

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DOS ORGANOCALCOGÊNIOS DIFENILDISELENETO E DIFENILDITELURETO SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL E PROCESSOS ASSOCIADOS

Rebeca Lobato Alves¹; Karoline Kristina Kemmerich²; Rodrigo Luiz de Oliveira Rodrigues Cunha³; Tiago Rodrigues⁴

Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: rl.alves@hotmail.com¹

Estudante Curso de Biomedicina; e-mail: kristinakemmerich@hotmail.com²

Professor da Universidade Federal do ABC; e-mail: rodrigo.cunha@ufabc.edu.br³

Orientador do Programa em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: tiago.rodrigues@ufabc.edu.br⁴

Área do Conhecimento: Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chaves: Organocalcogênios; Mitocôndria; Transição de permeabilidade mitocondrial

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 onde acredita-se que sua atividade biológica, e de outros compostos contendo selênio, possa estar associada à alteração do estado redox de tióis intracelulares (FREI *et al.*, 2007; GLASER *et al.*, 2013). O estresse oxidativo é uma condição associada a diversas doenças e pode ser causado por uma diminuição da capacidade do sistema de defesa antioxidante ou por um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HALLIWELL, 1994). Esta condição, está relacionada à lipoperoxidação de membranas biológicas e oxidação de grupos tiólicos (-SH) de proteínas, podendo resultar na transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (SANTANA *et al.*, 2009)

OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do difenildisseleneto em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos, especificamente sobre a transição de permeabilidade mitocondrial e processos associados. Tal estudo visa auxiliar no entendimento dos efeitos biológicos destes compostos, estipulando seus possíveis potenciais farmacológicos e/ou toxicológicos.

METODOLOGIA

O DPDS foi cedido pelo Prof. Dr. Rodrigo L. O. R. Cunha (UFABC) e solução estoque de foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, pureza ≥ 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 potencial de membrana foi avaliado pela alteração da fluorescência da rodamina 123 no λ 505/535 nm excitação/emissão, respectivamente A oxidação de -SH de proteínas mitocondriais foi avaliada em tampão fosfato de potássio com adição do DTNB pela absorbância em 412

nm. A lipoperoxidação da membrana mitocondrial foi avaliada através da geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a absorbância determinada em 535 nm. As espécies reativas de oxigênio foram estimadas pelo aumento de um produto (DCF) fluorescente, pelo resultado da oxidação de DCFDA, em 503/529 de excitação/emissão, respectivamente. 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 difenilditelureto não pode ser estudado neste projeto, pois foi insolúvel em água e pouco solúvel em DMSO. Contornar essa falta de solubilidade inserindo o organotelúrio em sistemas nanoestruturados formados por poloxâmeros inviabilizaria a comparação com os efeitos sobre a TPM entre os organocalcogênios, uma vez que, isoladamente, os poloxâmeros possuem a capacidade de provocar disfunções mitocondriais. Portanto, priorizamos a continuação dos estudos com DPDS, utilizando sete concentrações a partir do rastreamento de seus efeitos no projeto anterior, para melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos na indução da TPM em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

Dessa forma, as mitocôndrias isoladas de fígado de ratos foram incubadas com as mesmas concentrações de DPDS utilizadas no ensaio de inchamento osmótico mitocondrial (resultados anteriores) com a finalidade de avaliar se o organocalcogênio promove dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Como podemos observar na Fig. 1, o DPDS foi capaz de promover a dissipação do $\Delta\Psi_m$ a partir da concentração de 5 mmol/L, porém de forma exacerbada a partir de 25 mmol/L.

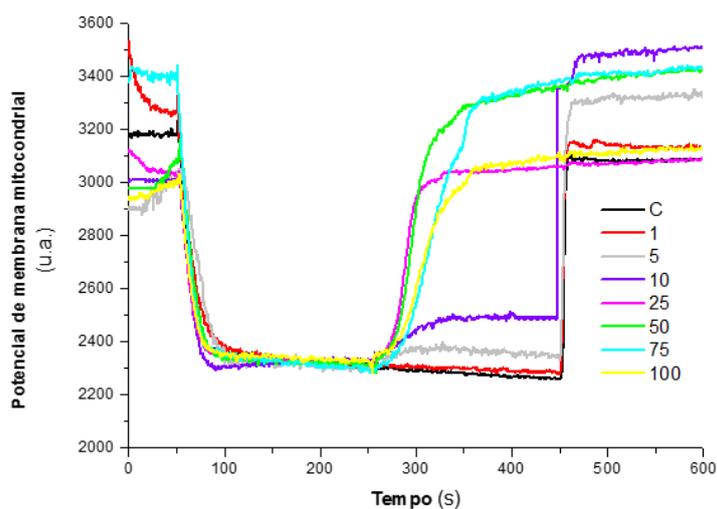


Figura 1. Avaliação da dissipação do potencial de membrana mitocondrial pelo DPDS em mitocôndria isoladas de fígado de rato. As mitocôndrias (1 mg/mL) foram incubadas em meio de reação contendo rodamina 123 (0,4 $\mu\text{mol/L}$), rotenona (2 $\mu\text{mol/L}$) e CaCl_2 (10 $\mu\text{mol/L}$). A cadeia respiratória foi iniciada após a adição de succinato de potássio (5 mmol/L) em 50 segundos, as concentrações de DPDS (mmol/L) foram adicionadas em 250 segundos e o CCCP (1 $\mu\text{mol/L}$) em 450 segundos, sendo utilizado como controle positivo. O controle indica ausência de droga. O resultado é representativo de pelo menos três experimentos independentes.

Como o DPDS foi capaz de promover permeabilização mitocondrial, o organoselênio foi incubado com mitocôndrias isoladas de fígado de rato e adicionado ácido 5,5-ditiobis-nitrobenzóico (DTNB) para investigamos a possível indução da oxidação de grupamentos tiólicos (-SH) de proteínas mitocondriais por este composto. Como pode ser observado na Fig. 2, o DPDS promoveu a oxidação de -SH de proteínas mitocondriais de forma concentração dependente, podendo este efeito estar relacionado à indução da TPM por este composto.

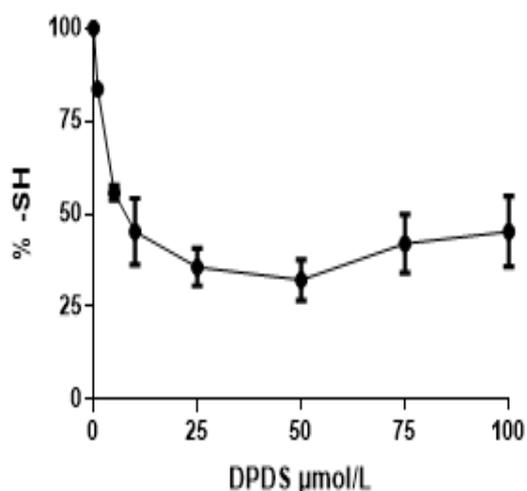


Figura 2. Avaliação da oxidação de -SH de proteínas mitocondriais promovida pelo DPDS em mitocôndria isoladas de fígado de rato. As mitocôndrias (1 mg/mL) foram incubadas em meio de reação, adicionado de succinato de potássio (5 mmol/L), rotenona (2 µmol/L) e CaCl₂ (10 µmol/L). As porcentagens foram calculadas considerando o controle como 100%. A quantificação foi realizada após adição do DPDS pela absorbância do DTNB em 412 nm. O controle, indicando ausência de droga, foi considerado como 100% de -SH. O t-BOOH (0,6 mM) foi utilizado como controle positivo, onde obteve-se a média de 46% de -SH. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Visto que o DPDS oxidou -SH de membranas mitocondriais, foi avaliado sua capacidade em promover a lipoperoxidação de membranas mitocondriais através da liberação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Como pode ser observado na Fig. 3 (painel A) o DPDS 100 µM, concentração que promoveu o maior inchamento osmótico mitocondrial, não foi capaz de induzir a lipoperoxidação de membrana mitocondrial, inclusive, parece diminuir a peroxidação lipídica basal em relação ao controle, sugerindo um efeito protetor contra a oxidação. Estudos prévios também sugerem que o DPDS apresenta efeito protetor sobre a lipoperoxidação (ROSSATO *et al.*, 2002; POSSER *et al.*, 2008).

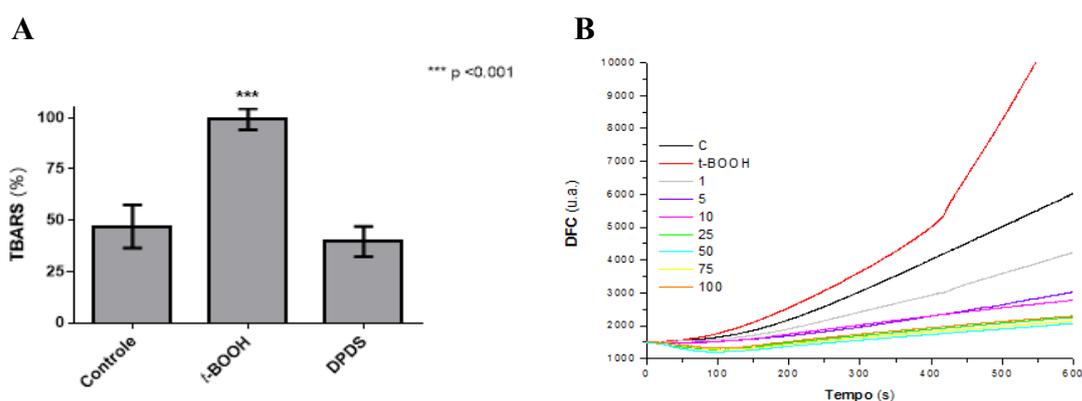


Figura 3. Indução de lipoperoxidação e geração de espécies reativas ao oxigênio pelo DPDS em mitocôndria isoladas de fígado de rato. As mitocôndrias (1 mg/mL) foram adicionadas em meio contendo succinato de potássio (5 mmol/L), rotenona (2 µmol/L) e CaCl₂ (10 µmol/L). **(A)** A absorbância relativa foi determinada em 535 nm utilizando o DPDS na concentração de 100 mmol/L. O controle indica ausência de drogas e o controle positivo foi realizado com a adição de t-BOOH (0,6 mM), sendo considerado como 100%. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata. **(B)** Foi avaliado a mudança de fluorescência

pela oxidação de DCFDA (1 μ mol/L) com a liberação de DFC. O resultado é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes.

Além disso, seus efeitos sobre a geração global de radicais livres na mitocôndria foram avaliados utilizando-se o fluoróforo DCFDA. Como pode ser observado na Fig. 3 (painel B), o DPDS, além de não induzir aumento da produção de radicais livres, promoveu diminuição das mesmas abaixo da geração mitocondrial basal, sugestivo de potencial antioxidante. Esses dados corroboram os resultados já obtidos de Puntel *et al.* (2010). Mesmo na ausência de lipoperoxidação e estresse oxidativo houve permeabilização mitocondrial, podendo ser causada por uma ação oxidante direta do composto sobre os grupamentos tiólicos mitocondriais. Resultados similares já foram descritos anteriormente para compostos ciclopaladados (SANTANA *et al.*, 2009).

CONCLUSÕES

O DPDS promoveu a permeabilização de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, demonstrada pela dissipação do potencial de membrana. Tal efeito foi acompanhado pela oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas mitocondriais, mas não pela oxidação lipídica das membranas mitocondriais, e diminuiu a geração de radicais livres pelas mitocôndrias abaixo do basal. Isso mostra que mesmo podendo apresentar um efeito antioxidante, o DPDS é capaz de promover disfunções mitocondriais potencialmente associadas à morte celular e isso pode ser explorado em condições onde a citotoxicidade é benéfica, por exemplo, contra células tumorais, parasitas, protozoários ou bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

FREI, G. M.; LEBENTHAL, I.; ALBECK, M.; ALBECK, A.; SREDNI, B. Neutral and positively charged thiols synergize the effect of the immunomodulator AS101 as a growth inhibitor of Jukart cells, by increasing its uptake. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 5, p. 712-722, Setembro, 2007.

GLASER, V.; MORITZ, B.; SCHMITZ, A.; DAFRE, A. L.; NAZARI, E. M.; MULLER, Y. M. R.; FEKSA, L.; STRALIOTTOA, 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**, v. 206, n.1, p. 18-26, Outubro, 2013.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-724, 1994.

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**, v. 1199, p. 138-147, mar. 2008.

PUNTEL, R. L.; ROOS, D. H.; FOLMER, V.; NOGUEIRA, C. W.; GALINA, A.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. Mitochondrial Dysfunction Induced by Different Organochalcogens Is Mediated by Thiol Oxidation and Is Not Dependent of the Classical Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening. **Toxicological Sciences**, v. 117, n. 1, p. 133-143, 2010.

ROSSATO, J. I.; KETZER, L. A.; CENTURIÃO, F. B.; SILVA, S. J. N.; LUDTKE, D. S.; ZENI, G.; BRAGA, A. L.; RUBIN, M. A.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant Properties of New Chalcogenides Against Lipid Peroxidation in Rat Brain. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 4, p. 297-303, Abril, 2002.

SANTANA, D.P.; FARIA, P.A.; PAREDES-GAMERO, E.J.; CAIRES, A.C.F.; NANTES, I.L.; RODRIGUES, T. Palladacyclescatalyse the oxidation of critical thiols of the mitochondrial membrane proteins and lead to mitochondrial permeabilization and cytochrome c release associated with apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 417, p. 247256, 2009.