

ESTUDO DE ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS POTENCIALMENTE RELACIONADAS À MORTE CELULAR INDUZIDA POR DERIVADOS CALCÓGENOQUINOLÍNICOS

Rayssa de Mello Lopes¹; Claudia Alves da Costa²; Letícia Silva Ferraz³; Isadora Maria de Oliveira⁴; Hélio Alexandre Stefani⁵; Tiago Rodrigues⁶

1. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: raymello98@gmail.com
2. Doutoranda em Biotecnologia; e-mail: ca.liny@hotmail.com
3. Doutoranda em Biotecnologia; e-mail: letisbloom@hotmail.com
4. Doutoranda da Universidade de São Paulo; e-mail: isadoraoliveira@usp.br
5. Professor da Universidade de São Paulo; e-mail: hstefani@usp.br
6. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: trodrigues.ufabc@gmail.com

Área de Conhecimento: **Metabolismo e Bioenergética**

Palavras chaves: Mitocôndria; calcogênio; quinolina; estrutura-atividade; morte celular.

INTRODUÇÃO

Organocalcogênios derivados de selênio são compostos extensivamente estudados e reconhecidos por suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras (NOGUEIRA & ROCHA, 2011). Embora esses efeitos sugiram um potencial terapêutico contra doenças neurodegenerativas, estudos recentes têm mostrado que organocalcogênios podem apresentar toxicidade contra células tumorais *in vitro*, exibindo também potencial antitumoral (JUNG *et al.*, 2001; SHEN *et al.*, 2001). Os mecanismos responsáveis por tal ação antitumoral *in vitro*, no entanto, não são totalmente compreendidos, principalmente no que diz respeito ao papel da mitocôndria no disparo ou regulação da morte celular. Além disso, sabe-se que a quinolina é um composto farmacologicamente ativo, com atividade citotóxica já descrita em células antitumorais (KUMAR *et al.*, 2009; AFZAL *et al.*, 2015), e que sua combinação com os organocalcogêneos pode constituir-se em proposta interessante para a síntese de novas drogas. Como as mitocôndrias estão envolvidas no disparo e regulação da morte celular (TAIT & GREEN, 2019) o estudo dos efeitos de drogas sobre parâmetros mitocondriais em mitocôndrias isoladas constitui-se em um modelo interessante para se avançar na compreensão dos mecanismos de citotoxicidade em células tumorais.

OBJETIVO

Avaliar os efeitos de uma série de derivados calcogenoquinolinínicos estruturalmente relacionados sobre parâmetros mitocondriais potencialmente associados à morte celular em mitocôndrias isoladas.

METODOLOGIA

Uma série de vinte e cinco derivados calcogenoquinolinínicos utilizados nesse trabalho foram sintetizados, purificados e cedidos pelo Prof. Dr. Hélio Alexandre Stefani (FCF-USP). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de Mogi das Cruzes, sob protocolo nº 004/2018. Para a obtenção e isolamento das mitocôndrias ratos Wistar machos (180 g) foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado foi alcançado por incisão na cavidade abdominal. Após a remoção do órgão, as mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial e a determinação da proteína mitocondrial foi realizada pelo método de Biureto (CAIN & SKILLETER, 1987). A respiração mitocondrial foi estimada polarograficamente usando eletrodo do tipo Clark (Hansatech) pelo

consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas (1 mg/mL), incubadas em meio de respiração contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, EGTA 0,5 mmol/L e K_2HPO_4 10 mmol/L, pH 7,4, a 30 °C e energizadas com substratos de sítio I (malato e glutamato, 10 mmol/L). O potencial de membrana ($\Delta\Psi$) foi avaliado em espectrofluorímetro Hitachi F-7000 (Tóquio, Japão) por meio das alterações da fluorescência da rodamina 1231,0 μ mol/L, com comprimentos de onda de 505 e 535 nm excitação/emissão. As mitocôndrias (1 mg/mL) foram energizadas com substrato de sítio II (succinato de potássio 5 mmol/L) e incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L e cloreto de cálcio 10 μ mol/L, a 30°C (volume final 2,0 mL). O efluxo de cálcio e a geração de espécies reativas de oxigênio foram avaliados nas mesmas condições experimentais do ensaio de potencial de membrana, Calcium Green 5N 0,1 mmol/L (505/531 nm, excitação/emissão) e DCFDA (diacetato de diclorofluoresceína) 1 μ mol/L (495/527 nm, excitação/emissão), respectivamente. Para as análises gráficas foi utilizado o software Graph Pad Prism 7.04 (Graph Pad Software, Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação do impacto dos derivados calcogenoquinolínicos sobre os aspectos energéticos mitocondriais, seus efeitos foram avaliados sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas em estado basal (estado 4). Nas concentrações de 40 e 80 μ M, os compostos promoveram estímulo concentração-dependente da velocidade de consumo de oxigênio no estado 4 com diferentes potências, sugerindo desacoplamento (dados não mostrados). Em seguida, para estimar a capacidade dos compostos de induzir a permeabilização mitocondrial, um evento intrinsecamente ligado à morte celular, selecionamos os compostos 21 e 22 que foram os que apresentaram maior citotoxicidade em células tumorais (dados não mostrados) e avaliamos processos mitocondriais que ocorrem durante a permeabilização mitocondrial, a saber, dissipação do potencial de membrana e efluxo de cálcio mitocondrial. Uma das formas de permeabilização mitocondrial é a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), descrita como um processo regulado, dependente de cálcio, associado à oxidação de grupos tiólicos de proteínas mitocondriais e diretamente relacionado à morte celular (HUNTER & HAWORTH, 1979; ZORATTI & SZABÒ, 2005; CRUZ *et al.*, 2010).

Dessa forma, como pode ser observado na Fig. 1, tanto o composto 21 (A) quanto o 22 (B) foram capazes de dissipar o potencial de membrana mitocondrial, sendo o efeito máximo (similar ao desacoplador CCCP) obtido com 25 μ M.

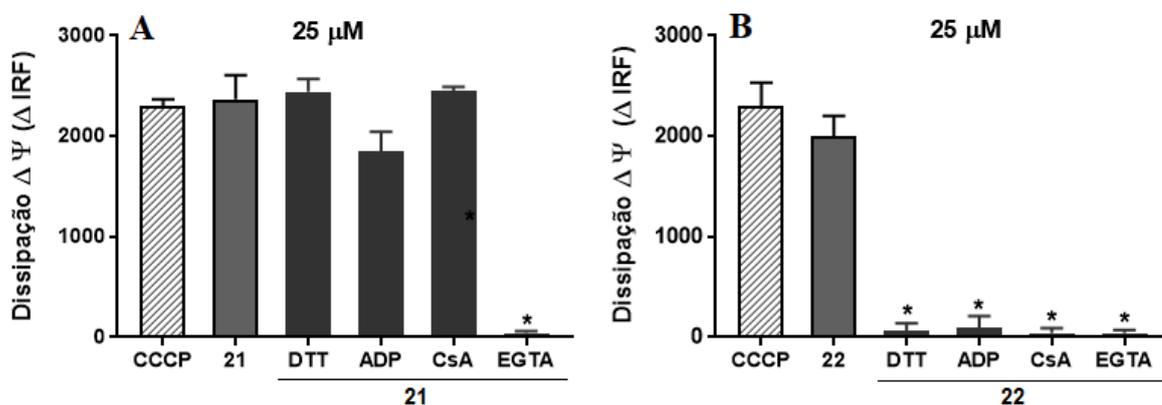


Fig. 1. Efeito dos moduladores sobre a dissipação do potencial de membrana mitocondrial induzida pelos calcogenoquinolínicos. A dissipação máxima do potencial de membrana foi determinada utilizando CCCP (1 μ mol/L) como controle positivo e os moduladores da TPM testados sob efeito dos compostos 21 (A) e 22 (B) foram: DTT (ditiotreitól) e ADP (difosfato de adenosina) na concentração de 1 mmol/L, CsA (ciclosporina A) 1 μ mol/L e EGTA (ácido etilenoglicoltetracético) 0,5 mmol/L. Os resultados apresentados estão apresentados como média \pm erro padrão da média.

Nestas mesmas condições experimentais, foram avaliados os efeitos de moduladores do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP). Somente o EGTA, um quelante de cálcio, foi capaz de inibir a permeabilização mitocondrial induzida por ambos os compostos, mostrando que esse efeito é dependente de cálcio. No entanto, os demais moduladores do PTP ADP (se liga ao NAT), DTT (reduzidor tiólico) e CsA (se liga à ciclofilina D), foram capazes de inibir somente a dissipação do $\Delta\Psi$ induzida pelo composto 22, mas não pelo 21, sugerindo que o composto 22 induz a TPM e o 21 induz uma permeabilização mitocondrial inespecífica.

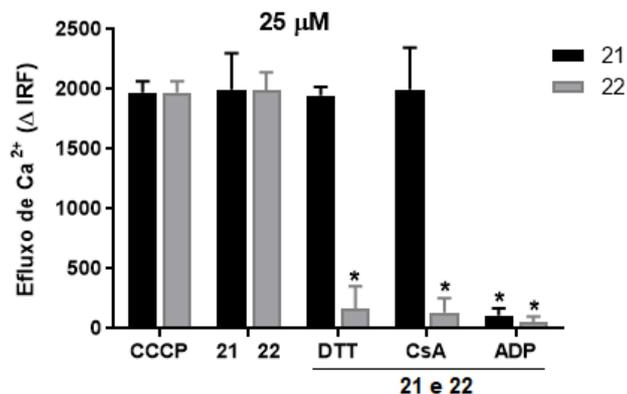


Fig. 2. Efluxo de cálcio mitocondrial estimulado pelos calcogenoquinolínicos sob efeito dos moduladores. Como controle positivo foi utilizado CCCP (1 $\mu\text{mol/L}$) e os moduladores da TPM foram testados sob ação dos compostos 21 e 22, respectivamente: DTT e ADP em 1 mmol/L , CsA em 1 $\mu\text{mol/L}$ e EGTA em 0,5 mmol/L . Os resultados apresentados estão apresentados como média \pm erro padrão da média.

Para estimar se uma possível indução de estresse oxidativo pelos compostos poderia ser responsável pela permeabilização mitocondrial, avaliamos cineticamente a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizando o fluoróforo DCFDA, nas mesmas condições experimentais usadas para o experimento da Fig. 1. Como pode ser observado na Fig. 3, comparativamente ao *t*-butilhidroperóxido (*t*-BOOH), usado como controle positivo, a produção de EROs promovida pelos compostos 21 e 22 foi relativamente baixa. Esse aspecto terá que ser posteriormente melhor investigado.

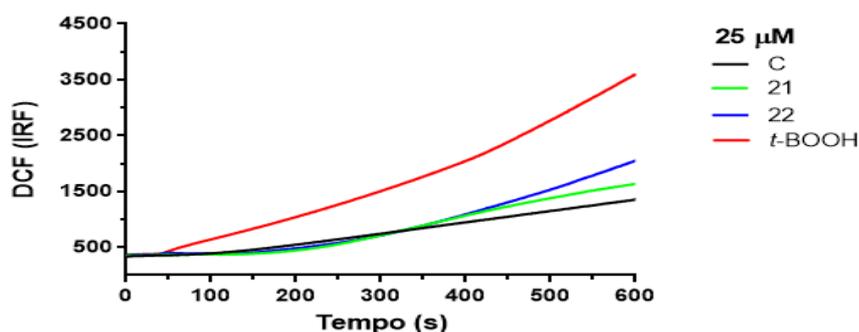


Fig. 3. Avaliação da geração de EROs pelos calcogenoquinolínicos. A determinação do DCF foi realizada pela mudança da fluorescência e o controle indica a ausência da droga. Em 50 segundos os compostos foram adicionados e como controle positivo o *t*-BOOH (*t*-butilhidroperóxido) 0,6 mmol/L foi utilizado.

CONCLUSÃO

Os derivados quinolínicos 21 e 22 estudados afetam aspectos energéticos mitocondriais e promovem permeabilização mitocondrial de forma dependente de cálcio. Além disso, o composto 22 induz o processo de transição de permeabilidade mitocondrial, inibido por CsA, DTT e ADP, enquanto que o 21 promove uma permeabilização inespecífica. Tais alterações mitocondriais podem contribuir para o entendimento dos mecanismos de citotoxicidade desses compostos em células tumorais.

REFERÊNCIAS

AFZAL, O.; KUMAR, S.; HAIDER, M. R.; ALI, M. R.; KUMAR, R.; JAGGI, M.; BAWA, S. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 97, 871–910, 2015.

CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. **Biochemical Toxicology**, Oxford, IRL Press, p. 217-254, 1987.

CRUZ, T.S.; FARIA, P.A.; SANTANA, D.P.; FERREIRA, J.C.; OLIVEIRA, V.; NASCIMENTO, O.R.; CERCHIARO, G.; CURTI, C.; NANTES, I.L.; RODRIGUES, T. On the mechanisms of phenothiazine-induced mitochondrial permeability transition: Thiol oxidation, strict Ca²⁺ dependence, and cyt c release. **Biochem.Pharm.**, v. 80, p. 1284-1295, 2010.

JUNG, U.; ZHENG, X.; YOON, S.; CHUNG, A. Se-methylselenocysteine induces apoptosis mediated by reactive oxygen species in HL-60 cells. **Free Radic. Biol.Med.**, v. 31, p. 479–489, 2001.

HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. The protective mechanisms. **Biochem.Biophys.**, v. 195, p.453 – 459, 1979.

KUMAR, S.; BAWA, S.; GUPTA, H. Biological Activities of Quinoline Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 9(14), 1648–1654, 2009.

NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 1313-1359. 2011.

SHEN, H.M.; YANG, C.F.; DING, W.X.; LIU, J.; ONG, C.N. Superoxide radical initiated apoptotic signalling pathway in selenite-treated HepG2 cells: mitochondria serve as the main target. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, p. 9–21, 2001.

TAIT, S.W.G.; GREEN, D.R. Mitochondrial regulation of cell death. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2013;5:a008706.

ZORATTI, M.; SZABÓ, I.; DE MARCHI, U. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? **Biochim Biophys Acta**. 2005, Jan 7;1706(1-2):40-52.