

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

Mayara Kaori Kisaki<sup>1</sup>; Deyse Cardoso da Silva<sup>2</sup>; Dr. Tiago Rodrigues<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: mkisaki@hotmail.com<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: deyse.cardoso@hotmail.com<sup>2</sup>

Professor da Universidade Federal do ABC; e-mail: trodrigues@umc.br, tiago.rodrigues@ufabc.edu.br<sup>3</sup>

**Área do Conhecimento: Metabolismo e Bioenergética**

**Palavras-chaves: Plumbagin; Mitocôndria; Estado redox.**

## 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, podendo ser encontrada tanto nas suas raízes quanto nas folhas e cascas. 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 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

Uma vez 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 projeto foi avaliar os efeitos do plumbagin 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 estudo da ação do plumbagin sobre o estado redox do citocromo *c* foi avaliado por espectroscopia UV/vis em um espectrofotômetro Shimadzu Multispec 1501. 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 & WILLIAMS (1956). O estado redox dos nucleotídeos de piridina foi avaliado em um espectrofluorímetro Hitachi F2500 (Tóquio, Japão) utilizando a fluorescência intrínseca destes nucleotídeos em 366/450 nm, excitação e emissão, respectivamente. A determinação de glutatona reduzida foi estimada espectrofluorimetricamente usando o indicador fluorescente *o*-ftalaldeído (OPT) em 350 e 420 nm (emissão/excitação) e a oxidação de grupos tiólicos de proteínas mitocondriais foi avaliada espectrofotometricamente com ácido 5,5'-dinitrobenzóico (DTNB) em 412nm de acordo com JOCELYN (1987).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados apresentados no período anterior mostraram que o plumbagin foi capaz de acelerar a velocidade de consumo de oxigênio do estado 4 (basal) de maneira concentração-dependente. Foram sugeridos três mecanismos responsáveis pela citotoxicidade apresentada por quinonas, dos quais um está associado a respiração mitocondrial, possivelmente pela capacidade destas substâncias em abstrair elétrons de flavoenzimas, dentre elas a NADH desidrogenase - complexo I (BUFFINTON et al., 1989). Dessa forma, para esclarecer este mecanismo, foi realizado um estudo dos efeitos desta droga na presença de diferentes inibidores de complexos da cadeia respiratória. A **Fig. 1** mostra que o plumbagin foi capaz de aumentar o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias mesmo após a adição do inibidor de complexo IV cianeto de potássio (KCN), confirmando sua capacidade de sequestrar elétrons de algum sítio da cadeia respiratória mitocondrial.

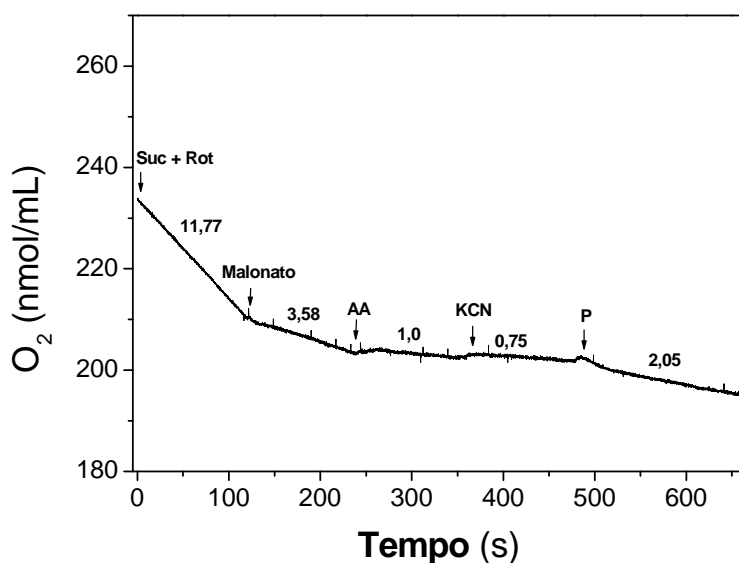
Como os complexos respiratórios foram completamente inibidos e mesmo assim houve um consumo de oxigênio induzido pelo plumbagin, levantou-se a hipótese de que estes elétrons poderiam ser provenientes da reação redox entre o citocromo *c* e o plumbagin e para confirmarmos esta hipótese, foi realizado um ensaio de espectroscopia UV/vis do citocromo *c* na presença da droga. Os resultados demonstraram que a adição do plumbagin não alterou o espectro do citocromo *c*, indicando que o plumbagin não é capaz de promover sua oxidação ou redução.

Foi avaliado então seus efeitos sobre o estado redox dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H), a fim de esclarecer se os elétrons doados ao plumbagin poderiam ser provenientes destes nucleotídeos, visto que a oxidação dessas espécies é acompanhada por redução do oxigênio na cadeia respiratória mitocondrial. Os nucleotídeos de piridina quando excitados no comprimento de onda de 366nm emitem fluorescência em 450 nm, sendo que esta é de origem intrínseca e corresponde à forma reduzida destes nucleotídeos. Assim, a diminuição da fluorescência é indicativa de oxidação dessas espécies. Neste ensaio, observou-se que o plumbagin promoveu a oxidação do

NAD(P)H de forma concentração-dependente, tanto na suspensão mitocondrial, quanto em solução de concentração conhecida, explicando em parte, o efeito do plumbagin sobre a respiração mitocondrial, já que a droga poderia estar oxidando o NAD(P)H e doando estes elétrons para o oxigênio, aumentando assim a velocidade de consumo.

Como o plumbagin apresentou uma significativa atividade pró-oxidante sobre os nucleotídeos de piridina, passou-se a avaliar tal efeito sobre os níveis de glutatona reduzida (GSH). Para isso, utilizou-se um marcador conhecido como *o*-ftalaldeído (OPT), este possui capacidade de ligar-se à glutatona reduzida e fluoresce quando excitado em 350 nm. Resultados demonstraram que o plumbagin foi capaz de diminuir os níveis de glutatona reduzida de maneira concentração-dependente, sugerindo mais um efeito pró-oxidante desempenhado por este composto.

Visto que na etapa anterior, o plumbagin induziu um aumento na geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs), e que essa geração está relacionada à oxidação de NAD(P)H e GSH, passou-se a verificar a oxidação dos grupos tiólicos de proteínas mitocondriais, uma vez que esses são candidatos preferenciais à oxidação em proteínas. Além disso, a oxidação de grupamentos tiólicos com formação de pontes dissulfeto em proteínas da membrana mitocondrial está associada à transição de permeabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, à morte celular (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Como previsto, o plumbagin também foi capaz de oxidar os grupos tiólicos de proteínas de maneira concentração, contribuindo para a caracterização de sua atividade pró-oxidante.



**Fig. 1 – Efeito estimulatório de plumbagin sobre a respiração basal mitocondrial.** Mitocôndrias (1mg/mL) foram incubadas em meio de respiração contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES-KOH 10 mM, EGTA 0,5 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.4 a 30°C. Efeito estimulatório de plumbagin (P) sobre a taxa de respiração do estado basal de mitocôndrias isoladas do fígado de rato energizadas com 5 mM succinato (mais 2,5 µM rotenona) e inibidas com 4 mM de malonato, 1,0 µg/mL de antimicina A (AA) e 0,3 mM cianeto de potássio (KCN). As adições são indicadas pelas setas e os números são a velocidade de consumo de oxigênio nmol/mL/min.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que o plumbagin possui uma importante atividade pró-oxidante em moléculas biológicas, a qual está associada ao aumento do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias, provavelmente pela capacidade da droga em abstrair elétrons da cadeia respiratória e formar EROs através de um ciclo redox .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUFFINTON, G.D; ÖLLINGER, K; BRUNMARK, A; CADENAS, E. DT-Diaphorase- catalysed reduction of 1,4 – naphthoquinone derivatives and glutathionyl-quinones conjugates. **Biochem. J**, v. 257, p. 561-571, 1989.

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.

CHANCE, B; WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 221, n. 1, p. 477-489, 1956.

JOCELYN, P.C. **Methods in enzymology**. v.143, p.44-67, 1987.

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