.* Toxicity of alpidem, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, but not zolpidem, in rat hepatocytes: role of mitochondrial permeability transition and metabolic activation. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 299, p. 793-800, 2001.

BIELAWSKA, A; BIELAWSKA, K; MUSZYNSKA, A. Synthesis and Biological Evaluation of New Cyclic Amidine Analogs of Chlorambucil. **II Farmaco**, v. 59, p. 111-117, 2004.

CANTO-CAVALHEIRO, M.M; ECHEVARRIA, A; ARAUJO, C.A; BRAVO, M.F; SANTOS, L.H; JANSEN, A.M; LEON, L.L. The potential effects of new synthetic drugs against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Microbios**, v. 90, p. 51-60, 1997.

CHANCE, B; WILLIAMS, G.R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 217, n.1, p. 383-393, 1955.

COSTA, J.M.L. O uso clínico das pentamidinas com especial referência nas leishmanioses. **Acta Amazonica**, v. 23, p. 163-172, 1993.

CREUTZ, C; SUTIN, N. Reduction of ferricytochrome *c* by dithionite ion: electron transfer by parallel adjacent and remote pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington DC, v. 70, n. 6, p. 1701-1703, 1973.

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

DEGLI EPOSTI, M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1364, p. 222-235, 1998.

DAMPER, D; PATTON, C.L. Pentamidine transport and sensitivity in brucei-group trypanosomes. **J Protozool.** v. 23, p. 349–356, 1976.

DESCHAMPS, D; FISCH, C; FROMENTY, B; BERSON, A; DEGOTT, C; PESSAYRE, D. Inhibition by salicylic acid of the activation and thus oxidation of long-chain fatty acids. Possible role in the development of Reye's syndrome. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 259, p. 894-904, 1991.

DONNELLY, H; BERNARD, E.M; ROTHKOTTER, H; GOLD, J.W.M; ARMSTRONG, D. Distribution of Pentamidine in Patients with AIDS. **J Infect Dis**, v. 157, n. 5, p. 985-989, 1988.

DYKENS, J.A; WILL, YVONNE. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. **Drug Discov Today**, v. 12, p. 777-85, 2007.

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

ECHEVARRIA, A; SANTOS, L.H; MILLER, J; MAHMOOD, N. Synthesis, Characterization, and Anti-HIV Activity of Some 2-*p*-X-phenyl-1,3-N,N'-diphenylamidines. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 6, n. 16, p. 1901-1904, 1996.

FACCENDA, D; CAMPANELLA, M. Molecular Regulation of the Mitochondrial F₁F_o-ATP synthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF₁). **Int J Cell Biol**, v. 2012, 2012.

FARBER, E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. **Mod Pathol.**, v. 7, n. 5, p. 605-609, 1994.

FASTIER, F.N. Structure-activity Relationships of Amidine Derivates. **Pharmacol Rev**, v. 14, n. 1, p. 37-90, 1962.

FONSECA-GEIGEL, L. A via do óxido nítrico em *Leishmania amazonensis*. Rio de Janeiro, 2000. 89p. [Dissertação de Mestrado. Fundação Instituto Oswaldo Cruz]

FROMENTY B; PESSAYRE, D. Inhibition of Mitochondrial Betaoxidation as a Mechanism of Hepatotoxicity. **Pharmacol Ther**, v. 67, p. 101–154, 1995.

GEBHARDT, R; HENGSTLER, J.G; MÜLLER, D; *et al.* New Hepatocyte *in vitro* Systems for Drug Metabolism: Metabolic Capacity and Recommendations for Application in Basic Research and Drug Development, Standard Operation Procedures. **Drug Metab Rev**, v. 35, p. 145-213, 2003.

GENESTRA, M; ECHEVARRIA, A; CYSNEFINKELSTEIN, L; VIGNÓLIO-ALVES, L; LEON, L.L. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Nitric Oxide Biol. Chem**, v. 8, p.1-6, 2003.

GIORGIO, S.; LINARES, E; CAPURRO, M.L; BIANCHI, A.G; AUGUSTO, O. Formation of nitrosyl hemoglobin and nitrotyrosine during murine leishmaniasis. **Photochem Photobiol**, v. 63, p. 750–754, 1996.

GNAIGER, E. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph, and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction, Edited by James Dykens and Yvonn Will, John Wiley & Sons, Inc, p. 327-352, 2008.

GOA, K.L; CAMPOLI-RICHARDS, D.M. Pentamidine Isethionate: A Review of its Antiprotozoal Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in *Pneumocystis carinii* Pneumonia. **Drugs**, v. 33, p. 242-258, 1987.

GRATTAGLIANO, I; BONFRATE, L; DIOGO, C.V; WANG, H.H; WANG, D.Q.V; PORTINCASA, P. Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury, certainties and doubts. **World J. Gastroentrol.**, v.15, n. 39, p. 4865-4876, 2009.

GREENHILL, J.V; LUE, P. Amidines and Guanidines in medicinal chemistry. **Progr Med Chem**, v. 30, p. 206-306, 1993.

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

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

JACOB, M; BJARNASON, I; RAFI, S; WRIGGLESWORTH, J; SIMPSON, R.J. A study of the effects of indometacin on liver mitochondria from rats, mice and humans. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 15, p. 1837-1842, 2001.

JAESCHKE, H; GORES, G.J; CEDERBAUM, A.I.; HINSON, J.A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J.J. Mechanisms of Hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 65, p. 166-176, 2002.

KEYHANI, J; KEYHANI, E. Cytochrome *c* oxidase biosynthesis and assembly in *Candida utilis* yeast cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 167, p. 588-595, 1975.

KEMMELMEYER, F.S; BRACHT, A. 1989. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug mefenamic acid on energy metabolism in the perfused rat liver. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 38,p. 823-830, 1989.

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

LABBE, G; PESSAYRE, D; FROMENTY, B. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 22, p. 335-353, 2008.

LACY, C.F; ARMSTRONG, L.L; GOLDMAN, M.P; LANCE, L.L. Medicamentos Lexi-Comp Manole: uma fonte abrangente para médicos e profissionais da saúde. 17ª edição, Editora Manole, 2009.

LANSIAUX, A; TANIOUS, F; MISHAL, Z; *et al.* Distribution of furamide analogues in tumor cells: targeting of the nucleus or mitochondria depending on the amidina substitution. **Cancer Res**, v. 24, p. 7219-29, 2002.

LEIST, M; SINGLE, B; CASTOLDI, A.F, KÜHNLE, S. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **J. Exp. Med.**, New York, v. 185, No 8, p. 1481-1486, 1997.

LEWIS, W; DALAKAS, M.C. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. **Nature Med**, v. 1, p. 417-422, 1995.

LEWIS, W; LEVINE, E.S; GRINIUVIENE, B. *et al.* Fialuridine and its Metabolites Inhibit DNA Polymerase γ at Sites of Multiple Adjacent Analog Incorporation, Decrease mtDNA Abundance, and Cause Mitochondrial Structural Defects in Cultured Hepatoblasts. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.93, p. 3592–3597, 1996.

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

MANSOURI, A; GAOU, I; FROMENTY, B; *et al.* Premature oxidative aging of hepatic mitochondrial DNA in Wilson's disease. **Gastroenterology**, v. 113, p. 599-605, 1997.

MARGOLIASH, E. The chromatographic behaviour of cytochrome *c* on cation exchangers. **Biochem. J.**, London, v. 56, p. 535 – 543, 1954.

MASON, T.L; POYTON, R.O; WHARTON, D.C; SCHATZ, G. Cytochrome *c* oxidase from bakers' yeast. Isolation and properties. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 248, n. 4, p. 1346-1354, 1973.

MASUBUCHI Y; YAMADA S; HORIE, T. Diphenylamine as an important structure of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 58, p.861-865, 1999.

MORENO, A.J.M; MADEIRA, V.M.C. Interference of parathion with mitochondrial bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1015, p. 361-367, 1990.

MORENO, S.N. Pentamidine is an uncoupler of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, v. 326, p. 15-20, 1996.

MORENO-SANCHEZ, R.; BRAVO, C.; VASQUEZ, C.; AYALA, G.; SILVEIRA, L. H.; MARTINEZ-LAVIN, M. Inhibition and uncoupling of phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 57, p. 743-752, 1999.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, A; PADMANABHAN, P.K; SAHANI, M.H; BARRET, M.P; MADHUBALA, R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 145, p. 1-10, 2006.

MUSTAFA, M.G.; UTSUMI, K; PACKER, L. Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 24, n. 3, p. 381-385, 1966.

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

NYUGEN-VAN-DUONG, M.K; NICOLAS, L; GAUDEMER, A; BRIK, M.E. Synthesis and ESR study of new dihydroxamic acid siderophores as scavengers of hydroxyl radicals. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 8, p. 227-232, 1998.

OSZCZAPOWICZ, J; RACZYNSKA, E. Amidines. Part 13. Influence of substitution at imino nitrogen atom on pK_a values of N^1N^1 -dimethylacetamidines. **J Chem Soc, Perkin Trans. 2**, p. 1677-80, 1984

ÖZDEN, S; ATABEY, D; YILDIZ, S; GÖKER, H. Synthesis and Potent Antimicrobial Activity of Some Novel Methyl of Ethyl 1*H*-benzimidazole-5-carboxylates Derivates Carrying Amide or Amidine Groups. **Bioorg Med Chem**, v. 13, p. 1587-1597, 2005.

PANICO, A; VICINI, P; INCERTI, M; CARDILE, V; GENTILE, B; RONSISVALLE, G. Amidinobenzisothiazole Derivates with Antidegenerative Activity on Cartilage. **Il Farmaco**, v. 57, p.671-675, 2002.

PESSAYRE, D; MANSOURI, A; HAOUZI, D; FROMENTY; B. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. **Cell Biol Toxicol.**, v. 15, p. 367-373, 2000.

PESSAYRE D; FROMENTY B; MANSOURI A; BERSON A. Hepatotoxicity due to mitochondrial injury, in: Kaplowitz N., DeLeve L.D. (Eds), Drug-induced liver disease, 2nd edn. **Informa Healthcare**, New York, p. 49–84, 2007.

PESSAYRE, D; MANSOURI, A; HAOUZI, D; FROMENTY; B. Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. J. Uetrecht (ed.), **Adverse Drug Reactions**, Handbook of Experimental Pharmacology 196, p. 311, 2010.

PETRESCU, I; TARBA, C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. **Biochim Biophys Acta**, v. 1318, p. 385-94, 1997.

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

PULLMAN, M.E; PENEFSKY, H.S.; DATTA, A; RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 235, n. 11, p. 3322-3329, 1960.

RAKBA, N; NYUGEN-VAN-DUONG, M.K; NICOLAS, L; *et al.* Cytoprotection and iron mobilization in rat hepatocyte cultures by a new synthetic dihydroxamate chelator. **Toxicol Lett**, v. 110, p. 19-27, 1999.

ROSSI, E.; AZZONE, G. F. Ion transport in liver mitochondria. Energy barrier and stoichiometry of aerobic K⁺ translocation. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 7, p. 418-426, 1969.

RUSSMANN, S; KULLAK-UBLICK, G.A; GRATAGLIANO, I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. **Current Medicinal Chemistry**., v. 16, p. 3041-3053, 2009.

SAÏ, P; BOILLOT, D; BOITARD, C; DEBRAY-SACHS, M; REACH, G; ASSAN, R. Pentamidine, A New Diabetogenic Drug in Laboratory Rodents. **Diabetologia**, v. 25, 418-423, 1983.

DOS SANTOS, M. S; BERNARDINO, A.M.R; SOUZA, M.C. Principais Métodos de Síntese de Amidinas. **Quim Nova**, v. 29, n. 6, p. 1301-1306, 2006.

SCATENA, R; BOTTONI, P; BOTTA, P; MARTORANA, G.E; GIARDINA, B. The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 293, p. 12-21, 2007.

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

SEPPALA, A.J; SARIS, N.E; GAUFFIN, M.L. Inhibition of phospholipase a-induced swelling of mitochondria by local anesthetics and related agents. **Biochem Pharmacol**, v. 2, p. 305-13, 1971.

SHINOHARA, Y; BANDOU, S; KORA, S; KITAMURA, S; INAZUMI, S; TERADA, H. Cationic uncouplers of oxidative phosphorylation are inducers of mitochondrial permeability transition. **FEBS Lett**, v. 428, p. 89-92, 1998.

SHRINER, R.L; NEUMANN, F.W. The Chemistry of the Amidines. **Chemical Review**, v. 35, p. 351-415, 1944.

SIELECKI, T.M; LIU, J; MOUSA, S.A; RACANELLI, A.L; HAUSNER, E.A; WEXLER, R.R; OLSON, R.E. Synthesis and Pharmacology of Modified Amidine Isoxazoline Glycoprotein IIb/IIa Receptor Antagonists. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 11, p. 2201-2204, 2001.

SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenases. **Methods Biochem. Anal.**, Weinheim, v. 22, p. 123-175, 1974.

SINGH, B K. Amidine: *Structure, Reactivity, and Complexation Behavior*. **Int J ChemTech Res**, v. 1, n. 2, p. 250-264, 2009.

SOARES-BEZERRA, R.J; LEON, L; GENESTRA, M. Recentes Avanços na Quimioterapia de Leishmanioses: Moléculas Intracelulares como Alvo de Fármacos. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SOMLO, M. Induction des lactico-cytocrome c reductases (D - ET L -) de la levure aerobie par les lactates (D - ET- L). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 97, p. 183-201, 1965.

SONDHI, S.M; SINGH, J; KUMAR, A; JAMAL, H; GUPTA, P.P. Synthesis of Amidine and Amide Derivates and their Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activities. **Eur J Med Chem**, v. 44, p. 1010-1015, 2009a.

SONDHI, S.M; RANI, R; GUPTA, P.P; AGRAWAL, S.K; SAXENA, A.K. Synthesis, Anticancer, and Anti-inflammatory Activity Evaluation of Methanesulfonamide and Amidine Derivates of 3,4-diaryl-2-imino-4-thiazolines. **Mol Divers**, v. 13, p. 357-366, 2009b.

SUMNER, J. B. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. **Science**, Washington, v. 100, p. 413-414, 1944.

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

TEMPORAL, R.M; CYSNE-FINKELSTEIN, L; ECHEVARRIA, A; DE SOUZA, M.A; SERTA, M; DA SILVA-GONCALVES, A.J; PIRMEZ, C; LEON, L.L. Effects of amidine derivatives on parasite-macrophage interaction and evaluation of toxicity. **Drug Res**, v. 52, p. 489-493, 2002.

TEMPORAL, R.M; CYSNE-FINKELSTEIN, L; ECHEVARRIA, A; DA SILVA-GONCALVES, A.J; LEON, L.L; GENESTRA, M.S. Amidine Derivates and *Leishmania amazonensis*: na Evaluation of the Effect of Nitric Oxide (NO) Production on the Parasite-macrophage Interaction. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 20, n. 1, p. 13-18, 2005

TERADA, H; NAGAMUNE, H; MORIKAWA, N; ICHIKAWA, T. The cyanine dye triS-C4(5) as a cationic uncoupler of oxidative phosphorylation: interaction with mitochondria detected by derivative spectrophotometry. **Cell Struct Funct**, v. 8, p. 161-70, 1983.

TIDWELL, R.R; JONES, S.K; GERATZ, J.D; OHEMENG, K.A; BELL, C.A; BERGER, B.J; HALL, J.E. Development of Pentamidine Analogues as New Agents for the Treatment of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. **Ann N Y Acad Sci**, v. 616, p. 421-441, 1990.

ULRICH, R.G; BACON, J.A; BRASS E.P; CRAMER, C.T; PETRELLA, D.K; SUN, E.L. Metabolic, idiosyncratic toxicity of drugs: overview of the hepatic toxicity induced by the anxiolytic, panadiplon. **Chem. Biol. Interact**, v. 134, p. 251-270, 2001.

VALMAS, N; ZURYN, S; EBERT, P.R. Mitochondrial uncouplers act synergistically with the fumigant phosphine to disrupt mitochondrial membrane potential and cause cell death. **Toxicology**, v. 252, p. 33-39, 2008.

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

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

ZHANG, Z.G; LI, X.B; GAO, L; *et al.* An updated method for the isolation and culture of primary cell hepatocytes. **Vet J**, v. 191, p. 323-6, 2011.

WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 40, p. 353-388, 2000.

WEICKOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.423, p. 339-42, 1998.

WISPELWEY, B; PEARSON, R.D. Pentamidine: a Review. **Infect Cont Hosp Ep**, v. 12, n. 6, p. 375-382, 1991.

YOETANI, T.; RAY, G.S. Studies on cytochrome oxidase. VI. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocycytochrome *c* by cytochrome oxidase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.240, n.8, p. 3392-3398, 1965.