

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINA LORENA MEIRA FERNANDES



ALTERAÇÕES NA BIOENERGÉTICA DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO E TOXICIDADE EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2) PROMOVIDAS POR UMA XILOGLUCANA DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* (COPAÍBA) E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO (IV/V)

CURITIBA

2016

KARINA LORENA MEIRA FERNANDES

ALTERAÇÕES NA BIOENERGÉTICA DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE
FÍGADO DE RATO E TOXICIDADE EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO
(HepG2) PROMOVIDAS POR UMA XILOGLUCANA DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii*
(COPAÍBA) E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO (IV/V)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof^ª Dr^ª Silvia Maria S. C. Cadena
Co-orientador: Prof^ª Dr^ª Guilhermina R. Noleto

CURITIBA

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

Fernandes, Karina Lorena Meira

Alterações na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato e toxicidade em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) promovidas por uma xiloglucana de sementes de *Copaifera langsdorffii* (Copaíba) e seu complexo oxovanádio (IV/IV). / Karina Lorena Meira Fernandes. – Curitiba, 2016.

75 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Sílvia Maria S. C. Cadena

Co-orientadora: Guilhermina R. Noleto

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

1. Copaíba. 2. Bioenergética. 3. Vanádio. I. Título. II. Cadena, Sílvia Maria S. C. III. Noleto, Guilhermina R. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.


CDD (20. ed.) 574.19121

TERMO DE APROVAÇÃO

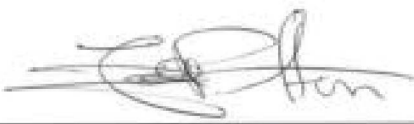
KARINA LORENA MEIRA FERNANDES

ALTERAÇÕES NA BIOENERGÉTICA DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO E TOXICIDADE EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2) PROMOVIDAS POR UMA XILOGLUCANA DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* (COPAÍBA) E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO (IV/V)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Prof.ª Dr.ª Silvia M. S. C. Cadena - Orientadora
Departamento de Bioquímica, UFPR


Prof.ª Dr.ª Gláucia R. Martínez
Departamento de Bioquímica, UFPR


Prof.ª Dr.ª Fabíola Regina Stevan
PUCPR

Curitiba, 29 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por muito antes de essa jornada começar, cuidar caprichosamente de todos os detalhes, me proporcionando alegrias, oportunidades, desafios e superação junto ao sentimento de amparo. Ao Senhor, só posso dar-te eterna gratidão.

Aos meus pais, Edina e Milton, por serem exatamente como são, exemplos de amor, humildade, honestidade, força e esperança. Vocês serão sempre meus heróis e modelos para a vida! Sem vocês ao meu lado eu nada conseguiria. Obrigada por todos os ensinamentos, verdadeiros mestres.

Aos meus queridos irmãos, Rodrigo e Nicoli, que mesmo muito pequenos já me ensinavam o altruísmo e responsabilidade, obrigada por me trazerem tantas alegrias no dia a dia e me darem ânimo nos momentos mais difíceis.

Ao meu amado Matheus, que durante esse caminho passou de namorado para noivo! Obrigada por compartilhar sempre os meus ideais durante essa caminhada, oferecendo apoio, incentivo e compreensão. Te amo e dedico a ti, muito desse trabalho com a mais profunda gratidão. Juntos vamos ao infinito e além!

A toda a minha família e amigos, por serem exemplo de união e por me incentivarem sempre a aprender e a ser sempre melhor.

A prof^a Silvia Maria Suter Correia Cadena, por ter me aceito, mesmo quando seu tempo era curto, obrigada pela oportunidade e por ter acreditado em mim, ser sua orientada foi um privilégio, espero levar comigo todas as suas qualidades, não só profissionais, mas também pessoais, sou eternamente grata.

A prof^a. Guilhermina R. Noletto, pelos ensinamentos, carinho e paciência para me ensinar.

As professoras do grupo de oxidações biológicas, Maria Eliane, Gláucia e Sheila obrigada pelas contribuições.

Aos meus queridos amigos de laboratório, Elaine, Carlos, Diego, Juan, Carolina, William Felipe, Anna, Otávio, Rafaela, Willian, Palona, Juliana, Felipe e Gustavo, obrigada pelos conselhos e ajuda nos experimentos, além disso, pelos 2 anos de amizade.

A todos os professores, entre eles Patrícia Stuelp Campelo e Edvaldo Rosa, que me ajudaram a chegar aqui.

A Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, pela excelência e ética, e as Agências Financiadoras, Capes e CNPq.

"Não são nossas habilidades que revelam quem realmente somos, são as nossas escolhas."

J. K. Rowling

"Vamos todos numa linda passarela, de uma aquarela que um dia enfim...descolorirá."

Aquarela, Toquinho

“Porque a seus anjos ele dará ordens a seu respeito para que o protejam em todos os seus caminhos.”

Salmos 91:11

RESUMO

Para polissacarídeos isolados de diferentes fontes são atribuídas diversas atividades biológicas que podem ser modificadas por sua complexação com metais, entre estes o vanádio. Para uma xiloglucana extraída de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC) e o seu complexo com oxovanádio (XGC:VO) foi descrito efeito tóxico para células de melanoma murino B16F10, possivelmente associado com o comprometimento da respiração celular. O presente estudo teve como objetivo avaliar esta possibilidade ao determinar os efeitos destes polímeros em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Ainda, para evidenciar se XGC e XGC:VO são tóxicos para outras linhagens de células tumorais, seus efeitos sobre a viabilidade e proliferação de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) também foram determinados. Em mitocôndrias intactas foram determinados os estados 3 e 4 da respiração, o coeficiente de controle respiratório (CCR) e a razão ADP/O. XGC (0,5-25 µg/mL) não afetou nenhum dos parâmetros analisados quando os substratos foram glutamato/malato. No entanto, XGC:VO (0,5-25 µg/mL) inibiu em ~13% o estado 3 da respiração e, conseqüentemente, causou uma redução de ~13% no CCR. Em mitocôndrias desacopladas com FCCP, ambos os polímeros reduziram em ~30% o consumo de oxigênio, de forma independente da concentração. Quando o succinato foi utilizado como substrato oxidável, XGC promoveu um estímulo do estado 4 (~17%) e reduziu o CCR em ~12%, somente na concentração de 10 µg/mL. Por sua vez, XGC:VO não alterou qualquer parâmetro. Em mitocôndrias rompidas, a atividade da NADH oxidase não foi alterada pelos polissacarídeos (0,5-25 µg/mL), mas XGC promoveu um estímulo da Succinato Oxidase em ~95% (0,5 e 1,0 µg/mL) e 73% (25 µg/mL). Tanto a XGC como XGC:VO inibiram a atividade da succinato desidrogenase em ~19 e ~30%, respectivamente, na maior concentração (25 µg/mL). A viabilidade das células HepG2, após 24 horas de tratamento com XGC aparentemente aumentou em 27, 22 e 43%, nas concentrações de 25, 100 e 200 µg/mL respectivamente. XGC:VO (25 µg/mL) promoveu uma redução de ~20% da viabilidade, e na concentração de 100 µg/mL aumentou aparentemente este parâmetro em ~68%. Em 48 horas de tratamento, tanto XGC como XGC:VO não alteraram a viabilidade das células HepG2. XGC:VO e XGC (200 µg/mL) após 24 h de tratamento reduziram a proliferação celular em ~40% e ~60%, respectivamente. Após 48h de tratamento XGC e XGC:VO (100 µg/mL) estimularam a proliferação ~24% chegando o estímulo a 30% na concentração de 200 µg/mL para ambos polissacarídeos. Em 72 h de tratamento, o estímulo se manteve para XGC (200 µg/mL - 33%), porém, XGC:VO inibiu a proliferação em ~85% (200 µg/mL). Em ensaios de recuperação celular (tratamento por 48h e retirada dos compostos e novo ensaio em 24h), XGC (200 µg/mL) estimulou em ~51% a proliferação, enquanto XGC:VO promoveu uma inibição de ~35% e ~77% nas concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo em mitocôndrias isoladas demonstram que os efeitos do XGC e XGC:VO sobre a respiração dependem tanto do substrato oxidado, se do Complexo I (glutamato/malato) ou Complexo II (succinato), quanto da presença do vanádio complexado ao polissacarídeo. Estes efeitos relacionam-se com a integridade da membrana mitocondrial, uma vez que em ensaios com as organelas rompidas, não foram observados efeitos dos polímeros na oxidação completa do NADH. Os efeitos em mitocôndrias isoladas se refletem aparentemente na ação de XGC e XGC:VO em células HepG2, cuja viabilidade e proliferação exibem perfis de estímulo e inibição dependentes da presença do metal e das concentrações utilizadas. Considerados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo abrem novas e importantes frentes de investigação do mecanismo da toxicidade destes polímeros em células tumorais.

Palavras chaves: bioenergética mitocondrial, hepatocarcinoma, xiloglucanas, vanádio.

ABSTRACT

Polysaccharides isolated from different sources have shown several biological activities, which may be modified by their complexation with metals, such as vanadium. For a xyloglucan from *Copaifera langsdorffii* (XGC) seeds and its complex with oxovanadium (XGC:VO) the toxic effect on melanoma murine B16F10 cells was described. This effect was associated with the impairment of B16F10 cells respiration. The present study aimed to investigate this possibility by determining the effects of these polymers on mitochondrial bioenergetics. It was also evaluated if the polysaccharides are toxic for human hepatocellular carcinoma cells (HepG2). In intact isolated mitochondria were determined the states 3 and 4 of respiration, the respiratory control coefficient (CCR) and the ratio ADP/O. XGC (0.5-25 $\mu\text{g/mL}$) did not affect any of the parameters analyzed when the substrates were glutamate/malate. However, XGC:VO (0.5-25 $\mu\text{g/mL}$) reduced at $\sim 13\%$ the state 3 and consequently the CCR values were reduced by $\sim 13\%$. In FCCP uncoupled mitochondria, both polymers reduced by $\sim 30\%$ the oxygen consumption in a dose-independent way. When the succinate was used as oxidizable substrate, XGC stimulated the state 4 ($\sim 17\%$) and reduced the CCR by $\sim 12\%$, but only at 10 $\mu\text{g/mL}$. On the other hand, XGC:VO did not affect any parameter when succinate was the substrate. In disrupted mitochondria, the activity of NADH oxidase was not changed by the polysaccharides (0.5-25 $\mu\text{g/mL}$), but XGC promoted a stimulus of Succinate Oxidase by $\sim 95\%$ (0.5; 1.0 $\mu\text{g/mL}$) and 73% (25 $\mu\text{g/mL}$). Both XGC and XGV:VO inhibited the succinate dehydrogenase activity by ~ 19 and $\sim 30\%$, respectively, at the highest concentration (25 $\mu\text{g/mL}$). The viability of HepG2 cells after 24 hours of treatment with XGC apparently increased by 27, 22 and 43% at 25, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$, respectively. XGV:VO (25 $\mu\text{g/mL}$) promoted a decrease of 20% in the cells viability, and at 100 $\mu\text{g/mL}$ apparently increased this parameter at $\sim 68\%$. After 48 hours of treatment, both XGC and XGC:VO did not alter the HepG2 viability XGC:VO and XGC (200 $\mu\text{g/mL}$) reduced cellular proliferation at $\sim 40\%$ and $\sim 60\%$, after 24 h of treatment, respectively. After 48 hours of treatment XGC and XGC:VO (100 $\mu\text{g/mL}$) stimulated the proliferation by $\sim 24\%$ reaching to $\sim 30\%$ at 200 $\mu\text{g/mL}$ for both polysaccharides. When the cells were treated for 72 h, the stimulation was until observed for XGC (200 $\mu\text{g/mL}$ - 33%); however, the proliferation was inhibited ($\sim 85\%$) by XGC:VO at the same concentration (200 $\mu\text{g/mL}$). In cell recovery assays (treatments for 48 h following the removal of polysaccharides and cells culturing by 24 h), XGC (200 $\mu\text{g/mL}$) stimulated the proliferation by $\sim 51\%$, while XGC:VO promoted an inhibition of $\sim 35\%$ and $\sim 77\%$ at the 100 $\mu\text{g/mL}$ and 200 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results obtained in this study with isolated mitochondria showed that the effects of XGC and XGC:VO are dependent on the Complex of the substrate oxidation (Complex I – glutamate/malate or Complex II - succinate), as well as of the presence of vanadium. These effects are tightly related with the integrity of mitochondrial membrane since in disrupted organelles the polymers did not promoted any effect on NADH oxidation. The polysaccharides effects on isolated mitochondria probably were also involved in their actions on HepG2 cells, on which the viability and proliferation were stimulated or inhibited dependent on the presence of vanadium and concentration. Taken together, these results open new and important perspectives for the further investigations concerning the mechanisms of toxicity of these polymers in tumor cells.

Key words: mitochondrial bioenergetics, hepatocellular carcinoma, xyloglucan, vanadium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM SEGMENTO DE CADEIA DE XILOGLUCANA DE PAREDE CELULAR DO TIPO I _____	18
FIGURA 2: FRUTOS E SEMENTES DE <i>Copaifera langsdorffii</i> (COPAÍBA) _____	20
FIGURA 3: MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL DO METAL VANÁDIO ____	24
FIGURA 4: ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL _____	29
FIGURA 5: TRAÇADO DEMONSTRATIVO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO POR MITOCÔNDRIAS INTACTAS EM OXÍGRAFO _____	37
FIGURA 6: EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE O ESTADO 3 DA RESPIRAÇÃO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS. _____	38
FIGURA 7: EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO DURANTE O ESTADO 4 DA RESPIRAÇÃO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS ____	40
FIGURA 8: EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE O COEFICIENTE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO (CCR) EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS _____	42
FIGURA 9: EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE A RAZÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ADP POR OXIGÊNIO CONSUMIDO (ADP/O) _____	43
FIGURA 10: EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE A RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM PRESENÇA DE FCCP _____	46
FIGURA 11: EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE A ATIVIDADE DA NADH OXIDASE _____	48
FIGURA 12: EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO OXIDASE _____	49
FÍGURA 13: EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE _____	50

FIGURE 14: EFEITO DE XGC E XGC:VO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 _____ 53

FIGURE 15: EFEITO DE XGC E XGC:VO SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2 _____ 57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-RESULTADOS DOS TESTES DE MTT E CRISTAL VIOLETA PARA XGC E XCG:VO _____ 61

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

ADP/O: Quociente entre nanomol de ADP e nanoátomos de oxigênio consumidos durante o estado 3

BSA: Albumina Bovina Sérica

CCR: Coeficiente de Controle Respiratório

DMSO: Dimetilsufóxido

DPIP: 2,6-Diclorofenolindofenol

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FCCP: Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona

HBSS: Solução Balanceada de Hanks

IL-1: Interleucina-1

MME: Membrana Mitocondrial Externa

MMI: Membrana Mitocondrial Interna

MRBs: Modificadores da Resposta Biológica

MTT: Brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Tampão Fosfato

PTPM: Poro de transição de Permeabilidade Mitocondrial

PMS: Metasulfato de Fenazina

SUS: Sistema Único de Saúde

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

VDAC: Canal Aniônico Voltagem-Dependente

XGC: Xiloglucana

XGC:VO: Xiloglucana Complexada com Oxovanádio

$\Delta\psi_m$ -Potencial elétrico de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
1.1	OBJETIVO GERAL	15
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL.....	16
2.2	XILOGLUCANAS DE RESERVA	18
2.2.1	<i>Xiloglucanas de Copaiфера langsdorffii</i>	19
2.3	VANÁDIO E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	21
2.4	BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL	25
2.5	HEPATOCARCINOMA HUMANO.....	27
3	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	SOLUÇÕES DE XILOGLUCANA DE <i>Copaiфера langsdorffii</i> (XGC) E SEU COMPLEXO XGC:VO	30
4.2	ANÁLISES DOS EFEITOS DA XGC E XGC:VO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS ..	30
4.2.1	Animais	30
4.2.2	Isolamento de mitocôndrias.....	31
4.2.3	Determinação do consumo de oxigênio, cálculo do coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O em mitocôndrias isoladas	31
4.2.4	Obtenção de mitocôndrias rompidas para avaliação da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória	32
4.2.5	Determinação da atividade enzimática dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória.....	32
4.3	ANÁLISES DOS EFEITOS DA XGC E XGC:VO EM CÉLULAS HepG2	33
4.3.1	Meio de cultura e Soluções	33
4.3.2	Ensaio de Viabilidade Celular.....	34
4.3.3	Ensaio de Proliferação Celular.....	35
4.4	Análise estatística dos dados experimentais.....	36

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	EFEITOS DA XGC E XGC:VO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS.....	37
5.1.1	Mitocôndrias intactas - medidas de parâmetros respiratórios	37
5.1.2	Mitocôndrias rompidas - Atividade dos complexos da cadeia respiratória.....	47
5.2	EFEITOS DA XGC E XGC:VO EM CÉLULAS HEPG2.....	52
5.2.1	Viabilidade Celular	52
5.2.2	Proliferação celular	55
6	CONCLUSÃO	62
7	REFERÊNCIAS	63
8	ANEXO I	75

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O potencial dos compostos de origem vegetal como fonte de novas drogas oferece aos pesquisadores um amplo campo para a investigação científica (RATES, 2001). A identificação de seus componentes, bem como de seus mecanismos de ação, tem sido um dos maiores desafios para a ciência (GEBHARDT, 2000). Com o avanço da química foi possível purificar esses compostos, determinar e modificar suas estruturas a fim de melhorar certas características. Isso tem permitido aos pesquisadores detalhar seus efeitos sobre o organismo humano, contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias contra várias doenças, entre estas o câncer (CLARDY *et al.*, 2004).

A quimioterapia tradicional para o tratamento do câncer não é seletiva e, portanto, pode ser agressiva à tecidos e órgãos saudáveis. Assim, é de grande interesse o estudo de agentes que possuam ação antitumoral e que apresentem menor toxicidade, dentre esses, destacam-se os polissacarídeos. Ainda não foram esclarecidos os mecanismos de ação da atividade antitumoral dos polissacarídeos, porém, sabe-se que estes compostos são capazes de induzir a apoptose de células tumorais, impedir a proliferação celular e exercer efeito imunomodulador que potencializa a ação de quimioterápicos (ZONG *et al.*, 2012).

As β -glucanas de diferentes fontes são os polissacarídeos mais estudados como imunomoduladores e seus efeitos contra algumas doenças, como por exemplo, as neoplásicas, já foram comprovados (CHEN *et al.*, 2010; CHLUBNOVÁ *et al.*, 2011). Um exemplo dessa aplicação é o imunoglucan®, uma β -1,3-glicopiranosose, que está disponível para tratamento do câncer de estômago e mama. Este medicamento atua modulando o sistema imunológico do hospedeiro por aumentar a atividade dos macrófagos (TAKAKU *et al.* 2001; SCHEPETKIN *et al.*, 2006). Além disso, eleva a taxa de interleucinas, tais como, IL-1 que acabam por estimular células NK (Natural killer), responsáveis pela destruição de células neoplásicas (TAKAKU *et al.* 2001).

A complexação de polissacarídeos com metais parece potencializar os efeitos desses polímeros (NOLETO *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2011). Nesse contexto, o vanádio ganha destaque. A esse metal, isoladamente, são atribuídos diversos efeitos biológicos, entre esses a ação mimética à insulina, as atividades antihiperlipidêmica, antihipertensiva, imunomoduladora, antitumoral e como diurético, (EVANGELOUS, 2001; NOLETO *et al.*, 2009; ABDELHAMID *et al.*, 2010, BARRIO, 2010). Alguns estudos sugerem que dentro das células, o metal deposita-se principalmente nas mitocôndrias, onde

altera as funções destas organelas podendo levar a morte celular (AON *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2010).

Xiloglucanas isoladas *Copaifera langsdorffii* (GULLFOT *et al.*, 2009) têm sido alvo de pesquisas que buscam avaliar sua atividade na forma nativa ou modificada por complexação com o metal vanádio (ROSÁRIO *et al.*, 2008; ROSÁRIO *et al.*, 2011; FARIAS, 2012). Farias (2012) demonstrou que o polissacarídeo diminuiu a viabilidade de células B16F10, efeito que segundo a autora foi aparentemente relacionado ao comprometimento do metabolismo energético mitocondrial. Tal efeito foi potencializado quando se utilizou a xiloglucana (XGC) complexada com oxovanádio (XGC:VO). Utilizando células intactas, o estudo demonstrou que XGC estimulou a respiração. Além disso, o complexo foi capaz de modular negativamente a expressão da subunidade β da ATP sintase, outro alvo importante na terapêutica do câncer (CHANG *et al.*, 2007). Embora estes resultados sejam relevantes, uma vez que sugerem que este polissacarídeo e seu complexo com vanádio comprometem a provisão de energia nestas células e, que isto poderia estar relacionado com sua citotoxicidade, são insuficientes para propor os mecanismos moleculares envolvidos. Assim, para investigar o provável mecanismo de ação destes compostos e melhor estabelecer a relação entre os efeitos sobre a bioenergética mitocondrial e a atividade citotóxica descrita por Farias (2012), novos estudos são necessários.

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar os efeitos de xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC) e seu complexo com oxovanádio (XGC:VO) em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e mitocôndrias isoladas de fígado de rato com a finalidade de relacionar sua toxicidade a alterações na bioenergética mitocondrial.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato avaliar os efeitos de xiloglucana de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC), e seu complexo com oxovanádio (XGC:VO) sobre os estados 3 e 4 da respiração, Coeficiente de controle respiratório CCR, razão ADP/O e atividade dos complexos da cadeia respiratória.

Em células de Hepatocarcinoma Humano (HepG2) avaliar os efeitos de XGC e XGC:VO sobre a viabilidade e a proliferação celular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL

Entre o período de 1981 e 2010 foram aprovados no mercado farmacêutico, pelo *Food and Drugs Administration*, 1355 novos fármacos, destes, 48,6% eram provenientes direta ou indiretamente de plantas (NEWMAN & CRAGG, 2012). O Brasil é o país com maior número de espécies vegetais no mundo, até o ano de 2012, 55 mil espécies foram catalogadas (de um total de 350 a 550 mil presentes no mundo) (FONSECA, 2012). Porém, ainda são escassos os estudos que procuram investigar o potencial medicinal dessas plantas (NEWMAN & CRAGG, 2012). Assim, o Brasil é atrativo neste contexto, uma vez que cresce o interesse mundial pelos medicamentos derivados de plantas (OLIVEIRA, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2012).

Em 2008, o mercado de fitoterápicos, apresentou taxa de crescimento anual maior do que o de medicamentos sintéticos (CARVALHO, 2008). Um estudo que avalia a origem de fármacos lançados no mercado até o ano de 2010 demonstra que esse cenário deve manter-se nos próximos anos (NEWMAN & CRAGG, 2012). Em países desenvolvidos como o Canadá, França, Alemanha e Itália, o uso de produtos fitoterápicos era praticado por 70 a 90% da população em 2012 (WHO, 2011; BRASIL; 2012).

Compostos isolados a partir de plantas como, o etoposídeo, paclitaxel, vincristina, vimblastina, entre outros, contribuíram para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos, atualmente muito utilizados na oncologia (SILVA, 2013). Por esses motivos, a investigação farmacológica de plantas medicinais para o tratamento de doenças tem sido considerada prioridade pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Nesse contexto, o Ministério da Saúde do Brasil possui programas, em parceria com órgãos governamentais e particulares, para a elaboração de práticas públicas voltadas ao desenvolvimento desse setor e a inserção de medicamentos obtidos de fontes naturais no Sistema Único de Saúde (SUS) (LORENZONI, 2014).

Entre os compostos de origem vegetal com potencial aplicação na terapêutica, destacam-se os polissacarídeos. Esses polímeros, obtidos de diversas fontes naturais, apresentam importantes atividades biológicas como: antiviral (TALARICO *et al.*, 2004), antibacteriana (XIE *et al.*, 2002), antifúngica (EL-HASAN *et al.*, 2009), antiparasitária (NATHAN, 1985), anticoagulante (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005), leishmanicida (NOLETO *et al.*, 2002; BARROSO *et al.*, 2007), e antitumoral (HASHIMOTO *et al.*, 1983;

OGAWA *et al.*, 1989; PENG *et al.*, 1991; NISHINO *et al.*, 1994; SEFEHRI *et al.*, 1998; YALIN *et al.*, 2005; FARIAS, 2012).

Esses biopolímeros são formados por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas e podem ser representados pela fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, em que n é maior ou igual a 40 e menor ou igual a 3000. Os polissacarídeos são de grande interesse para a indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia, pois apresentam propriedades geleificantes, espessantes e estabilizantes (SUDHAKAR *et al.*, 1996; CLOSS *et al.*, 1999; NISHINARI *et al.*, 2000).

As plantas são ótimas fontes de polissacarídeos, esses podem ser encontrados em exsudatos, sementes, frutos, tubérculos e cascas (CUNHA; PAULA & FEITOSA, 2009). Ao contrário dos compostos sintéticos, a maioria dos polissacarídeos extraídos de plantas não causam efeitos colaterais significativos. Assim, esses polímeros naturais não são considerados tóxicos e são candidatos ideais para o tratamento de doenças (SCHEPETKIN *et al.*, 2006).

Estudos têm demonstrado que polissacarídeos de plantas podem atuar como modificadores da resposta biológica (MRBs) classificando-os como imunomoduladores (BOHN; BeMILLER, 1995; SCHEPETKIN *et al.*, 2006). MRBs podem ser moléculas endógenas, como por exemplo as citocinas ou, podem ser de fonte exógena, derivados de plantas, bactérias e algas e são capazes de aumentar e/ou prolongar a resposta imunológica através de vários mecanismos (TZIANABOS, 2000; LEUNG *et al.*, 2006). Os polissacarídeos imunomoduladores podem atuar com MRBs exógenos ao ligarem-se com receptores de MRBs endógenos (KWOK *et al.*, 2001; KITAJMA, 2000; PONCE *et al.*, 2003; NI *et al.*, 2004; SAIMA *et al.*, 2000), o que pode levar ao aumento da resposta imunológica do hospedeiro ao induzir a produção de mediadores que atuam como moléculas efetoras contra células tumorais. Esse efeito pode resultar, de forma individual, em uma importante resposta antitumoral causada pelo polissacarídeo, ou atividade sinérgica quando usado em conjunto com outros quimioterápicos (ZONG *et al.*, 2012; SILVEIRA, 2010).

No âmbito dos estudos com diversos polissacarídeos visando atividade imunomoduladora, as xiloglucanas se destacam. Em estudo de Rosário e colaboradores (2008 e 2011), os autores demonstraram que xiloglucanas extraídas de *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* e *Mucuna sloanei*, apresentam atividade elicítatória de células para a cavidade peritoneal de camundongos. Além disso, esses polímeros estimulam a produção de óxido nítrico, IL-1 β e TNF- α por macrófagos, células diretamente ligadas com a atividade antitumoral via imunomodulação.

Kumar e Bhattacharya (2008) sugerem a aplicação da xiloglucana das sementes de *T. indica* (tamarindo) na indústria alimentícia, como espessante, estabilizante, agente antimicrobica, inibidor da cristalização, entre outras. Na indústria farmacêutica as xiloglucanas são de interesse devido as suas características mucoadesivas, de biocompatibilidade e biodegradabilidade, podendo ser utilizadas, por exemplo, como veículo de determinadas drogas (PAL *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2012; UCCELLO-BERRATTA *et al.*, 2010). Além disso, xiloglucanas atuam como fibras dietéticas, pois, não são digeridas pelas enzimas presentes no intestino delgado humano, de modo que alcançam o cólon de maneira inalterada, podendo ser fermentadas pelas bactérias intestinais (ONWELUZO *et al.*, 2002). Hensel e Meier (1999) observaram que as xiloglucanas das sementes de *Tropaeolum majus* apresentaram atividade antimutagênica, com inibição dose-dependente de 20-50%, contra o agente mutagênico 1-nitropireno. Assim, os autores sugeriram que xiloglucanas podem ser adicionadas em alimentos com a função de agentes antimutagênicos. Também, xiloglucanas extraídas da parede celular de diversas frutas comerciais e seus oligossacarídeos mostraram efeitos inibitórios no crescimento de células tumorais humanas COLO (KATO *et al.*, 2001).

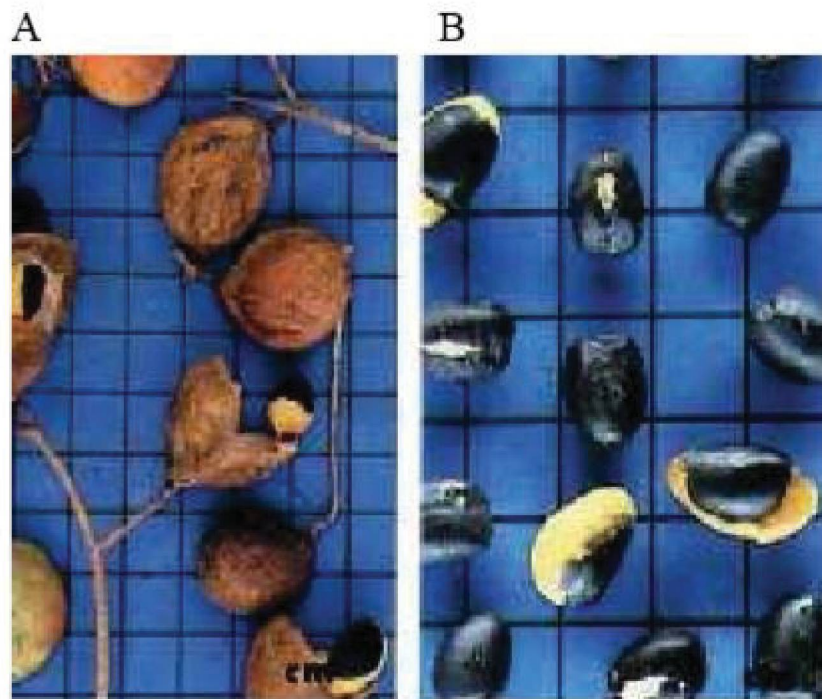
Xiloglucanas de reserva parecem ativar células do sistema imune, pois causam aumento na capacidade fagocítica em monócitos, neutrófilos, bem como em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (SREELEKHA *et al.*, 1993; PAULY, 1999; SILVEIRA, 2010).

2.2.1 Xiloglucanas de *Copaifera langsdorffii*

Como já descrito, as sementes de plantas são importantes fontes de xiloglucanas, entre essas fontes, as sementes do gênero *Copaifera* possuem xiloglucanas de importante aplicação na indústria de alimentos e na obtenção de oligossacarídeos com atividade biológica. (GULLFOT *et al.*, 2009; PICOUT *et al.*, 2003; BURGALASSI *et al.*, 1996; ITOH *et al.*, 2008; PETKOWICZ *et al.*, 2006). As 72 espécies desse gênero, distribuídas em regiões tropicais da América Latina, são comumente conhecidas por “cobaíba, copaibera ou pau d’oleo”. Dessas, 16 espécies são encontradas somente no Brasil, principalmente nos estados do Amazonas, Ceará e Pará. As espécies mais comuns são *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (VEIGA, 2002). Estas árvores são de crescimento lento, crescem em

solos bem drenados e, de maneira geral melhor em solos de matas ciliares do que em solo de cerrado (FREITAS, 2002; VEIGA, 2002). Podem alcançar de 25 a 40 metros de altura e viver até 400 anos. O tronco áspero apresenta coloração escura. Sua madeira é empregada na construção civil, para confecções de artigos esportivos e em ferramentas (LORENZI, 1992; PEDRONI *et al.*, 2002). As folhas podem ser alternadas, pecioladas e penuladas. Suas pequenas flores são apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículos axilares (PIO, 1984). Seus frutos possuem uma semente ovoide envolvida por um arilo abundante e colorido (FIGURA 2), que na época de frutificação é engolido por aves que regurgitam a semente (VEIGA, 2002).

FIGURA 2- FRUTOS E SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* (copaíba). A: Fruto de *Copaifera langsdorffii* (copaíba) e B: Semente de *Copaifera langsdorffii* (copaíba)



FONTE: LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Ed. Plantarum (1992, p.152).

O gênero *Copaifera* possui enorme diversidade de metabólitos secundários, característica que estimula o seu estudo. Pesquisas realizadas com o óleo de copaíberas mostram prevalência da presença de sesquiterpenos e diterpenos (BRAGA *et al.*, 1998). A *C. langsdorffii* pode ser encontrada em todo o território brasileiro e é importante na medicina popular, especialmente na região amazônica. Lemos *et al.*, (2015) verificaram que o extrato

hidroalcoólico de folhas de *C. langsdorffii* apresenta atividade gastroprotetora, pois em modelo animal diminuiu a acidez total do suco gástrico e aumentou a produção de muco.

Com o objetivo de avaliar os efeitos citotóxicos de extratos de espécies de plantas brasileiras contra linhagens de várias células tumorais (B16, HL-60, MCF-7 e HCT-8), JÚNIOR *et al.*, (2010), demonstraram que extratos de *Copaifera langsdorffii* inibiam a proliferação destas células.

O tronco desta espécie fornece o óleo de copaíba, rico em terpenos, extraído mediante uma pequena incisão a cerca de um metro de altura de seu tronco. Após purificação, este óleo torna-se transparente e possui diversas aplicações biológicas, sendo utilizado como anti-inflamatório, analgésico e anti-infeccioso no tratamento de dores de garganta, infecção urinária e pulmonar, proteção gástrica, cicatrização de feridas cutâneas, atividade antimicrobiana (PAIVA, 2009; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; BASILE, 1988; FERNANDES, 1992), atividade hipotensiva, contraceptiva, anti-reumática, anti-espasmódica e laxativa (BRITO *et al.*, 2010). Além disso, apresentou atividade antitumoral contra carcinoma de IMC em camundongos (OHSAKI *et al.*, 1994; COSTA, 2015).

Copaifera langsdorffii apresenta alto potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos. Existem mais de 200 trabalhos científicos publicados envolvendo *Copaifera langsdorffii*, porém, esses estudos estão relacionados ao óleo que é exsudado do tronco desta árvore e pouco se conhece sobre as atividades de outros elementos como os polissacarídeos de suas sementes (FURTADO, 2013).

Como já descrito, os polissacarídeos apresentam estruturas que possibilitam que estes se complexem com diferentes metais. Estudos demonstram que as xiloglucanas de semente de *Copaifera langsdorffii*, constituídas de D-glucose, D-xilose e D-galactose em proporção de 2,5:1,5:1,0 e massa molar de $1,6 \times 10^5$ g/mol (ROSÁRIO *et al.*, 2008), diminuíram a viabilidade das células melanoma murino B16F10. Além do polissacarídeo na forma nativa, o estudo avaliou a forma complexada com vanádio que apresentou um importante efeito citotóxico, possivelmente potencializado pela presença do metal (FARIAS, 2012).

2.3 VANÁDIO E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Metais e componentes metálicos têm destaque na medicina devido as suas atividades biológicas e vêm sendo utilizados no tratamento de várias doenças, como exemplos: compostos de antimônio apresentam atividade antiprotozoária e são utilizados no tratamento das leishmanioses, o metal bismuto, quando na forma de sal, tem ação antiúlcera por inibir o

crescimento da bactéria *Helicobacter pylori*, o ferro é utilizado no tratamento dos efeitos secundários da malária, além disso, quando em excesso, é extremamente tóxico para o parasita causador dessa enfermidade - *Plasmodium* -, a prata tem atividade antimicrobiana pois interage com a membrana celular dos microrganismos, causando danos na respiração celular e, no interior destas células, interagem com o DNA levando a sua desnaturação e impedindo a divisão celular, a platina apresenta ação antitumoral por atuar na inibição da síntese e reparo do DNA da célula tumoral (DESOIZE, 2004; NETO *et al.*, 2008). Além disso, alguns metais têm efeito sinérgico com outras drogas já utilizadas em terapias contra o câncer. Particularmente em relação à atividade antitumoral, vários metais são investigados, compostos a base de rutênio, cobre, titânio, estanho e vanádio têm sido relatados como promissores para o tratamento do câncer (DESOIZE, 2004; MESHKINI, 2010).

O vanádio é um metal de transição pertencente ao grupo 5d da tabela periódica, possui massa atômica de 51u e número atômico 23 e em condições ambiente é encontrado no estado sólido (EVANGELOUS, 2001). Apresenta diversos estados de oxidação, com colorações e atividades singulares. Este metal é encontrado em uma diversidade de minerais, como a magnetita e é empregado em ligas metálicas. Na natureza, é um elemento traço essencial para alguns seres vivos e está presente em alimentos como óleos, frutas, espinafre, ostras, peixes, mariscos, fígado, pimenta preta e salsa (RAY, 2006). A deficiência de vanádio em espécies como galinhas e ratos resulta em reprodução deficiente (SCHWARZK, 1971), porém, sua função em sistemas biológicos ainda não está totalmente esclarecida (EVANGELOUS, 2001; RAY, 2006; MESHKINI, 2010). Acredita-se que o vanádio seja capaz de participar de processos biológicos após conjugação com as proteínas albumina e transferrina. No sangue a forma de vanadato (V^{+5}), é reduzido a vanadil (V^{+4}) pela glutatona dos eritrócitos ou por ácido ascórbico e outros compostos redutores do plasma. Em seguida, é transportado ligado a albumina e transferrina e, nas células predomina a forma de V^{+5} , devido ao pH neutro. O V^{+5} entra nas células através do transporte de íons, então V^{+5} se reduz a V^{+4} pela glutatona celular (HANSEN, 1982; SABBIONI, 1993; BARAN, 2000; CRUZ, 2002; BISHAYEE, 2010). Devido a sua capacidade de interagir com biomoléculas, os efeitos biológicos do vanádio têm sido extensivamente estudados. Entre esses, destacam-se o aumento da oxidação da glucose e síntese de glicogênio no fígado, mimetizando a ação da insulina; atividades antihipertensiva, antihiperlipidêmica, antiobesidade, leishmanicida, como diurético e modulador do sistema imune (EVANGELOUS, 2001; NOLETO, 2002; ABDELHAMID, 2010, BARRIO, 2010).

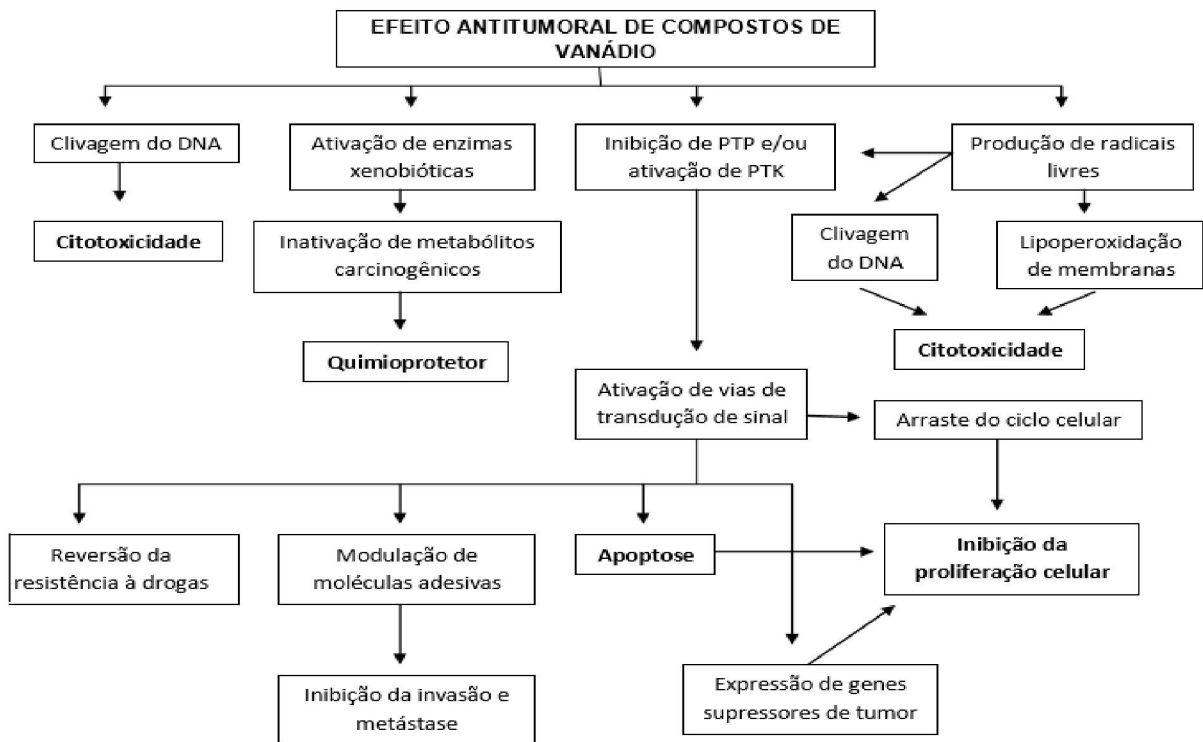
Todos os compostos de vanádio são considerados tóxicos em altas concentrações, sendo que esses efeitos estão relacionados com o estado de oxidação do metal, dose, via e

tempo de administração, porém, não há evidências de que esse metal possa ser classificado como agente carcinogênico. Uma série de compostos de vanádio complexados com ligantes, foram sintetizados com o objetivo de oferecer uma melhor tolerância à toxicidade do metal, além disso, a complexação potencializa seu efeito antitumoral e o torna mais seletivo para células neoplásicas (EVANGELOUS, 2001; ASSEM, 2009). A atividade antitumoral do vanádio foi descrita em 1965 e tem sido amplamente investigada. Sabe-se que esse metal apresenta atividade antitumoral contra diversos tipos de câncer, como: colo de útero (FANECA, 2009), tireoide (GONÇALVES, 2011), mama (RAY, 2006), fígado, ovário, rins, pulmão (BISHAYEE, 2010) e ósseos (LEÓN, 2014; EVANGELOUS, 2001).

Um agente antineoplásico deve exercer sobre as células tumorais um efeito antiproliferativo, deve reduzir a metástase, atuar como citostático ou citotóxico e não induzir resistência celular. Compostos de vanádio possuem todas essas propriedades, exercidas em conjunto ou de forma independente através de vários mecanismos (EVANGELOUS, 2001). A FIGURA 3 exemplifica os mecanismos pelos quais o vanádio atua como um agente antitumoral.

O vanádio parece exercer seu efeito antitumoral através de inibição de tirosina fosfatases e/ ou ativação de quinases, consequentemente, ativando vias de transdução de sinais que levam a apoptose e/ou ativam genes supressores de tumor. Os efeitos antiproliferativos de compostos de vanádio parecem estar principalmente relacionados com a parada do ciclo celular mediado por inibição de fosfatases pelo metal, impedindo assim, a mitose das células tumorais e por ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos que induzem a transcrição do fator nuclear NF- κ B envolvido no processo de apoptose (MORINVILLE, 1998; EVANGELOUS, 2001). Ainda, compostos de vanádio, em diferentes estados de oxidação, causam danos ao DNA. Quando o metal se encontra nos estados de oxidação III e V pode ser carcinogênico, porém, só a forma IV causa quebra de DNA de dupla fita (RODRIGUEZ *et al.*, 2011; LÉON, 2014). O metal e seus compostos aumentam os níveis de radicais livres em sistemas biológicos, evento ligado a clivagem do DNA, principalmente mediado por radicais hidroxil (EVANGELOUS, 2001; CUESTA, 2011). Estudos descrevem os efeitos de lipoperoxidação da membrana plasmática e parada de ciclo celular (EVANGELOUS, 2001; HOSSEINI, 2013). Compostos de vanádio podem inibir a indução de moléculas de adesão, atuando como agentes antimetastáticos (FANECA, 2009).

FIGURA 3 – MECANISMOS RELACIONADOS A AÇÃO ANTITUMORAL DO METAL VANÁDIO



FONTE: EVANGELOUS (2001), adaptado.

NOTA: PTP: proteínas tirosina fosforilases; PTK: proteínas tirosina quinase.

Um importante efeito adicional do vanádio é o seu papel como quimiopreventivo contra a carcinogênese quimicamente induzida. Isso ocorre devido à inativação de metabólitos carcinogênicos derivados de xenobióticos, e também por aumentar a capacidade antioxidante dos órgãos alvos de agentes carcinogênicos, agindo principalmente na fase de iniciação e promoção da carcinogênese (ABDELHAMID, 2010; EVANGELOUS, 2001). Compostos de vanádio são capazes de impedir o crescimento tumoral em animais portadores de carcinoma mamário (RAY, 2005; RAY, 2006) e câncer de colo de útero (KANNA, 2005).

Quando complexado com compostos orgânicos, o vanádio se torna mais lipofílico, sua absorção gastrointestinal aumenta e, conseqüentemente, diminui-se a dose necessária para produzir efeitos biológicos de interesse, assim esse metal se torna menos tóxico (McNEIL, 1992; THOMPSON 2003; ZHAO *et al.*, 2010). Açúcares têm a propriedade de reduzir o vanádio (V) a oxovanádio (VO^{2+}), formando complexos com este cátion (BARAN, 2009). Assim, complexos de carboidrato com vanádio são importantes para a farmacologia, uma vez que o carboidrato pode atuar como carreador do metal (JUNGWIRTH, 2011). Para esses complexos é descrito o efeito inibitório na atividade da fosfatase alcalina, mimético da

insulina, de redução da proliferação de osteoblastos tumorais (BARAN, 2009) e células HeLa (NOLETO *et al.*, 2009). Quando complexado com xiloglucanas de semente de *Copaifera Langsdorffii*, o complexo reduziu a viabilidade, a proliferação e a respiração de células B16F10 (FARIAS, 2012).

Estudos *in vivo* demonstram que as mitocôndrias são importantes alvos do vanádio (FRANCO, 2009; SOARES, 2007). Recentemente, tem sido sugerido que uma das razões para a toxicidade hepática do vanádio poderia ser o comprometimento das mitocôndrias dos hepatócitos (ZHAO *et al.*, 2010). Porém, os mecanismos bioquímicos envolvidos nos danos mitocondriais induzidos por vanádio ainda não foram totalmente esclarecidos. Zhao *et al.*, (2010), observaram em mitocôndrias isoladas de fígado de rato que compostos de vanádio com diferentes substâncias orgânicas atuam de diferentes formas sobre a organela, dependendo da característica do ligante. Em sua maioria, compostos de vanádio iniciam a apoptose através da indução do estresse oxidativo nas mitocôndrias, resultando na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) e consequente liberação do citocromo C, evento que relacionado ao início da apoptose (ZHAO *et al.*, 2010).

2.4 BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

No ano de 1960, estudos comprovaram que as mitocôndrias são responsáveis pela respiração celular e a fosforilação oxidativa. Posteriormente, o ATP, gerado no final desse processo, foi reconhecido como a molécula de suprimento energético e sua produção foi relacionada com o consumo de oxigênio. Cerca de dez anos depois dessas descobertas, estudos realizados em mitocôndrias isoladas permitiram o detalhamento do maquinário mitocondrial envolvido na produção de ATP, tais como enzimas e substratos. Essas organelas, encontradas em quase todas as células eucarióticas, foram, então, consideradas fonte de energi celular por serem responsáveis pelo acúmulo de energia na forma de ATP. Além disso, as mitocôndrias desempenham outras funções como, a regulação osmótica, modulação do estado redox, controle de pH, regulação da apoptose, metabolismo de xenobióticos e lipídeos e homeostase do Ca^{+2} (SCHON, 2003).

A arquitetura da mitocôndria é fundamental para o funcionamento dessa organela. De maneira geral, sua estrutura consiste em duas membranas, com características distintas, separadas por um espaço intermembranas, que reveste o espaço interno denominado matriz mitocondrial (SCHON, 2003; WHITAKER, 2016; HOSSEINI, 2013; WEN 2013).

Na matriz mitocondrial, estão presentes diferentes enzimas envolvidas em processos metabólicos como as do ciclo do ácido cítrico e da beta oxidação de ácidos graxos. A membrana externa (MME), é permeável a íons e a maioria dos metabólitos, apresenta muitos canais aniônicos dependentes de voltagem (VDAC), os quais são permeáveis a solutos de peso molecular inferior a 10 kDa. Já a membrana interna (MMI), dobrada em inúmeras cristas, é impermeável a íons e a maioria das pequenas moléculas, além disso, essa membrana contém proteínas com três tipos de função: proteínas transportadoras específicas que regulam a passagem de metabólitos, proteínas do complexo enzimático denominado F_1F_0 ATP sintase, responsável pela liberação de ATP e proteínas da cadeia respiratória, organizadas nos complexos (I, II, III e IV), que transferem elétrons provenientes do NADH e $FADH_2$ para o oxigênio. Durante o transporte de elétrons, ocorre bombeamento de prótons pelos complexos I, III e IV, criando um gradiente eletroquímico entre o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial. Os prótons bombeados para o espaço intermembranas retornam à matriz mitocondrial pela F_1F_0 ATP sintase, sendo que esse processo gera energia suficiente para a liberação de ATP (KROEMER; REED, 2000; SCHON, 2003).

Atualmente, as mitocôndrias são consideradas potenciais alvos de terapias contra doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e metabólicas como o câncer (GOGVADZE *et al.*, 2008; LOUREIRO *et al.*, 2013; WHITAKER *et al.*, 2016). Sabe-se que estas organelas desempenham um papel chave nos mecanismos de morte celular e, ainda, são importantes no metabolismo energético de diversas linhagens tumorais. Em algumas linhagens resistentes a quimioterapia, por exemplo, a proteína desacopladora (UCP_2) é superexpressa, tornando essas células incapazes de produzir ATP pela fosforilação oxidativa, reproduzindo o “efeito Warburg”, no qual as células tumorais utilizam preferencialmente a glicólise anaeróbica para produção de energia, em detrimento da fosforilação oxidativa. A ocorrência de apoptose nestas células também pode estar diminuída e estas passam a se proliferar sem controle (PEREIRA *et al.*, 2012).

As células animais utilizam mais de 90% da energia proveniente da fosforilação oxidativa associada com a membrana mitocondrial interna (MITCHELL, 1961). Assim, a exposição desta organela a compostos que têm a capacidade de interagir com as membranas mitocondriais pode comprometer a eficiência do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa, levando a morte celular por apoptose (AON *et al.*, 2009). Nesse contexto, estas organelas constituem um excelente modelo experimental para avaliar a toxicidade de um composto ou até mesmo esclarecer seu mecanismo de ação.

2.5 HEPATOCARCINOMA HUMANO

O hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular (CHC), é uma neoplasia epitelial derivada das principais células do fígado – os hepatócitos, classificando assim o CHC como câncer primário do fígado (KUMAR, 2005). Segundo a OMS, o CHC é a quinta forma mais comum de câncer em todo o mundo, a cada ano surgem cerca de meio milhão de novos casos. Além disso, o hepatocarcinoma é o terceiro tipo de câncer que mais causa mortes e ocorre em frequência três vezes maior em homens do que em mulheres. Tem maior incidência na região da Ásia, Japão e África, devido a relação com a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV), frequente nessa população. Apesar de não estar entre os dez tipos de câncer mais prevalentes no Brasil, o CHC tem alta mortalidade, acarretando custos elevados para o Sistema Único de Saúde (MASSABKI, 2010).

Os fatores de risco para o CHC são as hepatopatias crônicas causadas por infecções pelos vírus da hepatite B, C e D, as hepatopatias hereditárias, obesidade, hepatite autoimune, diabetes do tipo II, uso abusivo de esteroides, tabaco e álcool, além de toxinas como a aflotoxina, que participa ativamente da carcinogênese desse tumor (BAFFY, 2012; MASSABKI, 2010; ASSINM, 2011; YUEN 2009).

Quanto aos eventos moleculares que desencadeiam o CHC, é conhecido que esse tumor relaciona-se com doenças que interferem na síntese de DNA dos hepatócitos, surgindo quando ocorre mutação nos genes dessas células, que, por sua vez, se multiplicam desordenadamente (BRECHOT, 1998; MASSABKI, 2010).

O CHC é muito agressivo, com alto índice de óbito após o início dos sintomas, mais comumente icterícia e/ou ascite. Quando diagnosticado na fase sintomática, o paciente sem tratamento tem vida média inferior a um mês. A grande maioria dos pacientes portadores de CHC é diagnosticada nessa fase e os tratamentos disponíveis são limitados e pouco eficazes. Os tratamentos atuais incluem cirurgia de ressecção e transplante do órgão, além de quimioterapia e radioterapia, que são citotóxicos e pouco específicos, agredindo tanto células tumorais quanto células saudáveis (SORIANO *et al.*, 2016). Portanto, a busca por novos agentes contra este tipo de tumor é objeto de pesquisas em todo o mundo (WU *et al.*, 2014).

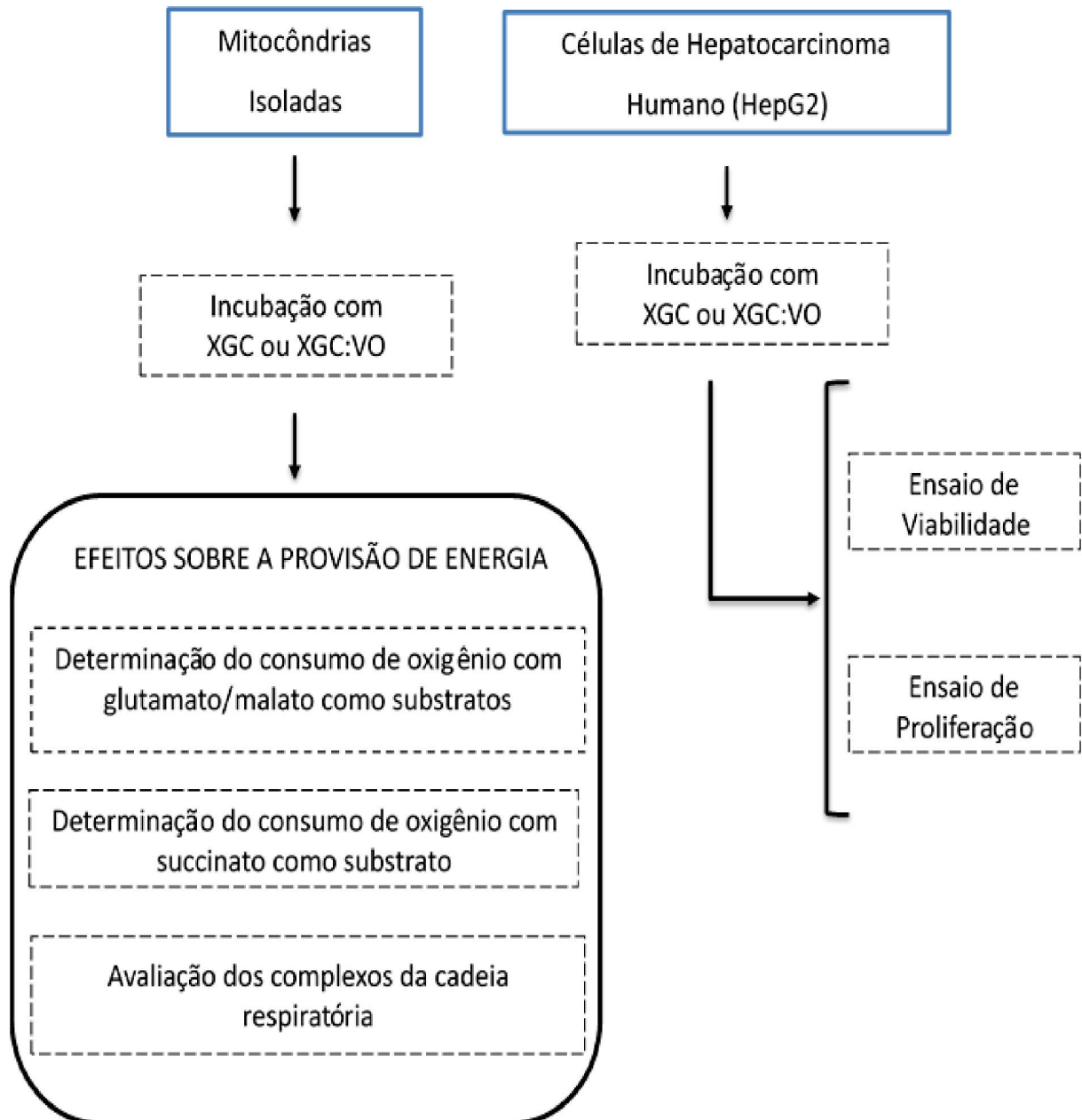
Entre as abordagens para o desenvolvimento de uma terapia antitumoral, destacam-se os modelos de células em cultura. Vários estudos utilizam-se desse modelo para esclarecer a ação de potenciais compostos antitumorais. Wu *et al.*, (2014), por exemplo, demonstraram que sais de vanádio peroxidados são potenciais agentes no tratamento do CHC pois o ortovanadato de sódio, em células de hepatocarcinoma humano (HepG2, Hep3B e SK-Hep-1),

suprimiu a proliferação, induziu a parada do ciclo celular, causou apoptose por diminuir o potencial de membrana mitocondrial e, provocou a autofagia nessas células.

Dentre as células de hepatocarcinoma humano mantidas em cultura, a linhagem HepG2 é muito utilizada por possuir grande quantidade de mitocôndrias e, conseqüentemente, DNA mitocondrial, crescerem em monocamadas aderentes ao plástico e serem facilmente visualizadas por microscópio confocal. Também são consideradas um ótimo modelo para investigar os efeitos tóxicos de compostos sobre as funções celulares e mitocondriais (PINTI *et al.*, 2003).

3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL DO ESTUDO



FONTE: O autor (2016).

4 METODOLOGIA

4.1 SOLUÇÕES DE XILOGLUCANA DE *Copaifera langsdorffii* (XGC) E SEU COMPLEXO XGC:VO

Para a realização deste estudo foi utilizado um polímero de reserva de xiloglucana de *Copaifera langsdorffii*, isolada e cedida pela Professora Dr.^a Carmem Lucia de Oliveira Petkowicz do grupo de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. O complexo desta xiloglucana com oxovanádio (IV/V) denominado XGC:VO foi preparado pelas professoras Dr.^a Guilhermina R. Noletto, Dr.^a Ana Lucia R. Mercê do Departamento de Química da UFPR e Dr.^a Carmem Lúcia de Oliveira Petkowicz.

A solução estoque de xiloglucana (XGC) foi preparada em PBS, pH 7,4, na concentração de 1 mg/mL e posteriormente esterilizada em autoclave a 120 °C, durante 30 minutos. A solução estoque de xiloglucana complexada (XGC:VO) foi preparada em água ultrapura na concentração de 1 mg/mL e posteriormente esterilizada por filtração em membrana de celulose com poros de 0,22 µm. Após esterilização, a concentração de carboidratos totais nas soluções foi determinada pelo método fenol-ácido sulfúrico, conforme metodologia descrita por Duboi *et al* (1956) e de uso de rotina no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais.

4.2 ANÁLISES DOS EFEITOS DA XGC E XGC:VO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

4.2.1 Animais

Para o isolamento das mitocôndrias de fígado, foram utilizados ratos albinos, da linhagem Wistar, machos, pesando entre 200 a 300 g, mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas permitindo-se água à vontade. Antes de seu início, o projeto foi avaliado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), obtendo o certificado CEUA N° 691. Para realizar de forma correta e segura os procedimentos experimentais, foi realizado o curso de treinamento teórico de manipulação de animais, ofertado pelo Setor de Ciências Biológicas (Anexo I).

4.2.2 Isolamento de mitocôndrias

As mitocôndrias de fígado foram isoladas como descrito por Voss *et al* (1961), com algumas modificações. O meio de extração utilizado era constituído de: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, Hepes 10 mmol.L⁻¹, EGTA 1 mmol.L⁻¹, pH 7,4 e BSA 0,1 g%. Após eutanásia do animal por decapitação, o fígado foi imediatamente removido e imerso no meio de extração a 4°C. Após lavagem, o fígado foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador van Potter Elvehjen, usando-se sucessivamente pistilos frouxo e normal. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 320 x g a 4°C em centrífuga Hitachi, modelo Himac CR21E, durante 5 minutos, para eliminação de fragmentos celulares. Desprezando-se o sedimento, o sobrenadante foi centrifugado a 12.600 x g, durante 10 minutos, a 4°C. O sedimento obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspensão e lavado duas vezes em meio de extração por centrifugação a 8.100 x g, durante 10 minutos, 4°C. As mitocôndrias obtidas foram ressuspensas em meio de extração. As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Lowry *et al.*, (1951) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As leituras foram realizadas a 700 nm em espectrofotômetro.

4.2.3 Determinação do consumo de oxigênio, cálculo do coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O em mitocôndrias isoladas

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias intactas foi monitorado polarograficamente com eletrodo de oxigênio tipo Clark, em oxígrafo OROBOROS – 2K, sob agitação, em câmara fechada termostalizada, a temperatura de 28°C. O sistema de reação foi constituído de: D-Manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol.L⁻¹, EGTA 1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%, suplementado com K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹, ADP 0,2 mmol.L⁻¹ para glutamato de sódio 2 mmol.L⁻¹ e malato de sódio 0,2 mmol.L⁻¹, ou, suplementado com K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹, ADP 0,08 mmol.L⁻¹, rotenona 10 µmol.L⁻¹ para succinato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹. Para cada experimento foi utilizada a quantidade de mitocôndria correspondente a concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ para glutamato/malato ou 1,0 mg.mL⁻¹ para succinato. Para o experimento em mitocôndrias desacopladas, o sistema de reação era constituído dos mesmos reagentes usados no sistema para o substrato glutamato/malato, porém, na presença de FCCP (0,5 µM) e na ausência de ADP. A estes sistema de reação contendo as mitocôndrias foram adicionados a XGC ou seu complexo XGC:VO nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10 e 25 µg.mL⁻¹ e incubados por 3 minutos. As velocidades respiratórias foram expressas com % do

controle, considerando o fluxo de oxigênio ($\mu\text{mol de O}_2 \text{ consumido. min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína) considerando-se que a solubilidade do O_2 na água, a 28°C e 1 atm é de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (ESTABROOK, 1967). A relação ADP/O foi determinada como descrito por CHANCE & WILLIAMS (1955), relacionando o número de moléculas de ADP fosforiladas por átomo de oxigênio consumido, durante o estado 3 da respiração (NICHOLLS, FERGUSON, 2002). 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). Como controles foram utilizadas mitocôndrias respirando somente com meio de reação e substratos da cadeia respiratória.

4.2.4 Obtenção de mitocôndrias rompidas para avaliação da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória

Mitocôndrias de fígado de rato, isoladas como descrito no item 4.2.3, foram congeladas em freezer -80°C , até o momento de sua utilização. As organelas foram rompidas por 4 ciclos de congelamento a -180°C em nitrogênio líquido e descongelamento. Os fragmentos de membrana assim obtidos foram utilizados para a avaliação da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória.

4.2.5 Determinação da atividade enzimática dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória

Para determinar a atividade das enzimas ligadas à cadeia respiratória foram utilizadas preparações de mitocôndrias rompidas como descrito no item 4.2.4.

4.2.5.1 NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido Redutase)

A atividade do complexo NADH oxidase foi determinada através do consumo de O_2 segundo método descrito por SINGER (1974). O sistema de reação, à temperatura de 28°C , em volume final de 2 mL, era constituído de: tampão fosfato 80 mmol.L^{-1} , pH 7,4, EDTA $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, NADH $0,17 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg}$ de proteína mitocondrial. Os resultados foram expressos em fluxo de oxigênio ($\mu\text{mol de O}_2 \text{ consumido. min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial).

4.2.5.2 Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio óxido Redutase)

A atividade do complexo succinato oxidase foi determinada através do consumo de O_2 segundo método descrito por SINGER (1974). O sistema de reação, em volume final de 2 mL, foi constituído de tampão fosfato 80 mmol.L^{-1} , pH 7,4, rotenona $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, succinato de sódio 10 mmol.L^{-1} e 0,5 mg de proteína mitocondrial. A reação ocorreu a 28°C e foi iniciada pela adição do substrato oxidável. Os resultados foram expressos em fluxo de oxigênio (μmol de O_2 consumido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial) (ESTABROOK, 1967).

4.2.5.3 Desidrogenase Succínica (Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido Redutase)

A atividade da desidrogenase succínica foi determinada pelo método de SINGER (1974), utilizando-se DPIP e PMS como aceptores artificiais de elétrons. O sistema de reação em volume final de 1 mL continha tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} , pH 7,4, succinato de sódio 20 mmol.L^{-1} , NaCN 1 mmol.L^{-1} , EDTA 2 mmol.L^{-1} e $100 \text{ } \mu\text{g}$ de proteína mitocondrial. A mistura foi incubada por 10 minutos a 28°C , e a reação iniciada pela adição de DPIP $300 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e PMS 1 mmol.L^{-1} . A velocidade de redução do DPIP foi monitorada a 600 nm e os resultados foram expressos em nmol de DPIP reduzido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $19.100 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para o DPIP reduzido (SINGER, 1974).

4.3 ANÁLISES DOS EFEITOS DA XGC E XGC:VO EM CÉLULAS HepG2

Foram utilizadas células de hepatocarcinoma humano (HepG2) provenientes da American Type Culture Collection, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCR. Estas células crescem em monocamadas, de natureza epitelial e apresentam ciclo celular com tempo médio de 20 horas.

4.3.1 Meio de cultura e Soluções

4.3.1.1 Meio de cultura para as células HepG2

Para o cultivo de células HepG2 foi utilizado o meio essencial mínimo de Dulbecco (DMEM) com alta concentração de glucose, disponível em forma de pó reconstituível. Após dissolução em água ultrapurificada, o meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22

µm e armazenado sob refrigeração. Para o crescimento das células este meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v), penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL, HEPES 20 mmol.L⁻¹ e bicarbonato de sódio 0,8 mM para ajustar o pH em 7,4.

4.3.1.2 Solução salina fosfato tamponada (PBS)

A solução salina tamponada (PBS) foi preparada em forma de solução estoque cinco vezes concentrada, sendo constituída nesta condição de: Na₂HPO₄ 40,5 mol.L⁻¹, NaCl 680 mol.L⁻¹, KH₂PO₄ 7,3 mol.L⁻¹. O pH foi ajustado para 7,4 e o volume completado para 1 litro em balão volumétrico. A solução foi então autoclavada a 120°C, 1 atm, por 40 minutos para posterior armazenagem em frasco estéril mantido sob refrigeração.

4.3.1.3 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) foi constituída da mistura de duas soluções (A e B), as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 20x) e armazenadas a 4°C. A solução A foi composta de NaCl, 2,73 M, KCl, 107 mM, CaCl₂ 25 mM MgSO₄. H₂O 27 M. A solução B foi composta por Na₂HPO₄ 8,5 mM glucose 111 mM. Essas soluções foram preparadas em água ultrapura em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. Na utilização do HBSS, as soluções A e B foram misturadas (1:1), posteriormente diluídas com água ultrapura e o pH foi ajustado para 7,4. A solução salina balanceada foi esterilizada por filtração em membranas estéreis com poros de 0,22 µm em câmara de fluxo laminar.

4.3.1.4 Solução de tripsina-EDTA

A solução tripsina-EDTA, uma solução dispersante de células preparada com a finalidade de descolar as células HepG2 das garrafas de cultura, foi constituída de: NaCl 137 mmol.L⁻¹, KCl 5,4 mmol.L⁻¹, glucose 5 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 0,42 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 0,44 mmol.L⁻¹, NaHCO₃ 2,3 mmol.L⁻¹, EDTA 0,53 mmol.L⁻¹, 0,05 % (m/v) tripsina (1:250) e 0,002 % (m/v) de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio. A esterilização da solução foi feita por filtração.

4.3.2 Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[45-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) de acordo com MOSMANN (1983). Segundo a

metodologia, as desidrogenases mitocondriais de células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em DMSO que absorvem um comprimento de onda de 550 nm.

As células HepG2 foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços e deixadas em estufa para a adesão a 37 °C, em atmosfera de CO₂ 5% por 24 h. Após aderência foram adicionadas soluções de XGC ou XGC:VO diluídos em meio de cultura nas concentrações de 25, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, seguido de incubação por 24 horas, 48 horas e 72 horas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ 5%. Após a incubação, o meio foi retirado e substituído por HBSS acrescido de solução de MTT (5 mg.mL^{-1} em HBSS), obtendo-se uma concentração final de 0,5 mg.mL^{-1} . As células foram então incubadas por 3 horas a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂ e, após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e DMSO adicionado para dissolução dos cristais de formazan. A absorbância das amostras foi medida em leitor de microplacas, e foi utilizado para leitura de comprimento de onda de 550 nm, utilizando DMSO como branco e os resultados foram expressos como % de viabilidade em relação ao controle (100%)

4.3.3 Ensaio de Proliferação Celular

A proliferação celular foi determinada pelo ensaio do cristal violeta (KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989) que baseia-se no fato de que somente as células viáveis permanecem aderidas à superfície de cultivo. Após fixação das células, é adicionado o corante cristal violeta que, por sua vez, se liga ao DNA celular. O corante então é eluído e a viabilidade celular é avaliada espectrofotometricamente em leitor de microplacas em um comprimento de onda de 550 nm. As células HepG2 foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços e deixadas por 24 horas em estufa à 37°C em 5% de CO₂ para aderirem. O meio de cultura foi, então, substituído por meio novo contendo o polissacarídeo ou o complexo diluído em meio nas concentrações de 25, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Como controle negativo, as células foram incubadas somente com meio de cultura. O tempo de tratamento utilizado foi de 24, 48 e 72 horas. Após o tempo de tratamento o meio foi aspirando e os poços foram lavados com PBS e então fixados com metanol (100%). Após fixação com metanol foi adicionado o corante cristal violeta. Após lavagem das placas com PBS e eluição do corante com citrato de sódio, foi realizada a leitura da absorbância em 550 nm em leitor de microplacas.

4.4 Análise estatística dos dados experimentais

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (média \pm dp), seguindo-se análise de variância e teste de Tukey e para comparação dos valores. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

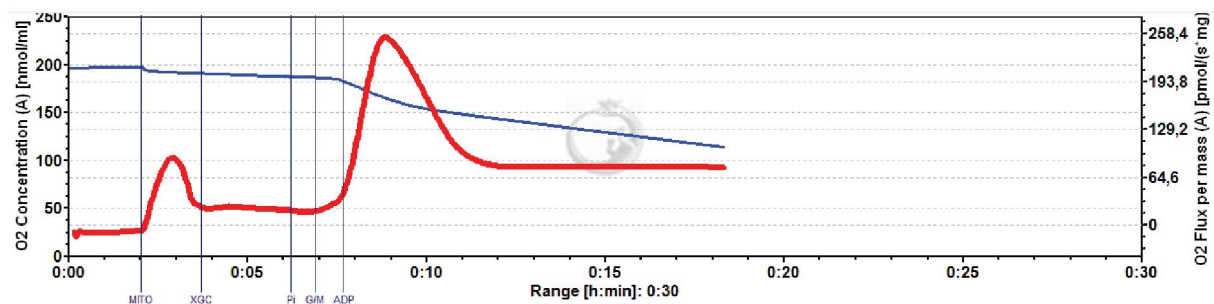
5.1 EFEITOS DA XGC E XGC:VO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

5.1.1 Mitocôndrias intactas - medidas de parâmetros respiratórios

Para verificar os efeitos de XGC e XGC:VO sobre a respiração mitocondrial, foram realizadas análises polarográficas dos efeitos destes compostos sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato (FIGURA 5), avaliando-se os seguintes parâmetros: consumo de oxigênio na presença de ADP (estado 3 da respiração), consumo de oxigênio após a exaustão de ADP (estado 4 da respiração), coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O.

Na FIGURA 5 estão representados os efeitos da XGC e XGC:VO sobre o consumo de oxigênio durante o estado 3 da respiração. Pode-se observar que a XGC em sua forma nativa, não alterou o consumo de oxigênio na presença de ADP, quando foram utilizados glutamato/malato ou succinato como substratos oxidáveis. No entanto, o complexo XGC:VO reduziu a velocidade do consumo de oxigênio em ~13%, independentemente da concentração utilizada, somente quando o glutamato/malato foram os substratos oxidáveis. Com base nestes resultados é possível sugerir que o efeito inibitório observado sobre o estado 3 está associado a presença do metal e ocorre somente quando os elétrons são provenientes do NADH, oxidado no Complexo I da cadeia respiratória.

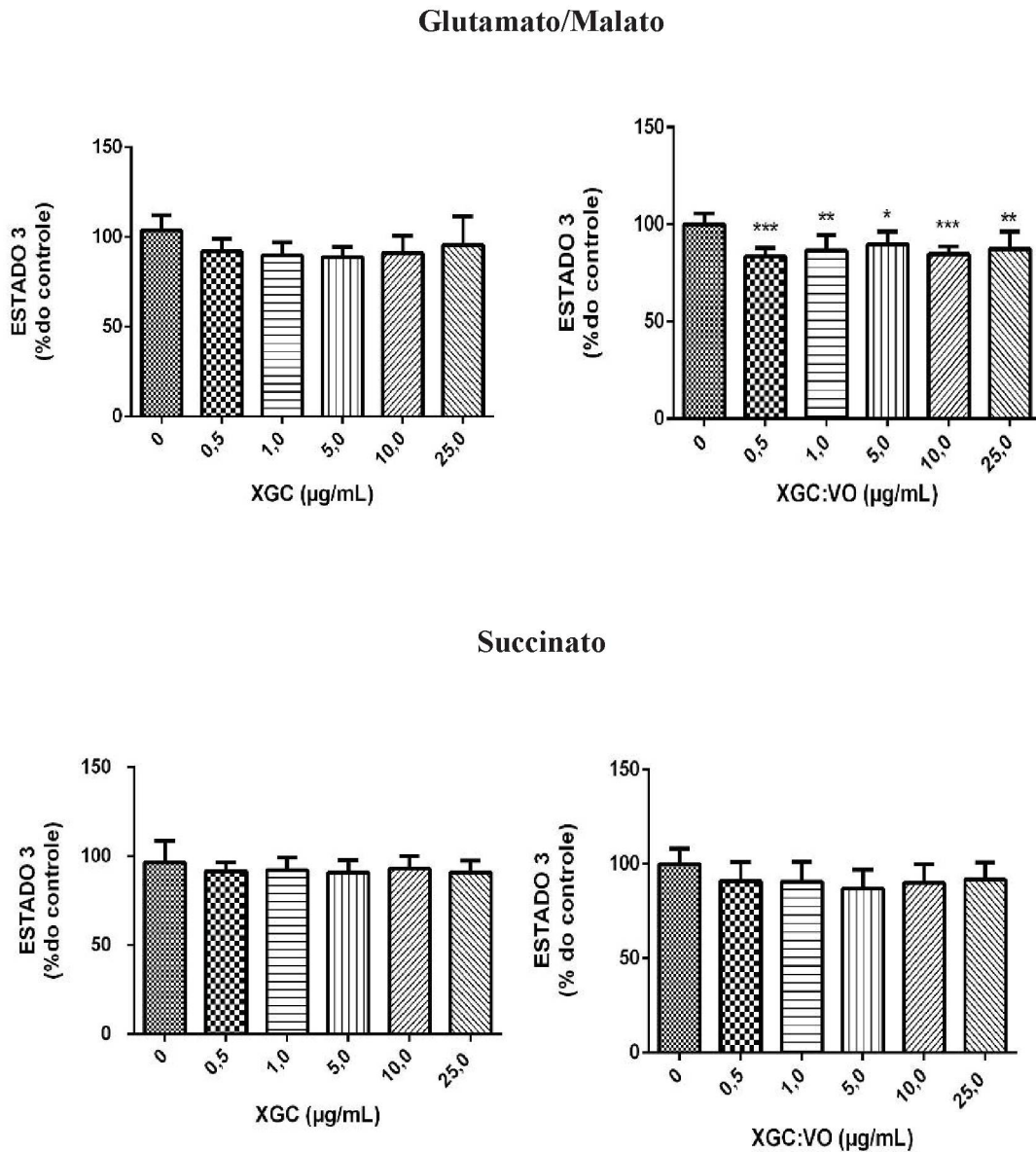
FIGURA 5 - TRAÇADO DEMONSTRATIVO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO POR MITOCÔNDRIAS INTACTAS



FONTE: O autor (2014).

Nota: O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias intactas foi monitorado polarograficamente com eletrodo de oxigênio tipo Clark, em oxígrafo OROBOROS – 2K, sob agitação, em câmara fechada termostatzada, a temperatura de 28°C. O sistema de reação foi constituído de: D-Manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol.L⁻¹, EGTA 1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%, suplementado com K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹, ADP 0,2 mmol.L⁻¹ para glutamato de sódio 2 mmol.L⁻¹ e malato de sódio 0,2 mmol.L⁻¹. Assim, foi possível determinar o estado 3 da respiração (consumo de oxigênio na presença de ADP), o estado 4 da respiração (consumo de oxigênio após a exaustão de ADP) e o coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O.

FIGURA 6 - EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE O ESTADO 3 DA RESPIRAÇÃO



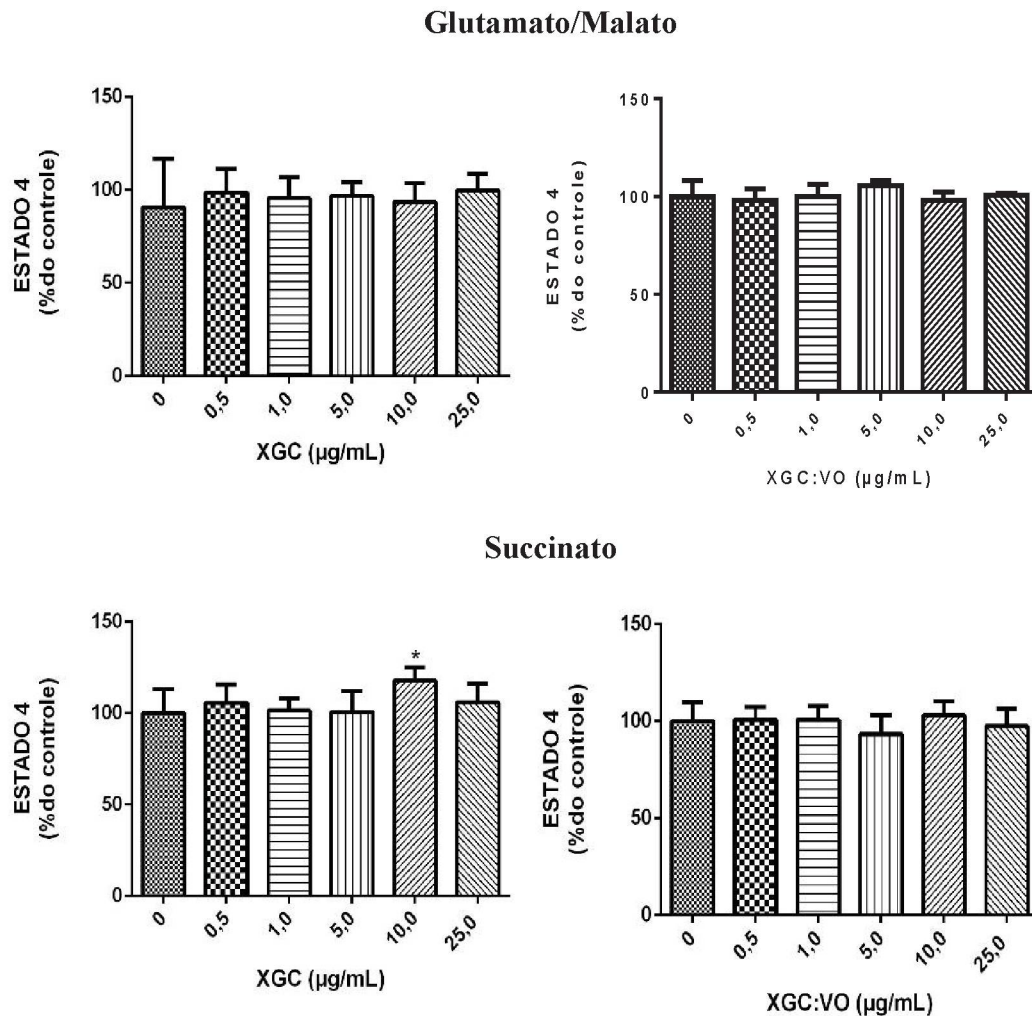
FONTE: O autor (2016).

NOTA: Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol.L⁻¹, EGTA 0,1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1 g%. Suplementado com glutamato de sódio 2 mmol.L⁻¹, malato de sódio 0,2 mmol.L⁻¹ K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹ e ADP 0,2 mmol.L⁻¹ ou com succinato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, rotenona 10 µmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹ e ADP 0,08 mmol.L⁻¹. Para Glutamato/Malato, cada valor representa a média ± desvio padrão de 8 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de 494.60 ± 85.9 e 297.61 ± 16.86 pmol O₂ . s⁻¹.mg⁻¹ proteína para XGC e XGC:VO, respectivamente. Para Succinato de sódio, cada valor representa a média ± desvio padrão de 4 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de 651,09 ± 90 e 757,68 ± 63,4 pmol O₂ . s⁻¹.mg⁻¹ proteína para XGC e XGC:VO, respectivamente.

Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência dos polissacarídeos): *p < 0,05; **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001.

Quando foi avaliado o estado 4 (FIGURA 6), observou-se que tanto XCG como seu complexo com vanádio não afetaram o consumo de oxigênio, quando utilizados glutamato/malato como substratos. Assim, ficou descartada, neste modelo experimental, a possibilidade de que estes compostos possam atuar como agentes desacopladores da fosforilação oxidativa quando substratos do Complexo I são oxidados. No entanto, curiosamente, o polissacarídeo em sua forma não complexada (XCG) promoveu um estímulo neste estado da respiração em ~17%, somente para a concentração de 10 µg/mL, quando o succinato foi o substrato oxidável.

FIGURA 7 - EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO DURANTE O ESTADO 4



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol.L⁻¹, EGTA 0,1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1 g%. Suplementado com glutamato de sódio 2 mmol.L⁻¹, malato de sódio 0,2 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹ e ADP 0,2 mmol.L⁻¹ ou com succinato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, rotenona 10 µmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹ e ADP 0,08 mmol.L⁻¹. Para Glutamato/Malato, cada valor representa a média ± desvio padrão de 8 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de 132,34 ± 41,4 (continuação da legenda da FIGURA 6) e 79,39 ± 7,0 pmol O₂.s⁻¹.mg⁻¹ proteína para XGC e XGC:VO, respectivamente. Para Succinato de sódio, cada valor representa a média ± desvio padrão de 4 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de 72,2 ± 10,0 e 148 ± 16,29 pmol O₂.s⁻¹.mg⁻¹ proteína para XGC e XGC:VO, respectivamente.

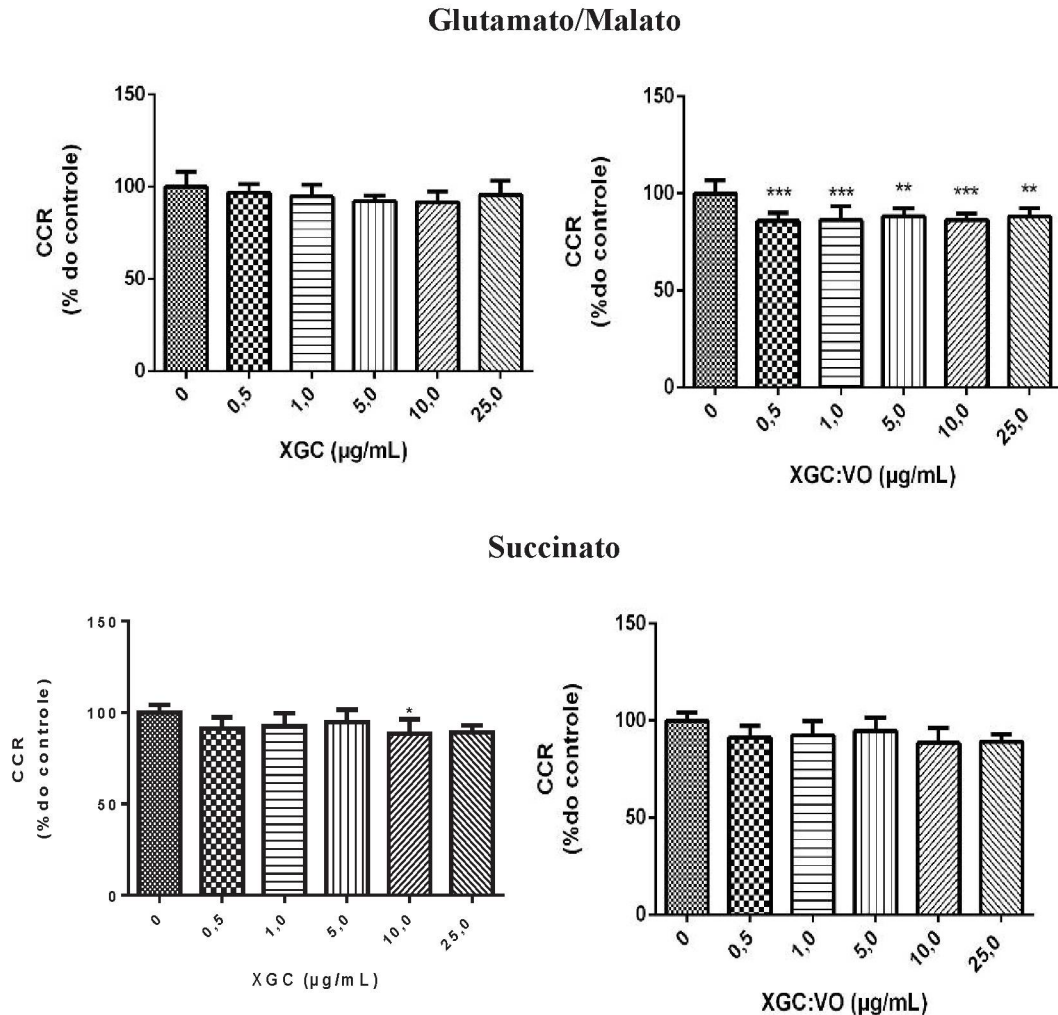
Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência dos polissacarídeos): *p < 0,05; **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001.

Como mencionado, o consumo de oxigênio pela mitocôndria no estado 3 é definido como a respiração durante a fosforilação do ADP adicionado ao sistema e, o consumo de oxigênio no estado 4 é a respiração após o ADP adicionado ter sido consumido (fosforilado a ATP). A partir dos valores destes estados é possível calcular o coeficiente de controle respiratório (CCR), que representa a razão entre as velocidades do estado 3/estado 4. Quanto

maior o seu valor, melhor é a qualidade da preparação mitocondrial. Este parâmetro também é bastante útil para avaliar o efeito da adição de xenobióticos às preparações mitocondriais. Por exemplo, inibidores do estado 3 e/ou agentes desacopladores da fosforilação oxidativa diminuem os valores de CCR (NICHOLLS, FERGUSON, 2002). A FIGURA 7 mostra os valores de CCR em presença de XGC e XGC:VO para a oxidação do glutamato/malato e succinato. Verifica-se que a XGC:VO, em todas as concentrações avaliadas, diminuiu o valor de CCR em ~ 13%, quando glutamato/malato são os substratos. Esse resultado é decorrente da inibição causada pelo complexo no estado 3 (FIGURA 5), no entanto, esse composto não altera, em qualquer concentração, o valor de CCR quando o succinato foi o substrato. Por sua vez, a XGC nativa causa o efeito contrário em relação aos substratos, esse polissacarídeo não alterou o CCR quando o substrato foi glutamato/malato, porém, reduz o CCR em aproximadamente ~12%, quando o succinato foi o substrato, resultado compatível com o estímulo do estado 4 observado na FIGURA 6.

O seguinte parâmetro analisado foi a razão ADP/O que expressa a eficiência da fosforilação oxidativa, ao relacionar o número de moléculas de ADP fosforiladas por átomo de oxigênio consumido, durante o estado 3 da respiração (NICHOLLS, FERGUSON, 2002). Na FIGURA 8 observa-se que tanto a XGC como seu complexo com vanádio não alteraram a razão ADP/O quando os substratos foram glutamato/malato, o que está de acordo com a ausência de efeito sobre o estado 4 da respiração (FIGURA 6). Quando o substrato foi o succinato, os polissacarídeos, na forma nativa e na forma complexada, não alteraram a razão ADP/O, apesar da XGC ter causado um estímulo no estado 4 na concentração de 10 μ g/mL. Ao que parece, o estímulo de 17% nesta concentração não foi suficiente para comprometer a eficiência da fosforilação oxidativa.

FIGURA 8 - EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE O COEFICIENTE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO (CCR)

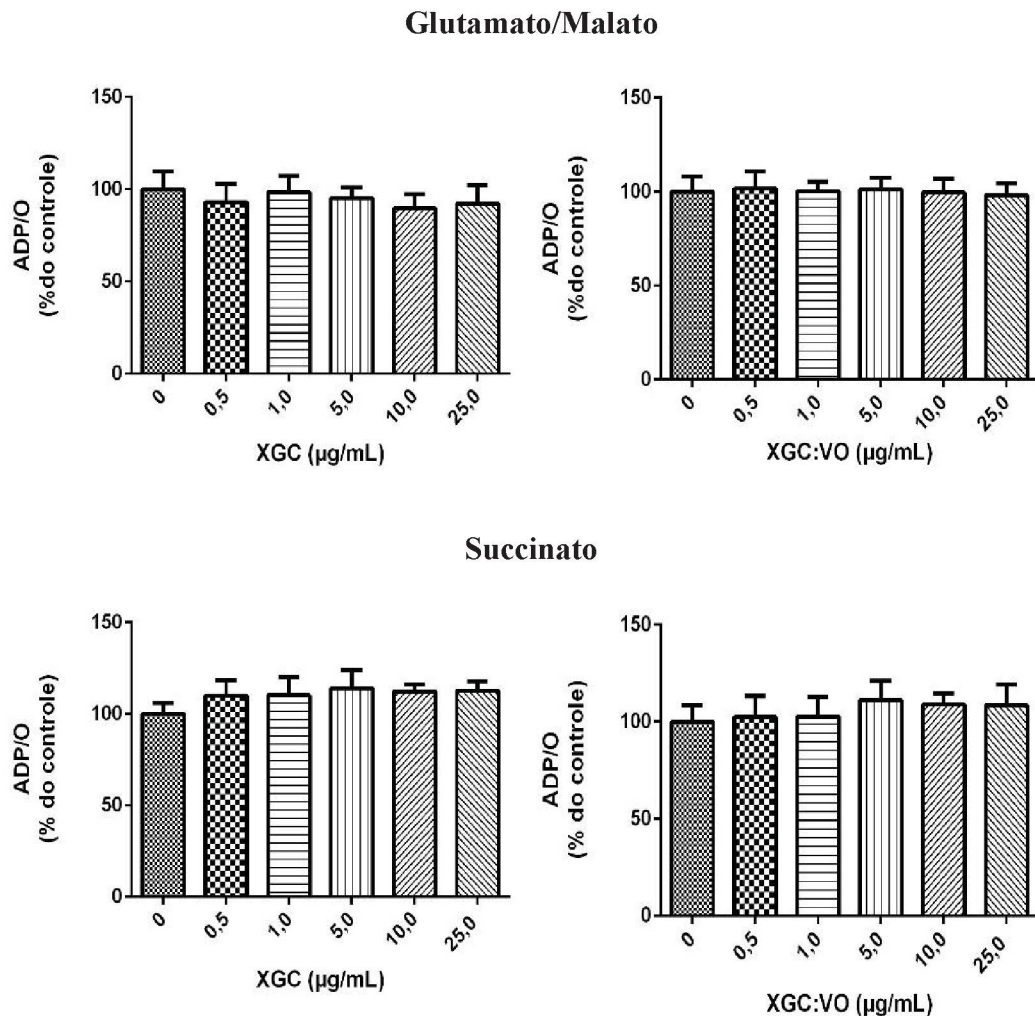


FONTE: O autor (2016).

NOTA: Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol.L⁻¹, EGTA 0,1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1 g%. Suplementado com glutamato de sódio 2 mmol.L⁻¹, malato de sódio 0,2 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹ e ADP 0,2 mmol.L⁻¹ ou com succinato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, rotenona 10 µmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹ e ADP 0,08 mmol.L⁻¹. Para Glutamato/Malato, cada valor representa a média ± desvio padrão de 8 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de 3,6 ± 0,2 e 3,96 ± 0,27 pmol O₂ consumido.s⁻¹.mg⁻¹ proteína para XGC e XGC:VO, respectivamente. Para Succinato de sódio, cada valor representa a média ± desvio padrão de 4 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de 6,12 ± 0,2 e 5,7 ± 0,4 pmol O₂ consumido.s⁻¹.mg⁻¹ proteína para XGC e XGC:VO, respectivamente.

Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência dos polissacarídeos): *p < 0,05; **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001.

FIGURA 9 - EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE A RAZÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ADP POR OXIGÊNIO CONSUMIDO (ADP/O) POR OXIGÊNIO CONSUMIDO (ADP/O)



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol.L⁻¹, EGTA 0,1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1 g%. Suplementado com glutamato de sódio 2 mmol.L⁻¹, malato de sódio 0,2 mmol.L⁻¹ K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹ e ADP 0,2 mmol.L⁻¹ ou com succinato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, rotenona 10 µmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹ e ADP 0,08 mmol.L⁻¹. Para Glutamato/Malato, cada valor representa a média ± desvio padrão de 8 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de 2,60 ± 0,25 e 2,70 ± 0,22 pmol O₂ consumido.s⁻¹.mg⁻¹ proteína para XGC e XGC:VO, respectivamente. Para Succinato de sódio, cada valor representa a média ± desvio padrão de 4 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde ao fluxo de oxigênio de 1,79 ± 0,1 e 1,0 ± 0,06 pmol O₂ consumido.s⁻¹.mg⁻¹ proteína para XGC e XGC:VO, respectivamente.

Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência dos polissacarídeos): *p < 0,05; **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001.

Sabe-se que as mitocôndrias são importantes alvos da ação de compostos químicos, como fármacos ou fitoterápicos, porque muitas destas substâncias podem inibir a função mitocondrial através de diferentes mecanismos. (WHITAKER *et al.*, 2016). Neste contexto, Farias (2012) avaliou os efeitos de XGC e XGC:VO sobre a respiração de células B16F10 intactas e demonstrou que a XGC (2,5 e 25 µg/mL, não alterou o consumo de oxigênio.

Porém, na concentração intermediária (10 $\mu\text{g/mL}$) causou o aumento do consumo de oxigênio em todos os estados da respiração: basal (sem adição de inibidores ou desacopladores), *leak* (em presença de oligomicina) e desacoplado (adição de FCCP), sendo que sobre este último o estímulo foi mais pronunciado, de ~132%. É interessante que no presente estudo, como observado por Farias em células de melanoma murinho B16F10, somente a XGC na mesma concentração destacada pela autora (10 $\mu\text{g/mL}$), foi capaz de estimular o estado 4 da respiração em mitocôndrias isoladas. Acredita-se que a diferença na magnitude do estímulo possa ser devido as particularidades de cada modelo experimental.

Também como observado por Farias (2012) o efeito do complexo XGC:VO foi de inibidor da respiração (FIGURA 5). No entanto, as inibições observadas por Farias foram de maior intensidade (~50%), com a concentração de 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$, no consumo de oxigênio das células B16F10.

Os ensaios que avaliam os efeitos de xenobióticos em modelos celulares, via de regra, utilizam concentrações mais elevadas do que as utilizadas em modelo de organelas isoladas, como, por exemplo, em mitocôndrias. Isto porque espera-se que a ação em organelas seja mais direta e, assim, seria necessária uma menor concentração para causar os mesmos efeitos. Os resultados apresentados aqui não seguem este padrão, uma vez que as concentrações utilizadas incluem-se na faixa do estudo de Farias (2012), ou seja, de 2,5 a 25 $\mu\text{g/mL}$ os efeitos são menos pronunciados. Estes resultados são importantes e podem modificar o planejamento experimental de futuras investigações com polissacarídeos, como também com outros compostos em modelos celulares e em organelas isoladas.

Em mitocôndrias isoladas de hepatócitos de ratos, Hosseini e colaboradores (2013) observaram que o vanádio, na forma de metavanadato (V_5), causou um significativo efeito desacoplador, atuando também como inibidor do transporte de elétrons na cadeia respiratória. No entanto, Soares e colaboradores (2007), observaram que o vanádio na sua forma decamérica (V_{10}), em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e de peixe, causou redução no consumo de oxigênio por essa organela, sem promover o desacoplamento da fosforilação oxidativa, resultados compatíveis a este estudo em mitocôndrias isoladas, e aos de Farias (2012) em células. Isto sugere que compostos de vanádio podem agir de formas diversas em mitocôndrias dependendo do seu estado de oxidação e também das mudanças conformacionais que pode causar na molécula a qual se complexa. Ainda no estudo de Soares e colaboradores (2007), o vanádio na sua forma decamérica parece não alterar a fluidez da membrana mitocondrial, apesar de alterar o $\Delta\psi_m$. Os resultados daqueles autores não

mostraram alterações na razão ADP/O, usada como indicador da integridade da membrana mitocondrial.

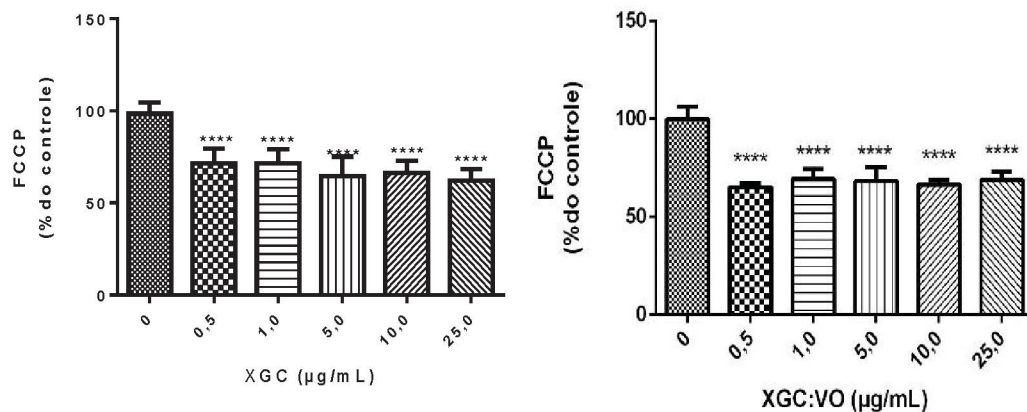
A inibição na velocidade respiratória durante o estado 3 (FIGURA 5) pode ser justificada por quaisquer das seguintes possibilidades: a) inibição de um ou mais complexos da cadeia respiratória; b) inibição das desidrogenases dos substratos utilizados; c) inibição do translocador de nucleotídeos de adenina; d) inibição da ATPsintase e e) inibição dos transportadores dos substratos. Com o objetivo de esclarecer quais destas possibilidades estariam envolvidas na inibição do transporte de elétrons durante o estado 3 (FIGURA 5) foram realizados ensaios de consumo de oxigênio em presença de FCCP, um desacoplador clássico. Segundo o modelo quimiosmótico, proposto por Peter Mitchell (1961), o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória, localizada na membrana mitocondrial interna (MMI), que é impermeável a prótons, gera uma energia livre que é acoplada ao transporte de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, formando um potencial eletroquímico transmembrana. A favor do seu gradiente de concentração, esses prótons voltam para a matriz, através do canal proteico Fo da ATP sintase, também localizada na membrana mitocondrial interna, fornecendo a energia livre para a liberação do ATP (NICHOLLS, FERGUSON, 2013). Na presença de FCCP, um protonóforo que permeia a membrana mitocondrial interna, tanto na forma protonada como desprotonada, a síntese de ATP está desacoplada do transporte de elétrons na cadeia respiratória. Neste caso, o FCCP no espaço intermembranas está em seu estado protonado e na matriz se desprotona, possibilitando que os prótons bombeados para o espaço intermembranas retornem à matriz mitocondrial, sem passar pelo canal Fo da ATP sintase, etapa essencial para a liberação do ATP. Como consequência, a concentração de prótons na matriz aumenta, o gradiente eletroquímico de prótons se desfaz e em resposta o transporte de elétrons acontece em velocidade máxima para bombear os prótons em excesso da matriz para o espaço intermembranas, buscando reestabelecer o gradiente, o que resulta no aumento da respiração (NICHOLLS & FERGUSON, 2013). Assim, neste ensaio é possível avaliar a possível inibição de complexos da cadeia respiratória sem a interferência dos parâmetros relacionados à fosforilação oxidativa. Porém, o transporte de elétrons ainda depende da velocidade da entrada dos substratos e da atividade de suas desidrogenases.

Os resultados destes experimentos estão apresentados na FIGURA 9. Observa-se que ambos os polissacarídeos diminuem o consumo de oxigênio na presença de FCCP, quando glutamato/malato são os substratos. A inibição causada no estado 3 pela XGC:VO se reflete nesse resultado com diminuição de ~32% no consumo de oxigênio. De forma inesperada,

observa-se que, apesar de não causar inibição do estado 3 (FIGURA 5) em mitocôndrias acopladas, a XGC na forma nativa foi capaz de inibir (~30%) o consumo de oxigênio na presença do desacoplador, mostrando que em condições em que o transporte de elétrons não é dependente da síntese de ATP, o polímero exerce efeito inibidor da cadeia respiratória. Para esclarecer este efeito são necessárias investigações futuras.

FIGURA 10 - EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE A RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM PRESENÇA DE FCCP.

Glutamato/Malato



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Estado desacoplado. Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol.L⁻¹, EGTA 0,1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1 g%. Suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L⁻¹, malato de sódio 0,5 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 2 mmol.L⁻¹ e FCCP 0,5 µM. Cada valor representa a média ± desvio padrão de 8 experimentos independentes em duplicata. 100% corresponde a 267.23 ± 20.09 e 240.84 ± 19.50 pmol O₂ consumido.s⁻¹.mg⁻¹ proteína para XGC e XGC:VO respectivamente.

Valores estatisticamente diferentes do controle (p < 0,05); ** (p < 0,01) *** (p < 0,001) **** (p < 0,0001).

Nos resultados do presente estudo, o efeito inibitório da XGC:VO sobre o estado 3 da respiração com glutamato/malato, poderia ser decorrente, entre outros fatores, da ação do complexo sobre a síntese de ATP, envolvendo a inibição da enzima responsável pela síntese do nucleotídeo e/ou do translocador de nucleotídeos de adenina. Nesse contexto, Farias (2012) observou que XGC:VO modula negativamente a expressão da subunidade β da F₁F_o-ATP sintase na concentração de 200 µg/mL em células B16F10, o que motiva a avaliação da atividade ATPásica em mitocôndrias. Além disso, esse experimento poderia evidenciar o efeito desacoplador da XGC, observado quando o succinato foi o substrato oxidável. O efeito de desacoplador também pode ser comprovado por experimentos de consumo de oxigênio na presença de oligomicina. Esse antibiótico se liga a subunidade Fo da F₁F_o-

ATP sintase, impedindo o retorno de prótons para a matriz mitocondrial e, conseqüentemente, promove a diminuição do transporte de elétrons através da cadeia respiratória. Agentes desacopladores atuam promovendo o aumento da velocidade do consumo de oxigênio, mesmo em presença de oligomicina, devido ao aumento no fluxo de elétrons decorrente do aumento na condutância a prótons através da membrana mitocondrial interna (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Assim, a avaliação do consumo de oxigênio na presença de FCCP e oligomicina, utilizando succinato como substrato, também poderia confirmar o efeito desacoplador da XGC nativa e sugerir algum efeito de inibição no transporte de elétrons na cadeia respiratória por esse composto e pela XGC:VO.

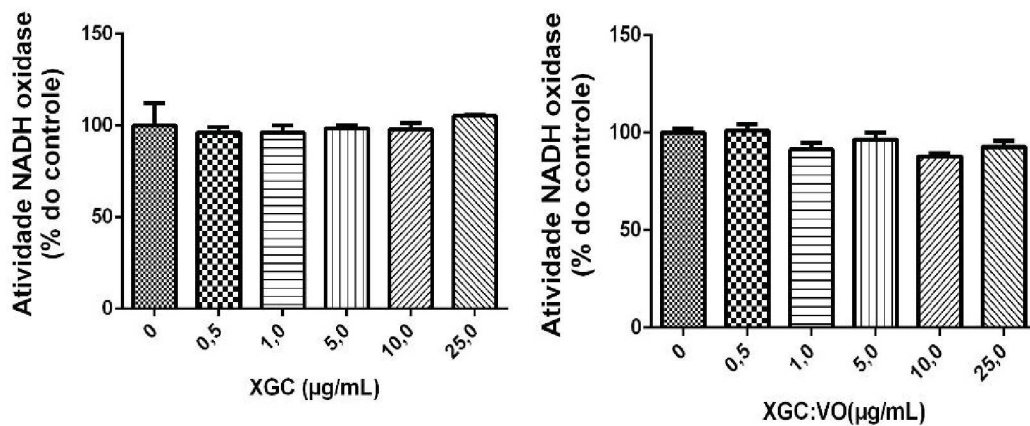
O colapso do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) está relacionado com a liberação do citocromo *c* e conseqüente morte celular por apoptose (SOARES, 2007; ZHAO *et al.*, 2010; HOSSEINI 2013; WEN, 2013). Esse colapso pode decorrer tanto de uma restrição no fluxo de elétrons, quanto de um efeito desacoplador (NICHOLLS & FERGUSON, 2013). Sabe-se que compostos de vanádio podem colapsar o $\Delta\psi_m$ (SOARES, 2007; ZHAO *et al.*, 2010; HOSSEINI 2013) e que XGC nativa pode atuar como agente desacoplador (FARIAS, 2012). Portanto, avaliações dos efeitos de XGC nativa e XGC:VO sobre o potencial elétrico de membrana seriam valiosas para esclarecer os efeitos do polissacarídeo e de seu complexo com vanádio. Também, em adição aos experimentos citados, a ação destes compostos sobre a membrana mitocondrial poderia ser avaliada através de ensaios de inchamento mitocondrial (swelling) na presença e/ou ausência de substratos. Nestes experimentos, os efeitos dos polímeros sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória, a permeabilidade e a elasticidade da MMI poderiam ser estimadas.

5.1.2 Mitocôndrias rompidas - Atividade dos complexos da cadeia respiratória

Considerando o efeito inibitório da XGC:VO sobre o estado o estado 3, a redução no consumo de oxigênio em presença de FCCP também causado pela XGC e, ainda, que estes efeitos poderiam ser resultantes da ação direta dos polissacarídeos sobre os complexos da cadeia respiratória, foram realizados experimentos para avaliar esta possibilidade. Para isso, foram utilizadas preparações de mitocôndrias rompidas (obtidas conforme o item 4.2.3), nas quais a barreira representada pela membrana mitocondrial interna é minimizada, o que permite avaliar o efeito dos compostos apenas sobre o transporte de elétrons, independentemente do gradiente eletroquímico de prótons, dos transportadores e da atividade das desidrogenases dos substratos.

Foram determinadas inicialmente as atividades dos segmentos NADH e succinato oxidase, que compreendem o transporte de elétrons desde o complexo I ou II, respectivamente, até o oxigênio. Na FIGURA 10 pode-se observar que XGC e XGC:VO, em todas as concentrações, não alteram o fluxo de elétrons no segmento NADH oxidase. Este resultado sugere que a inibição observada sobre o estado 3 ocasionada por XGC:VO (FIGURA 5) e em mitocôndrias desacopladas com FCCP (XGC e XGC:VO - FIGURA 9) pode estar relacionada a uma inibição do transporte ou das reações de desidrogenação dos substratos glutamato/malato.

FIGURA 11 - EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE A ATIVIDADE DA NADH OXIDASE



FONTE: O autor (2016).

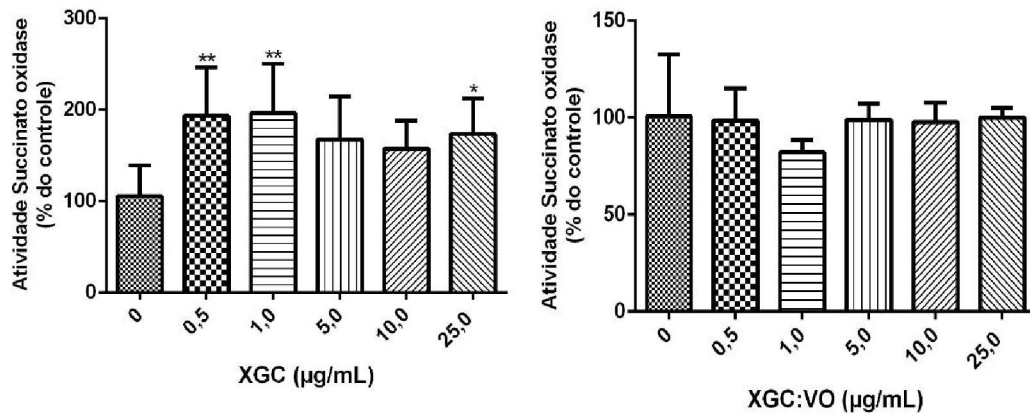
NOTA: Sistema de Reação: tampão fosfato 80 mmol.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 50 µmol.L⁻¹, NADH 0,17 mmol.L⁻¹ e 0,5 mg de proteína mitocondrial. Cada valor representa a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde a 381,77±146,88 e 597,57 ± 48,0 nmol de oxigênio consumido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial para XGC e XGC:VO respectivamente.

Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência dos polissacarídeos): *p < 0,05; **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001.

No entanto, com relação ao segmento da Succinato oxidase (FIGURA 11) a XGC nativa promoveu expressivo aumento de atividade (~95%) nas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL, e em 73% na concentração de 25 µg/mL. Já o complexo XGC:VO não afetou este segmento. Este resultado bastante curioso pode se relacionar ao estímulo do metabolismo de macrófagos por xiloglucanas observado por Rosário e colaboradores (2008; 2011). Os autores demonstraram que este polissacarídeo, isolado de sementes de *T. indica*, aumentou a viabilidade de macrófagos peritoneais em 20% quando na concentração de 100 µg/mL, nesse mesmo modelo. Abreu, 2015, observou o mesmo efeito por uma β-galactana isolada dos frutos de *Sicana odorifera*, em 48 horas de exposição esse polímero aumentou a viabilidade dos macrófagos em 25% e 32% nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL. Segundo esses autores, esses eventos estariam relacionados ao aumento do metabolismo dessas células.

Entretanto, ainda permanece pouco esclarecido como polissacarídeos atuam no metabolismo mitocondrial.

FIGURA 12 - EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO OXIDASE.



FONTE: O autor (2016).

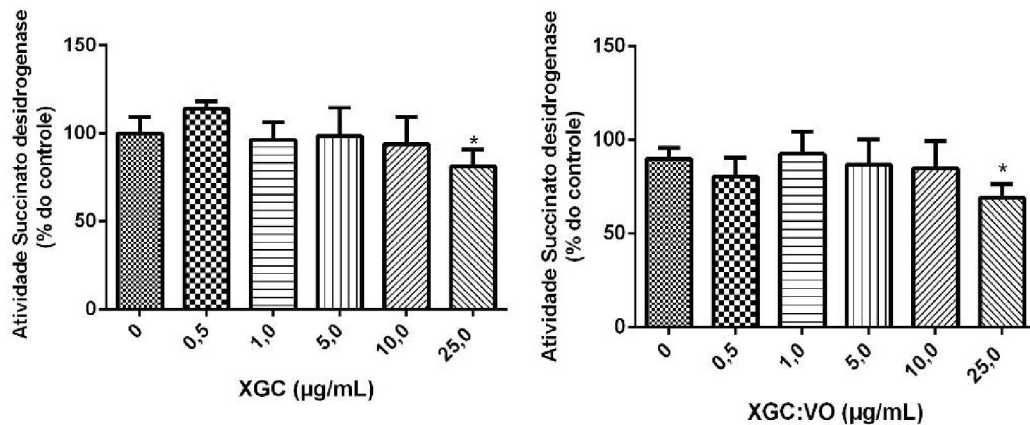
NOTA: Sistema de Reação: tampão fosfato 80 mmol.L⁻¹, pH 7,4, rotenona 10 µmol.L⁻¹, succinato de sódio 10 mmol.L⁻¹ e 0,5 mg de proteína mitocondrial. Cada valor representa a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde a 208.58 ±13.75 e 105.26 ±33.70 nmol de oxigênio consumido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial para XGC e XGC:VO respectivamente.

Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência dos polissacarídeos): *p < 0,05; **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001.

Uma vez que, tanto XGC como XGC:VO, não alteraram a atividade do segmento NADH oxidase, mas XGC causou um importante estímulo da Succinato oxidase, na próxima etapa avaliou-se a atividade da succinato desidrogenase (FIGURA 12), o Complexo II da cadeia respiratória. Somente na maior concentração (25 µg/mL), ambos os polissacarídeos inibiram a atividade do complexo II, sendo que o polissacarídeo complexado com vanádio causou maior inibição (~30%) quando comparado com o polissacarídeo na forma nativa (19%).

Hosseini e colaboradores (2013) ao avaliarem a ação do metavanadato sobre a bioenergética mitocondrial observaram que este composto atua principalmente nos complexos II e III da cadeia respiratória causando sua inibição, que levou a uma maior produção de H₂O₂, evento diretamente relacionado a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, colapso do potencial de membrana e conseqüentemente, disfunção mitocondrial. Embora o resultado aqui encontrado seja semelhante ao observado por HOSSEINI e colaboradores (2013) não é compatível com o estímulo sobre o segmento succinato oxidase.

FIGURA 13 - EFEITOS DA XGC E XGC:VO SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE.



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Sistema de Reação: tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, succinato de sódio 20 mmol.L⁻¹, NaCN 1 mmol.L⁻¹, EDTA 2 mmol.L⁻¹ e 100 µg de proteína mitocondrial. Cada valor representa a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes em duplicata, 100% corresponde 0,146 ± 0,01 e 0,13 ± 0,008 nmol de DPIP reduzido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial para XGC e XGC:VO respectivamente.

Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência dos polissacarídeos): *p < 0,05; **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001.

Quando analisados os resultados obtidos em mitocôndrias isoladas para a XGC nativa e a complexada com vanádio (XGC:VO), fica claro que a presença do metal modifica os efeitos do polissacarídeo. No entanto, a interpretação destes resultados é complexa. A XGC:VO foi capaz de inibir o estado 3 durante a oxidação do glutamato/malato, reduzir a velocidade do transporte de elétrons também em presença de FCCP com os mesmos substratos, mas não afetou a atividade da NADH oxidase (FIGURAS 5; 9 e 10 respectivamente). A principal diferença entre estes ensaios é que nos dois primeiros a membrana mitocondrial estava íntegra, o que parece ser importante para o efeito do polissacarídeo complexado. Outro ponto importante é que no ensaio da NADH oxidase, não há interferência do transportador dos substratos e de suas desidrogenases. Assim é possível sugerir que XGC:VO comprometa a fosforilação oxidativa por reduzir a entrada do glutamato/malato e/ou sua desidrogenação. Ensaios específicos devem ser feitos para esclarecer estas possibilidades, como por exemplo, a atividade da glutamato desidrogenase.

No caso da XGC nativa o efeito é diferente do observado para o polissacarídeo complexado. XGC não afeta nenhum parâmetro (estado 3, estado 4, CCR e razão ADP/O) da respiração quando os substratos que geram NADH para o Complexo I (glutamato/malato) são utilizados (FIGURAS 5; 6; 7 e 8 respectivamente). Porém, em mitocôndrias desacopladas com FCCP o polissacarídeo promove uma significativa inibição (FIGURA 9). Por sua vez,

em mitocôndrias oxidando o succinato, XGC promoveu o aumento da velocidade respiratória do estado 4 somente na concentração intermediária de 10µg/mL, resultado semelhante ao observado em células B16F10 por Farias (2012). O estímulo foi ainda maior para atividade da succinato oxidase, quando a barreira da membrana mitocondrial interna foi minimizada, uma vez que o ensaio é realizado com mitocôndrias rompidas. Neste caso, os resultados sugerem que existe um efeito estimulador do transporte de elétrons para este substrato que se acentua quando a membrana está rompida. Por outro lado, o efeito inibitório para a oxidação a partir do complexo I só é observado quando não há interferência do gradiente eletroquímico de prótons (mitocôndrias desacopladas – FIGURA 9). Para esclarecer estes resultados, ensaios com mitocôndrias desacopladas, oxidando succinato, devem ser feitos para verificar se o estímulo do transporte de elétrons se mantém quando a membrana mitocondrial está íntegra. Ainda, a falta de estímulo e até mesmo a inibição do complexo II na maior concentração (FIGURA 12) de XGC não é compatível com os demais resultados. Neste caso, a metodologia utilizada provavelmente não é capaz de refletir o verdadeiro efeito do polissacarídeo. Neste ensaio, os elétrons provenientes da oxidação do succinato são transferidos do complexo II para os aceptores artificiais de elétrons (PMS e DCPIP). Pelos resultados parece que o estímulo só é observado quando os elétrons seguem seu curso na cadeia respiratória, indicando que a XGC interfere no transporte de elétrons do complexo II para a ubiquinona. Ensaios específicos para este fim devem ser realizados para esclarecer esta hipótese.

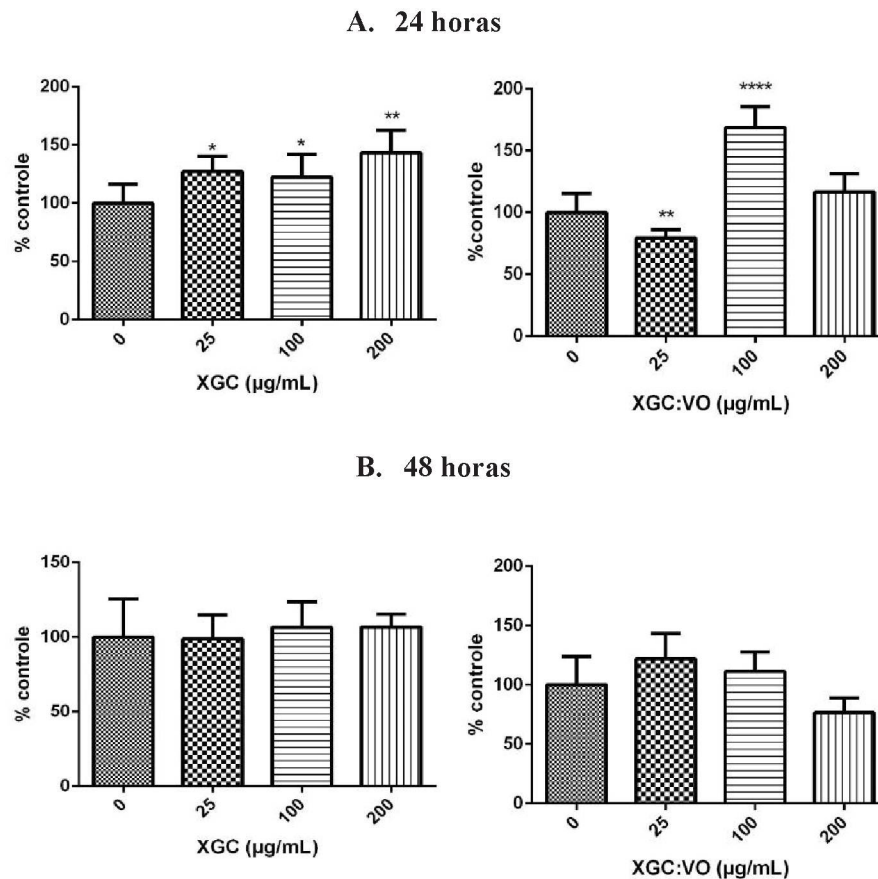
5.2 EFEITOS DA XGC E XGC:VO EM CÉLULAS HEPG2

5.2.1 Viabilidade Celular

Os resultados da viabilidade celular pelo método do MTT estão apresentados na FIGURA 13, onde se observa que a XGC nativa aparentemente aumenta a viabilidade das células HepG2 em 27, 22 e 43%, quando nas concentrações de 25, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, no tempo de 24 h de tratamento. Quando as células foram tratadas com XGC:VO, nas mesmas condições, os resultados foram distintos de acordo com a concentração. Na menor concentração (25 $\mu\text{g/mL}$), o complexo diminuiu em 20% a viabilidade, enquanto que, na concentração de (100 $\mu\text{g/mL}$), o mesmo composto aumentou a viabilidade em 68%. Chama a atenção o fato de que um composto seja capaz de aumentar a viabilidade celular, sendo que a interpretação deste resultado exige cautela. Este aparente aumento da viabilidade celular, avaliada pelo método de MTT, por polissacarídeos já foi descrita em estudos anteriores. Rosário (2010) avaliou a viabilidade de macrófagos peritoneais quando incubados com xiloglucana de *T. indica* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e observou que em 48 h de tratamento, esse polímero induziu um aumento de aproximadamente 20% na viabilidade dessas células. Amorim (2012) observou para uma pectina isolada da casca do cacau (*Theobroma cacao L.*) aumentou de 20 a 30 % a viabilidade de macrófagos nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, em 48 horas de incubação. Abreu (2015), ao avaliar a ação de galactana isolada dos frutos de *Sicana odorifera* sobre macrófagos, observou, pelo método de MTT, que o polímero em 24 h de incubação com 100 $\mu\text{g/mL}$ da β -D-galactana diminuiu a viabilidade dos macrófagos em cerca de 20%. Ao contrário, em 48 h houve aumento na viabilidade de 25% e 32% nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Nesses estudos, os autores justificaram que o estímulo na viabilidade de macrófagos poderia ser explicado pela utilização do método de MTT, já que macrófagos ativados têm seu metabolismo alterado, quando comparados com macrófagos residentes.

Avaliar o aumento da atividade metabólica é um parâmetro utilizado para verificar a ativação de macrófagos (XIONG *et al.*, 2011). Vale ressaltar que os estudos com polissacarídeos em macrófagos, citados acima (ROSÁRIO, 2012; AMORIM, 2012 e ABREU, 2015) mostraram que estes biopolímeros ativaram estas células para a produção de diferentes mediadores como óxido nítrico, ânion superóxido, interleucinas pró- e anti-inflamatórias, além alterar sua morfologia de residentes para caracteristicamente ativados.

FIGURA 14 - EFEITO DE XGC e XGC:VO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2.



FONTE: O autor (2016).

NOTA: A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT, após o tratamento com XGC ou XGC:VO nas concentrações de 25; 100 e 200 µg/mL no tempo de 24 (A) ou horas e 48 horas (B). Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata. O grupo controle, considerado como 100% de viabilidade corresponde a $0,375 \pm 0,06$ para 24 horas e $0,402 \pm 0,11$ para 48 horas e representa o grupo tratado apenas com o meio.

*Valores estatisticamente diferentes do controle *($p < 0,05$); **($p < 0,01$) ***($p < 0,001$) ****($p < 0,0001$).

Quanto a atividade do vanádio, Hosseini e colaboradores (2013), utilizando o método de MTT para avaliar a ação do metavanadato sobre a atividade da succinato desidrogenase de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, observaram que o metal, nas concentrações de 50; 100 e 200 µM, diminuiu a atividade desta enzima em até 55%. Os autores propuseram que o vanádio, nesse estado de oxidação, atuaria inibindo o segmento succinato desidrogenase/citocromo b/ubiquinona e também ocasionaria a transferência reversa de elétrons do complexo II para o complexo I. Estes efeitos ainda justificariam a maior produção de H_2O_2 que, por sua vez, poderia levar a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e ativação de caspases, eventos relacionados com a morte celular por apoptose.

Outro ponto a considerar são os relatos da literatura de efeitos antagônicos de vanádio e seus compostos, como observado no presente estudo. Zhao e colaboradores (2010), em mitocôndrias de fígado, avaliaram a atividade de diferentes compostos de vanádio sobre o complexo II, também pela redução do MTT. Os resultados encontrados mostraram que alguns compostos de vanádio inibiram a atividade do complexo, enquanto outros estimulavam, além disso, curiosamente os compostos que inibiam a complexo II também induziam o inchamento mitocondrial, colapsavam o potencial de membrana e causavam a liberação do citocromo *c*, porém, os compostos que estimulavam este complexo inibiam o inchamento mitocondrial, mas não afetavam o potencial de membrana e a liberação do citocromo *c*. Os autores explicaram que tais eventos antagônicos promovidos por compostos de vanádio seriam resultantes das diferenças entre os ligantes complexados ao metal, e também aos diferentes estados de oxidação que esses compostos adquirem ao serem degradados. Como conclusão, sugerem que diferentes compostos de vanádio podem atuar de forma distinta em mitocôndrias isoladas.

Os resultados do presente estudo também confirmam uma inibição pela XCG:VO, quando a atividade do complexo II é avaliada separadamente (FIGURA 12). Porém, esta inibição também foi observada para a xiloglucana não complexada (FIGURA 12), na mesma concentração de 25 µg/mL, sugerindo que o polissacarídeo e não somente o complexo com vanádio é responsável por este efeito. Por outro lado, quando se trata da avaliação da respiração em células B16F10 por Farias, 2012, e em mitocôndrias isoladas e intactas, no presente estudo, XGC promove um estímulo, enquanto que o principal efeito de XGC:VO é de inibição (FIGURA 5). Assim, o polissacarídeo complexado com o vanádio parece promover efeitos mais significativos quando em sistemas mais complexos, como organelas e células.

Interessantemente, após 48 h de tratamento tanto XGC como XGC-VO não alteraram a viabilidade das células s HepG2, sugerindo uma possível adaptação destas células a presença do polissacarídeo e seu complexo com o metal (FIGURA 13). Esta suposta adaptação também poderia mascarar uma sobreposição de efeitos, de estímulo do metabolismo nas primeiras 24 h, seguido de uma inibição em 48 h. Assim, o resultado final seria uma aparente ausência de efeito.

5.2.2 Proliferação celular

A capacidade que as células tumorais têm de se expandir em número pode ser determinada pela taxa de proliferação celular. Ensaios que determinam os efeitos de compostos sobre este parâmetro são úteis para identificar potenciais agentes antitumorais. Na FIGURA 14 e TABELA 1 estão apresentados os efeitos da XGC e XGC:VO sobre a proliferação das células HepG2. Observa-se que XGC e XGC:VO, no tempo de 24 horas de tratamento (FIGURA 14-A), na menor concentração (100 µg/mL), não causaram efeitos sobre a proliferação. Porém, quando essa concentração foi duplicada (200 µg/mL), ambas as preparações inibiram a proliferação. XGC, na mesma concentração, causou uma inibição de ~40%, sendo que complexo com vanádio apresentou efeito mais pronunciado, diminuindo a proliferação celular em ~60%. Curiosamente, após 48 horas de tratamento (FIGURA 14- B), o efeito inibitório não foi mais observado, ao contrário, tanto XGC como XGC:VO promoveram um aumento na proliferação celular nas concentrações de 100 e 200 µg/mL. XGC e XGC:VO estimularam a proliferação em ~25% e ~30% nas concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente. Contudo, os efeitos semelhantes provocados pelos compostos sobre as células no tempo de 48 h de tratamento, se desassociam parcialmente quando as células HepG2 foram tratadas por 72 h (FIGURA 14- C). Nesse tempo observa-se que na concentração de 100 µg/mL ambos os polímeros não tem efeito na proliferação celular, porém, na concentração de 200 µg/mL, enquanto XGC continua estimulando a proliferação em ~33%, XGC:VO reduz a proliferação das células HepG2 em ~85%.

Com o objetivo de avaliar se as células HepG2 poderiam retomar seu perfil de proliferação se o tratamento com os polissacarídeos fosse interrompido, foram realizados ensaios específicos para este fim. Nestes experimentos, as células foram tratadas por 48 h com XGC ou XGC:VO nas concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL e após este tempo o meio de cultivo foi substituído por outro sem os polímeros. As células foram mantidas em condições de cultivo por mais 24 h e foram repetidos os ensaios de proliferação. Os resultados estão representados na FIGURA 14- D.

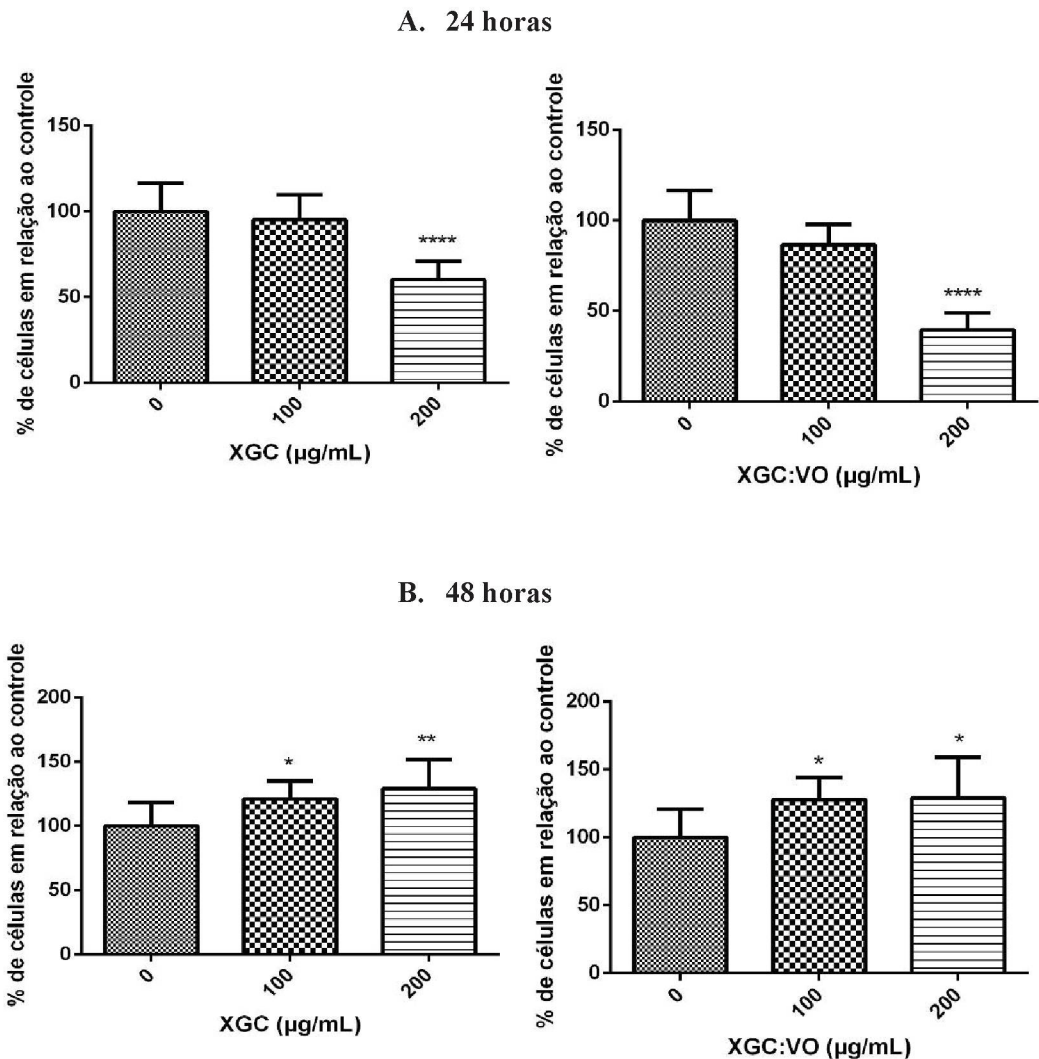
Interessantemente, mesmo após a retirada do tratamento, o aumento da proliferação celular promovido pela XGC (200 µg/mL), persiste, sendo o estímulo de ~51%. XGC:VO ainda promove efeitos sobre as células HepG2, mas ao invés de aumento observado para 48 horas de tratamento, passa a reduzir a proliferação em ~35% e ~77% nas concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente. Estes resultados, como os obtidos em mitocôndrias, são de difícil interpretação e sugerem que os efeitos de XGC dependem do

tempo de tratamento e se modificam quando o polissacarídeo está complexado com o vanádio (XGC:VO).

Farias, 2012, observou que o tratamento por 24 h com XGC reduziu em ~20%, 37% e 46% a proliferação de células B16F10, quando tratadas com 2,5; 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$ de XGC, respectivamente. fica evidente que no presente estudo, com células HepG2, concentrações aproximadamente 20 vezes maiores foram necessárias para causar efeitos semelhantes aos encontrados por Farias, 2012, em células B16F10, sugerindo que de alguma forma as células B16F10 são mais sensíveis a ação da XGC ou que as HepG2 são mais resistentes a esse composto.

Também no estudo de Farias, 2012, no tempo de 48 horas de tratamento com XGC, a redução da proliferação das células B16F10 foi mais acentuada alcançando ~48%, ~52% e ~51%, para as mesmas concentrações (2,5; 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$ de XGC, respectivamente). Ao contrário, no presente estudo XGC em 48 horas, estimulou a proliferação celular (FIGURA 14- B), tanto na menor concentração (100 $\mu\text{g/mL}$) em ~21%, que não havia apresentado efeito em 24 horas, como na maior concentração (200 $\mu\text{g/mL}$) em ~29%, que anteriormente inibia a proliferação em ~40%. Esses resultados sugerem que as células HepG2 responderam a inibição de 24 h com um estímulo de proliferação em 48 h, novamente sugerindo uma possível adaptação destas células a presença do polissacarídeo, como visto nos resultados de viabilidade celular em 48 horas (FIGURA 13 –B).

FIGURA 15 - EFEITO DE XGC E XGC:VO SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HEPG2.

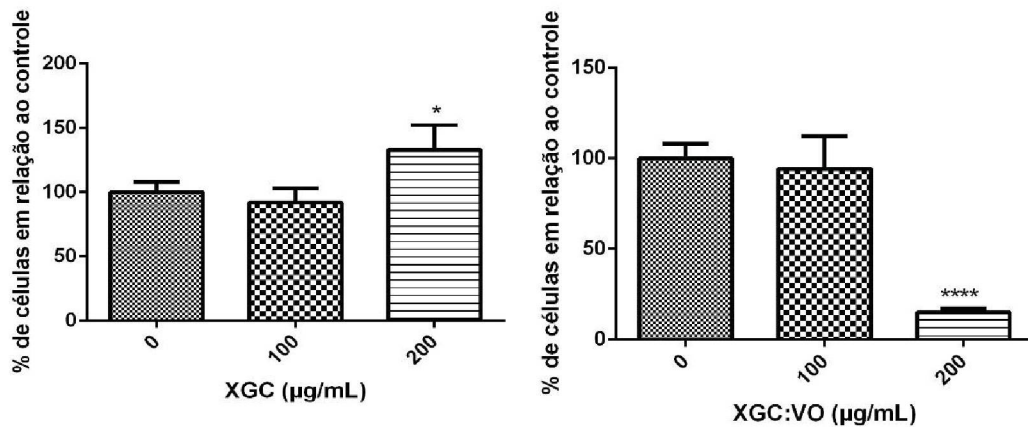


FONTE: O autor (2016).

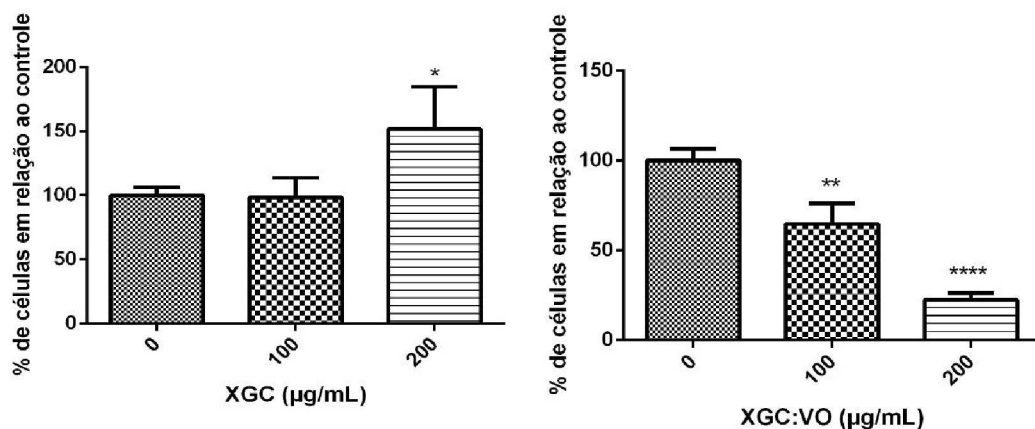
NOTA: A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de cristal violeta, após o tratamento com XGC ou XGC:VO nas concentrações de 100 e 200 µg/mL, como descrito em Materiais e Métodos, item 4.4.3. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata. **(A)** 100% (ausência de tratamento) corresponde a $0,349 \pm 0,05$ **(B)** 100% (ausência de tratamento) corresponde a $0,364 \pm 0,09$ **(C)** 100% (ausência de tratamento) corresponde a $0,341 \pm 0,05$ **(D)** 100% (ausência de tratamento) corresponde a $0,348 \pm 0,02$.

Valores estatisticamente diferentes do controle*($p < 0,05$); **($p < 0,01$) ***($p < 0,001$) ****($p < 0,0001$).

C. 72 horas



D. Recuperação (após 48 horas)



Esse comportamento indutor e inibidor dos polissacarídeos sobre a proliferação de células tumorais também foi descrito em outros estudos. Silveira, 2010, ao avaliar a ação de xiloglucanas de reserva extraídas de sementes de *Hymenaea courbaril* (Jatobá) observou que esse polissacarídeo promoveu um aumento na proliferação das células HeLa de maneira dose-dependente, onde observou-se uma variação de ~65% a 156% em relação ao controle em um tempo de 24 h de tratamento. Em 48 h de tratamento, observou-se um aumento na proliferação de ~19% a 38% em relação ao controle. A autora avaliou a atividade do polissacarídeo do exsudato do fruto de *Chorisia speciosa* (Paineira) sobre as mesmas células e observou efeitos opostos sobre a proliferação, sendo estes efeitos dependentes da concentração e do tempo de incubação. Na maior concentração (200 µg/ml) ocorreu um aumento na proliferação em relação ao controle (24 h) em ~83%. Já para o tratamento de 48

h, nessa mesma concentração, o polissacarídeo promoveu uma inibição da proliferação de 27%.

Nie *et al.*, 2013, avaliaram os efeitos de xiloglucanas de *Tamarindus indica* sobre queratinócitos normais de pele humana (NHEK), queratinócitos de pele humana imortalizados (HaCaT) e fibroblastos. Observaram que esses polímeros eram internalizados pelos endossomos destas células e não só induziam a proliferação, mas também a migração, a progressão do ciclo celular e ativação de enzimas intracelulares por regular a expressão de genes referentes a proteínas de membrana, citoesqueleto, sinalização de citoquinas e matriz extracelular (ECM), bem como a processos de metabolismo e transcrição. Esses autores afirmaram que a capacidade dessa xiloglucana em estimular a proliferação celular é uma propriedade muito importante para aplicação na indústria farmacêutica, uma vez que são consideradas ótimos veículos para medicamentos utilizados para regeneração celular. Assim, esses polímeros são promissores no desenvolvimento de agentes cicatrizantes por melhoraram processos de reepitelização e remodelação. No entanto, os autores destacaram que esses efeitos podem não ser interessantes para tratamento de outras doenças, como o câncer, e que esses polímeros não devem ser vistos como veículos inertes.

Outros estudos citam xiloglucanas como biomaterial interessante para o desenvolvimento de matriz extracelular sintética pela engenharia de tecido (DENG *et al.*, 2014). Seo *et al.* (2005) relataram a XGC, como um novo material de ECM sintética, que aumenta a aderência de células hepáticas devido ao reconhecimento das porções de galactose por receptores de asialoglicoproteína presentes nessas células. Além disso, esse polímero aumenta as funções específicas de hepatócitos, como a desintoxicação.

Considerando nossos resultados e os achados na literatura, possivelmente a XGC em células HepG2 parece induzir genes que regulam a proliferação celular, mas esta hipótese deve ser comprovada. Quanto aos efeitos de XGC:VO sobre a proliferação de células HepG2, foi observado que nas primeiras 24 h, o efeito de inibição na maior concentração do complexo parece ser decorrente da presença da XGC, porém, o metal aparentemente potencializa esse efeito (FIGURA 14- AC). Wang (2010) demonstrou que os compostos de vanádio, independente do seu estado de oxidação, inibem significativamente a proliferação de células de hepatoma HepG2, mas têm apenas um efeito discreto sobre as células imortalizadas hepáticas L02, o que indica a seletividade de compostos de vanádio para as células tumorais.

A presença do metal vanádio parece mesmo potencializar a ação de polissacarídeos. Nesse contexto, Noletto *et al.* (2009), avaliando os efeitos do tratamento de duas preparações de galactomananas (GALMAN A e B) extraídas das sementes de *Mimosa scabrella*

(bracatinga) e complexadas ao oxovanadium sobre células HeLa, observaram um discreto aumento na proliferação de células tratadas com GALMAN A e um pequeno decréscimo no tratamento com GALMAN B. Por outro lado, quando complexadas ao oxovanadium, ambas inibiram a proliferação celular em ~60%, demonstrando que a presença do metal é crucial para o efeito tóxico observado.

TABELA 1 - RESULTADOS DOS TESTES DE MTT E CRISTAL VIOLETA PARA XGC E XCG:VO.

TESTE	TEMPO (horas)	CONCENTRAÇÕES ($\mu\text{g/mL}$)	RESULTADOS (%)	
			XGC	XGC:VO
MTT (Viabilidade)	24	25	+27%	-20%
		100	+22%	+68%
		200	+43%	ns
	48	25	ns	ns
		100	ns	ns
		200	ns	ns
Cristal Violeta (Proliferação)	24	100	ns	ns
		200	-40%	-60%
	48	100	+21%	+27%
		200	+30%	+30%
	72	100	ns	ns
		200	+33%	-85%
	RECUPERAÇÃO	100	ns	-35%
		200	+51%	-77%

FONTE: O autor (2016).

ns: não significativo.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- Em mitocôndrias isoladas e intactas, XGC e XGC:VO afetam a respiração de forma dependente do substrato oxidado (Complexo I - glutamato/malato ou do Complexo II - succinato), da presença do vanádio complexado ao polissacarídeo e das concentrações;
- A ausência de efeitos de XGC e XGC:VO em mitocôndrias rompidas, quando o NADH é oxidado, sugere que a interação dos polímeros com as membranas mitocondriais, seja responsável, pelo menos em parte, por seus efeitos sobre a bioenergética mitocondrial;
- Os efeitos em mitocôndrias isoladas se refletem aparentemente na ação de XGC e XGC:VO em células HepG2, cuja viabilidade e proliferação exibem perfis de estímulo e inibição dependentes da presença do metal e das concentrações utilizadas.

7 REFERÊNCIAS

- ABDELHAMID, G.; ANWAR-MOHAMED, A.; ELMAZAR, M.M.; EL-KADI, A.O. Modulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase by vanadium in human hepatoma HepG2 cells. **Toxicol In Vitro**, v. 24, n. 6, p. 1554-61, 2010.
- ABREU, E.C.A. Avaliação do potencial imunomodulador de uma β - galactana isolada dos fritos de *Sicana odorifera*, Cucurbitaceae. Trabalho de dissertação de mestrado em Ciências – Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba 2015
- AMORIM, J. C. Efeitos biomoduladores da pecticina da casca dos frutos de cacau (*Theobroma Cacao* L.) sobre macrófagos peritoneais de camundongos. Trabalho de dissertação de mestrado em Ciências – Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.
- AON, M. A. From mitochondrial dynamics to arrhythmias. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41, p.1940–1948, 2009.
- ASSEM FL, LEVY LS. A review of current toxicological concerns on vanadium pentoxide and other vanadium compounds: gaps in knowledge and directions for future research. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v12: 289-306, 2009.
- ASSIM, M; SARMA, M.P; THAYUMANAVAN, L; KAR, P. Role of aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population. **Clin Biochem**, v. 44, p. 1235-1240, 2011.
- BAFFY, G; BRUNT E.M; CALDWELL, S.H; Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. **J Hepatol**. v.56, p.1384–91, 2012.
- BARAN, E. J. Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 80, n. 1-2, p. 1-10, 2000.
- BARAN, E. J. Oxovanadium(IV) complexes of carbohydrates: a brief overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 4, p. 547-53, 2009.
- BARRIO, D.E. Potential Use of Vanadium Compounds in Therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3632-3642, 2010.
- BARROSO, P.A.; MARCO, J.D.; CALVOPINA, M.; KATO, H.; KORENAGA, M.; HASHIGUCHI, Y. A trial of immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in vitro and in vivo with Z-100, a polysaccharide obtained from *Mycobacterium tuberculosis*, alone or combined with meglumine antimoniate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 1123–1129, 2007.
- BASILE, A.C.; SERTIE, J.A.; FREITAS, P.C.D. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian copaiba. **Journal of Ethnopharmacology**, v.22, p.101- 9, 1988.
- BERGO, A.C. Atividade antitumoral e Imunológica de Abrina e Pulchelina em tumor mamaário murino. [Monografia de Graduação. Araraquara (SP), Universidade Estadual Paulista; 2013.

BISHAYEE, A. et al. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the in vivo evidence. **Cancer Letter** v. 294, n. 1, p. 1-12, 2010.

BOHN, J.A e BeMILLHER J.N. (1-3) β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of struture-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p.3-14, 1995.

BRAGA, W. F.; REZENDE, C.M.; PINTO, A. C. Terpenoides from *Copaiba cearensis* of Copaifera species. **Phytochemistry** 49, 263-264, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica-Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRECHOT C. Molecular mechanisms of hepatitis B and C viruses related to liver carcinogenesis. **Hepatology**, v.45:(Suppl3), p. 189-1196, 1998.

BRITO, N.M.B.; BRITO, M.V.H.; CARVALHO, R.K.V.; MATOS, L.T.M.B.; LOBATO, R.C.; CORREA, S.C.; BRITO, R.B. The effect of copaiba balsam on Walker 256 carcinoma inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.25, n.2, 2010.

BUCKERIDGE M.S., SANTOS H.P., TINE M.A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology Biochemistry**. v. 38, p. 141-56, 2001.

BURGALASSI, S.; PANICHI, L.; SAETTONE, M.F.; JACOBSEN, J.; RASSING, M.R. Development and in vitro/in vivo testing of mucoadhesive buccal patches releasing benzydamine and lidocaine. **International Journal Pharmacology**, v.133, p.1-7, 1996.

BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. Xyloglucan from leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**. v. 58, p. 525-531, 2001.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, p. 52-108, 2000.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do Registro de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil. **Revista Bras. Farmacognosia**, vol. 18, nº2, 2008.

CHANCE, B. WILLIAMS, G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.217, p.383 -427, 1955.

CHANG, H. J.; LEE, M. R.; HONG, S. H.; YOO, B. C.; SHIN, Y. K.; JEONG, J. Y.; LIM, S. B.; CHOI, H. S.; JEONG, S. Y.; PARK, J. G. Identification of mitochondrial FoF1-ATP

synthase involved in liver metastasis of colorectal cancer. **Cancer Science**, v. 98, n. 8, p. 1184-91, 2007.

CHEN, R.; MENG, F.; LIU, Z.; CHEN, R.; ZHANG, M. Antitumor activities of different fractions of polysaccharide purified from *Ornithogalum caudatum* Ait. **Carbohydrate Polymers**. v. 80, p. 845–851, 2010.

CHEN, D.; GUO, P.; CHEN, S. Properties of xyloglucan hydrogel as the biomedical sustained-release carriers. **Journal of Materials Science**, vol.23, p.955–962, 2012.

CHLUBNOVÁ, I.; SYLLA, B.; NUGIER-CHAUVIN, C.; DANIELLOU, R.; LEGENTIL, L.; KRALOVÁ, B.; FERRIÈRES, V. Natural glycans and lycoconjugates as immunomodulating agents. **Natural Products Reports**.v.28, p. 937–952, 2011.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, p.829-37, 2004.

CLOSS, C.B.; CONDE-PETIT, B.; ROBERTS, I.D.; TOLSTOGUZOV, V.B.; ESCHER, F. Phase separation and rheology of aqueous starch/galactomannan systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p.67-77, 1999.

COSTA, A.R.M; FREITAS, L.A.P; MENDIOLA, J; IBANEZ, E. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and in vitro assays. **Journal os Supercritical Fluids**, v. 100, o. 86-89, 20015.

CRUZ, O. U., FM. metvan a novel oxovanadium complex with broads spectrum anticancer activity. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 11, n. 12, p. 18291836, 2002.

CUESTA S, FRANCES D, GARCIA GB. ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. **Neurotoxicol Teratol**, v; 33: 297-302, 2011.

CUNHA, P; PAULA, R; FEITOSA, J. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quím. Nova**, vol.32 n.3. São Paulo 2009.

DENG, X; CAO, Y; YAN, H; YANG, J; XIONG, G; YAO, H; QI, C. Enhanced liver functions of HepG2 cells in the alginate/xyloglucan scaffold. **Biotechnol Latt**. v. 37, p. 235-240, 2015

DESOIZE, BERNARD. Metals and Metals Compounds in Cancer Treatment. **Anticancer Research**, v. 24, p. 1529-1544, 2004.

DUBOIS, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anaytical. Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EL-HASAN, A.; WALKER, F.; SCHONE, J.; BUCHENAUER, H. Detection of viridiofungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, p. 457–470, 2009.

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

EVANGELOUS, A. M. Vanadium in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 42, n. 3, p. 249-65, Jun 2001.

FANECA, H. F., VA.; TOMAZ, I.; GONÇALVES, G.; AVECILLA, F.; PEDROSO DE LIMA, MC.; GERALDES, CFGC.; PESSOA, JC.; CASTRO, M. Vanadium compounds as therapeutic agents: Some chemical and biochemical studies. **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 601-608, 2009.

FARIAS, C.L.A. Xiloglucana de sementes de *Copaifera langsdorffii* (Copaíba) e seu complexo com Oxovanádio (IV/V): Efeitos sobre células de Melanoma Murino B16- F10 In Vitro. [Dissertação de Mestrado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 2012.

FERNANDES, R.M.; PEREIRA, N.A.; PAULO, L.G. Anti-inflammatory activity of copaíba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.73, p.53-6, 1992.

FONSECA, M.C.M. **Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. Espaço para o produtor**, Viçosa, 2012.

FRANCO, R.; SANCHEZ-OLEA, E. M. REYES-REYES; M. I. PANAYIOTIDIS, Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis, **Mutat. Res.**674, p. 3–22, 2009.

FREITAS, C.V.; OLIVEIRA, P.E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p.311-21, 2002.

FREITAS, R. A., MARTIN, S.; SANTOS, G. L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 507-514, 2005.

FRY, S. C. The structure and functions of xyloglucan. **J. Exp. Bot.**, v. 40, n. 211, p. 1-11, 1989.

FURTADO, R.A. Caracterização fitoquímica, avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória e biotransformação de um composto isolado das folhas de *Copaifera langsdorffii*. [Teses de doutorado]. Ribeirão Preto. (SP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2013

GEBHARDT, R. *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Medica, Stuttgart**, v. 66, n.2, p. 99-105, 2000.

GOGVADZE V, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. Mitochondria in cancer cells: What is so special about them? **Trends Cell Biol.** v.18, p. 165-73. 2008

GONCALVES, A. P.; VIDEIRA, A.; SOARES, P.; MAXIMO, V. Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cells involves the activation of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR. **Life Science**, v. 89, n. 1112, p. 371-7, 2011.

GULLFOT, F.; IBATULLIN, F.M., SUNDQVIST, G., DAVIES, G.J., BRUMER, H. Functional characterization of xyloglucan glycosynthases from GH7, GH12, GH16 scaffolds. **Biomacromolecules**, v.10, p.1782-88, 2009.

HANSEN TV, AASETH J, ALEXANDER J. The effects of chelating agents on vanadium distribution in the rat body and uptake by human erythrocytes. **Arch Toxicol**, v. 50, p.195–202, 1982.

HASHIMOTO K, OKAWA Y, SUZUKI K, OKURA Y, SUZUKI S, SUZUKI M. Antitumor activity of acidic mannan fraction from Bakers" yeast. **J Pharmacobiodyn**, v.6, p.66876, 1983.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 139-168, 1989.

HENSEL, A.; SCMIDGALL, J.; KREIS, W. The plant cell wall – A potential source for pharmacologically active polysaccharides. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 73, p. 37- 43, 1999.

HOSSEINI, M-J; SHAKI, F; GHAZI-KHANSARI, M; POURAHMAD, J. Toxicity of Vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. **Metallomics**, v.5, p. 156, 2013.

HSIEH, Y. S. Y.; HARRIS, P. J. Xyloglucans of monocotyledons have diverse structures. **Molecular Plant**, v. 2, p. 943-965, 2009.

ITOH, K., YAHABA, M., TAKAHASHI, A., TSURUYA, R., MIYAZAKI, S., DAIRAKU, M. In situ gelling xyloglucan/pectin formulations for oral sustained drug delivery. **International Journal Pharmacology**, v. 356, p.95–101, 2008.

JAKÓBISIAK, M. ; LASEK, W. ; GOLAB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunology Letters**, vol. 90, p. 103-122, 2003.

JUNGWIRTH, U.; KOWOL, C. R.; KEPPLER, B. K.; HARTINGER, C. G.; BERGER, W.; HEFFETER, P. Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 4, p. 1085-127, 2011.

JÚNIOR, H.M.; OLIVEIRA, D.F.; CARVALHO, D.A.; PINTO, J.M.A.; CAMPOS, V.A.C.; MOURÃO, A.R.B.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTALOTUFO, L.V. Evaluation of native and exotic brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, p.231-38, 2010.

KANNA, P. S.; SARALAYA, M. G.; SAMANTA, K.; CHATTERJEE, M. Vanadium inhibits DNA-protein cross-links and ameliorates surface level changes of aberrant crypt foci during 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Cell Biology and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 41-52, 2005.

KATO, Y.; UCHIDA, J.; ITO, S.; MITSUISHI, Y. Structural analysis of the oligosaccharides units of xyloglucan and their effects on growth of COLO 201 human tumor cells. **Intern Cong Series**, Amsterdam, v. 1223, p. 161-164, 2001.

- KITAJMA, Y. Structural and biochemical characteristics of pathogenic fungus: cell walls, lipids and dimorphism, and action modes of antifungal agents. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 41, p. 211–217, 2000.
- KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.**, v. 6, p. 513-519, 2000.
- KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical Biochemistry**. v. 182, p. 16-19, 1989.
- KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. O fígado e as vias biliares, In: Robbins e Coltran. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7ª ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 968-972, 2005.
- KUMAR, C. S.; CHANDINI, S.; BHATTACHARYA, S. Tamarind Seed: properties, processing and utilization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 1-20, 2008.
- KWOK, T.T.; CHEN, P.; LIU, P.Y.; TANG, Y.C.; KONG, S.K.; FUNG, K.P. The anti-tumour effect of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharides. **Biological Signals**, v. 10, p. 294-298, 2001.
- LEMOS, M; SANTIN, J.R; MIZUNO, C.S; BOEING, T; SOUSA, J.P.B; NANAYAKKARA. D; BASTOS, J.K; *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potencial gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 25, p.238-245, 2015.
- LEÓN, I.E; BUTENKO, N; VIRGILIO, A.L; MUGLIA, C.I; BARAN, E.J; CAVACO, I; ETCHEVERRY, S.B. Vanadium and cancer treatment: Antitumoral mechanisms of three oxovanadium (IV) complexes on a human osteosarcoma cell line. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 134, p. 106-177, 2014.
- LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; KOON, J.C.M.; FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v.105, p. 101–114, 2006.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Plantarum**, São Paulo, p. 152 e 155, 1992.
- LOUREIRO R; MESQUITA K. A.; OLIVEIRA, P.; NAREDO, I.V. Mitochondria in Cancer Stem Cells: A Target for Therapy. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**. v. 7, 2013.
- LORENZONI, A.A; LUSA, F.T; CAVALLI, A.P; GNOATO, C.V; FERRARI, B. GRACIANI, P.C; BOHEN, C; SÁ, C.A; CORRALO, V.S. Edeito protetor de produtos naturais sobre o dano hepático induzido pelo paracetamol. Acta Ambiental Catarinense. v.11, n. 1/2. 2014.
- 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.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, p. 7-13, 2005.

MASSABKI, P.S; PIMENTA, J.R. Carcinoma hepatocelular: um panorama clínico. **Rev. Bras. Clin. Med**, v.8, p. 59-67, 2010.

McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.

McNEIL, J.H; YUEN, H.R; ORVING, C. Bis(maltolato)oxovanadium(IV) is a potent insulin mimetic. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.35, p. 1489-1491, 1992.

MESHKINI, A.; YAZDANPARAST, R. Chemosensitization of human leukemia K562 cells to taxol by a Vanadium-salen complex. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, n. 3, p. 334-42, 2010.

MITCHELL P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**. v. 8, p.191:144-8. 1961.

MORETÃO, M.P.; BUCHI, D.F.; GORI N, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of acidic heteropolysacchride (ARAGAL) from the gum of *Anadenantheracolubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, v. 89, p. 175-185, 2003.

MORINVILLE, A.M., D.; SHAVER, A. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. **Trends Pharmacology Science**, v. 19, n. 11, p. 452-460, 1998.

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

NATHAN, C.F. Regulation of macrophages oxidative methabolism and antiparasitic activity. In: van FURTH, R. **Mononuclear Phagocytes Characteristics, Physiology and Function**, p. 411-420, 1985.

NAVARRO, M.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 1070-1078, 2010.

NETO, E. A. B; RIBEIRO, C; ZUCOLOTTTO. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. **Comunicado técnico**. São Carlos-SP, v. 2008.

NEWMAN, D; CRAGG, G. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. V. 75, p. 311-335, 2012.

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K.M.; TIZARD, I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1745-1755, 2004.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics** 3. San Diego: Academic Press, p.90-129, 2002.

NIE, W; DETERS A.M; Tamarind Seed Xyloglucans Promote Proliferation and Migration of Human Skin Cells through Internalization via Stimulation of Proproliferative Signal Transduction Pathways. **Dermatology Research and Practice**. Volume 2013, Article ID 359756, 14pages, 2013.

NISHINARI, K.; ZHANG, H.; IKEDA, S. Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. *Curr Opin Colloid Interface Science*, v. 5, p. 195-201, 2000

NISHINO T, NISHIOKA C, URA H, NAGUMO T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. **Carbohydrate Research**, v.255, p. 213–24, 1994.

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L. M ; IACOMINI, M ; GORIN, PA J ; THOMAZ-SOCCOL, V; OLIVEIRA, MBM . Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Molecular and Cellular Biochemistry, Netherlands**, v. 233, p. 73-83, 2002.

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; OLIVEIRA, M.B.M. Yeast mannan-vanadium (IV) complexes and then effects on peritoneal macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 113-122, 2004.

NOLETO, G.R.; PETKOWICZ, C.L.O.; MERCÊ, A.L.R.; NOSEDA, M.D.; MÉNDEZSÁNCHEZ, S.C.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): Complexation with oxovanadium (IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 5, p. 749-57, 2009.

OGAWA Y, INOMATA T, YOSHIDA S, MAEDA T, SEGUCHI H. Experimental study of the antitumor effect of Z-100 in the treatment of MM46 tumor transplanted in C3H/He mice. 2. Effect of the combination therapy of radiation and long term administration of Z-100. **Nippon Gan Chiryo Gakkai Shi**, v.24, p.51–6, 1989.

OHSAKI, A.; YAN, L.T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y.; **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** 4, 2889, 1994.

ONWELUZO, J. C.; RAMESH, H. P.; THARANATHAN, R. N. Characterization of free sugars and xyloglucan-type polysaccharides of two tropical legumes. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 253-257, 2002.

OLIVEIRA, D. A.; MOREIRA .P. A; JÚNIOR, A. F.M; PIMENTA; SILVA., A. Potential of plants biodiversity of the north region of Minas Gerais state. **Unimontes Científica**. v.8, n.1 - jan./jun. 2006.

PAIVA, E.A.S. Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae). *C. R. Biologies*, v. 332 p. 1078–1084, 2009.

PAL, D.; NAYAK, A.K. Novel tamarind seed polysaccharide alginate mucoadhesive microspheres for oral gliclazide delivery: invitro-invivoevaluation. **DrugDelivery**, vol.19, n.3, p. 123–131, 2012.

PAULY, M.; FREIS, O.; PAULY, G. Galactomannan and xyloglucan: Bio-active polysaccharides. **Altured's Cosmetics & Toiletries**, v. 114, p. 65-78, 1999.

PEDERSEN, P. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers" most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. **Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 211-222, 2007.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Rev. bras. Bot.**, v. 25, 2002.

PENG S.Y.; NORMAN J.; CURTIN G.; CORRIER D.; MCDANIEL H.R.; BUSBEE D. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. **Molecular Biotherapy**, v.3, p. 79–87, 1991.

PEREIRA, C; OLIVEIRA, A; PAZIN, M; DORTA, D. J. Mitocôndria como Alvo para Avaliação de Toxicidade de Xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 25, P. 1-14, 2012.

PETKOWICZ, C.L.O.; RECHIA,C.G.V.; BUSATO, A.P.; REICHER, F. Xiloglucanas: estrutura, propriedades e aplicações. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carboidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. Ed. USP, São Paulo-SP. 2006.

PICOUT, D.R.; ROSS-MURPHY, S.; ERRINGTON, N.; HARDING, S.E. Pressure cell assisted solubilization of xyloglucans: tamarind seed polysaccharide and detarium gum. **Biomacromolecules**, v.4, p.799-807, 2003.

PINTI, M.; TROIANO, L.; NASI, M.; FERRARESI, R.; DOBRUCKI, J.; COSSARIZZA, A. Hepatoma Hep G2 cells as a model for in vitro studies on mitochondrial toxicity of antiviral drugs: which correlation with the patient? **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, v. 17, p. 166-171, 2003.

PIO, CORRÊA M. Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, vol.2. **Imprensa Nacional**, Rio de Janeiro, 1984.

PONCE, N.M.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; FLORES, M.L.; STORTZ, C.A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 153–165, 2003.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RAY, R. S.; BASU, M.; GHOSH, B.; SAMANTA, K.; CHATTERJEE, M. Vanadium, a versatile biochemical effector in chemical rat mammary carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 51, n. 2, p. 184-96, 2005

RAY, R.S.; RANA, B; VENU,V.; CHATTERJEE, M. **Vanadium mediated apoptos and cell cycle arrest in MCF7 cell line.** *Chemico-Biological Interactions*, v. 163, p. 239-247, 2006.

RODRÍGUEZ-MERCADO JJ, MATEOS-NAVA RA, ALTAMIRANO-LOZANO MA. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides in vitro. **Toxicol In Vitro**, v. 25, p. 1996-2002, 2011.

ROSÁRIO, M.M.T.; NOLETO, G.R.; BENTO, J.F.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M.; PETKOWICZ, C.L.O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, v.69, p. 464–472, 2008.

ROSARIO, M.M.; KANGUSSU-MARCOLINO, M.M.; DO AMARAL, A.E.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. Storage xyloglucans: potent macrophages activators. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, n. 1-2, p. 127-33, 2011.

SABBIONI E, POZZI G, DEVOS S, PINTAR A, GASELLA L, FISCHBACH M. The intensity of vanadium (V)-induced cytotoxicity and morphological transformation in BALB/3T3 cells is dependent on glutathione mediated bioreduction to vanadium. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 2565–8. 1993.

SAIMA, Y.; DAS, A.K.; SARKAR, K.K.; SEN, A.K.; SUR, P. An antitumor pectic polysaccharide from *Feronia limonia*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 333–335, 2000.

SCHEPETKIN, I.A e QUINM, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunology**, v. 6, p. 317– 333, 2006.

SCHWARZ K, MILNE DB. Growth effects of vanadium in the rat. **Science**, v. 174, p. 426-8, 1971.

SCHON, E A; Mitochondria, **Neuroscience for Neurologists**. January 28, 2003.

SEFEHRI, H.; ROGHANI, M.; HOUDEBINE, M.L.; Oral administration of pectinrich plant extract enhances C3 and C4 complement concentration in woman colostrum. **Reproduction Nutrition Development**, v.38, p. 255–60, 1998.

SEO, S.J; AKAIKE, T; CHOI, Y; SHIRAKAWA, M; KANG, I. Alginate microcapsules prepared with xyloglucan as a synthetic extracellular matrix for hepatocyte attachment. **Biomaterials**. v.26, p. 3607-3615, 2005

SILVA, A.C. Uma atualização sobre a influência de plantas medicinais em tratamentos de quimioterapia. [Dissertação de mestrado] Coimbra, Portugal, 2013.

SILVEIRA, J. da C. Avaliação dos Efeitos Imunomoduladores e Citotóxicos de Polissarídeos de *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbaril*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

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

SORIANO, A; VARONA, A; GIANCHANDANI, R; MONEVA, M. E; ARRANZ, J; GONZALEZ, A; BARRERA, M. Selection of patients with hepatocellular carcinoma for liver transplantation: Past and future. **World Journal of Hepatology**. v.8, p. 58-68, 2016.

SOARES, S. S.; GUTIERREZ-MERINO, C.; AURELIANO, M. Decavanadate induces mitochondrial membrane depolarization and inhibits oxygen consumption. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 5, p. 789-96, 2007

SREELEKHA, T. T.; VIJAYAKUMAR, T.; ANKANTHIL, R.; VIJAYAN, K. K.; NAIR, M. K. Immunomodulatory effects of a polysaccharide from *Tamarindus indica*. **Anti-Cancer Drugs**, v. 4, p. 209-212, 1993.

SUDHAKAR, V.; SINGHAL, R.S.; KULKAMI, P.R. Starch-galactomannan interactions: functionality and rheological aspects, **Food Chemistry**, v. 55, p. 259264, 1996

TALARICO, L.B.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; SCOLARO, L.A.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia cremulata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 34, p. 63-71, 2004.

TAKAKU, T; KIMURA, Y; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compounds from *Agaricus blazei* Murill and its Mechanism of Action. **The Journal of Food Science**, v. 131, p.1409-1413, 2001.

THOMPSON, K.H; SUN, Y; BELLMAN, K.D; IA; SETYAWATI; KURANARATNE, B.O; RAWJI, G; WHEELER, J; SUTTON, K; BHANOT, S; CASSIDY, C; McNEILL, J.H; YUEN, V.G; ORVING, C. Preparation and characterization of vanadyl complexes with bidentate maltol-type ligands; in vivo comparisons of anti-diabetic therapeutic potential. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, p.66-67, 2003.

TZIANABOS, A.O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 523-533, 2000.

UCCELLO-BARRETTA, G.; NAZZI, S.; ZAMBITO, Y.; DI COLO, G.; BALZANO, F.; SANSÒ, M. Synergistic interaction between Tspolysaccharide and hyaluronic acid: implications in the formulation of eye drops. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 395, n.1-2, p.122–131, 2010.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, n.2, p.273-286, 2002.

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

WANG, Q; TONG-TONG, L; FU, Y; WANG, K. YANG, X. Vanadium compounds discriminate hepatoma and normal hepatic cells by differential regulation of reactive oxygen species. **J. Biol Inorg Chem.** v. 15, p. 1087-1097, 2010.

WEN, S.; ZHU, D; HUANG, P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. **Future Med Chem.** v.5 p.53–67. 2013.

WHITAKER, R. M; DANIEL, C; CRAIG, C; RICK, G. Mitochondrial Biogenesis as a Pharmacological Target: A New Approach to Acute and Chronic Diseases. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology.** v.56, p. 229-49, 2016.

WHO -2011 World Health Organization - The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. 12p.

WU, Y; MAY, Z; WANG,D; ZHAO,B; PAN, H; LIU, L. DAI,W; JIANG, H. Sodium orthovanadate inhibits growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in na orthotopic model in vivo. **Cancer Letter.** v. 351, p. 108-116, 2014.

XIE, W.; XU, P.; WANG, W.; LIU, Q. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 35-40, 2002.

XIONG. S. L.; LI, A.; LU. F.;, HOU, D. Antioxidant and immunoregulatory activity of different polysaccharide fractions from tuber of *Ophiopogon japonicus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1273–1280, 2011.

YALIN, W.; ISHURD, O.; CUIRONG, S.; YUANJIANG, P.; Structure analysis and antitumor activity of (1→3)- β -d-glucans (cordyglucans) from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. **Planta Medicine**, v.71, p. 381–4, 2005.

YU, L. H., X.; PAN, Q.; YANG, L.; XU, Y.; ZHAO, G.; WANG, H.; WU, J.; LIU, K.; CHEN, J. Interactions between metal ions and carbohydrates. Syntheses and spectroscopic studies of several lanthanide nitrate–D-galactitol complexes. **Carbohydr Research**, v. 346, p. 2278-2284, 2011.

YUEN, M.F; HOU, J.L; CHUTAPUTTI, A. Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, p. 346-353, 2009.

ZHAO, Y.; YE, L.; LIU, H.; XIA, Q.; ZHANG, Y.; YANG, X.; WANG, K. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 4, p. 371-8, 2010.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. “Anticancer polysaccharides from natural resources a review of recent research” **Carbohydra**, v. 90, n. 4, p. 1395–1410, 2012.

8 ANEXO I

