

ESTUDO DOS EFEITOS DO PLUMBAGIN SOBRE A BIOENERGÉTICA E O ESTADO REDOX MITOCONDRIAL

Mayara Kaori Kisaki¹; Deyse Cardoso da Silva;² Tiago Rodrigues³

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: mkisaki@hotmail.com¹

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: deyse.cardoso@hotmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: trodrigues@umc.br³

Área do Conhecimento: Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: Plumbagin; Mitocôndria; Estado redox mitocondrial

INTRODUÇÃO

Dionaea muscipula Ellis é uma das plantas carnívoras mais conhecidas no mundo e pode sobreviver em solos nutricionalmente pobres, pois captam e digerem pequenos insetos para serem utilizados como fontes de nitrogênio. Foi relatado em estudo anterior, que essa planta é capaz de produzir e acumular uma grande quantidade de uma substância citotóxica denominada plumbagin.

Plumbagin (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) é uma quinona presente em grandes quantidades em plantas das famílias Droseraceae e Plumbaginaceae, sendo que esta substância pode ser encontrada tanto nas raízes quanto nas folhas e cascas das plantas dessas espécies. Diversas plantas pertencentes a essas famílias são cultivadas em Taiwan, sendo bastante utilizadas na medicina tradicional chinesa. Vários efeitos biológicos do plumbagin têm sido investigados para avaliação do seu potencial farmacológico, sendo que algumas propriedades têm sido apontadas, tais como antitumoral, leishmanicida, antibacteriano, antifúngico, antialérgico e contra infecção por *H. pylori*. Diversos estudos recentes têm demonstrado que o plumbagin é capaz de induzir apoptose em células tumorais, sendo que esta citotoxicidade apresentada por este composto parece estar relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros processos mitocondriais.

Embora o plumbagin seja largamente distribuído na natureza e utilizado para vários propósitos na medicina popular, existem poucos estudos toxicológicos sobre esse composto. Dessa forma, o estudo de substâncias capazes de alterar a bioenergética e o estado redox mitocondrial é extremamente importante para a avaliação do seu potencial farmacológico e possível desenvolvimento de um produto com aplicação na saúde humana ou animal.

OBJETIVOS

Visto que os efeitos biológicos do plumbagin estão associados a alterações do estado redox celular e seu efeito pró-apoptótico conta com envolvimento mitocondrial, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos do plumbagin (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) sobre a bioenergética e o estado redox de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. Tal estudo auxiliará na elucidação dos mecanismos citotóxicos exibidos pelo plumbagin.

METODOLOGIA

O plumbagin foi adquirido comercialmente de Sigma Chem Co. (St. Louis, MO, USA) e a partir deste foram preparadas diluições desta substância. As mitocôndrias isoladas de

fígado de rato foram obtidas por centrifugação diferencial e a quantificação de proteínas foi feita pelo método do Biureto (CAIN & SKILLETER, 1987). O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas foi analisado polarograficamente, a 30 °C, em um oxígrafo Hansatech (Hansatech Instr., Norfolk, Inglaterra) equipado com um eletrodo tipo Clark (Gilson Medical Electronics, USA), e os parâmetros respiratórios foram determinados de acordo com CHANCE & WILLIANS (1956). O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) foi avaliado espectrofluorimetricamente utilizando a Rodamina 123 nos comprimentos de onda de 505 e 535nm, excitação e emissão respectivamente (IMBERTI *et al.*, 1993). A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada espectrofluorimetricamente utilizando 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) nos comprimentos de onda de 503nm de excitação e 529nm de emissão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para testarmos o efeito de plumbagin sobre a fosforilação oxidativa, foi determinado o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de fígado de rato no estado basal (estado 4), energizadas com substratos respiratórios de sítio I (malato + glutamato) e II (succinato). Como resultado, plumbagin foi capaz de acelerar a velocidade de consumo de oxigênio do estado 4 (basal) de maneira concentração-dependente, tanto com substratos respiratórios de sítio I quanto de sítio II. Estes resultados sugeriam que o aumento da velocidade do consumo de oxigênio induzido por plumbagin era decorrente do desacoplamento da fosforilação oxidativa, onde tal efeito pode ocorrer por mecanismo protonofórico, semelhante à desacopladores clássicos como o 2,4-dinitrofenol ou carbonilcianeto-3-clorofenilhidrazona (CCCP). Para confirmarmos essa hipótese, foi avaliado o efeito desta substância sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) utilizando a rodamina 123, um marcador fluorescente específico para mitocôndrias, que é captado eletroforicamente, ou seja, assim que os elétrons são doados de substratos oxidáveis para a cadeia respiratória e o gradiente eletroquímico é formado, ocorre, simultaneamente, a captação da rodamina 123, diminuindo, então, sua emissão de fluorescência. Desta forma, a diminuição da fluorescência da rodamina 123 indica a formação do gradiente eletroquímico e o aumento, sua dissipação. Entretanto, o plumbagin não promoveu dissipação do $\Delta\Psi$ e não exerceu nenhum efeito em relação ao controle; desta forma sugerimos que seu efeito sobre o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias não seja decorrente de desacoplamento da fosforilação oxidativa.

De acordo com estes resultados obtidos, ou seja, presença de efeito estimulatório sobre o estado basal da respiração mitocondrial na ausência de dissipação do $\Delta\Psi$, redirecionamos este estudo para avaliar a atividade de plumbagin sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), para esclarecermos se o aumento do consumo de oxigênio promovido por esta droga está associado à geração de radicais livres. Dessa forma, realizamos este ensaio sob a mesma condição dos experimentos de respiração mitocondrial, utilizando como indicador da geração de EROs uma sonda conhecida por DCFDA. DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) é uma molécula que atravessa facilmente as membranas biológicas, sendo hidrolisada por esterases liberando o composto não fluorescente DCFH. Este em presença de EROs é rapidamente oxidado e transformando-se então em DCF que apresenta um alto rendimento quântico de fluorescência quando excitado em 503 nm. Assim, neste ensaio, o aumento da fluorescência observada é proporcional à produção de EROs pelas mitocôndrias. Como pode ser observado na **Figura 1**, o plumbagin induziu um aumento da geração de EROs de forma concentração dependente, porém este efeito não está correlacionado com a respiração mitocondrial. Um estudo recente, desenvolvido por Doughan & Dikalov

(2007), utilizando-se também um tipo de quinona, demonstra resultados semelhantes, sugerindo um possível efeito pró-oxidante apresentado por essas quinonas.

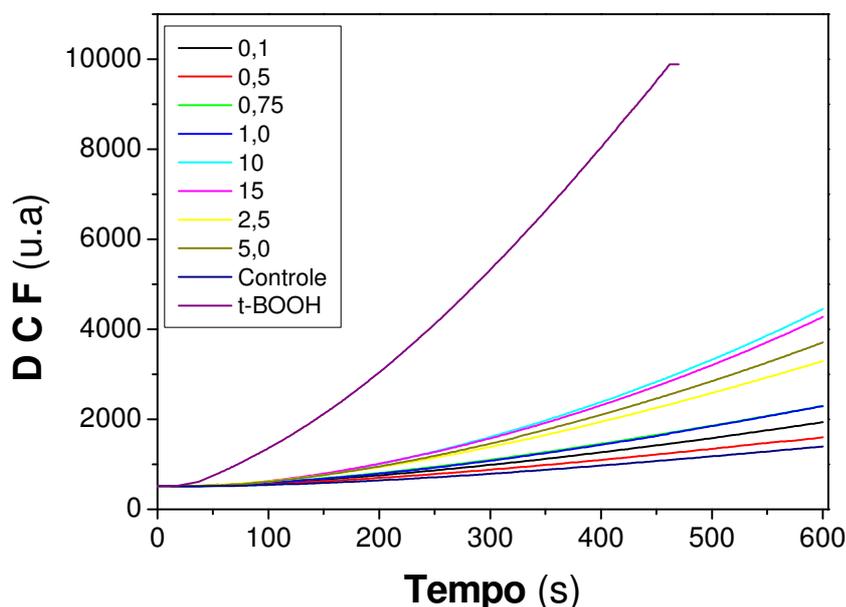


Fig. 1 Geração de EROs mitocondrial induzida por Plumbagin. As mitocôndrias (1mg/mL) foram incubadas em meio de respiração contendo 125mM sacarose, 65mM KCl, 10mM HEPES-KOH, 0,5mM EGTA, 10mM K_2HPO_4 , pH 7.4 a 30°C e a geração foi estimada espectrofluorimetricamente utilizando o fluoróforo 2',7' - diclorofluoresceína diacetato (DCFDA). Traçado representativo do aumento da fluorescência, decorrente da geração de EROs induzida por plumbagin em diferentes concentrações expressas em $\mu M \times L^{-1}$. Controle: mitocôndrias na ausência de plumbagin; t-BOOH: 0,6mmol $\times L^{-1}$ de t-BOOH (indutor de estresse oxidativo).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados concluiu-se que plumbagin promove o aumento do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato, sendo que esse efeito não é acompanhado pela dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). O Plumbagin induziu a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), dessa forma em função destes resultados, podemos apontar um melhor direcionamento de nossos estudos, para futuramente esclarecer se os resultados apresentados possuem relação com a atividade citotóxica desta substância em células tumorais, como já demonstrado na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds.), *Biochemical Toxicology*, Oxford, IRL Press, p.217-254, 1987.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in enzymology and related subjects biochemistry*, v. 17, p. 65 – 134, 1956.

DOUGHAN, A.K.; DIKALOV, S.I. Mitochondrial redox cycling of mitoquinone leads to superoxide production and cellular apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 9, p. 1825 – 1836, 2007.

IMBERTI, R.; NIEMINEN, A-L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Baltimore, v. 265, p. 392-400, 1993.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, Campinas, v. 26, n. 3/4, p. 463-471, 1999.