

**AMANDA DO ROCIO ANDRADE PIRES**

**DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS:  
DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E TOXICIDADE EM CÉLULAS HEPG2**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Silvia Maria Suter Correia Cadena

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Guilhermina Rodrigues Noletto

Curitiba  
2011

*Dedico este trabalho a razão da minha vida...  
da minha luta...  
da minha felicidade...  
Aos meus amores...  
Minha Mãe, meu esposo, meus irmãos e minha querida professora Sílvia.*

## *Agradecimentos*

*À Deus, Pai amado que me concedeu a vida e a oportunidade de realizar este sonho e que sempre me amparou e consolou em todos os momentos de minha vida.*

*À minha amada Mãe Maria de Fátima que sempre deu o seu melhor, o seu amor incondicional... Sempre muito guerreira, me ensinou a lutar por um futuro melhor.*

*Ao meu amado esposo Celsi pelo amor restaurador, pela paciência consoladora e pelo apoio motivador. Te amo muito e você tem grande parte nesta conquista, pois foi com o seu incentivo que eu persisti*

*À querida professora Silvia Cadena, um exemplo de pessoa e profissional, que sempre se dedicou muito na orientação deste trabalho. Sou muito grata pela paciência, carinho, entusiasmo, apoio e pela possibilidade de conviver estes seis anos com sua pessoa maravilhosa.*

*Aos meus irmãos Rafaela pelo carinho e Fabiano pelo apoio, incentivo e pelo auxílio computacional.*

*À minha tia Elizabeth, a Julia, a Michelli, meu pai Manoel e toda a minha família que são o motivo da minha vida.*

*À Professora Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto pela co-orientação e auxílio com os experimentos.*

*Às Professoras Dra. Maria Eliane Merlin Rocha, Glaucia Regina Martinez, Eva Carnieri pela correção dos relatórios, artigos e textos.*

*Aos demais professores do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular.*

*À minhas queridas amigas do Laboratório Carol, Regina, Gisele, Lyvia, Beth e Andreia pelas conversas e desabafos, pelas risadas e descontração que tornam o dia-a-dia muito mais agradável.*

*Ao Glaucio pela ajuda nos experimentos de fragmentação de DNA.*

*Aos colegas Jonas e Paulo pela ajuda com os animais e o Thiago pela ajuda com os programas de computador*

*Aos colegas de laboratório Anna e Gustavo pelo auxílio nos experimentos e a todos que me ajudaram na realização deste trabalho.*

*À Professora Áurea Echevarria pela gentil doação dos compostos estudados neste trabalho.*

*As minhas amigas queridas Michele, Fabiana, Nelissa e Viviane, pelos passeios, os desabafos e as risadas...*

*Às técnicas de laboratório Silvana e Franciane*

*Ao "Nino" do departamento de Biologia Celular pelo auxílio nos ensaios de morfologia.*

*Aos funcionários do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.*

*À Coordenação do Curso de Pós-Graduação e professores do Departamento de Bioquímica da UFPR,*

*À Sra. Marilza e Irene pelo auxílio prestado.*

*À CNPq pelo auxílio financeiro.*

*Ninguém é tão grande que não possa aprender  
e nem tão pequeno que não possa ensinar*

*Pindaro*

## RESUMO

As células cancerosas são tolerantes a muitos tratamentos devido à aquisição de mecanismos de resistência à apoptose e por apresentarem um programa proliferativo anormal. Neste contexto, o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antitumoral e o entendimento de seu mecanismo de ação é essencial. Os compostos mesoiônicos têm mostrado atividade contra diferentes linhagens tumorais, a qual tem sido atribuída às suas características físico-químicas. Dentre estes compostos, os derivados 1,3,4-tiadiazóis-2-fenilamina têm merecido destaque devido à sua importante atividade antimelanoma. No presente estudo, os efeitos de derivados desta classe, o MI-J, MI-4F, MI-2,4diF e MI-D, foram avaliados sobre mitocôndrias isoladas e cultura de células de hepatocarcinoma humano (HepG2). Em experimentos utilizando mitocôndrias isoladas, o MI-J, MI-4F e MI-2,4diF inibiram de forma dose-dependente ( $6,5 - 130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) o inchamento mitocondrial em presença de acetato sódico pela adição de glutamato mais malato e succinato. A contração da organela após adição de inibidores específicos da cadeia respiratória também foi comprometida. Experimentos de polarização de fluorescência das sondas DPH e DPH-PA em lipossomas de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), demonstraram que o derivado MI-J ( $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) diminuiu a fluidez da membrana em regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, enquanto que os derivados fluorados ( $5$  e  $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) exerceram este efeito predominantemente em regiões hidrofóbicas. Todos os derivados, de forma dose-dependente ( $5, 25$  e  $80 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína), inibiram a lipoperoxidação induzida por AAPH e  $\text{Fe}^{3+}$ /ADP/2-oxogluturato. Estes derivados, nessas mesmas concentrações, também foram capazes de sequestrar radicais superóxido e inibir a atividade da superóxido dismutase mitocondrial. Além disso, em concentrações de  $6,5$  e  $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína preveniram tanto a oxidação espontânea, como a induzida por cálcio, dos nucleotídeos de piridina. Todos os derivados ( $65$  e  $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) inibiram a captação de cálcio, enquanto que o efluxo do cátion foi inibido somente pelo MI-J ( $\sim 52\%$ ) e MI-4F ( $\sim 50\%$ ), possivelmente devido à inibição da formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) em  $100\%$  e  $50\%$ , respectivamente. Todos os derivados (MI-J, MI-4F, MI-2,4diF e MI-D) foram tóxicos para células HepG2 em cultura. Na concentração de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , os derivados reduziram em  $\sim 50\%$  a viabilidade destas células, tratadas durante 24 horas. A análise da morfologia celular mostrou alterações sugestivas de formação de *blebs*, corpos apoptóticos e retração celular, causadas pelo tratamento com os derivados ( $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 3 horas). Os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF ( $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 24 horas) promoveram o aumento da fragmentação de DNA, enquanto que o MI-D não causou alterações significativas neste parâmetro. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os derivados exercem efeito antioxidante em mitocôndrias isoladas, o qual é dependente de sua interação com a membrana mitocondrial interna. No entanto, apesar disto, são tóxicos para células HepG2 em cultura, indicando que o mecanismo responsável pela atividade antitumoral destes compostos é complexo e exige maiores investigações.

Palavras chaves: Compostos mesoiônicos. Derivados 1,3,4-tiadiazóis-2-fenilamina. Bioenergética mitocondrial. Células HepG2.

## ABSTRACT

Cancer cells are tolerant to many treatments since they possess mechanisms of resistance to apoptosis and an unusual proliferation program. In this context, the development of new drugs with antitumor activity and the understanding of their action mechanism are essential. Mesoionic compounds have shown antitumoral activity against different tumor cell lines, which has been attributed to its physical and chemical characteristics. Among these compounds, 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives have received special attention due to their antimelanoma activity. In this study, the effects of derivatives belongs to this class, MI-J, MI-4F, MI-2,4diF and MI-D, were evaluated on isolated mitochondria and on culture of human hepatocarcinoma cells (HepG2). In experiments using isolated mitochondria, MI-J, MI-4F and MI-2,4diF inhibited, in a dose-dependent way (6.5 to 130 nmol.mg<sup>-1</sup> protein), mitochondrial swelling in the presence of sodium acetate by addition of glutamate plus malate and succinate. The organelle shrinkage after addition of specific respiratory chain inhibitors was also impaired. Experiments of fluorescence polarization of DPH and DPH-PA probes in dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) liposomes, showed that the derived MI-J (5 μmol.L<sup>-1</sup>) decreased the fluidity of hydrophilic and hydrophobic regions of membrane, whereas fluorine derivatives (5 and 15 μmol.L<sup>-1</sup>) decreased it predominantly in hydrophobic regions. All derivatives, in a dose-dependent way (5, 25 and 80 nmol.mg<sup>-1</sup> protein), inhibited lipid peroxidation induced by AAPH and Fe<sup>3+</sup>/ADP/2-oxoglutarato. At the same concentrations, these derivatives were also able to scavenger superoxide radicals and to inhibit the activity of mitochondrial superoxide dismutase. In addition, at concentrations of 6.5 and 32.5 nmol.mg<sup>-1</sup> protein, they prevented either the spontaneous and calcium induced oxidation of pyridine nucleotides. All derivatives inhibited the uptake of calcium (65 and 130 nmol.mg<sup>-1</sup> protein), whereas the cation efflux was inhibited only by the MI-J (~ 52%) and MI-4F (~50%), possibly due to inhibition of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in 100% and 50%, respectively. All derivatives (MI-J, MI-4F, MI-2,4diF and MI-D) were toxic to HepG2 cells. Derivatives at concentration of 50 μmol.L<sup>-1</sup> reduced by ~50% the viability of cells treated for 24 hours. The analysis of cell morphology showed changes suggestive of blebs formation, apoptotic bodies and cell shrinkage caused by treatment with the derivatives (5 μmol.L<sup>-1</sup> for 3 hours). MI-J, MI-4F and MI-2,4diF (25 μmol.L<sup>-1</sup> for 24 h) promoted the increase of DNA fragmentation, while MI-D did not cause significant changes in this parameter. The results of this study suggest that derivatives exert antioxidant effects in isolated mitochondria, which are dependent on their interaction with the inner mitochondrial membrane. However, in despite of this, they are toxic to HepG2 cells indicating that the mechanism responsible for their antitumor activity is complex and requires additional investigations.

Key words: Mesoionic compounds. 1,3,4-Thiadiazolium-2-phenylamine derivatives. Mitochondrial bioenergetics. HepG2 cells.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	METABOLISMO MITOCONDRIAL DAS ERO.....	22
FIGURA 2	LIPOPEROXIDAÇÃO MITOCONDRIAL.....	24
FIGURA 3	TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE CÁLCIO.....	27
FIGURA 4	REPRESENTAÇÃO DAS VIAS DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE.....	31
FIGURA 5	REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO.....	32
FIGURA 6	REPRESENTAÇÃO E EXEMPLOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS DOS TIPOS A E B.....	33
FIGURA 7	ESTRUTURAS REPRESENTATIVAS DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS COM DESTACADA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	34
FIGURA 8	ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS 4-FENIL-5-X-1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS.....	35
FIGURA 9	ESTRUTURA QUÍMICA DO 1,3,4-TIADIAZÓIS[3,2a] PIRIMIDINA.....	36
FIGURA 10	ESTRUTURA QUÍMICA DO 4,5-DIFENIL-2-TIOLATO-1,3,4-TIADIAZÓLIO.....	36
FIGURA 11	ESTRUTURA DO COMPOSTOS MESOIÔNICO 1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-AMINIDA ATIVO CONTRA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	37
FIGURA 12	ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS-2-AMINIDA: <b>A.</b> COMO ÁCIDOS CONJUGADOS E <b>B.</b> COMO BASES LIVRES.....	37
FIGURA 13	ESTRUTURAS QUÍMICAS DE DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS.....	39
FIGURA 14	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MEDIÇÕES DE POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA (P).....	55
FIGURA 15	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM GLUTAMATO E MALATO DE SÓDIO.....	64

FIGURA 16	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM SUCCINATO DE SÓDIO.....	66
FIGURA 17	ESTRUTURAS DAS SONDAS DPH-PA E DPH.....	70
FIGURA 18	EFEITO DO MI-J SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH.....	73
FIGURA 19	EFEITO DO MI-4F SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH.....	74
FIGURA 20	EFEITO DO MI-2,4DIF SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH.....	75
FIGURA 21	EFEITO DO MI-J SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH-PA.....	79
FIGURA 22	EFEITO DO MI-4F SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH-PA.....	80
FIGURA 23	EFEITO DO MI-2,4DIF SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH-PA.....	81
FIGURA 24	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDA POR FERRO.....	84
FIGURA 25	DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO AAPH EM PRESENÇA DE OXIGÊNIO.....	85
FIGURA 26	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDA POR AAPH.....	86
FIGURA 27	REDUÇÃO DO NBT EM PRESENÇA DE PMS E NADH.....	88
FIGURA 28	CAPACIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS SUPERÓXIDO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS.....	89
FIGURA 29	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O ESTADO REDOX DOS NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA.....	94
FIGURA 30	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O ESTADO REDOX DOS NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA EM PRESENÇA DE CÁLCIO.....	97

FIGURA 31	ENSAIO CONTROLE DE TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL.....	99
FIGURA 32	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL.....	101
FIGURA 33	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O TRANSPORTE DE CÁLCIO MITOCONDRIAL.....	106
FIGURA 34	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE.	110
FIGURA 35	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE.....	111
FIGURA 36	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE.....	112
FIGURA 37	EFEITO DO MI-J SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2.....	117
FIGURA 38	EFEITO DO MI-4F SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2.....	118
FIGURA 39	EFEITO DO MI-2,4DIF SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2.....	119
FIGURA 40	EFEITO DO MI-D SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2.....	120
FIGURA 41	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2.....	124
FIGURA 42	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 APÓS TRATAMENTO COM MI-J.....	125
FIGURA 43	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 APÓS TRATAMENTO COM MI-4F.....	127
FIGURA 44	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 APÓS TRATAMENTO COM MI-2,4DIF.....	128
FIGURA 45	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 APÓS TRATAMENTO COM MI-D.....	129
FIGURA 46	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DE DNA APÓS 6 HORAS DE TRATAMENTO.....	132

FIGURA 47	HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DOS EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O CICLO CELULAR APÓS 6 HORAS DE TRATAMENTO.....	133
FIGURA 48	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DE DNA APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO.....	135
FIGURA 49	HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DOS EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O CICLO CELULAR APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO.....	136

#### LISTA DE TABELAS

TABELA 1	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2.....	121
----------	---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Absorbância
AAPH	2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidroclorato
ADP/O	Quociente entre nanomol de ADP e nanoátomos de oxigênio consumidos durante o estado 3
AIF	Fator inibidor de apoptose
ANT	Translocador de Nucleotídeo de Adenina
Apaf-1	Fator apoptótico ativado por protease
Arsenazo III	Ácido 2,2'-(1,8-dihidroxi-3,6-disulfonaftaleno-2,7-bisazo) bisbenzeno arsonico
BHT	Butil hidroxitolueno
BSA	Albumina de soro bovino
CARD	Domínio de recrutamento de caspase
CCR	Coeficiente de controle respiratório
Cl <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50%
COX-2	Ciclooxigenase 2
CsA	Ciclosporina A
DISC	Complexo de sinalização de indução de morte
DL <sub>50</sub>	Dose que causa morte em 50%
DMEM	Meio essencial mínimo de Dulbecco
DMPC	Dimiristoil-fosfatidilcolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPH-PA	3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenil-ácido propiônico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol bis (éter 2-amino-etil) N, N, N', N' tetracético
Endo G	Endonuclease G
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona
Gpx	Glutaciona peroxidase
Gred	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada

HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HCC	Hepatocarcinoma celular
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IAP	Proteína inibidora de apoptose
IP	Iodeto de propídio
MDA	Malondialdeído
MM	Membrana mitocondrial
MMI	Membrana mitocondrial interna
MME	Membrana mitocondrial externa
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NBT	Nitroblue tetrazólio
NOS	Óxido nítrico sintase
P	Polarização
PBS	Solução salina tamponada
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PMA	12-meristato 13-acetato forbol éster
PMS	Fenazina metassulfato
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
RaM	Modo rápido de captura
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de próton
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Tm	Temperatura média de transição de fase
TNF	Fator de necrose tumoral
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
Tpx	Tioredoxina peroxidase
TRADD	<i>TNF-receptor-associated death domain</i>
TRE	Transporte reverso de elétrons
Tred	Tioredoxina redutase
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano

TrxS <sup>-</sup>	Tioredoxina oxidada
TrxSH	Tioredoxina reduzida
TUNEL	<i>TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
UQ	Ubiquinol
UQ <sup>-</sup>	Semiquinona
UQH <sub>2</sub>	Ubiquinona
VDAC	Canal aniônico dependente de voltagem
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana
$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$	Gradiente eletroquímico de prótons
$\Delta pH$	Gradiente de pH

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1	MITOCÔNDRIAS E ESTRESSE OXIDATIVO.....	19
2.2	TRANSPORTE DE CÁLCIO E TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL.....	24
2.3	MORTE CELULAR PROGRAMADA.....	27
2.4	COMPOSTOS MESOIÔNICOS.....	32
2.4.1	Atividade biológica dos compostos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos.....	34
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	44
<b>4</b>	<b>ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b> .....	45
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
5.1	REAGENTES.....	46
5.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS...	46
5.3	ANIMAIS.....	47
5.4	ENSAIOS EM MITOCÔNDRIA DE FÍGADO DE RATOS.....	47
5.4.1	Isolamento de mitocôndrias.....	47
5.4.2	Isolamento de mitocôndrias para determinação do grau de inchamento mitocondrial em presença de substrato.....	48
5.4.3	Métodos analíticos envolvendo as preparações mitocondriais.....	48
5.4.3.1	Determinação do inchamento ( <i>swelling</i> ) em mitocôndrias energizadas.....	48
5.4.3.2	Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina.....	49
5.4.3.3	Determinação do transporte mitocondrial de cálcio.....	49
5.4.3.4	Transição de permeabilidade mitocondrial.....	49
5.4.3.5	Capacidade sequestradora de radical superóxido.....	50
5.4.3.6	Determinação da lipoperoxidação mitocondrial.....	50

5.4.3.7	Determinação da atividade de enzimas antioxidantes.....	51
5.4.3.7.1	Superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD).....	51
5.4.3.7.2	Glutaciona peroxidase (Gpx).....	51
5.4.3.7.3	Glutaciona redutase (Gred).....	52
5.5	EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS SOBRE A FLUIDEZ DE MEMBRANAS SINTÉTICAS.....	52
5.5.1	Preparo de lipossomas de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC).....	52
5.5.2	Incorporação das sonda DPH e DPH-PA.....	53
5.5.3	Determinações fluorimétricas.....	53
5.5.4	Determinação da temperatura de transição de fase (T <sub>m</sub> ).....	55
5.6	CÉLULAS.....	56
5.6.1	Procedimentos de esterilização de materiais.....	56
5.6.2	Meio de cultura.....	56
5.6.3	Soluções utilizadas no cultivo celular.....	57
5.6.3.1	Solução salina balanceada de Hanks (HBSS).....	57
5.6.3.2	Solução salina tamponada (PBS).....	57
5.6.3.3	Solução tripsina-EDTA.....	57
5.6.4	Cultura e subculturas (repiques).....	58
5.6.5	Coleta e contagem de células.....	58
5.6.6	Métodos analíticos envolvendo as células HepG2.....	58
5.6.6.1	Determinação da viabilidade celular.....	58
5.6.6.2	Análises de morfologia.....	59
5.6.6.3	Quantificação da fragmentação de DNA.....	59
5.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	60
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
6.1	INCHAMENTO MITOCONDRIAL.....	61

6.2	FLUIDEZ DE MEMBRANAS ARTIFICIAIS.....	68
6.3	LIPOPEROXIDAÇÃO.....	82
6.3.1	Lipoperoxidação induzida por Fe <sup>3+</sup> /ADP/2-oxogluturato.....	82
6.3.2	Lipoperoxidação induzida por AAPH.....	85
6.4	CAPACIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS SUPERÓXIDO..	87
6.5	ESTADO REDOX DOS NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA.....	90
6.6	TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL.....	98
6.7	TRANSPORTE DE CÁLCIO MITOCONDRIAL.....	103
6.8	ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	107
6.9	EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE CÉLULAS HEPG2.....	113
6.9.1	Viabilidade celular.....	113
6.9.2	Morfologia celular.....	122
6.9.3	Fragmentação do DNA.....	131
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO FINAL.....</b>	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>146</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>147</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>158</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os derivados cloreto de 4-fenil-5-[2-Y, 4-X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina que diferem entre si somente pelos substituintes do anel cinamoil: MI-J (Y = H e X = OH); MI-4F (Y = H e X = F), MI-2,4diF (Y = X = F) e o MI-D (Y = H e X = NO<sub>2</sub>) são compostos de grande interesse biológico por apresentarem atividade antitumoral contra diferentes tipos de tumor, dentre estes o melanoma, um tumor agressivo e resistente à terapia (GRYNBERG; SANTOS; ECHEVARRIA, 1997; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003; 2004a). Considerando o envolvimento das mitocôndrias nos mecanismos de morte celular, os efeitos destes compostos foram avaliados anteriormente sobre parâmetros relacionados à bioenergética mitocondrial (PIRES *et al.*, 2010). Naquele estudo, demonstrou-se que estes derivados promovem o desacoplamento da fosforilação oxidativa, a inibição do transporte de elétrons e alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, sendo estes efeitos de intensidade diferente para cada derivado e dependente do substituinte do anel cinamoil.

Os resultados dos trabalhos anteriores realizados com os derivados 1,3,4-tiadiazóis fenilamina justificam a continuidade das investigações sobre os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral destes compostos. Desta forma, para melhor estabelecer o grau de correlação entre os efeitos sobre a bioenergética mitocondrial e a atividade antitumoral descrita, bem como delinear o provável mecanismo de ação destes compostos, neste estudo avaliou-se o efeito destes derivados sobre a fluidez e permeabilidade em membranas artificiais; o transporte de cálcio, a transição de permeabilidade, a lipoperoxidação e a atividade das enzimas antioxidantes em mitocôndrias isoladas. Também foi realizada uma análise em nível celular utilizando o modelo de hepatocarcinoma humano (células HepG2), uma das neoplasias mais comuns, cujo tratamento disponível atualmente ainda é ineficaz em muitos casos. Ainda, este modelo experimental é considerado excelente para investigação da toxicidade de compostos sobre as funções mitocondriais e celulares.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MITOCÔNDRIA E ESTRESSE OXIDATIVO

A mitocôndria é uma organela citoplasmática, delimitada por dupla membrana, que participa de uma variedade de processos fisiológicos através da produção de ATP, regulação da sinalização celular e amplificação da resposta de morte celular programada. A membrana mitocondrial externa (MME), tem composição semelhante a de outras membranas eucarióticas, enquanto que a interna (MMI), de origem procariótica, difere-se da primeira tanto na composição quanto nas propriedades físicas (ULIVIERI, 2010). A MMI é dobrada em inúmeras cristas, as quais aumentam a área superficial e contém muitas proteínas e complexos protéicos, envolvidos no transporte de elétrons, síntese de ATP e transporte de metabólitos. A MME apresenta muitos canais aniônicos dependentes de voltagem (VDAC), os quais são permeáveis a solutos até 5000 Da. Por outro lado, a MMI é impermeável a muitos íons e solutos e esta propriedade permite a criação de um gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ), formado como resultado do bombeamento de prótons acoplado ao transporte de elétrons na cadeia respiratória, o qual é indispensável para a síntese de ATP pela ATPsintase (KROEMER; REED, 2000). As mitocôndrias provêm mais de 90% do ATP produzido pela célula através da fosforilação oxidativa e, portanto, durante o processo de morte celular, estas organelas têm papel crucial na definição do destino celular entre os processos de apoptose e necrose (ULIVIERI, 2010; LEIST *et al.*, 1997). Além disso, o metabolismo energético mitocondrial é reconhecido como a mais importante fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) na maioria das células eucarióticas (KOWALTOSKI *et al.*, 2009).

Durante o processo de transferência de elétrons na cadeia respiratória cerca de 1 – 2% de todo o oxigênio consumido é parcialmente reduzido, resultando na formação de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (ADAM-VIZI; CHINOPOULOS, 2006; BROOKES *et al.*, 2004). A redução monoelétrica do oxigênio ocorre principalmente no complexo I (NADH desidrogenase) e complexo III (ubiquinona-citocromo *c* oxiredutase) da cadeia respiratória. As ERO são produzidas pelo complexo III devido a formação de um radical semiquinona ( $UQ^{\cdot-}$ ) durante a transferência de elétrons no ciclo da coenzima Q ( $UQH_2$ ). Devido ao alto poder

reduzido do par semiquinona / ubiquinol ( $UQ^{\cdot-}/UQ$ ), a geração de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pode ocorrer de forma dependente do acesso do oxigênio a este sítio. Já o complexo I é reconhecido como o local de maior formação de ERO, sendo que em presença de substratos que geram NADH, esta produção ocorre a uma velocidade baixa, entretanto, quando inibido por rotenona, os níveis de NADH alcançam um máximo e a produção de ERO é significativamente estimulada. Além disso, uma significativa parcela da produção de ERO se deve ao transporte reverso de elétrons (TRE) do complexo II para o I (ADAM-VIZI; CHINOPOULOS, 2006; KOWALTOSKI *et al.*, 2009). Nesta situação o succinato doa elétrons para o complexo II via  $FADH_2$  e estes elétrons são transferidos para o complexo III e IV até o oxigênio. Concomitantemente a transferência de elétrons ocorre o bombeamento de prótons que gera uma diferença de potencial transmembrana suficiente para induzir o retorno de elétrons do complexo II para o complexo I através do TRE. Neste caso, o succinato age como doador de elétrons para o complexo I, promovendo a redução do  $NAD^+$ , e como substrato para o complexo III (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

A mitocôndria também produz óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), através da reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). O  $NO^{\cdot}$  pode inibir a transferência de elétrons no complexo IV e, desta forma, aumentar a produção de  $O_2^{\cdot-}$  (CADENAS, 2004). Além disso, o  $O_2^{\cdot-}$  e o  $NO^{\cdot}$  reagem na matriz mitocondrial formando outras espécies reativas como o superóxido protonado ( $HO_2^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Desde que a ligação O-O é relativamente fraca, o  $H_2O_2$  facilmente se decompõe gerando  $HO^{\cdot}$ . A decomposição do  $ONOO^-$  protonado ( $ONOOH$ ) gera além do  $HO^{\cdot}$ , o dióxido de nitrogênio ( $^{\cdot}NO_2$ ) (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; NAVARRO, 2004). Em adição, o  $H_2O_2$  pode reagir com metais de transição, principalmente o ferro ( $Fe^{2+}$ ) e formar  $HO^{\cdot}$ , o qual é extremamente reativo (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

O superóxido que pode ser convertido a  $H_2O_2$  por dismutação espontânea ou por ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (BROOKES *et al.*, 2004). Em humanos, esta enzima apresenta-se em três diferentes isoformas, sendo elas a CuZn-SOD presente no citosol, a Mn-SOD na matriz mitocondrial e a extracelular EC-SOD (VALKO *et al.*, 2006). O  $H_2O_2$  resultante desta reação é substrato para a enzima catalase que promove a sua redução a água. Além desta enzima, o  $H_2O_2$  também é substrato para as enzimas glutatona peroxidase (Gpx) e tioredoxina peroxidase (Tpx), as quais reduzem o peróxido de hidrogênio a água utilizando

como doadores de elétrons a glutathiona (GSH) e a tioredoxina (TSH), respectivamente. Acoplado a estas reações, as enzimas glutathiona redutase (Gred) e tioredoxina redutase (Tred) restabelecem a forma reduzida da GSH e a TSH utilizando como doador de elétrons o NADPH. A transidrogenase mitocondrial, uma proteína integral da MMI, reduz novamente o  $\text{NADP}^+$  utilizando o NADH, concomitantemente ao bombeamento de prótons para a matriz mitocondrial. O NADPH pode ser restaurado, também, pela ação da enzima isocitrato desidrogenase utilizando isocitrato como substrato. Como consequência da formação de ERO ocorre o aumento da razão  $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$  mitocondrial, além da diminuição dos níveis de GSH (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001; VALKO *et al.*, 2006; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). O resumo do sistema antioxidante mitocondrial está representado na figura 1.

Os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são nocivos e relacionados com o processo de envelhecimento e patologias como o câncer, doenças cardiovasculares, inflamatórias e degenerativas (WINTERBOURN, 2008; NIKI, 2009). As ERO são geradas continuamente durante o processo de transporte de elétrons e apresentam um potencial para danificar muitas moléculas biológicas tais como proteínas, DNA e lipídeos (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). O radical hidroxila e o oxigênio singlete são as principais ERO que afetam diretamente o DNA, entretanto, o dano a esta biomolécula também pode ocorrer em presença de outros pró-oxidantes (AVERY, 2011). As alterações no DNA mitocondrial podem ser maiores devido a sua proximidade dos sítios geradores e ausência de histonas, em comparação ao DNA nuclear (ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011). Outro alvo das ERO são as proteínas que podem sofrer alterações na sua estrutura e função. Alguns fatores determinam a maior susceptibilidade ao ataque de radicais, tais como a presença de resíduos de aminoácidos mais sensíveis a oxidação como a metionina e a cisteína, presença de sítios de ligação de metais, localização celular, conformação e velocidade de degradação (AVERY, 2011). Por exemplo, o radical superóxido pode oxidar e inativar proteínas com centros ferro-enxofre (Fe-S) tal como a aconitase. A inativação da aconitase resulta na liberação de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , os quais podem levar a formação do radical hidroxila que, por sua vez, pode atacar o DNA e lipídeos, aumentando o dano oxidativo (ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011). Entretanto, poucas evidências mostram que a oxidação de proteínas por ERO resulta em morte celular (AVERY, 2011).

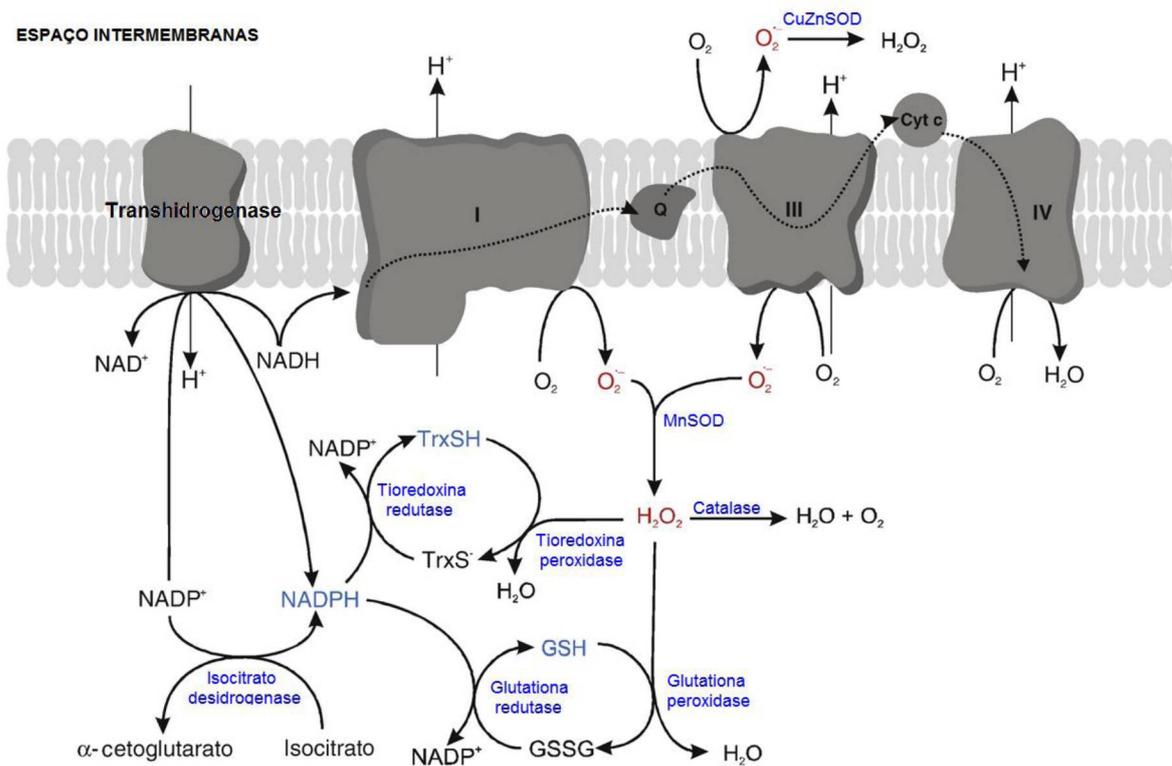


FIGURA 1 - METABOLISMO MITOCONDRIAL DAS ERO.

FONTE: Kowaltowki *et al.* (2009).

NOTA: O radical superóxido formado nos complexos I e III é dismutado a  $H_2O_2$  pela CuZn-SOD ou Mn-SOD no espaço intermembranar ou na matriz, respectivamente. O  $H_2O_2$  pode ser removido pela glutaciona peroxidase e pela tio redoxina peroxidase usando glutaciona reduzida (GSH) ou tio redoxina reduzida (TrxSH), respectivamente ou pela catalase. A glutaciona (GSSG) e tio redoxina oxidada (TrxS $^{\bullet}$ ) são reduzidas pela enzimas glutaciona redutase e tio redoxina redutase, respectivamente usando NADPH como fonte de elétrons. O  $NADP^+$  pode ser novamente reduzido pela transhidrogenase mitocondrial ou pela enzima isocitrato desidrogenase.

A oxidação de lipídeos por ERO é um processo que está relacionado com diversas alterações, principalmente na estrutura de membranas. Este processo é conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação e tem como resultado a conversão de lipídeos insaturados em hidroperóxidos lipídicos polares, os quais podem causar a redução da fluidez de membranas e a perda da atividade de proteínas integrais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Extensiva lipoperoxidação tem sido relacionada com a perda da integridade de membranas e com a morte celular (AVERY, 2011).

A lipoperoxidação é um processo metabólico natural sobre condições aeróbicas normais e é uma das mais pesquisadas conseqüências da ação das ERO

sobre a função e estrutura das membranas (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Este processo é iniciado pelo ataque a cadeias de ácido graxos por espécies químicas que tem reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio do carbono metileno (figura 2). O grande número de duplas ligações presentes nas cadeias de ácidos graxos facilitam a remoção de um átomo de hidrogênio bis-aliílico do carbono adjacente as duplas ligações e, desta forma, confere aos ácidos graxos poliinsaturados uma maior susceptibilidade a peroxidação (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

O  $O_2^{\cdot-}$  e o  $NO^{\cdot}$  não possuem reatividade suficiente para iniciar a lipoperoxidação diretamente, entretanto, este processo pode ser desencadeado pelo radical  $HO^{\cdot}$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; NIKI, 2009). O radical centrado no carbono, formado após a abstração do hidrogênio do carbono metileno (radical lipídico), sofre um rearranjo para uma configuração mais estável formando dienos conjugados. Estes, em presença de oxigênio, podem formar o radical lipoperoxil. Este radical apresenta reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio das cadeias lipídicas e, desta forma, participa da propagação da lipoperoxidação, sendo que o ataque do radical lipoperoxil a outras cadeias lipídicas forma um hidroperóxido lipídico e um novo radical lipídico. Por outro lado, o radical lipoperoxil pode sofrer uma adição intramolecular formando endoperóxido lipídico (BUEGE; AUST, 1978; NIKI, 2009).

Uma série de produtos como os aldeídos malondialdeído, acroleína e 4-hidroxi-2-nonenal, além de outros como oxisteróis e isoprostanas podem ser formados como produtos secundários e de degradação durante a lipoperoxidação (NIKI, 2009). Os produtos formados durante a lipoperoxidação são rapidamente metabolizados e excretados por eficientes mecanismos de defesa *in vivo*, sendo um deles executados pelas enzimas glutathione peroxidase e a selenoproteína P que reduzem o hidroperóxido lipídico ao seu correspondente álcool (NIKI, 2009). A figura 2 ilustra o processo de iniciação e propagação da lipoperoxidação.

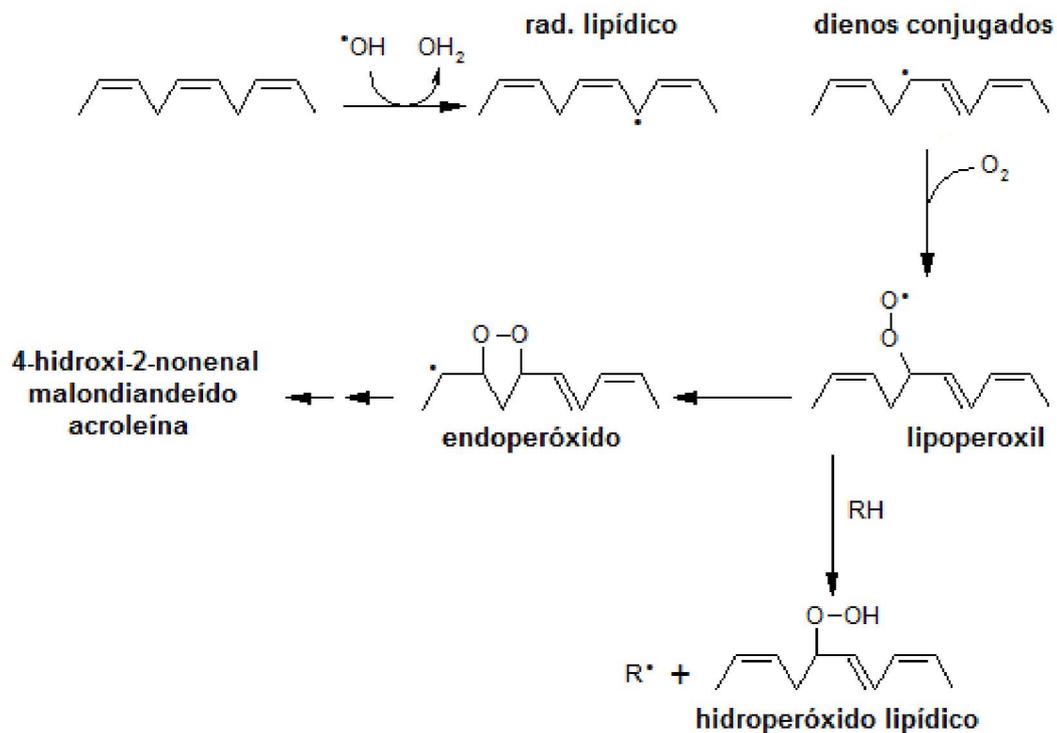


FIGURA 2- LIPOPEROXIDAÇÃO MITOCONDRIAL  
 FONTE: Buege; Aust (1978); Niki (2009)  
 NOTA: O radical hidroxila ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) abstrai um átomo de hidrogênio bis-alílico da cadeia lipídica formando o radical lipídico ( $\text{R}^{\bullet}$ ). Este forma dienos conjugados após rearranjo e pode reagir com o oxigênio formando o radical lipoperoxil. Este por sua vez, pode abstrair um átomo de hidrogênio de um lipídeo adjacente ( $\text{RH}$ ) ou formar um endoperóxido. A formação de endoperóxido lipídico tem como um dos produtos de degradação o malondialdeído.

## 2.2 TRANSPORTE DE CÁLCIO E TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

O cálcio atua como segundo mensageiro em muitos processos biológicos, incluindo a proliferação celular, a transcrição de genes, as modificações pós-traducionais de proteínas e metabolismo aeróbico (RASOLA; BERNARDI, 2011). Mitocôndrias isoladas são capazes de acumular grandes quantidades de cálcio, em processo dirigido pela respiração (CARAFOLI, 2010). Sabe-se que a entrada de cálcio no espaço intermembranas é regulada por um canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), que é inibido por vermelho de rutênio (BROOKES *et al.*, 2004). Já a entrada do cátion na matriz mitocondrial também ocorre por um mecanismo de uniporte, dependente do aumento do potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) e caracterizado

pela inibição por vermelho de rutênio ou, ainda, por outro sistema conhecido por modo rápido de captura (RaM), o qual ocorre em uma escala de milissegundos e permite rápidas mudanças na concentração de cálcio mitocondrial e citosólico (BROOKES *et al.*, 2004; RASOLA; BERNARDI, 2011). Devido à entrada de duas cargas positivas, o uniporte de cálcio dissipa o  $\Delta\Psi_m$ . Através destes mecanismos a mitocôndria pode acumular uma quantidade de cálcio aproximadamente cem vezes maior em relação a quantidade inicial, mas isto só é possível em presença de fosfato (CARAFOLI, 2010). O fosfato inorgânico (Pi) entra na matriz mitocondrial por antiporte com hidroxila ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{OH}^-$ ) ou simporte com  $\text{H}^+$  ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-:\text{H}^+$ ), o que promove uma diminuição no  $\Delta\text{pH}$ . No entanto, a formação do complexo fosfato-cálcio impede que ocorra a dissipação da força próton-motriz, uma vez que impede as variações promovidas pelo Pi no  $\Delta\text{pH}$  e pelo cálcio no  $\Delta\Psi_m$ . O complexo formado é inativo osmoticamente, mas rapidamente dissociável (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

Na matriz mitocondrial existem enzimas que são ativadas alostericamente pelo cálcio, entre elas a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, a isocitrato desidrogenase e a piruvato desidrogenase. O cátion também atua como um estimulador da ATPsintase, da  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase e do translocador nucleotídeos adenina (ANT) (BROOKES *et al.*, 2004), proteínas presentes na membrana mitocondrial interna. Desta forma, a formação de complexos cálcio-fosfato nas formas de hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] e whitlockita [ $\text{Ca}_9(\text{MgFe})(\text{PO}_4)_6\text{PO}_3\text{OH}$ ] é importante para que a mitocôndria acumule cálcio sem alterar as suas funções e, desta forma, prevenir a dissipação do  $\Delta\Psi_m$  (CARAFOLI, 2010). De modo geral, o cálcio aparece como um efetor positivo das funções mitocondriais e, qualquer perturbação no seu equilíbrio mitocondrial ou citosólico provocará implicações em diversas vias metabólicas celulares.

Além da formação dos complexos com fosfato, a mitocôndria possui dois mecanismos de efluxo para o íon que auxiliam no controle da concentração de cálcio na organela e no citosol: o antiporte com sódio ( $\text{Ca}^{2+}/n\text{Na}^+$ ) em mitocôndrias de cérebro e coração ou o antiporte com prótons ( $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ ) no caso de mitocôndrias de fígado. Neste último caso, o efluxo do íon é acoplado à atividade do antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NICHOLLS; FERGUSON, 2002). Portanto, tanto o influxo quanto o efluxo de cálcio na mitocôndria consomem  $\Delta\Psi_m$  e são, portanto, dependentes do bombeamento de prótons pela cadeia respiratória (BROOKES *et al.*, 2004).

Adicionalmente, quando a mitocôndria é exposta a concentrações elevadas de cálcio, pode ocorrer o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial através da formação de um poro que é chamado de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) (RASOLA; BERNARDI, 2011). O PTPM é postulado como um complexo multimérico que ocorre em condições específicas no sentido de evitar o dano mitocondrial devido à sobrecarga de cálcio (RASOLA; BERNARDI, 2011). Este processo inclui várias proteínas mitocondriais localizadas na membrana mitocondrial interna e externa, sendo descrito o envolvimento do VDAC, do translocador de nucleotídeo adenina (ANT) e da ciclofilina D na constituição do PTPM (HAIL JR, 2005). A abertura do PTPM promove o colapso do gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ), a hidrólise de ATP e o inchamento mitocondrial, além do extravasamento de proteínas pró-apoptóticas para o citosol, como citocromo *c* e caspases. Portanto, a formação do PTPM está intimamente ligada com a indução de morte celular (BATANDIER *et al.*, 2004; CARAFOLI, 2010).

A abertura ou formação do PTPM pode ser desencadeada por altas concentrações de cálcio mitocondrial e outros estímulos, incluindo a presença de oxidantes e o esgotamento das formas reduzidas do  $NAD^+$  e  $NADP^+$ . Em contrapartida, este pode ser inibido por ciclosporina A, a qual se liga a ciclofilina D, uma *cis/trans*-prolil-isomerase na matriz ou pela presença de antioxidantes, como por exemplo, a glutatona reduzida (GSH) (ZORATTI; SZABÓ, 1995; BROOKES *et al.*, 2004). A inibição do influxo de cálcio por EGTA ou vermelho de rutênio também previne a abertura do poro (ZORATTI; SZABÓ, 1995), enquanto que o acúmulo ERO pode promover a sua abertura devido à formação de ligações cruzadas pela oxidação de grupos tióis de proteínas da membrana interna (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001). A figura 3 mostra as vias de influxo e efluxo de cálcio na mitocôndria.

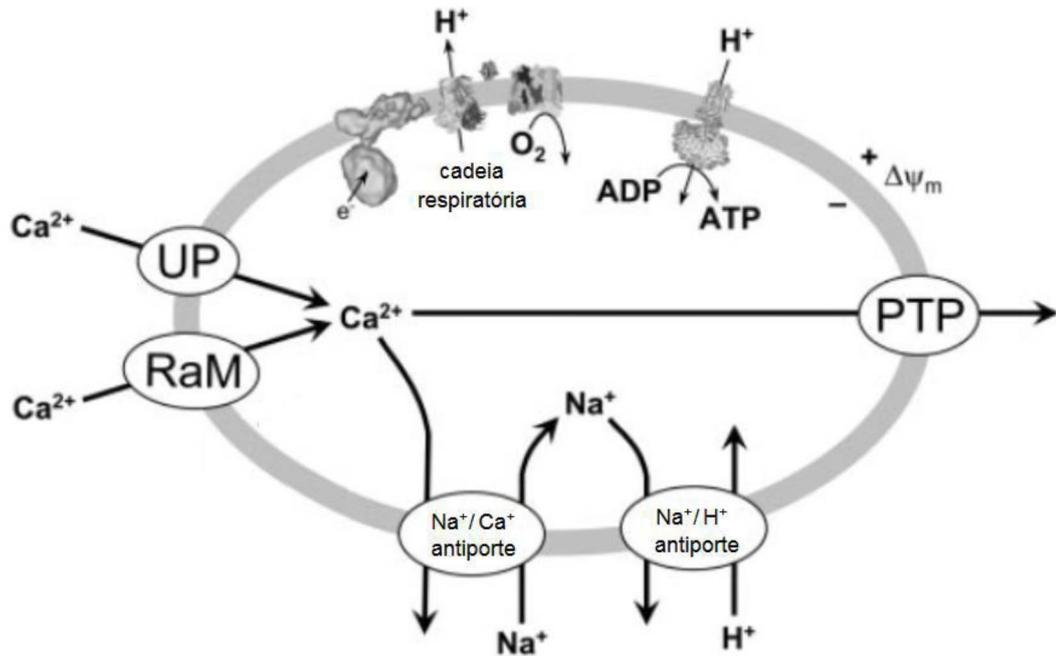


FIGURA 3 - TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE CÁLCIO.

FONTE: Adaptado de Brookes *et al.* (2004).

NOTA: A figura mostra os mecanismos de influxo de cálcio por uniporte (UP) ou pelo modo rápido de captura (RaM), e de efluxo por antiporte com prótons ou através do poro de transição de permeabilidade (PTP). O íon cálcio sai da matriz por antiporte com o íon sódio e este, por sua vez, retorna a matriz em troca de prótons, desta forma, em resumo o cálcio sai da matriz em troca de próton. A membrana externa e o complexo II foram omitidos da ilustração para maior clareza.

### 2.3 MORTE CELULAR PROGRAMADA

A morte celular é um fenômeno importante que ocorre freqüentemente em organismos multicelulares com o objetivo de manter a homeostase dos tecidos (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Ela pode ocorrer por dois modos principais: a apoptose e a necrose. A necrose é um tipo de morte celular associada com uma disfunção celular aguda em resposta a condições de estresse severo ou após exposição a agentes tóxicos (SAMALI, *et al.*, 1999; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Este processo de morte não envolve nenhum padrão de degradação do DNA e de proteínas e é acompanhado por inchamento da matriz mitocondrial e citoplasmático causando ruptura celular (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHE-RIGON, 1998; ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011). Por outro lado, a apoptose é um mecanismo celular estritamente regulado, que ocorre em um determinado momento como parte do desenvolvimento normal do organismo, sendo responsável pela

remoção de células desnecessárias, velhas ou danificadas e que ocorre continuamente no sentido de compensar a multiplicação das células por mitose (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHE-RIGON, 1998; ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011). É caracterizada como um processo dependente de caspases, que é uma família de cisteína proteases conhecidas como executoras da apoptose, devido as alterações morfológicas resultantes de sua atividade (PARONE; JAMES; MARTINOU, 2002). A morte injustificada por apoptose ou necrose contribui para a etiologia de muitas doenças crônicas e agudas, incluindo isquemia, síndromes neurodegenerativas e infecciosas. Por outro lado, o comprometimento da apoptose é freqüentemente associada com condições hiperproliferativas tal como doenças auto-imunes e câncer (KEPP *et al.*, 2011).

O processo de morte celular por apoptose está associado com mudanças morfológicas e bioquímicas características como dissipação do potencial e permeabilização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo *c*, ativação de caspases, clivagem do DNA, perda de aderência à matriz extracelular e à células vizinhas, retração celular, condensação da cromatina, exposição do fosfolípídeo fosfatidilserina na superfície celular, formação de projeções da membrana celular (*blebs*) e liberação de fragmentos celulares envoltos em membrana chamados corpos apoptóticos (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; KEPP *et al.*, 2011; ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011).

A apoptose é regulada através de duas vias de sinalização distintas, a via intrínseca e extrínseca, que convergem na ativação da caspase-3 (figura 4). Na via extrínseca, que é mediada pela ligação de indutores de morte aos respectivos receptores, ocorre a ativação de um complexo de sinalização de indução de morte (DISC) que resulta na ativação da caspase-8. Como, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF), produzido pelas células do sistema imune, interage com um receptor específico TRADD (*TNF-receptor-associated death domain*) na superfície externa da membrana plasmática e ativa o complexo DISC, desencadeando a ativação da caspase-8. Esta, por sua vez, ativa diretamente a caspase-3, a qual cliva proteínas alvos levando à apoptose (ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011). Por outro lado, a via intrínseca é conhecida como via mitocondrial que envolve a liberação de citocromo *c*, ativação das caspases-9 e -3 e formação do apoptosomo (RAYCHAUDHURI, 2010), como será detalhado a seguir.

Durante a apoptose, a mitocôndria não apresenta mudanças estruturais significativas (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHE-RIGON, 1998; PARONE; JAMES; MARTINOU, 2002), entretanto, alterações no seu funcionamento estão intimamente relacionadas com a ativação deste processo (REGULA; ENS; KIRSHENBAUM, 2003; PARONE; JAMES; MARTINOU, 2002; MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998). Alterações em resposta ao estresse celular e ao estado bioenergético mediam a iniciação da apoptose por esta via, sendo que a permeabilização da membrana mitocondrial tem um papel central (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). A permeabilização da membrana mitocondrial pode ser iniciada pelos membros pró-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2 ou pelo poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) (KEPP *et al.*, 2011). Este evento permite que proteínas presentes no espaço intermembranas sejam liberadas para o citosol. Um vez no citosol, vários destes fatores liberados, incluindo o citocromo c, participam da ativação de caspases que destroem a célula por meio de uma cascata de reações (LANDES; MARTINOU, 2011). A família das proteínas Bcl-2, originalmente identificada em células de linfomas B 2 (*B-cell lymphoma-2*), é dividida em dois grupos, sendo um com propriedades anti-apoptóticas e outro com atividade pró-apoptóticas. Alguns dos membros anti-apoptóticos incluem Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, enquanto os que promovem a morte celular são Bax, Bak, Bad e Bid (REGULA; ENS; KIRSHENBAUM, 2003). Os membros Bax e Bak participam na permeabilização da membrana mitocondrial externa. Em células viáveis, Bak é uma proteína integral da membrana mitocondrial externa (MME), enquanto a Bax é encontrada no citosol. Em resposta ao estímulo de morte, a caspase-8 cliva Bid que induz Bax e Bak a sofrer uma série de mudanças conformacionais que permitem a sua oligomerização na MME e, conseqüentemente, a permeabilização da membrana mitocondrial (LANDES; MARTINOU, 2011; ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011).

O efluxo de proteínas pró-apoptóticas também pode ocorrer através do PTPM, que é um canal inespecífico de alta condutância que permite a passagem de solutos de até 1500 Da (RASOLA; BERNARDI, 2011). A permeabilização da MMI é considerada como um ponto sem retorno na cascata bioquímica que leva à apoptose pela via intrínseca. A mais proeminente conseqüência da permeabilização da membrana mitocondrial inclui a dissipação do potencial de membrana, interrupção da síntese de ATP, superprodução de ERO e liberação de proteínas tóxicas no

citossol, as quais normalmente são retidas dentro do espaço intermembranas (KEPP *et al.*, 2011). Entre as proteínas liberadas no citossol inclui-se o citocromo *c*, AIF (fator indutor de apoptose), Smac/DIABLO, Omi, pro-caspases 2, 3, 8 e 9 e endonuclease G (PARONE; JAMES; MARTINOU, 2002; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011). O efluxo do citocromo *c* presente na mitocôndria é um evento central na apoptose porque ele participa de um complexo de alto peso molecular ativado por caspases: o apoptosomo (ADRAIN; MARTIN, 2001; RAYCHAUDHURI, 2010). Além do citocromo *c*, o apoptosomo também contém deoxiATP (dATP), fator apoptótico ativado por protease 1 (Apaf-1) e caspases 9 (KEPP *et al.*, 2011). No citossol, a Apaf-1 se liga ao dATP e após hidrólise, sofre uma mudança conformacional a qual permite que esta proteína se ligue ao citocromo *c*. A ligação da Apaf-1 com o citocromo *c* promove uma mudança conformacional adicional, a qual promove a oligomerização da Apaf-1 e a exposição do domínio de recrutamento de caspases (CARD – *caspase-recruitment domain*). Neste momento, a pró-caspase-9 pode então se ligar aos oligômeros de Apaf-1 através da interação entre as duas subunidades CARD-CARD e, assim, formar o apoptosomo. Finalmente, a caspases-9 ativa é liberada do complexo Apaf-1/citocromo *c* e pode ativar as caspases efetoras 3, 6 e 7 (PARONE; JAMES; MARTINOU, 2002).

Além do citocromo *c*, outras proteínas que estão envolvidas no processo de apoptose são liberadas no citossol após permeabilização da membrana mitocondrial. A Smac/DIABLO participa indiretamente da ativação das caspases 3 e 9 por ligação a proteína inibidora de apoptose (IAP) e, AIF e endonuclease G são deslocadas para o núcleo onde induzem a condensação da cromatina e fragmentação do DNA (REGULA; ENS; KIRSHENBAUM, 2003; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011). A figura 4 mostra a representação do processo de apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca.

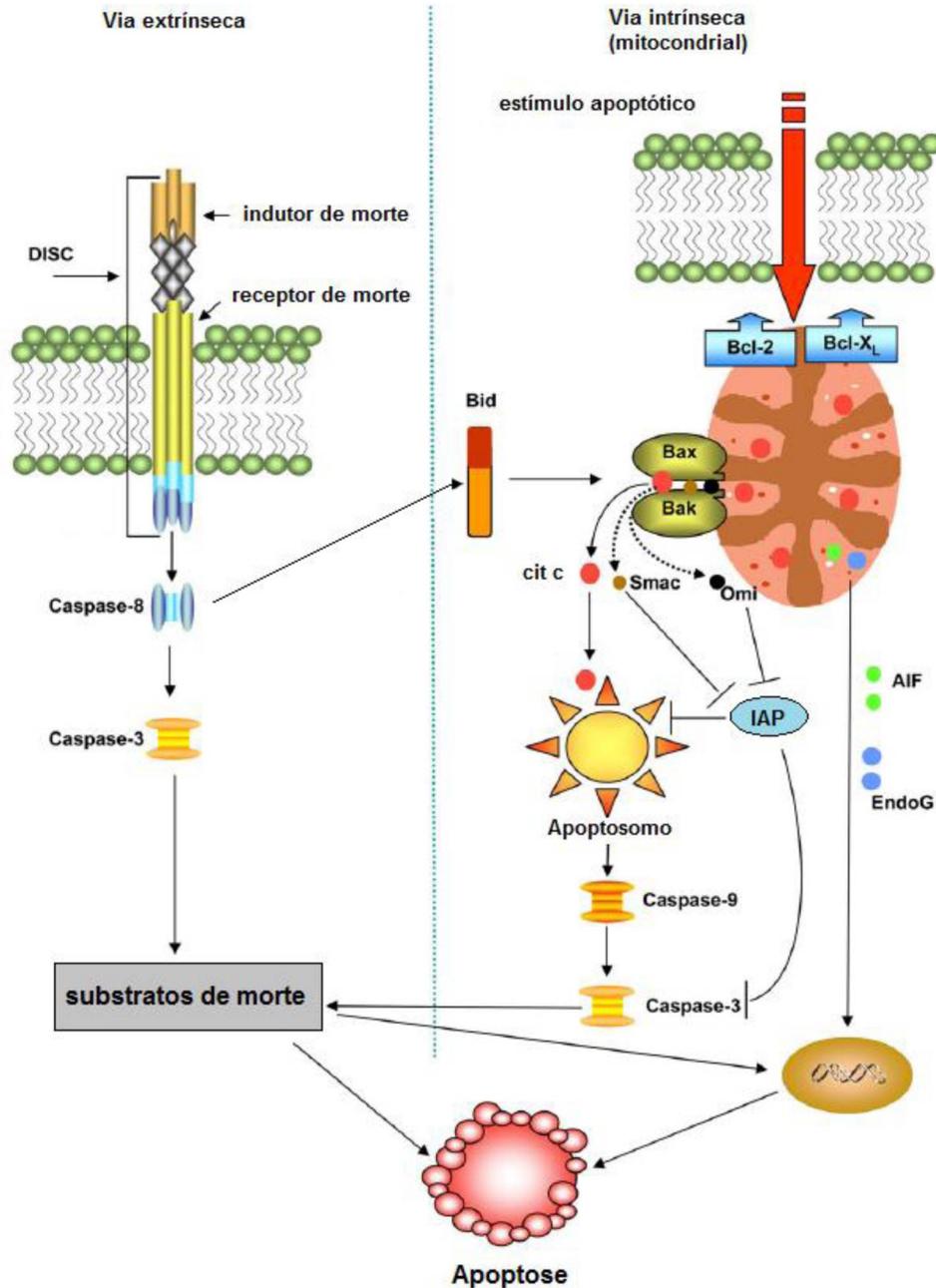


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DAS VIAS DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE.

FONTE: Orrenius; Nicotera; Zhivotovsky (2011).

NOTA: A via extrínseca é desencadeada pela ligação de indutores de morte nos receptores induzindo a sua oligomerização e formação do complexo DISC (complexo de sinalização de indução de morte), seguindo-se a ativação da caspase-8 e caspase-3. Na via intrínseca, Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> são inibidores da apoptose, enquanto Bid pode ser clivada pela caspase-8 e promover a oligomerização de Bax e Bak e, portanto, a permeabilização da membrana mitocondrial que permite a liberação de proteínas pró-apoptóticas no citosol. Esta permeabilização também pode ocorrer pela formação do PTPM (não representado na figura). O citocromo c (cit c), promove a formação do apoptosomo que ativa a caspase-9 e, conseqüentemente, a caspase-3. As proteínas Smac e Omi também participam da ativação de caspases através da inibição da atividade da IAP (proteína inibidora da apoptose), enquanto AIF (fator indutor de apoptose) e EndoG (endonuclease G) são translocadas para o núcleo, onde participam da fragmentação do DNA e condensação da cromatina. A caspase-3 cliva proteínas alvo (substratos de morte) que podem promover a fragmentação de DNA causando a morte celular (apoptose)

## 2.4 COMPOSTOS MESOIÔNICOS

Os compostos mesoiônicos são caracterizados por uma estrutura heterocíclica com cinco ou seis membros, que não pode ser satisfatoriamente representada por uma estrutura polar ou covalente. Devem possuir também, um sexteto de elétrons  $\pi$  em associação com todos os átomos que constituem o anel. Este deve apresentar, ainda, carga positiva e um átomo ou grupo de átomos ligados ao anel deve ter carga oposta. Atualmente recomenda-se que o termo mesoiônico seja restrito a anéis heterocíclicos de cinco membros, considerando as propriedades físico-químicas descritas por Baker e Ollis (1955) para classificar estes compostos (NEWTON; RAMSDEN, 1982). Os compostos mesoiônicos podem ser representados pela estrutura genérica mostrada na figura 5, onde as letras de **a** até **f** representam átomos como: carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre seguidos de seus respectivos substituintes, específicos para cada tipo de composto (OLLIS; RAMSDEN, 1976; NEWTON; RAMSDEN, 1982).

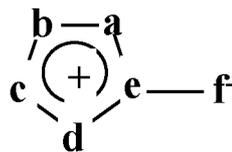


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO  
 FONTE: Newton e Ramsden (1982); Ollis e Ramsden (1976).

Com a análise dos possíveis sistemas mesoiônicos observou-se que estes compostos apresentavam distintas propriedades químicas dependendo da natureza dos substituintes do anel, ou seja, da origem dos oito elétrons  $\pi$  que podem ser distribuídos entre o anel mesoiônico (carga positiva) e o átomo ou grupo de átomos ligados ao anel (carga negativa). Desta forma, estes compostos foram separados em duas classes distintas: compostos mesoiônicos do tipo A e B. Na figura 6 estão demonstradas as estruturas genéricas e exemplos de compostos do tipo A e B, onde os números sobrescritos indicam a origem dos oito elétrons  $\pi$  (NEWTON; RAMSDEN, 1982).

Até o ano de 1982, foram relatados mais de sessenta compostos mesoiônicos do tipo A e mais de treze do tipo B. Os compostos do tipo A estão classificados em: oxazóis, dioxóis, diazóis, tiazóis, ditióis, oxadiazóis, oxatiazóis,

triazóis, tiadiazóis, oxatriazóis, tetrazóis, tiatriazóis, oxatióis, selenazóis e ditiadiazóis. Os compostos do tipo B são subdivididos em: oxazóis, diazóis, tiazóis, ditióis, tiadiazóis e tetrazóis (OLLIS; RAMSDEN, 1976; NEWTON; RAMSDEN, 1982).

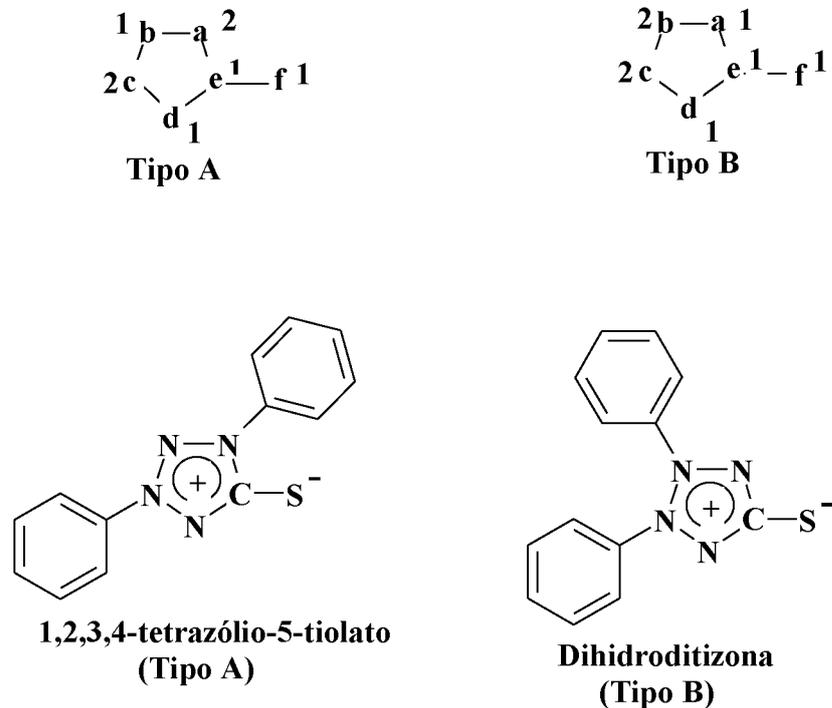


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO E EXEMPLOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS DOS TIPOS A E B.

FONTE: Newton e Ramsden (1982); Ollis e Ramsden (1976).

NOTA: Estrutura genérica dos compostos do tipo A e B, onde os números sobrescritos indicam a origem dos oito elétrons  $\pi$ . O 1,2,3,4-tetrazólio-5-tiolato é um exemplo de composto mesoiônico do tipo A e seu isômero dihidroditizona, do tipo B.

Vários compostos mesoiônicos apresentam atividade biológica, porém, somente quatro classes são destacadas na literatura: sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olatos), sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminidas), os oxatriazóis e os 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, cujas estruturas estão representadas na figura 7 (KIER; ROCHE, 1967). Estes compostos apresentam características em comum que podem justificar sua aplicação terapêutica, como uma estrutura relativamente pequena e caráter aromático planar que permitem melhor interação do sistema  $\pi$  com macromoléculas biológicas. A variação da densidade eletrônica em torno do anel e a presença de regiões distintamente carregadas, as quais conferem à estrutura um alto momento de dipolo, possibilitam interações eletrostáticas com biomoléculas

como o DNA e proteínas. Outro aspecto físico-químico importante para sua função é o caráter global neutro destas estruturas o que permite que estes compostos atravessem membranas biológicas *in vivo* (KIER; ROCHE, 1967; OLLIS; RAMSDEN, 1976; NEWTON; RAMSDEN, 1982). A seguir esta revisão tratará apenas da classe dos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos que constituem o objeto deste estudo.

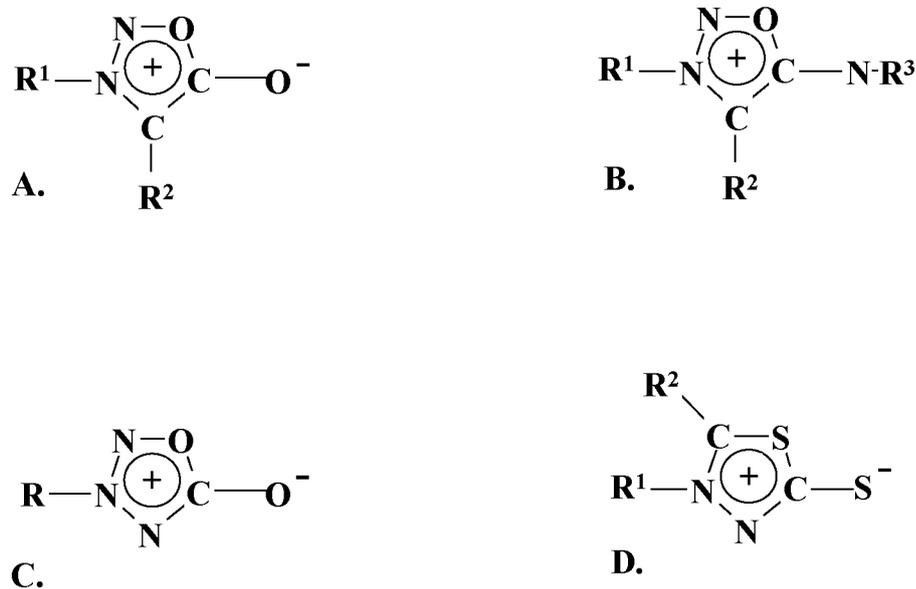


FIGURA 7 - ESTRUTURAS REPRESENTATIVAS DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS COM DESTACADA ATIVIDADE BIOLÓGICA.

FONTE: Kier e Roche (1967).

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

#### 2.4.1 Atividade Biológica dos Compostos 1,3,4-Tiadiazóis Meso-iônicos

Os derivados mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis, representados na figura 7D, possuem importante atividade biológica. O primeiro relato sobre a utilização destes compostos data de 1965, quando Stewart e Kier descreveram a síntese e avaliaram a atividade *in vitro* da série de derivados do 4-fenil-5-X-1,3,4-tiadiazólio mesoiônico (figura 8) contra *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. A sensibilidade destes microorganismos frente aos compostos mesoiônicos foi medida através da zona de inibição de crescimento em torno do disco de Agar. Os compostos que apresentavam em X substituintes alquil de cadeia curta como o metil, etil e isopropil, foram os que apresentaram maior atividade bactericida. Por outro

lado, derivados com substituintes alquil de cadeias longas e volumosas eram inativos.

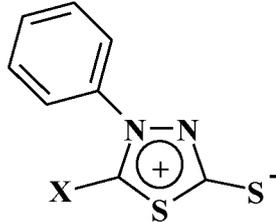


FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS 4-FENIL-5-X-1,3,4 TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS  
FONTE: Stewart e Kier (1965).

Sob outro enfoque, Glennon e colaboradores (1981) relataram a atividade inibitória de derivados mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis [3,2-a] pirimidinas (figura 9) sobre a enzima adenosina 3',5'-monofosfato fosfodiesterase em comparação a inibidores conhecidos desta enzima, como a teofilina e 1-metil-3-isobutilxantina. Os autores observaram que a presença de substituintes maiores e mais hidrofóbicos como o fenil e o benzil na posição R<sub>6</sub> aumentavam a ação inibitória dos compostos. Por outro lado, compostos onde a posição R<sub>6</sub> foi substituída por grupos alquil pequenos e menos hidrofóbicos não apresentaram a inibição. Segundo os autores, este efeito foi devido à similaridade estrutural dos compostos mesoiônicos testados com as xantinas naturais como a teofilina.

Posteriormente, Glennon e colaboradores (1984) estudaram a ação de derivados mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis[3,2-a] pirimidinas (figura 9) como antagonistas dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>. Neste estudo foi testada, *in vitro*, a ação inibidora (receptor de adenosina A<sub>1</sub>) e/ou ativadora (receptor de adenosina A<sub>2</sub>) da enzima adenilato ciclase por compostos mesoiônicos semelhantes as xantinas. Muitos tiadiazóis mesoiônicos foram mais seletivos ao receptor de adenosina A<sub>1</sub> e não mostraram atividade frente ao receptor A<sub>2</sub>. Porém, a maioria dos compostos mesoiônicos testados foram menos potentes que a teofilina como antagonistas de receptores de adenosina.

Lima e colaboradores (1986) descreveram a atividade biológica para o 4,5-difenil-2-tiolato-1,3,4-tiadiazólio (figura 10). Demonstraram sua atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* contra as bactérias: *Staphylococcus aureus*,

*Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus* e os seguintes fungos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula sp.*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium sp.*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*. Os ensaios foram realizados em meio líquido e sólido, indicando que a dose ideal para inibição do crescimento de todos os microorganismos testados foi de 400 µg/mL.

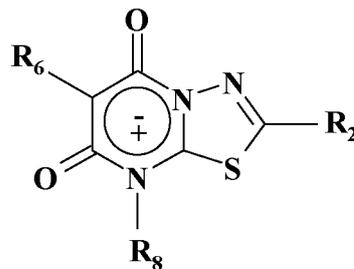


FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 1,3,4-TIADIAZÓIS[3,2,-a]PIRIMIDINA.  
FONTE: Glennon e colaboradores (1981).

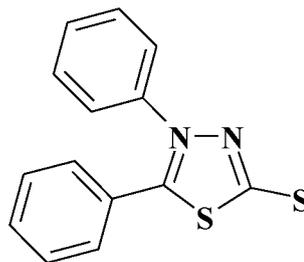


FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 4,5-DIFENIL-2-TIOLATO-1,3,4 TIADIAZÓLIO.  
FONTE: Lima e colaboradores (1986).

Posteriormente, em 1992, Montanari e colaboradores testaram a sensibilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente a compostos mesoiônicos do tipo 1,3,4-tiadiazólio utilizando a técnica de microcalorimetria. Neste estudo foi observada uma pequena atividade antifúngica quando o grupo metóxido (OCH<sub>3</sub>) ou nitro (NO<sub>2</sub>) foram usados como substituínte em X, porém somente o 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida (figura 11) apresentou atividade antifúngica significativa com valor de aproximadamente 17%. Os autores sugeriram que estes compostos agem como

fungistáticos. Em estudos posteriores Montanari, Amaral e Giesbrecht (1997) relataram a síntese e a atividade antimicrobiana de alguns derivados 1,3,4-tiadiazóis-2-aminida contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*, que foram avaliados tanto a forma de ácidos conjugados como de bases livres (figura 12), sendo que os ácido conjugados apresentaram maior atividade que as bases livres. Entre os ácidos conjugados avaliados, aqueles em que X foi substituído por Br, Cl ou NO<sub>2</sub> apresentaram maior atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Neste mesmo ano, Howe descreveu a síntese e a atividade antibacteriana do cloreto de (2,3-difenil-1,3,4-tiadiazólio-5-tiolato-S<sub>exo</sub>) de ouro. Entre os microorganismos testados o composto apresentou discreta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, sendo menos ativo contra bactérias Gram negativas e fungos.

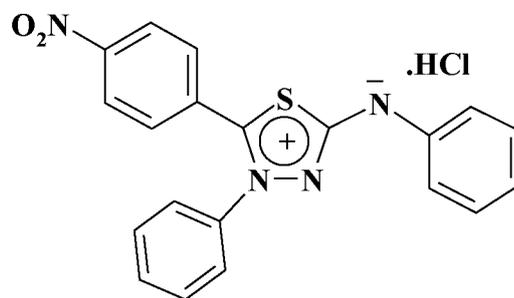


FIGURA 11 - ESTRUTURA DO COMPOSTO MESOIÔNICO 1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-AMINIDA ATIVO CONTRA *Saccharomyces cerevisiae*.  
FONTE: Montanari e colaboradores (1992).

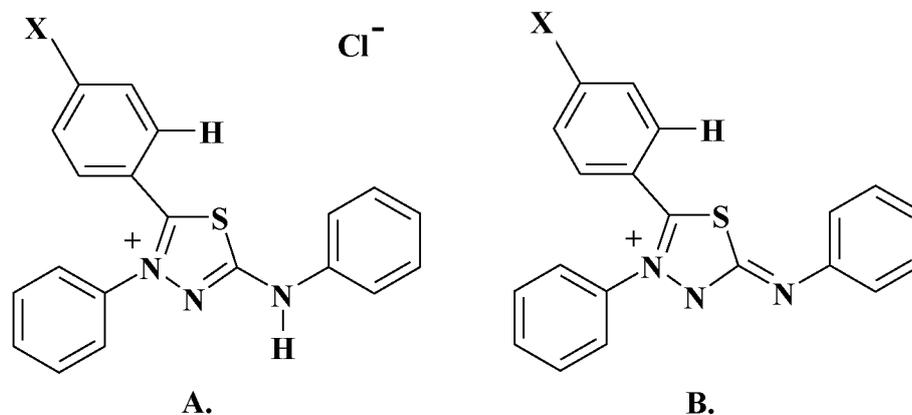


FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS-2-AMINIDA: **A.** COMO ÁCIDOS CONJUGADOS E **B.** COMO BASES LIVRES.  
FONTE: Montanari, Amaral e Giesbrecht (1997).

No sentido de avaliar a atividade antitumoral Grynberg, Santos e Echevarria (1997) sintetizaram quatro derivados do cloreto de 4-fenil-5-(4-X-cinamoil)-1,3,4-tiadiazolio-2-fenilamina e testaram estes compostos contra Sarcoma 180 (S180) e carcinoma de Ehrlich em camundongos. Os autores observaram que quando o anel cinamoil era substituído por grupos mais polares, como NO<sub>2</sub> (MI-D) e OH (MI-J) (figura 13 A e B), estes apresentavam atividade contra carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180 e, por outro lado com substituintes menos polares como X=H (MI-A) e X=OCH<sub>3</sub> (MI-C) não apresentavam atividade antitumoral significativa. O MI-D (figura 13 B) apresentou a melhor atividade antitumoral para ambos os tumores testados. A toxicidade hematológica também foi avaliada e não foram observadas mudanças significativas entre os animais tratados e controles.

A importante atividade antitumoral do MI-D motivou a realização de uma série de estudos subsequentes, nos quais diferentes efeitos do composto foram investigados. Cadena e colaboradores (1998) avaliaram os efeitos do MI-D sobre o metabolismo energético mitocondrial e observaram que este reduziu a eficiência da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, causando uma acentuada diminuição do coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O. As análises dos complexos da cadeia respiratória sugeriram que os sítios de inibição do MI-D situam-se após o complexo I e entre os complexos II e III. Também de forma dose dependente o MI-D colapsou o potencial elétrico transmembrana ( $\Delta\psi_m$ ). A atividade da ATPase foi drasticamente aumentada em mitocôndrias intactas, mas inibida em mitocôndrias desacopladas por carbonil cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). De acordo com estes resultados, os autores classificaram o MI-D como um agente desacoplador inibitório (CADENA *et al.*, 1998).

Em estudos posteriores, Cadena e colaboradores (2002) verificaram que o MI-D alterou a fluidez e a elasticidade da membrana mitocondrial através de estudos de inchamento mitocondrial induzido por valinomicina e nigericina ambos em presença de K<sup>+</sup> e de polarização de fluorescência das sondas DPH e DPH-PA em vesículas multilamelares sintéticas (DMPC) e mitocondriais. Os autores sugeriram, ainda que os efeitos provocados na membrana mitocondrial e na transdução de energia poderiam estar envolvidos no mecanismo pelo qual o MI-D induz a morte em células tumorais como relatado anteriormente por Grynberg, Santos e Echevarria (1997).

Os efeitos do MI-D também foram avaliados sobre células HeLa e células leucêmicas da linhagem L1210. Em ambos os modelos, o MI-D estimulou o consumo de oxigênio do estado 4 induzido por oligomicina e, em células L1210, o composto mesoiônico estimulou a produção de lactato. O tratamento de células HeLa com MI-D provocou alterações morfológicas como: formação de “*blebs*” na membrana plasmática, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, características do processo de morte celular por apoptose. Ensaio utilizando o método TUNEL (*TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling*) indicaram também o MI-D como indutor da morte celular por apoptose sendo que, segundo o autor, tal mecanismo poderia ser responsável pelo efeito antitumoral deste composto (CADENA, 1999).

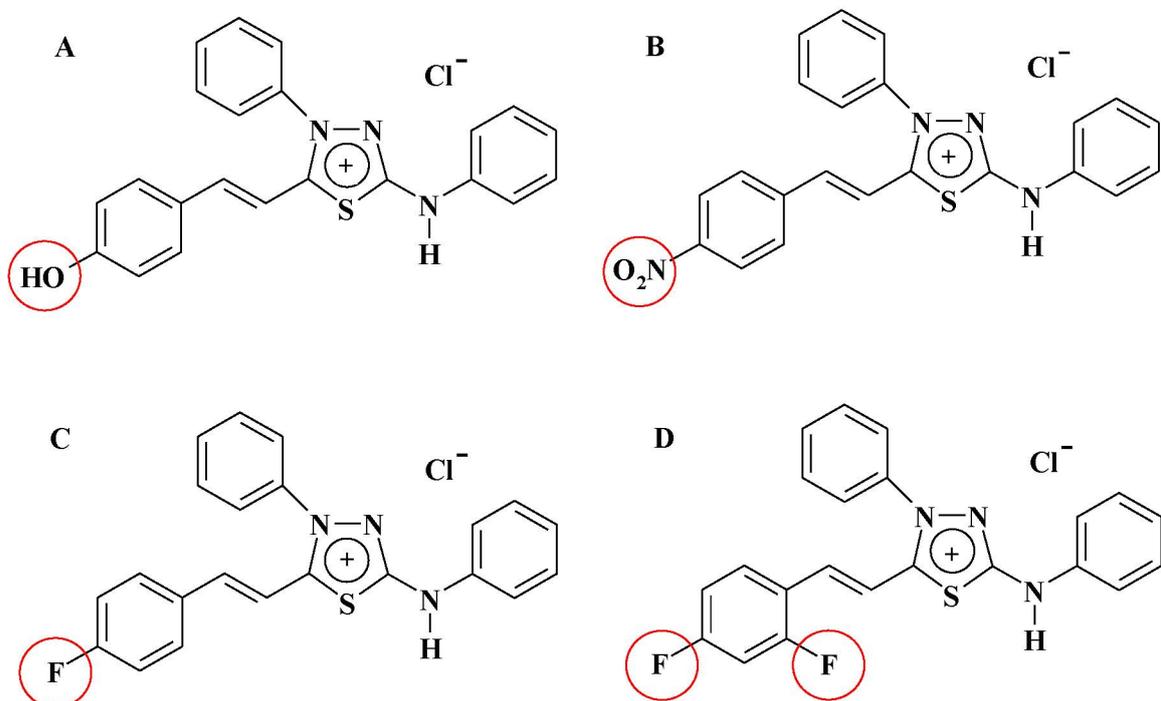


FIGURA 13 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS  
 FONTE: Grynberg, Santos e Echevarria (1997); Dos Santos e Echevarria (2001).  
 NOTA: **A.** cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxi-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-J); **B.** cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D); **C.** cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorcinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-4F) e **D.** cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-2,4diF). \*Os círculos destacam os substituintes do anel cinamoil

Da Silva e colaboradores (2002) demonstraram que o MI-D foi ativo contra *Leishmania amazonensis* ao avaliar a atividade de vários derivados da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida contra este parasita em seus dois estágios evolutivos: promastigota e amastigota. O MI-D apresentou atividade contra as duas formas evolutivas, sendo que a forma promastigota apresentou maior sensibilidade que a amastigota com  $DL_{50}$  de  $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $52,92 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente. Os autores sugerem que a diferença de sensibilidade entre as forma evolutivas se deve ao pH da solução, sendo que no meio de cultura da forma promastigota (pH 7,0) os derivados mesoiônicos se encontram na forma desprotonada, enquanto para a forma amastigota (pH 5,5) estes compostos se mantêm em sua forma hidrociorada como cátions heterocíclicos.

Cardoso e colaboradores (2004) demonstraram ainda que o MI-D afeta o metabolismo hepático estimulando a glicogenólise em 95% e inibindo o consumo de oxigênio em 37% em fígado de rato perfundido. O composto foi também capaz de reduzir em até 95% a produção de ânion superóxido por macrófagos estimulados por 12-meristato 13-acetato forbol éster (PMA) da cavidade peritoneal de camundongos. O MI-D apresentou, também, ação analgésica, antipirética e antiinflamatória *in vivo*, nas doses de 8 mg/Kg, 1 mg/Kg e 8 mg/Kg, respectivamente. Segundo os autores, estes efeitos foram decorrentes da diminuição dos níveis de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) indicando a inibição da ciclooxigenase 2 (COX-2).

Em adição aos estudos de Grynberg, Santos e Echevarria (1997), o efeito antitumoral do MI-D foi também demonstrado contra células de melanoma murino B16-F10 *in vivo* e *in vitro* (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003). Utilizando a dacarbazina e fotemustina, agentes antineoplásicos de uso corrente, como parâmetros de eficiência, os autores demonstraram que o MI-D exerce efeito citotóxico contra células de melanoma murino de forma dose e tempo dependente. A dose  $18 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D foi capaz de promover um efeito citotóxico com redução de 50% da viabilidade das células em 24 horas, mostrando-se mais eficaz que a fotemustina ( $257 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Já em 72 horas, a dose  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  foi capaz de inibir completamente a proliferação de células de melanoma. A atividade antitumoral do MI-D foi avaliada também *in vivo* em camundongos C57BL/6 portadores de melanoma subcutâneo (B16-F10). Os animais foram tratados com MI-D por via intraperitoneal utilizando uma única dose de  $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ , 24 horas após a inoculação das células. Nestas condições o MI-D inibiu o crescimento tumoral em 85%, um efeito antitumoral mais

eficaz do que o observado para a fotemustina (50%) e a dacarbazina (27%). Em tumores já desenvolvidos (8 dias) o MI-D também foi capaz de inibir o crescimento em aproximadamente 64%.

Em estudos posteriores Senff-Ribeiro e colaboradores (2004 b) avaliaram os efeitos do composto MI-D em diferentes linhagens de melanoma humano. Para uma dose de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de MI-D, em 48 horas de incubação, a viabilidade celular para as linhagens MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO foi reduzida em, aproximadamente, 20, 30, 20 e 13%, respectivamente. O MI-D também diminuiu a proliferação destas células, mostrando uma elevada atividade citotóxica. A adesão das células MEL-85 a laminina, fibronectina e matrigel, componentes da matriz extracelular, foi reduzida pelo MI-D. A morfologia e a organização do citoesqueleto das células MEL-85, também foram modificadas pelo tratamento com o composto. Com base nos resultados obtidos nestes estudos, os autores apontaram o MI-D como uma droga bastante promissora contra o melanoma, o que motivou o registro de patente desta atividade (PI0402854-6).

Devido ao importante efeito biológico do MI-D, Romão e colaboradores (2009) avaliaram o seu metabolismo e toxicidade. O metabolismo do MI-D foi avaliado *in vitro*, utilizando microssomas de fígado de camundongo, gerando um produto principal que foi analisado por cromatografia líquida (HPLC) e por espectrometria de massa. Estas análises mostraram que este metabólito apresentou espectro semelhante à molécula do MI-D, no entanto, com a presença de quatro grupos hidroxila adicionais. A análise da urina e do plasma de animais tratados com o MI-D confirmou a presença deste metabólito. Testes de toxicidade aguda com o MI-D mostraram que a dose letal média  $DL_{50}$  foi de  $181,2 \text{ mg.kg}^{-1}$  e esta dose foi 22 vezes maior que a dose para obter efeito analgésico e anti-inflamatório ( $8 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), 181 vezes maior para efeito antipirético ( $1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e 7 vezes maior que a dose para efeito antitumoral ( $25 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) (77% de inibição do crescimento de tumor) (CARDOSO *et al.*, 2004; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004a) A análise histopatológica dos animais sobreviventes a  $DL_{50}$  mostraram adesão abdominal, focos de inflamação e formação de granulomas.

O efeito do MI-D sobre o estresse oxidativo, principalmente sobre o processo de oxidação de lipídeos foi avaliado por Méndez-Sánchez e colaboradores (2009). Neste estudo, o MI-D inibiu fortemente a lipoperoxidação induzida por  $\text{Fe}^{3+}$ -ADP/2-oxoglutarato em mitocôndria isolada de fígado de rato e este efeito dose-

dependente chegou a 95% na concentração de 80 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína. Nesta mesma dose, o MI-D inibiu em 22% a lipoperoxidação induzida por radicais de carbono gerados por AAPH. O composto também inibiu a lipoperoxidação induzida por Fe<sup>2+</sup>/NADH em partículas submitocondriais acopladas e desacopladas, sendo que o efeito em partículas acopladas foi quatro vezes maior. Este efeito inibitório também foi observado em experimentos com lipossoma de fosfatidilcolina de soja de modo dose-dependente e independente se o radical é gerado na fase lipídica ou aquosa. O MI-D também mostrou habilidade de seqüestrar radicais superóxido chegando a 31% para a concentração de 80 µmol.L<sup>-1</sup>. Os autores sugeriram que o efeito inibitório do MI-D sobre a lipoperoxidação se deve a capacidade de seqüestrar radicais livres e ao seu efeito desacoplador anteriormente demonstrado por Cadena e colaboradores (1998).

Com o objetivo de estabelecer a relação entre estrutura química e atividade antitumoral, Senff-Ribeiro e colaboradores (2004a) avaliaram os efeitos dos derivados mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina em células de melanoma murino B16-F10 *in vitro* e em tumores resultantes da implantação subcutânea das células B16-F10 em camundongos C57BL/6. Os compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina testados diferiam apenas no substituinte do anel cinamoil, sendo as substituições na posição 4' por: OH = MI-J; F = MI-4F; NO<sub>2</sub> = MI-D e substituições em 2' e 4' por F = MI-2,4diF (figura 13). Nas análises *in vitro* e *in vivo*, o MI-D foi o derivado que apresentou maior eficiência. *In vitro* o composto monofluorado foi mais efetivo contra as células B16-F10 que o MI-2,4diF, entretanto, nas análise *in vivo* o MI-4F apresentou valor estatisticamente não significativo. O composto MI-J não apresentou efeito significativo para as análises *in vitro* e *in vivo*. O MI-2,4diF e o MI-D foram capazes de inibir o crescimento tumoral em 55 e 77%, respectivamente na concentração de 57 µmol.kg<sup>-1</sup>.

Em estudo anterior, o efeito dos derivados 1,3,4 – tiadiazóis - fenilamina MI-J, MI-4F e MI-2,4diF (figura 13 A, C e D) foram avaliados sobre a bioenergética mitocondrial. Os três derivados diminuíram significativamente a velocidade de consumo de oxigênio durante o estado 3 utilizando succinato ou glutamato e malato como substratos, sendo que para os últimos, o efeito foi mais significativo. Nestes ensaios, os derivados MI-4F e MI-2,4diF inibiram totalmente o estado 3 na concentração de 130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína. O efeito inibitório sobre a transferência de elétrons resultou da inibição da atividade dos complexos I e IV, sendo sobre este

último mais significativo. A velocidade do consumo de oxigênio durante o estado 4 foi fortemente aumentada em presença de succinato ou glutamato e malato, e nas concentrações acima de  $65 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína a velocidade do estado 4 se igualou a do estado 3. Em decorrência dos efeitos sobre os estados 3 e 4 da respiração, os valores do coeficiente de controle respiratório (CCR) e da razão ADP/O foram significativamente diminuídos. A atividade da ATPase foi estimulada em mitocôndrias intactas, e não sofreu alterações em mitocôndrias rompidas. O efeito de estímulo sobre a ATPase em adição ao estímulo do estado 4, mostra que os derivados apresentam efeito desacoplador. Os autores concluíram que os três derivados apresentaram efeitos semelhantes, porém com diferentes intensidades. Os derivados MI-4F e MI-2,4diF, ambos substituídos no anel cinamoil por átomos de flúor, apresentaram efeitos mais intensos quando comparado ao MI-J, substituído por uma hidroxila. Com base nestas informações, os autores sugerem que o efeito destes derivados sobre a bioenergética mitocondrial é mais influenciada pela hidrofobicidade dos compostos do que pelos efeitos eletrônicos dos substituintes (PIRES *et al.*, 2010).

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Embora em estudo anterior (PIRES *et al.*, 2010) tenha sido demonstrado que os derivados do cloreto de 4-fenil-5-[2-Y, 4-X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, sendo o MI-J (Y = H e X = OH); MI-4F (Y = H e X = F) e MI-2,4diF (Y = X = F), pertencentes a classe dos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, comprometem de forma significativa as funções mitocondriais ligadas a provisão de energia, os mecanismos envolvidos ainda não foram esclarecidos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo, através de diferentes estratégias experimentais, obter informações adicionais que permitissem delinear um possível mecanismo de ação destes compostos sobre o metabolismo energético mitocondrial e correlacioná-lo a atividade antitumoral anteriormente descrita. Para tanto, foram determinados seus efeitos em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, sobre:

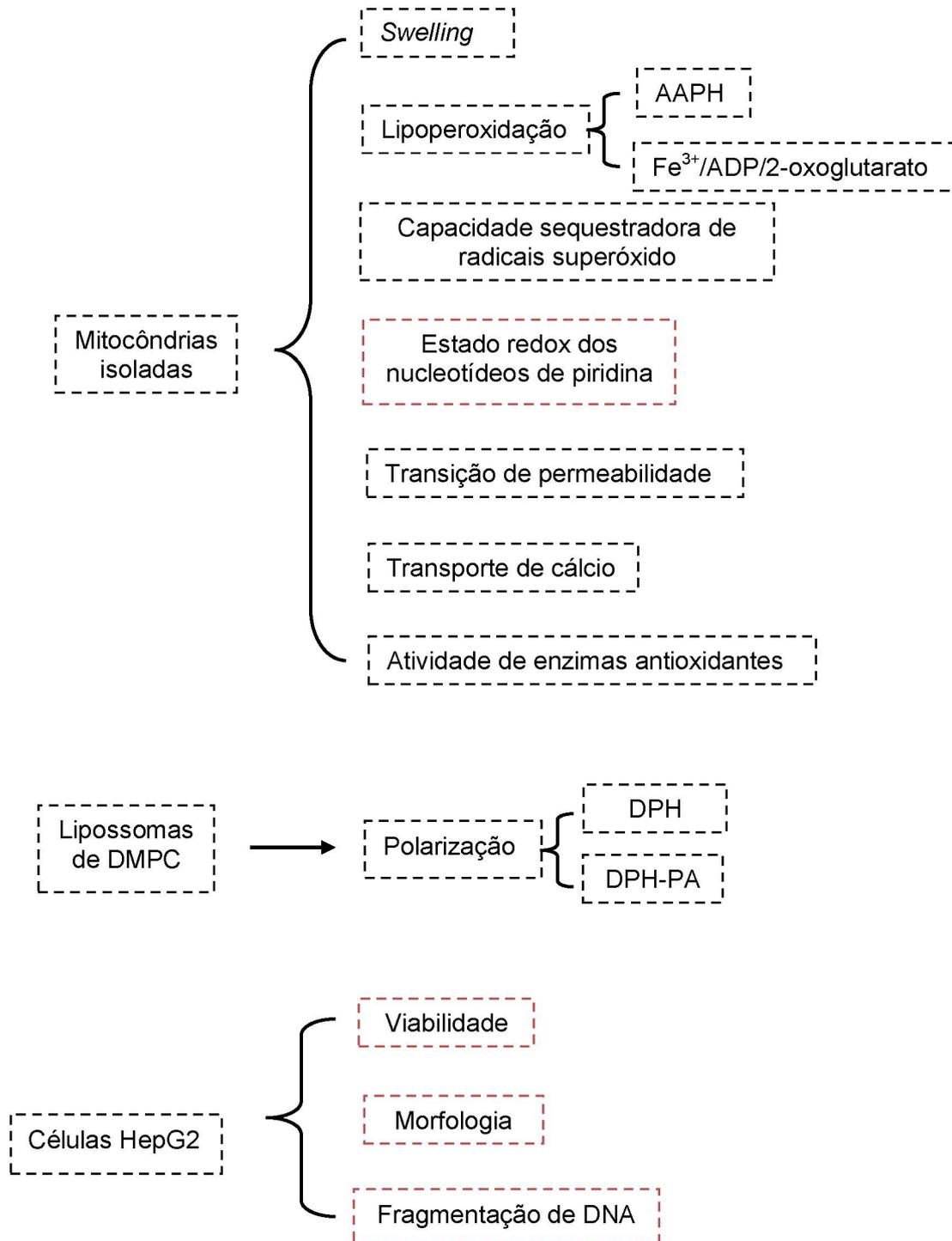
- a) O inchamento (*swelling*) mitocondrial energizado.
- b) A lipoperoxidação;
- c) O estado redox dos nucleotídeos de piridina;
- d) A transição de permeabilidade;
- e) A captação e efluxo de cálcio;
- f) A atividade de enzimas antioxidantes.

E em sistema livre de mitocôndrias foi avaliado o seqüestro de radicais superóxido.

Uma vez que os objetivos descritos acima apresentam uma estreita relação com possíveis alterações na permeabilidade e elasticidade da membrana mitocondrial interna, também se constituiu um objetivo deste estudo avaliar os efeitos destes derivados sobre a fluidez de membranas em modelo de lipossomas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

Ainda, no sentido de ampliar as investigações sobre o mecanismo bioquímico da ação destes compostos sobre as funções celulares, este estudo teve também como objetivo avaliar os efeitos do MI-J, MI-4F, MI-2,4diF e MI-D (Y = H e X = NO<sub>2</sub>) sobre a viabilidade, morfologia e fragmentação de DNA de células de hepatoma humano (HepG2).

#### 4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



**NOTA:** As caixas de bordas pretas representam os experimentos realizados com os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF e as caixas com bordas vermelhas com os derivados MI-J, MI-4F, MI-2,4diF e MI-D.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 REAGENTES

Os reagentes D-manitol, HEPES, EGTA, EDTA, BSA, DMPC, rotenona, ácido glutâmico, digitonina, penicilina, estreptomicina, DPH, DPH-PA, TBA, ADP, ácido málico, FeCl<sub>3</sub>, FCCP, antimicina A, Tris, bicarbonato de sódio, MTT, hematoxilina e eosina y foram obtidos do laboratório Sigma Chemical Co.

Os seguintes reagentes foram adquiridos dos laboratórios indicados: sacarose - Synth; ácido succínico - Aldrich Chemical; soro fetal bovino e DMEM alta glucose - Cultilab; ácido pícrico - Nuclear. O CaCl<sub>2</sub>, KCl, TCA, KOH, clorofórmio, DMSO, acetato de sódio, fosfato de sódio e potássio, formaldeído, ácido acético, juntamente com os demais reagentes com alto grau de pureza, foram adquiridos do laboratório Merck.

Os derivados do cloreto de 4-fenil-5-[2-Y, 4-X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, sendo o MI-J (Y = H e X = OH); MI-4F (Y = H e X = F); MI-2,4diF (Y = X = F) e MI-D (Y=H e X = NO<sub>2</sub>) (figura 13) foram sintetizados e gentilmente doados pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Áurea Echevarria do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As estruturas dos compostos foram anteriormente confirmadas por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e espectroscopia de massas (DOS SANTOS; ECHEVARRIA, 2001).

### 5.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS

Foram preparadas soluções estoque em DMSO dos quatro derivados em estudo em concentração final de 6,5 mmol.L<sup>-1</sup>, sendo que para uso em células estes derivados foram dissolvidos em DMSO estéril, não sendo necessário esterilização posterior da solução. Estas soluções estoque foram mantidas congeladas a -18°C e utilizadas por, no máximo, um mês após o preparo. Análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e espectroscopia de massa confirmaram que estes derivados mantêm suas características estruturais se armazenados nestas condições (ECHEVARRIA - comunicação pessoal). Para a utilização nos ensaios, as soluções estoque foram diluídas em meio de reação ou meio de cultivo para obter a concentração final desejada em cada situação experimental. Em todos os ensaios utilizando

mitocôndrias os derivados foram previamente incubados durante 2 minutos com as preparações. Para cada experimento realizado foram também realizados ensaios controle com a mesma quantidade do solvente (DMSO), nas mesmas condições experimentais.

### 5.3 ANIMAIS

Para o isolamento de mitocôndrias de fígado de rato, foram utilizados ratos machos albinos Wistar, com peso variando entre 180-220 g, mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com dieta balanceada Purina® e água a vontade e, para o isolamento das mitocôndrias, foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas permitindo-se água à vontade. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (certificado Nº 355 em anexo)

### 5.4 ENSAIOS EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATOS

#### 5.4.1 Isolamento de mitocôndrias

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por Voss e colaboradores (1961), com algumas modificações, utilizando-se como meio de isolamento: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, EGTA 1 mmol.L<sup>-1</sup> e BSA 0,1% (m/v). Para a obtenção das mitocôndrias, os animais foram sacrificados por decapitação. O fígado foi imediatamente retirado e imerso em meio de extração gelado. Depois de lavado, o órgão foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador van Potter Elvehjen, usando-se sucessivamente pistilo frouxo e normal. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 3.200 x g a 4°C em centrífuga Hitachi, modelo himac CR-21E, durante 5 minutos, para eliminação de restos de células intactas, membranas e núcleos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 12.600 x g, durante 10 minutos, a 4°C. O precipitado obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspensão, lavado duas vezes em meio de isolamento por centrifugação a 8.100 x g, durante 10

minutos, a 4°C. As mitocôndrias assim obtidas foram suspensas em meio de isolamento e a concentração de proteína contida nesta preparação foi determinada.

#### 5.4.2 Isolamento de mitocôndrias para determinação do grau de inchamento mitocondrial em presença de substrato

Para os experimentos de inchamento mitocondrial, a técnica de isolamento foi a mesma descrita no item anterior, utilizando-se, porém, o meio de isolamento constituído de: sacarose 330 mmol.L<sup>-1</sup>, Tris-HCl 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5 e EDTA 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> (MUSTAFA *et al.* 1966). Na última lavagem foi utilizado meio de isolamento sem EDTA. As mitocôndrias foram suspensas utilizando-se este mesmo meio e a concentração de proteínas na preparação foi determinada.

#### 5.4.3 Métodos analíticos envolvendo as preparações mitocondriais

##### 5.4.3.1 Determinação do inchamento mitocondrial (*swelling*) em mitocôndrias energizadas

O inchamento mitocondrial, decorrente da entrada de íons sódio na matriz, foi monitorado pelo método descrito por Seppala e colaboradores (1973). O meio mantido a 28°C, foi constituído de sacarose 100 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão HEPES 30 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5, EDTA 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> e proteína em concentração adequada. A reação foi iniciada pela adição de glutamato e malato de sódio na concentração de 10 mmol.L<sup>-1</sup> e 1 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente, ou succinato de sódio na concentração final de 5 mmol.L<sup>-1</sup>. Depois de atingido o novo ponto de equilíbrio, o meio de reação foi suplementado com 2 µmol.L<sup>-1</sup> de rotenona para observação da contração da organela energizada com glutamato e malato, e com 6 µg.mL<sup>-1</sup> de antimicina A para os ensaios com succinato.

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

#### 5.4.3.2 Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina

O estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais foi monitorado fluorimetricamente em Espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF 5301. O sistema de reação, constituído de sacarose  $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $65 \text{ mmol.L}^{-1}$  e HEPES-KOH  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,4, foi suplementado com rotenona  $2,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , succinato  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína. A reação ocorreu a  $30^\circ\text{C}$  usando-se os comprimentos de onda de 366nm e 450 nm para excitação e emissão, respectivamente, com fenda de 5,0 nm (PIGOSO *et al.*, 1998).

#### 5.4.3.3 Determinação do transporte mitocondrial de cálcio

O transporte de cálcio foi estimado em sistema de reação a  $30^\circ\text{C}$ , constituído de: D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , BSA 0,1% (m/v) e HEPES-KOH  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, suplementado com fosfato de potássio  $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ , arsenazo III  $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , rotenona  $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $45 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína. Este meio foi previamente tratado com resina Chelex-100 na concentração de 0,1% (m/v) antes do uso. A captação de cálcio foi iniciada com a adição de succinato de sódio  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A reação foi monitorada pela variação na absorbância do Arsenazo III utilizando os comprimentos de onda de 675-685 nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV - 2450 UV/VIS (SCARPA, 1979). Depois de finalizada a captação do íon, o efluxo foi induzido por FCCP  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

#### 5.4.3.4 Transição de permeabilidade mitocondrial

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) foi acompanhada como recomendado por Gunter e Pfeiffer (1990), pelo decréscimo da absorbância em 540 nm, devido ao inchamento mitocondrial na presença de íons cálcio. O meio de reação a  $28^\circ\text{C}$  e volume final de 1 mL foi constituído de D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , tampão HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, fosfato de potássio  $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ , rotenona  $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , proteína  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $\text{CaCl}_2$   $45 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . A reação foi iniciada pela adição de succinato de potássio  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  e acompanhada durante 10 minutos. No sentido de confirmar que o inchamento observado era decorrente da formação do

poro de transição de permeabilidade mitocondrial foram realizadas adições individuais de ciclosporina A  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  ou EGTA  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

#### 5.4.3.5 Capacidade seqüestradora de radical superóxido

A capacidade seqüestradora do radical superóxido foi avaliada pelo método descrito por Nishimiki e colaboradores (1972), com algumas modificações. Neste ensaio, radicais superóxido gerados em presença de NADH e PMS reduzem o nitroblue tetrazolium (NBT). O sistema de reação foi constituído de tampão Tris-HCl  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 8,0), NADH  $340 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , NBT  $72 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e PMS  $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . A reação foi acompanhada a 560 nm durante 5 minutos e a capacidade sequestradora do radical superóxido foi calculada usando a equação 1.

$$\text{capacidade sequestradora (\%)} = \left( 1 - \frac{A \text{ da amostra}}{A \text{ do controle}} \right) \times 100$$

(EQUAÇÃO 1)

FONTE: Qi *et al.*, 2005

#### 5.4.3.6 Determinação da lipoperoxidação mitocondrial

A peroxidação de lipídeos em mitocôndrias foi avaliada através do método que identifica espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta reação foi monitorada a 535 nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV - 2450 UV/VIS. Mitocôndrias, obtidas conforme descrito no item 5.4.1 foram incubadas, sob agitação, a  $37^{\circ}\text{C}$ , em meio de reação constituído de D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2. Foram usadas duas metodologias para a indução da lipoperoxidação. Uma utilizando o 2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidroclorato, AAPH ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), um indutor de radicais livres de fase aquosa, e a outra por adição de ADP  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{FeCl}_3$   $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e 2-oxoglutarato  $6 \text{ mmol.L}^{-1}$  (TAKAYANAGI *et al.*, 1980) para induzir a produção de radicais livres provenientes da cadeia respiratória. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 10, 20, 30 e 45 minutos, as quais foram adicionados 2 mL de reativo constituído de TCA 15% (m/v), TBA 0,4% (m/v) em HCl 0,25N e solução etanólica de BHT 0,01% (m/v). A mistura foi submetida à fervura por 15 minutos em banho-maria, resfriada e centrifugada a

12.000 x g por 5 minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada e os resultados foram expressos em nmol de TBARS formadas por minuto por miligrama de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do aduto malondialdeído-TBA de  $1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  (BUEGE; AUST, 1978).

#### 5.4.3.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

##### 5.4.3.7.1 Superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD)

A atividade da Mn-SOD foi avaliada de acordo com o método proposto por Nishimiki e colaboradores (1972). Neste ensaio, mitocôndrias obtidas como descrito no item 5.4.1 foram rompidas por ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e utilizadas como fonte de enzimas. Esta preparação foi incubada com KCN  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  com o objetivo de inibir a isoforma citosólica CuZn-SOD. O sistema de reação mantido a  $25^\circ\text{C}$  foi constituído de tampão Tris-HCl  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 8,0), NADH  $340 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , NBT  $72 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , PMS  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  e proteína em quantidade adequada para inibir em 50% a redução do NBT. A reação foi iniciada pela adição de NADH e acompanhada a 560 nm durante 1 minuto em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 2450 UV/VIS. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle, considerando que 1 unidade de SOD corresponde à inibição de 50% da redução do NBT.

##### 5.4.3.7.2 Glutathione peroxidase (Gpx)

A atividade da Gpx foi avaliada em mitocôndrias permeabilizadas com deoxicolato 0,5% de acordo com a técnica proposta por Flohé e Gunzler (1984). Neste ensaio a Gpx catalisa a oxidação de GSH, em presença de peróxidos, gerando glutathione oxidada (GSSG). A GSSG na presença de NADPH e Gred reduz novamente a glutathione. A atividade enzimática foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância do NADPH a 340 nm. O sistema de reação foi composto de tampão fosfato  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 7,0), EDTA  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , GSH  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , NADPH  $0,15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Gred purificada 0,2 U, *t*-butil hidroperóxido  $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $0,250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de proteína. A reação que ocorreu a  $25^\circ\text{C}$  foi iniciada pela adição de *t*-butil hidroperóxido e acompanhada durante 1 minuto. Os resultados foram

expressos em consumo de NADPH em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  de proteína, considerando-se o coeficiente de extinção molar do NADPH de  $6220\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### 5.4.3.7.3 Glutathiona redutase (Gred)

Avaliou-se a atividade da Gred de acordo com a técnica proposta por Sies e colaboradores. (1979). Neste ensaio a Gred catalisa a redução da glutathiona na presença de NADPH, em sistema de reação constituído de tampão fosfato  $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7,0), EDTA  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , GSSG  $0,66\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e NADPH  $0,075\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . As mitocôndrias obtidas como descrito no item 5.4.1 foram permeabilizadas pela adição de deoxicolato 0,5% (m/v) e  $0,250\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  da suspensão foi utilizada no sistema de reação. A reação foi mantida a  $25^{\circ}\text{C}$  e iniciada pela adição de GSSG. A oxidação de NADPH foi acompanhada durante 5 minutos a  $540\text{ nm}$  em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV – 2450 UV/VIS. Os resultados foram expressos em consumo de NADPH em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  de proteína, considerando-se o coeficiente de extinção molar do NADPH de  $6220\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

## 5.5 EFEITO DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS SOBRE A FLUIDEZ DE MEMBRANAS SINTÉTICAS

### 5.5.1 Preparo de lipossomas de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC)

Os lipossomas foram preparados como recomendado por Antunes-Madeira e colaboradores (1980), utilizando DMPC em concentração final de  $345\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . O fosfolípido foi dissolvido em clorofórmio e o solvente evaporado, até a secura, em evaporador rotatório, a  $25^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com tampão Tris - maleato  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7, KCl  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e disperso por agitação manual, em banho a  $30^{\circ}\text{C}$ , isto é,  $7^{\circ}\text{C}$  acima da temperatura de transição do fosfolípido. A amostra foi agitada vigorosamente durante 1 minuto e então submetida a ultrasonicação suave, utilizando-se banho de sonicação. O tempo de ultrasonicação foi controlado pela turbidez da suspensão, medida a  $600\text{ nm}$  em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV - 2450 UV/VIS. A sonicação foi interrompida quando a amostra atingiu o valor aproximado de 0,2 em absorbância. Os lipossomas preparados nestas condições são multilamelares (ANTUNES-MADEIRA *et al.*, 1995).

### 5.5.2 Incorporação das sondas DPH e DPH-PA

Foram utilizadas duas sondas o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), que se localiza no interior hidrofóbico da membrana, e o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno-ácido propiônico (DPH-PA), que permanece ancorado à superfície da membrana. O DPH e o DPH-PA foram solubilizados em tetrahidrofurano e dimetilformamida, respectivamente (LENTZ *et al.*, 1976; TROTTER; STORCH, 1989). Alíquotas de soluções concentradas de sonda foram incorporadas, sob agitação vigorosa em vórtex, nas suspensões de lipossomas previamente aquecidas a 30°C. A concentração final de sonda e o quociente sonda/lipídeo foram de 1,7  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 1/200, respectivamente, tanto na situação de uso do DPH quanto do DPH-PA.

As preparações de lipossomas foram incubadas no escuro, durante aproximadamente 18 horas, em temperatura de 30°C para os lipossomas de DMPC. Ambas as sondas incorporam-se rapidamente às membranas dos lipossomas multilamelares, atingindo intensidade de fluorescência constante ao fim de 90 minutos de incubação (LENTZ *et al.*, 1976).

Foram elaborados controles para cada situação experimental. Para cada amostra (suspensão de membranas contendo sonda), foi preparado um controle branco (sem sonda), contendo o volume correspondente dos solventes que foram utilizados para dissolver as sondas (tetrahidrofurano ou dimetilformamida). Este controle, que sofreu tratamento igual ao da amostra, foi utilizado na correção das medições fluorimétricas, para deduzir a interferência da luz dispersa pelas partículas em suspensão ("light scattering").

### 5.5.3 Determinações fluorimétricas

As medições fluorimétricas foram efetuadas em espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF 5301, com controle de temperatura e agitação. Para as medições de polarização de fluorescência (P) foram montados dois polarizadores: um, entre a amostra e o monocromador de excitação, para interceptar o feixe de excitação; outro, entre a amostra e o monocromador de emissão, para interceptar o feixe de emissão (analisador). A polarização de fluorescência foi determinada de acordo com o procedimento ilustrado na figura 14.

A amostra foi excitada pelo componente vertical da luz monocromática e foram medidas as intensidades da luz emitida quando o analisador estiver orientado paralela ( $I_{||}$ ) e perpendicularmente ( $I_{\perp}$ ) à direção de polarização da luz da excitação. As direções de polarização de  $I_{||}$  e  $I_{\perp}$  foram, respectivamente, a do eixo Z e X, como o ilustrado na figura 14. O índice de polarização de fluorescência foi, então, calculado como recomendado por Litman e Barenholz (1982), pelo quociente descrito na equação 2:

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}$$

(EQUAÇÃO 2)

Considerando que a intensidade de  $I_{||}$  e  $I_{\perp}$  foi medida depois de o feixe de luz atravessar a rede de difração do monocromador de emissão, foi necessário introduzir ainda um fator de correção nesta equação. A correção matemática desta distorção instrumental foi feita conforme recomendado por Toplack e colaboradores (1990), introduzindo-se na equação anterior o fator G dado pela equação 3:

$$G = \frac{I_{\perp}^*}{I_{||}^*}$$

(EQUAÇÃO 3)

em que  $I_{\perp}^*$  e  $I_{||}^*$  correspondem às intensidades dos componentes vertical e horizontal da luz emitida quando o polarizador está orientado horizontalmente. A amostra excitada com o componente horizontal da luz proveniente do monocromador de excitação deveria produzir idênticos componentes vertical e horizontal da luz emitida, porque as probabilidades de reorientação das moléculas excitadas, durante o tempo de vida da excitação, são idênticas em todas as direções horizontal e vertical. A diferença dos componentes vertical e horizontal, depois de atravessarem o monocromador de emissão, deve-se à dispersão e, portanto, transmissão desigual desses componentes. O valor corrigido do índice de polarização visualizado na equação 4, é:

$$P = \frac{I_{||} - G \cdot I_{\perp}}{I_{||} + G \cdot I_{\perp}}$$

(EQUAÇÃO 4)

As medições de polarização de fluorescência foram realizadas selecionando 365 nm para o comprimento de onda de excitação e 450 nm para o comprimento de emissão (LITMAN; BARENHOLZ, 1982; TROTTER; STORCH, 1989). As fendas de excitação e emissão foram selecionadas em 3 nm. Para cada preparação os valores de polarização foram determinados no intervalo de 10°C a 40°C, variando-se a temperatura a cada 1°C ou 2 °C.

#### 5.5.4 Determinação da temperatura média de transição de fase ( $T_m$ ).

A temperatura média de transição de fase ( $T_m$ ) é considerada como o ponto médio da projeção vertical do segmento com a maior inclinação e foi calculada pela derivada da polarização em função da temperatura, ou seja,  $\Delta P/\Delta T$  (ANTUNES-MADEIRA *et al.*, 1980).

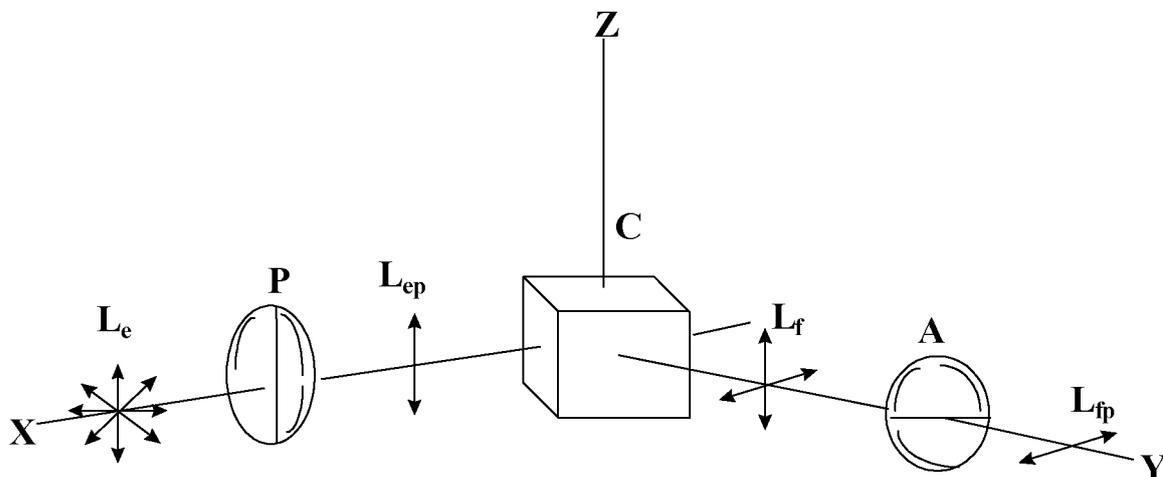


FIGURA14 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MEDIÇÕES DE POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA (P)

FONTE: Adaptado de Van Holde (1975)

NOTA: A luz monocromática de excitação ( $L_e$ ) ao passar pelo polarizador (P), orientado na vertical, dá lugar a um componente vertical de luz polarizada ( $L_{ep}$ ) que excita a amostra contida na célula C. A luz emitida ( $L_f$ ) ao passar pelo analisador (A) dá lugar a componentes da luz polarizada ( $L_{fp}$ ),  $I_{||}$  ou  $I_{\perp}$  conforme o analisador estiver colocado paralelamente ou a  $90^\circ$  à direção de polarização da luz de excitação. No processo, são preferencialmente excitadas as moléculas da amostra que se encontram alinhadas com o vetor eletromagnético do feixe polarizado de excitação. Estas moléculas, devido a difusão, vão depois orientar-se em várias direções no período de tempo do estado excitado e, por isso, é possível detectar na emissão componentes polarizados paralelamente, ( $I_{||}$ ) e perpendicularmente ( $I_{\perp}$ ) à excitação. Isto é, as moléculas excitadas vão reorientar-se em todas as direções do espaço e, assim, a fluorescência emitida é despolarizada. O grau de polarização reflete-se no decréscimo de  $I_{\perp}$  e aumento de  $I_{||}$ .

## 5.6 CÉLULAS

Foram utilizadas células de hepatoma humano (HepG2) provenientes da American Type Culture Collection e adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ, Rio de Janeiro, na passagem 85. Estas células crescem em monocamadas e apresentam ciclo celular com tempo médio de 20 horas (NATARANJAN; DARROUDI, 1991).

### 5.6.1 Procedimentos de esterilização de materiais

Todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (VECO). O material de vidro utilizado para a manutenção das culturas foi esterilizado a seco, a 180°C, por 6 horas. Tampas e pipetas foram esterilizadas em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão por quarenta e cinco minutos. O material plástico foi esterilizado em forno de microondas por 40 minutos. Após esterilização os materiais foram secos em estufa a 37°C. Todas as soluções utilizadas foram esterilizadas por filtração em membranas microporosas de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm, marca Millipore, em aparelho Sartorius ou em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão por quarenta e cinco minutos.

### 5.6.2 Meio de cultura

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 como descrito no item anterior 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<sup>-1</sup> e bicarbonato de sódio para ajustar o pH em 7,4.

### 5.6.3 Soluções utilizadas no cultivo celular

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

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) se constitui da mistura das soluções A e B, as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 20x) e armazenadas a 4°C. A solução A era composta de NaCl 2,73 mol.L<sup>-1</sup>, KCl 107 mmol.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 25 mmol.L<sup>-1</sup> e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 27 mmol.L<sup>-1</sup>. A solução B era constituída por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,5 mmol.L<sup>-1</sup> e glucose 110 mmol.L<sup>-1</sup>. As duas soluções foram preparadas em água ultrapura em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. Para o uso, as soluções A e B foram misturadas (1:1), diluídas com água ultrapura e o pH ajustado para 7,4. As soluções foram esterilizadas por filtração em membranas microporosas (0,22 µm) como descrito no item 5.6.1 e armazenada a 4°C.

#### 5.6.3.2 Solução salina tamponada (PBS)

A solução salina tamponada (PBS) foi preparada em forma de solução estoque cinco vezes concentrada, sendo constituída nesta condição de: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40,5 mol.L<sup>-1</sup>, NaCl 680 mol.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,3 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4. Esta solução foi esterilizada em autoclave a 120°C e 1 atm, como descrito no item 5.6.1, e mantida sob refrigeração. Para a utilização nos ensaios esta solução foi diluída em água ultrapurificada estéril.

#### 5.6.3.3 Solução 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<sup>-1</sup>, KCl 5,4 mmol.L<sup>-1</sup>, glucose 5 mmol.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,42 mmol.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mmol.L<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 2,3 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,53 mmol.L<sup>-1</sup>, 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 como descrito no item 5.6.1 e armazenada a -18°C.

#### 5.6.4 Cultura e subculturas (repiques)

As células HepG2 foram crescidas em monocamadas imersas em meio de cultura a 37°C ( $\pm$  1°C) em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em estufa SANYO, modelo COM – 17A. Após a cultura se tornar confluenta (aproximadamente 48 horas), as células foram coletadas e/ou subcultivadas na proporção de 1 : 3. O crescimento das células foi acompanhado por observação em microscópio invertido OLYMPUS, modelo CK2. Os repiques das células HepG2 foram feitos a cada 48 horas de crescimento, levando-se em consideração o grau de confluência das células. Após a remoção do meio de cultivo, foi adicionada solução de tripsina pré-aquecida a 37°C para descolar as células da garrafa de cultivo. A tripsinização foi realizada por aproximadamente 2 minutos. Na seqüência, a solução de tripsina foi retirada e as células foram suspensas em meio de cultura com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A suspensão obtida foi distribuída em novas garrafas de cultivo e foi adicionado meio de cultura em volume adequado para cada garrafa.

#### 5.6.5 Coleta e contagem de células

A coleta das células foi feita por tripsinização ou por raspagem com o auxílio de borracha macia (“rubber policeman”), conforme a necessidade do experimento. Na seqüência, as células foram suspensas em meio de cultura e centrifugadas a 1200 rpm, a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e descartado. O precipitado de células foi ressuspenso em meio de cultura e as células quantificadas utilizando-se hemocitômetro NEUBAUER de duas câmaras com o auxílio de microscópio OLYMPUS.

#### 5.6.6 Métodos analíticos envolvendo as células HepG2

##### 5.6.6.1 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]). Este método avalia a função de enzimas mitocondriais, as quais reduzem o sal tetrazólio formando cristais de formazan, que possuem cor roxa característica ao serem dissolvidos em DMSO.

As células HepG2 foram distribuídas na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço em placas de 96 poços (0,2 mL/poço). Após 24 horas para adesão a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , as células foram incubadas com os derivados ou o mesmo volume de DMSO (solvente dos derivados) durante 1, 3, 6 e 24 horas. Decorrido este tempo, o meio contendo os derivados foi retirado e adicionado 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de MTT  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em HBSS. As células imersas nesta solução foram incubadas por 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, a solução de MTT que não reagiu foi retirada e adicionado DMSO (0,01%) para dissolução dos cristais de formazan formados. Após homogeneização foi feita a leitura das placas em leitor de microplacas ELISA em  $\lambda = 550\text{nm}$  (REILLY *et al.*, 1998; CHEUNG *et al.*, 2007) e os resultados foram expressos como % de viabilidade em relação ao controle (100%).

#### 5.6.6.2 Análises de Morfologia

Monocamadas de células HepG2 ( $1 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) crescidas durante 48 horas em lamínulas de vidro foram incubadas, a  $37^\circ\text{C}$ , na presença dos derivados mesoiônicos durante 3 horas, ou DMSO em volume correspondente. Decorrido o tempo de incubação, esta solução foi desprezada e as células crescidas em lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas em solução de BOUIN (formaldeído 4% (v/v): ácido pícrico saturado: ácido acético, 4:15:1) por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas com água ultrapura e coradas com hematoxilina e eosina. Após a coloração, as células foram desidratadas em soluções compostas por acetona e xilol, e montadas em lâminas com Entelan. A morfologia das células HepG2 foi observada em microscópio BEL FOTONICS e as imagens foram capturadas em câmera fotográfica Sony Cyber-Shot com 13,5 mega pixel de resolução.

#### 5.6.6.3 Quantificação da fragmentação de DNA

O conteúdo de DNA fragmentado foi determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio (IP) (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992, BALASUBRAMANIYAN *et al.*, 2007, DOUGLAS *et al.*, 1995). Para a realização destes ensaios,  $1 \times 10^6$  células foram dispensadas em placas de 35 mm e incubadas

por 24 horas para adesão, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrido este tempo, o meio de cultura foi substituído por meio contendo os derivados ou volume correspondente de DMSO (solvente dos derivados), seguindo-se incubação durante 6 e 24 horas. Após incubação, o meio de cultura foi coletado em um tubo Falcon e a monocamada lavada com PBS, o qual foi retirado e reunido ao meio de cultura coletado anteriormente. Em seguida, as células foram coletadas por tripsinização e transferidas para o mesmo tubo contendo o meio de cultura e o PBS previamente coletados. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos. O precipitado foi ressuspensão em PBS e centrifugado novamente nas mesmas condições. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi suspenso em 0,3 mL de solução composta por 50 µg.mL<sup>-1</sup> de iodeto de propídio e 0,1% de Triton-X-100 preparado em PBS. Após a marcação, as células foram mantidas na ausência de luz e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD) utilizando o programa Cell Quest. A aquisição dos dados foi feita usando o filtro FL2 (fluorescência amarela) e analisadas em histograma (eixo X: filtro FL2 e eixo Y: número de eventos). O número de células em cada fase do ciclo celular foi expresso como porcentagem do total de eventos (10000 células). Os histogramas foram analisados utilizando-se o software WinMdi 2.9. Nesta análise, as células observadas na fase hipodiplóide ou sub-G1, representam células com DNA fragmentado.

## 5.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951) ou Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos com média ± desvio padrão e submetidos à análise de variância e teste de Tukey, para a comparação das médias. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de  $P \leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 INCHAMENTO MITOCONDRIAL

O inchamento mitocondrial ou “*swelling*” osmótico é caracterizado pela entrada de água na organela em resposta ao aumento da concentração de íons na matriz mitocondrial. Este processo está intimamente ligado ao estado energético mitocondrial e reflete a eficiência do transporte de elétrons através da cadeia respiratória (PACKER *et al.*, 1966; NICHOLLS; FERGUSON, 2002). As técnicas de *swelling* são ferramentas experimentais importantes, uma vez que permitem também avaliar a integridade da membrana mitocondrial interna, auxiliando no esclarecimento do mecanismo de ação de diferentes compostos.

Os resultados apresentados a seguir referem-se ao *swelling* observado presença de acetato de sódio e substrato oxidável (glutamato e malato ou succinato). Este tipo de *swelling* é dependente da formação do gradiente eletroquímico de prótons resultante do fluxo de elétrons gerado pela oxidação do substrato.

A MMI é permeável a uma variedade de espécies neutras como o O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e ácidos e bases fracos com baixo peso molecular como a amônia e o ácido acético. O equilíbrio destas espécies eletroneutras é indiferente ao potencial de membrana, entretanto, a entrada na matriz de espécies com próton dissociável é afetado pelo gradiente de concentração de prótons ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ). O ácido acético pode permear regiões da bicamada em sua forma não carregada, enquanto que a forma ionizada permanece impermeável. Como resultado, ocorre o equilíbrio da forma ácida (protonada) entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas, de maneira independente do potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ). Assim, no ensaio representado nas figuras 15 e 16, ocorre um equilíbrio nas concentrações de ácido acético entre o espaço intermembranas e matriz, enquanto que a presença de acetato na matriz deve-se a desprotonação do ácido, como resultado do pH mais alcalino. O aumento da concentração de acetato na matriz gera uma pressão osmótica que resulta na entrada de água e conseqüente inchamento da organela. A amplitude deste inchamento é maior na presença de íons sódio, cuja entrada na matriz é favorecida pelo transporte de elétrons e a conseqüente extrusão de prótons para o espaço

intermembranas, através do transportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

O monitoramento da extensão do *swelling* é possível devido às suspensões mitocondriais dispersarem a luz como consequência da diferença do índice de refração entre a matriz e o meio. Desta forma, durante o *swelling* o acúmulo de água na matriz diminui a concentração dos compostos que refratam a luz e, conseqüentemente, a dispersão de luz em relação ao meio, resultando na redução da absorbância da preparação mitocondrial. Este efeito só é possível devido ao desdobramento das cristas da membrana mitocondrial interna que confere elasticidade a esta estrutura (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

Como mencionado, neste estudo as medidas de inchamento mitocondrial foram feitas com preparações mitocondriais acopladas e em presença de acetato de sódio e foram utilizados glutamato e malato de sódio ou succinato de sódio como substratos. A figura 15 mostra o efeito dos derivados mesoiônicos nas concentrações de 6,5, 32,5, 65 e 130  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína sobre o inchamento mitocondrial em presença de glutamato e malato de sódio. Nos traçados que representam os ensaios controles (ausência dos compostos) observa-se uma diminuição na absorbância seguida da adição de glutamato e malato de sódio, ou seja, o inchamento mitocondrial decorrente da entrada de água em resposta a presença de acetato de sódio na matriz mitocondrial. A adição posterior de rotenona promove a contração mitocondrial, representada como um aumento na absorbância. Este efeito é decorrente da inibição do transporte de elétrons do complexo I para a ubiquinona, pela rotenona. Foram realizados controles com o mesmo volume de DMSO os quais mostraram que o solvente não altera a amplitude do *swelling* quando comparado ao ensaio controle (dado não mostrado).

Na figura 15A observa-se que a incubação prévia da preparação mitocondrial com MI-J já na menor concentração ( $6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) reduz significativamente a amplitude do *swelling* em ~70%, mas a contração da organela, resultante da adição de rotenona, ainda foi observada. A velocidade do inchamento foi reduzida em 72% quando comparado ao ensaio controle. Nas maiores concentrações (32,5 – 130  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína) o MI-J impediu o inchamento e a contração da organela. Este perfil também foi observado para os ensaios com MI-4F e MI-2,4diF (figuras 15B e C, respectivamente). No entanto, já nas menores

concentrações estes dois compostos impediram a entrada do ácido acético e sódio na mitocôndria.

Experimentos de inchamento mitocondrial utilizando o succinato de sódio também foram realizados e os resultados estão representados na figura 16. Nos ensaios controles (na ausência dos derivados) observa-se um pronunciado inchamento após a adição de succinato de sódio e contração da organela, após a adição da antimicina A, um inibidor do complexo III da cadeia respiratória. Em relação aos efeitos dos compostos, os perfis diferem-se dos apresentados na figura 15, para os substratos glutamato e malato de sódio. Na figura 16A observa-se que o MI-J reduz a amplitude e a velocidade do inchamento mitocondrial de forma dose-dependente, sendo que na maior concentração ( $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) esta inibição foi total. Nas concentrações de  $32,5$  e  $65 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína o MI-J reduziu a amplitude do *swelling* em aproximadamente 40% e 68%, respectivamente. Nestas mesmas condições o MI-J reduziu ~65% e 91% a velocidade do inchamento, respectivamente. Observa-se ainda que a contração da organela, como resultado da adição de antimicina, também foi reduzida em presença do MI-J, indicando um comprometimento da elasticidade da membrana mitocondrial interna.

Já para o MI-4F (figura 16B), observou-se um efeito distinto em relação ao MI-J. Na presença do composto nas concentrações de  $6,5$  e  $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína, observa-se uma significativa diminuição do inchamento mitocondrial em aproximadamente 53% e 74%, porém, a adição de antimicina A promoveu a contração da organela e o retorno aos valores iniciais da absorbância, indicando que a elasticidade da membrana mitocondrial interna não foi comprometida. A velocidade do inchamento também foi modificada em presença do MI-4F em ~61% e 89% nas concentrações de  $6,5$  e  $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente. Por sua vez, nas concentrações de  $65$  e  $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína, a inibição do inchamento foi total.

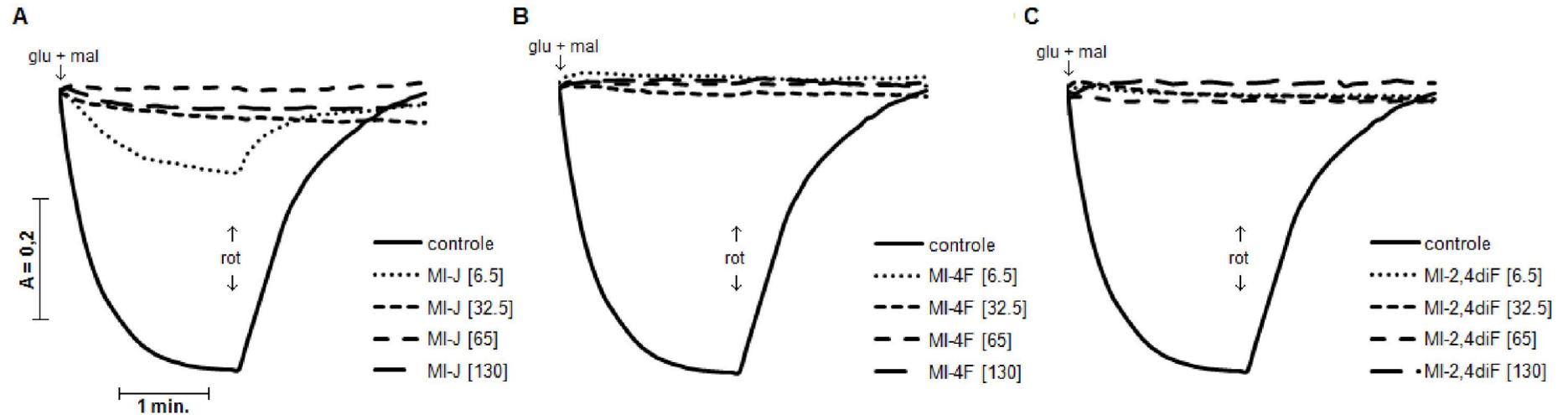


FIGURA 15- EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4 –TIADIAZÓIS SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM GLUTAMATO E MALATO DE SÓDIO

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: Sacarose  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ , tampão HEPES  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,5, EDTA  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína. A reação a  $28^\circ\text{C}$  foi iniciada pela adição de glutamato e malato de sódio (glu + mal) na concentração de  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , respectivamente. Depois de atingido o novo ponto de equilíbrio, o meio de reação foi suplementado com  $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de rotenona (rot) para observação da contração da organela. Controle – ausência dos compostos. Os compostos MI-J (A), MI-4F (B) ou MI-2,4diF (C) foram incubados por dois minutos com a preparação mitocondrial nas concentrações de 6,5, 32,5, 65 e  $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína (como indicado entre colchetes). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, itens 5.4.3.1. Os traçados são representativos de três experimentos independentes para cada composto.

O MI-2,4diF (figura 16C) mostrou um perfil semelhante ao MI-4F, porém com efeitos de diferente intensidade. Nas concentrações de 6,5, 32,5 e 65 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína observa-se a redução da amplitude (~32%, 75% e 85%, respectivamente) e da velocidade (~64%, 88% e 95%, respectivamente) do inchamento mitocondrial de modo dependente da concentração, mas sem comprometimento da contração da organela, como observado para o composto monofluorado, sugerindo que a elasticidade da membrana mitocondrial interna permanece inalterada. Já para a concentração de 130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína observou-se uma inibição total do inchamento mitocondrial e este perfil não foi alterado após a adição de antimicina A.

Os experimentos de *swelling* mitocondrial mostram que os três derivados são capazes de promover redução na amplitude do *swelling*, porém, a intensidade da mesma difere em relação aos substituintes do anel cinamoil (MI-J [OH], MI-4F [F], MI-2,4-diF [F]), como também em relação aos substratos. A inibição do *swelling* mitocondrial em presença de acetato de sódio pode ter como causa o comprometimento da formação do gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ). Neste contexto, Pires e colaboradores (2010) demonstraram, através de experimentos de consumo de oxigênio, que MI-J, MI-4F e MI-2,4diF diminuem a velocidade respiratória durante o estado 3, evidenciando o efeito inibidor do transporte de elétrons para estes derivados. Ainda neste mesmo estudo, os autores demonstraram que os efeitos sobre os estados da respiração foram menos intensos quando o succinato foi utilizado como substrato, o que está de acordo com a menor intensidade de efeitos também sobre o inchamento mitocondrial, observada no presente estudo. Segundo os autores, os efeitos diferenciais em relação aos substratos, devem-se aos sítios de inibição destes compostos na cadeia respiratória, identificados como os complexos I e IV. A atividade da NADH desidrogenase (complexo I) foi menos comprometida sendo inibida em ~10%, enquanto que o complexo IV foi inibido em aproximadamente 25%, 56% e 46% para o MI-J, MI-4F e MI-2,4diF, respectivamente. A atividade da succinato desidrogenase (complexo II) não foi alterada, o que justifica o menor comprometimento do transporte de elétrons quando o substrato utilizado é o succinato (PIRES *et al.*, 2010).

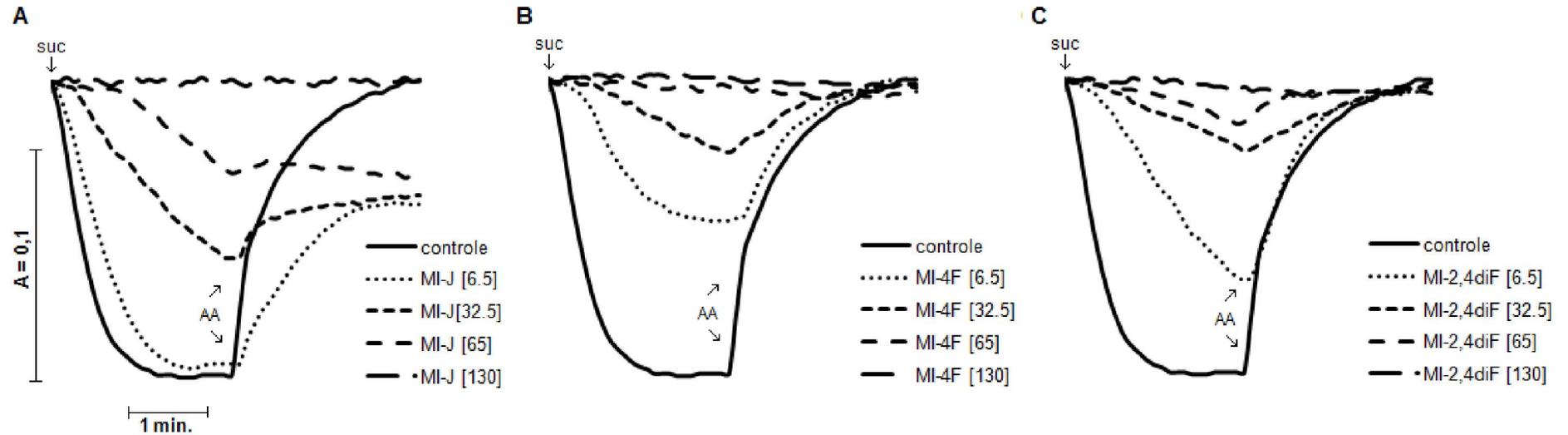


FIGURA 16 - EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS ENERGIZADAS COM SUCCINATO DE SÓDIO

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: Sacarose  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ , tampão HEPES  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,5, EDTA  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína. A reação a  $28^\circ\text{C}$  foi iniciada pela adição de succinato de sódio (suc) na concentração de  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Após atingido o novo ponto de equilíbrio, o meio de reação foi suplementado com  $8 \mu\text{g}$  de antimicina A (AA) para observação da contração da organela. Controle – ausência dos compostos. Os compostos MI-J (A), MI-4F (B) ou MI-2,4diF (C) foram incubados por dois minutos com a preparação mitocondrial nas concentrações de 6,5, 32,5, 65 e  $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína (como indicado entre colchetes). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, itens 5.4.3.1. Os traçados são representativos de três experimentos independentes para cada composto.

Se por um lado os resultados do inchamento mitocondrial são concordantes com a inibição do transporte de elétrons promovida pelos derivados, por outro, não explicam totalmente o comprometimento da elasticidade da membrana mitocondrial interna, como indicado pela ausência da contração da organela, observada principalmente nas maiores concentrações. É possível sugerir que este efeito seja decorrente da interação destes compostos com a membrana mitocondrial interna. Neste sentido, Pires e colaboradores (2010) também demonstraram que os derivados promovem o aumento da velocidade respiratória durante o estado 4, sugerindo seu efeito desacoplador, o qual se refletiu nos resultados da atividade de ATPase, que foi estimulada em baixas concentrações (6,5 – 65 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína) e inibida em altas (130nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína), quando utilizadas mitocôndrias intactas, enquanto que em mitocôndrias rompidas não se observaram alterações na atividade do complexo enzimático. Estes efeitos somados aos aqui demonstrados apontam para o comprometimento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, também sugerida por experimentos de inchamento mitocondrial em presença de valinomicina e nitrato de potássio em mitocôndrias desenergizadas (PIRES *et al.*, 2010). Neste tipo de *swelling*, a entrada de água na matriz mitocondrial é dependente da entrada de potássio, a qual é dependente do trânsito da valinomicina na membrana mitocondrial interna. Por sua vez, o trânsito do ionóforo relaciona-se à permeabilidade e fluidez desta membrana. Os derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, nas concentrações de 65 e 130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína, foram capazes de diminuir a amplitude do *swelling* de forma dose dependente. Para a concentração de 130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína observou-se que o composto MI-J promoveu uma diminuição menos pronunciada (~50%) em comparação aos derivados fluorados (~67% e ~56% para o MI-4F e MI-2,4diF, respectivamente). Os autores sugeriram que a intensidade destes efeitos sobre a membrana mitocondrial está intimamente ligada com a hidrofobicidade dos compostos, visto que os derivados MI-4F e MI-2,4diF, ambos com caráter mais hidrofóbico, possuem a maior efetividade.

Outros compostos mesoiônicos com atividade antitumoral também afetaram o *swelling* mitocondrial em presença de substrato. O SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólium-5-olato), que apresenta atividade antitumoral contra carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180 é um exemplo. Este composto promoveu a inibição do

*swelling* em presença dos substratos glutamato e succinato de modo dose-dependente. O efeito do SYD-1 foi mais pronunciado quando o glutamato foi utilizado como substrato, observando-se inibição total do inchamento na concentração de  $1,5 \mu\text{mol.mg}^{-1}$  de proteína. Além deste efeito, o composto inibiu o estado 3 da respiração e estimulou o estado 4. O *swelling* na ausência de substrato e em presença de valinomicina também foi diminuído. Os autores sugeriram que a inibição do *swelling* pode ser um somatório dos efeitos de SYD-1 sobre o transporte de elétrons e sobre a permeabilidade e/ou elasticidade da membrana mitocondrial interna (HALILA *et al.*, 2007).

Cadena e colaboradores (2002), avaliaram os efeitos de um outro composto mesoiônico, o MI-D, que se difere dos derivados aqui estudados pela presença de um grupo  $\text{NO}_2$  no anel cinamoil. Os efeitos do MI-D foram diferentes dos observados para os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF, uma vez que em baixas concentrações ( $15$  e  $38 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) promoveu a inibição do inchamento mitocondrial e em altas concentrações ( $50$  e  $80 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína), nas quais se observou a dissipação da força próton motriz, causou um significativo inchamento. Segundo os autores, isto ocorreu devido a alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial causadas pelo MI-D em altas concentrações, com consequente perda da sua seletividade.

Como conclusão, os resultados de inchamento mitocondrial obtidos no presente estudo são concordantes com àqueles descritos anteriormente (PIRES *et al.*, 2010) e refletem os significativos comprometimentos do transporte de elétrons e da permeabilidade e/ou elasticidade da membrana mitocondrial interna promovidos por estes compostos.

## 6.2 FLUIDEZ DE MEMBRANAS ARTIFICIAIS

Os efeitos sobre o inchamento mitocondrial aqui mostrados, como também os descritos anteriormente (PIRES *et al.*, 2011), sugerem que os derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos interagem com a membrana mitocondrial e, neste sentido, experimentos de polarização de fluorescência foram realizados com a finalidade de esclarecer estas possíveis interações.

Neste estudo foram realizados experimentos de polarização de fluorescência utilizando duas sondas fluorescentes, o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e o 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenil-ácido propiônico (DPH-PA), em membranas artificiais de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC). O DPH (figura 17) é um composto lipofílico utilizado para monitorar alterações da fluidez de regiões hidrofóbicas de bicamadas de fosfolípídeos, ou seja, o interior apolar de bicamadas (LENTZ *et al.*, 1976). Devido a sua estrutura longa e hidrofóbica, o DPH se insere no interior hidrofóbico das membranas alinhando-se paralelamente às cadeias lipídicas (SANTOS *et al.*, 2008). Quando esta sonda é incorporada na bicamada lipídica, torna-se parte integral do sistema, indiferentemente de sua composição ou estado físico (BHATTACHARYYA; NANDY, 1989). O DPH-PA (figura 17) é um derivado do DPH, que apresenta em sua estrutura uma porção polar (ácido propiônico) a qual faz com que este composto se aloje nas regiões mais hidrofílicas da membrana, ou seja, permanece ancorado na superfície das membranas (LÚCIO *et al.*, 2008). Estas sondas apresentam movimentação rotacional e quando excitadas por luz polarizada emitem fluorescência. A medida da intensidade de fluorescência quando estas sondas são excitadas com luz polarizada verticalmente e horizontalmente permite a determinação da polarização da sonda em um determinado ambiente (SANTOS *et al.*, 2008). Por sua vez, a medida de polarização de fluorescência das sondas DPH e DPH-PA em lipossomas reflete a sua movimentação rotacional no núcleo hidrofóbico e na superfície destas estruturas, respectivamente (BHATTACHARYYA *et al.*, 1988). Desta forma, altos valores de polarização de fluorescência (P) da sonda refletem uma maior ordem estrutural do ambiente onde ela se encontra e, conseqüentemente, baixa fluidez e vice-versa (ANTUNES-MADEIRA *et al.*, 1991).

Sistemas lamelares de lipídeos, principalmente lipossomas, são particularmente adequados para investigar o estado físico de lipídeos e suas modificações por agentes físicos e químicos, permitindo elucidar muitas modificações na membrana (ANTUNES-MADEIRA *et al.*, 1980). Neste estudo foram utilizados lipossomas de DMPC, preparados de modo a formar vesículas multilamelares.

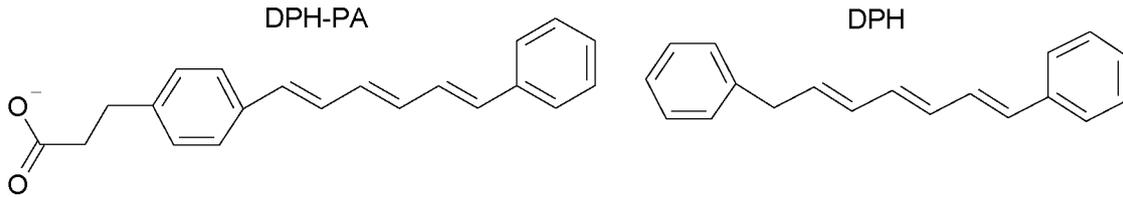


FIGURA 17 - ESTRUTURAS DAS SONDAS DPH-PA E DPH.

FONTE: Lucio e colaboradores (2008).

NOTA: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e o 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenil-ácido propiônico (DPH-PA).

Os lipídeos presentes em membranas biológicas, como fosfolipídeos e glicolipídeos, frequentemente formam estruturas de bicamadas em água e geralmente exibem mesomorfismo, ou seja, apresentam simultaneamente propriedades físicas dos líquidos e dos sólidos. Estes lipídeos podem, então, alternarem-se entre estes dois estados físicos, nos quais se apresentam ordenados (gel) ou desordenados (cristal-líquido). A mudança entre estes dois estados é chamada de transição de fase e a temperatura na qual isto ocorre é chamada de temperatura média de transição de fase ( $T_m$ ). Nesta temperatura os lipídeos passam da fase gel para a fase líquido-cristalina, ou seja, passam de uma fase mais rígida e organizada para uma fase mais fluída e menos organizada, onde as cadeias acil dos fosfolipídeos têm mais liberdade de movimento. O comprimento da cadeia dos fosfolipídeos, o grau de insaturação, a composição do grupo polar, o pH, assim como predominância da conformação *cis* ou *trans* influenciam na temperatura de transição de fase (OLDFIELD; CHAPMAN, 1972).

Os traçados representativos da transição de fase, também denominados de perfis termotrópicos, referentes ao efeito dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre a transição de fase de lipossomas de DMPC com as sondas DPH e DPH-PA estão mostrados nas figuras 18 a 23. Os gráficos representam a variação da polarização ( $P$ ) da sonda DPH ou DPH-PA em relação a temperatura. A variação da polarização foi avaliada nas temperaturas de 10 a 40°C, com intervalos de 1 a 2°C. Para todos os ensaios foram feitos controles em presença de DMSO (0,1%), o qual não teve efeito sobre o perfil de polarização das sondas. Controles em presença de tetrahidrofurano (0,05%) e dimetilformamida (0,05%), ambos utilizados na solubilização das sondas, também foram realizados e não apresentaram

fluorescência. Os derivados foram testados nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$ , com exceção do MI-J que na maior concentração interferiu significativamente na intensidade da fluorescência da sonda e, devido a isto, foi utilizado somente na menor concentração.

O efeito do MI-J sobre a polarização de fluorescência do DPH está mostrado na figura 18. Nesta figura, como nas seguintes (figuras 19 a 20), a curva do ensaio controle (ausência dos derivados) mostra a fase gel nas temperaturas de 10 a 18 °C e a fase líquido-cristalina nas temperaturas superiores a 28°C. As temperaturas intermediárias representam um estado transitório entre a fase gel e a líquido-cristalina. A temperatura na qual o fosfolípídeo passa da fase gel para a fase líquido-cristalina, a  $T_m$ , é normalmente determinada como sendo o ponto médio da projeção vertical do segmento com a maior inclinação, mas também pode ser calculada como a derivada da polarização em relação ao tempo ( $\Delta P/\Delta T$ ) (ANTUNES-MADEIRA; CARVALHO; MADEIRA, 1980; GHOSH *et al.*, 1993). O valor da  $T_m$  para a sonda DPH em lipossomas de DMPC foi de 22°C (ensaio controle) sendo este valor próximo aos descritos na literatura (FILIPPOV *et al.*, 2011).

Ainda na figura 18 observa-se que o MI-J na concentração de 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  deslocou significativamente a curva de polarização para a direita, em relação a curva controle, mostrando um aumento da polarização da sonda DPH tanto na fase gel quanto na líquido-cristalina. O significativo aumento no valor de P refletiu-se também no aumento do valor da temperatura média de transição de fase ( $T_m$ ) para 23°C (inserto). Este resultado sugere que o MI-J se insere na membrana lipídica limitando a movimentação rotacional da sonda DPH, ou seja, aumentando a rigidez do ambiente hidrofóbico onde ela se encontra. Efeito semelhante foi observado para o MI-4F (figura 19), porém com menor intensidade e somente na fase líquido-cristalina. Na menor concentração (5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) o MI-4F aumentou discretamente os valores de P, sendo que na maior concentração (15  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) este efeito foi mais expressivo. Como a presença do MI-4F alterou a organização da membrana somente em altas temperaturas o valor da  $T_m$  não sofreu modificações permanecendo em 22°C, mesmo valor encontrado para o controle.

O MI-2,4diF (figura 20) promoveu um aumento do valor da polarização de fluorescência do DPH na fase líquido-cristalina e na fase gel, em ambas as concentrações utilizadas. A presença do MI-2,4diF, nas concentrações de 5 e 15

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ , causou um aumento da  $T_m$  em  $2^\circ\text{C}$  ( $24^\circ\text{C}$ ) em relação ao controle ( $22^\circ\text{C}$ ). Estes resultados mostram que os derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos interferem na mobilidade desta sonda na bicamada, diminuindo a sua polarização. Este efeito pode ser decorrente da inserção dos derivados na bicamada lipídica, gerando modificações físicas no ambiente hidrofóbico onde a sonda está alojada, resultando na diminuição da sua fluidez.

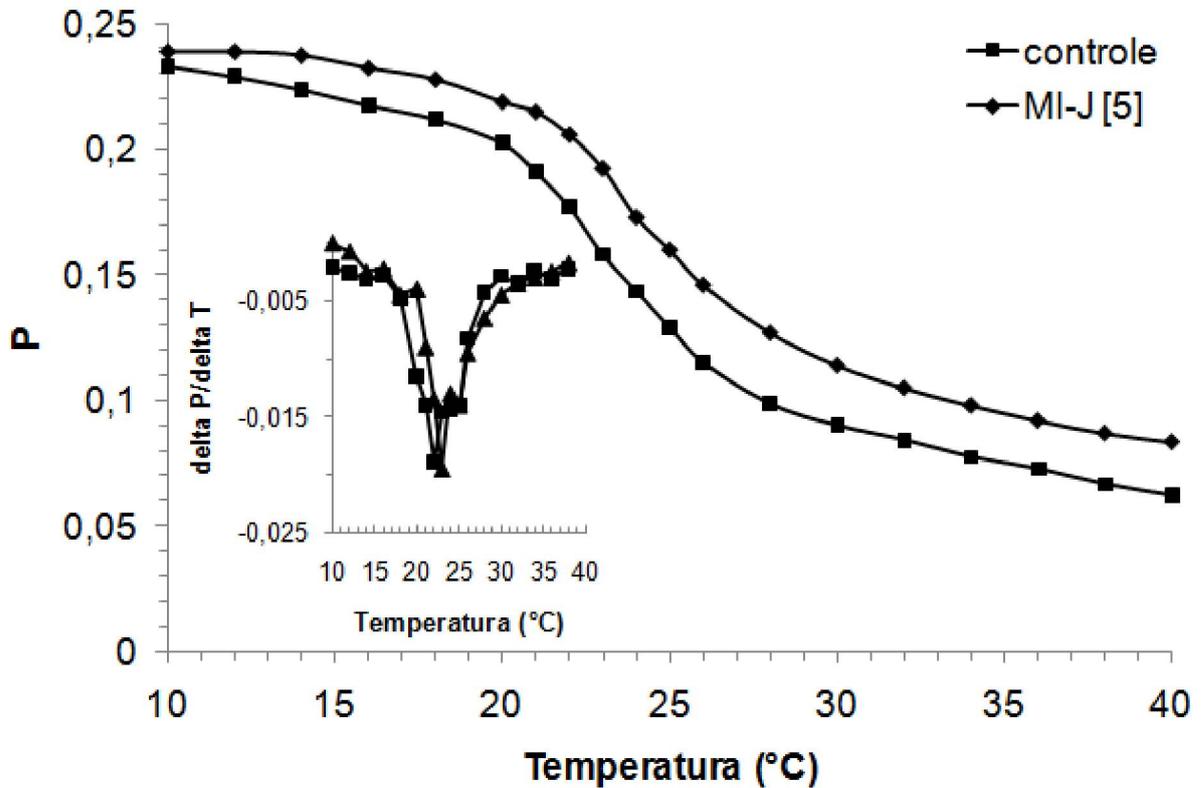


FIGURA 18 EFEITO DO MI-J SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Lipossomas de DMPC foram preparados utilizando o lipídeo na concentração final de  $345 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , solubilizado em clorofórmio. Após evaporação do solvente o lipídeo foi hidratado com tampão Tris - maleato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, KCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$ . O derivado MI-J foi incubado por 18 horas na concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  como indicado entre colchetes. O inserto representa a polarização diferencial do DPH em função da temperatura ( $\Delta P/\Delta T$ ). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, item 5.5. A figura é representativa de três experimentos independentes.

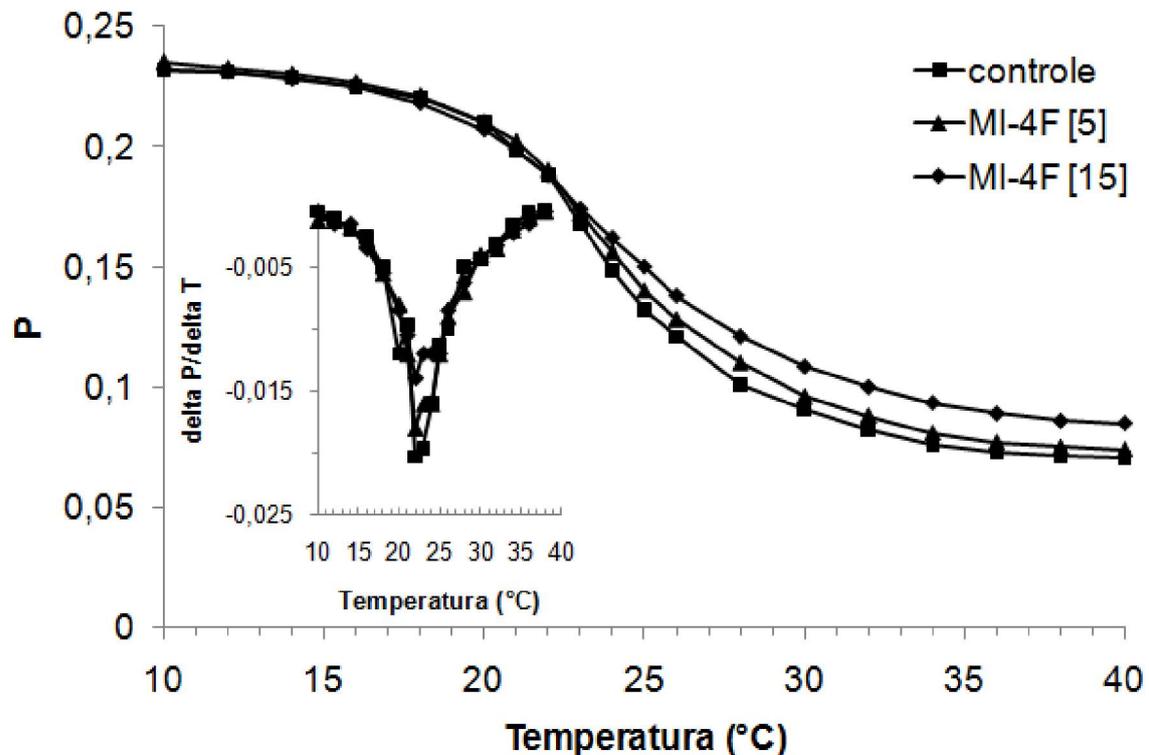


FIGURA 19 EFEITO DO MI-4F SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Lipossomas de DMPC foram preparados utilizando o lipídeo na concentração final de  $345 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , solubilizado em clorofórmio. Após evaporação do solvente o lipídeo foi hidratado com tampão Tris - maleato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, KCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$ . O derivado MI-4F foi incubado por 18 horas nas concentrações de 5 e  $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$  como indicado entre colchetes. O inserto representa a polarização diferencial do DPH em função da temperatura ( $\Delta P/\Delta T$ ). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, item 5.5. A figura é representativa de três experimentos independentes.

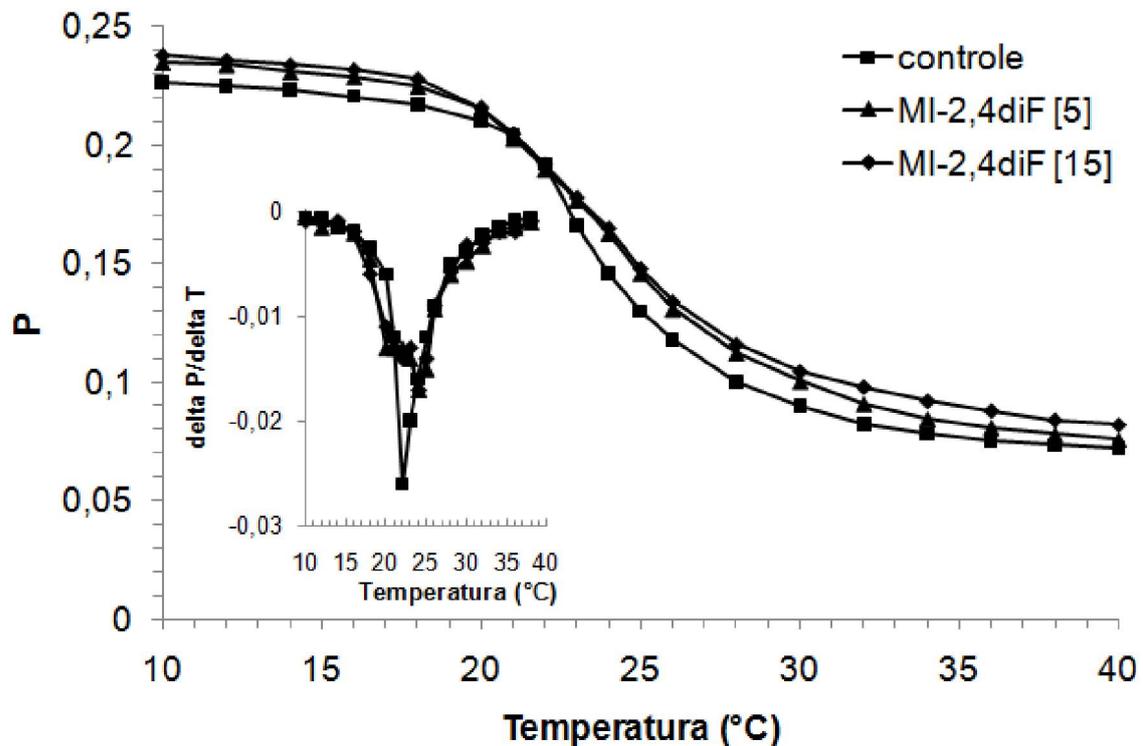


FIGURA 20 EFEITO DO MI-2,4diF SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Lipossomas de DMPC foram preparados utilizando o lipídeo na concentração final de  $345 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , solubilizado em clorofórmio. Após evaporação do solvente o lipídeo foi hidratado com tampão Tris - maleato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, KCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$ . O derivado MI-2,4diF foi incubado por 18 horas nas concentrações de 5 e  $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$  como indicado entre colchetes. O inserto representa a polarização diferencial do DPH em função da temperatura ( $\Delta P/\Delta T$ ). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, item 5.5. A figura é representativa de três experimentos independentes.

Os efeitos dos derivados sobre a polarização do DPH-PA, o qual permanece ancorado na região externa (polar) da membrana, estão mostrados nas figuras 21 a 23. O perfil de polarização desta sonda é muito parecido ao do DPH, mostrando predominância da fase gel em temperaturas inferiores a 21°C e da fase líquido-cristalina em temperaturas acima de 28°C e com valor da T<sub>m</sub> em 24°C. O efeito do MI-J neste sistema está mostrado na figura 21. Assim como para a sonda DPH, o MI-J (5 μmol.L<sup>-1</sup>) aumentou a polarização do DPH-PA, porém, somente na fase fluída. O valor para a T<sub>m</sub> não sofreu alteração em relação ao controle (24°C). Por outro lado, o MI-4F (figura 22) diminuiu discretamente os valores de P na fase fluída em ambas as concentrações de 5 e 15 μmol.L<sup>-1</sup>. Neste ensaio o valor da T<sub>m</sub> ficou inalterado para a menor concentração e diminuiu em um grau (23°C) para a concentração de 15 μmol.L<sup>-1</sup>, em comparação ao controle (24°C). Perfil semelhante foi observado para o MI-2,4diF (figura 23) que diminuiu a polarização na fase fluída em ambas as concentrações analisadas (5 e 15 μmol.L<sup>-1</sup>). Entretanto, na fase gel, os valores de P foram discretamente superiores aos do controle. Estes efeitos refletiram-se em uma diminuição da T<sub>m</sub> em um grau (23°C) para ambas as concentrações em comparação à determinada para o controle (24°C). Estes resultados sugerem que o MI-4F e o MI-2,4diF aumentam a fluidez da membrana em altas temperaturas e o MI-2,4diF aumentou a rigidez da fase gel. Estes compostos podem se inserir na bicamada lipídica e desorganizá-la, possivelmente por diminuir as interações iônicas entre as cabeças polares dos fosfolipídeos. Estes resultados mostram que em relação a organização da região polar, os derivados apresentaram efeitos opostos. O MI-J diminuiu enquanto que os derivados fluorados aumentam a fluidez da membrana.

Em estudo anterior, Cadena e colaboradores (2002) demonstraram que o MI-D também foi capaz de aumentar significativamente a polarização de fluorescência do DPH e DPH-PA em lipossomas de DMPC. Entretanto, este efeito foi significativo somente na concentração de 15 μmol.L<sup>-1</sup>, não havendo variação para a concentração de 5 μmol.L<sup>-1</sup>. Para ambas as sondas, o MI-D aumentou a polarização, entretanto este efeito foi mais evidente nas temperaturas superiores a 22°C. Como consequência, o valor da T<sub>m</sub> teve um acréscimo de 1,5°C (25°C) em relação ao valor do controle que foi de 23,5°C. Os autores sugeriram que o MI-D é capaz de inserir-se na bicamada lipídica, promovendo distúrbios tanto na fase hidrofílica como

hidrofóbica, diminuindo a sua fluidez (enrijecimento), conforme o evidenciado pelo aumento dos valores de P na fase fluída da preparação. Naquele estudo, a polarização das sondas DPH e DPH-PA em presença do MI-D também foram analisadas em lipossomas de membranas mitocondriais. Na concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  o MI-D não afetou a fluidez das membranas para ambas as sondas. Entretanto, com o aumento da concentração de MI-D ( $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ocorreu um efeito condensante da membrana, ou seja, o composto promoveu um aumento da polarização tanto para o DPH quanto para o DPH-PA. Os autores sugeriram que o MI-D se instala na membrana mitocondrial, afetando tanto os centros hidrofóbicos quanto os hidrofílicos e que o efeito desacoplador do MI-D possa resultar, ao menos em parte, desta inserção.

O perfil de polarização mostrado pelos derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF foi muito similar ao observado para o MI-D quando a sonda utilizada foi o DPH. Todos estes derivados aumentaram a polarização do DPH causando um enrijecimento da bicamada lipídica. A estrutura hidrofóbica e a ausência de carga formal destas moléculas permitem sua inserção na membrana. Os três derivados analisados neste estudo apresentam uma estrutura neutra e, portanto, podem permear membranas lipídicas. Entre os três compostos analisados, o MI-J foi o que apresentou um efeito mais pronunciado em relação aos outros derivados. Estes resultados diferem dos obtidos em experimentos de *swelling* em presença de valinomicina/ $K^+$  (PIRES *et al.*, 2011), os quais sugeriram que o derivado MI-4F é mais efetivo em alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial. Este resultado também se contrapõe a ordem de hidrofobicidade para os derivados, que define o MI-J como menos hidrofóbico em relação ao MI-4F e MI-2,4diF (PIRES *et al.*, 2010). No entanto, para a interpretação destes resultados deve-se considerar que os lipossomas utilizados como modelo experimental são constituídos de ácidos graxos saturados (DMPC), diferentes dos lipídeos que compõem a membrana mitocondrial, rica em ácidos graxos insaturados. Além disso, deve-se considerar ainda a ausência de proteínas nos lipossomas, presentes em quantidade significativa na membrana mitocondrial interna. Neste contexto sabe-se que esta membrana é composta por aproximadamente 50% de proteínas integrais, 25% de proteínas periféricas e 25% de lipídeos, sendo que destes 10% são cardiolipinas (NICHOLLS, FERGUSON, 2002).

O efeito do MI-J sobre a polarização das sondas DPH e DPH-PA foi muito similar ao do MI-D, promovendo um aumento dos valores de P. Interessantemente, estes dois derivados possuem hidrofobicidade inferior aos derivados fluorados. A menor hidrofobicidade do MI-J e MI-D poderia justificar seu maior efeito na superfície da membrana, como mostrado pelo aumento da polarização da sonda DPH-PA. Entretanto, isto não justifica o efeito promovido no interior hidrofóbico da membrana monitorado pelo DPH. Estes efeitos podem ser relacionados com a disposição destes derivados na bicamada e as interações com as cadeias lipídicas.

Considerando que as cadeias de ácidos graxos apresentam duplas ligações que são facilmente polarizáveis e interagem entre si por interações de van der Waals (LENAZ, 1979), a presença de moléculas que promovam o aumento da polarização destas duplas ligações pode promover um aumento da interação entre as cadeias de ácidos graxos. Neste contexto, os derivados MI-J e MI-D, substituídos no anel cinamoil por grupos nitro e hidroxila, respectivamente, podem promover este efeito. O flúor, o oxigênio e o nitrogênio são átomos muito eletronegativos, entretanto os dois últimos apresentam raios maiores que o primeiro, presente nos derivados MI-4F e MI-2,4diF, e conseqüentemente são mais polarizáveis. Desta forma, a inserção do MI-J e MI-D podem promover um aumento do momento de dipolo destas moléculas e das cadeias acil dos ácidos graxos e, conseqüentemente, fortalecer estas interações aumentando o seu empacotamento, quando comparados com os derivados MI-4F e MI-2,4diF. Assim, a inserção do MI-J e MI-D na membrana pode promover o enrijecimento ao aumentar a interação de moléculas com polaridade semelhantes. Esta possibilidade também pode justificar o efeito dos derivados MI-4F e MI-2,4diF. Estes apresentaram um comportamento distinto do MI-J quanto à polarização da sonda DPH-PA, mostrando um aumento na fluidez da superfície da membrana. Talvez a hidrofobicidade somada a menor polaridade destes derivados, facilitem as interações derivados - fosfolípídeo competindo com as interações lipídeo-lipídeo, promovendo uma desorganização da membrana.

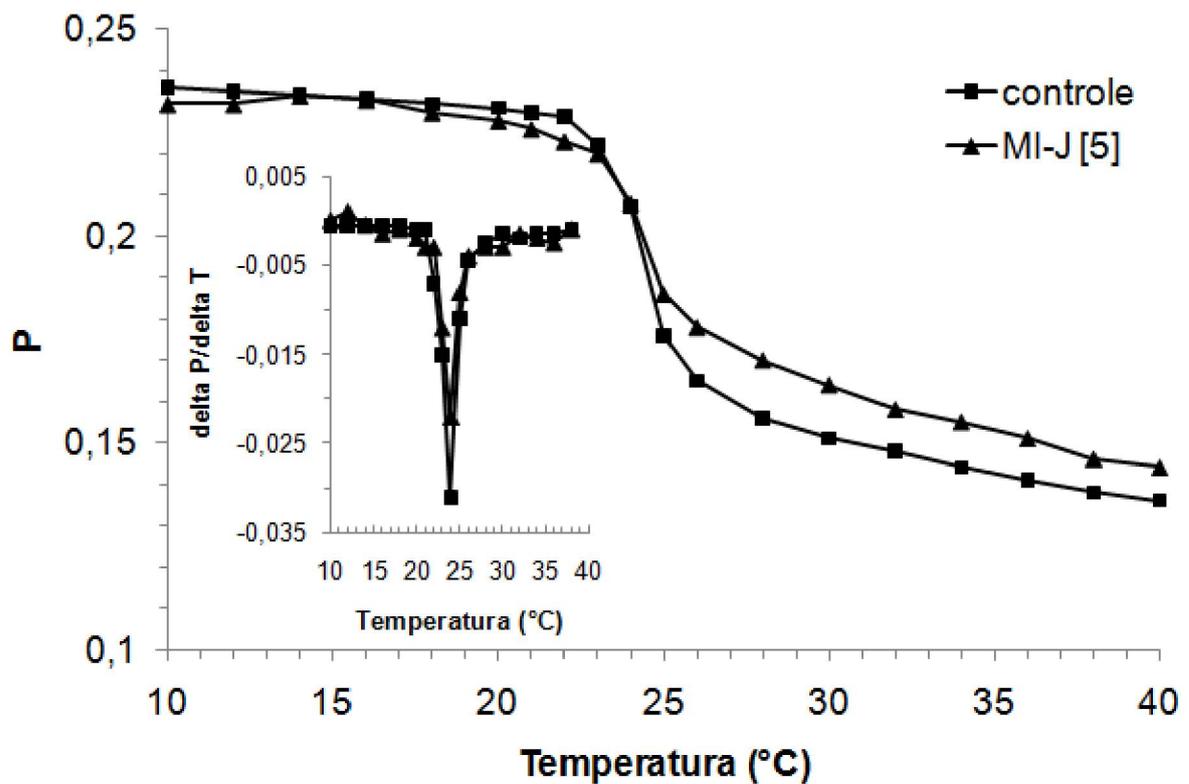


FIGURA 21 EFEITO DO MI-J SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH-PA  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Lipossomas de DMPC foram preparados utilizando o lipídeo na concentração final de  $345 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , solubilizado em clorofórmio. Após evaporação do solvente o lipídeo foi hidratado com tampão Tris - maleato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, KCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$ . O derivado MI-J foi incubado por 18 horas na concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  como indicado entre colchetes. O inserto representa a polarização diferencial do DPH-PA em função da temperatura ( $\Delta P/\Delta T$ ). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, item 5.5. A figura é representativa de três experimentos independentes.

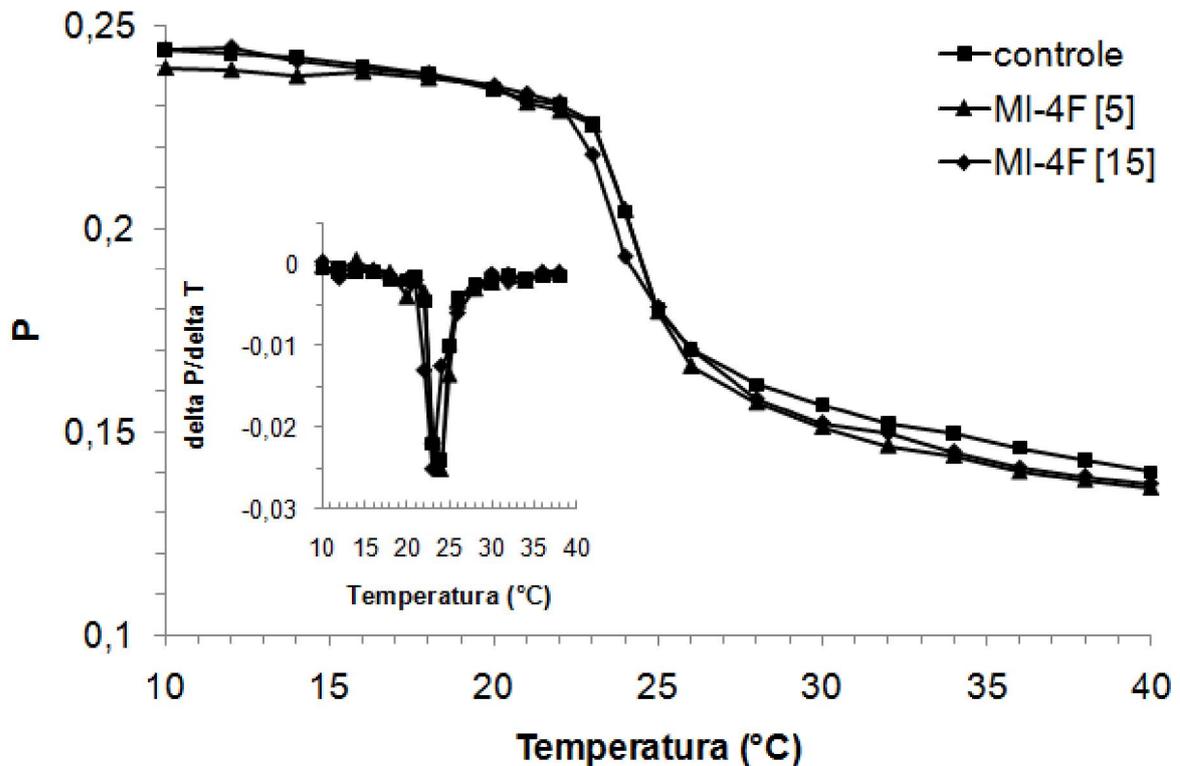


FIGURA 22 EFEITO DO MI-4F SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH-PA  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Lipossomas de DMPC foram preparados utilizando o lipídeo na concentração final de  $345 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , solubilizado em clorofórmio. Após evaporação do solvente o lipídeo foi hidratado com tampão Tris - maleato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, KCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ . O derivado MI-4F foi incubado por 18 horas nas concentrações de 5 e  $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$  como indicado entre colchetes. O inserto representa a polarização diferencial do DPH-PA em função da temperatura ( $\Delta P/\Delta T$ ). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, item 5.5. A figura é representativa de três experimentos independentes.

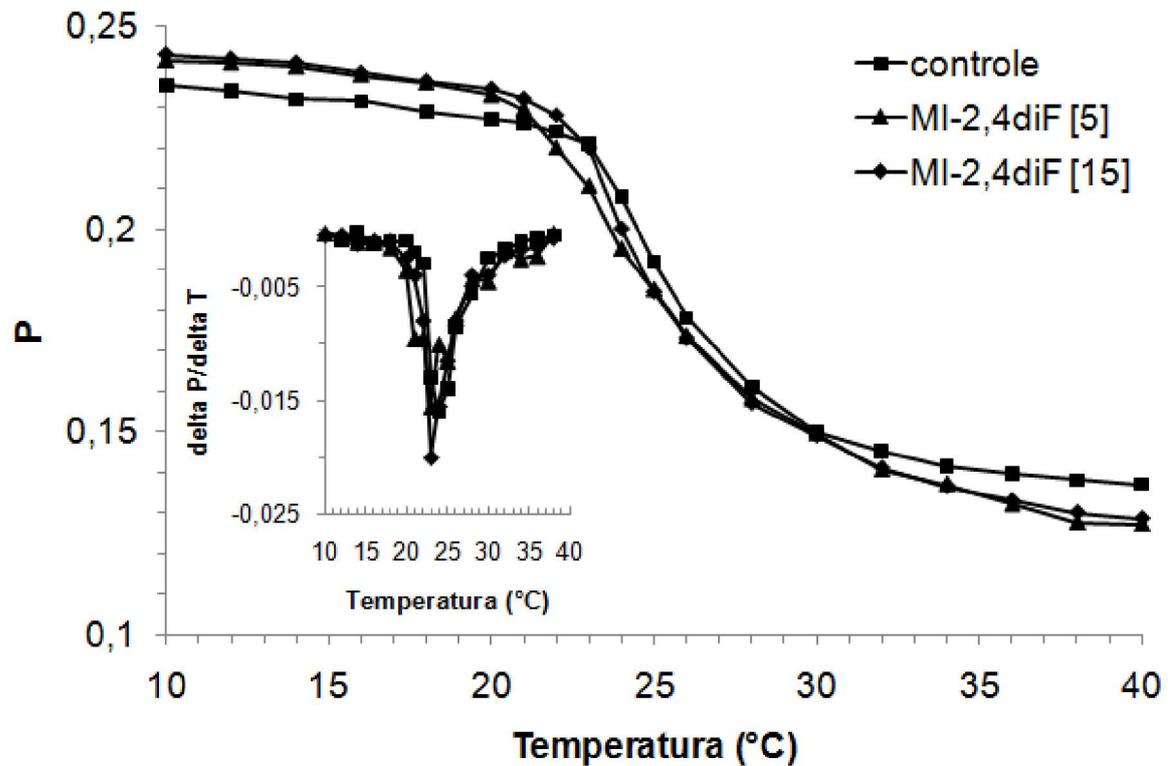


FIGURA 23 EFEITO DO MI-2,4diF SOBRE A POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DO DPH-PA  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Lipossomas de DMPC foram preparados utilizando o lipídeo na concentração final de  $345 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , solubilizado em clorofórmio. Após evaporação do solvente o lipídeo foi hidratado com tampão Tris - maleato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, KCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$ . O derivado MI-24diF foi incubado por 18 horas nas concentrações de 5 e  $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$  como indicado entre colchetes. O inserto representa a polarização diferencial do DPH-PA em função da temperatura ( $\Delta P/\Delta T$ ). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, item 5.5. A figura é representativa de três experimentos independentes.

### 6.3 LIPOPEROXIDAÇÃO

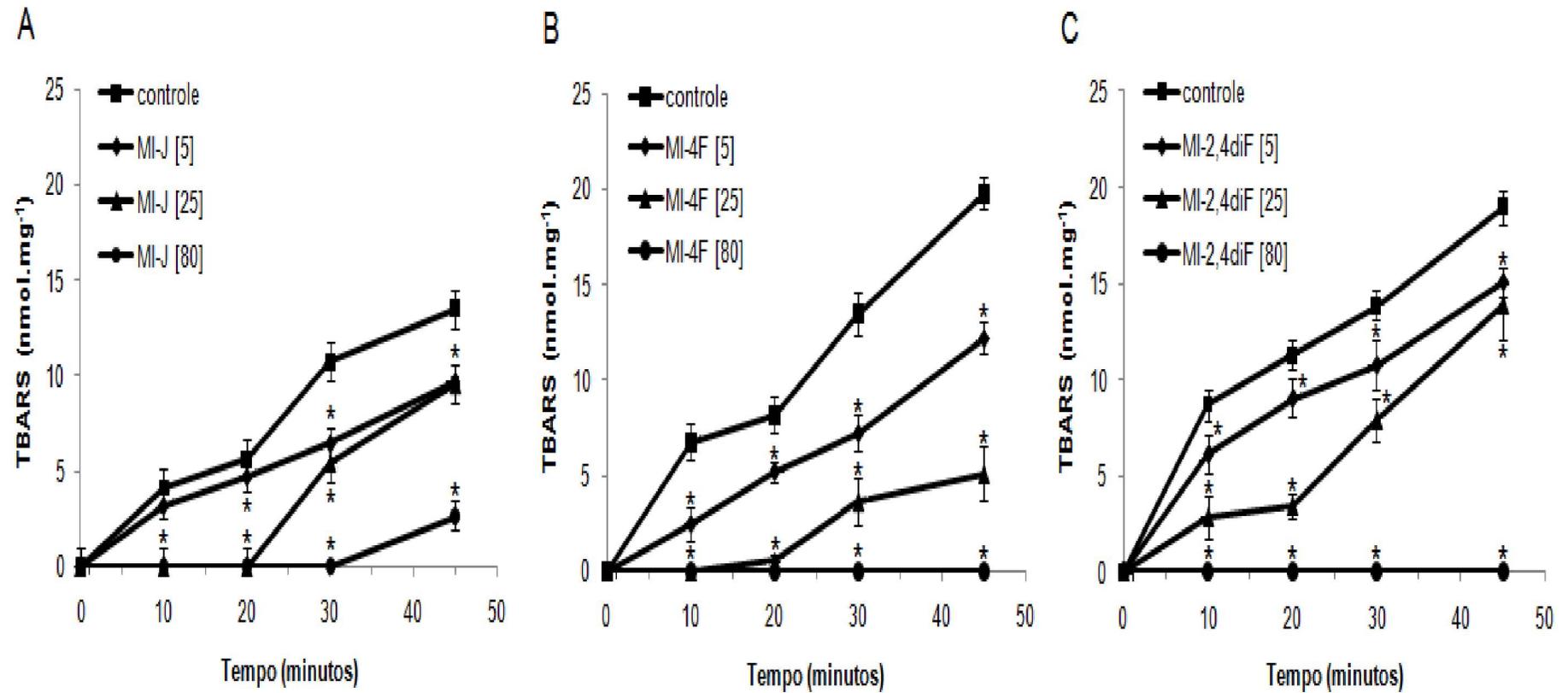
O processo conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação ocorre devido ao ataque de ERO a lipídeos. A oxidação de lipídeos presentes em membranas, os quais são produtos deste processo, estão relacionados às alterações na fluidez e perda da atividade de proteínas de membrana e até a morte celular. A morte celular programada está intimamente relacionada ao tratamento do câncer e muitas drogas utilizam esta via para promover a redução de tumores (ALAM, 2003). Neste sentido, a avaliação deste processo pode ajudar a delinear o mecanismo de ação dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, os quais apresentaram atividade antitumoral (GRYNBERG; SANTOS; ECHEVARRIA, 1997; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004). Além disso, os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF foram capazes de inibir o estado 3 da respiração mitocondrial, o que caracteriza um efeito inibidor do transporte de elétrons (PIRES *et al.*, 2010). Nesta circunstância, pode ocorrer o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e, como consequência, a indução da lipoperoxidação (ADAM-VIZI; CHINOPOULOS, 2006). Neste estudo, os ensaios de lipoperoxidação foram realizados utilizando mitocôndrias de fígado de rato acopladas e dois sistemas de indução da lipoperoxidação. No primeiro, a lipoperoxidação foi induzida por ferro em presença de substrato e ADP e, no segundo, a produção de radicais foi induzida pelo 2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidroclorato (AAPH). O processo de lipoperoxidação foi quantificado pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

#### 6.3.1. Lipoperoxidação induzida por $Fe^{3+}$ /ADP-2-oxogluturato

Nestes experimentos, mitocôndrias acopladas foram incubadas com ADP e cloreto férrico. A reação foi iniciada pela adição de 2-oxogluturato ( $\alpha$ -cetogluturato), o qual reduz o  $NAD^+$  durante a sua oxidação no ciclo do ácido cítrico. Em presença de NADH e ADP a mitocôndria produz continuamente pequenas quantidades de radical superóxido. Este, por sua vez, em presença de íons  $Fe^{2+}$ , leva a formação do radical hidroxila, altamente reativo e reconhecido como um iniciador da lipoperoxidação. Neste processo, os radicais formados reagem com as cadeias lipídicas dando origem a vários compostos, entre eles, o malondialdeído (MDA). A

formação destes compostos pode ser quantificada pelo aquecimento da amostra com ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH ácido, o qual forma um cromógeno rosa quantificado pela absorção em 532 nm (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). O efeito dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos neste sistema foi avaliado e os resultados estão mostrados na figura 24.

Os derivados foram testados nas concentrações de 5, 25 e 80 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína e a lipoperoxidação foi acompanhada nos tempos 0, 10, 20, 30 e 45 minutos. Todos os derivados inibiram a lipoperoxidação induzida por Fe<sup>3+</sup>/ADP-2-oxoglutarato (figuras 24A- C), entretanto, a intensidade deste efeito foi diferente para cada composto. O MI-J, nas concentrações de 25 e 80 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína, inibiu totalmente a lipoperoxidação (figura 24 A) em 10 minutos da reação. Em 45 minutos, a inibição da lipoperoxidação chegou a aproximadamente 30% nas concentrações de 5 e 25 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína sendo que na concentração de 80 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína a inibição chegou a 80%. O MI-4F (figura 24 B) exerceu um efeito mais intenso que o MI-J, inibindo totalmente a lipoperoxidação na maior concentração (80 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína) em todos os tempos testados. Nas menores concentrações, de 5 e 25 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína e em 45 minutos de incubação o MI-4F inibiu a lipoperoxidação em aproximadamente 40% e 75%, respectivamente. Efeito semelhante foi observado para o MI-2,4diF (figura 24 C) que inibiu totalmente a lipoperoxidação na concentração de 80 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína em todos os tempos, e nas concentrações de 5 e 25 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína promoveu uma inibição de aproximadamente 20% após 45 minutos. Estes resultados mostram que os derivados mesoiônicos são capazes de inibir a lipoperoxidação ferro induzida, em mitocôndrias acopladas que estão ativamente oxidando substratos. Como mencionado, a geração de ânion superóxido ocorre naturalmente em mitocôndrias acopladas, devido ao “vazamento” de elétrons a partir de transportadores da cadeia respiratória (ADAM-VIZI; CHINOPOULOS, 2006) o que, por sua vez, pode levar a lipoperoxidação. Sabe-se também que os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF atuam como desacopladores da fosforilação oxidativa (PIRES *et al.*, 2010). Considerando que agentes desacopladores aumentam a velocidade do transporte de elétrons diminuindo assim o tempo em que os transportadores permanecem reduzidos, o que por sua vez reduz o vazamento de elétrons e a geração de radical superóxido, é possível sugerir que os derivados mesoiônicos ao promoverem este efeito, inibam também o processo de lipoperoxidação.



24 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDA POR FERRO.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, ADP  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{FeCl}_3$   $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e proteína  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A reação foi iniciada com adição de 2-oxoglutarato  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Os derivados estavam presentes nas concentrações de 5, 25 e  $80 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína (como indicado entre colchetes). Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 10, 20, 30 e 45 minutos e adicionados 2 mL de reativo constituído de ácido tricloroacético (TCA) 15% (m/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,4% (m/v) em HCl 0,25N e BHT 0,01%. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, item 5.4.3.6 Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 6$ ). \* Significativamente diferente do controle ( $P < 0,05$ ).

Resultado similar foi demonstrado para o derivado MI-D que também inibiu a lipoperoxidação ferro induzida. Na concentração de  $25 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína este composto inibiu em aproximadamente 48% a lipoperoxidação chegando a  $\sim 97\%$  na concentração de  $80 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína em 45 minutos de incubação (MÉNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2009). Segundo os autores, este efeito foi decorrente da ação desacopladora do composto, descrito anteriormente por Cadena e colaboradores (1998).

### 6.3.2. Lipoperoxidação induzida por AAPH

O AAPH é um composto que sofre decomposição térmica a  $37^\circ\text{C}$  originando um radical peroxil (figura 25) que pode iniciar o processo de lipoperoxidação (HANLON; SEYBERT, 1997). Este ensaio foi realizado no sentido de eliminar a influência da cadeia respiratória na geração de radicais livres, bem como a influência dos derivados sobre a fosforilação oxidativa.

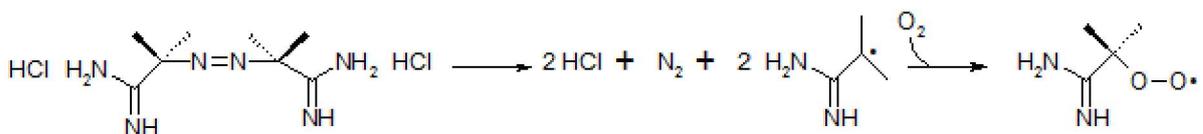


FIGURA 25 DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO AAPH EM PRESENÇA DE OXIGÊNIO.

FONTE: Hanlon e Seybert (1997).

NOTA: O composto AAPH sofre decomposição térmica a  $37^\circ\text{C}$  gerando um radical amidinio centrado no átomo de carbono que reage com o oxigênio formando o radical peroxil.

Os efeitos dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre a lipoperoxidação induzida por AAPH em mitocôndrias de fígado de rato estão mostrados na figura 26. Os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF foram testados nas concentrações de 5, 25 e  $80 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína e o tempo de reação foi fixado em 45 minutos (figura 26). Todos os derivados promoveram a inibição de lipoperoxidação, entretanto, este efeito foi menos pronunciado que o observado quando a lipoperoxidação foi induzida por ferro. O MI-J e o MI-4F inibiram a lipoperoxidação em aproximadamente 10% na

menor concentração ( $5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína), enquanto que na maior concentração ( $80 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) estes derivados promoveram uma inibição de 58% e 39%, respectivamente. Por sua vez, o MI-2,4diF nas concentrações de 5, 25 e  $80 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína inibiu a lipoperoxidação em aproximadamente 27%, 37% e 58%, respectivamente. Estes resultados mostram que os derivados mesoiônicos são capazes de inibir o processo de lipoperoxidação mesmo quando a fonte de radicais livres não está relacionada ao transporte de elétrons na cadeia respiratória. Uma possível explicação para a inibição da lipoperoxidação seria o sequestro de radicais livres pelos derivados.

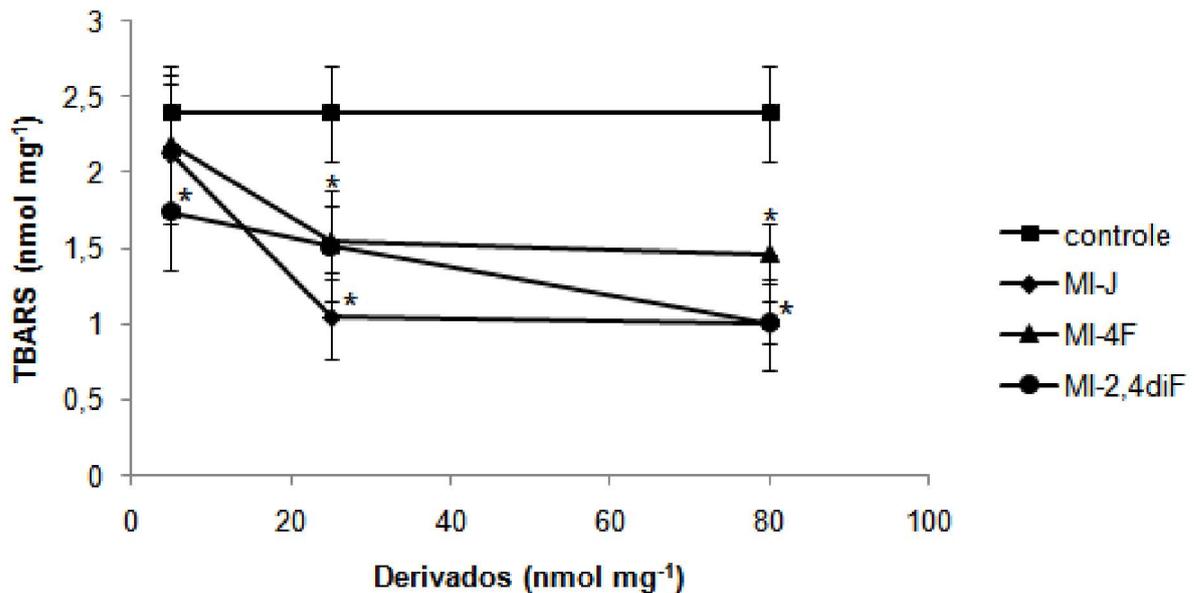


FIGURA 26 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDA POR AAPH.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: Meio de reação: D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2 e proteína  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A reação foi iniciada com adição de  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de AAPH. Os efeitos dos derivados foram analisados nas concentrações de 5, 25 e  $80 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína. Após 45 minutos de incubação foram retiradas alíquotas as quais foram adicionados 2 mL de reativo constituído de ácido tricloroacético (TCA) 15% (m/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,4% (m/v) em HCl 0,25N e BHT 0,01%. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, itens 5.4.3.6. Controle representa os experimentos realizados na ausência dos derivados. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 6$ ). \* Significativamente diferente do controle ( $P < 0,05$ ).

Méndez-Sánchez e colaboradores (2009) também avaliaram o efeito do MI-D sobre a lipoperoxidação induzida por AAPH. Naquele estudo, o MI-D inibiu em aproximadamente 22% na maior concentração testada ( $80 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) enquanto na concentração de  $25 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína esta inibição não foi significativa. Estes resultados mostram que o MI-D pode atuar como sequestrador de radicais livres e desta forma inibir a lipoperoxidação. Entretanto a inibição da lipoperoxidação induzida por AAPH (22%) foi inferior à induzida por ferro (97%) nas mesmas condições, mostrando que a inibição é maior quando os radicais são provenientes da cadeia respiratória. Os autores sugeriram que esta diferença se deve ao efeito desacoplador daquele composto. Neste sentido, semelhantemente ao MI-D, possivelmente o efeito desacoplador dos derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF justifiquem os resultados obtidos no presente estudo, os quais mostraram que a inibição da lipoperoxidação induzida por ERO geradas pela cadeia respiratória foi maior que a induzida por radicais peroxil provenientes da degradação do AAPH.

#### 6.4 CAPACIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS SUPERÓXIDO

Para esclarecer se o efeito inibitório dos derivados sobre a lipoperoxidação induzida por ferro poderia ser resultante da habilidade destes compostos de sequestrar radicais livres, especificamente ânion superóxido, ensaios foram realizados nos quais este radical é gerado em sistema contendo fenazina metassulfato (PMS), NADH e nitroblue tetrazólium (NBT) (figura 27), segundo Nishimiki e colaboradores (1972).

Os resultados destes experimentos estão apresentados na figura 28. A habilidade do MI-J em sequestrar superóxido foi de ~22% em todas as concentrações analisadas ( $5, 25$  e  $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Em contraste, para os derivados fluorados este efeito foi dose-dependente e de maior intensidade. Na menor concentração ( $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), o MI-4F foi capaz de sequestrar os ânions superóxido em ~5%, chegando a ~32% na maior concentração ( $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em comparação ao controle. O MI-2,4diF foi mais efetivo tanto na menor concentração ( $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  - ~15%) quanto na maior concentração ( $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$  - 40%) quando comparado ao derivado monofluorado. A capacidade sequestradora de radicais superóxido mostrada pelos derivados foi inferior a inibição da lipoperoxidação induzida por ferro

e por AAPH (figura 24 e 26, respectivamente). Isto sugere que os derivados possam sequestrar também outras espécies radicalares, além do superóxido, como o radical peroxil formado durante decomposição do AAPH (figura 25). Neste contexto, é possível sugerir que os derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos possam atuar como antioxidantes, uma vez que apresentam em sua estrutura um anel heterocíclico com insaturações (figura 13), o que possibilitaria o recebimento de elétrons provenientes de espécies radicalares.

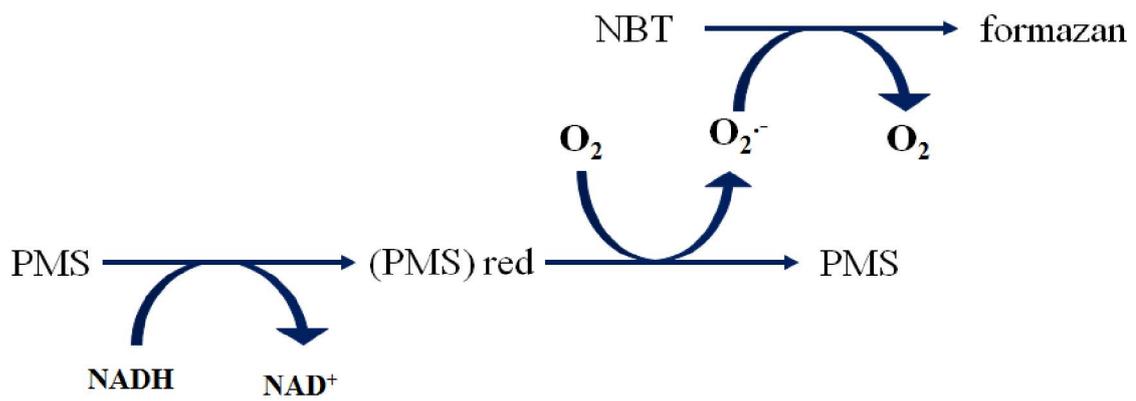


FIGURA 27 REDUÇÃO DO NBT EM PRESENÇA DE PMS E NADH.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Neste sistema o PMS sofre redução em presença de NADH, que se reoxida ao reduzir o oxigênio a superóxido. O radical superóxido formado reage com o NBT, que é oceptor final deste elétron no sistema, gerando *formazan* que é quantificado em 560nm. Compostos que são capazes de capturar radicais superóxido inibem, portanto, a redução do NBT.

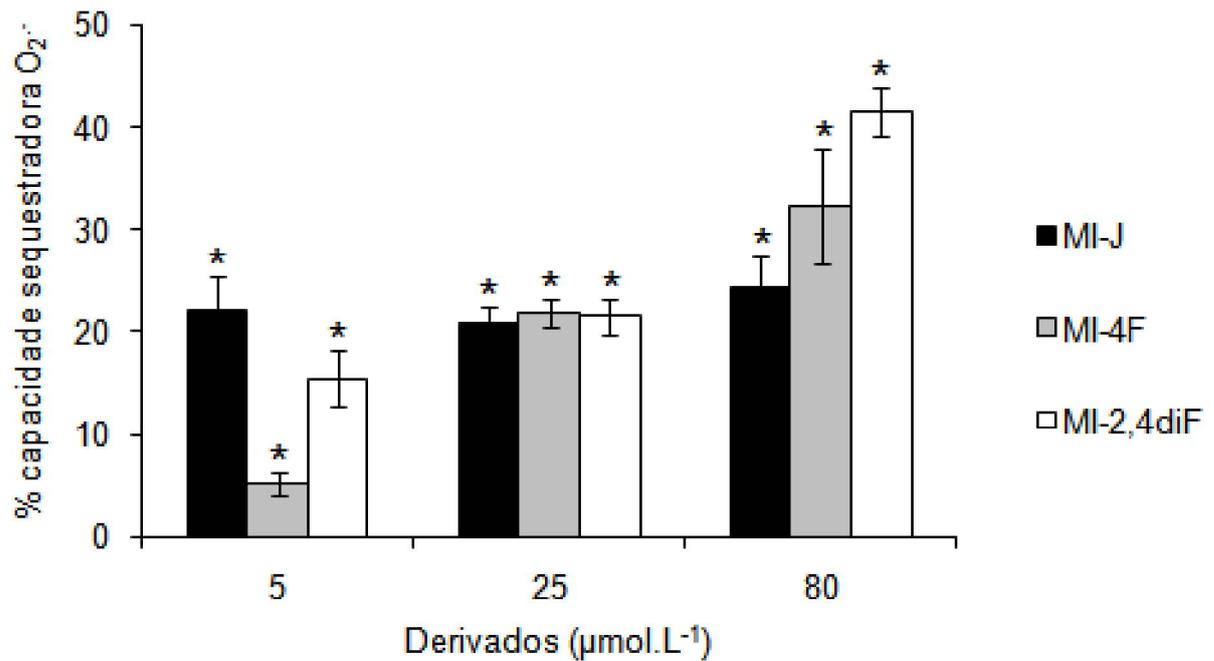


FIGURA 28 CAPACIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS SUPERÓXIDO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0, NBT 72 µmol.L<sup>-1</sup> e PMS 30 µM. A reação foi iniciada com adição de 0,340 µmol.L<sup>-1</sup> de NADH. Os efeitos dos derivados foram avaliados nas concentrações de 5, 25 e 80 µmol.L<sup>-1</sup>. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, itens 5.4.3.5. Os resultados são expressos como porcentagem de radical superóxido sequestrado em relação ao controle (sem a adição dos derivados). Cada valor representa a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. \* Significativamente diferente do controle (P < 0,05).

Estes mesmos efeitos também foram observados para o MI-D. Em estudo anterior, Méndez-Sánchez e colaboradores (2009) avaliaram a capacidade sequestradora de radicais superóxido do derivado MI-D. Os resultados obtidos naquele trabalho mostraram que o derivado também foi capaz de sequestrar o radical superóxido de forma dose-dependente em aproximadamente 7% e 31% para 25 e 80 µmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Como verificado para os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF no presente estudo, a capacidade sequestradora de radicais superóxido pelo MI-D foi de intensidade inferior a inibição promovida sobre a lipoperoxidação induzida por AAPH. Em conjunto, estes resultados reforçam a hipótese de que compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazó-2-fenilamina sejam capazes de

sequestrar diferentes espécies radicalares. Ainda no mesmo trabalho (MÉNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2009), sugeriu-se que esta propriedade de sequestrar radicais superóxido poderia explicar o decréscimo promovido pelo derivado ( $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) nos níveis de superóxido em macrófagos estimulados por PMA (forbol éster 12-meristato 13-acetato) (CARDOSO *et al.*, 2004).

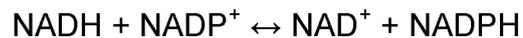
Ainda em relação à capacidade sequestradora de radicais superóxido, os derivados MI-J, MI-4F e MI-D apresentam efeitos de intensidades estatisticamente iguais na maior concentração ( $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) enquanto o MI-2,4diF mostrou efeito mais pronunciado. Talvez a maior habilidade de sequestrar radicais pelo MI-2,4diF possa ser explicada pela maior deslocalização de cargas presente em sua estrutura, a qual apresenta dois átomos de flúor ligados ao anel cinamoil (figura 13 e PIRES *et al.*, 2010).

## 6.5 ESTADO REDOX DOS NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA

A nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$  em sua forma oxidada) e sua análoga nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ( $\text{NADP}^+$  em sua forma oxidada) são coenzimas hidrossolúveis que sofrem oxidação e redução reversíveis em muitas das reações metabólicas de transferência de elétrons. Como seus anéis de nicotinamida lembram a piridina, esses compostos são algumas vezes denominados nucleotídeos de piridina (NELSON; COX, 2011). Como mencionado, estas moléculas estão envolvidas em reações de remoção de espécies reativas de oxigênio, mais especificamente do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Neste contexto, sabe-se que o radical superóxido formado durante o transporte de elétrons pela cadeia respiratória é dismutado a peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD) (ADAM-VIZI; CHINOPOULOS, 2006). Por sua vez, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido nesta reação pode ser decomposto à água pela ação da catalase, glutathione peroxidase e pela tioredoxina peroxidase, sendo que as duas últimas utilizam o NADPH para restabelecer a forma reduzida da glutathione e da tioredoxina, respectivamente. Desta forma, os níveis de NADPH são intimamente relacionados com a capacidade antioxidante mitocondrial (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

O NADPH é regenerado pela atividade da transidrogenase nicotinamida mitocondrial. Esta enzima é uma proteína integral da membrana mitocondrial interna

e catalisa a transferência reversível de íons hidreto entre  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  de acordo com a reação abaixo:



Constituindo uma bomba de prótons, esta enzima atua de forma acoplada à transferência de elétrons do  $\text{NADH}$  para o  $\text{NADP}^+$ , ou seja, a redução do  $\text{NADP}^+$  a partir de elétrons provenientes do  $\text{NADH}$ , é acoplada à translocação de prótons do espaço intermembranas para a matriz. Sua atividade é então influenciada pelo gradiente eletroquímico de prótons. Neste sentido, a energização da mitocôndria promove uma modificação conformacional da enzima, favorecendo a redução do  $\text{NADP}^+$  a partir dos elétrons provenientes do  $\text{NADH}$  em cerca de 10 vezes e, simultaneamente, a reação reversa de oxidação  $\text{NADPH}$  é inibida. Além disso, ambas as reações são inibidas por seus produtos. Desta forma, em situação de oxidação de  $\text{NADPH}$  (diminuição da razão  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ ) ocorre a ativação da transidrogenase no sentido de restabelecer o equilíbrio entre  $\text{NADPH}$  e  $\text{NADH}$  (ENANDER; RYDSTRÖM, 1982; HOEK; RYDSTRÖM, 1988).

Uma vez que os derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos inibem a lipoperoxidação induzida por  $\text{Fe}^{2+}/\text{ADP}/2\text{-oxoglutarato}$  e por  $\text{AAPH}$  e, ainda, que parte deste efeito possa ser atribuída a sua capacidade de sequestrar radicais superóxido, foram realizados ensaios de determinação do estado redox de nucleotídeos de piridina em presença do MI-J, MI-4F e MI-2,4diF. Embora não tenha sido objeto do presente estudo até então, decidiu-se também avaliar o perfil de oxidação dos nucleotídeos de piridina em presença de outro derivado desta mesma classe, o MI-D. Como mencionado, para o MI-D já são descritos na literatura os efeitos de inibição sobre a lipoperoxidação e capacidade sequestradora de radicais superóxido. Nestes experimentos, foram avaliados os efeitos dos compostos sobre a oxidação espontânea e induzida, pela presença de cálcio, dos nucleotídeos de piridina, medindo-se a fluorescência intrínseca do  $\text{NADH}$  e  $\text{NADPH}$  quando em sua forma reduzida, propriedade que permite a quantificação e monitoramento do seu estado redox (MAYEVSKY; ROGATSKY, 2007).

Nestes experimentos a reação foi iniciada pela adição de succinato de sódio que ao ser oxidado no complexo II fornece os elétrons que serão transportados pela cadeia respiratória, com geração de ânion superóxido. Neste contexto, sabe-se que durante a respiração mitocondrial cerca de 1 a 2% do oxigênio consumido deve-se a formação de ânions superóxido (ADAM-VIZI; CHINOPOULOS, 2006). O ânion

superóxido formado será convertido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  cuja decomposição à água, devido à ação da glutathione peroxidase e tioredoxina peroxidase, ocorrerá concomitantemente à oxidação de NADPH. A oxidação dos nucleotídeos de piridina é visualizada pela redução da intensidade de fluorescência. Nestes experimentos foi acompanhada predominantemente a oxidação do NADPH já que a oxidação do NADH pelo complexo I (NADH desidrogenase) foi impedida pela adição de rotenona. Ensaios controle na presença do mesmo volume de DMSO utilizado para solubilização dos derivados foram realizados e mostraram que o solvente não altera a fluorescência dos nucleotídeos de piridina em comparação ao controle.

No sentido de avaliar se os derivados mesoiônicos interfeririam no sinal de fluorescência dos nucleotídeos de piridina, foram feitos ensaios preliminares na presença de NADPH e dos derivados em volumes iguais aos utilizados para as concentrações de 6,5, 32,5, 65 e 130  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína. Nestes ensaios observou-se que o MI-J, MI-4F, MI-2,4diF e MI-D diminuía a intensidade de fluorescência nas concentrações de 65 e 130  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína. Desta forma, foram utilizadas somente as menores concentrações (6,5 e 32,5  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína). Os resultados referentes a estes experimentos estão demonstrados na figura 29. Os efeitos promovidos pelos derivados sobre a oxidação do NADPH foram semelhantes. O MI-J (figura 29 A) na menor concentração (6,5  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína) não alterou a intensidade de fluorescência dos nucleotídeos de piridina em relação ao ensaio controle (linha azul). Já na concentração de 32,5  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína observou-se uma redução na fluorescência de aproximadamente 20%, ou seja, o derivado preveniu a oxidação dos nucleotídeos de piridina. Efeito semelhante foi observado para o MI-4F (figura 29 B) que inibiu a oxidação dos nucleotídeos de piridina na maior concentração (32,5  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína) enquanto que em 6,5  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína não teve efeito. O MI-D (figura 29 D) mostrou um perfil diferente dos derivados MI-J e MI-4F, promovendo a diminuição da fluorescência de aproximadamente 15% somente na menor concentração (6,5  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína), enquanto na maior concentração (32,5  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína) não mostrou alteração em relação ao ensaio controle. Por outro lado, o MI-2,4diF (figura 29 C) impediu a oxidação do NADPH em ambas as concentrações (6,5 e 32,5  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína) apresentando a mesma intensidade (~17%). Este efeito demonstrado pelos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos pode ser explicado pela sua capacidade de sequestrar radicais superóxido, mostrada anteriormente (figura

28, e para o MI-D por MÉNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2009). Pode-se observar também que a intensidade do efeito inibitório da oxidação dos nucleotídeos de piridina é muito semelhante entre os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF com valores entre 17 e 20% para a concentração de  $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína, sendo que o MI-D reduziu a intensidade de fluorescência somente na menor concentração. Nos experimentos de sequestro de radicais superóxido (figura 28), na concentração de  $25 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (equivalente a  $50 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) os derivados apresentaram efeitos de intensidade semelhante (~20% de atividade sequestradora). Em resumo, a partir dos resultados destes experimentos, pode-se sugerir que a presença dos derivados MI-J, MI-4F, MI-D e MI-2,4diF nas preparações mitocondriais promove um efeito protetor contra o estresse oxidativo promovido pelos radicais superóxido, gerados naturalmente durante o processo de transporte de elétrons.

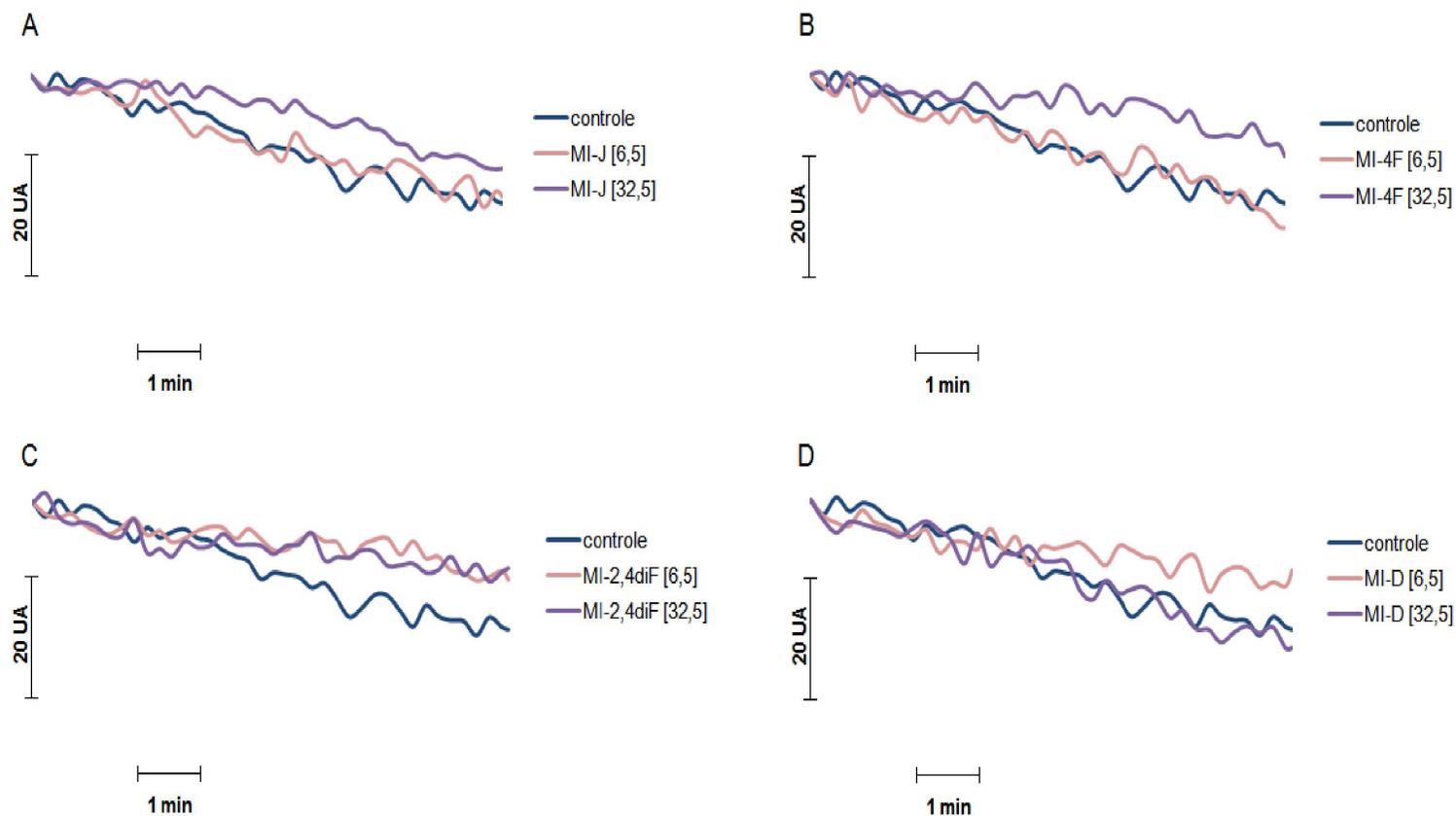


FIGURA 29 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O ESTADO REDOX DOS NUCLEOTÍDEOS DE PIRIDINA  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: sacarose  $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $65 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES-KOH  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,4, rotenona  $2,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  e proteína  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Todos os ensaios foram feitos na ausência de cálcio. A reação ocorreu a  $30^\circ\text{C}$ , sob constante agitação e foi iniciada com adição de  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de succinato de sódio. Os derivados (A) MI-J, (B) MI-4F, (C) MI-2,4diF e (D) MI-D foram adicionados 2 minutos antes do início da reação e foram testados nas concentrações de  $6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína (linha rosa) e  $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína (linha lilás). Ensaio controle (ausência dos derivados) está representado na linha azul. A fluorescência do NADPH foi medida usando os comprimentos de onda de  $366 \text{ nm}$  para excitação e  $450 \text{ nm}$  para emissão com fenda de  $5,0 \text{ nm}$ . As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.4.3.2 Os valores estão expressos em unidades arbitrárias (U.A.) de fluorescência e os traçados são representativos de 5 experimentos independentes em triplicata.

A mitocôndria tem a capacidade de capturar e armazenar grande quantidade de cálcio e essa sobrecarga pode favorecer o estresse oxidativo (VERCESI, 1993; KOWALTOWSKI *et al.*, 2001). O acúmulo de cálcio intramitocondrial pode resultar no estímulo das reações do ciclo do ácido cítrico e, conseqüentemente, o aumento na produção das coenzimas FADH<sub>2</sub> e NADH o que, por sua vez, irá favorecer a maior formação de ERO. De outro modo, o cátion ao ligar-se a cardiolipinas presentes na MMI promove uma desorganização da fase lipídica, favorecendo a redução monoelétrica do oxigênio. Ainda, o cálcio pode favorecer a formação de ERO ao estimular a enzima óxido nítrico sintase (NOS). O óxido nítrico gerado inibe o complexo IV da cadeia respiratória o que pode promover o aumento da geração de ERO a partir do complexo III, sendo que a principal fonte de superóxido mitocondrial é o radical intermediário ubisemiquinona (QH<sup>\*</sup>) formado durante o ciclo Q no sítio Qp do complexo III (BROOKES *et al.*, 2004, CARAFOLI, 2010, RAND; SENGUPTA, 1972).

Considerando o exposto, o efeito dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre o estado redox dos nucleotídeos de piridina foi também avaliado em presença de cálcio. Os resultados destes experimentos estão mostrados na figura 30. Observa-se na linha correspondente ao controle (controle com cálcio) que a adição de cálcio promoveu uma significativa redução da intensidade de fluorescência, devido à oxidação dos nucleotídeos de piridina, efeito este consideravelmente maior que a oxidação espontânea (controle - ausência de cálcio). Ainda na figura 30, pode-se observar que todos os derivados mostram perfil similar, prevenindo a oxidação do NADPH de modo dose-dependente. Na concentração de 6,5 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína o MI-J (figura 30 A) promoveu uma significativa inibição da oxidação dos nucleotídeos de piridina (~27%) sendo que em 32,5 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína esta inibição quase dobrou (~60%). Na maior concentração, o perfil do MI-J foi similar ao do ensaio sem a adição de cálcio (controle – linha azul). O MI-4F (figura 30 B) também inibiu a oxidação dos nucleotídeos de piridina, porém não se observou diferença entre as concentrações utilizadas (6,5 e 32,5 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína) e este efeito foi de intensidade semelhante a menor concentração do MI-J (~28%). O efeito do MI-2,4diF (figura 30 C) mostrou um perfil semelhante ao MI-J inibindo a oxidação dos nucleotídeos de piridina desde a menor concentração em ~40% (6,5 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína), sendo que na maior concentração testada (32,5 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína) a diminuição da intensidade de fluorescência foi comparável ao do ensaio controle

(~64%). Assim como para os ensaios de oxidação espontânea dos nucleotídeos de piridina, o efeito do MI-D também foi avaliado em uma condição de estresse por sobrecarga de cálcio. O MI-D (figura 30D) também reduziu a intensidade de fluorescência dos nucleotídeos de piridina, entretanto somente na maior concentração ( $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) e esta inibição foi superior a dos outros derivados (~79%), sendo portanto o derivado mais efetivo na maior concentração utilizada. Entretanto, este foi o único derivado que não alterou o estado redox dos nucleotídeos de piridina na maior concentração ( $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) na ausência de cálcio (figura 29).

A partir destes resultados é possível sugerir que os derivados MI-J, MI-4F, MI-2,4diF e MI-D atuam como antioxidantes neste sistema, porém, em presença de cálcio, este efeito é mais significativo. Como observado em experimentos anteriores, tal efeito poderia ser decorrente da capacidade sequestradora de radicais livres dos derivados (figura 28). No entanto, é importante considerar outras possibilidades: alterações da atividade das enzimas antioxidantes e/ou interferência na entrada do cálcio na matriz mitocondrial. Estas possibilidades foram avaliadas através de ensaios de transporte de cálcio e transição de permeabilidade mitocondrial e de determinação da atividade de enzimas antioxidantes, em presença dos derivados. Os resultados destes experimentos são apresentados a seguir.

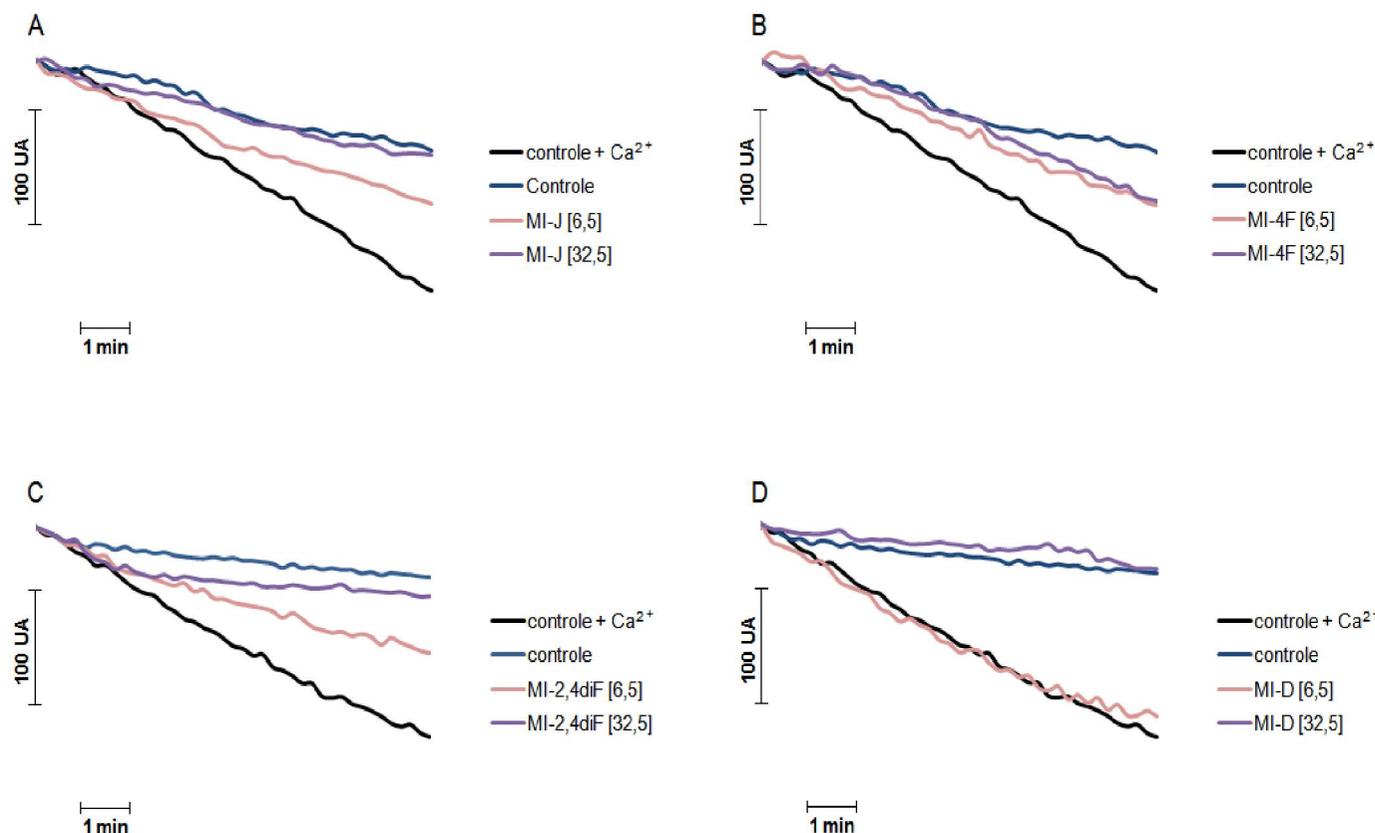


FIGURA 30 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICO SOBRE O ESTADO REDOX DOS NUCLEOTÍDEOS PIRIDINA EM PRESENÇA DE CÁLCIO

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: sacarose  $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $65 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES-KOH  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,4, rotenona  $2,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  e proteína  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Exceto o ensaio controle, todos os ensaios foram feitos em presença de  $40 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ . A reação ocorreu a  $30^\circ\text{C}$ , sob constante agitação e foi iniciada com adição de  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de succinato de sódio. Os derivados (A) MI-J, (B) MI-4F, (C) MI-2,4diF e (D) MI-D foram adicionados 2 minutos antes do início da reação e foram testados nas concentrações de  $6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína (linha rosa) e  $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína (linha lilás). Ensaio controle (ausência dos derivados) está representado pela linha azul e controle na presença de cálcio pela linha preta. A fluorescência do NADPH foi medida usando os comprimentos de onda de  $366 \text{ nm}$  para excitação e  $450 \text{ nm}$  para emissão com fenda de  $5,0 \text{ nm}$ . As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item.5.4.3.2. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias (U.A.) de fluorescência e os traçados são representativos de 4 experimentos independentes em triplicata.

## 6.6 TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

O poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) é caracterizado como uma estrutura proteica localizada na membrana mitocondrial interna, cujas mudanças conformacionais, que resultam alternadamente em suas formas aberta e fechada, são dependentes da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e sensíveis a ciclosporina A (ZAGO, CASTILHO, VERCESI, 2000). A abertura do PTPM promove o colapso do gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ ), a hidrólise de ATP, o inchamento mitocondrial (BATANDIER *et al.*, 2004) e o extravasamento de solutos normalmente impermeáveis à membrana mitocondrial interna, como alguns íons e, de particular importância, de proteínas pró-apoptóticas para o citosol. Desta forma, a abertura do PTPM tem um papel crítico no processo de morte celular, mediada tanto por necrose quanto por apoptose (CARAFOLI, 2010).

A abertura do PTPM pode ser induzida por agentes pró-oxidantes, ligantes de tióis, fosfato inorgânico e desacopladores. Sabe-se, também, que o acúmulo ERO devido à depleção de GSH e NADPH pode promover este processo, além de induzir a peroxidação lipídica (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 1996 e 2001).

Uma vez que os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4-F inibiram a oxidação dos nucleotídeos de piridina, a lipoperoxidação e, ainda, foram capazes de sequestrar ânions superóxido, tornou-se importante avaliar também seus efeitos sobre a formação e abertura do PTPM. A figura 31 mostra um ensaio controle em presença de EGTA e ciclosporina A, conhecidos inibidores da formação/abertura do PTPM (ZORATTI; SZABÓ, 1995). O EGTA por ser um quelante de cálcio, impedirá que o íon esteja livre para induzir a formação do PTPM, já a ciclosporina A exerce seu efeito inibidor devido a sua ligação específica a ciclofilina D, uma proteína envolvida na abertura do PTPM (NICOLLI *et al.*, 1996). A inibição por ciclosporina A é usada como identificador do PTPM (ZORATTI, SZABÓ, 1995). Ensaio na presença de EGTA e ciclosporina A foram realizados em todos os experimentos, porém, estão mostrados separadamente para melhor clareza e visualização posterior dos efeitos dos derivados. Na figura 31 observa-se o ensaio em que a reação foi iniciada pela adição de succinato de sódio a uma suspensão contendo mitocôndrias acopladas em presença de cloreto de cálcio e fosfato. A diminuição da absorbância reflete o inchamento mitocondrial como consequência da abertura do PTPM e posterior entrada de água na organela. Este processo foi acompanhado

espectrofotometricamente em 540 nm. Ainda na figura 31 pode-se observar que a pré-incubação da preparação mitocondrial com ciclosporina A ou EGTA impediu completamente a abertura do PTPM em contraste ao significativo inchamento visualizado na ausência destes inibidores (controle).

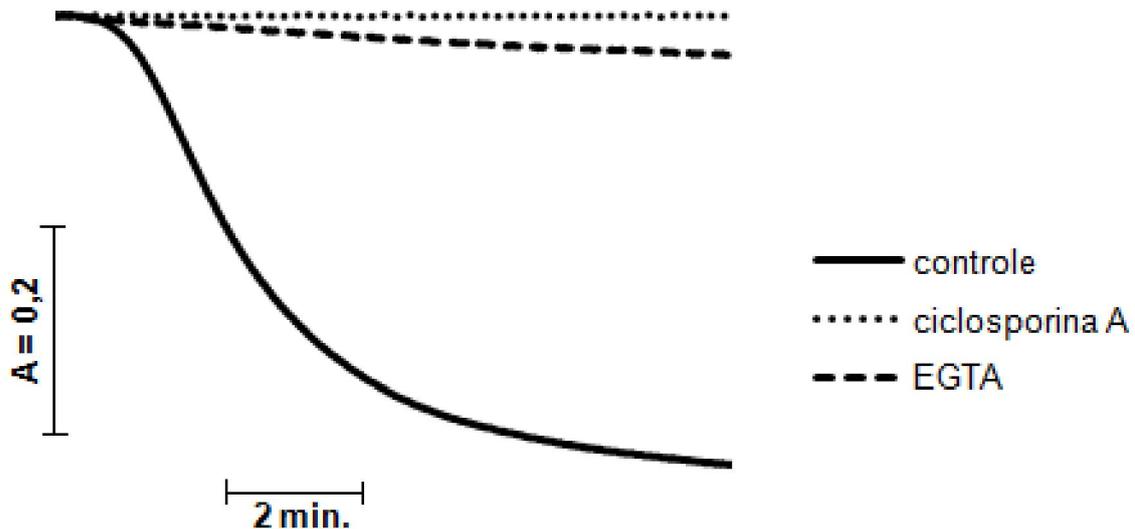


FIGURA 31 ENSAIO CONTROLE DE TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, rotenona 5 μmol.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 mmol.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 45 μmol.L<sup>-1</sup> e proteína 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. A reação foi realizada a 28°C e iniciada com adição de 3 mmol.L<sup>-1</sup> de succinato de sódio. Quando indicado a reação ocorreu em presença de EGTA 1 mmol.L<sup>-1</sup> ou ciclosporina A 0,5 μmol.L<sup>-1</sup>. A formação do poro de transição de permeabilidade foi monitorada pela variação da absorbância em 540 nm durante 10 minutos. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.4.3.4. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

A figura 32 mostra o efeito dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre a TPM induzida por fosfato. Todos os derivados foram testados nas concentrações de 6,5, 32,5, 65 e 130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína. A linha controle mostra uma diminuição da absorbância após a adição de succinato de potássio, refletindo um inchamento mitocondrial decorrente da formação do PTPM. Na figura 32-A estão mostrados os efeitos do MI-J sobre a TPM. Pode-se observar que o MI-J reduziu a amplitude do inchamento decorrente da formação do PTPM de forma dose-dependente. Na menor

concentração ( $6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) o MI-J não promoveu efeito significativo, entretanto, na concentração de  $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína a amplitude do inchamento foi reduzida em  $\sim 49\%$  enquanto que a velocidade deste processo foi comprometida em  $\sim 34\%$ . Nas concentrações de 65 e  $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína a inibição foi total. O MI-4F também inibiu a formação do PTPM, porém somente nas menores concentrações. Em  $6,5$  e  $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína o PTPM foi inibido em  $\sim 10\%$ , sendo que a velocidade do inchamento foi reduzida em  $\sim 80\%$  para ambas as concentrações. No entanto, em  $65 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína o MI-4F inicialmente inibiu o PTPM mas, ao longo do ensaio, este efeito foi se tornando menos pronunciado até ser substituído por um inchamento de amplitude  $45\%$  inferior em relação ao ensaio controle. Nesta mesma concentração a velocidade inicial de inchamento foi igual a metade da velocidade do ensaio controle (ausência dos derivados). Diferentemente do MI-J, em presença do MI-4F na maior concentração ( $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) ocorreu o inchamento da organela com velocidade  $26\%$  inferior ao ensaio controle. Perfil semelhante foi observado para o MI-2,4diF, porém com maior intensidade. Nas menores concentrações ( $6,5$  e  $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) a inibição promovida pelo MI-2,4diF ficou em torno de  $20\%$  em relação a amplitude e  $\sim 85\%$  e  $63\%$  em relação a velocidade do inchamento. Em  $65 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína foi observado inibição do PTPM nos primeiros minutos do ensaio e depois ocorreu um inchamento de amplitude de  $\sim 30\%$  em relação ao controle. Assim como o MI-4F, na maior concentração ( $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) em presença do MI-2,4diF ocorreu o inchamento da organela ( $\sim 65\%$  em relação ao controle). A velocidade do inchamento foi reduzida em  $\sim 48\%$  e  $13\%$  nas concentrações de 65 e  $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente.

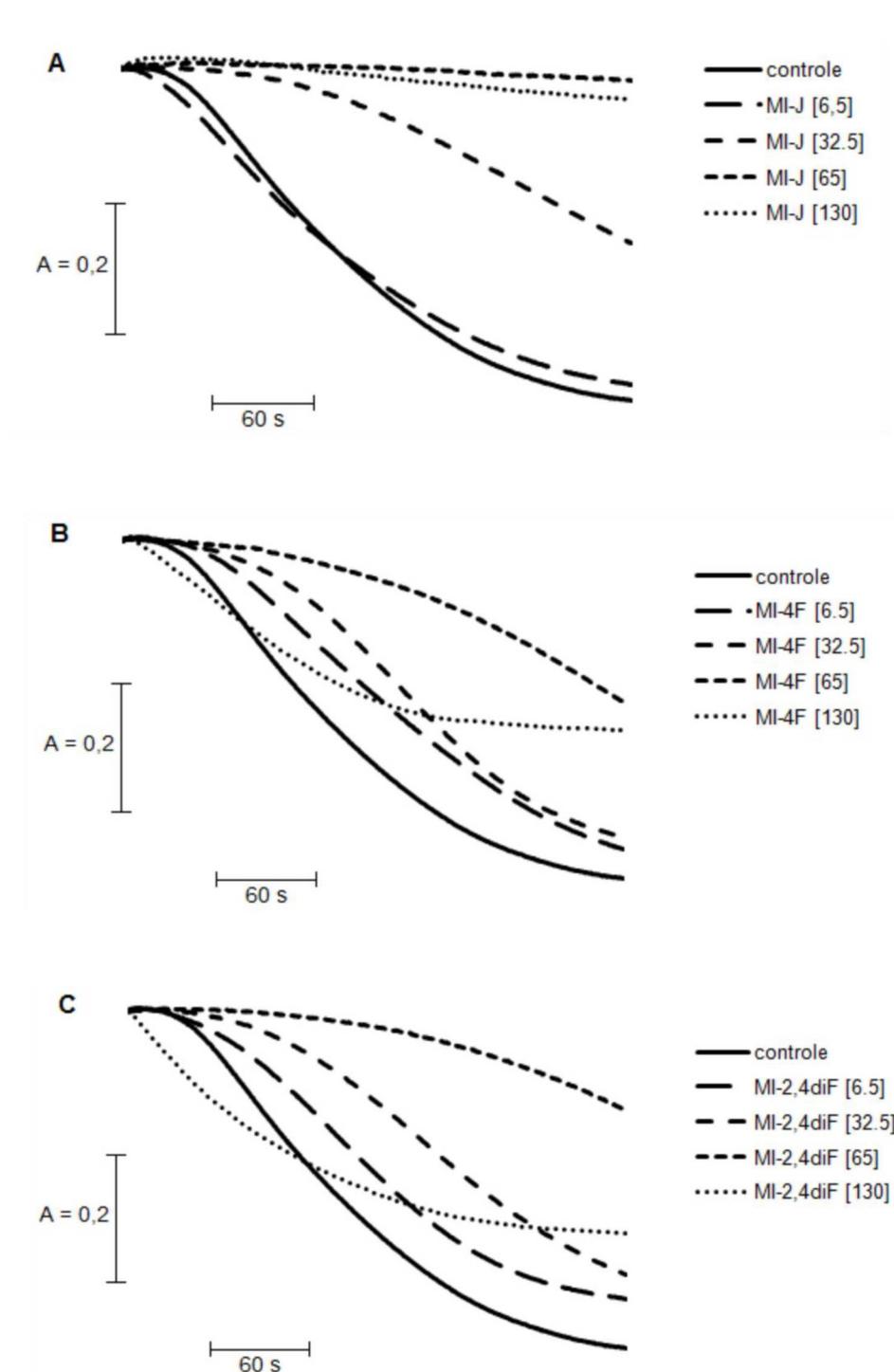


FIGURA 32 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, rotenona 5 μmol.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 mmol.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 45 μmol.L<sup>-1</sup> e proteína 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. A reação foi realizada a 28°C e iniciada com adição de 3 mmol.L<sup>-1</sup> de succinato de sódio. Os derivados (A) MI-J, (B) MI-4F e (C) MI-2,4diF foram adicionados 2 minutos antes do início da reação e foram testados nas concentrações de 6,5, 32,5, 65 e 130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína. A formação do poro de transição de permeabilidade foi monitorada pela variação da absorbância em 540 nm durante 10 minutos. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.4.3.4. Os traçados são representativos de três experimentos independentes para cada composto em triplicata.

Vários inibidores da TPM agem prevenindo ou se opondo a indução desencadeada por algum agente ou condição (ZORATTI; SZABÓ, 1995). O efeito inibitório da TPM observado neste trabalho pode ser atribuído ao efeito desacoplador demonstrado pelos derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF, desde que eles estimularam o estado 4 da respiração e a atividade da ATPase (PIRES *et al.*, 2010). Sabe-se que agentes desacopladores atuam inibindo a TPM possivelmente devido a prevenção da captura de cálcio, como consequência do colapso do potencial de membrana (ZORATTI; SZABÓ, 1995). Outro fato importante é que agentes desacopladores diminuem a formação de ERO que são consideradas mediadoras deste processo (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 1996 e 2001). Neste sentido, os derivados aqui estudados também se mostraram capazes de sequestrar ânion superóxido, porém com intensidade inferior a inibição sobre a TPM.

Por outro lado, o efeito observado sobre a TPM não foi somente o de inibição. Para os derivados fluorados, nas maiores concentrações, observou-se um inchamento significativo. Em experimentos de polarização de fluorescência (figuras 18 a 23 e PIRES, *et al.*, 2011) observou-se que estes derivados comprometem significativamente a fluidez de membrana. Os derivados MI-4F e MI-2,4diF alteraram a fluidez de membranas de DMPC, fazendo com que a região hidrofóbica e hidrofílica se tornassem mais rígidas e fluídas, respectivamente. Estes efeitos foram observados em concentrações mais baixas ( $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) que as utilizadas nos experimentos de transição de permeabilidade ( $130 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). No entanto, deve-se considerar que os modelos experimentais são diferentes, lipossomas de DMPC nos ensaios de polarização e mitocôndrias intactas nos ensaios de transição de permeabilidade. Além disso, o inchamento observado pode resultar do comprometimento da permeabilidade da membrana mitocondrial o que permitiria a entrada de solutos e água de modo inespecífico, não relacionado à formação/abertura do PTPM.

Efeitos semelhantes foram descritos para o Tamoxifeno, composto utilizado no tratamento de câncer de mama. Este promoveu a inibição da TPM induzida por fosfato e cálcio. Medidas do transporte de cálcio e do potencial de membrana mostraram que o Tamoxifeno previne a liberação de cálcio e a despolarização da membrana mitocondrial induzida por cálcio, mostrando que a inibição da TPM não se deve a inibição do uniporte deste íon. Os autores sugeriram que o Tamoxifeno mimetiza a ação da ciclosporina na inibição do PTPM e que este efeito não está

relacionado com a propriedade antioxidante do composto (CUSTODIO; MORENO; WALLACE, 1998).

O efeito do MI-D, outro derivado testado por Méndez-Sánchez (2009), foi semelhante ao observado para o MI-J. O MI-D foi testado nas concentrações de 5 a 80 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína, porém foi observado efeito significativo somente nas concentrações acima de 25 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína. O MI-D inibiu o inchamento decorrente da TPM em 25%, 35% e 42% nas concentrações de 25, 65 e 80 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente. Os autores justificaram o efeito inibitório do MI-D pela sua capacidade de colapsar o potencial de membrana de forma dose dependente, anteriormente descrito por Cadena e colaboradores (1998). Em adição, o MI-D também foi capaz de inibir a TPM induzida por peróxido de hidrogênio em aproximadamente 66% na concentração de 80 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína. Os autores sugeriram que este efeito inibitório pode resultar da somatória da capacidade sequestradora de radicais livres e do efeito do composto sobre a entrada de cálcio na mitocôndria.

A comparação entre o efeito promovido pelos derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF e o MI-D sobre a TPM pode ser feita somente na concentração de 65 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína, utilizada aqui e em trabalho anterior (MÉNDEZ-SÁNCHEZ, 2009). Nesta concentração, o MI-D inibiu a TPM com menor intensidade que os derivados aqui estudados, mostrando um perfil semelhante ao MI-J. Neste contexto, cabe mencionar que estes dois derivados são substituídos por grupos com propriedades eletrônicas semelhantes (PIRES *et al.*, 2010) o que pode justificar a similaridade de efeitos. Esta similaridade entre o MI-D e o MI-J também foi observada em relação ao efeito desacoplador (PIRES *et al.*, 2010; CADENA *et al.*, 1998). Uma vez que os derivados possuem efeito desacoplador, a inibição da PTPM poderia relacionar-se com o comprometimento do fluxo de cálcio mitocondrial. Esta possibilidade também foi avaliada e os resultados estão apresentados no próximo item.

## 6.7 TRANSPORTE DE CÁLCIO MITOCONDRIAL

O efeito dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre a TPM e sobre o estado redox dos nucleotídeos de piridina pode ser decorrente de alterações causadas pelos derivados sobre o fluxo de cálcio mitocondrial. Para esclarecer esta

hipótese foram avaliados os efeitos dos derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF sobre o transporte de cálcio mitocondrial utilizando arsenazo III (SCARPA, 1979). O arsenazo III (ácido 2,2'-(1,8 - dihidroxi-3,6 - disulfonaftaleno - 2,7 - bisazo) bisbenzenoarsonico) é um indicador metalocrômico utilizado para medir o transporte de cálcio na mitocôndria. Este composto tem alta sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e forma um complexo com o íon que pode ser quantificado pela diferença da absorbância medida em 675 e 685 nm, sem a interferência de outros cátions como o  $\text{Mg}^{2+}$  (SCARPA, 1979). O transporte de cálcio foi avaliado nas mesmas condições da TPM, exceto pela adição do indicador.

Neste experimento, em uma suspensão mitocondrial contendo rotenona, fosfato e arsenazo III foi adicionado cloreto de cálcio em concentração suficiente para induzir a TPM. A figura 33 mostra o ensaio controle, no qual, após a adição de cálcio ocorre sua complexação com o arsenazo e o consequente aumento da absorbância, que reflete a quantidade de cálcio extramitocondrial. A adição de succinato promove o transporte de elétrons através da cadeia respiratória, resultando no aumento do potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ). Uma vez que a entrada do cálcio na organela é direcionada pelo  $\Delta\Psi_m$ , o cátion se dissocia do arsenazo e sua entrada na matriz mitocondrial é visualizada pela diminuição da absorbância. Na sequência do ensaio, em resposta a adição de FCCP, um desacoplador clássico, ocorre a dissipação do potencial de membrana e a saída do cálcio da matriz (aumento da absorbância), que pode ocorrer em processo de antiporte com prótons ou através do poro de TPM (CARAFOLI, 2010).

O efeito dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre o transporte de cálcio estão mostrados na figura 33. Todos os derivados foram testados nas concentrações de 65 e 130  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína. Na figura 33A está mostrado o efeito do MI-J sobre o transporte de cálcio mitocondrial. O derivado promoveu a inibição do influxo de cálcio na mitocôndria de forma dose-dependente, como observado após a adição de succinato. Na concentração de 65  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína o MI-J inibiu o influxo de cálcio em ~10%, porém, na maior concentração (130  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de proteína), o influxo foi comprometido em torno de 40% em relação ao ensaio controle (na ausência dos derivados). O efluxo de cálcio também foi comprometido, porém somente na maior concentração, com redução de aproximadamente 50% em relação ao influxo. Este resultado está de acordo com a inibição da TPM (figura 32A) observada nestas condições. Possivelmente, a inibição

do efluxo de cálcio seja consequência da inibição da TPM, considerando que o efluxo do íon possa ocorrer por esta via (CARAFOLI, 2010).

O MI-4F promoveu um efeito semelhante, porém, mais intenso em relação ao observado para o MI-J. Já na concentração de  $65 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína a inibição do influxo foi de  $\sim 64\%$ , chegando a quase  $83\%$  na maior concentração ( $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína). O processo de efluxo foi comprometido em  $60\%$  em relação ao influxo, somente na maior concentração. Nestas mesmas condições, o MI-4F inibiu parcialmente a formação do PTPM (figura 32B), e este efeito foi de intensidade semelhante à inibição do transporte de cálcio.

O MI-2,4diF comprometeu a captura de cálcio em aproximadamente  $17\%$  e  $68\%$  nas concentrações de  $65$  e  $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente. Diferentemente do MI-J e do MI-4F, o MI-2,4diF não comprometeu o processo de efluxo de cálcio. Este resultado está de acordo com o *swelling* de grande amplitude observado nos experimentos de TPM (figura 32C), que não teve a mesma amplitude que o controle possivelmente pela inibição do influxo de cálcio.

Observa-se na figura 33 que todos os derivados inibiram o influxo de cálcio, porém com intensidades diferentes. O comprometimento do influxo do íon pode ser relacionado com a inibição da oxidação dos nucleotídeos de piridina em presença de cálcio (figura 30). Esta inibição pode ser pelo menos em parte, consequência do impedimento da entrada de cálcio na mitocôndria, prevenindo, desta forma, o estresse causado pelo acúmulo de cálcio intramitocondrial (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001; BROOKES *et al.*, 2004). Em adição, estes derivados foram caracterizados como desacopladores da fosforilação oxidativa (PIRES *et al.*, 2010) e, portanto, dissipam o potencial de membrana resultando em uma condição desfavorável à captação de cálcio pela mitocôndria, desde que a entrada do íon na organela se dá eletroforicamente.

A diferença da intensidade dos efeitos sobre o transporte de cálcio mitocondrial é muito semelhante à ordem de intensidade de efeito desacoplador dos derivados quando utilizado succinato como substrato. O MI-4F é o derivado que apresentou maior efeito desacoplador, seguido pelo MI-2,4diF e o MI-J (PIRES *et al.*, 2010), sendo esta a mesma ordem observada no ensaio de transporte de cálcio, ou seja, o composto monofluorado teve o maior efeito no transporte deste íon, quando comparado ao MI-2,4diF e MI-J.

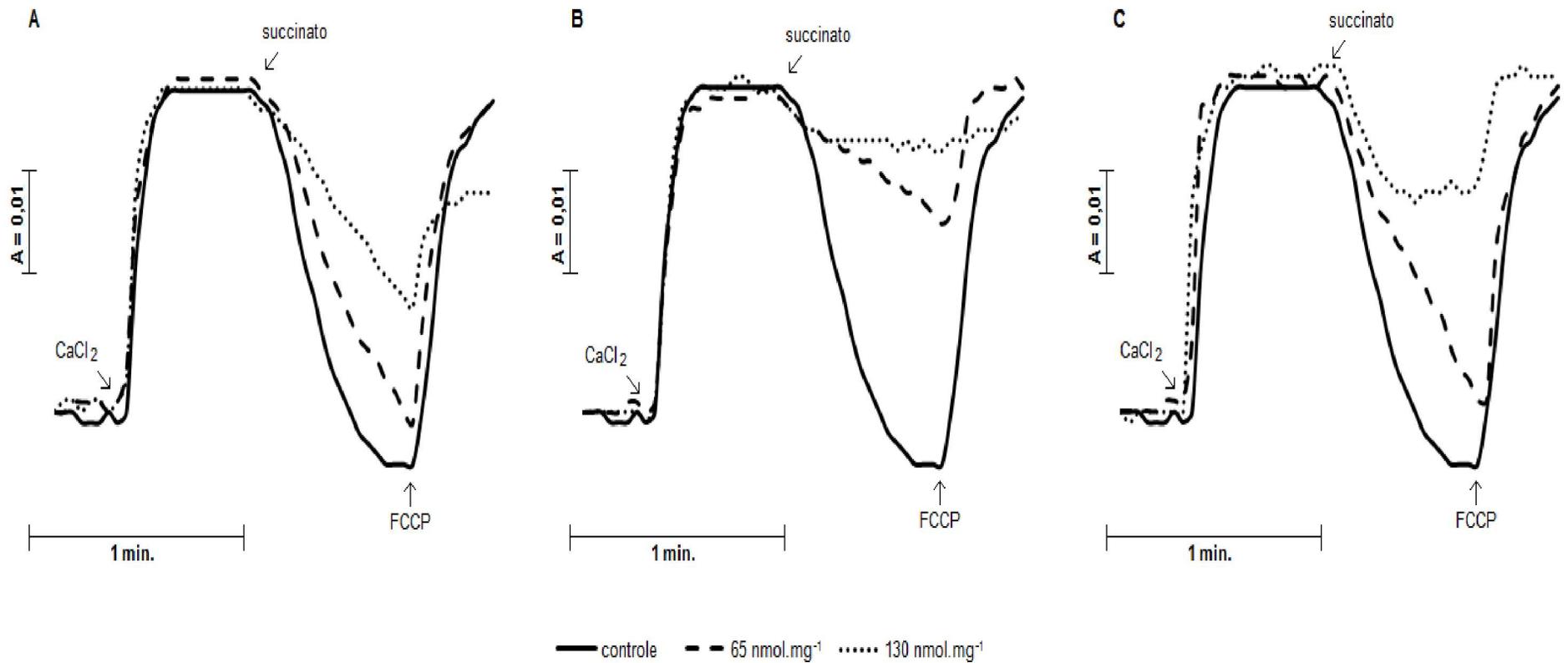


FIGURA 33 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O TRANSPORTE DE CÁLCIO MITOCONDRIAL

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: sacarose 250 mmol.L<sup>-1</sup>, BSA 0,1 g%, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, rotenona 10 µmol.L<sup>-1</sup>, arsenazo III 20 µmol.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 45 µmol.L<sup>-1</sup> e proteína 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. A captação de cálcio pela foi iniciada com adição de 3 mmol.L<sup>-1</sup> de succinato de potássio e o efluxo com FCCP 1 µmol.L<sup>-1</sup>. Os derivados (A) MI-J, (B) MI-4F e (C) MI-2,4diF foram adicionados 2 minutos antes do início da reação e foram testados nas concentrações de 65 e 130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.4.3.3. Os traçados são representativos de três experimentos independentes para cada composto em triplicata.

O efeito do MI-D sobre o transporte de cálcio também foi avaliado por Méndez-Sánchez (2009). Naquele trabalho, o influxo e o efluxo do cátion foram monitorados pela sonda fluorescente FURA 2-AM. O MI-D promoveu uma discreta diminuição na captação de cálcio em relação ao ensaio controle de forma independente da concentração (5, 25 e 80 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína). Em relação ao efluxo do cátion induzido por FCCP, a adição do MI-D não causou alterações em comparação ao controle. O efluxo de cálcio também foi avaliado com a adição de vermelho de rutênio, um inibidor do uniporte de cálcio mitocondrial (ZORATTI; SZABÓ, 1995). Nestes ensaios o MI-D também diminuiu a captação de cálcio, independentemente da concentração analisada. Entretanto, em relação ao efluxo, a incubação com o MI-D comprometeu significativamente a saída do íon da organela impedindo este processo. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que os efeitos sobre a TPM não foram exclusivamente decorrentes do impedimento da captação de cálcio pela mitocôndria, porém, ressaltam que experimentos complementares com indutores e inibidores específicos do poro de TPM são necessários para determinar o mecanismo da inibição. Os autores sugeriram, ainda, que a inibição do efluxo de cálcio seria decorrente da inibição da TPM, já que grande parte do efluxo de cálcio pode ocorrer através do PTPM.

De acordo com o exposto acima, pode-se sugerir que a inibição do efluxo de cálcio, observado para os derivados MI-J e MI-4F (figura 33 A e B), pode ser consequência da inibição da TPM (figura 32).

## 6.8 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Os metabólitos intramitocondriais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) são pró-oxidantes que potencialmente levam ao estresse oxidativo. O ânion superóxido e o óxido nítrico são radicais livres, entretanto, são pouco reativos e não participam de reações de propagação. Estas duas espécies sofrem reações que geram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ONOO<sup>-</sup>, os quais são potencialmente danosos porque podem gerar o radical hidroxila (HO<sup>•</sup>), um radical extremamente reativo. Desta forma, torna-se necessária a presença de um sistema de proteção contra estas espécies (CADENAS, 2004). As células sintetizam alguns de seus antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (Gpx), bem como peptídeos com grupos tióis como

a glutathiona, enquanto que outros antioxidantes são obtidos da alimentação como, por exemplo, as vitaminas E e C e carotenóides (JUNQUEIRA, 2004). Tais defesas antioxidantes são extremamente importantes porque elas atuam diretamente na remoção dos radicais livres, protegendo o ambiente biológico da ação deletéria destas moléculas (VALKO *et al.*, 2006).

No presente estudo foram avaliadas as atividades das enzimas superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD – EC 1.15.1.1), glutathiona redutase (Gred – EC 1.6.4.2) e glutathiona peroxidase (Gpx – EC 1.11.1.1.9) em presença dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos (VALKO *et al.*, 2006).

Em humanos existem três isoformas de SOD: a citosólica CuZn-SOD, a mitocondrial Mn-SOD e a extracelular EC-SOD. A Mn-SOD mitocondrial é um homotetrâmero (96 kDa) contendo um átomo de manganês por subunidade, sendo que este alterna-se entre os estados de oxidação  $Mn^{3+}$  e  $Mn^{2+}$  durante a dismutação do superóxido (VALKO *et al.*, 2006). Como mencionado, o radical superóxido é a primeira ERO produzida pela mitocôndria, sendo principalmente liberado na matriz mitocondrial onde a Mn-SOD atua na sua dismutação a  $H_2O_2$  (CADENAS, 2004). O peróxido de hidrogênio resultante desta reação é substrato para três outras enzimas mitocondriais: a catalase, a glutathiona peroxidase e a tioredoxina peroxidase (TPx) (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001). Além do  $H_2O_2$ , peróxidos orgânicos também são substratos para a Gpx, que catalisa a adição de dois elétrons para redução de peróxidos à água ou álcool, respectivamente. A Gpx age em conjunto com o tripeptídeo glutathiona (GSH), o qual é simultaneamente oxidado durante a redução de peróxidos formando glutathiona dissulfeto (GSSG) (VALKO *et al.*, 2006). GSH é um tiol de baixa massa molecular encontrado em altas concentrações intracelularmente devido a sua grande contribuição na defesa antioxidante. Em sua forma oxidada (GSSG), a glutathiona não apresenta atividade antioxidante e deve ser novamente reduzida para restabelecer sua atividade protetora (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). A redução da glutathiona oxidada é mediada pela glutathiona redutase dependente de NADPH. Na reação, a glutathiona oxidada é reduzida consumindo NADPH, sendo este último regenerado pela transidrogenase mitocondrial que utiliza o NADH como doador de equivalentes redutores (BRUNNER *et al.*, 2001). Desta forma, a produção de ERO aumenta a razão  $NADP^+ / NADPH$  mitocondrial.

Neste estudo, com fins comparativos, a atividade da enzima Mn-SOD foi determinada em sistema idêntico ao utilizado para quantificar a capacidade

sequestradora de radicais superóxido (item 5.4.3.5 de materiais e métodos), exceto pela presença de mitocôndrias de fígado de rato rompidas como fonte da enzima. Como o objetivo foi avaliar somente a atividade da Mn-SOD, a suspensão mitocondrial foi incubada com cianeto de potássio que inibe a atividade da CuZn-SOD que é encontrada no citosol, espaço intermembranas e núcleo.

A figura 34 mostra os resultados dos efeitos dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre a enzima Mn-SOD. Os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF foram testados nas seguintes concentrações: 6,5, 32,5, 65 e 130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína. Todos os derivados inibiram a atividade da enzima, porém com intensidades diferentes. O MI-J inibiu significativamente a atividade da enzima em concentrações acima de 32,5 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína com valores de aproximadamente 22% chegando a 85% nas maiores concentrações (65 e 130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína). A atividade desta enzima foi menos comprometida pelos derivados fluorados em comparação ao MI-J. A incubação com MI-4F promoveu uma inibição de ~20% porém somente nas maiores concentrações (65 e 130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína). O MI-2,4diF promoveu uma inibição significativa de ~32% somente na maior concentração (130 nmol.mg<sup>-1</sup> de proteína).

As enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase também foram avaliadas e suas atividades foram mensuradas indiretamente, pelo consumo de NADPH. Os resultados estão mostrados nas figuras 35 e 36, respectivamente, nas quais se observa que os derivados não promoveram alterações significativas na atividade de ambas as enzimas.

O sistema glutathione peroxidase / glutathione reductase não foi alterado, entretanto, a atividade da enzima superóxido dismutase foi inibida. Nesta circunstância ocorrerá um acúmulo de radicais superóxido devido a diminuição da velocidade de dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio, considerando que a SOD aumenta a velocidade desta reação (WINTERBOURN, 2008). Desta forma, a redução da quantidade de peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente da formação de radical hidroxila, podem reduzir também o processo de lipoperoxidação induzida por ferro. Este resultado está de acordo com a inibição da lipoperoxidação induzida por ferro (figura 24) observada em presença dos derivados. Além disso, os derivados foram capazes de sequestrar radicais superóxido (figura 28). Portanto, estes resultados sugerem que a inibição da lipoperoxidação induzida por ferro pode

ser consequência da inibição da atividade da enzima Mn-SOD e do sequestro de radicais superóxido.

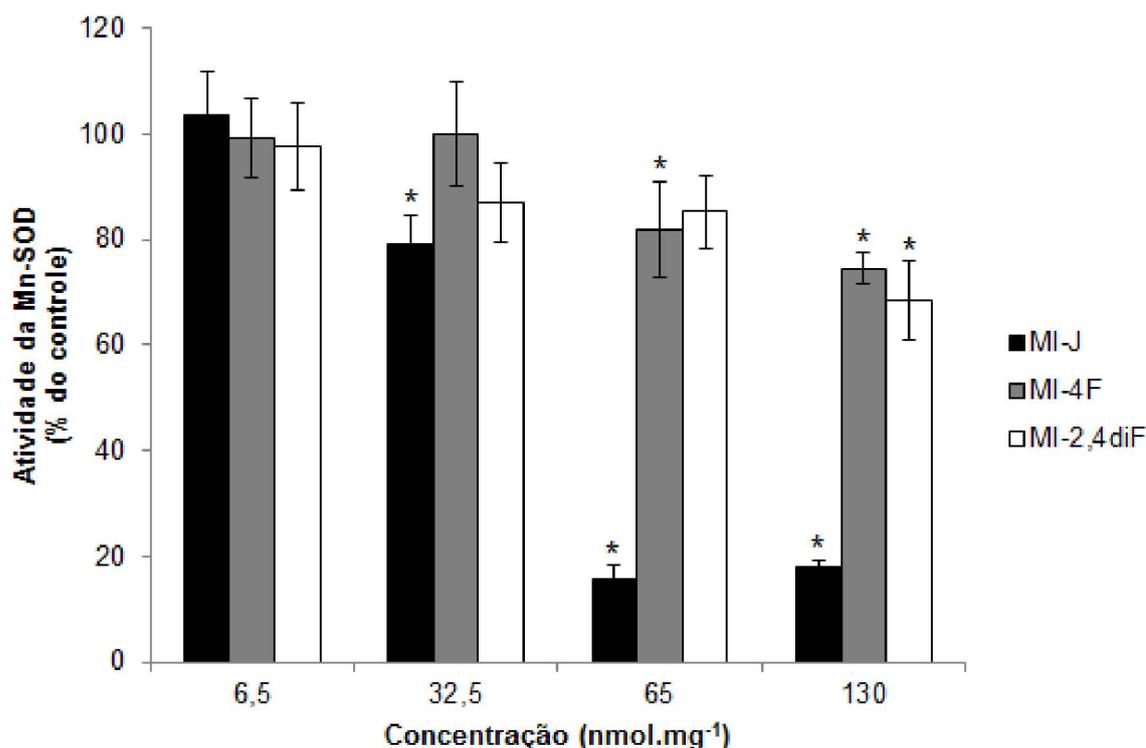


FIGURA 34 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0, NBT 72 µmol.L<sup>-1</sup>, PMS 30 µmol.L<sup>-1</sup> e KCN 6 mmol.L<sup>-1</sup>. A reação foi iniciada com adição de 340 µmol.L<sup>-1</sup> de NADH e acompanhada a 560 nm durante 2 minutos. Os efeitos dos derivados foram determinados nas concentrações de 6,5, 32,5, 65 e 130 nmol.mg<sup>-1</sup>. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.4.3.7.1. Os resultados estão expressos como porcentagem de atividade com relação ao controle (ausência dos derivados). Cada valor representa a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. \* Significativamente diferente do controle (P < 0,05). 100% corresponde a 1 unidade de SOD que equivale a inibição de 50% da taxa de redução do NBT.

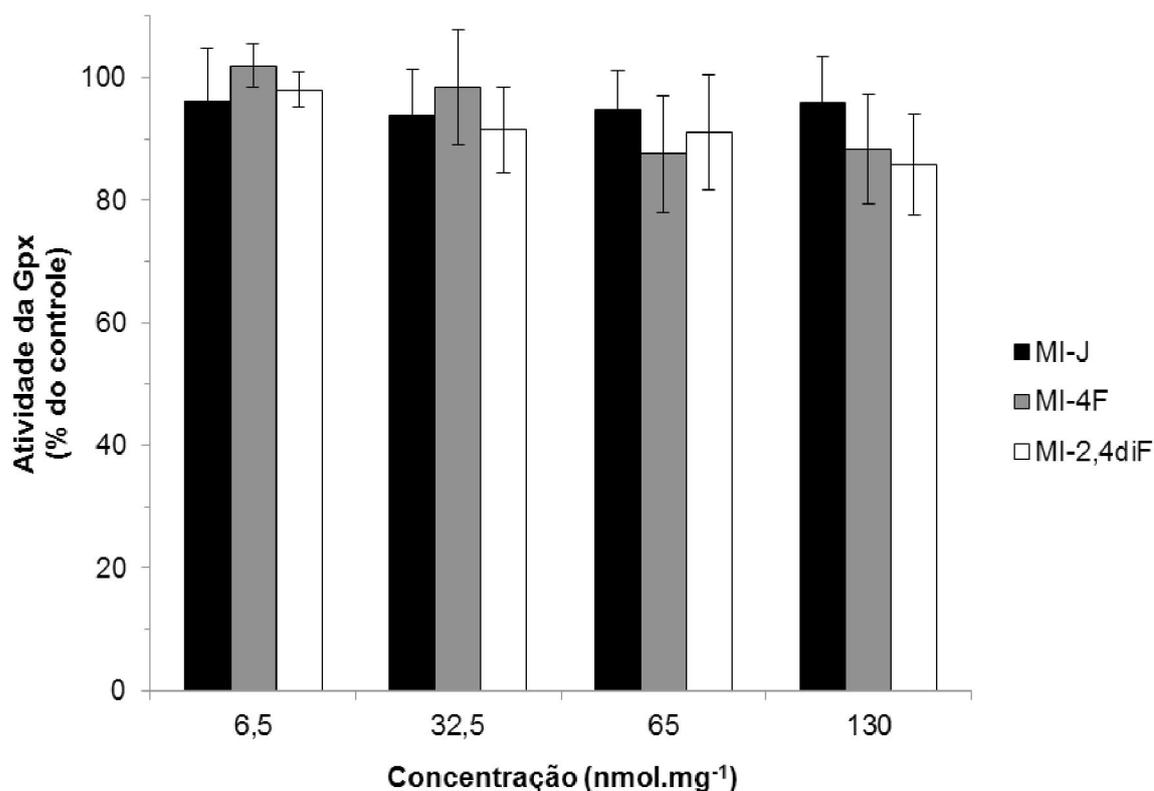


FIGURA 35 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: Tampão fosfato 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, GSH 2 mmol.L<sup>-1</sup>, Gred 0,2 U, EDTA 1mmol.L<sup>-1</sup>, NADPH 0,15 mmol.L<sup>-1</sup>, t-butilhidroperóxido 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> e proteína 0,250 mg.mL<sup>-1</sup>. A reação foi iniciada com a adição de t-butilhidroperóxido e acompanhada a 340 nm durante 1 minutos. Os efeitos dos derivados foram determinados nas concentrações de 6,5, 32,5, 65 e 130 nmol.mg<sup>-1</sup>. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.4.3.7.2. Os resultados estão expressos como porcentagem de atividade com relação ao controle (ausência dos derivados). Cada valor representa a media ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. \* Significativamente diferente do controle (P < 0,05). 100% corresponde a 0,275 nmol de NADPH consumido por micrograma de proteína por minuto de reação.

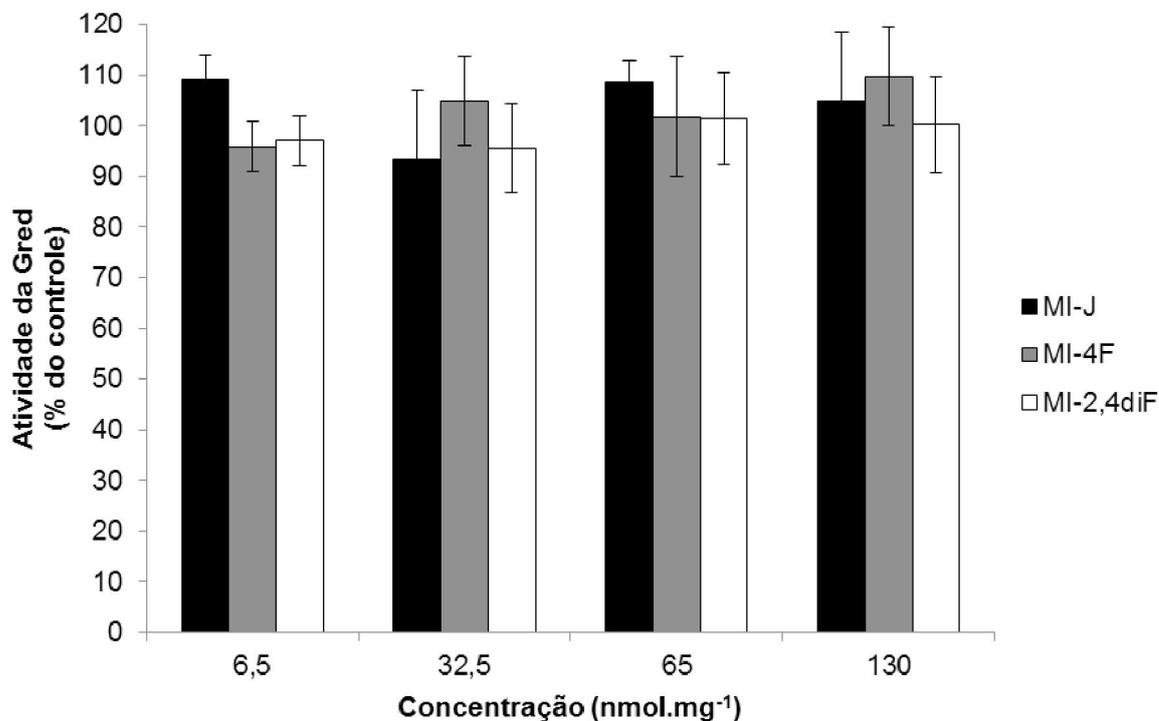


FIGURA 36 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio de reação: Tampão fosfato 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, NADPH 0,075 mmol.L<sup>-1</sup>, GSSG 0,66 mmol.L<sup>-1</sup> e proteína 0,25 0 mg.mL<sup>-1</sup>. A reação foi iniciada com a adição de GSSG e acompanhada a 340 nm durante 5 minutos. Os efeitos dos derivados foram determinados nas concentrações de 6,5, 32,5, 65 e 130 nmol.mg<sup>-1</sup>. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.4.3.7.3. Os resultados estão expressos como porcentagem de atividade com relação ao controle (ausência dos derivados). Cada valor representa a media ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. \* Significativamente diferente do controle (P < 0,05). 100% corresponde a 6,044 pmol de NADPH consumido por micrograma de proteína por minuto de reação.

O efeito do MI-D sobre a atividade das enzimas SOD, Gpx, Gred e catalase foi avaliado por Méndez-Sánchez (2009), porém, foi utilizado extrato livre de células, proveniente de cultura de células HeLa, como fonte de enzimas. Naquele trabalho, o MI-D foi testado nas concentrações de 5, 15 e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , sendo que não foram observadas alterações significativas na atividade das enzimas SOD, catalase e Gred. Somente na concentração de 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  o MI-D promoveu um aumento de ~30% na atividade de enzima Gpx. Os autores descrevem que este resultado não se refletiu nos experimentos de produção de peróxidos (aumento de ~30%) e na lipoperoxidação (não houve efeito) em células HeLa. As diferenças metodológicas foram usadas para justificar esta diferença nos resultados, já que nos ensaios enzimáticos o extrato livre de células foi incubado com o MI-D por dois minutos, enquanto nos ensaios de produção de peróxido e lipoperoxidação foram utilizadas células em cultivo que permanecem em contato com o composto por 1 hora. Ainda em relação ao aumento da atividade da Gpx, os autores sugerem que este pode ser um dos mecanismos envolvidos na inibição da lipoperoxidação pelo MI-D em mitocôndrias isoladas (MÉNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2009), no entanto, a atividade desta enzima não foi determinada naquele estudo em preparações mitocondriais.

A atividade da enzima SOD foi inibida pelo MI-J, MI-4F e MI-2,4diF, sendo que no estudo de Méndez-Sánchez (2009) o MI-D não mostrou o mesmo efeito. As diferentes fontes da enzima podem justificar estes resultados, uma vez que para avaliação do efeito do MI-D foi utilizado extrato celular contendo as várias isoformas da SOD. O aumento da atividade da Gpx, observada em ensaios com o MI-D, também não foi observado para os derivados aqui testados. O mesmo foi observado para a enzima Gred, cuja atividade não foi modificada em presença dos derivados.

## 6.9 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE CÉLULAS HEPG2

### 6.9.1 Viabilidade celular

Estudos anteriores (PIRES *et al.*, 2010 e 2011) mostraram que os derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos aqui estudados comprometem as funções mitocondriais ligadas à provisão de energia, o que sugere que as funções celulares também

seriam afetadas em presença destes compostos. Neste contexto, é possível sugerir que em células intactas os efeitos promovidos sobre a bioenergética mitocondrial poderiam levar ao desencadeamento de mecanismos de morte, como necrose e/ou apoptose, o que, por sua vez, justificaria a atividade antitumoral destes compostos, descrita anteriormente por Grynberg, Santos e Echevarria (1997). Desta forma, com objetivo de avaliar o efeito dos derivados MI-J, MI-4F, MI-2,4diF e MI-D em células intactas, foram realizados experimentos utilizando células de hepatocarcinoma cultivadas (células HepG2).

O hepatocarcinoma celular (HCC) é a quinta neoplasia mais comum, a principal causa de mortes em pacientes com cirrose e a terceira mais comum causa de morte relacionada ao câncer no mundo (LODATO *et al.*, 2006). No sentido de diminuir estes números, muitos estudos estão sendo desenvolvidos (BALASUBRAMANIYAN *et al.*, 2007; CHEUNG *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2006).

Para avaliar o potencial antitumoral de um composto específico, muitos estudos têm utilizado animais como modelos experimentais. Entretanto, devido às diferenças entre as espécies, torna-se necessária a sua reavaliação em seres humanos. Neste sentido, modelos de células humanas têm sido desenvolvidos (WILKENING *et al.*, 2003). Hepatócitos humanos são um modelo experimental muito atrativo para estudos das funções metabólicas do fígado. Entretanto, o seu uso é limitado pela dificuldade de obtenção de material biológico (ex.: material para biópsia), para o seu isolamento e de manter a cultura destas células por muito tempo (CASTELL; GÓMEZ-LECHÓN, 1997). Neste sentido, as células de hepatoma humano HepG2 são consideradas um excelente modelo para investigar a toxicidade de compostos sobre as funções celulares e mitocondriais. Este modelo experimental apresenta várias vantagens como: a alta quantidade de organelas mitocondriais e, conseqüentemente, DNA mitocondrial; as células crescem em monocamadas aderentes ao plástico e podem ser facilmente visualizadas por microscópio confocal (PINTI *et al.*, 2003). Estas células também são frequentemente usadas como modelo em estudos de biotransformação *in vitro* (SASSA *et al.*, 1987). Porém, em células HepG2 os níveis de expressão dos genes que codificam para o citocromo P450, assim como, para uma série de importantes enzimas da fase II são significativamente diferentes do observado para hepatócitos primários. A atividade e a expressão, especialmente das enzimas da fase I, são baixas em células HepG2. Em contrapartida, a regulação de genes específicos das enzimas de metabolização de

drogas é similar tanto em hepatócitos quanto em HepG2. Desta forma, as células HepG2 podem ser usadas como modelo para estudos de regulação das enzimas de metabolização de drogas (WILKENING *et al.*, 2003).

Embora semelhantes aos hepatócitos, as células HepG2 apresentam-se diferentes quanto a morfologia celular. Os hepatócitos primários humanos exibem um formato típico de células cúbicas e frequentemente contém dois núcleos. As células HepG2 apresentam morfologia semelhante a células epiteliais e contém um núcleo com um número de cromossomos por célula que varia entre 48 e 54 (NATARAJAN; DARROUDI, 1991). Devido a todos os aspectos descritos, as células HepG2 foram escolhidas como modelo experimental neste estudo.

Ensaio preliminares foram realizados para determinar a concentração ideal de células e dos derivados, utilizando o método do MTT. Este método é colorimétrico e quantifica as células viáveis em uma preparação celular. No ensaio, os sais de *tetrazolium* (MTT) são reduzidos a *formazan* através de reações enzimáticas catalisadas por desidrogenases mitocondriais, ativas somente em células viáveis. A partir destes ensaios padronizou-se a concentração de células de  $1 \times 10^4$  células por poço em placas de 96 poços.

No sentido de determinar as concentrações dos derivados mesoiônicos que seriam utilizadas nos experimentos, a viabilidade de células HepG2 foi avaliada frente a diversas concentrações destes compostos. É importante destacar que as concentrações utilizadas em experimentos anteriores em preparações mitocondriais foram também consideradas para estabelecer a concentração dos compostos nos ensaios com células cultivadas.

A partir destes experimentos foram definidas as concentrações de 5, 25 e  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  dos derivados que foram incubados por 1, 3, 6 e 24 horas com as células. Os resultados destes experimentos estão apresentados nas figuras 37 a 40 e tabela 1.

A figura 37 mostra o resultado da viabilidade das células HepG2 após incubação com o MI-J. O derivado promoveu a diminuição da viabilidade a partir de 1 hora de incubação. Neste tempo, na concentração de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  o derivado reduziu a viabilidade celular em ~7%, sendo que com o dobro desta concentração ( $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) a diminuição chegou a ~24% em relação ao ensaio controle (na ausência dos derivados). Em 3 horas de incubação, o MI-J reduziu em ~15% e ~29% a viabilidade, nas concentrações de 25 e  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente, e esta

redução manteve-se próxima a 30%, para ambas as concentrações, quando o tempo de incubação foi de 6 horas. Na menor concentração, o MI-J somente reduziu a viabilidade celular (~14%) quando o tempo de incubação foi de 24 horas. Neste mesmo tempo de tratamento e nas maiores concentrações (25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) a redução da viabilidade foi de ~50%.

O composto monofluorado (figura 38) reduziu em ~ 8% a viabilidade celular após 3 horas de incubação nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Dobrando-se o tempo de incubação, para estas mesmas concentrações, o MI-4F reduziu em ~15% e ~26% a viabilidade, respectivamente. Já no maior tempo de tratamento (24 horas) foi observada redução de ~23% na viabilidade na menor concentração (5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Assim como para o MI-J, o MI-4F reduziu em torno de 50% a viabilidade nas maiores concentrações (25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

O MI-2,4diF (figura 39) mostrou valores de redução da viabilidade muito similares aos determinados para o MI-4F, após 24 horas de incubação para as três concentrações testadas (20%, 49% e 50% em ordem crescente). Esta similaridade também foi observada pela ausência de efeito em todas as concentrações testadas em 1 hora de incubação. A viabilidade foi estatisticamente reduzida em aproximadamente 7% após a terceira hora e 17% e 27% após seis horas de tratamento com o MI-2,4diF nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente.

De todos os derivados testados, o MI-D foi o composto que menos influenciou na viabilidade das células HepG2 (figura 40). Na concentração de 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  o MI-D não promoveu alterações na viabilidade celular em nenhum dos tempos analisados. O composto reduziu em ~ 8% a viabilidade somente na maior concentração (50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e após 6 horas de incubação. No entanto, após 24 horas, o MI-D reduziu a viabilidade em aproximadamente 28% e 49% nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente.

A partir destes resultados, podemos sugerir que o efeito dos derivados sobre a viabilidade de células HepG2 varia de intensidade nas menores concentrações, mas são igualmente citotóxicos na concentração de 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e tempo de tratamento de 24 horas, promovendo a morte de ~50% das células (tabela 1).

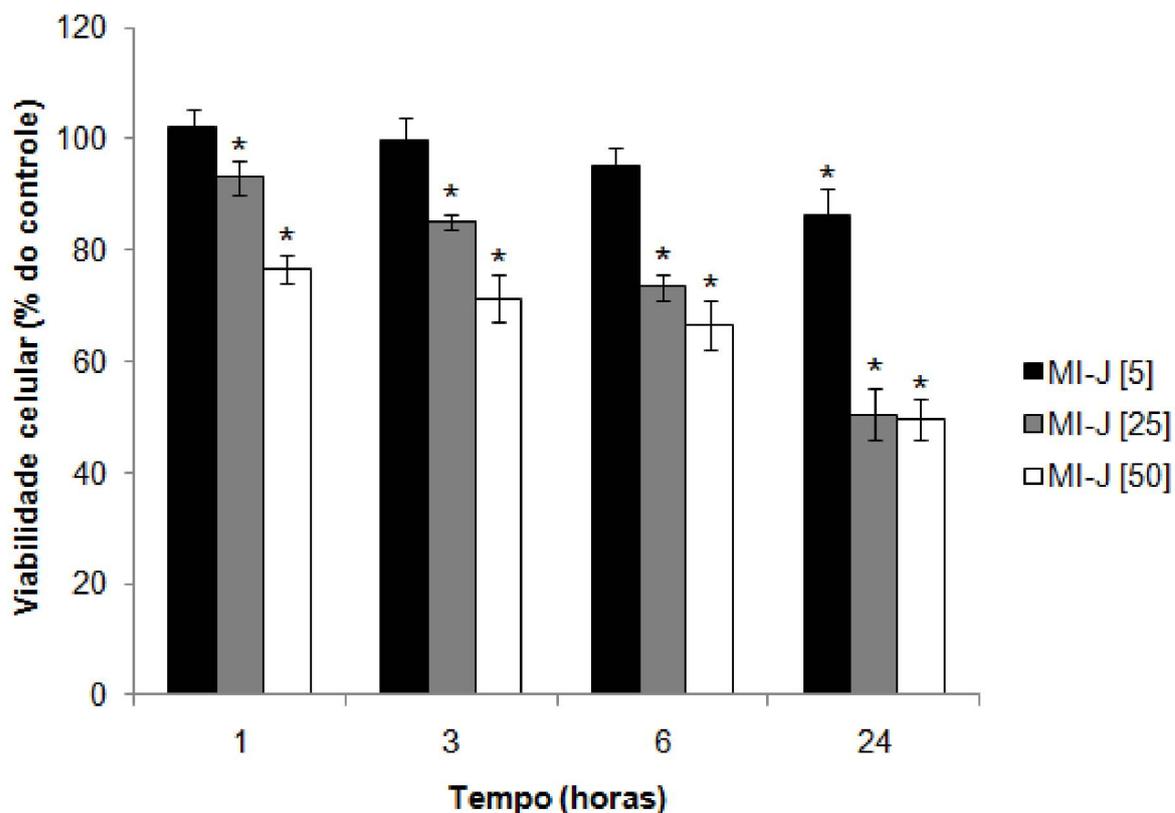


FIGURA 37 EFEITO DO MI-J SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2.  
 FONTE: O autor (2011).

NOTA: Células HepG2 foram distribuídas a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços e deixadas para aderir por 24 horas. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 1, 3, 6 e 24 horas com MI-J nas concentrações de 5, 25 e  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (como indicado entre colchetes). Após o tratamento foi avaliada a viabilidade pelo método do MTT. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.1. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes em quadruplicata. \* Significativamente diferente do controle ( $P < 0,05$ ). Os controles correspondem a  $100\% \pm 8,64$  para 1 hora,  $100\% \pm 4,35$  para 3 horas,  $100\% \pm 1,07$  para 6 horas e  $100\% \pm 2,44$  para 24 horas.

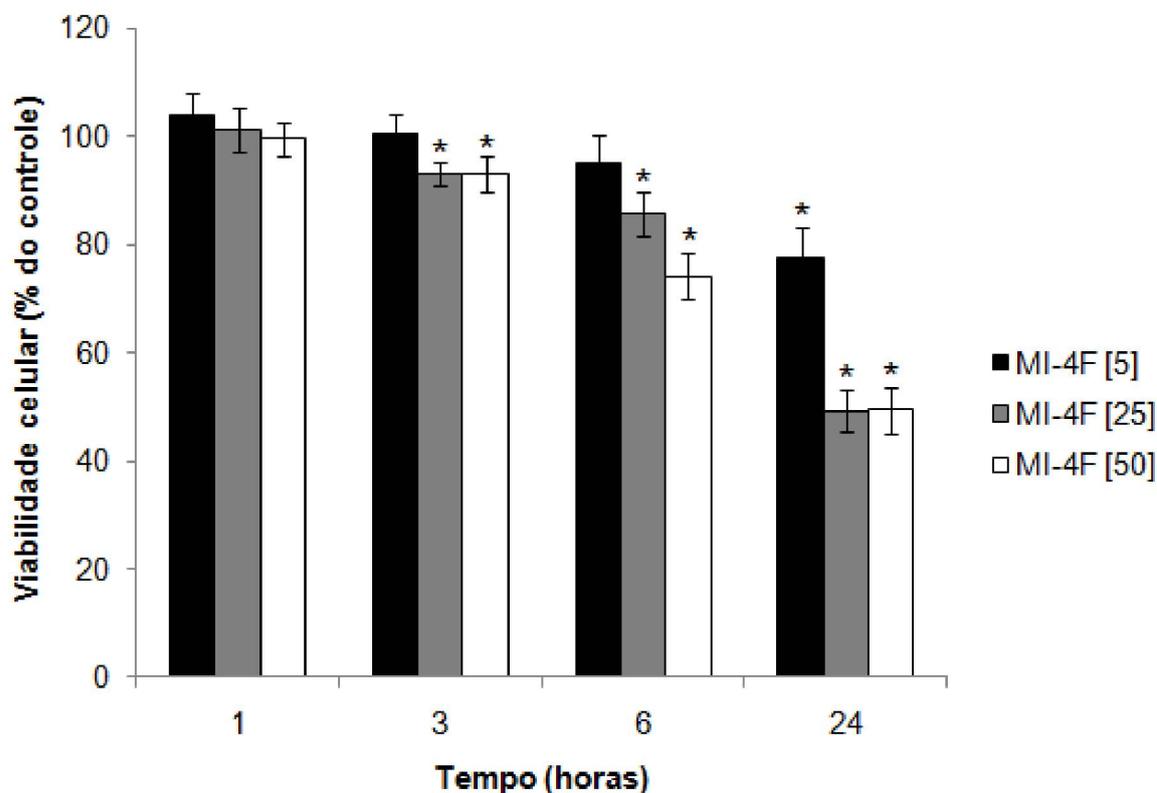


FIGURA 38 EFEITO DO MI-4F SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Células HepG2 foram distribuídas a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços e deixadas para aderir por 24 horas. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS e, incubadas durante 1, 3, 6 e 24 horas com MI-4F nas concentrações de 5, 25 e  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (como indicado entre colchetes). Após o tratamento foi avaliada a viabilidade pelo método do MTT. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.1. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes em quadruplicata. \* Significativamente diferente do controle ( $P < 0,05$ ). Os controles correspondem a  $100\% \pm 8,64$  para 1 hora,  $100\% \pm 4,35$  para 3 horas,  $100\% \pm 1,07$  para 6 horas e  $100\% \pm 2,44$  para 24 horas.

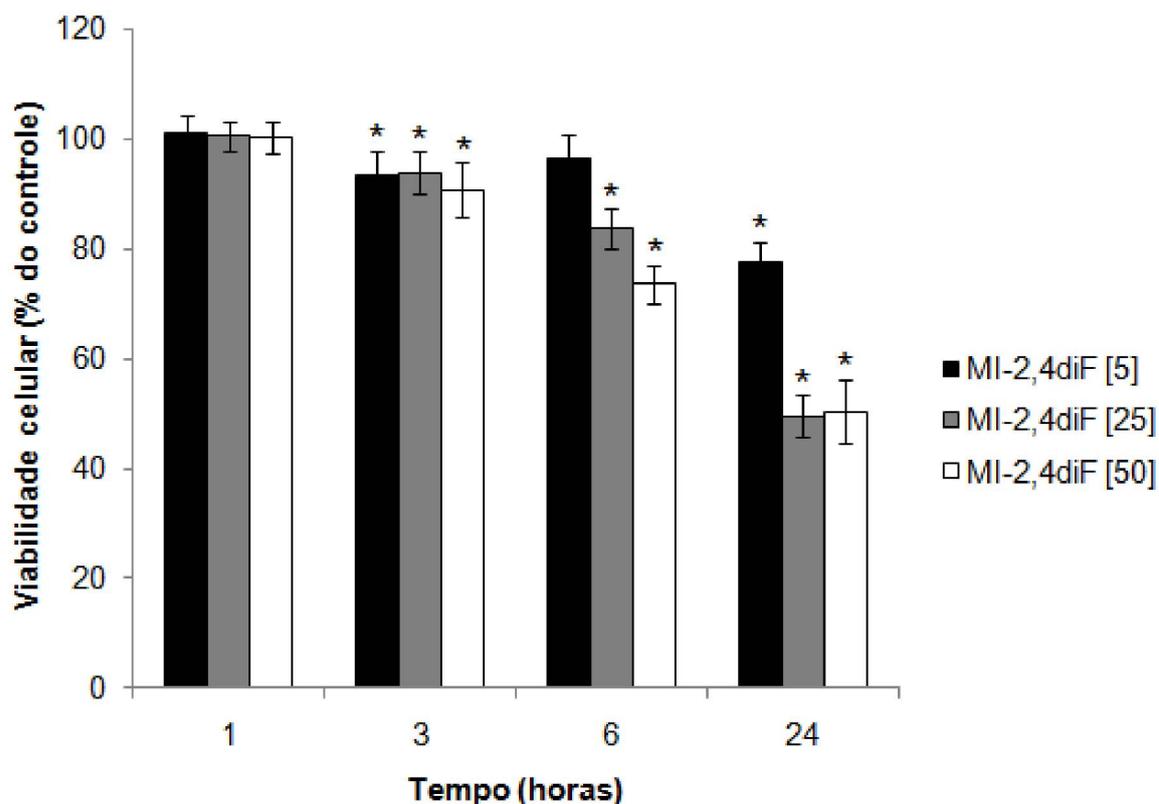


FIGURA 39 EFEITO DO MI-2,4diF SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Células HepG2 foram distribuídas a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços e deixadas para aderir por 24 horas. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS e, incubadas durante 1, 3, 6 e 24 horas com MI-2,4diF nas concentrações de 5, 25 e  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (como indicado entre colchetes). Após o tratamento foi avaliada a viabilidade pelo método do MTT. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.1. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes em quadruplicata. \* Significativamente diferente do controle ( $P < 0,05$ ). Os controles correspondem a  $100\% \pm 8,64$  para 1 hora,  $100\% \pm 4,35$  para 3 horas,  $100\% \pm 1,07$  para 6 horas e  $100\% \pm 2,44$  para 24 horas.

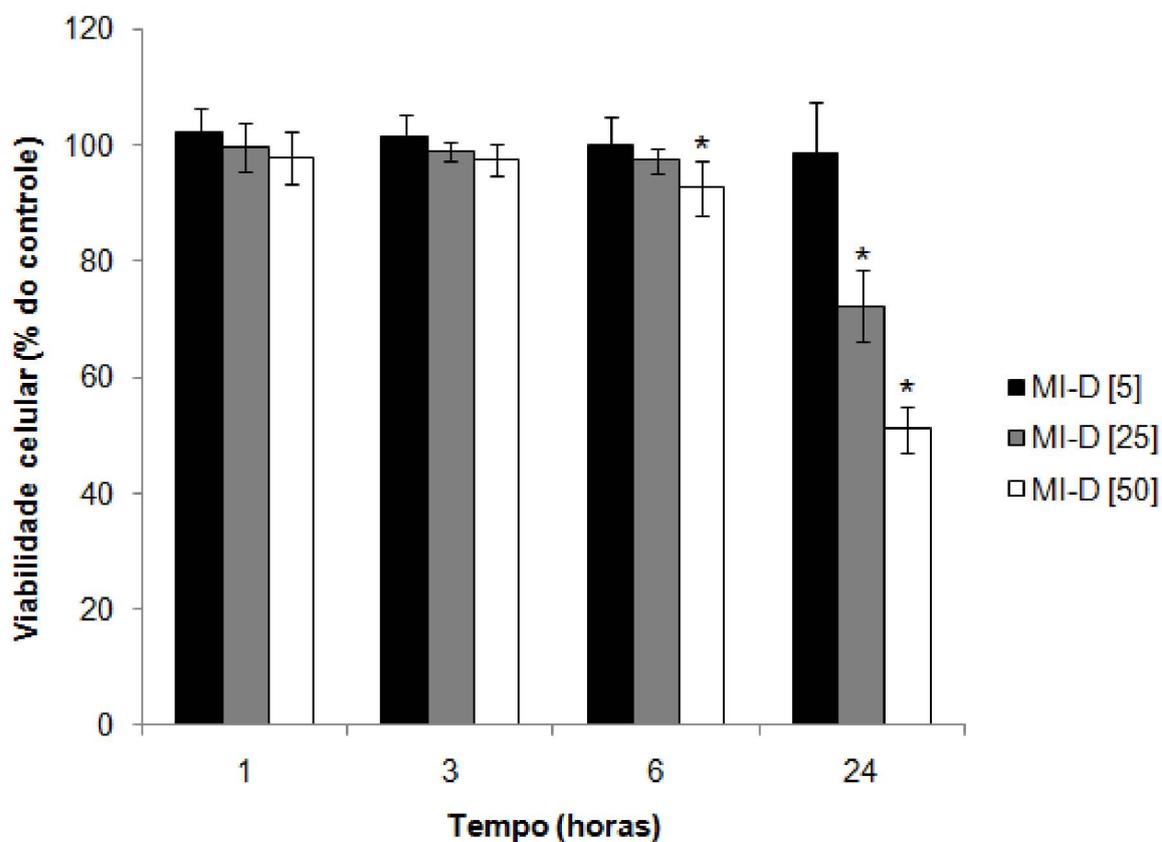


FIGURA 40 EFEITO DO MI-D SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Células HepG2 foram distribuídas a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços e deixadas para aderir por 24 horas. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS e, incubadas durante 1, 3, 6 e 24 horas com MI-D nas concentrações de 5, 25 e  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (como indicado entre colchetes). Após o tratamento foi avaliada a viabilidade pelo método do MTT. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.1. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes em quadruplicata. \* Significativamente diferente do controle ( $P < 0,05$ ). Os controles correspondem a  $100\% \pm 8,64$  para 1 hora,  $100\% \pm 4,35$  para 3 horas,  $100\% \pm 1,07$  para 6 horas e  $100\% \pm 2,44$  para 24 horas.

Concentração ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	Viabilidade (% em relação ao controle)			
	MI-J	MI-4F	MI-2,4diF	MI-D
5	86,33 $\pm$ 4,63*	77,55 $\pm$ 5,54*	77,62 $\pm$ 3,66*	98,42 $\pm$ 8,78
25	50,53 $\pm$ 4,53*	49,28 $\pm$ 3,82*	49,49 $\pm$ 3,84*	72,26 $\pm$ 6,16*
50	49,63 $\pm$ 3,74*	49,40 $\pm$ 4,32*	50,39 $\pm$ 5,82*	51,06 $\pm$ 4,02*

TABELA 1: EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2.

NOTA: Viabilidade celular após 24 horas de tratamento com os derivados. As condições experimentais estão descritas no item 5.6.6.1 da seção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em % em relação ao controle ( $100\% \pm 2,44$ ), como média  $\pm$  desvio padrão. \* Significativamente diferente do controle ( $P < 0,05$ ).

Ensaio de viabilidade celular com outras linhagens de células tumorais foram anteriormente realizadas com o MI-D. Em células de carcinoma de cervix uterino humano (células HeLa), observou-se aproximadamente 27% de redução da viabilidade após uma hora de incubação com o composto na concentração de 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (CADENA, 1999; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, 2009). Efeito semelhante foi observado por Senff-Ribeiro e colaboradores (2003) e Méndez-Sánchez (2009) que avaliaram a viabilidade de células de melanoma murino, B16-F10, frente ao MI-D. Naqueles trabalhos, o MI-D reduziu em aproximadamente 20% a viabilidade destas células (25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) após uma hora de incubação. Para esta mesma linhagem, o MI-D na concentração de 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  reduziu a viabilidade em 50% após 3 horas de incubação, sendo que nenhuma célula viável restou após 24 horas de incubação nesta mesma concentração (SEFFF-RIBEIRO *et al.*, 2003). O composto mesoiônico MI-D também foi testado em quatro diferentes linhagens de células de melanoma humano: MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO. A viabilidade das células MEL-85 foi comprometida em 56% a 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  durante 24 horas e, neste mesmo tempo, a viabilidade foi reduzida em aproximadamente 80% na maior concentração (50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). O MID exerceu citotoxicidade máxima nesta mesma concentração, quando o tempo de incubação aumentou para 48 horas. Para a SK-MEL, a incubação com o MI-D a 25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , reduziu o número de células viáveis para ~30% e 17% após 24 horas de tratamento, enquanto que, nestas mesmas condições, somente 12% e 7% das células A2058 estavam viáveis. A linhagem MEWO foi mais sensível aos efeitos tóxicos do MI-D, observando-se uma redução do número de células viáveis para aproximadamente 8% utilizando-se 25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , por 24 horas, sendo que

após 48 horas de tratamento 100% das células estavam mortas com a dose de 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004b).

O MI-D mostrou-se muito mais citotóxico em células de melanoma murino e humano do que em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), sugerindo uma citotoxicidade seletiva. Para este mesoiônico foi demonstrada ainda atividade antitumoral contra melanoma murino, proveniente da inoculação das células B16-F10, Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich, sendo que seu efeito em melanoma foi mais significativo comparado a de outros derivados da mesma classe (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003, GRYNBERG; SANTOS; ECHEVARRIA, 1997).

Os compostos MI-J, MI-4F e MI-2,4diF também foram avaliados contra células B16-F10 (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004a). Estes derivados foram testados nas concentrações de 2,5 a 75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e incubados por 1, 3, 24, 48 e 72 horas. O MI-J não afetou a viabilidade em nenhuma concentração mesmo após 72 horas de tratamento. O MI-2,4diF reduziu a viabilidade em 16% e 47% após incubação com 25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente, durante 24 horas. Nestas mesmas condições, o MI-4F reduziu a viabilidade em aproximadamente 26% e 78%, mostrando-se mais citotóxico para esta linhagem. Em comparação aos resultados obtidos no presente estudo, o MI-J mostrou-se mais citotóxico para HepG2, enquanto que o MI-4F foi mais efetivo em melanoma. Já o MI-2,4diF mostrou-se similarmente citotóxico para ambas as linhagens.

#### 6.9.2. Morfologia celular

A determinação da viabilidade celular pelo método do MTT é uma metodologia amplamente utilizada em estudos iniciais de citotoxicidade, porém, se restringe apenas a determinar a quantidade de células viáveis frente a um determinado tratamento. Desta forma, dando sequência ao estudo dos efeitos dos derivados 1,3,4-tiadiazóis sobre células HepG2 em cultura, foi realizada a análise por microscopia óptica destas células, utilizando os corantes hematoxilina e eosina.

A hematoxilina é um corante natural extraído do cerne da árvore *Haematoxylon campechianum*, porém, seu princípio ativo é derivado de sua oxidação, a hemateína. Em condições ácidas, a hemateína se liga à resíduos de lisina das histonas nucleares, colorindo o núcleo das células em azul escuro. Em

conjunto com este corante é utilizado a eosina, um derivado ácido do xanteno ou ftaleína, que cora o citoplasma e serve como fundo e contraste. O emprego desta técnica permite a diferenciação entre o núcleo, com coloração azul, e citoplasma em rosa pálido (RAPHAEL, 1986).

Como mencionado anteriormente, a apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção e controle da homeostase dos tecidos (HAIL JR, 2005). Durante este processo a célula sofre alterações morfológicas características, tais como a retração celular, perda de aderência à matriz extracelular e a células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011). Porém, quando ocorre disfunção celular aguda, em resposta a condições adversas como estresse ou exposição a agentes tóxicos, a célula pode sofrer necrose (SAMALI *et al.*, 1999). O aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e ruptura celular são algumas das características da morte celular por necrose (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Algumas destas alterações podem ser visualizadas ao microscópio com a utilização de corantes como a hematoxilina e a eosina. Os resultados obtidos pela coloração de células na ausência (controle) e na presença dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos estão mostradas nas figuras 41 a 45. As imagens foram obtidas por microscopia óptica utilizando ampliação de 40x e 100x e registradas com câmera digital com ampliação de 1,5x. Em todas as imagens as barras mostram em escala microscópica o tamanho real. Testes preliminares mostraram reduzido número de células após tratamento com as concentrações mais altas (25 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Portanto, nestes ensaios, as células foram tratadas com 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  dos derivados por 3 horas. Decorrido este tempo, as células foram coradas com hematoxilina e eosina, como descrito no item 5.6.6.2 de materiais e métodos. A figura 41 A e B mostra o ensaio controle com amplificação de 40x e 100X, respectivamente. Nesta figura, as células se apresentam como monocamada com morfologia semelhante a células epiteliais contendo um único núcleo. Nestas imagens observa-se que as células encontram-se justapostas, constituindo uma monocamada contínua, com citoplasma homogêneo, núcleo grande bem delimitado e com vários nucléolos. As células tratadas com o solvente das drogas, o DMSO

(figura 41 C e D), com o mesmo volume utilizado nos ensaios com os derivados (0,01% v/v) não apresentaram alterações morfológicas.

A figura 42 mostra células HepG2 tratadas com o MI-J. Mesmo em baixa concentração, significativas alterações na morfologia das células são visualizadas. A figura 42 C – F mostra a perda da organização celular em monocamada, vacuolização intensa, prolongamentos globosos do citoplasma sugerindo a formação de *blebs*, retraimento do citoplasma em comparação ao controle (42 A e B). Estas modificações são sugestivas de sofrimento celular. Nos ensaios de viabilidade celular, nesta mesma condição, o MI-J não promoveu a morte das células. Estes dados indicam que o MI-J está causando sofrimento celular, evidenciado pelas alterações morfológicas, sem causar a sua morte, até a interrupção do tratamento.

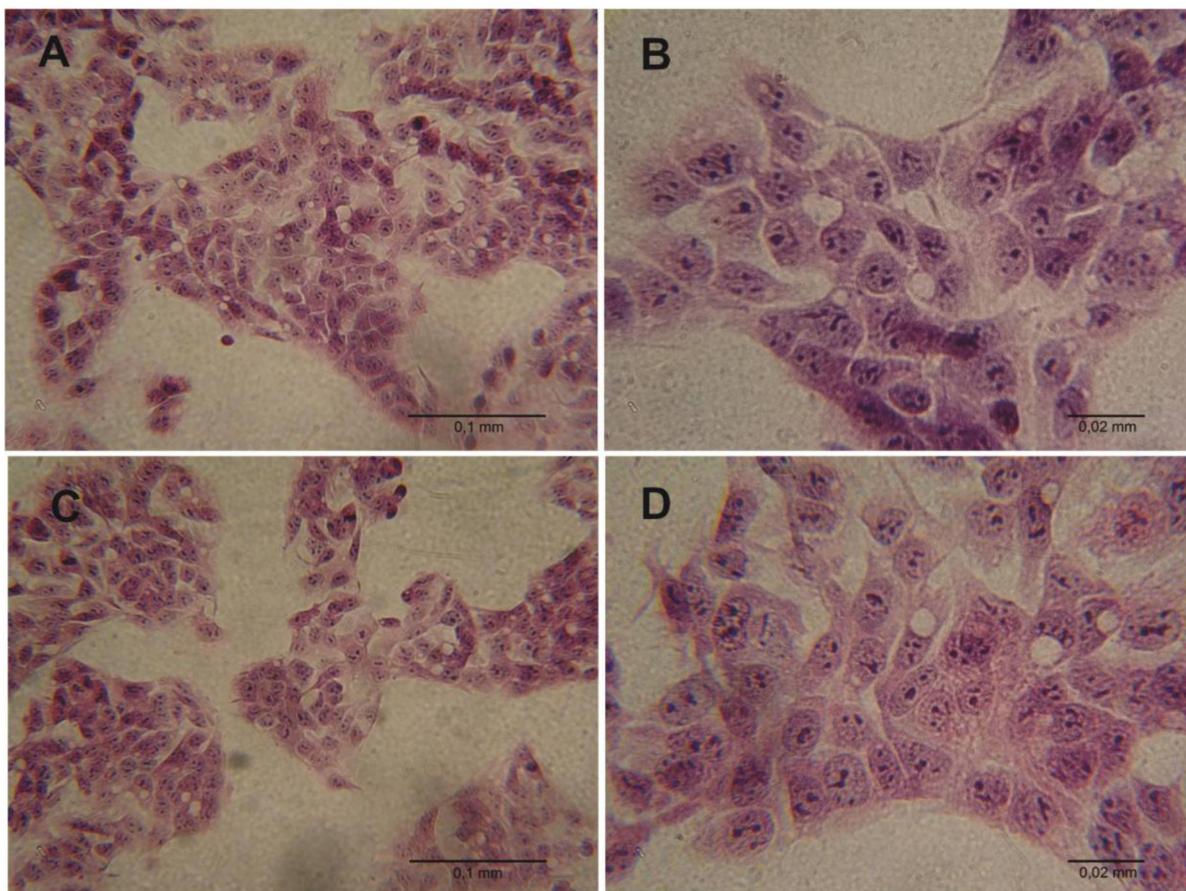


FIGURA 41 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Imagens da monocamada observada por microscopia óptica após coloração com hematoxilina e eosina nas seguintes condições: (A e B) controle, (C e D) DMSO. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.2. Em todas as fotografias a escala mostra magnificação real.

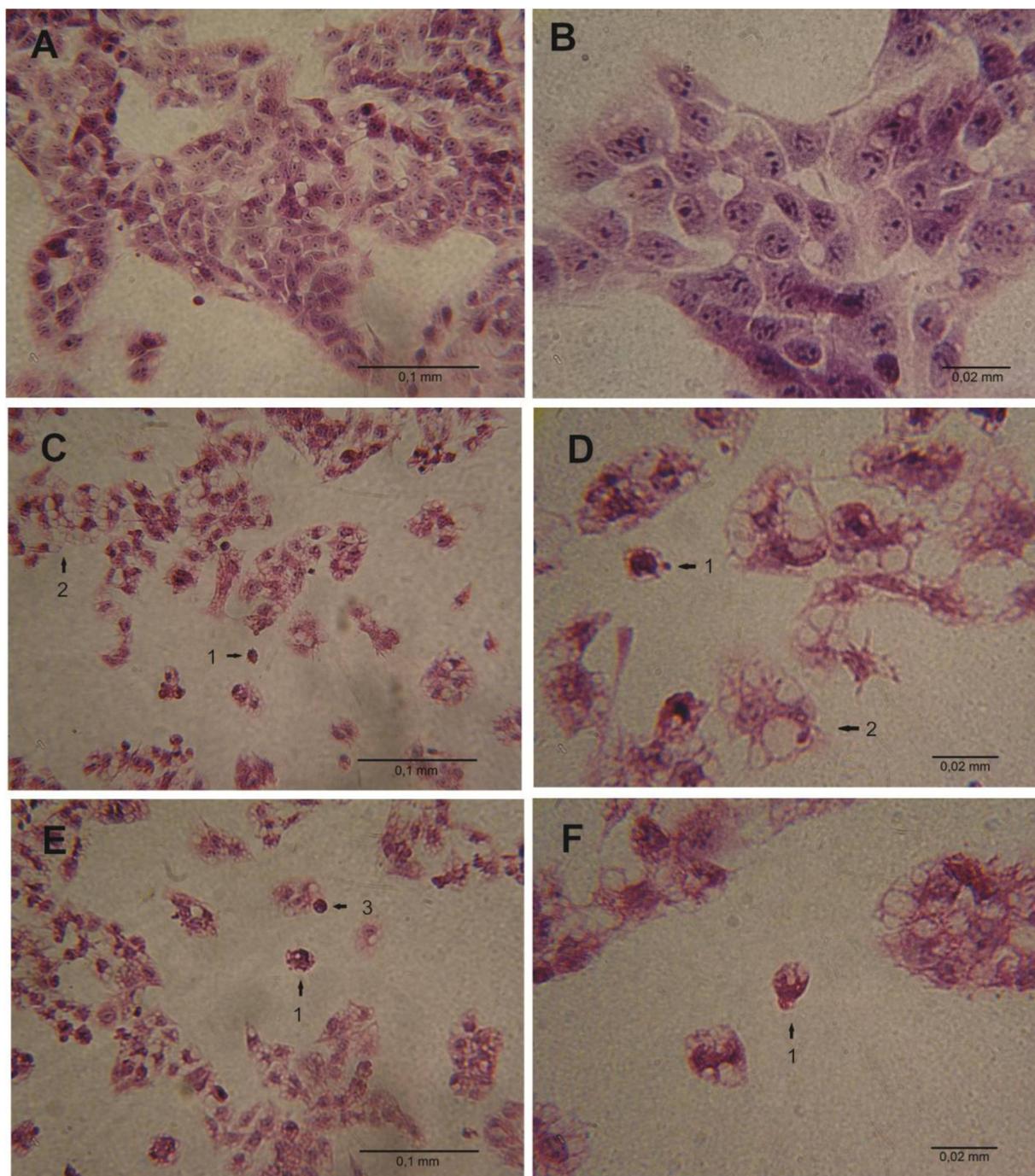


FIGURA 42 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 APÓS TRATAMENTO COM MI-J  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Imagens da monocamada observada por microscopia óptica após coloração com hematoxilina e eosina nas seguintes condições: (A e B) controle, (C a F) MI-J  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 3. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.2. As setas indicam alterações morfológicas: (1) célula com projeções indicando a formação de *blebs*, (2) células apresentando vacúolos, (3) retraimento celular. Em todas as fotografias a escala mostra magnificação real.

A figura 43 mostra que o tratamento das células HepG2 com o MI-4F reduz a quantidade de células aderidas. As imagens sugerem alterações significativas na monocamada como a formação de vacúolos, corpos apoptóticos, *blebs* e alta desorganização celular. Após o tratamento com o MI-4F, em algumas células, não é mais possível distinguir núcleo e citoplasma. Todas essas modificações sugerem que o MI-4F promove significativas alterações na estrutura da célula indicando intenso sofrimento. Interessantemente a concentração que promove todas estas alterações (figura 43 C-D) não reduz a viabilidade, sugerindo que mesmo com intenso sofrimento as células permanecem vivas.

O MI-2,4diF (figura 44) mostrou um efeito um pouco diferente do observado para o MI-J e MI-4F. Ocorre uma predominância de células arredondadas com citoplasma significativamente reduzido, sugerindo que o MI-2,4diF interfira na adesão celular. Nestas micrografias também é possível ver estruturas que sugerem a formação *blebs* e corpos apoptóticos. Os mesmos efeitos foram observados para o MI-D (figura 45), mostrando que este composto modifica a estrutura celular, causando sofrimento. O MI-D e o MI-2,4diF também não alteraram os valores de viabilidade com o tratamento utilizando  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 3 horas. Portanto, sugere-se que estas alterações morfológicas mostrem um sofrimento celular sem a ocorrência de morte. Deve-se considerar que as alterações morfológicas observadas no presente estudo necessitam de outras técnicas complementares como microscopia eletrônica de transmissão para confirmação.

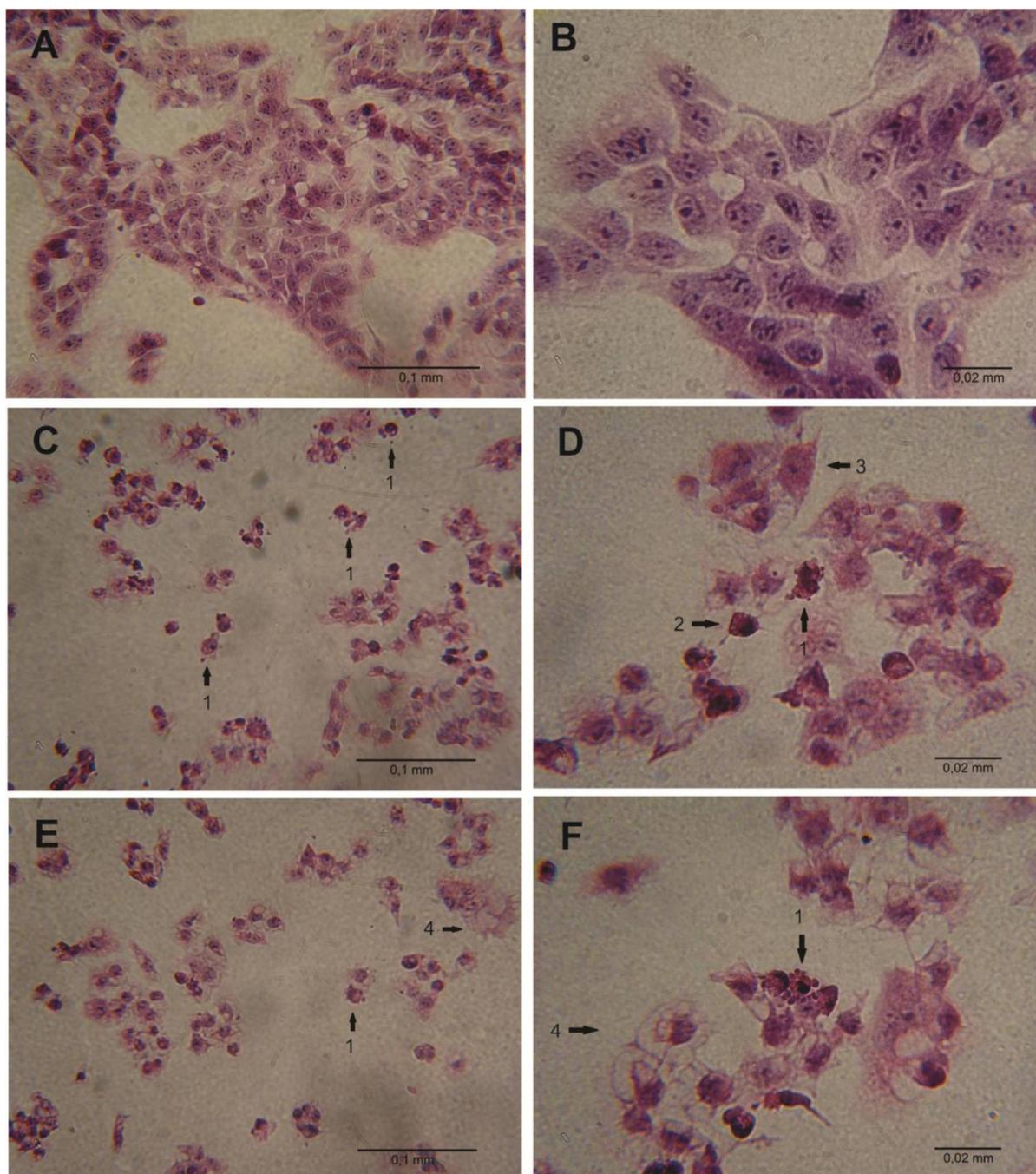


FIGURA 43 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 APÓS TRATAMENTO COM MI-4F  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Imagens da monocamada observada por microscopia óptica após coloração com hematoxilina e eosina nas seguintes condições: (A e B) controle, (C a F) MI-4F  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.2. As setas indicam alterações morfológicas: (1) célula com projeções indicando a formação de *blebs*, (2) retraimento celular e núcleo picnótico, (3) célula com volume aumentado, (4) células apresentando vacúolos. Em todas as fotografias a escala mostra magnificação real.

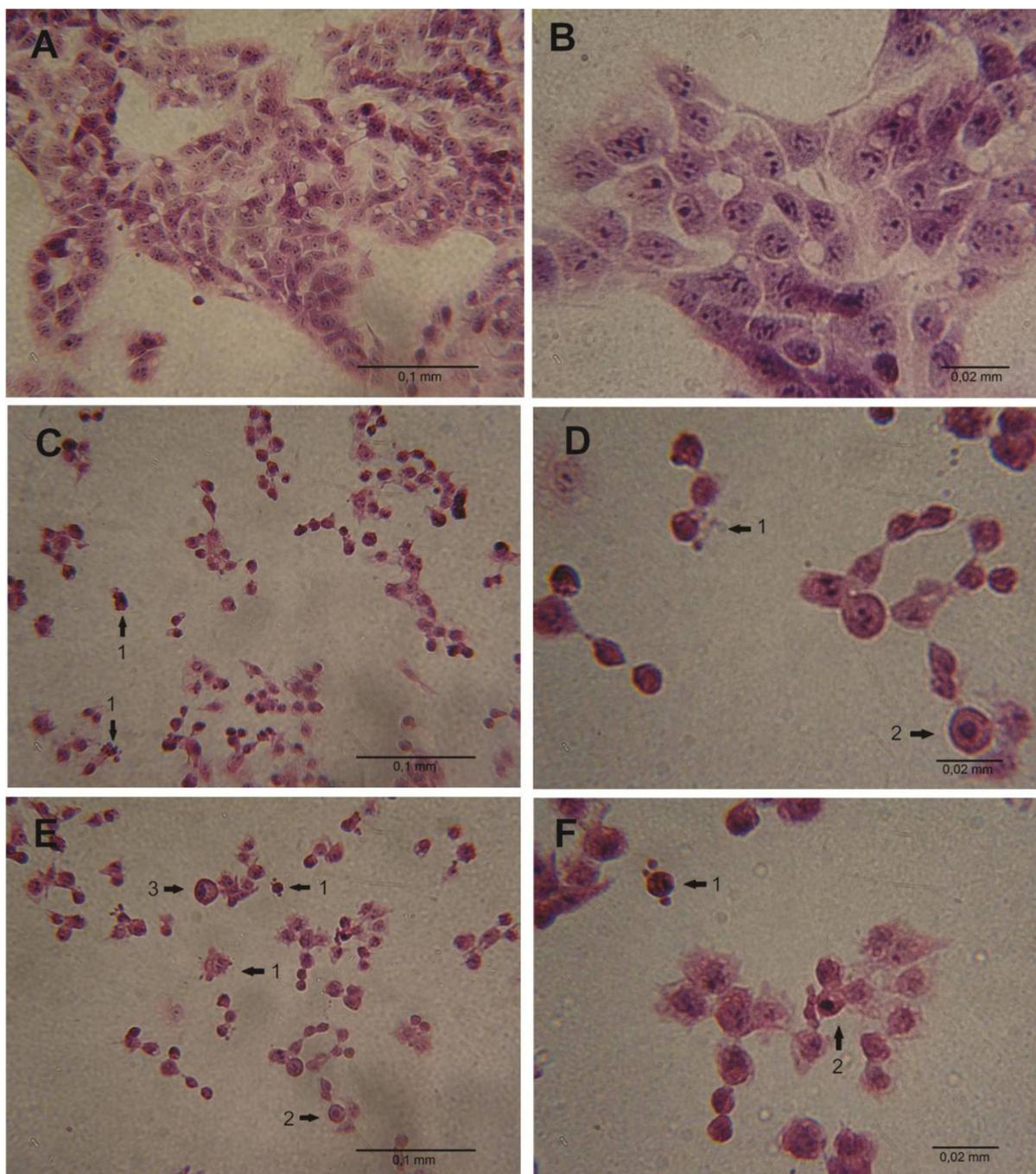


FIGURA 44 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 APÓS TRATAMENTO COM MI-2,4diF  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Imagens da monocamada observada por microscopia óptica após coloração com hematoxilina e eosina nas seguintes condições: (A e B) controle, (C a F) MI-2,4diF  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.2. As setas indicam alterações morfológicas: (1) célula com projeções indicando a formação de *blebs* e corpos apoptóticos, (2) células com núcleos picnóticos, (3) célula com volume aumentado. Em todas as fotografias a escala mostra magnificação real.

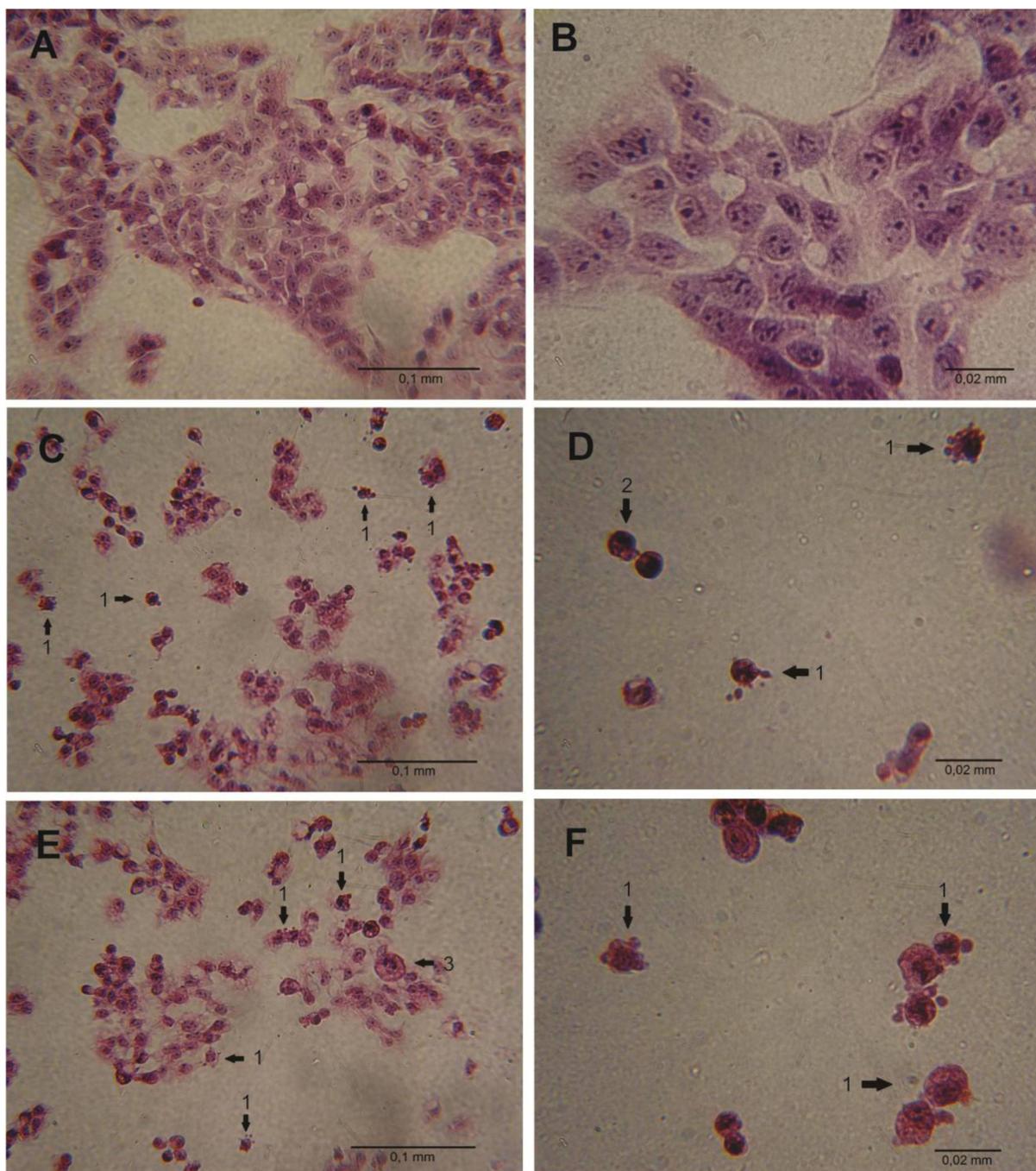


FIGURA 45 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2 APÓS TRATAMENTO COM MI-D  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Imagens da monocamada observada por microscopia óptica após coloração com hematoxilina e eosina nas seguintes condições: (A e B) controle, (C a F) MI-D  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.2. As setas indicam alterações morfológicas: (1) célula com projeções indicando a formação de *blebs* e corpos apoptóticos, (2) retraimento celular, (3) célula com volume aumentado. Em todas as fotografias a escala mostra magnificação real.

Sabe-se que a morfologia e a função celular são características intimamente relacionadas (WILKENING; STAHL; BADER, 2003). Nestes ensaios, pode-se observar que o tratamento das células HepG2 com os derivados 1,3,4-tiadiazóis promove significativas alterações morfológicas e, neste sentido, pode-se sugerir que alterações nas funções celulares também possam estar ocorrendo. Como visto nos ensaios de viabilidade celular nenhuma alteração foi observada quando os derivados foram incubados durante 3 horas na concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , no entanto, esta mesma concentração foi capaz de causar grandes modificações morfológicas. Para todos os derivados foram observadas alterações, como formação de *blebs* e corpos apoptóticos, condensação da cromatina e redução celular, que são características do processo de apoptose (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Estes resultados sugerem que a presença dos derivados promove sofrimento celular e até mesmo a morte, mas em uma pequena parcela das células. Deve-se considerar, também, que embora a mitocôndria esteja diretamente envolvida no processo de apoptose, micrografias eletrônicas mostram que sua estrutura mantém-se intacta até os últimos estágios da apoptose, quando ela e outras organelas começam a inchar (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Desta forma, mesmo com estas alterações morfológicas, a estrutura e a função de alguns componentes mitocondriais, assim como desidrogenases, poderiam estar preservadas, justificando a ausência de efeito sobre a viabilidade. Para elucidar o mecanismo de ação destes derivados e possíveis caminhos de morte, outros ensaios são necessários. Neste sentido foram realizados ensaios de fragmentação de DNA que estão mostrados nas seções seguintes.

A análise morfológica de células HeLa em presença de MI-D foi avaliada por Cadena (1999). Naquele trabalho, a análise de micrografias de células coradas com hematoxilina e eosina e microscopia eletrônica de transmissão evidenciaram grande sofrimento celular incluindo a formação de *blebs* e condensação da cromatina. Ensaio complementares utilizando o método TUNEL, com o qual é possível detectar a presença de DNA fragmentado, confirmaram que o MI-D leva a morte celular por apoptose. O MI-D foi incubado a uma concentração de  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durante 90 minutos e, como visto aqui, nesta concentração não ocorreu a redução da viabilidade. Os autores justificaram esta diferença pelo fato de que células apoptóticas mantém sua integridade de membrana horas após o início do processo.

### 6.9.3 Fragmentação do DNA

A indução da apoptose por quimioterápicos é considerada um dos efeitos mais significativos para inibição do crescimento tumoral (RAYCHAUDHURI, 2010). Entretanto, inicialmente estes agentes agem de modo inespecífico, o que pode levar a lesões no DNA ou, ainda, ao comprometimento da organização estrutural do citoesqueleto, também em células não tumorais (ALAM, 2003).

Durante o processo de apoptose vários eventos bioquímicos e morfológicos específicos ocorrem, incluindo: a ativação de caspases, a permeabilização da membrana mitocondrial, a fragmentação do DNA e a exposição do fosfolípídeo fosfatidilserina na superfície celular (KEPP *et al.*, 2011). Entre estes efeitos, a ativação de endonucleases endógenas, que tem afinidade por regiões internucleossomais do DNA, é um dos eventos mais proeminentes (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992).

A principal modificação nuclear durante a apoptose é a fragmentação das fitas duplas do DNA em fragmentos de 180 a 200 pares de bases (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Este complexo fenômeno pode ser mediado pela ativação de múltiplas endonucleases, sendo esta ativação desencadeada por diferentes estímulos (LECOEUR, 2002). Neste contexto, é bem conhecido que ERO participam da sinalização da morte celular programada. O dano ao DNA é comumente detectável durante o estresse oxidativo e representa a principal contribuição das ERO no processo de morte celular, particularmente em células eucarióticas (AVERY, 2011). Por exemplo, a lipoperoxidação associada ao estresse oxidativo, não contribui diretamente para a morte celular, porém, os produtos reativos provenientes deste processo, como malondialdeído e 4-hidroxinonenal, podem atuar como iniciadores. Estes produtos reativos podem atacar aminoácidos de cadeias laterais em proteínas e, ainda, causar a fragmentação do DNA. O DNA é particularmente propenso à oxidação catalisada por ferro, isto porque este metal se liga diretamente ao esqueleto fosfodiéster, onde o radical hidroxila pode ser gerado através da reação de Fenton. O dano ao DNA é comumente detectável durante o estresse oxidativo, e é claro que tal dano é a maior contribuição para a morte induzida por ERO, especialmente em células eucarióticas (AVERY, 2011).

Existem vários métodos para avaliar a fragmentação de DNA, entre estes a citometria de fluxo. Neste método é possível analisar células apoptóticas utilizando

iodeto de propídio (IP) para determinar o conteúdo de DNA celular. Este procedimento é embasado na observação de que a fração de células apoptóticas tem um reduzido conteúdo de DNA, devido a sua degradação e saída do núcleo (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992). Desta forma, nos histogramas provenientes desta análise, a população de células apoptóticas é representada pela fração de eventos sub-G1, ou seja, células com núcleo sub-diplóides (LOO; RILLEMA, 1998).

Os resultados da análise do conteúdo de DNA fragmentado após 6 horas de tratamento com os derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos estão mostrados nas figuras 46 e 47. Nestas figuras, pode-se observar que o conteúdo de DNA fragmentado não foi alterado em relação ao experimento controle (ausência dos derivados), após 6 horas de tratamento (figura 46). Os histogramas representativos destes experimentos (figura 47) também mostram que não há diferença entre as células tratadas e o controle.

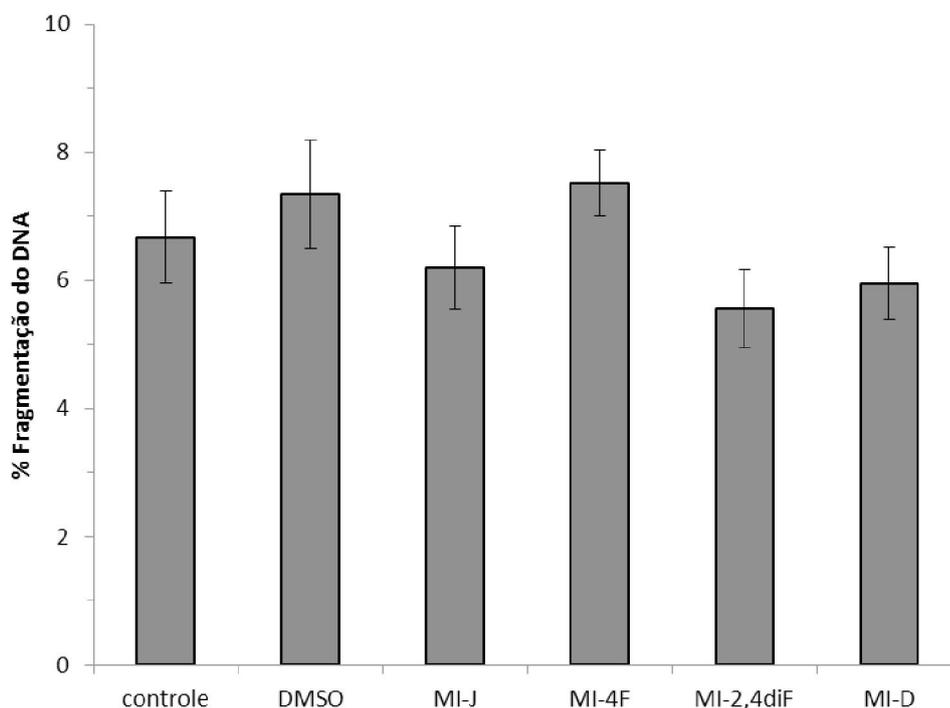


FIGURA 46 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DE DNA APÓS 6 HORAS DE TRATAMENTO

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Células HepG2 foram tratadas com  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos ou o mesmo volume de DMSO durante 6 horas. Ensaio na ausência dos derivados (controle) também foram realizados. As células foram coletadas, lavadas com PBS e suspensas em solução de IP. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur usando o filtro FL2. Os valores estão expressos como porcentagem do total de eventos (10000 células). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.3. Os valores representam a média de três experimentos independentes em triplicata.

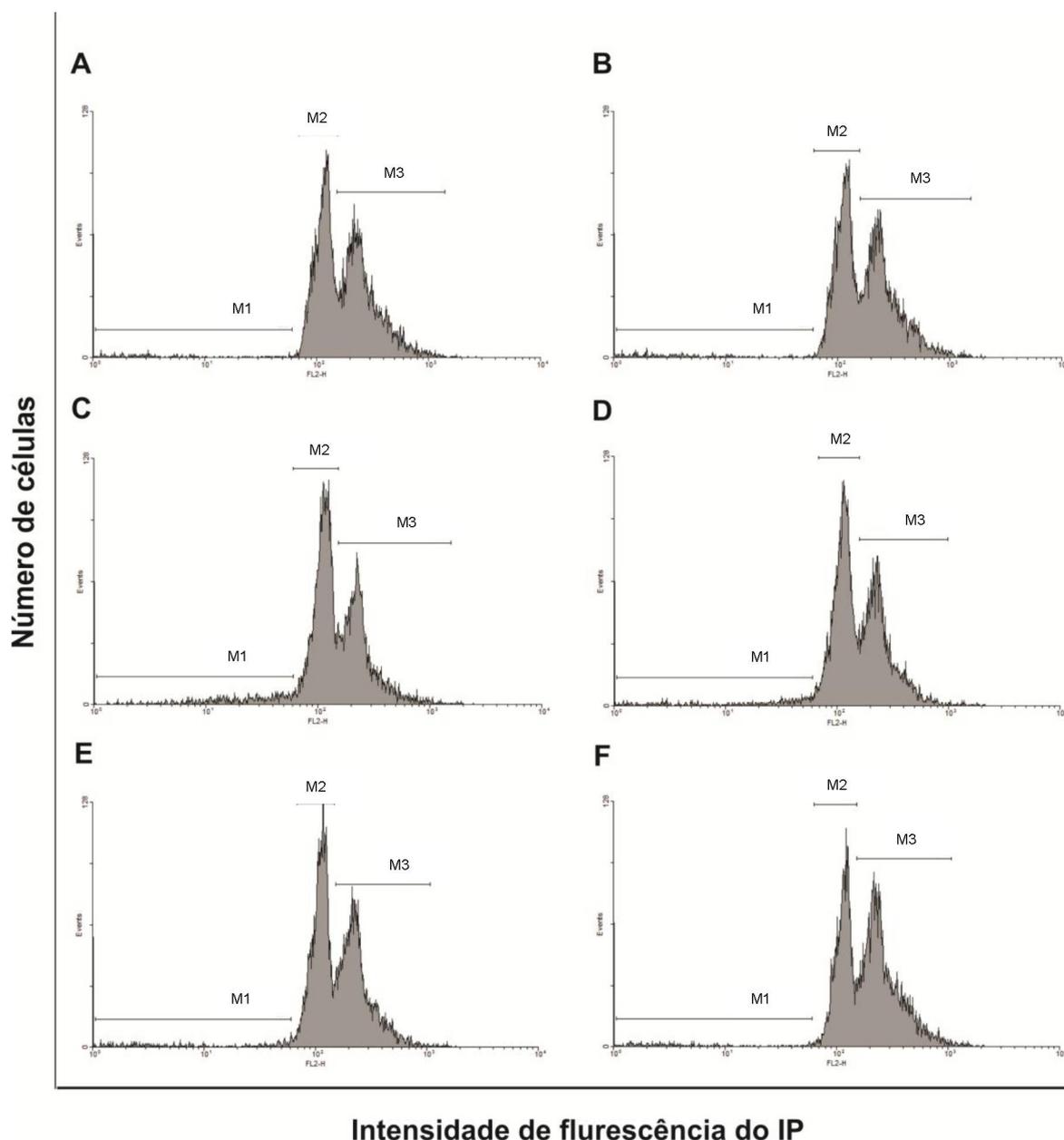


FIGURA 47 HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DOS EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O CICLO CELULAR APÓS 6 HORAS DE TRATAMENTO.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Células HepG2 foram tratadas com  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos ou o mesmo volume de DMSO (solvente das drogas) durante 6 horas. As células foram coletadas, lavadas com PBS e suspensas em solução de IP. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur usando o filtro FL2. O número de células em cada fase foi expresso como porcentagem do total de eventos (10000 células). A fase sub-G1 é representada pela área delimitada pela barra M1, fase G0/G1 pela barra M2 e fase G2/M pela barra M3. Os histogramas representam (A) controle, (B) DMSO, (C) MI-J, (D) MI-4F, (E) MI-2,4diF e (F) MI-D. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.3. Os traçados são representativos de três experimentos independentes para cada composto em triplicata.

Por outro lado, após 24 horas de tratamento, diferenças estatísticas em relação ao controle foram observadas. Estes resultados estão mostrados nas figuras 48 e 49. O MI-J foi o composto que promoveu a maior porcentagem de fragmentação do DNA (figura 48), quando comparado aos outros derivados. Isto pode ser visto pelo aumento do número de células em fase sub-G1 (figura 49). Este derivado promoveu aproximadamente 15% de fragmentação de DNA em comparação aos 2,7% do controle. Já o MI-4F promoveu aproximadamente 12% de fragmentação e o MI-2,4diF ~11%. Mesmo com valores tão próximos, a análise estatística destes dados mostra que os derivados apresentam efeitos de intensidades diferentes entre si. Em relação a outras fases do ciclo celular, os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF mostraram efeitos semelhantes (figura 49), promovendo uma diminuição do número de células na fase G0/G1 e um discreto aumento em G2/M, porém, não foi observada parada em nenhuma das fases. Como a fragmentação de DNA é uma característica de morte celular por apoptose, pode-se sugerir que o tratamento de células HepG2 com os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF induza a morte celular por apoptose. Estes resultados são compatíveis aos da análise morfológica, os quais mostram modificações características deste tipo de morte nestas células (figuras 43 - 45), no entanto, este ensaio foi realizado com parâmetros diferentes (concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  por 3 horas). Por outro lado, a porcentagem de fragmentação do DNA para estes derivados foi muito inferior à redução da viabilidade com MTT, que foi de aproximadamente 50%, nestas mesmas condições (figuras 37 - 39).

Assim como os derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, uma série de outros compostos com atividade antitumoral também aumentam a quantidade de DNA fragmentado. Como exemplo, o leaquiadona A, um composto extraído da planta medicinal *Radix sophorae* que possui pronunciada atividade citotóxica contra células HepG2 e atividade antitumoral em camundongos portadores de tumor originado pela mesma linhagem celular. A análise do ciclo celular de células HepG2 tratadas com leaquiadona A mostrou que este composto aumentou a porcentagem de células na fase sub-G1 de forma dependente da concentração, sem a ocorrência de parada em nenhuma das fases do ciclo celular. O aumento da fragmentação do DNA também foi observado em experimentos de eletroforese em gel de agarose e citometria de fluxo utilizando a sonda FITC-dUTP (CHEUNG *et al.*, 2007).

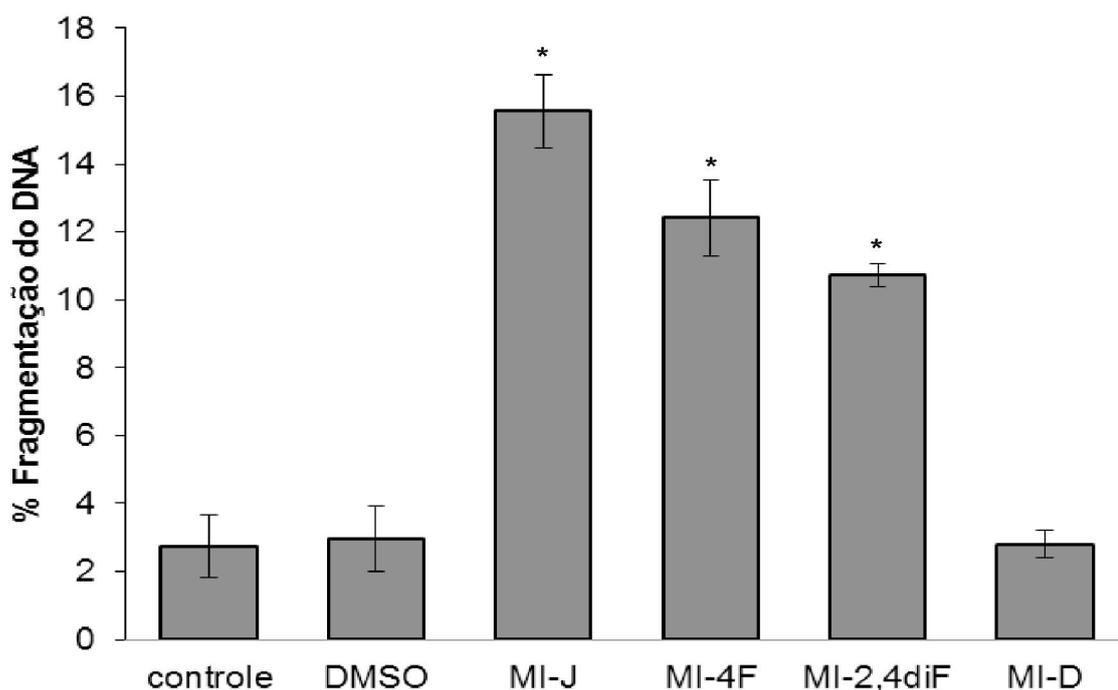
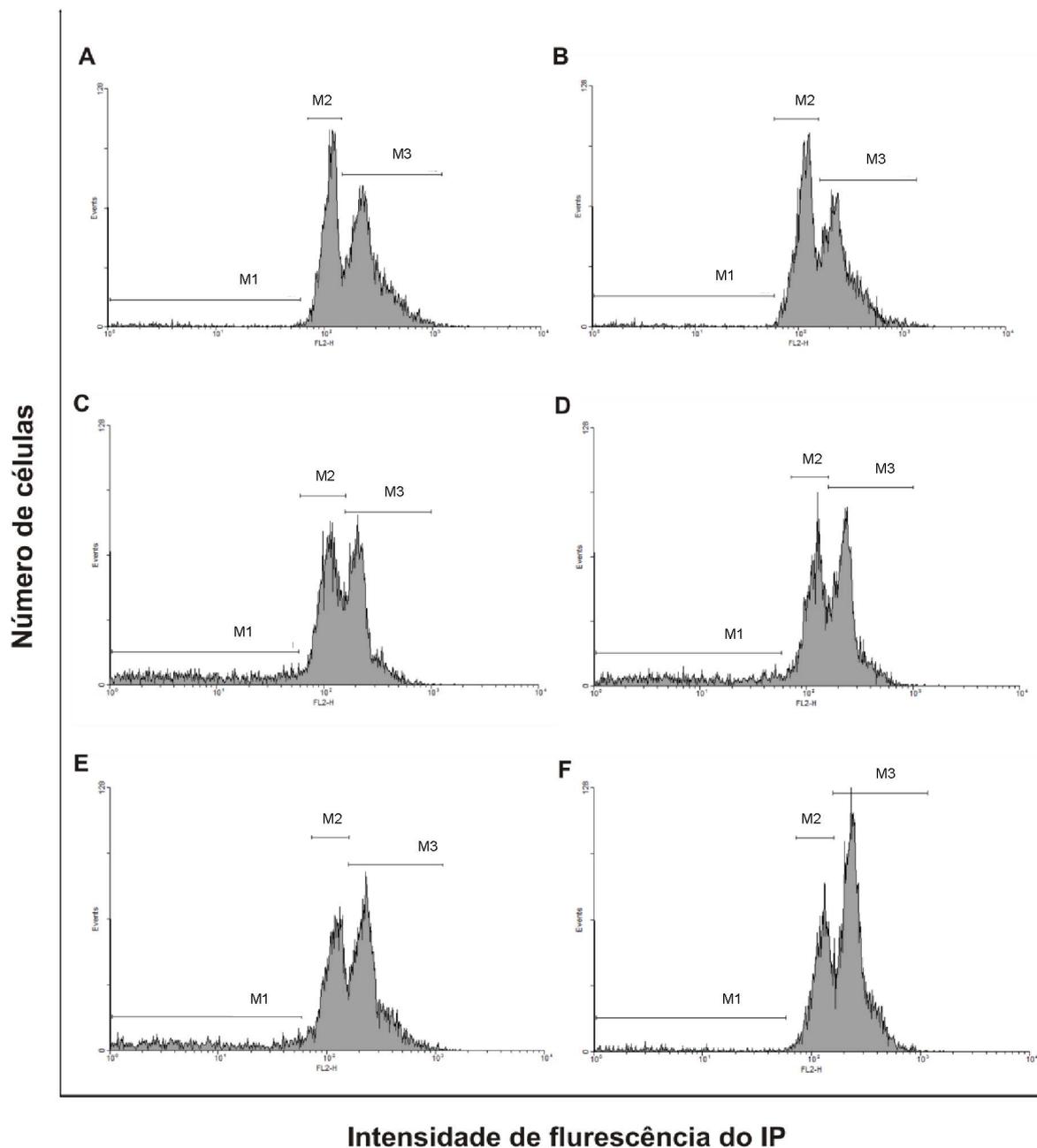


FIGURA 48 EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DE DNA APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Células HepG2 foram tratadas com  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos ou o mesmo volume de DMSO durante 24 horas. Ensaio na ausência dos derivados (controle) também foram feitos. As células foram coletadas, lavadas com PBS e suspensas em solução de IP. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur usando o filtro FL2. Os valores estão expressos como porcentagem do total de eventos (10000 células). As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.3. Os valores representam a média de três experimentos independentes em triplicata. \* Significativamente diferente do controle ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 49** HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DOS EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O CICLO CELULAR APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Células HepG2 foram tratadas com  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos ou o mesmo volume de DMSO (solvente das drogas) durante 24 horas. As células foram coletadas, lavadas com PBS e suspensa em solução de IP. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur usando o filtro FL2. O número de células em cada fase foi expresso como porcentagem do total de eventos (10000 células). A fase sub-G1 é representada pela área delimitada pela barra M1, fase G0/G1 pela barra M2 e fase G2/M pela barra M3. Os histogramas representam (A) controle, (B) DMSO, (C) MI-J, (D) MI-4F, (E) MI-2,4diF e (F) MI-D. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos item 5.6.6.3. Os traçados são representativos de três experimentos independentes para cada composto em triplicata.

Diferentemente do observado para os outros derivados, o MI-D promoveu aproximadamente 2,8% de quebra do DNA, valor estatisticamente igual ao controle (2,7%) (figura 48). Analisando os histogramas (figura 49) pode-se observar, também, que o MI-D mostrou um perfil diferente do controle e dos outros derivados. O MI-D promoveu um aumento do número de células na fase G2/M e diminuição na fase G1/G0. Em adição a este efeito, o MI-D não promoveu a fragmentação do DNA. Desta forma, podemos sugerir que o MI-D induz a uma parada no ciclo celular na fase G2/M, apresentando assim atividade citostática e citotóxica. Isto está de acordo com os resultados de viabilidade celular, no qual o MI-D foi o menos efetivo e causou a morte de apenas 28% das células com  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e somente após 24 horas de incubação (tabela 1). Entretanto, a análise morfológica (figura 45) mostra alterações características de morte celular por apoptose, como observado anteriormente para células HeLa (CADENA, 1999). Neste sentido, torna-se necessário a realização de outros experimentos, como avaliação da ativação de caspases, para comprovar esta hipótese.

Efeito semelhante ao MI-D foi observado para trióxido de arsênio e a genisteína, ambos utilizados no tratamento quimioterápico de hepatocarcinoma. Ma e colaboradores (2011) mostraram que em células HepG2 e Hep3B quando tratadas por 48 horas com trióxido de arsênio sozinho ou combinado com genisteína, ocorre um aumento do número de células na fase S e G2/M e uma diminuição significativa do número de células em fase G0/G1. Ensaios *in vivo*, utilizando camundongos, mostraram que a combinação destas duas drogas é mais efetiva na redução de tumores do que quando usadas separadamente. A análise por citometria de fluxo de células marcadas com anexina V e IP também mostraram que esta combinação aumenta a apoptose.

Estes dados sugerem que compostos com atividade antitumoral e citotóxica podem promover efeito antitumoral por diferentes vias, sendo que a fragmentação de DNA pode fazer ou não parte do seu mecanismo de ação. Deve-se ainda considerar a necessidade de experimentos complementares como, por exemplo, eletroforese em gel de agarose, para confirmar estes resultados.

## 7 DISCUSSÃO FINAL

Em estudo anterior, Pires e colaboradores (2010) demonstraram que os derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, mais especificamente, o MI-J, MI-4F e MI-2,4diF, apresentam características que os classificam como inibidores do transporte de elétrons e desacopladores da fosforilação oxidativa. Também naquele estudo, resultados de experimentos de *swelling* mitocondrial, na ausência de substrato e em presença de valinomicina e potássio, foram sugestivos do comprometimento da fluidez da membrana mitocondrial interna pelos derivados (ANDRADE, 2010; PIRES *et al.*, 2011). No presente estudo, estes efeitos foram confirmados através de outras abordagens experimentais. Observou-se que os mesmos derivados inibem o *swelling* mitocondrial em presença de substrato oxidável e acetato (figura 15 e 16), sendo que tal efeito pode ser justificado pela inibição do transporte de elétrons. Por sua vez, experimentos de polarização com as sondas DPH e DPH-PA em lipossomas de DMPC reforçam a sugestão de que os derivados comprometam a fluidez da membrana mitocondrial interna. O MI-J diminuiu significativamente a fluidez destas membranas em ambas as regiões, hidrofílica e hidrofóbica, enquanto que os derivados fluorados (MI-4F e MI-2,4diF) diminuiram a fluidez do núcleo hidrofóbico e aumentaram discretamente a fluidez das regiões mais superficiais (hidrofílicas) destas membranas (figuras 18 - 23).

Cadena e colaboradores (2002) demonstraram que o MI-D, outro derivado 1,3,4-tiadiazol-2-fenilamina, diminuiu significativamente a fluidez de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas da membrana. Este resultado é semelhante ao apresentado para o MI-J. Estes dois derivados partilham de características físico-químicas semelhantes, sendo ambos substituídos por grupos mais polarizáveis. Por outro lado, os derivados fluorados (MI-4F e MI-2,4diF), substituídos por grupos menores e menos polarizáveis, promoveram alterações mais discretas no ambiente hidrofóbico das membranas. Com base nestes resultados pode-se sugerir que os derivados com substituintes mais polarizáveis promovam uma redução da fluidez de membranas compostas por fosfolípidos com maior intensidade (PIRES *et al.*, 2010).

Os resultados dos experimentos de polarização de fluorescência podem, ainda, auxiliar na interpretação do efeito inibitório destes derivados sobre a lipoperoxidação (figura 24), uma vez que mostraram que os mesmos são capazes de se inserir em bicamadas lipídicas, preferencialmente nas regiões hidrofóbicas. Esta

inserção, de alguma forma, parece favorecer o aumento da organização e empacotamento das cadeias de fosfolípídeos, refletindo-se como diminuição da fluidez do ambiente hidrofóbico. Por sua vez, esta diminuição da fluidez da membrana pode restringir a difusão de radicais livres e, portanto, diminuir a propagação da reação radicalar que promoveria a oxidação da membrana. A relação entre a diminuição da fluidez de membranas e a inibição da lipoperoxidação também têm sido descrita para outros compostos, como por exemplo, para os flavonóides, benzo- $\gamma$ -pironas naturais que apresentam atividade antioxidante (ARORA *et al.*, 2000). Arora e colaboradores avaliaram a naringenina, rutina, genisteína, genistina e biocanina A, e seus respectivos metabólitos. Todos os flavonóides, isoflavonóides e metabólitos promoveram a diminuição da fluidez de membranas artificiais de fosfolípídeos (1-estearoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), como observado pela medida da anisotropia das seguintes sondas fluorescentes: ácido esteárico 6-(9-antroiloxi) (6-AS), ácido esteárico 12-(9-antroiloxi) (12-AS) e ácido palmítico 16-(9-antroiloxi) (6-AP). Estes compostos comprometeram com maior intensidade o núcleo hidrofóbico das membranas, modificando o empacotamento das cadeias lipídicas. Os autores sugeriram que os flavonóides e isoflavonóides mimetizariam o efeito do colesterol e do  $\alpha$ -tocoferol estabilizando a membrana e que este mecanismo poderia estar relacionado com a inibição da lipoperoxidação promovida pelos mesmos.

A relação entre a fluidez de membrana e a atividade antioxidante também foi demonstrada para o composto antitumoral Tamoxifeno e seu metabólito, o hidroxitamoxifeno (CUSTÓDIO *et al.*, 1994). Ambos inibiram a lipoperoxidação induzida por  $Fe^{2+}$ /ascorbato e apresentaram uma alta capacidade de sequestrar radicais peroxil gerados, tanto na fase aquosa quanto na fase lipídica, como demonstrado nos experimentos de lipoperoxidação induzida por AAPH e AMVN, respectivamente, sendo que o hidroxitamoxifeno mostrou-se mais efetivo. Os autores sugeriram que esta diferença seria decorrente da presença de um grupo hidroxila no anel benzênico, o qual permitiria que os radicais abstraíssem com maior facilidade elétrons ou um átomo de hidrogênio do hidroxitamoxifeno em comparação ao Tamoxifeno (anel benzênico sem hidroxila), sendo as cargas estabilizadas por ressonância. Em adição, o hidroxitamoxifeno se localizaria preferencialmente na superfície de membranas e poderia interagir com os radicais, anulando sua ação sobre os lipídeos e, assim, inibiria a lipoperoxidação.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que os derivados mesoiônicos apresentam comportamento semelhante ao do Tamoxifeno e hidroxitamoxifeno. Todos os derivados inibiram a lipoperoxidação induzida por  $\text{Fe}^{3+}/\text{ADP}/2\text{-oxogluturato}$  e AAPH (figura 24 e 26), mesmo efeito descrito anteriormente para o MI-D (MÉNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2009), além de atuarem como possíveis antioxidantes, como sugeridos nos experimentos de sequestro de radicais superóxido (figura 28 e MÉNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2009). Assim como o Tamoxifeno e os flavonóides, a estrutura dos derivados 1,3,4-tiadiazóis-2-fenilamina é constituída por anéis benzênicos e um sistema de ressonância de elétrons. A figura 13 mostra a estrutura destes derivados, nas quais se observa que o hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo fenilamina apresenta maior facilidade de ser abstraído por radicais. Por sua vez, a presença de substituintes no anel cinamoil que sejam mais eletronegativos (MI-2,4diF e MI-D) pode facilitar a abstração do hidrogênio e conferir maior atividade ao composto para reagir com radicais livres e ERO (PIRES *et al.*, 2010).

Quanto a inibição da lipoperoxidação, os derivados MI-4F e MI-2,4diF apresentaram efeitos de intensidade semelhante, sendo estes maiores que o do MI-D e MI-J. Em comparação ao MI-J, este resultado pode ser justificado pela presença de substituintes no anel cinamoil com maior eletronegatividade, tornando o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo fenilamina mais fracamente ligado e, desta forma, facilitar sua abstração. Entretanto, o composto MI-D é substituído por um grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) que apresenta maior eletronegatividade quando comparado aos demais derivados. Particularmente no caso do MI-2,4diF deve-se considerar que a estabilização de cargas pode ocorrer de forma mais efetiva, uma vez que há uma maior deslocalização dos elétrons na molécula em comparação aos outros derivados que possuem um único grupo ligado ao anel cinamoil (PIRES *et al.*, 2010), o que promoveria um aumento na sua reatividade.

Em contraste à capacidade de sequestrar ânions superóxido (figura 28), os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF, inibiram a atividade da enzima Mn-SOD. Méndez-Sánchez (2009) avaliaram o efeito do MI-D sobre esta enzima em células HeLa e B16-F10 e não observaram qualquer efeito do composto. Considerando que o MI-D também não altere a atividade da SOD mitocondrial, o maior efeito do MI-4F e MI-2,4diF sobre a lipoperoxidação, em comparação a este composto, poderia ser justificado. Como mencionado, a inibição desta enzima irá diminuir a velocidade de

dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio, o qual é substrato para reações que produzem radicais com potencial para iniciar a lipoperoxidação (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Considerando estas informações, pode-se sugerir que a inibição da lipoperoxidação observada para os derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF possa ser decorrente de uma somatória de efeitos: sequestro de ânions superóxido, inibição da enzima Mn-SOD, diminuição da fluidez de membrana e o efeito desacoplador, anteriormente descrito (PIRES *et al.*, 2010).

Ainda em relação à inibição da lipoperoxidação, outro fato que chama a atenção é que a mesma foi inibida completamente nos primeiros minutos de reação, mas, em tempos maiores, observa-se um aumento na velocidade de oxidação dos lipídeos, efeito verificado principalmente para as maiores concentrações (figura 24). Isto sugere que estes derivados possam reagir diretamente com as ERO, impedindo a propagação deste processo nos minutos iniciais da reação e, após a reação com todas as moléculas dos derivados, a lipoperoxidação reinicia-se com velocidade semelhante a do controle. Efeito semelhante foi descrito para o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), um conhecido antioxidante (CUSTÓDIO *et al.*, 1994; NIKI *et al.*, 1984). Todos os derivados exibiram este mesmo perfil de inibição da lipoperoxidação, principalmente nas maiores concentrações, sendo que o MI-2,4diF foi o mais efetivo (figura 24). Em relação ao MI-D, esta analogia não pode ser feita, já que a avaliação do seu efeito sobre a lipoperoxidação foi realizada somente em um único tempo (45 minutos) (MÉNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2009).

O sugestivo efeito antioxidante dos derivados pode também ter sido responsável pela diminuição da oxidação dos nucleotídeos de piridina, mesmo em presença de cálcio (figuras 29 e 30). Entretanto, na interpretação deste último resultado deve-se considerar a inibição do transporte do cátion na organela em presença dos derivados (figura 33). Todos os derivados avaliados no presente estudo (figura 33) e o MI-D (MÉNDEZ-SÁNCHEZ, 2009) inibiram o influxo de cálcio de modo dose-dependente. Sabe-se que o cálcio pode promover o aumento da produção de ERO (BROOKES *et al.*, 2004, CARAFOLI, 2010), portanto, a inibição do seu influxo pode prevenir o estresse oxidativo, o que também poderia contribuir para o possível efeito antioxidante dos mesoiônicos. Em relação ao efluxo do íon, somente para os derivados MI-J e MI-4F foi observada diminuição.

Os resultados dos experimentos de transporte de cálcio estão de acordo com a inibição da formação/abertura do PTM. Observa-se na figura 32 que o MI-J inibiu a

TPM de forma dose dependente, possivelmente como resultado da significativa inibição do influxo e efluxo de cálcio. Neste contexto, sabe-se que o PTPM pode atuar também como via de efluxo deste cátion (RASOLA; BERNARDI, 2011). Resultado similar foi observado para os derivados fluorados (MI-4F e MI-2,4diF), com a ressalva de que na maior concentração ( $130 \text{ nmol.mg}^{-1}$  de proteína) a inibição (observada como diminuição da amplitude do inchamento em relação ao controle), foi substituída pelo inchamento de amplitude significativa, o que sugere um comprometimento da integridade da membrana interna ou a ocorrência da TPM nesta concentração. Em relação a esta última hipótese, observa-se na figura 33 que os derivados fluorados, em especial o MI-4F, comprometeram de forma significativa o transporte do cálcio, sugerindo novamente um comprometimento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, o que por sua vez indica que o inchamento observado na figura 32, ocorra de forma independente a formação/abertura do PTPM.

A inibição da formação/abertura do PTPM, promovida pelos derivados em concentrações menores, pode relacionar-se com a possível atividade antioxidante dos derivados, uma vez que o processo de permeabilização da membrana pode ser ativado pela oxidação de grupos tióis de proteínas envolvidas na formação do PTPM (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001). Em adição, a inibição do influxo de cálcio previne o estresse oxidativo e, conseqüentemente, os processos desencadeados por ERO como o PTPM e a lipoperoxidação, sendo ambos os processos envolvidos na indução da apoptose (AVERY, 2011).

Entretanto, experimentos de viabilidade das células HepG2 tratadas com os derivados mostram que estes compostos são citotóxicos. Além disso, as análises da morfologia e ciclo celular mostram que os derivados promovem alterações sugestivas de morte celular por apoptose. Neste contexto, são descritos outros compostos com atividade antioxidante, como o Tamoxifeno e a genisteína, que também são citotóxicos e utilizados no tratamento do câncer. O Tamoxifeno, que é um composto utilizado no tratamento do câncer de mama (JORDAN, 1990), apresenta atividade antioxidante (CUSTÓDIO *et al.*, 1994), inibe a TPM (HERNÁNDEZ-ESQUIVEL *et al.*, 2011; CARDOSO; ALMEIDA; CUSTÓDIO, 2004; CUSTÓDIO; MORENO; WALLACE, 1998), inibe a oxidação dos nucleotídeos de piridina (CARDOSO; ALMEIDA; CUSTÓDIO, 2004), altera a fluidez de membranas (CUSTÓDIO; ALMEIDA; MADEIRA, 1993) e inibe a lipoperoxidação (CUSTÓDIO *et*

*al.*, 1994). Ainda, o Tamoxifeno promove alterações significativas nas funções mitocondriais, entre elas a estimulação da ATPase e do estado 4 da respiração, inibição do estado 3 da respiração mitocondrial, devido ao seu efeito inibitório sobre os complexos III e IV e dissipação do potencial de membrana (TUQUET *et al.*, 2000; CARDOSO *et al.*, 2001). Cardoso e colaboradores (2001) sugerem que os efeitos sobre as funções bioenergéticas, como alterações na estrutura de membrana, na respiração e na eficiência da fosforilação podem explicar a indução de morte celular por este composto em diferentes tipos celulares.

Em relação aos ensaios com células HepG2 observou-se comprometimento da viabilidade ( $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em presença dos derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF (figuras 37 - 39) a partir de 3 horas de tratamento. No entanto, o MI-D alterou a viabilidade somente após 6 horas de tratamento e, mesmo após 24 horas, a quantidade de DNA fragmentado não foi alterada em relação ao controle (figura 48). Por outro lado, os demais derivados foram mais citotóxicos em baixas concentrações (figuras 38 - 40) e promoveram a fragmentação do DNA (figura 48) seguindo esta ordem de intensidade: MI-J > MI-4F  $\geq$  MI-2,4diF. Na análise do ciclo celular (figura 49) pode-se observar que o MI-D foi o único derivado que promoveu um aumento do número de células na fase G2/M e diminuição na fase G0/G1, ou seja, uma parada no ciclo celular, sugerindo que o MI-D apresente efeito citostático. Este efeito pode ser decorrente da ação do MI-D sobre a função ou expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular como, por exemplo, a proteína p21, que está relacionada com a parada do ciclo celular e indução à senescência (KNAPOWSKI; WIECZOROWSKA-TOBIS; WITOWSKI, 2002). A Genisteína, um flavonóide natural utilizado no tratamento do câncer de mama, apresenta efeito semelhante ao MI-D promovendo a parada do ciclo celular em G2/M em células de câncer gástrico humano (HGC-27) e células de câncer de mama (MATSUKAWA *et al.*, 1993; SHAO *et al.*, 1998 a; LI *et al.*, 2008). SHAO e colaboradores (1998 a) mostraram que o Genisteína apresenta efeito antiproliferativo em linhagem de células de câncer de mama humano contendo ou não receptores de estrogênio (MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente). Os autores associaram este efeito antiproliferativo da Genisteína com a parada específica do ciclo celular em G2/M e o aumento da expressão da proteína p21. Este mesmo grupo, em estudo posterior (SHAO *et al.*, 1998 b), demonstrou que a Genisteína promove a regulação negativa da transcrição da metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9) e a regulação positiva do inibidor tecidual de

metaloproteinase-1 (TIMP-1), além de reduzir os níveis do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e do fator de transformação de crescimento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) em células MCF-7 e MDA-MB-23, promovendo uma inibição do processo de invasão e angiogênese. Neste sentido, não se pode descartar a possibilidade do MI-D comprometer a regulação de fatores envolvidos na proliferação e morte celular e, para tanto, são necessários experimentos complementares que busquem esclarecer os mecanismos envolvidos na ação antitumoral deste derivado.

Em células HepG2, o MI-J foi mais citotóxico em baixas concentrações e o derivado que promoveu maior fragmentação de DNA. Em estudos anteriores, este mesmo composto não apresentou citotoxicidade em células B16-F10 e não apresentou efeito antitumoral em melanoma murino (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004), mas mostrou atividade antitumoral contra sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich (GRYNBERG; SANTOS; ECHEVARRIA; 1997). Por outro lado, o derivado MI-D que mostrou-se menos citotóxico em baixas concentrações no presente estudo (figura 40), foi mais efetivo contra melanoma murino, sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich em comparação ao MI-J, além de apresentar citotoxicidade para várias linhagens de melanoma humano (GRYNBERG; SANTOS; ECHEVARRIA; 1997; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004 a e b) e induzir a apoptose em células HeLa (CADENA, 1999).

Os derivados MI-4F e MI-2,4diF apresentaram atividade antitumoral contra melanoma murino e citotoxicidade contra células B16-F10, sendo que o MI-2,4diF foi mais efetivo nos testes *in vivo* (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo não mostram diferenças significativas entre estes dois derivados sobre a redução da viabilidade (figuras 38 e 39), no entanto o MI-2,4diF causou maior fragmentação de DNA quando comparado ao MI-4F (figura 48).

As análises morfológicas sugerem que todos os derivados, inclusive o MI-D, causaram modificações significativas nas células como retração celular, formação de *blebs* e corpos apoptóticos (figuras 42 - 45) mesmo em baixa concentração e curto tempo de exposição aos derivados ( $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durante 3 horas). Esta condição foi escolhida porque grande parte das células permanecia aderida e as alterações morfológicas eram mais discretas que em concentrações mais altas ( $25$  e  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  - resultado não mostrado). Interessantemente, na concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  durante 3 horas de tratamento não foi observada grandes modificações nos valores de viabilidade celular (figuras 37 a 40) e fragmentação de DNA, o qual foi realizado

na concentração de 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  após 6 horas de tratamento (figuras 46 e 47). Talvez estas modificações morfológicas sejam reflexo do sofrimento celular causado pelo tratamento com os derivados, no entanto, sem que ocorra a fragmentação do DNA e morte celular.

Com base nestas informações, pode-se sugerir que não existe um padrão de efeitos entre os derivados para as diferentes linhagens e mesmo entre ensaios *in vivo* e *in vitro*. Além disso, com base nos diferentes efeitos promovidos pelos derivados, pode-se observar que as diferenças estruturais e, conseqüentemente as físico-químicas, promovem efeitos diferentes sobre as funções mitocondriais e celulares. Parece que estes derivados possuem certa seletividade celular e que as diferenças entre as linhagens podem justificar a maior efetividade ou ausência de efeitos. Neste sentido, talvez a presença de grande quantidade de organelas mitocondriais nas células HepG2 (PINTI *et al.*, 2003) justifiquem os efeitos dos derivados. Considerando que os efeitos dos derivados MI-2,4diF, MI-4F, MI-J sobre a bioenergética são de intensidade superior ao do MI-D, e que isto foi reproduzido nos experimentos de viabilidade celular nas menores concentrações (5 e 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), pode-se sugerir que o comprometimento das funções mitocondriais nestas células pode ser mais nocivo que em outras linhagens. No entanto, não se pode descartar que outros mecanismos, que não envolvam a bioenergética mitocondrial, estejam envolvidos na atividade citotóxica destes derivados.

Considerando, ainda, que a porcentagem de células com DNA fragmentado após o tratamento com os derivados (figura 48) foi ausente ou inferior a porcentagem de morte nos experimentos de viabilidade (figuras 37 - 40). Estes resultados sugerem que os derivados MI-J, MI-4F, MI-2,4diF e MI-D podem promover a morte celular por outras vias além daquelas que envolvam a mitocôndria e a fragmentação de DNA, como por exemplo, pela via extrínseca da apoptose. Portanto, experimentos que visem à elucidação do mecanismo de ação antitumoral destes derivados, como a identificação da ativação da caspase-8 e liberação de citocromo c, são essenciais para a continuidade deste estudo.

## 8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

1) Os efeitos promovidos pelos derivados sobre a bioenergética mitocondrial estão intimamente relacionados às alterações que estes promovem na permeabilidade das membranas mitocondriais. Em adição, a presença de diferentes substituintes faz com que estas alterações sejam distintas de acordo com a hidrofobicidade dos compostos;

2) O comprometimento da permeabilidade e fluidez de membrana se reflete em todos os resultados obtidos;

3) A inibição observada sobre o inchamento mitocondrial reflete também a inibição promovida pelos derivados sobre o transporte de elétrons (PIRES *et al.*, 2010). Por sua vez, a inibição da lipoperoxidação, da captação de cálcio, da oxidação dos nucleotídeos de piridina resultou do efeito desacoplador dos derivados (PIRES *et al.*, 2010), somado à sua atividade sequestradora de radicais livres, em particular, de ânion superóxido;

4) A inibição da atividade da enzima Mn-SOD pelos derivados não resultou em aumento de processos oxidativos (lipoperoxidação, oxidação dos nucleotídeos de piridina e transição de permeabilidade mitocondrial) possivelmente devido ao fato de ter sido contraposta pela atividade sequestradora de ânions superóxido demonstrada para os mesmos;

5) Os derivados MI-J, MI-4F, MI-2,4diF e MI-D são citotóxicos para células HepG2, mesmo em baixa concentração, como indicado pelas significativas alterações morfológicas, sugestivas de indução de morte celular por apoptose;

6) O derivado MI-D exerce sua toxicidade sobre células HepG2 por mecanismos diferentes dos demais derivados (MI-J, MI-4F e MI-2,4diF) pois foi o único que não promoveu o aumento da fragmentação do DNA.

7) Em relação aos substituintes, em mitocôndrias isoladas, os efeitos mais significativos relacionam-se com a presença de átomos ou grupos que aumentam a hidrofobicidade. Em células ainda não foi possível estabelecer uma relação entre a estrutura e os efeitos observados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM-VIZI, V; CHINOPOULOS, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. **TRENDS in Pharmacol. Sci.**, v. 27, n. 12, p. 639-645, 2006.

ADRAIN, C.; MARTIN, S.J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. **TRENDS Biochem. Sci.**, v. 26, p. 390-397, 2001.

ALAM, J.J. Apoptosis: target for novel drugs. **TRENDS Biotechnol.**, v. 21, p. 479-483, 2003.

ANDRADE, A.R. **Relação estrutura-atividade de derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre o metabolismo energético mitocondrial.**, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ANTUNES-MADEIRA, M.C.; CARVALHO, A. P.; MADEIRA, V. M. C. Effects of insecticides on thermotropic lipid phase transitions. **Pestic. Biochem. Physiol.**, Orlando, v. 14, p. 161-169, 1980.

ANTUNES-MADEIRA, M.C.; ALMEIDA, L.M.; MADEIRA, V.M.C., DDT - membrane interactions studied with two fluorescent probes. **Pestic. Sci.**, v. 33, p. 347-357, 1991.

ANTUNES-MADEIRA, M.C.; VIDEIRA, R.A.; KLÜPPEL, M.L.; MADEIRA, V.M.C. Amiodarone effects on membrane organization evaluated by fluorescence polarization. **Int. J. Cardiol.**, Shannon, v. 48, p. 211-218, 1995.

ARORA, A.; BYREM, T.M.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, p. 102-109, 2000.

AVERY, S.V. Molecular target of oxidative stress. **Biochem. J.**, v. 434, p. 201-210, 2011.

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

BALASUBRAMANIYAN, V.; SHUKLA, R.; MURUGAIYAN, G.; BHONDE, R.R.; NALINI, N. Mouse recombinant leptin protects human hepatoma Hep G2 against apoptosis, TNF- $\alpha$  response and oxidative stress induced by the hepatotoxin-ethanol. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1770, p. 1136-1144, 2007.

BATANDIER, C; LEVERVE, X; FONTAINE, E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 17, p. 17197-17204, 2004.

BHATTACHARYYA, M.; NANDY, P. Effect of nicotinic acid on microviscosity in mixed liposomal system of lecithin and sphingomyelin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 275, p. 379-384, 1989.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany.**, v. 91, p. 179-194, 2003.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p 248-254, 1976.

BROOKES, P.S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J.L.; ANDERS, M.W.; SHEU, S.-S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 287, p. C817-833, 2004.

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

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

CADENA, S. M. S. C. **Contribuição ao conhecimento ao mecanismo de ação dos compostos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos.**, 1999. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

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

CADENAS, E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. **Mol. Asp. Med.**, v. 25, p. 17-26, 2004.

CARAFOLI, E. The fateful encounter of mitochondria with calcium: how did it happen? **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1797, p. 595-606, 2010.

CARDOSO, C.M.P; CUSTODIO, J.B.A; ALMEIDA, L.M; MORENO, A.J.M. Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. **Toxicol. appl. Pharmacol.**, Orlando, v. 176, p. 145-152, 2001.

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

CARDOSO, J.C; CADENA, S.M.S.C; ZAMPRONIO, A; ARRUDA, A.M.S; CARNIERI, E.G.S; ECHEVARRIA, A; CONSTANTIN, J; BRACHT, A; OLIVEIRA, M.B.O. Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on acute inflammatory response. **Drug Develop. Res.**, Hoboken, v.61, n. 4, p. 207-217, 2004.

CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. **In vitro methods in pharmaceutical research**. Itália, Academic Press, 1997, p.130-131.

CHEUNG, C.S.; CHUNG, K.K.; LIU, J.C.; LAU, C.; HON, P.; CHAN, J.Y.; FUNG, K.; AU, S.W. Leachianone A as a potential anti-cancer drug by induction of apoptosis in human hepatoma Hep G2 cells. **Cancer Letters.**, v. 253, p. 224-235, 2007.

CUSTODIO, J.B.A; MORENO, A.J.M; WALLACE, K.B. Tamoxifen inhibits induction of mitochondrial permeability transition by Ca<sup>2+</sup> and inorganic phosphate. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Orlando, v. 152, p. 10-17, 1998.

CUSTÓDIO, J.B.A.; DINIS, T.C.P.; ALMEIDA, L.M.; MADEIRA, V.M.C. Tamoxifen and hydroxytamoxifen as intramembraneous inhibitors of lipid peroxidation. Evidence for peroxy radical scavenging activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, p. 1989-1998, 1994.

CUSTÓDIO, J.B.A.; ALMEIDA, L.M.; MADEIRA, V.M.C. The anticancer drug tamoxifen induces changes in the physical properties of model and native membranes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1150, p. 123-129, 1993.

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

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M.A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 795-808, 1992.

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

DOUGLAS, R.S.; TARSHIS, A.D.; PLETCHER, C.H.; NOWELL, P.C.; MOORE, J.S. A simplified method for the coordinate examination of apoptosis and surface phenotype of murine lymphocytes. **J. Immunol. Meth.**, v. 188, p. 219-228, 1995.

ENANDER, K.; RYDSTRÖM, J. Energy-linked nitotinamide nucleotide transhydrogenase. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 14760-14766, 1982.

FILIPPOV, A.; MUNAVIROV, B.; SPARRMAN, T.; ISHMUHAMETOVA, V.; RUDAKOVA, M.; SHRIRAM, P.; TAVELIN, S. Interaction of a poly(acrylic acid) oligomer with dimyristoyl-phosphatidylcholine bilayers, **Langmuir**, v. 27, p. 3754-3761, 2011.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p.114-121, 1984.

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

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

GHOSH, A.K.; MUKHERJEE, J.; BASU, R.; CHATTERJEE, M.; NANDY, P. A fluorescence anisotropy study of stabilizing effect of tri- and tetra- nitrovasodilatory drugs on DPPC liposomal membrane. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1153, p. 20-22, 1993.

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

GUNTER, T.E.; PFEIFFER, D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.258, p. 755-786, 1990.

HAIL Jr, N. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. **Apoptosis**, Dordrecht, v. 10, p. 687 – 705, 2005.

GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.**, v. 258, n. 5, p. C755-C786, 1990.

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

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. 715S – 725S, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford University Press, New York, pp. 45-53, 2000.

HANLON, M. C.; SEYBERT, D. W. The pH Dependence of Lipid Peroxidation using Water-Soluble Azo Initiators. **Free Rad. Biol. Med.**, v.23, n. 5, p. 712–719, 1997.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**, Wiley-Liss, p. 319-368, 2004.

HERNÁNDEZ-ESQUIVEL, L.; PAVÓN, N.; ZAZUETA, C.; GARCÍA, N.; CORREA, F.; CHÁVEZ, D. Protective action of tamoxifen on carboxyatratyloside-induced mitochondrial permeability transition. **Life Sci.**, v. 88, p. 681-687, 2011.

HOEK, J.B.; RYDSTRÖM, J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. **Biochem. J.**, v. 254, p. 1-10, 1988.

HOWE, B.P. Considerations in platinum and gold drug design and the synthesis of chloro(2,3-diphenyl-1,3,4-thiadiazolium-5-thiolato-Sexo)gold(I): the first gold mesoionic complex of its kind. **Metal Based Drugs**, London, v. 4, n. 5, p. 273-277, 1997.

HU, Y.; YANG, Y.; YOU, Q.; LIU, W.; GU, H.; ZHAO, L.; ZHANG, K.; WANG, W.; WANG, X.; GUO, Q. Oroxylin A induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2 was involved in its antitumor activity. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, Orlando v. 351, p. 521-527, 2006.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

JORDAN, V.C.; Long-term adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 15, p. 125-136, 1990.

JUNQUEIRA, V.B.C.; BARROS, S.B.M.; CHAN, S.S.; RODRIGUES, L.; GIAVAROTTI, L.; ABUD, R.L.; DEUCHER, G.P. Aging and oxidative stress. **Mol. Asp. Med.**, v. 25, p. 5-16, 2004.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. **Nat. Rev.**, v. 10, p. 221-237, 2011.

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

KOWALTOWSKI, A.J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 47, p. 333-343, 2009.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or organic phosphate in the presence of  $Ca^{2+}$  is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett.**, v. 378, p. 150-152, 1996.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, v. 495, p. 12-15, 2001.

KNAPOWSKI, J.; WIECZOROWSKA-TOBIS, K.; WITOWSKI, J. Pathophysiology of ageing. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 53, p. 135-146, 2002.

KROEMER, G; DALLAPORTA, B; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v. 60, p. 619-642, 1998.

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.**, v. 6, p. 513-519, 2000.

LANDES, T.; MARTINOU, J.C. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1813, p. 540-545, 2011.

LECOEUR, H.; Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. **Exp. Cell Res.**, v. 277, p. 1-14, 2002.

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

LENAZ, G. The role of lipids in the structure and function of membranes **Subcell. Biochem.**, v. 6, p. 233, 1979.

LENTZ, B.R.; BARENHOLZ, Y.; THOMPSON, T.E. Fluorescence depolarization studies of phase transition and fluidity in phospholipid bilayers. 1-Single component phosphatidylcholine liposomes. **Biochemistry**, Washington DC, v. 15, n. 20, p. 4521-4528, 1976.

LI, Z.; LI, J.; MO, B.; HU, C; LIU, H.; QI, H.; WANG, X.; XU, J. Genistein induces G2/M cell cycle arrest via stable activation of ERK1/2 pathway in MDA-MB-231 breast cells. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 24, p. 401-409, 2008.

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

LITMAN, B.J.; BARENHOLZ, Y. Fluorescent probe diphenylhexatriene. **Methods. Enzymol.**, New York, v. 81, p. 678-685, 1982.

LODATO, F.; MAZZELA, G.; FESTI, D.; AZZAROLI, F.; COLECCHIA, A.; RODA, E. Hepatocellular carcinoma prevention: A worldwide emergence between the opulence of developed countries and the economic constraints of developing nations. **World J. of Gastroenterol.**, v. 12, p. 7239-7249, 2006.

LOO, D.T; RILLEMA, J.R. Measurement of cell death **Methods in Cell Biol.**, San Diego, v. 57, p. 251-263, 1998.

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.

LÚCIO, M; FERREIRA, H; LIMA, J.L.F.C; REIS, S. Use of liposomes as membrane models to evaluate the contribution of drug-membrane interactions to antioxidante properties of etodolac. **Redox Report**, v. 13, n. 5, p. 225-236, 2008.

MA, Y.; WANG, J.; LIU, L.; ZHU, H.; CHEN, X.; PAN, S.; SUN, X.; JIANG, H. Genistein potentiates the effect of arsenic trioxide against human hepatocellular carcinoma: role of Akt and nuclear factor- $\kappa$ B. **Cancer Lett.**, v. 301, p. 75-84, 2011.

MAYEVSKY, A.; ROGATSKY, G.G Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. **Am J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 292, p. 615-640, 2007.

MATSUKAWA, Y.; MARUI, N.; SAKAI, T.; SATOMI, Y.; YOSHIDA, M.; MATSUMOTO, K.; NISHINO, H.; AOIKE, A. Genistein arrest cell cycle progression at G2-M. **Cancer Res.**, v. 53, p. 1328-1331, 1993.

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

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

MIGNOTTE, B; VAYSSICRE, J-L. Mitochondria and apoptosis. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 252, p. 1-15, 1998.

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

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

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

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

NAVARRO, A. Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. **Mol. Asp. Med.**, v. 25, p. 37-48, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5° ed., Porto Alegre: Artmed, 2011.

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

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

NIKI, E.; SAITO, T.; KAWAKAMI, A.; KAMIYA, Y. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and C. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 4177-4182, 1984.

NIKI, E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects, **Free Rad. Bio. Med.**, v. 47, p. 469-484, 2009.

NISHIMIKI, M.; RAO, N.A.; YAGI, K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 46, p. 849-853, 1972.

OLDFIELD, E; CHAPMAN, D. Dynamics of lipids in membranes: heterogeneity and the role of cholesterol, **FEBS Let.**, v. 23, p. 285-297, 1972.

OLLIS, W.D.; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic compounds. **Adv. Heterocycl. Chem.**, San Diego, v.19, n. 1, p. 1-121, 1976 .

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

PACKER, L.; UTSUMI, K.; MUSTAFA, M.G. Oscillatory states of mitochondria. I. Electron and energy transfer pathways. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 117, p. 381-393, 1966.

PARONE, P.A.; JAMES, D.; MARTINOU, J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochim.**, v. 84, p. 105-111, 2002.

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

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.

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

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

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

RAND, R.P.; SENGUPTA, S. Cardiolipin forms hexagonal structures with divalent cations. **Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes**, v. 255, p. 484-492, 1972.

RAYCHAUDHURI, S. How can we kill cancer cells: insights from the computational models of apoptosis. **World J. Clin. Oncol.**, v. 10, p. 24-28, 2010.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**, in press, 2011.

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

REGULA, K.M.; ENS, K.; KIRSHENBAUM, L.A. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 35, p. 559-567, 2003.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, p. 803-810, 1998.

ROMÃO,S.; CADENA, S.M.S.C.; AMORIM, J.C.; MENDEZ-SANCHEZ, S.C.; ECHEVARRIA, A; SILVA, E.F.; ROCHA, M.E.M.; NOLETO, G.R.; CARNIERI, E.G.S.; MARTINEZ, G.R.; OLIVEIRA, M.B.M. Metabolism of the mesoionic compound (MI-D) by mouse liver microsomes, detection of its metabolite *in vivo*, and acute toxicity in mice. **J. Biochem, Mol. Toxicol.**, v. 23, p. 394-405, 2009.

SAMALI, A.; NORDGREN, H.; ZHIVOTOVSKY, B.; PETERSON, E.; ORRENIUS, S. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 255, p. 6-11, 1999.

SANTOS, F; TEIXEIRA, L; LÚCIO, M; FERREIRA, H; GASPAR, D; LIMA, J.L.F.C; REIS, S. Interactions of sulindac and its metabolites with phospholipid membranes: An explanation for the peroxidation protective effect of the bioactive metabolite. **Free Rad. Res.**, v. 42, n. 7, p. 639-650, 2008.

SASSA, S.; SUGITA, O.; GALBRAITH, R.A.; KAPPAS, A. Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 143, p. 52-57, 1987.

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

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

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

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

SEPPALA, A. J.; WIKSTROM, M. K. F.; SARIS, N. E. L. Damping of mitochondrial volume oscillations by propranolol and related compounds. In: CHANCE, B.; PYE, E. K.; GHOSO, A. K.; HESS, B. **Biological and Biochemical oscillators**. New York: Academic Press, p. 115-124, 1973.

SHAO, Z-M.; WU, J.; SHEN, Z-Z.; BARSKY, S.H. Genistein exerts multiple suppressive effects on human carcinoma cells. **Cancer Res.**, v. 58, p. 4851-4857, 1998b.

SHAO, Z-M.; ALPAUGH, M.L.; FONTANA, J.A.; BARSKY, S.H. Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21<sup>WAF/CIP1</sup> induction, G<sub>2</sub>/M arrest, and apoptosis. **J. Cell. Biochem.**, v. 69, p. 44-54, 1998a.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Lett.** Amsterdam, v. 103, p. 287-290, 1979.

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

TOPLACK, H.; BATCHIULIS, V.; HERMETTER, A.; HUNZINKER, T.; HONEGGER, U.E.; WIESMANN, U.N. Effects of culture and incubation conditions on membrane fluidity in monolayer of culture cells measured as fluorescence anisotropy using trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1028, p. 67-72, 1990.

TROTTER, P.J.; STORCH, J. 3-[p-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl] phenylpropionic acid (PA-DPH): characterization as a fluorescent membrane probe and binding to fatty acid binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 982, p.131-139, 1989.

TUQUET, C; DUPONT, J; MESNEAU, A; ROUSSAUX, J. Effects of tamoxifen on electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. **Cell Biol. Toxicol.**, Dordrecht, v. 16, p. 207-219, 2000.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol.**, Oxon, v. 552, p. 335-344, 2003.

ULIVIERI, C. Cell death: insights into the ultrastructure of mitochondria. **Tissue and Cell**, v. 42, p. 339-347, 2010.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, **Chem. Biol. Interac.**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VAN HOLDE, K.E. Absorption and emission of radiation. In: HAGER, L.; WOLD, F. **Physical Biochemistry**. New Jersey: Prentice-Hall, 1975, p. 171-175.

VERCESI, A.E.  $Ca^{2+}$  transport and oxidative damage of mitochondria. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 26, p. 441-457, 1993.

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.

WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hep G2 with regard to their biotransformation properties. **Drug Metabol. Disposit.**, v. 31, p. 1035-1042, 2003.

WINTERBOURN, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, **Nat. Chem. Biol.**, v. 4, p. 278-286, 2008.

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

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

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



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEA)



Nº 355

## CERTIFICADO

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

## CERTIFICATION

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

PROCESSO: 23075.065046/2009-42

APROVADO:  
07/04/2009 – R.O. 03/2009

TÍTULO: Derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos: disfunção mitocondrial e toxicidade em células Hep G2

AUTORES: Amanda do Rocio Andrade, Sivia Maria S. Correia Cadena, Guilhermina Rodrigues Noletto

DEPARTAMENTO: Bioquímica

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi  
Coordenadora do CEEA

TERMO DE APROVAÇÃO

AMANDA DO ROCIO ANDRADE PIRES

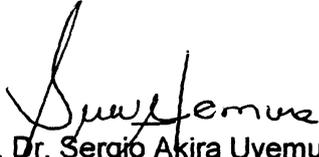
DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS: DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E TOXICIDADE EM CÉLULAS HEPG2

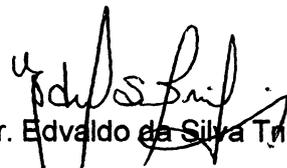
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutos em Ciência – Bioquímica, no programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

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

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Eliane Merlin Rocha  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Emy Luiza Ishii Iwamoto  
Departamento de Bioquímica – UEM

  
Prof. Dr. Sergio Akira Uyemura  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e Bromatológicas – USP

  
Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFPR

Curitiba, 27 de julho de 2011.