

EFEITOS DE ORGANOCALCOGÊNIOS EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE CÉREBRO DE RATO: INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS MECANISMOS MITOCONDRIAIS ASSOCIADOS À NEUROPROTEÇÃO

Rebeca Lobato Alves¹; Ana Elisa Diogo Marçal Padilha¹; Karoline Kristina Kemmerich¹; Leticia Silva Ferraz²; Rodrigo Luiz de Oliveira Rodrigues Cunha²; Tiago Rodrigues²

Graduanda do Curso de Biomedicina/UMC; e-mail: rl.alves@hotmail.com¹

Graduanda do Curso de Biomedicina/UMC; e-mail: kristinakemmerich@hotmail.com¹

Mestranda do Programa de Biotecnologia/UMC; e-mail: anadmpadilha@hotmail.com¹

Mestranda do Programa de Biosistemas/UFABC; e-mail: anadmpadilha@hotmail.com¹

Professor da UFABC; e-mail: tiago.rodrigues@ufabc.edu.br²

Professor da UFABC; e-mail: rodrigo.cunha@ufabc.edu.br²

Área do Conhecimento: Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chaves: Organocalcogênios; Mitocôndria; Citotoxicidade

INTRODUÇÃO

Compostos orgânicos funcionalizados com calcogênios, especialmente aqueles com selênio em sua composição, vêm recebendo crescente atenção voltada para o reconhecimento e entendimento, em nível molecular, de suas diversificadas atividades biológica. Particularmente o difenildisseleneto (DPDS) é um dos compostos mais estudados dessa classe e apresentou efeito protetor sobre a peroxidação lipídica induzida por ácido quinolínico, que superestimula o sistema glutamatérgico e causa neurotoxicidade (MEOTTI et al., 2004; POSSER et al., 2008). Além disso, o DPDS não afetou a viabilidade celular de fatias de hipocampo de rato, pelo contrário, aumentou a viabilidade dos mesmos na presença de peróxido como agente estressor (POSSER et al., 2008). Esses estudos sugerem que o DPDS possui efeito neuroprotetor com potencial aplicação em doenças neurodegenerativas. O DPDS também mostrou-se capaz de diminuir disfunções mitocondriais, promovendo hepatoproteção (CARVALHO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

OBJETIVOS

Uma vez que os efeitos biológicos do difenil disseleneto (DPDS) estão associados a citoproteção com preservação da função mitocondrial, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do DPDS sobre a transição de permeabilidade mitocondrial em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato como modelo e correlacionar esse efeito com possível citoproteção relatada para este composto.

METODOLOGIA

O difenildisseleneto (DPDS) foi cedido pelo Prof. Dr. Rodrigo L. O. R. Cunha (UFABC) e solução estoque de DPDS foi preparada em DMSO (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 99\%$). Para os experimentos a concentração máxima de DMSO usada não apresentou efeito mensurável sobre os parâmetros analisados. 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 inchamento osmótico mitocondrial foi avaliado pela diminuição da absorbância relativa em 540 nm em um

espectrofotômetro de microplacas Synergy H4 (Biotek, USA), na presença de CaCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$. As células HepG2 (hepatocarcinoma) e Neuro-2a (neuroblastoma) foram cultivadas em meio DMEM *high glucose* (Sigma-Aldrich, USA) suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) inativado por calor (Gibco, *South America origin*), antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$) (Gibco), pH 7.2. Para os ensaios de viabilidade, 20 μL da suspensão de células foi adicionada a igual volume da solução de Azul de Tripán 0.016% e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer, sendo consideradas inviáveis as células que incorporaram o corante, e viáveis as que excluíram o Azul de Tripán. O ensaio de citometria de fluxo para determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizado em um citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, EUA) e os dados coletados foram tratados no programa FlowJo. Para cada amostra foram analisados 10.000 eventos. As células foram marcadas com iodeto de 3,3'-dihexailoxacarbocianina (DiOC_6) (Invitrogen, USA). Para as análises gráficas e estatísticas foram usados os programas Microcal Origin 9.1 (Microcal™ Software, Inc.) e Prisma 6.0 (GraphPad Software, Inc.). Os traçados são representativos e os dados quantitativos são provenientes de no mínimo 3 experimentos independentes ($n \geq 3$), sendo apresentados como média \pm epm (erro padrão da média). Quando pertinente, a análise da significância estatística dos dados experimentais foi avaliada por de análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey, considerando $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DPDS foi adicionado à suspensão de mitocôndrias isoladas de fígado e de cérebro de rato, energizadas com succinato de potássio, um substrato de sítio II da cadeia respiratória mitocondrial, em concentrações crescente (1 – 150 $\mu\text{mol/L}$) a fim de se verificar o efeito deste organocalcogênio sobre a permeabilidade mitocondrial. Como pode ser observado na Fig. 1, o DPDS promoveu um inchamento osmótico mitocondrial de forma concentração dependente, tanto em mitocôndrias de fígado (linha cinza) quanto em mitocôndrias de cérebro (linha preta). Este efeito foi maior em mitocôndrias de fígado em comparação com as de cérebro.

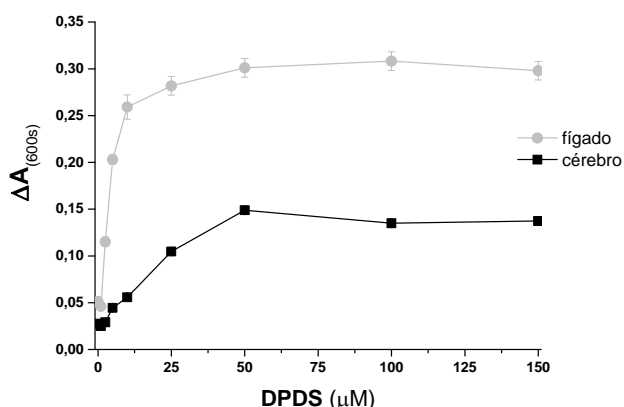


Fig. 1. Indução de inchamento osmótico mitocondrial por difenil disseleneto (DPDS) em mitocôndrias isoladas de fígado e cérebro de rato. A variação da absorbância relativa entre DPDS e controle em 600 segundos foi plotada em função da concentração para a quantificação do efeito indutor do DPDS em mitocôndrias isoladas de fígado (linha cinza) e de cérebro (linha preta) de rato. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média ($n=3$).

O objetivo inicialmente delineado baseou-se em inúmeros artigos publicados com evidências da literatura que descreviam amplamente o difenildisseleneto com possível

atividade neuroprotetora em modelos *in vitro* e *in vivo* (POSSER et al., 2008; GLASSER et al., 2013). Como possível mecanismo de ação neuroprotetora figura-se sua potente ação antioxidante (IBRAHIM et al., 2015). Também foi proposto que o DPDS foi capaz de atenuar danos mitocondriais induzidos por acetoaminofen no fígado (CARVALHO et al., 2013). Entretanto, logo no primeiro experimento observamos que em vez de proteger, o DPDS promoveu um dano mitocondrial que resultou em permeabilização, e por este motivo passou-se a investigar não o efeito protetor, mas sim o efeito citotóxico deste composto, como descrito a seguir. Como pode ser observado na Fig. 2, o DPDS induziu morte celular de forma concentração dependente, tanto em células HepG2 (A), quanto em células Neuro 2a (B). Os valores de EC₅₀, concentração de droga que mata 50% da população celular, foram aproximadamente 2,5 $\mu\text{mol/L}$ para as células HepG2 e 10 $\mu\text{mol/L}$ para as células Neuro 2a, exibindo assim a mesma susceptibilidade ao DPDS observada nos experimentos com mitocôndrias isoladas.

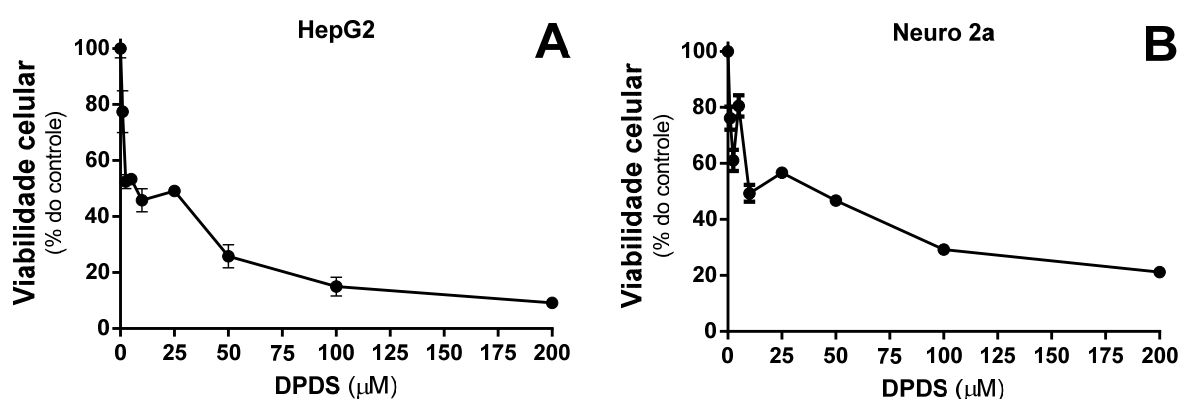


Fig. 2. Efeito do DPDS sobre a viabilidade de células Neuro 2a avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan. As células HepG2 (A) e Neuro 2a (B) foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ 5%, com diferentes concentrações de DPDS. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão do azul de tripan e a porcentagem de células viáveis foi avaliada em relação ao controle sem adição de droga (100%). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes.

Uma vez que o DPDS promoveu permeabilização em mitocôndrias isoladas e exibiu citotoxicidade nos respectivos modelos celulares, a ocorrência de permeabilização mitocondrial nas células intactas tratadas com DPDS foi investigada. No entanto, não é experimentalmente fácil determinar tal permeabilização em células como é em mitocôndrias isoladas por meio do ensaio de inchamento osmótico. Por isso, avalia-se indiretamente o potencial de membrana mitocondrial, pois a permeabilização mitocondrial resulta necessariamente em dissipação do mesmo. As células HepG2 foram então carregadas com o fluoróforo DiOC₆ que emite fluorescência no canal verde quando as mitocôndrias estão com elevado potencial de membrana e a fluorescência diminui com a sua dissipação. Como pode ser observado na Fig. 3, a adição do DPDS diminuiu a fluorescência do DiOC₆ assim como o desacoplador clássico CCCP, usado como controle positivo neste experimento, sugerindo assim a ocorrência da permeabilização mitocondrial em células induzida por DPDS.

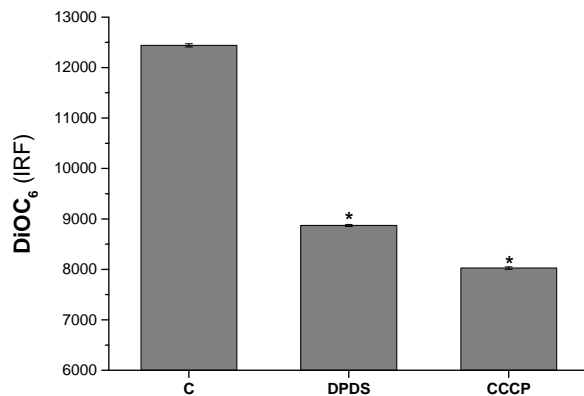


Fig. 3. Efeito do DPDS sobre o potencial transmembrana mitocondrial em células HepG2. As células HepG2 foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ 5%, com DPDS 10 µmol/L. Foram contados 10.000 eventos e os resultados foram apresentados como média geométrica ± erro padrão da média. *Estatisticamente diferente do controle (p<0.05).

CONCLUSÕES

O DPDS promoveu permeabilização em mitocôndrias isoladas de fígado e cérebro de rato, sendo esse efeito mais exacerbado nas de fígado. Além disso, este composto induziu morte celular concentração dependente em células em cultura associadas à ocorrência de disfunção mitocondrial. Esses resultados não eram esperados de acordo com a hipótese inicial onde foi proposto a investigação de processos mitocondriais associados à neuroproteção, mas a modificação do curso do projeto revelou aspectos importantes da citotoxicidade exibida por difenil disseleneto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAIN, K.; SKILLETER, N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: Snell, K; Mullack, B, editors. *Biochemical Toxicology*. London: IRL Press Limited, p.217-254, 1987.
- CARVALHO, N.; ROSA, E. F.; SILVA, M. H.; TASSI, C. C.; CORTE, C. L. D.; PESCADOR, S. C.; MAURIZ, J. L.; GALLEGU, J. G.; SOARES, F. A. New Therapeutic Approach: Diphenyl Diselenide Reduces Mitochondrial Dysfunction in Acetaminophen- Induced Acute Liver Failure. *PLoS one*, vol. 8, n. 12, dez. 2013.
- GLASER, V.; MORITZ, B.; SCHMITZ, A.; DAFRE, A. L.; NAZARI, E. M.; MULLER, Y. M. R.; FEKSA, L.; STRALIOTTO, M. R.; BEM, A. F.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T.; LATINI, A. L. Protective effects of diphenyl diselenide in a mouse model of brain toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, vol. 206, n.1, p. 18-26, out. 2013.
- MEOTTI, F.C.; STANGHERLIN, E.C.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environmental Research*, vol. 94, n. 3, p. 276-282, mar. 2004.
- OLIVEIRA, J.; MOREIRA, E. L.G.; MANCINI, G.; HORT, M. A.; LATINI, A.; RIBEIRO-DO-VALE; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T.; BEM, A. F. Diphenyl Diselenide Prevents Cortico-cerebral Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Induced by Hypercholesterolemia in LDL Receptor Knockout Mice. *Neurochem Research*, vol. 38, n. 10, p. 2028–2036, out. 2013.
- POSSER, T.; FRANCO, J. L.; SANTOSA, D. A.; RIGON, A. P.; FARINA, M.; DAFRE, A. L.; ROCHA, J. B. T.; LEAL, R. B. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. *Brain Research*, vol. 1199, p. 138-147, mar. 2008.