

ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTIOXIDANTE DE FENOTIAZINAS E ANÁLOGOS ESTRUTURAIS EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS E SISTEMAS MODELO

Aline Pagotti¹; Priscila Afonso de Faria²; Tiago Rodrigues³

Estudante do Curso de biomedicina; e-mail: alinepagotti@hotmail.com¹

Doutoranda da UFABC; e-mail: priscilaafonsofaria@yahoo.com.br²

Professor da UFABC; email: trodriques.ufabc@gmail.com³

Área do Conhecimento: Bioquímica

Palavras-chave: fenotiazinas; scavenger; antioxidante.

INTRODUÇÃO

As fenotiazinas (FTZs) são fármacos antipsicóticos utilizados no tratamento de esquizofrenia. Estruturalmente, possuem uma estrutura de três anéis, onde dois anéis benzênicos estão ligados por um átomo de enxofre e um de nitrogênio, o que caracteriza o núcleo tiazínico. Esse fármaco em seu estado fundamental possui efeitos variados em sistemas biológicos. Outros trabalhos mostram que as FTZs, em baixas concentrações (10 $\mu\text{mol/L}$) diminuíram a geração de ânions superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em mitocôndrias isoladas, inibiram a lipoperoxidação da membrana mitocondrial induzida por Fe^{2+} /citrato e a transição de permeabilidade mitocondrial/oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas, induzidas por *t*-BOOH/ Ca^{2+} (RODRIGUES *et al.*, 2002).

A mitocôndria é uma organela de aproximadamente 0,5 μm de diâmetro e tem como função a geração da maior parte da energia das células na forma de ATP, participa da homeostase celular do cálcio e é responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Fisiologicamente uma pequena fração de todo o O_2 consumido durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória sofre uma redução incompleta gerando ânions superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). O ânion superóxido pode ser transformado na maioria das espécies reativas de oxigênios (EROs) por reações sequenciais; assim a mitocôndria é reconhecidamente uma das principais fontes de EROs, pois os gera continuamente em pequenas quantidades. Por esse motivo, essa organela possui um sistema de defesa antioxidante que faz a conversão do $\text{O}_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por reações catalisadas pela superóxido dismutases (SOD), (FRIDOVICH, 1995). O H_2O_2 , na presença de Fe^{2+} , pode ser convertido em radical hidroxil (OH \cdot), um dos mais potentes oxidantes em meios biológicos. A formação de OH \cdot , a partir de H_2O_2 , é catalisada por metais de transição reduzidos, que por sua vez podem ser reduzidos novamente, propagando esse processo. Quando a produção de EROs está elevada ou a capacidade do sistema de defesa antioxidante está diminuída, ocorre um fenômeno associado a danos oxidativos de macromoléculas chamado estresse oxidativo (LIOCHEV & FRIDOVICH, 2000). Por esse motivo, a mitocôndria é um bom modelo biológico para o estudo de substâncias com possível atividade antioxidante

OBJETIVOS

Estudar a atividade antioxidante de derivados fenotiazínicos, além de outros análogos estruturais como os corantes azul de metileno e o vermelho neutro, para tentarmos estabelecer as necessidades estruturais dessas moléculas tricíclicas que contribuem ou respondem pela atividade antioxidante observada.

METODOLOGIA

Redução de DPPH. Para avaliar se as fenotiazinas possuem atividade *scavenger* de radicais livres, foi realizado o ensaio de reatividade com 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), que é um radical livre estável em soluções hidroalcoólicas. Após a incubação de diferentes concentrações de TR, a absorbância foi determinada em 517 nm em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 (BLOIS, 1958).

Geração de ânion superóxido. Para avaliar se as fenotiazinas apresentam atividade *scavenger* de ânions superóxido, foi usado o sistema xantina/xantina oxidase para a geração dos ânions superóxido, que foi determinada pela redução de citocromo *c* Fe^{3+} para citocromo *c* Fe^{2+} , acompanhando as mudanças espectrais em 550 nm em um espectrofotômetro Fotodiodo MultiSpec-1501 (Shimadzu Co., Kyoto, Japão).

Geração de radical hidroxil. Para avaliar se as fenotiazinas apresentam atividade *scavenger* de radical hidroxil, este foi gerado pela reação de Fenton, usando H_2O_2 e Fe^{2+} . TR foi incubada na presença de H_2O_2 , as mudanças espectrais foram acompanhadas em um espectrofotômetro Fotodiodo MultiSpec-1501 (Shimadzu Co., Kyoto, Japão).

Oxidação de lipídeos. As mitocôndrias foram isoladas de fígado de rato, por centrifugação diferenciada. A suspensão mitocondrial (1,0 mg de proteína) foi incubada em um meio contendo KCl 130 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, adicionado de succinato de potássio 5 mmol/L, rotenona 2,5 mmol/L, $(NH_4)_2 Fe(SO_4)_2$ 50 mmol/L e citrato de sódio 2 mmol/L por 30 minutos, a 37 °C (volume final de 1,0 mL). Em seguida foi adicionado 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1 % (m/v) (preparado em NaOH 50 mmol/L), 0,1 mL de NaOH 10 mol/L e 0,5 mL de ácido fosfórico 20 %, seguido por incubação durante 20 minutos, a 85°C. O complexo MDA-TBA foi extraído com 2 mL de n-butanol e a absorbância determinada em 532 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Redução de DPPH. As fenotiazinas em seu estado fundamental e irradiadas não apresentaram atividade *scavenger* de DPPH nem nas maiores concentrações da droga se comparado ao quercetim, que é um flavonóide com ação antioxidante já descrito na literatura.

Atividade scavenger de ânions superóxido. A xantina, na presença da enzima xantina oxidase é oxidada a ácido úrico e um elétron da reação é doado para O_2 , que é reduzido a ânion superóxido. O ânion superóxido pode reduzir o citocromo *c* Fe^{3+} para citocromo *c* Fe^{2+} . A fenotiazina TR apresentou atividade *scavenger* de $O_2^{\bullet-}$, impedindo a redução do citocromo *c*. Ocorreu uma competição entre a droga e o citocromo *c* pelo $O_2^{\bullet-}$, comprovando a atividade *scavenger* de superóxido apresentada por TR, visto o aumento da concentração da fenotiazina resultou em maior a atividade *scavenger* de $O_2^{\bullet-}$.

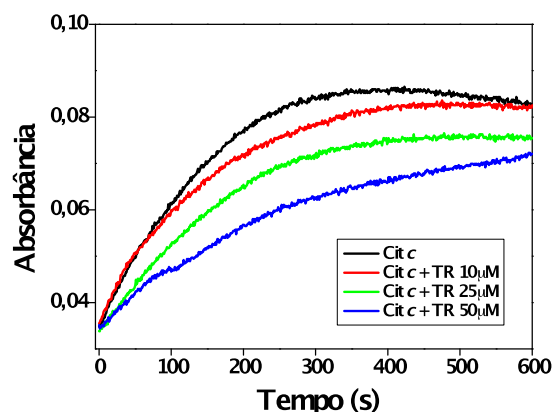


Fig. 1 – Efeito de TR sobre a redução de citocromo *c* induzida por ânion superóxido. Cinética em 550 nm feita para acompanhar a redução do citocromo *c*, na presença de diferentes concentrações de TR.

Atividade scavenger de radicais hidroxil (OH⁻). A fenotiazina foi incubada na presença de H₂O₂ e Fe²⁺ para verificar se a droga pode atuar como *scavenger* de radicais hidroxil. O pH pode interferir nas reações, pois a formação do cátion radical da fenotiazina é favorecida em pH ácido e a desprotonação do peróxido é favorecida em pH alcalino. Assim, o ensaio foi realizado nos pH 4, 7 e 11. Ocorreram mudanças espectrais nas bandas de TR na presença tanto de H₂O₂ quanto na presença de H₂O₂ e Fe²⁺. As mudanças espectrais indicam que alguma reação ocorreu levando a formação de produto(s). Entretanto, neste caso, a incubação com peróxido na ausência de Fe²⁺ (condição onde não há geração de radicais hidroxil) promoveu alterações no espectro de TR, indicando que esta reage com H₂O₂, sendo que este efeito será posteriormente estudado. As alterações na presença de peróxido e ferro podem indicar reação com radicais hidroxil, mas não é possível afirmar, havendo necessidade de outros métodos para se investigar tal reatividade.

Oxidação de lipídeos. As FTZ e os corantes azul de metileno e vermelho neutro foram testados nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 mM. Todas as FTZ e os corantes protegeram as mitocôndrias da oxidação de lipídeos de maneira concentração-dependente com diferentes potências, sendo o azul de metileno o mais potente. A figura 2 mostra a inibição da oxidação de lipídeos das membranas mitocondriais pelas fenotiazinas e análogos na concentração de 25 mM.

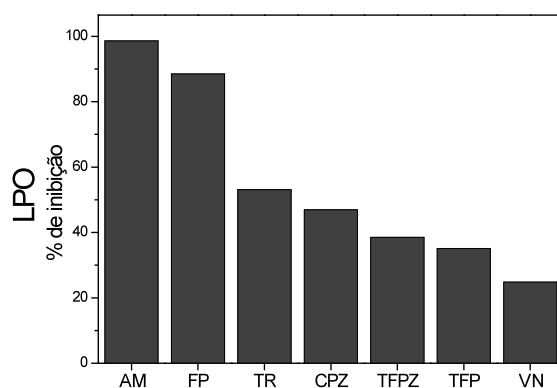


Fig. 2 – Inibição de lipoperoxidação (LPO) pelas fenotiazinas e corantes análogos. As mitocôndrias foram incubadas na presença das fenotiazinas flufenazina (FP), tioridazina (TR), clorpromazina (CPZ), triflupromazina (TFPZ) e trifluoperazina (TFP) e dos corantes azul de metileno (AM) e vermelho neutro (VN) na concentração de 25 mM durante 30 minutos a 37°C, na presença de Fe^{2+} . A porcentagem de proteção do processo de lipoperoxidação foi calculada em relação ao controle positivo (na presença de Fe^{2+} e na ausência de drogas), que foi considerado como 100%.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que TR no estado fundamental possui atividade *scavenger* de ânions superóxido. Entretanto não foi possível verificar a reatividade com radicais hidroxil devido à reação da fenotiazina com peróxido de hidrogênio. Tal atividade pode contribuir para o mecanismo de ação antioxidante responsável pela proteção contra a oxidação de lipídeos das membranas mitocondriais observada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. Superoxide and iron: partners in crime. in: Stadtman, E.R.; Levine, R.L. Protein oxidation. **The New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 191-208, 2000.

RODRIGUES, T.; SANTOS A.C.; PIGOSO A.A.; MINGUATTO F.E.; UYEMURA S.A.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis – potentially implicated mechanisms. **British journal of Pharmacology**, v. 136, p. 136-142, 2002.