UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

**SÍNTESE DE CONJUGADOS
DESFERRIOXAMINA-PEPTÍDEO PARA QUELAÇÃO
DE FERRO LÁBIL MITOCONDRIAL**

ROXANA YESENIA PASTRANA ALTA

TESE DE DOUTORADO

Área: Química

Orientador: Breno Pannia Espósito

Co-orientadora: Maria Terêsa Machini

**Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do depósito na SPG

31/05/2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pastrana Alta, Roxana Yesenia
P293s Síntese de conjugados desferrioxamina-peptídeo para quelação
de ferro lábil mitocondrial / Roxana Yesenia Pastrana Alta --
São Paulo, 2016.
 lv. (várias paginações).

 Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
 Orientador: Espósito, Breno Pannia
 Co-orientador: Machini, Maria Terêsa

 1. Peptídeos 2. Ferro 3. Mitocôndrias I. T. II. Espósito, Breno
Pannia, orientador. III. Machini, Maria Terêsa, co-orientador.

547.756 CDD

ROXANA YESENIA PASTRANA ALTA

Título da Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Química)

Orientador: Breno Pannia Espósito
Co-orientadora: Maria Terêsa Machini

São Paulo

2016

Sé que me acusan de apacibilidad, y tal vez de altruismo, y tal vez de locura. Tales acusaciones son irrisorias. Es verdad que hago química en un pequeño, aislado y lúgubre laboratorio, pero también es verdad que sus ramificaciones son bastas, universales y optimistas.

Como todo joven distraído y apasionado, me pregunto dócilmente el fin supremo de estudiar Ciencias exactas. Y puedo numerar infinitas razones. Y multiplicarla en búsqueda de infinitos misterios. Y pensar que la posible caracterización de tal o cual compuesto formaría parte de lo sobrenatural y aun de lo divino, pero como todo misterio la solución siempre es inferior al mismo y responde coherentemente a lo aprendido.

Dicen que soy prisionero! Claro que no, no me faltan distracciones, me agazapo a la sombra de lo descubierto o a la vuelta de un libro, juego al detective y me dejo caer en lo desconocido para encontrar lo buscado.

Lo que aprendí de algunos desconocidos...

...en mis días en São Paulo:

規律、遅かれ早かれ知性を倒します。

“La disciplina tarde o temprano vencerá a la inteligencia”

真実を知らぬものは嘘の奴隷になる

“Desconocer una verdad me hace esclavo de una mentira”

...y mis días en Canada:

“Life is not about waiting for one storm to pass...

It is about learning to dance in the rain-snow”

“Em algum lugar, algo incrível espera para ser conhecido”

Carl Sagan

DEDICATÓRIA

Aos Meus pais,

Pela minha integridade,

Pelo amor, incentivo e dedicação imensuráveis,

Por minha educação.

A minha irmã,

Pelo exemplo de determinação e coragem;

Pela credibilidade, amor e muitos conselhos e alegrias compartilhadas,

Assim como nossos gostos compartilhados...

A Marvin,

Que con amor y cariño llena mis días de felicidad; Sin

tí el sentido de todo sería otro....

AGRADECIMENTOS

Queridos pais, Meche & Mateo, há quatro anos deixava o ninho — até então, Lima era nosso universo... Amigos de infância são pela primeira vez separados...quatro anos são eternos. Aos dezessete anos, o sonho de menina de serra torna-se realidade: ingresso na Faculdade de Ciências da UNI... sou pura alegria e excitação! Uma vitória conquistada com o suor, sofrimento, abnegação e amor de vocês dois. Em cinco anos, terei me apaixonado pela química, mas também terei conhecido as injustiças, sujeiras e hipocrisia de nossa sociedade. Mas que não deixemos morrer os sonhos... Na busca por um mundo melhor, minha inquietação levou-me a seguir um programa de pós-graduação. Foi assim como a distância de casa aumentou, Elizabeth e eu mudamos para São Paulo e logo eu continuaria sozinha em Toronto e mais uma parada em Barcelona...O Skype jamais saciaria a sede por um beijo ou o prazer de um almoço peruano. Com vocês, aprendemos a não nos satisfazer com qualquer coisa, a jamais desistir de um sonho ou recuar diante de um desafio. Nesta hora em que mais um desafio se aproxima — voltar para a Terrinha e contribuir para a melhora de sua ciência e educação —, não me faltam motivos para agradecê-los... mas, em especial lhes agradeço por serem essas duas pessoas maravilhosas!

À minha querida irmã, Elizabeth, agradeço pela força e amizade, ter minha irmã caçula como colega é uma honra! Que a química traga-lhe muitas alegrias...

Ao meu grande amor, Marvin, por sempre me apoiar e ajudar em todas as formas, pelo carinho, amor, compreensão e companhia desde esse 13 de setembro até agora. Teremos mais maratonas, mais concertos e mais Death Metal.

Agradeço a meu orientador, professor e amigo Dr. Breno Pannia Espósito pela confiança, orientação, amizade, incentivo, ensinamento, carinho e apoio que me deu diariamente pessoalmente e via mail; por sua dedicação interminável na finalização deste trabalho. E sobretudo pela independência que me deu no desenvolvimento do projeto, que muito contribuiu para forjar o meu pensar da ciência.

A minha co-orientadora Prof. Dra. Maria Terêsa Machini pelas inúmeras conversas de ciência e vida, dadas cada oportunidade quando tomávamos um cafezinho. Assim como aprender o jeito ordenado e organizado das coisas e do tempo no tempo, minha experiência no campo é inesquecível – minha gratidão. Obrigada por cuidar de mim quando me enfermei obrigada pelo Chá mágico e pelo amor colocado no conteúdo.

A meu amigo de graduação ou o amigo-colega ou irmão-rival, Hector. Oxalá estudantes como você sejam um dia a regra no Peru e no Brasil.

Aos colegas do laboratório LAQBAM: Hector, Camila, Rodrigo, Fabiane e do laboratório Química de Peptídeos, Cesar, Marcos Sulca, Vitor, Taina, Glaucia, Doris e ao grande herói de meus problemas Cleber W. Liria e aos que já foram embora Elizabeth e o Dibakar Goswami. À Nancy pelo bom ensinamento sobre uma área desconhecida, obrigada pela amizade, confiança, apoio, ajuda e cupcakes. Obrigada a todos por compartilhar esse microcosmo de diversidade cultural chamado IQ e por se lembrarem dos meus aniversários com esses deliciosos bolos, mostrando-me outro tipo de calor familiar.

Agradeço a todos os professores do IQ-USP, cujo esforço permitiu-nos trilhar de forma segura as veredas da química e bioquímica.

Também agradeço à Dra. Shana Kelley (Universidade de Toronto, Canadá) pela oportunidade de estágio no seu laboratório, e à sua equipe por ser tão simpática e prestativa. Simon P. Wisnovsky, trabalhar com você foi muito estimulante; obrigado pelo seu tempo. Obrigada Rachel, Erick, Maria, July e Andrea porque minha estadia no Medical Sciences Building foi uma experiência proveitosa. Sua mentalidade aberta e forte espírito de trabalho transformou meus dias num jogo intelectual muito agradável.

Sou grata a todo o pessoal do Laboratório do Grupo de Pesquisa de Bioquímica do estresse oxidativo no Instituto de Investigação Biomédica de Lérida (Barcelona), especialmente ao Prof. Joaquim Ros e ao Jordi, que me acolheram desde o primeiro dia e viram os resultados de meus compostos sempre do melhor ângulo. Agradeço a Rosa que me ensinou tudo do laboratório. Quem sabe o que teria sido de mim sem ela; meu mais sincero agradecimento.

Ao suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa recebida, e pela bolsa-sanduíche. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e ao “bandeijão” por aliviar minha fome nos almoços, e às vezes no jantar e café da manhã.

RESUMO

Alta, R.Y.P. Síntese de Conjugados Desferrioxamina-Peptídeo para Quelação de Ferro Lábil Mitocondrial. 2016. (154p). Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As mitocôndrias são os principais locais de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são produzidos como subprodutos da cadeia de transporte de elétrons. O ferro livre e as ERO podem se envolver em processos potencialmente nocivos, sendo que a desregulação do metabolismo do ferro nessa organela tem sido associada a várias doenças, como a Ataxia de Friedreich (FA). O transporte seletivo de quelantes de ferro a esta organela é proposto como um meio de melhorar sintomas de FA. A desferrioxamina (DFO) é um sideróforo bacteriano com grande afinidade ao ferro, mas baixa penetração celular.

Já os peptídeos altamente catiônicos TAT₄₉₋₅₇ (Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg), 1A (F_x-Arg-F_x-Lys-F_x-Arg-F_x -Lys), SS02 (Dmt-(D)-Arg-Phe-Lys) e SS20 (Phe-(D)-Arg-Phe-Lys) são conhecidos por permear as membranas citossólicas e mitocondriais. Nós preparamos conjugados de DFO com peptídeos que penetram as mitocôndrias e estudamos suas características de ligação ao ferro *in vitro*.

Eles foram preparados e conjugados em fase sólida com DFO (produzindo quatro mtDFO), que em seguida foram purificados e caracterizados por meio de LC/MS e análise de aminoácidos. Os mtDFO de alta pureza exibiram capacidade de ligação de ferro idêntica à do quelante livre DFO. Os mtDFO também foram capazes de suprimir a oxidação catalisada pelo sistema ferro-ascorbato.

A fim de avaliar a localização intracelular dos mtDFO, estes foram marcados com TAMRA (mtDFO-TAMRA). Frente a uma linhagem de carcinoma de ovário, os mtDFO foram em geral pouco tóxicos e altamente localizados nas mitocôndrias. Não foram observados níveis expressivos de danos a DNA, indução de apoptose, geração de ERO na mitocôndria, arraste de ciclo celular ou de apoptose.

Resultados preliminares da aplicação dos mtDFO a cardiomiócitos murínos com baixo nível de frataxina (modelo de FA) indicam um restabelecimento de aproximadamente 60% na morfologia mitocondrial, o que pode ser interpretado como uma melhora nas funções dessa organela. Estes resultados indicam que os mtDFO produzidos podem ser uma parte importante no arsenal terapêutico para FA.

Palavras-chave: Ferro, peptídeo, mitocôndria, entrega mitocondrial.

ABSTRACT

Alta, R.Y.P. Synthesis of Desferrioxamine-Peptide Conjugates for the Chelation of Mitochondrial Labile Iron. 2016. (154p). Tese (PhD) – Graduation in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo.

Mitochondria are the main site for the generation of reactive oxygen species (ROS) as sub products of electron transport chain. Free iron and ROS may interact to generate potentially harmful species, and iron homeostasis in this organelle has been linked to several diseases, such as Friedreich Ataxia (FA). Selective targeting of iron chelators to mitochondria has been proposed as a means of alleviating FA symptoms. Desferrioxamine (DFO) is a bacterial siderophore with high affinity for iron, however low cell penetration.

Highly charged peptides TAT₄₉₋₅₇ Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg), 1A (F_x-Arg-F_x-Lys-F_x-Arg-F_x -Lys), SS02 (Dmt-(D)-Arg-Phe-Lys) and SS20 (Phe-(D)-Arg-Phe-Lys) are known as both cell- and mitochondria-permeant. We prepared conjugates of DFO with mitochondria-penetrating peptides and studied their iron binding characteristics *in vitro*.

They were prepared in solid phase and conjugated to DFO (generating four mtDFO), which were then purified and characterized by LC/MS and Amino acid analysis. MtDFO exhibited iron binding ability identical to free DFO. The mtDFO of high purity were also able to quench the oxidation catalyzed by the iron-ascorbate system.

Cell localization studies were performed by tagging mtDFO with TAMRA. In A2780 cells, mtDFO displayed in general low toxicity and high levels of mitochondrial location. No expressive levels of DNA damage, apoptosis, mitochondrial ERO generation or cell cycle arresting were observed.

Preliminary results of the application of mtDFO on mouse cardiomyocytes with low levels of frataxin (animal model of FA) indicate a recovery of ca. 60% of mitochondrial morphology. This is interpreted as an improvement of the functions of the organelle. These results indicate that mtDFO may be important allies in the therapy of FA.

Keywords: Iron, peptide, mitochondrion, mitochondrial targeting.

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS.

Código de uma e de três letras para os vinte aminoácidos usuais					
A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cys	Cisteína	N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico	P	Pro	Prolina
E	Glu	Ácido glutâmico	Q	Gln	Glutamina
F	Phe	Fenilalanina	R	Arg	Arginina
G	Gly	Glicina	S	Ser	Serina
H	His	Histidina	T	Thr	Treonina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina
K	Lys	Lisina	W	Trp	Triptofano
L	Leu	Leucina	Y	Tyr	Tirosina

5-DTAF: 5-((4,6-diclorotriazinil)aminofluoresceína)

A.A: Aceptor de acila

aa: Aminoácido

ACN: Acetonitrila

AO: Fármacos via administração oral

apo-TF: Apo-transferrina

Ard: Fmoc-D-Arg(Pmc)-OH

Boc: *N*^o-*tert*-butiloxicarbonil

CAL: Calceína

CAL-AM: Calceína-acetoximetila

CALFe: Calceína ligada ao ferro

CALFeH: Calceína protonada ligada ao ferro

CHN: Análise elementar dos elementos C, H e N

CIA: Conjunto de cluster ferro-enxofre citosólica

CPPs: Peptídeos que penetram nas células

D.A.: Doador de acila

DCYTB: ferro reductase duodenal

DFO: Desferroxamina

DFO: Mesilato de desferrioxamina

DFP: Deferiprona

DFX: Deferasirox

DHR: *Dihidrorodamina*

DIC: *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

DLC: Cations lipofílicos delocalizados

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

Dmt: 2',6'-dimetiltirosina

DMT1: Transportador de metal divalente 1

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DRX : *Difração de raios X*

EROs: Espécies reativas de oxigênio ou ROS

FA: Ataxia de Friedreich

FARA: *Friedreich Ataxia Research Alliance*, Alianças de pesquisas da Ataxia de Friedreich

FAS: Sulfato ferroso amoniacal

FDA: Administração de drogas e alimentos

Fl: Fluoresceína

Fl-aTf: Apotranferrina fluorescente

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxycarbonil

FPN: Ferroportina

FPN-1: Ferroportina-1

FTIR: Espectroscopia vibracional com transformada de Fourier na região do infravermelho

FTP: cloreto de (Formilmetil)trifenilfosfônio

F_x: L-cicloexilalanina

FXN: Gene mutadona FA

GAA: Repetição de trinucleotídeos, guanina, adenina, adenina

GRX3 y GRX5: Glutarredoxinas

HBS: Solução HEPES Salina tamponada

HBTU: *N,N,N',N'*-Tetrametil-O-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorofosfato, O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronium hexafluorofosfato

HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

holo-Tf: holotransferrina

IC₅₀: Concentração inibitória do 50% da população de células

LC: Concentração letal

IMM: Membrana mitocondrial interna

ISC: Clusters ferro-enxofre

ISCU: Cofactor para formação do clusters ferro-enxofre

LC/ESI-MS: Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas

LPI: Ferro labil plasmático

MeOH: Metanol

MFRN: Mitoferrina

MPP: Peptídeos que penetram em mitocôndrias

mtDFO: Conjugados de DFO

mtDFO-TAMRA: Conjugado de DFO marcado com TAMRA

Mw: Massa molar (g/mol)

NFS1: Enzima cisteína desulfurase

Nsuc: Anidrido do ácido succínico

nta: Ácido nitrilotriacético

NTBI: Ferro não ligado à transferrina

OBut: Éster *t*-butílico

OMM: Membrana mitocondrial externa

pK_{ow}: ou logP_{ow}, constante de partição ou constante de lipofilicidade

Pmc: 2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonil

PUFA: Ácidos graxos poli-insaturados

r: *D*-arginina

RD: Rodamina

Resina WANG: Fmoc-Arg(Pmc)-resina Wang

RMN: Espectroscopia por ressonância magnética *nuclear*

RMN¹H: Espectroscopia por ressonância magnética *nuclear* de *prótons*

RP-HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

Rr: Coeficiente de correlação de Pearson

SPFS: Síntese de peptídeos em fase sólida

TF: Transferrina

TFA: Ácido trifluoroacético

TFR1: Receptor de transferrina

TIM: Transportador da membrana mitocondrial interna

TIS: Triisopropilsilano

TOM: Transportador da membrana mitocondrial externa

TPP: Cátion trifenila fosfônio

TPP-DFO: DFO conjugado com um cátion lipofílicamente deslocalizado

UV: ultravioleta

UV-Vis: Espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível

Zip8 e Zip14 / SLC39A14: Transportadores de ferro

Δyfh1: *S.cerevisiae*, proteína frataxina proveniente da levedura

Δψ_m: Potencial de membrana mitocondrial

Δψ_p: Potencial de membrana plasmático

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	15
1.1.	A importância biológica do ferro	15
1.2.	Homeostase do ferro	15
1.3.	Metabolismo intracelular do ferro	16
1.4.	Metabolismo mitocondrial do ferro	18
1.5.	Espécies reativas de Oxigênio e estresse oxidativo	20
i.	Alvos da ERO e dano oxidativo	20
1.6.	Doenças associados ao metabolismo mitocondrial do ferro	21
i.	Problemas gerais	21
ii.	Ataxia de Friedrich	21
1.7.	Quelação de ferro em Ataxia de Friedreich (FA)	22
1.8.	Outras perspectivas terapêuticas	24
1.9.	A mitocôndria: alvo terapêutico específico	24
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1.	SÍNTESE MANUAL EM FASE SÓLIDA (SPFS), CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS Tat (49-57), 1A, SS02, SS20 E SEUS CONJUGADOS COM DESFERRIOXAMINA (mtDFO)	
3.1.1.	Materiais	30
3.1.2.	Sínteses manuais das peptidil-resinas em fase sólida (SPFS)	30
3.1.3.	Síntese do DFO-NSuc	33
3.1.4.	Sínteses dos DFO-conjugados (mtDFO)	33
3.1.5.	Clivagem da resina, desproteção total e extração dos peptídeos e dos DFO-conjugado	34
3.1.6.	Análise, purificação e caracterização dos peptídeos e dos mtDFO	35
a –	Cromatografia Líquida de Alta eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)	35
b –	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI/MS)	36
c –	Análises de aminoácidos (AAA)	36
3.2.	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE QUELANTE DOS mtDFO	37
3.2.1-	Teste com calceína	37
3.2.2.	Teste com apotransferrina fluorescente (FI-aTf)	38
3.3.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS CONJUGADOS mtDFO	38
3.4.	ESTUDO DA PERMEABILIDADE DOS CONJUGADOS mtDFO EM CÉLULAS HeLa	39
3.4.1.	Cultura de células	39
3.4.2.	Ensaio de citotoxicidade	39

3.4.3. Estudos de imagem celular.....	39
3.5. SÍNTESE DE Tat, Tat-K, 1A, 1A-K, SS02 e SS02-K, SS20 e SS20-K COM VISTAS À CONJUGAÇÃO COM DFO-NSuc E MARCAÇÃO COM TAMRA	
3.5.1. Síntese automatizada de peptídeos.....	40
3.5.2. Acoplamento de DFO e marcação com TAMRA.....	42
3.5.3. Clivagem do peptídeo da resina, desproteção total e extração dos peptídeos e dos DFO-conjugados	43
3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS, mtDFO e mtDFO-TAMRA.....	43
3.6.1. Cromatografia Líquida de Alta eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)	43
3.6.2. Espectrometria de massas (MALDI)	43
3.7. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS mtDFO.....	44
3.7.1. Cultura de Células.....	44
3.7.2. Ensaios de citotoxicidade	44
3.7.3. Experimentos de imagem celular.....	44
3.7.4. Determinação de danos no DNA por qPCR	45
3.7.5. Análise do ciclo celular	45
3.7.6. Análise dos níveis de superóxido mitocondrial	45
3.7.7. Ensaio de Apoptose (Anexina V)	45
3.8. CÁTIOS LIPOFÍLICOS DESLOCALIZADOS	46
3.8.1. SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO TPP-DFO	46
3.9. AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA MORFOLOGIA MITOCONDRIAL EM MIÓCITOS CARDÍACOS	
3.9.1. Experimentação em animais	47
3.9.2. Isolamento e cultura de NRVMs (<i>Neonatal Rat Ventricular Myocytes</i>)	47
3.9.3. Inoculação de lentivírus na cultura de NRVMs	48
3.9.4. Aplicação dos conjugados mtDFO na cultura de NRVM tratada com lentivírus.....	48
3.9.5. Marcação subcelular e análises das imagens.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1. Síntese dos mtDFO.....	50
4.1.1. Sínteses manuais das peptidil-resinas	50
4.1.2. Sínteses automatizadas das peptidil-resinas.....	52
4.1.3. Síntese e caracterização do DFO-NSuc.....	52
4.1.4. Sínteses dos DFO-conjugados (mtDFO) feitas na Universidade de São Paulo.....	54
4.1.5. Síntese dos mtDFO marcados com TAMRA feitos na Universidade de Toronto.....	55
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS E mtDFO.....	55
4.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)	55
4.2.2. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI/MS) dos compostos obtidos na USP	60

4.2.3. Análise de aminoácidos (AAA) dos compostos obtidos na USP	62
4.2.4. Espectrometria de massas (MALDI) dos compostos obtidos na Univ. de Toronto.....	63
4.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE QUELANTE DOS mtDFO	64
4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS mtDFO	68
4.5. ESTUDO DA PERMEABILIDADE DOS mtDFO	69
4.6. AVALIAÇÃO CELULAR	75
4.6.1 Ensaios de citotoxicidade.....	75
4.6.2. Estudos de localização celular.....	77
4.6.3. Determinação de danos no mtDNA por qPCR	79
4.6.4 Análise do ciclo celular	81
4.6.5. Análise dos níveis de superóxido mitocondrial	83
4.6.6. Ensaio de apoptose (Anexina V)	84
4.7. ESTUDOS COM CÁTIOS LIPOFÍLICOS DESLOCALIZADOS.	86
4.8. ESTUDOS COM CARDIOMIÓCITOS (NRVMs)	92
5. CONCLUSÕES	95
6. BIBLIOGRAFIA	96
7. SÚMULA CURRICULAR	114
8. ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância biológica do ferro

Os íons metálicos são componentes essenciais dos sistemas biológicos. Sódio (Na^+), potássio (K^+), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}) são a base para muitas funções, incluindo condução nervosa, contração muscular e estabilização de ácidos nucleicos ¹. O significado biológico destes metais é grande, pois cerca de um terço das proteínas encontradas nos seres vivos estão associadas com algum metal ². Os metais de transição como o ferro (Fe), por exemplo, alternam facilmente entre estados de oxidação, o que lhes permite atuar como cofatores de um grande número de enzimas celulares ³.

Os estados de oxidação do ferro biologicamente mais relevantes são o Fe(II) e Fe(III) ¹. O Fe(II) é assimilável em condições fisiológicas, participa no transporte trans-membranar, síntese do grupo heme e estoque na ferritina. Comparado com a forma ferrosa, o Fe(III) é praticamente insolúvel em condições fisiológicas (temperatura, pH e concentração de oxigênio). As constantes cinéticas de reações de substituição do Fe(II) são maiores do que o do Fe(III) ⁴.

1.2. Homeostase do ferro

O corpo humano contém entre 3 e 5 g de ferro ⁵. A maioria está na forma de heme na hemoglobina dos glóbulos vermelhos (2 g) mioglobina do músculo (acima de 300 mg). Outros órgãos ricos em ferro são o baço, fígado, medula óssea (1600 mg). Outras proteínas celulares e enzimas contêm cerca de 8 mg de ferro. Cerca de 3 mg de ferro são transportados pela transferrina (TF, glicoproteína de 679 aminoácidos), conteúdo esse que é renovado mais de 10 vezes por dia. O ferro é reciclado a partir de macrófagos retículo endoteliais (obtidos dos eritrofagocitos) ou obtido através da dieta (graças aos enterócitos que ajudam na internalização do grupo heme ou ferro inorgânico), (Figura 1) ⁴.

O ferro em meio aquoso se encontra em dois estados de oxidação importantes o Fe(II) e Fe(III) , o Fe(II) é assimilável em condições fisiológicas como o transporte trans-membrana, síntese do grupo heme e estoque na ferritina, etc. Por outro lado o Fe(III) se encontra como hidróxido-aquoso complexos insolúveis em condições fisiológicas como temperatura, pH e concentração de oxigênio. Essas duas espécies dependem do meio onde elas se encontrem.

Cineticamente o Fe(II) é mais lábil devido a que sua constante de troca (K_{troca}) é 10 000 vezes maior à do Fe(III) , o qual é explicado pelo tipo de interação do Fe(III) sendo um ácido duro que interage com as moléculas de oxigênios que são bases duros formando hidróxidos que precipitam, em cambio o Fe(II) por ser um ácido intermédio não interage com a mesma afinidade. Uma maior labilidade permite uma maior complexação.

O ferro perto das moléculas NAD^+ (Nicotinamida adenina dinucleótido) se mantém como Fe(II) estado reduzido do ferro sem embargo o ferro perto das moléculas de oxigênio a pH 7 se oxidam e podem gerar

espécies reativas de oxigênio (EROs). No equilíbrio oxido-redução, passar de um estado a outro num meio oxigenado pode levar a produzir espécies reativas de oxigênio. Como por exemplo a reação de Haber-Weiss: $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^-$. Onde se gera o radical superóxido o qual interage com dois hidrogênios sendo catalisada pela superóxido dismutase (SOD) para produzir as espécies peróxido de hidrogênio e novamente o oxigênio, segundo: $2 \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Se saímos do equilíbrio do ferro devido a um excesso deste metal, isso pode levar à formação de radical hidroxila a partir da reação de Fenton: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$.

De todas as EROs, o radical hidroxila é o mais tóxico já que possui a maior potencial de redução ($E^0 = 2,31 \text{ V}$) em meio biológico e uma elevada constante cinética ($k \sim 10^7\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Como consequência um excesso de ferro pode originar a formação de radicais livres em excesso.

Figura 1. a) Absorção, distribuição, reciclagem de ferro no organismo e troca quantitativa com outros órgãos; b) Regulação do metabolismo do ferro sistêmico. Modificado de Pantopoulos, K. et al. 2012 ⁴.

A absorção de ferro inorgânico envolve a redução de Fe(III) a Fe(II) , por redutores como o ascorbato e/ou ferriredutases como a DCYTB (duodenal cytochrome B) ⁶. A redução concentra-se a transportadores de membrana como DMT1 (*divalent metal transporter 1*). A internalização do heme não é totalmente compreendida, mas pode ser mediada por endocitose direta ⁷. As hemo-oxigenases metabolizam o heme para liberar o ferro dentro dos macrófagos ⁸. Ambos os eritrócitos e os macrófagos têm um transportador transmembranar para exportar o Fe(II) ao plasma, a ferroportina (FPN). Uma vez no plasma, o ferro é oxidado mediante a ação de ferroxidases, como a ceruloplasmina ou hefestina (expressa na membrana basolateral dos enterócitos) ^{9,5}.

O ferro exportado é ligado à transferrina no plasma, que se mantém num estado redox inerte e é distribuído para diferentes tecidos. Agastrina, polipeptídeo que estimula a secreção ácida gástrica, poderia servir como quelante do ferro e ajudar na sua ligação com apo-TF ¹⁰. A regulação do ferro sistêmico em mamíferos responde a um hormônio, hepcidina, que é sintetizado no fígado e em outras células. O aumento nos níveis de ferro (sangue e fígado) e a ocorrência de inflamação (infecções) causa aumento da hepcidina que liga-se à ferroportina, diminuindo a absorção do ferro. Mutações no gene da hepcidina ou de seus reguladores *upstream* provocam hemocromatose juvenil ^{11,4}.

1.3. Metabolismo intracelular do ferro

A maioria das células recebe ferro da TF. A TF liga-se fortemente a ferro com uma afinidade que exige pH neutro ¹². Ferro entra no espaço intracelular graças a um receptor específico para TF, uma glicoproteína transmembranar chamada TFR1 ¹³. A Figura 2 mostra a endocitose de TFR1 ligado à TF. Nos endossomos, o ferro é liberado da transferrina e a metalo-redutase STEAP3 (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3*)¹⁴ reduz ferro(III) a ferro(II), que é transportado para o citossol pelo DMT1. O TFR1 retorna para a membrana para ser novamente utilizado.

O ferro captado pela célula torna-se parte da LPI (Ferro lábil plasmático) que é ativo em termos redox (reação de Fenton e apoptose ^{15,16}), para depois ser incorporado a proteínas ou transportado às mitocôndrias usando a mitoferrina (MFRN) ou utilizando o mecanismo “*Kiss and run*” para sintetizar centros Fe-S. Parte do ferro no LIP pode também ser exportado via ferroportina, como visto anteriormente, ou armazenado na ferritina (proteína ubíqua conservada, armazenamento até 4500 átomos de ferro como óxido de ferro) ⁹.

Acredita-se que o ferro no LIP esteja ligado a moléculas de baixo peso molecular, como fosfatos, ânions orgânicos (carboxilatos e citratos), ligantes polifuncionais (polipeptídeos e hormônios) ou, ainda, glutathione ¹⁷.

Outros possíveis transportadores de ferro são Zip8 e Zip14 / SLC39A14, transportador principal de zinco que facilita a entrada de ferro (e outros metais divalentes, tais como o manganês e cádmio) em células em cultura ¹⁸. Também os canais de cálcio do tipo L dependente da voltagem, podem desempenhar um papel importante em miócitos cardíacos em situações de acúmulo de ferro, porque tem-se verificado que o bloqueio dos mesmos diminui o acúmulo de ferro e o estresse oxidativo, tendo efeito positivo na sobrevivência e na manutenção da estrutura e função cardíacas^{19, 20, 21}.

Existem outras *chaperonas* citossólicas que transportam ferro, como as gluta-redoxinas GRX3 e GRX5. Seu déficit altera o transporte de ferro nas mitocôndrias ²².

Figura 2. Biologia celular do metabolismo do ferro intracelular, modificado de Hentze, M. W.et. al. 2010 ⁹.

1.4. Metabolismo mitocondrial do ferro

O ferro na mitocôndria é utilizado principalmente para a síntese do grupo heme e centros ferrosulfurados. O seu excesso fica armazenado na ferritina mitocondrial ou mitoferrina (MFRN) ^{4,23}. A síntese do heme começa e termina nas mitocôndrias, mas alguns passos intermediários ocorrem no citosol ²⁴. A síntese dos *clusters* ferro-enzofre (ISC *iron-sulfur clusters*) ocorre na matriz mitocondrial²⁵.

Os ISC são formados pelo ferro e ânion sulfeto (S^{2-}) que geram os aglomerados $[2 Fe-2S]$ e $[4Fe-4S]$. Estes são grupos prostéticos de proteínas que têm funções essenciais na cadeia de transporte de elétrons nas reações redox do catabolismo a CO_2 e H_2O . Há mais de 20 componentes que facilitam a síntese e maturação de centros de ferro-enzofre na mitocôndria, citosol e núcleo ^{4,23}. A síntese destes aglomerados ocorre em três etapas (Figura 3) e depende da proteína frataxina.

A Figura 3 mostra que o primeiro passo é formar um dímero a partir de dois monômeros da proteína ISCU e NFS1 formando o complexo dessulfurase (NFS1-ISD11). No segundo passo, o centro Fe-S é transferido para as diferentes apo-proteínas. O terceiro passo é a incorporação de diferentes grupos prostéticos em apo-proteínas, incluindo ISCA1/2, IBA57, NFU1, BOLA3 e IND1 (estes últimos estão envolvidos na maturação do complexo I). O cluster ou precursor formado também pode ser exportado das mitocôndrias às máquinas de montagem citossólica (CIA, *cytosolic-iron-sulfur cluster assembly*) ^{4,23,26,27,25}.

Figura 3. Esquema geral da síntese dos centros ferro-enxofre, figura modificada de Rouault, T. A. et. al.2012 ²⁶.

A frataxina é uma pequena proteína ácida (com um ponto isoelétrico em torno de 4,9) altamente conservada ao longo da evolução ^{28,29,30,31} (Figura 4). A sua expressão é mais elevada em tecidos com uma alta taxa de metabolismo oxidativo. A frataxina está envolvida na homeostase do ferro ³², biossíntese dos centros ferro-enxofre ^{33,34}, metabolismo do grupo heme ³⁵, estoque de ferro ^{36,37}, ativação da fosforilação oxidativa ³⁸, controle do estado redox e proteção das células ante o estresse oxidativo ^{39,40,41}. Assim, a falta de frataxina (como na Ataxia de Friedreich, v. abaixo) promove o acúmulo de ferro mitocondrial, em detrimento do ferro citosólico, levando a hipersensibilidade ao estresse oxidativo ⁴². Ao mesmo tempo, o acúmulo do ferro mitocondrial é uma característica comum de alteração da síntese de ISC, o que sugere um problema quando há deficiência de frataxina. Frataxinas de levedura, humanos e de bactérias se ligam ao ferro como monômero; na presença de excesso de ferro, oligomerizam-se ou agregam-se ^{43,44,28}. Em *S.cerevisiae* ($\Delta yfh1$), agrega-se de uma maneira dependente do ferro, o que sugere um papel no armazenamento do metal ⁴⁵. Este processo requer um grande excesso de Fe(II), que se converte a Fe(III) durante a oligomerização ^{41,37}.

Figura 4. Frataxina uma proteína altamente conservada, figura modificada de Adinolfi, S. et. al.2002 ²⁸.

Estudos em diferentes modelos deficientes em frataxina mostraram uma deficiência da atividade aconitase e outras proteínas com centros de ferro-enxofre ⁴⁶. Daí a relação da frataxina com a biossíntese desses cofatores. Diferentes organismos ou tipos celulares respondem de forma diferente à deficiência da frataxina ⁴⁷. Ela pode desempenhar as seguintes funções: união ao ferro e função de chaperonas de ferro ^{33,48,26}; oligomerização, armazenamento e desintoxicação de ferro ^{37,49}; sensor de ferro ^{50,51}; ativadora do metabolismo e supressão tumoral ^{52,46} e reguladora do estresse oxidativo ^{53,30}.

1.5. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são moduladores críticos das funções celulares e estão envolvidos na sinalização celular ^{54,55}. Excesso de EROs pode perturbar estas funções e promover danos nos lipídios, ácidos nucleicos e proteínas ^{56,57,58,59}, gerando o chamado estresse oxidativo, que pode ter consequências patogênicas. Um equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs permite um desempenho normal da função celular.

Espécies reativas de oxigênio são uma família de moléculas geradas, transformadas e consumidas continuamente em todos os organismos, como consequência da vida aeróbica. O termo EROs agrupa diferentes radicais primários: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($OH^{\cdot}$) e o ânion radical do dióxido de carbono ($CO_2^{\cdot-}$). Inclui também diferentes espécies não-ramais: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), monóxido de carbono (CO), oxigênio singlete (1O_2) e ozônio (O_3). Finalmente, os produtos de reações colaterais destes ERO com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos são, também, considerados espécies reativas. Além disso, as proteínas podem ser modificadas com aldeídos e cetonas produzidos pela oxidação de lipídios e proteínas mediada pelo EROs ^{60,61,62}. O radical hidroxil $OH^{\cdot}$ é o mais reativo devido ao seu elevado potencial de redução (2,3 V) (superior ao de todos os substratos biológicos) e devido à sua constante de reação com biomoléculas ($k \sim 10^8 - 10^{10} M^{-1}s^{-1}$) ⁶³.

Espécies reativas de nitrogênio (ERN) também são capazes de causar danos às estruturas celulares. Tais espécies incluem o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), peróxido nítrico ($ONOO^{\cdot}$), o aduto peroxíntrico- CO_2 ($ONOCO_2^{\cdot-}$), e outros não-ramais como o trióxido de nitrogênio (N_2O_3) e o óxido de nitrogênio (NO_2) ^{64,65}.

As ERO e ERN são geradas como um subproduto da respiração aeróbica em resposta ao estresse e participam em funções de sinalização. Por exemplo, o NO pode modular cascatas de sinalização, mas também está implicado no dano atecidos e na progressão das diferentes enfermidades inflamatórias ^{66,67,68}.

Alvo da ERO e dano oxidativo

As proteínas são alvos das ERO e podem sofrer várias modificações: a oxidação de grupos aromáticos e cadeias laterais de aminoácidos alifáticos, a fragmentação do polipeptídeo e a formação de agregados de proteína com ligações cruzadas ⁶⁹ (Figura 5).

Figura 5. Sistema oxidativo e anti-oxidativo em células (esquema não estequiométrico), figura modificada de Nordberg, J.et. al.2001 ⁷⁰.

Ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) são os lipídeos mais susceptíveis a ser oxidados porque as suas insaturações aumentam a susceptibilidade da molécula à oxidação. Além disso, o oxigênio e as ERO são mais solúveis na bicamada lipídica hidrofóbica que em ambiente aquoso. A oxidação de lipídeos é mediada pelas ERO e enzimas. Os hidroperóxidos podem também fragmentar os PUFA e gerar compostos intermediários como alcanos, alquenos, hidroxiálquenos, glioxal, malonaldeído e hidroxinonenal. Os fosfolipídeos são sensíveis à oxidação pelo fato de conter PUFA. Colesterol também é bastante suscetível a ser oxidado e formar oxisteróis ^{71,72}. No nível enzimático, os principais agentes oxidantes são lipoxigenases, ciclooxigenases e citocromo c oxidase ⁷³. Por outro lado, a oxidação do DNA pode ocorrer nas bases de ácidos nucleicos, resíduos desoxirribose ou o esqueleto fosfodiéster. O radical hidroxila é um dos oxidantes de DNA mais frequentes, mas também o óxido nítrico e hipoclorito causam modificações nessa biomolécula ⁷⁴.

Entre os alvos EROs que foram descritos em diferentes tipos de células, temos as fosfatases P, as proteínas G, as quinases CaMKII (de *Ca/Calmodulin-dependent* Kinase II) e os fatores de transcrição AP1 (de *ativador de proteína1*) ^{75,76}.

1.6. Doenças associadas a problemas no metabolismo mitocondrial do ferro

i. Problemas gerais

Sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido em muitos problemas ⁵⁵, como doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica), distrofia muscular, envelhecimento, progéria, aterosclerose, artrite reumatóide, pancreatite aguda, câncer e patologias associadas com a desregulação do metabolismo do ferro. Também é descrito que a desregulação do metabolismo do ferro mitocondrial tem consequências patológicas, incluindo ataxia de Friedreich e outras doenças que serão brevemente descritas adiante ^{23,27}.

O déficit de ISCU provoca uma miopatia, onde os pacientes mostram déficits na fosforilação oxidativa muscular, acidose láctica, diminuição da atividade da succinato desidrogenase e aconitase, uma diminuição global das proteínas do ISC e depósitos de ferro no músculo esquelético ⁷⁷. As anemias sideroblásticas são caracterizadas pela formação de hemácias anormais, contendo sideroblastos (eritroblastos que apresenta um anel ou raiz contendo grânulos de ferro, na mitocôndria ou ao redor do núcleo) ²⁷.

Finalmente, o ferro também pode contribuir para a progressão de outras doenças, tais como doenças cardiovasculares, câncer ou infecções múltiplas. Os motivos podem incluir mecanismos, tais como estresse oxidativo ou a capacidade de promover a proliferação celular ^{78,79}.

ii. Ataxia de Friedreich

Essa ataxia foi descrita inicialmente em 1863 pelo Dr. Nikolaus Friedreich. Pacientes com FA apresentam menor atividade de proteínas mitocondriais que dependem de ISC, como por exemplo a frataxina. A formação desses clusters é crítica para a prevenção do acúmulo do ferro e do estresse oxidativo ⁴⁶. Essa doença degenerativa autossômica recessiva é caracterizada por atrofia degenerativa das colunas posteriores da medula espinal que contribuem à ataxia progressiva, perda da sensibilidade e debilidade muscular. As características adicionais são a escoliose, deformação dos pés e sintomas cardíacos. O gene mutadona FA (FXN) foi localizado na região cromossômica 9q13. A maioria dos pacientes de FA é portadora da repetição de trinucleotídeos GAA no intron do gene FXN. Em ocasiões raras, os pacientes apresentam uma expansão GAA em um alelo e uma mutação da perda de função no outro alelo ^{29,80}. A identificação do gene foi conseguida pela demonstração de que a expansão de repetição GAA gera uma conformação anormal de DNA, com a conseqüente diminuição na transcrição do gene FXN ⁴².

A patologia se inicia com a neurodegeneração, durante a qual os DRG (Dorsal Root Ganglion) se atrofiam e degeneram ^{81,82,83}. Também são perdidas terminações axonais ricas no neurotransmissor ácido gama aminobutírico⁸⁴. Em seguida, ocorre a cardiomiopatia, que é a principal causa de morte (60 – 80%) dos afetados pela FA ^{85,86}. Patologicamente, os cardiomiócitos estão hipertrofiados e podem se observar focos de necrose e depósitos de ferro nessas células ^{87,88}. Além disso, um risco maior de ocorrência de diabetes também tem sido registrado para portadores de FA ^{89,90,91}. Atualmente, existem vários modelos para o estudo dessa doença, incluindo culturas celulares ⁹² (e, especialmente, cardiomiócitos ⁹³), ratos ^{94,95}, invertebrados ^{96,97} e levedura ^{32,98}.

1.7. Quelação de ferro em Ataxia de Friedreich (FA)

A terapia de quelação de ferro é o atual tratamento das doenças sistêmicas de sobrecarga de ferro. No entanto, a utilização em doenças neurológicas associadas à sobrecarga de ferro é controversa ^{99,100}.

O principal ponto é que, em doenças neurológicas (como p. ex. Parkinson e Alzheimer), os depósitos de ferro são localizados e não sistêmicos, dificultando a terapia de quelação, pois a sobrecarga localizada pode se apresentar inclusive concomitantemente com um quadro geral de falta de ferro, ou seja, é um problema de distribuição heterogênea dos depósitos do metal. Na FA, o ferro está em excesso nas mitocôndrias e é relativamente empobrecido no citossol. Depósitos de ferro ocorrem principalmente no coração, sem sobrecarga sistêmica de ferro. Assim, nos pacientes de FA os níveis de ferro sérico e ferritina são normais, enquanto o receptor de transferrina é mais expressado^{101,102}. Drogas que permitam a redistribuição do ferro (no caso da FA, para o citossol p. ex.) poderiam ser potencialmente benéficas. Hoje, o desafio é conceber moléculas permeáveis ao cérebro e redistribuir o ferro a partir de mitocôndrias, sem comprometer a disponibilidade celular^{103,104} (Figura 6).

Figura 6. Na FA, a deficiência de proteína frataxina altera a regulação dos níveis de ferro, levando a um acúmulo tóxico nas mitocôndrias, figura modificada da revista Quest Magazine²⁹³.

A desferrioxamina (DFO, Figura 7) é um excelente quelante de ferro, mas de difícil penetração membranar não podendo ser administrada por via oral. Esse quelante promove um esgotamento dos reservatórios de ferro lábil extracelulares.

Figura 7. Estrutura do mesilato de desferrioxamina (DFO).

1.8. Outras perspectivas terapêuticas

Não existe tratamento específico para a FA aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*). Como consequência, muito esforço tem sido feito para encontrar novos medicamentos e terapias estão em testes clínicos ^{105,106,107}.

A FARA (*Friedreich Ataxia Research Alliance*) é uma organização que promove a investigação científica, dedicada à cura da FA. Por meio de seu website (<http://www.curefa.org/>) mostra o progresso e desenvolvimento de possíveis candidatos terapêuticos. Na Figura 8 são mostrados os principais candidatos com base no seu mecanismo de ação ou abordagem de tratamento. As duas primeiras etapas, descoberta e desenvolvimento pré-clínico, são realizadas no laboratório. A etapa *Investigational New Drug* é um marco importante para as etapas "Fase 1" - "Fase 3" (ensaios clínicos). Até agora não há nenhuma droga aprovada na Fase 3.

Figura 8. Tratamento da FA. O eixo vertical mostra os principais candidatos com base no seu mecanismo de ação. No eixo horizontal, fase de pesquisa em que cada candidato se encontra. Figura modificada da web-Fara Home (Ago-2015) ¹⁰⁸.

1.9. A mitocôndria: alvo terapêutico específico

A mitocôndria contém uma membrana mitocondrial externa (OMM) e uma membrana mitocondrial interna (IMM) altamente convoluída ¹⁰⁹. A IMM é única e muito densa devido à abundância de fosfolípidos saturados e elevada proporção de proteína:lipídeo (3: 1) comparado à membrana plasmática (1:1)^{110,109}. Além disso, a mitocôndria tem um elevado potencial de membrana ($\Delta\psi_m$ cerca de -180 mV) em comparação com a membrana plasmática ($\Delta\psi_p$ cerca de -60 mV) ¹⁰⁹. Estas características excluem das mitocôndrias uma ampla

gama de íons e moléculas, usando maquinaria de transporte especial para penetrar na IMM ¹¹¹. As mitocôndrias são importantes reguladores das vias de morte celular e estão envolvidas na ativação e na propagação da apoptose, necroptose e necrose ¹¹².

Embora a mitocôndria tenha seu próprio DNA, a maioria das proteínas necessárias ao seu funcionamento é produzida no citossol, mediante controle da expressão adequada do DNA nuclear. Para serem importadas para a mitocôndria, essas proteínas são marcadas com seqüências de peptídeos que funcionam como “sinalizadoras” do seu destino biológico. Tais seqüências são geralmente conhecidas por MPPs (Mitochondria Penetrating Peptides), e em geral são catiônicas e lipofílicas. Uma vez internalizadas, essas seqüências são clivadas e a proteína adquire sua plena funcionalidade ¹¹³. A mitocôndria também tem um sistema de importação TOM (transportador da membrana mitocondrial externa) e TIM (transportador da membrana mitocondrial interna) de proteínas específicas ¹¹⁴. A Figura 9 mostra um resumo da internalização do ferro, deficiência da frataxina (cluster Fe-S) e diferença entre a membrana plasmática e mitocondrial.

Portanto, uma das estratégias para concentrar seletivamente moléculas bioativas na mitocôndria é usar essa maquinaria de importação, acrescentando nesta seqüência peptídica os compostos de interesse. Esta abordagem tem sido bem sucedida, dirigindo uma variedade de proteínas para a mitocôndria, a fim de estudar uma ampla gama de fenômenos biológicos ^{115,116,117}. Além dessas seqüências peptídicas, podem também ser utilizados polímeros catiônicos ou lipossomos (Tabela 1) ¹¹⁸.

Dois requisitos gerais para a localização mitocondrial são cruciais: carga positiva e lipofilicidade ¹¹⁹. O caráter catiônico é necessário para conduzir o vetor através das membranas (celular e mitocondrial, ambas com potencial membrana negativo) ^{120,121,122}.

Figura 9. Internalização de Fe na mitocôndria e a regulação exercida pelas frataxina na síntese dos clusters “Fe-S”

121,122,114.

A deslocalização da carga positiva reduz a energia de ativação associada à dessolvatação do íon que deve acontecer antes da sua absorção através da IMM ^{123,124}. A carga positiva é espalhada sobre uma grande área de superfície, a fim de aumentar o seu raio, reduzindo eficazmente a interação com moléculas de água circundantes¹¹⁴. Estas características permitem que tais moléculas penetrem na IMM movidas pelo seu elevado potencial negativo¹¹⁰. Isto se traduz numa concentração 100-500x na matriz mitocondrial. Apesar de a despolarização parcial da membrana e um ligeiro desacoplamento da cadeia de transporte de elétron resultarem da translocação de cátions através da IMM, esses efeitos são em grande parte reversíveis ¹²⁵. Além disso, alterações na bioenergética mitocondrial, como uma diminuição na taxa de respiração basal, são apenas evidentes após a adição de concentrações elevadas de vetores de entrega¹²⁶. Nota-se que a eficácia e absorção destes agentes de direcionamento são dependentes do tipo de tecido, posto que existe uma grande variabilidade nas taxas da biogênese mitocondrial ¹²⁷.

Atualmente, tem-se dado maior ênfase na entrega por vetores peptídicos (MPP) e cátions lipofilicamente deslocalizados (DLC) por serem sistemas robustos e apresentarem múltiplas aplicações na área medicinal ¹²⁸.

Tabela 1: Lista dos vetores de entrega utilizados.

Tipo vetor de Entrega	Vantagens	Limitações	Exemplos
<p>Lipossomos</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Podem entregar cargas com grandes Mw e carregadas. -A carga não está ligada covalentemente. -Ajustável a diferentes cargas e aplicações. 	<ul style="list-style-type: none"> - O maior tamanho pode levar a uma resposta imune ou tóxica. -Síntese difícil 	<p>Sclareol ¹²⁹, paclitaxel ^{130, 131}, ceramide¹³², DNA^{130,133}.</p>
<p>Nanopartículas</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Podem entregar cargas com grandes Mw e carregadas. -A carga não está ligada covalentemente. -Ajustável a diferentes cargas e aplicações. 	<ul style="list-style-type: none"> -Limitado <i>in vivo</i>. -Síntese difícil. 	<p>Lonidamina ¹³⁴, α-tocoferol succinato ¹³⁵, curcumina, 2,4-dinitrofenol ¹³⁵, ZnPc ¹³⁶</p>
<p>Catión trifenilfosfônio</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Fácil conjugação. -Orientação de pequenos vetores. -Podem cruzar a barreira hematoencefálica -Baixa toxicidade e rápida absorção <i>in vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> -Não pode entregar carga com elevado Mw. 	<p>Ubiquinona ¹³⁷, gamitrinibs ¹²⁰, plastoquinona y sus derivados ^{138, 139}, peroxidase ¹⁴⁰ y superóxido dismutasa ¹⁴¹, TEMPO ¹⁴², rodamina19 ¹⁴³, hidroxitolueno butilado ¹⁴⁴, porfirina ¹⁴⁵, S-nitrosotiol ¹⁴⁶, ciclosporina A ¹⁴⁷, PNA ¹⁴⁸, 2,4-dinitrofenol ¹⁴⁹, boronato de arilo ¹⁵⁰.</p>
<p>Peptídeos que penetram na mitocôndria (MPP)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Fácil síntese em fase sólida. -Facilmente ajustável a diferentes cargas e aplicações. -Fácil conjugação e Orientação de pequenos vetores. 	<ul style="list-style-type: none"> -Limitado <i>in vivo</i>. -Não pode entregar carga com elevado Mw. 	<p>Clorambucil ^{151,152}, doxorubicina ¹⁵³, cisplatino ¹⁵⁴, metotrexato ^{155,156}, corantes carregados negativamente ¹⁵⁷, dimetil tirosina ¹⁵⁸, 4-amino TEMPO ¹⁵⁹.</p>

O uso de peptídeos abre uma nova área de estudo, onde se pode:

- Direcionar marcadores (peptídeos-específicos) a organelas específicas. De fato, o peptídeo Tat (49-57), assim como outras seqüências de peptídeos catiônicos e lipofílicos, tem sido utilizado para direcionar fluoróforos à parte citosólica da célula assim como para a mitocôndria, abrindo novas oportunidades de transportadores de carga ^{160,157}.
- Estudar a relação estrutura-atividade de peptídeos biologicamente ativos, tal como foi feito com peptídeo 1A, que propõe a relação entre lipofilicidade/carga de um peptídeo para a penetração a certas organelas, como a mitocôndria ^{161,162}.
- Desenvolver inibidores de proteases e antivirais para enfermidades neurodegenerativas ⁸⁰, como por exemplo os peptídeos antioxidantes SS02 e SS20, que ingressam na membrana mitocondrial interna (IMM) e têm por finalidade a eliminação de EROs e redução da morte celular ¹¹⁴.

Neste projeto de doutorado, estudaram-se as sínteses de quatro seqüências peptídicas e seus respectivos conjugados com DFO, visando o direcionamento do sideróforo a mitocôndrias para o tratamento de sobrecarga de ferro associado à FA:

Tat49-57(R-K-K-R-R-Q-R-R-R): Pertence a um grupo de peptídeos capaz de se translocar através da membrana celular por diversas vias ¹⁶¹. O peptídeo Tat (Trans-Acting Activator of Transcription) derivado da proteína trans-ativadora HIV¹⁶⁰, foi descoberto em 1987. A região mínima requerida para a translocação da membrana envolve os resíduos 47 a 57 (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R). Este peptídeo facilita a entrega intracelular de diversas cargas, como drogas com permeabilidade celular limitada, biomoléculas maiores e até mesmo biomoléculas transportadoras, como lipossomos e nanopartículas¹⁶³. A exclusão dos aminoácidos básicos (Y e G) gera o peptídeo Tat (49-57), que pode penetrar a membrana hidrofóbica da mitocôndria¹⁵⁷. Recentemente, observou-se que as proteínas Tat-acopladas podem ultrapassar o principal obstáculo no tratamento do câncer ao cérebro, a barreira hematoencefálica ^{164,165}. A descoberta deste peptídeo serviu como a base a utilização de peptídeos penetrantes em células (CPPs) como transportadores moleculares. ^{166,167,168}. 1A (F_x-r-F_x-K-F_x-r-F_x-K; r = *D*-arginina e F_x = *L*-cicloexilalanina): Originalmente ¹⁵⁷ se estudaram quatro MPPs como vetores de administração mitocondrial. Um deles foi o peptídeo conhecido como 1A, com o objetivo de entrega de várias moléculas às mitocôndrias de células vivas. Através de variação de cargas adjacentes (figura10) evidenciou-se que a seqüência alternada catiônica/hidrofóbica é crítica para penetração na mitocôndria, no entanto, uma seqüência de quatro cargas positivas adjacentes garante uma especificidade na organela, independentemente da estrutura da carga bio-ativa. Demonstrou-se também que este peptídeo pode entregar pequenas moléculas carregadas negativamente (-2) ¹⁶¹.

Figura 10. Sequência de peptídeos e distribuição de carga (F: fenilalanina; Fx: ciclohexilalanina; r: D-arginina; K: lisina).

SS02 (Dmt-r-F-K; Dmt = 2',6'-dimetiltirosina): Pertence ao grupo de SS-tetrapeptídeos^{99,169}. O peptídeo SS02 é o primeiro antioxidante que ataca de forma seletiva e concentra-se na IMM, o que permite a eliminação de EROs no local de sua produção *in vitro*. Este peptídeo exerce sua atividade antioxidante através do resíduo dimetiltirosina, e compartilhando semelhança estrutural com a vitamina E.

SS20 (F-r-F-K): Também pertence ao grupo de SS-tetrapeptídeos que penetram a IMM, tendo o Dmt (dimetiltirosina) sido substituído pela F (fenilalanina), o que elimina sua atividade antioxidante¹⁶⁹.

2. OBJETIVOS

A célula normal tem um equilíbrio entre o ferro plasmático e mitocondrial, uma célula afetada pela Ataxia de Friedreich apresenta uma sobrecarga de ferro dentro da mitocôndria. O objetivo desta tese foi criar novos conjugados de ferro que possam entrar na mitocôndria e inativar esse ferro diminuindo a geração de espécies reativas de oxigênio. Para isso foi utilizado a conjugação de um peptídeo que penetra na mitocôndria e um ligante específico de ferro chamado DFO (não ingressa na célula), essa conjugação deve ter as mesmas características do ligante específico de ferro a nível mitocondrial.

- a) Síntese, purificação e caracterização química dos conjugados mtDFO;
- b) Avaliação da capacidade quelantes e atividade antioxidante dos mtDFO;
- c) Estudo da avaliação celular dos mtDFO:
Citotoxicidade, localização mitocondrial dos mtDFO-TAMRA, dano ao mtDNA, ciclo celular, níveis de superóxido e apoptose.
- d) Síntese, caracterização e avaliação celular do conjugado TPP-DFO;
- e) Avaliação da atividade em cardiomiócitos modelo de FA: mtDFO e TPP-DFO.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SÍNTESE MANUAL EM FASE SÓLIDA (SPFS), CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS Tat (49-57), 1A, SS02, SS20 E SEUS CONJUGADOS COM DESFERRIOXAMINA (mtDFO)

3.1.1. Materiais

Os suportes poliméricos empregados foram: resina Fmoc-Arg(Pmc)-Wang adquirida da Novabiochem (San Diego/CA, USA) de grau de substituição de 0,61 mmol de aminoácido/g, resina Rink-Amida-(Fmoc) adquirida da AdvancedChemtech (Louisville/KY, EUA) de grau de substituição de 0,7 mmol, resina Rink-Amida-(Fmoc) adquirida da ChemPeplnc (Wellington, EUA) de grau de substituição de 0,8 mmol. As três apresentam tamanho de partícula de 100 a 200 mesh¹⁷⁰.

Os derivados de aminoácidos foram os seguintes: Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH e Fmoc-Gln-OH da Novabiochem (San Diego/CA, EUA); Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc- β -cyclohexyl-Ala-OH, Fmoc-D-Arg(Pmc)-OH e Fmoc-Phe-OH da Bachem (Torrance/CA, EUA); Fmoc-L-(2,6-di-Me)Tyr-OH AnaSpec (Seraing, Bélgica), Anexo (A1-A).

Os reagentes acopladores e as suas procedências foram os seguintes: DIC (Sigma-Aldrich Chemical Co.(Saint Louis/MO, EUA), HOBt (Protein Research Foundation, Osaka/JAPÃO), HBTU (ChemPep Inc., Wellington/EUA). A base utilizada foi DIPEA (Applied Biosystems, Foster City-CA/EUA).

Os solventes e outros reagentes para síntese foram: DMF, DMSO, Tol e ACN da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro/BRASIL); TIS, MeOH e TFA da Merck KGaA (Darmstadt, ALEMANHA); Anidro acético da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Saint Louis/MO, EUA); H₂O bidestilada deionizada (Millipore, Bedford/MA/EUA). Reagentes para teste de ninidrina da AppliedBiosystems (Foster City/CA, EUA) ¹⁷¹.

Na preparação de eluentes para RP-HPLC e LC/MS, foram usados os seguintes solventes e ácido: ACN, água destilada deionizada e TFA.

O NSuc (anidrido do ácido succínico) foi adquirido da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro/BRASIL); O DFO (Desferal®, mesilato de desferrioxamina) era proveniente da Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça.

3.1.2. Sínteses manuais das peptidil-resinas em fase sólida (SPFS)

As sínteses em SPFS em temperatura ambiente e alta ¹⁷² empregam diferentes sistemas de reação, mas todos se baseiam no alongamento da cadeia peptídica no sentido C→N terminal ¹⁷³. SPFS se inicia com a ligação do aminoácido (protegido no grupo α -amino e na cadeia lateral reativa) da sequência peptídica de interesse a um suporte sólido (reação de aminoacilação). Em seguida, o protetor do grupo amino- α da aminoacil-resina é removido (reação de desproteção) e, se necessário, é feita uma lavagem com solução de base orgânica para que o grupo α -amino seja desprotonado (neutralização) e, portanto, possa atuar como um nucleófilo reagindo com o novo derivado de aminoácido quimicamente ativado na sua α -carboxila (reação de acoplamento). Um fluxograma ilustrativo do procedimento sintético encontra-se na Figura 11 ¹⁷⁴. As reações de desproteção e acoplamento são repetidas até que a sequência peptídica desejada seja construída, o que, em parte, é assegurado pelos testes de ninidrina ¹⁷¹ de amostras da peptidil-resina em crescimento : teste de

ninidrina positivo é azul (Figura 12-b) para amina livre e amarelo (Figura 12-c) para teste negativo. A peptidil-resina é então submetida à clivagem da ligação peptídeo-resina e sua desproteção total, separação do peptídeo da resina e secagem do peptídeo bruto ¹⁷⁵. Ele é caracterizado e purificado antes do seu uso.

Figura 11. Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida. Y:OH,NH₂; X: grupo retirador de elétron,®: resina funcionalizada com uma amina; P: grupo protetor linear da função amina-α (Fmoc ou Boc); PR: grupo protetor de cadeias laterais; R: cadeia lateral do aminoácido. Modificado de Loffredo, C. ¹⁷⁴.

A SPFS pode ser feita empregando duas estratégias: Boc e Fmoc, que se baseiam em um sistema protetor temporário do grupo amina-α e um sistema de proteção ortogonal ou lateral, com estabilidades/labilidades opostas em meios orgânicos contendo ácidos e bases ¹⁷⁶. A estratégia Fmoc é a mais utilizada ¹⁷². Um exemplo de suporte sólido empregado é o copolímero de poliestireno e estireno ¹⁷⁷. Nesse trabalho empregamos a estratégia Fmoc¹⁷⁵ e protocolos estabelecidos no Laboratório de Química de Peptídeos do IQ-USP para síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) a 60 °C ^{178,179} (Tat (49-57)) e à temperatura ambiente ¹⁷⁴ (1A, SS02 e SS20). A Tabela 2 mostra os passos seguidos para acoplar cada aminoácido e desproteger do grupo Fmoc. A Figura 1 descreve o sistema reacional, bem como o teste de ninidrina.

Tabela 2: Condições experimentais empregadas nas SPFS

Etapa 1: Lavagem Inicial 25% DMSO/Tol ou DMF + MeOH	Etapa 4: Acoplamento Fmoc-aa(X)-OH em 25%DMSO/Tol ou DMF + DIC/HOBt
Etapa 2: Desproteção 20% piperidina/DMF	Etapa 5: Lavagem pós Acoplamento 25% DMSO/Tol ou DMF + MeOH
Etapa 3: Lavagem pós desproteção DMF ou 25% DMSO/Tol + MeOH	Etapa 6^b: Acoplamento Acetilação 50% anidrido acético e 50% de solução de 25% DMSO/Tolueno

^aTodas as etapas foram monitoradas pelo teste de ninidrina ¹⁷¹.

^bA etapa 6 só é feita quando o teste do acoplamento é positivo para amina livre em 10% apenas.

Figura 12. a) Sistemas de reação (adaptado de material do Laboratório de Química de Peptídeos do IQ-USP): a1) SPFS a temperatura ambiente dos peptídeos 1A, SS02 e SS20, a2) SPFS em alta temperatura do peptídeo TAT (49-57). Testes feitos com ninidrina: b) grãos azulados, teste positivo para aminas livres e c) grãos amarelos, teste negativo para aminas livres.

a) Síntese 1 do peptídeo Tat (49-57)

Na SPFS a 60 °C (aquecimento convencional em banho-maria) foi utilizado um frasco da Figura 12-a2 acoplado a um banho termostatzado da PolyScience (Niles/IL, USA), modelo 8001 e 200 mg da resina Fmoc-Arg(Pmc)-Wang. O excesso molar de cada derivado de aminoácido foi de 2,5 vezes.

b) Síntese 2 do peptídeo Tat (49-57)

Foi utilizado o frasco da Figura 12-a1 e 400 mg da resina Rink-Amida protegida com Fmoc e usado usado excesso molar de 2,5 vezes de cada derivado de aminoácido.

c) Síntese dos peptídeos 1A, SS02 e SS20

Foi feito o mesmo descrito acima a partir das massas iniciais de 200 mg para 1A e 400 mg para SS02 e SS20 O derivado de aminoácido Dmt foi usado em excesso molar de 2 vezes.

A Tabela 3 mostra as sequências peptídicas e as suas massas molares esperadas.

Tabela 3: Dados de cada peptídeo sintetizado

Peptídeo	Estrutura	Massa Molecular, Mw (g/mol)
Tat (49-57)	H-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-OH	1339,63
1A	H-F _x -Arg-F _x -Lys- F _x -Arg-F _x -Lys-NH ₂	1198,66
SS02	Dmt-(D)-Arg-Phe-Lys-NH ₂	639,80
SS20	H-Phe-(D)-Arg-Phe-Lys-NH ₂	596,74

3.1.3. Síntese do DFO-NSuc

O DFO-NSuc foi sintetizado a partir do ácido succínico (Nsuc) e mesilato de desferrioxamina (DFO), os quais foram acoplados segundo a reação mostrada na Figura 13 e método descrito por nós anteriormente^{180,181}. O DFO (1,52 mmol) foi dissolvido em piridina (17 mL destilada recentemente), depois foi adicionado o anidrido do ácido succínico (3,46 mmol) para agitação e reação por um dia a temperatura ambiente. Observou-se a formação duma emulsão branca no segundo dia, quando se adicionou 200 mL de 0,015 mol L⁻¹ NaOH_(aq). A solução tornou-se transparente e permaneceu em agitação a temperatura ambiente por 15 h. Em seguida, a solução foi resfriada por 2 h com gelo e à ela foi adicionado HCl concentrado até pH 2. Filtrou-se e secou-se (< 170 °C) o precipitado obtido. A sua caracterização foi feita como se segue.

Figura13. Síntese do NSuc-DFO

A composição elementar foi determinada no equipamento Perkin Elmer Elemental Analyzer CHN 2400 (Central Analítica do IQUSP) para a quantificação de C, H, N e S. O espectro ¹H RMN do composto foi obtido no espectrômetro Bruker modelo A3-500 disponível na Central Analítica do IQUSP. A amostra foi preparada em DMSO deuterado e medida a 298 K.

3.1.4. Sínteses dos DFO-conjugados (mtDFO)

Foi utilizado anidrido do ácido succínico (Nsuc) e mesilato de desferrioxamina (DFO), os quais foram acoplados aos peptídeos segundo a rota sintética apresentada na Figura 14 seguindo rota sintética estabelecida por nós¹⁸¹ no Laboratório de Química de Peptídeos do IQ-USP. As seqüências dos peptidil-conjugados são apresentadas na Tabela 4. Em todos os conjugados se utilizou DFO, HBTU e HOBt em excesso molar de 4 vezes e DIPEA em excesso molar de 3 vezes em relação ao HBTU.

Figura 14. Rota sintética para a síntese dos conjugados (aa = Fmoc-aminoácido)

Tabela 4: Dados de cada mtDFO sintetizado

Peptídeo	Estrutura	Massa Molecular, Mw (g/mol)
DFO-Nsuc-Tat 49-57	DFO-Nsuc-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-OH	1982,38
DFO-Nsuc-1A	DFO-Nsuc- F _x -Arg-Ala-Lys- F _x -Arg- F _x -Lys-OH	1841,41
DFO-Nsuc-SS02	DFO-Nsuc-Dmt-(D)-Arg-Phe-Lys-NH ₂	1282,55
DFO-Nsuc-SS20	DFO-Nsuc-Phe-(D)-Arg-Phe-Lys-NH ₂	1237,80

3.1.5. Clivagem da resina, desproteção total e extração dos peptídeos e dos DFO-conjugados.

Clivagem do peptídeo da resina, desproteção total e extração do peptídeo

Essa etapa é um dos passos cruciais nas sínteses de peptídeos. O tratamento da peptidil-resina com um coquetel de clivagem e desproteção pode levar a diferentes reações químicas. Reagentes e condições não estudadas, podem ocasionar modificação ou dano irreversível no peptídeo, quando o interesse é remover o peptídeo do suporte sólido e remover todos os grupos protetores de cadeias laterais dos aminoácidos (Figura 15).

Figura 15. Reação de resina-peptidil totalmente protegida com o coquetel de clivagem e desproteção e alguns dos possíveis grupos protetores-scavengers acoplados ¹⁸².

Em nosso caso, as peptidil-resinas ou os mtDFO-resinas foram incubados em shaker por determinado tempo a 37°C na presença das seguintes misturas:

Tabela 5: Coquetel utilizados.

	Reagente K*	Reagente K	Reagente X	Reagente R	Reagente SH
Composição	-95% de TFA, -2,5% de H ₂ O -2,5% de Fenol	-82,5 % de TFA, -5 % de H ₂ O, -5 % de TIS, - 5 % de Tioanisol -2,5 % EDT	-95% de TFA, -5% de TIS	-90% de TFA, -5% de Tioanisol, -3% de Etanodiol -2% de anisol	-95% de TFA, -2,5% de H ₂ O e -2,5% de TIS

Para precipitar os peptídeos ou os conjugados, foi adicionado éter diisopropílico gelado e as misturas foram centrifugadas a 8000 rpm por 3 min. Os sobrenadantes, foram removidos e reservados. Esse procedimento foi repetido quatro vezes. Os precipitados foram dissolvidos com solvente A. As soluções foram separadas da resina por centrifugação a 8000 rpm por 3 min. Esse procedimento foi repetido duas vezes. O mesmo foi feito com o solvente B. As soluções resultantes foram juntadas e liofilizadas.

3.1.6. Análise, purificação e caracterização dos peptídeos e dos mtDFO

a – Cromatografia Líquida de Alta eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)

A RP-HPLC baseia-se na adsorção de compostos em uma matriz estacionária hidrofóbica, no caso sílica derivatizada pela introdução de cadeias alquílicas, tais como *n*-butila (C₄), *n*-octila (C₈), *n*-octadecila (C₁₈), fenila, ciclohexila e outras, e na partição de solutos entre essa fase estacionária e a fase móvel (ou eluente). A fase móvel geralmente empregada é ácida e com baixa força iônica ¹⁸³. São utilizados gradientes de dois eluentes: Solvente A (inicialmente a 95%), e Solvente B (inicialmente a 5%). O ácido utilizado determina o contra-íon do sal formado entre os grupos-NH₃⁺ do(s) peptídeo(s), o que afeta a eluição dos componentes da amostra cromatografada. A detecção foi feita utilizando-se absorção a 210 nm, característica de ligações peptídicas de aminoácidos sem grupos aromáticos.

As análises dos peptídeos e mtDFO, brutos e purificados, foram realizadas usando um sistema da LDC Analytical composto por um controlador de gradiente automático, duas bombas (ConstaMetric 3500 e ConstaMetric 3200), um detetor UV (Milton Roy, spectromonitor 3100), um injetor de amostras manual (Rheodyne 7125), um integrador (TermoSeparationProducts, Data Jet integrator) e uma coluna analítica (Vydac C₁₈, 5 µm, 300 Å, 0,46x25 cm). Foram injetados 10 µL de amostra de uma solução 1 g/L de extrato de peptídeo e usado o gradiente linear de 5%-95% do Solvente B em 30 min.

Os peptídeos e mtDFO brutos (80-50mg) foram purificados usando sistema RP-HPLC Waters (EUA), modelo 600E preparativo, composto de uma bomba quaternária (Waters Delta 600 Pump), um detetor UV

(Waters 2487 Dual Absorbance Detector), um injetor de amostras manual (Rheodyne 3725i-119), um controlador de gradiente automatizado (Waters 600 controller), um registrador Kipp&Zonen SE 124 e uma coluna preparativa (Vydac C₁₈, 10µm, 300Å, 2,2x25 cm). Os gradientes e tempos foram ajustados caso a caso (ver Tabela 6).

Tabela 6: Condições e gradientes empregados em análises e para purificação de peptídeos e conjugados

Peptídeos e mtDFO	Solv. B	Gradiente
DFO-Nsuc-Tat (49-57)	60%ACN em 0,1%TFA/H ₂ O	10%B→ ^{10'} → 10%B→ ^{80'} → 50%B→ ^{10'} →95%B
1A	60% ACN em 0,1%TFA/ H ₂ O	25%B→ ^{10'} →25%B→ ^{90'} →65%B→ ^{10'} →95%B
DFO-Nsuc-1A	60%%ACN em 0,1%TFA/H ₂ O	20%B→ ^{10'} →20%B→ ^{120'} →80%B→ ^{10'} →95%B
SS02	40%%ACN em 0,1%TFA/H ₂ O	5%B→ ^{10'} →5%B→ ^{80'} →45%B→ ^{10'} →95%B
DFO-Nsuc-SS02	40%%ACN em 0,1%TFA/H ₂ O	30%B→ ^{10'} →30%B→ ^{90'} →75%B→ ^{10'} →95%B
SS20	40%%ACN em 0,1%TFA/H ₂ O	5%B→ ^{10'} →5%B→ ^{80'} →45%B→ ^{10'} →95%B
DFO-Nsuc-SS20	40%%ACN em 0,1%TFA/H ₂ O	30%B→ ^{10'} →30%B→ ^{90'} →75%B→ ^{10'} →95%B

O solvente A usado foi a solução 0,1%TFA /H₂O.

b – Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI/MS)

Os peptídeos brutos e purificados, assim como os DFO-conjugados (mtDFO), foram caracterizados num equipamento composto por um sistema de RP-HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão, fluxo 0,8 mL/min), composto por um degaseificador modelo DGU-20A₃, duas bombas modelo LC-20AD, um injetor Rheodyne 8125, um forno de coluna modelo CTO-20A, uma pré-coluna C₁₈ (5 x 2 mm, 4,6mm) Shim-pack GVP-ODS e uma coluna C₁₈ (150 x 2mm, 4,6 µm e 12 nm) Shim-pack GVP-ODS acoplada a um espectrômetro de massas AmaZon X da Bruker Daltonics (Alemanha) com fonte de ionização do tipo eletrospray, modo ESI positivo e com analisador do tipo 'Ion trap'. As voltagens aplicadas foram 3500 V (capilar) e 37 kV (cone). Para as análises dos espectros foi utilizado o software HyStar 3.2. Os solventes utilizados na cromatografia foram: solvente A, gradiente linear de 5 a 95% de solvente B em 30 min ¹⁸⁴.

c – Análises de aminoácidos (AAA)

Todas as peptidil-resinas e DFO-conjugados (mtDFO) foram submetidas à hidrólise em uma mistura de HCl e ácido propiônico (600 µL; 1:1, v/v) ou em HCl 6 mol.L⁻¹ por 24 h a 130 °C numa estação de trabalho Pico-Tag (Waters-Millipore, Billerica/MA, EUA). Posteriormente, as amostras foram secas à vácuo em dessecador contendo pastilhas de KOH. As composições molares dos aminoácidos presentes nos hidrolisados foram determinadas no analisador automático da Dionex Corporation, Sunnyvale/CA, EUA) acoplado a um computador que utiliza a plataforma 'Chromeleon' (composto por bombas GS50, detector eletroquímico ED50 e forno cromatográfico LC50). Este emprega a determinação direta via detecção por amperometria pulsada (IPAD-Integrated Pulsed Amperometric Detection) com detector eletroquímico ED50. Neste, os aminoácidos livres são

separados também por HPLC de troca iônica utilizando uma coluna AminoPac PA10 (2,0 cm x 25,0 cm) da Dionex Corporation (Sunnyvale/CA, EUA).

A proporção molar de cada aminoácido foi determinada a partir de uma curva de calibração resultante da análise de uma solução padrão de aminoácidos de concentração conhecida ¹⁸⁵. Dessa forma, foi possível determinar os conteúdos de aminoácidos e, conseqüentemente, os graus de substituição das peptidil-resinas e conjugados.

3.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE QUELANTE DOS mtDFO

Este procedimento foi feito usando o leitor de microplacas (96 poços) BMG FluostarOptima, operando com incubação a 37°C por 2 h e $\lambda_{exc}/\lambda_{emis} = 485/520 \text{ nm}$ ¹⁸⁶. A solução de sonda fluorescente (calceína ou apotransferrina fluorescente, FI-aTf) foi preparada em solução tampão de HBS (*HepesBuffered Saline*, Hepes 20 mmol.L⁻¹; NaCl 150 m.mol.L⁻¹, Chelex 1 g/100 mL) em concentração de 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ¹⁸⁷. No caso da FI-aTf, o tampão ainda foi suplementado com bicarbonato de sódio 10 mmol.L⁻¹ ¹⁸⁷.

3.2.1- Teste com calceína

O teste foi feito adicionando-se 180 μL de calceína na microplaca e iniciando-se a leitura de fluorescência. Quando o sinal tornou-se constante (~10 min), foram adicionados 10 μL de sulfato ferroso amoniacal (FAS) 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e continuou-se registrando a fluorescência por outros 10 min (tempo suficiente para atingir a supressão de fluorescência). Finalmente foram adicionados 10 μL de conjugado em concentrações finais que variam de 0-10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, observando-se o ressurgimento da fluorescência da calceína (Figura 16). Os resultados foram apresentados como porcentagem de recuperação (%R) da fluorescência utilizando os valores de fluorescência nos pontos A, B, C e D (Equação 1). Um gráfico de %R x concentração de conjugado pode mostrar qual ligante tem a melhor capacidade de quelação para o ferro ^{188,186,189}.

Figura 16. Perfil da fluorescência da calceína devido à formação e destruição do complexo com ferro. A: fluorescência inicial. B: fluorescência suprimida pela adição de ferro. C: estabilização da fluorescência devido à supressão. D: ponto final de recuperação de fluorescência.

Na Figura 16, a linha vermelha (o linha mais alta na parte de recuperação de fluorescência) que vai do ponto C até o D mostra que a recuperação da fluorescência pode ultrapassar a fluorescência inicial. Mesmo após o tratamento com Chelex®, traços de ferro ainda podem estar presentes no tampão (principalmente devido ao NaCl utilizado) e fazem com que a fluorescência inicial (A) não seja tão alta quanto possível. Quelantes de alta afinidade removem tanto o ferro adicionado no experimento quanto esses traços iniciais de ferro, o que pode se refletir em uma recuperação de fluorescência maior que 100%, no final.

3.2.2. Teste com apotransferrina fluorescente (FI-aTf)

A síntese da sonda FI-aTf foi usando métodos já descritos^{187,190,181}. A desferrioxamina tem maior afinidade pelo ferro do que a transferrina, no entanto a cinética dessa reação é muito lenta, pois na proteína, o ferro encontra-se ligado em um compartimento afastado da superfície da molécula. Portanto, não poderíamos seguir exatamente o mesmo procedimento empregado na interação com a calceína (descrito acima). Aqui, invertemos a ordem de adição do ferro (Figura 17).

Adicionou-se 180 μL de FI-aTf 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ na microplaca e iniciou-se a leitura de fluorescência. Quando a leitura do sinal da fluorescência tornou-se constante (~ 10 min), foram adicionados 10 μL de mtDFO (0 – 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, concentração final). Após estabilização do sinal (~ 10 min), foram adicionados 10 μL sulfato ferroso amoniacal (FAS) 4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e continuou-se registrando a fluorescência o tempo suficiente para atingir a supressão de fluorescência (50 min).

Figura 17. Teste de interação dos mtDFO com ferro, avaliada pela FI-aTF

3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS CONJUGADOS mtDFO

A capacidade dos conjugados de suprimir a atividade pró-oxidante do sistema ferro-ascorbatofoi determinada por um método fluorimétrico, em condições fisiológicas do soro sanguíneo pH 7,4 a 37 °C, já

descrito^{188,191,181}. Em microplacas (96 poços) foram adicionados 180 µL de uma solução de dihidrorodamina (DHR) 50 µmol.L⁻¹ e ascorbato 40 µmol.L⁻¹ em tampão HBS/Chelex. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de solução de ``ferro`` entre 0 e 10 µmol.L⁻¹ e, em seguida, 10 µL da solução dos quelantes ou conjugados, a diversas concentrações. Onde a solução de ``ferro`` foi: Fe(NTA), também chamado **TESTE Fe(NTA)** ou Ferro proveniente de soro de pacientes, também chamado **TESTE SORO**.

A leitura –foi feita em equipamento BMG FluostarOptima, com incubação a 37 °C e $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 485/520 nm. A intensidade de fluorescência de cada poço foi medida em intervalos de um minuto durante uma hora. Os resultados foram apresentados como taxas de fluorescência (intensidade de fluorescência/tempo).

3.4. ESTUDO DA PERMEABILIDADE DOS CONJUGADOS mtDFO EM CÉLULAS HeLa

3.4.1. Cultura de células

Foram usadas células de câncer cérvico-uterino (HeLa) proporcionadas pelo Laboratório de Fotossensibilização nas Ciências da Vida do IQ-USP, do Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista, cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle (DMEM) complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, a 37 °C e 5% de CO₂ numa incubadora modelo COM-18AC-PA. As células foram repicadas com tripsina-EDTA 0,25% por 5 min a 37 °C¹⁸¹.

3.4.2. Ensaio de citotoxicidade

O ensaio colorimétrico azul de Trypan¹⁹² (screening, ensaio prévio) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade do uma sobrecarga de Sulfato ferroso amoniacal (FAS). A partir das curvas de dose-resposta, foram determinados os valores da concentração inibitória de 50% do crescimento (IC₅₀). Foi utilizado um microscópio com aumento total de 400x.

3.4.3. Estudos de imagem celular

As células foram semeadas em placas Petri para obtenção de imagens (2,5×10⁴ células/placa), tratadas com 2 mL de meio e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por 48 h para completar a aderência e confluência de 60% de células/poço. Em seguida, foram retiradas da incubadora e receberam, quando necessário, os tratamentos descritos abaixo e esquematizados na Figura 18:

- 1) Adição de 1 mL de FAS/ácido ascórbico (10 µmol.L⁻¹/100 µmol.L⁻¹ em água), incubados a 37°C por 10 min;
- 2) Adição de 1 mL de quelantes (DFO ou mtDFO) 20 µmol.L⁻¹ em tampão HBS, incubados a 37°C por 10 min;
- 3) Adição de 1 mL de DHR 30 µmol.L⁻¹ em tampão HBS, incubado a 37 °C por 20 min.

Entre cada uma das etapas acima, era efetuada uma lavagem cuidadosa das células com 1 mL de tampão HBS aquecido a 37 °C.

Figura 18. Distribuição dos ensaios de permeabilidade dos compostos quelantes em células. Foram estabelecidos dois controles: sem ferro, menor fluorescência (placa 1) e com ferro, maior fluorescência (placa 2).

As imagens de fluorescência foram obtidas no microscópio Axiovert 200 (Carl Zeiss 146 Göttingen, Alemanha). O conjunto de filtros usados foi: $\lambda_{\text{ex}} = 450\text{--}490\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} \geq 515\text{ nm}$. As imagens foram registradas em câmera digital Canon Power Shot G10. O estudo da densidade de pixels foi feito com o programa ImageJ (v. 1.43u).

3.5. SÍNTESE DE Tat, Tat-K, 1A-K, SS02 e SS02-K, SS20 e SS20-K COM VISTAS À CONJUGAÇÃO COM DFO-NSuc E MARCAÇÃO COM TAMRA

3.5.1. Síntese automatizada de peptídeos

Na Universidade de Toronto-Canada, sob supervisão da Dra. Shana O. Kelley, foi usado um sintetizador automático PreludeProtein Technologies Inc.(Toronto/Canada) mostrado na Figura 19 e como suporte polimérico $50\text{ }\mu\text{mol}$ (63,3 mg) a Rink amida MBHA adquirida da Novabiochem (San Diego/CA, EUA) de grau de substituição de $0,79\text{ mmol/g}$. O tamanho de partícula foi de 100 a 200 mesh. Os derivados de aminoácidos na concentração de $200\text{ }\mu\text{M}$ (Tabela 7) foram os seguintes: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH e Fmoc-Phe-OH da AdvancedChem Tech(FOB Louisville, KY/, EUA); Fmoc- β -cyclohexyl-Ala-OH e Fmoc-Lys(MTT)-OH da ChempepInc.(Wellington, EUA); Fmoc-Lys(MTT)-OH da Aapptec(Louisville, KY/, EUA). Também foram usadas as soluções: HBTU 400 mmol L^{-1} em DMF, N-Methylmorpholine/N,N-Dimetilformamida $0,40\text{ mol L}^{-1}$ (Protein Technologies Inc.) para reações de acoplamento e 20% piperidina/N,N- Dimetilformamida (v/v) da Protein Technologies Inc(Toronto/Canada) para reações de desproteção. A Tabela 8 mostra as sequências dos peptídeos e conjugados de interesse.

Figura 19. a) Equipamento para síntese em fase sólida a partir de 27 diferentes aminoácidos, b) Reatores: 6 sínteses ao mesmo tempo, c) Software de controle do sintetizador .

Tabela 7: Quantidades e volumes usados no sintetizador.

Reagentes (200 mmol L ⁻¹)	Mw (g/mol)	Solvente (mL) DMF
R	648,78	28
K	468,55	20
Q	610,7	7
Cha	393,48	13
r	648,8	17
F	387,44	9
K-MTT	624,77	15
HBTU (400 mmol L ⁻¹)	379,25	50

Tabela 8: Sequência de aminoácidos para mtDFO e mtDFO-TAMRA sintetizados

Denominação	Peptídeo/Conjugado	Estrutura	Massa Molecular, Mw (g/mol)
mtDFO	DFO-Nsuc-TAT (49-57)	DFO-Nsuc-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-OH	1982,38
	DFO-Nsuc-1A	DFO-Nsuc-Ala-Arg-Ala-Lys-Ala-Arg-Ala-Lys-OH	1841,41
	DFO-Nsuc-SS20	DFO-Nsuc-Phe-(D)-Arg-Phe-Lys-NH ₂	1238,50
mtDFO-TAMRA	DFO-Nsuc-Tat-K-TAMRA	DFO-Nsuc-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Lys-TAMRA	2523,00
	DFO-Nsuc-1A-K-TAMRA	DFO-Nsuc-Ala-Arg-Ala-Lys-Ala-Arg-Ala-Lys-Lys-TAMRA	2382,03
	DFO-Nsuc-SS02-K-TAMRA	DFO-Nsuc-Dmt-(D)-Arg-Phe-Lys-Lys-TAMRA	1823,14
	DFO-Nsuc-SS20-K-TAMRA	DFO-Nsuc-Phe-(D)-Arg-Phe-Lys-Lys-TAMRA	1779,12

3.5.2. Acoplamento de DFO e marcação com TAMRA

Os acoplamentos com NSuc às peptidil-resinas seguidos de incorporações de DFO foram realizados manualmente (Figura 20) como já foi descrito e está resumido nas figuras abaixo. Dois procedimentos foram depois explorados¹⁵⁴.

Remoção do grupo MTT da K(MTT): em 3% TFA, 3% TIPS em DCM, a temperatura ambiente por 15 min, seguida de duas lavagens DCM/MeOH/DMF.

Acoplamento com TAMRA: 50 μ mol de peptidil-resina, excesso molar de quatro vezes (5,6)-TAMRA e HBTU em excesso molar de oito vezes DIPEA em DMF por 2 h a temperatura ambiente e com agitação¹⁵⁴. Para o monitoramento dos acoplamentos e desproteção foi utilizado o teste de ninidrina).

Figura 20. Sistema reacional para a obtenção de mtDFO e mtDFO-TAMRA

Figura21. Procedimento 1.

Onde pep:
-Tat (49-57)
-1A
-SHS02
-SS20

Figura22. Procedimento 2.

3.5.3. Clivagem do peptídeo da resina, desproteção total e extração dos peptídeos e dos DFO-conjugados

Um tubo micro-concentrador, colocou-se uma massa de peptidil-resina, mtDFO-resina ou mtDFO-TAMRA-resina, adicionou-se o reagente clivador SH (ver Tabela 9) e incubou-se em shaker por 2 h a temperatura ambiente. Para precipitar o peptídeo, mtDFO ou mtDFO-TAMRA, foi adicionado éter etílico gelado e a mistura foi centrifugada a 8000 rpm por 5 min. Esse procedimento foi repetido duas vezes com éter etílico. A extração do peptídeo, mtDFO ou mtDFO-TAMRA foi feita adicionando-se solvente A ao material insolúvel. O sobrenadante foi removido por centrifugação a 8000 rpm por 5 min. Esse procedimento foi repetido 2 vezes. Repetiu-se a lavagem com solvente B e a centrifugação. Os sobrenadantes foram secados numa bomba de vácuo.

3.6.CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS, mtDFO e mtDFO-TAMRA

3.6.1. Cromatografia Líquida de Alta eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)

HPLC de fase reversa foi realizada em sistema para HPLC Agilent 1100, utilizando uma coluna analítica (Varian C₁₈, 5 µm , 250 x 4,6 mm) e fluxo de 1 mL/min ou uma coluna semi-preparativa (Hamilton PRP-1, 10 µm, 250 x 10 mm ou C₁₈, 9,4 mm x 250 mm)) e fluxo de 3,0 mL/min. Para a HPLC analítica, foi usado um gradiente linear de solvente de 5 a 95% de de B por 60 min e detecção na faixa de UV (210, 280, 256 e 516 nm) num espectrofotômetro de díodos Agilent8453.

3.6.2. Espectrometria de massas (MALDI)

Foi utilizada a técnica MALDI-TOF/MS (Matrix Assisted Laser Desorption ionization-Time of Flight/ mass spectrometry). O equipamento para a espectrometria de massa foi um Ettan MALDI-TOF (Amershan Bioscience,

Suécia), para valores de massa/carga [m/z] de 450 até 3000, detectando íons carregados positivos. Usou-se como matriz a solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em ACN/H₂O 1:1. Os espectros foram obtidos após 3 min do início da leitura ou pelo acúmulo de 200 espectros simples. A energia do laser no começo da análise era de 43%, anteriormente foi feita calibração com um padrão de peptídeos angiotensina II e P14R (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de massas moleculares de 1045,53 e 1532,86 Da, respectivamente.

A amostra foi misturada com uma matriz sobre uma placa de metal condutora. Depois da cristalização da matriz junto com a amostra, a placa metálica foi introduzida no espectrômetro de massas, onde foi bombardeada com breves pulsos de laser. As moléculas dessorvidas e ionizadas foram aceleradas por meio de um campo elétrico e entraram em um tubo metálico submetido a vácuo (tubo de vôo, por onde as moléculas passam) até atingirem o detector. Os íons com tamanho menor (m/z) viajam mais rapidamente pelo tubo de vôo do que os de tamanho maior. Desse modo, os analitos ou substâncias das amostras, separados por TOF formam espectros de massa de acordo com sua razão m/z (massa/carga) e com picos que indicam quantidades variáveis de cada substância analisada (analito) ¹⁹³.

3.7. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS mtDFO

3.7.1. Cultura de Células

A célula A2780 (carcinoma de ovário) foi cultivada como monocamadas subconfluentes em meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (FBS) complementado com 1% de antibióticos ¹⁹⁴.

3.7.2. Ensaios de citotoxicidade

O ensaio colorimétrico CCK-8 foi utilizado para avaliar a citotoxicidade dos compostos (peptídeos, mtDFOs e TPP-DFO), utilizando um protocolo previamente descrito ¹⁹⁵. A partir das curvas de dose-resposta, os valores da concentração inibitória de 50% do crescimento (IC₅₀) foram determinados por interpolação.

3.7.3. Experimentos de imagem celular

As células foram semeadas numa placa de formação de imagens, 1 μ -slide de 8 poços ibitreat (Ibidi/cells in focus-Alemanha), com 2 mL de meio, até 60% de confluência. O meio foi trocado por outro contendo 1 ou 10 μ mol.L⁻¹ de MPP-TAMRA/ DFO-MPP-TAMRA, e as células foram incubadas por 1 h. O marcador MitoTracker Green (para mitocôndria) foi adicionado às células em concentrações de 1,25 a 4,0 μ mol L⁻¹ e incubados por 30 min. O meio foi aspirado e as células foram lavadas com 3 $\times$ 1mL de PBS e tratadas com 2 mL de DMEM isento de corante. As imagens foram obtidas com um microscópio de epifluorescência invertido Zeiss Axiovert 200M equipado com uma câmera digital EM-CCD (Hamamatsu). A fonte de luz foi uma lâmpada metal-haleto (EXFO) e as imagens de fluorescência foram obtidas com objetiva de imersão em óleo com ampliação de 63 $\times$. O microscópio era operado pelo software Volocity de Perkin-Elmer. A co-localização dos corantes foi quantificada utilizando o programa ImageJ ¹⁹⁶ utilizando um protocolo descrito previamente ¹⁹⁷. As células foram fotografadas usando um protocolo descrito anteriormente ¹⁵⁴. Todos os conjugados marcados

mtDFO-TAMRA foram avaliados desde a concentração $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ até $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com tempo de exposição desde 30 segundos a 2 minutos (Anexo A7) com a finalidade de evitar fotodegradação e formação de vesículas ("blebbing") na membrana plasmática, ou seja morte celular por apoptose ¹⁹⁸. As imagens para todas as concentrações estudadas foram mostradas na seção de Anexos, A7.

3.7.4. Determinação de danos no DNA por qPCR

As células A2780 foram semeadas em 2×10^5 células/poço e deixadas a aderir durante a noite. As células foram tratadas com MPP e DFO-MPPs por 6 h e colhidas depois de tripsinização. O DNA foi isolado a partir dos sedimentos celulares usando o kit de mini preparo GenElute de DNA genômico (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação de um segmento de 8,9 kb de DNA mitocondrial ou 12,2 kb do segmento de DNA genômico foi realizada utilizando a enzima de longo alcance elongase do kit de PCR (Invitrogen) como descrito anteriormente ¹⁹⁹.

3.7.5. Análise do ciclo celular

As células A2780 foram semeadas em placas de 12 poços com uma densidade de 10^5 células/mL e deixadas a aderir durante a noite. Em seguida foram tratadas com DFO-MPPs e foram incubadas por 24 h, depois foram colhidas por tripsinização e fixadas a 4°C com MeOH 70 % por 2 h. Estas foram centrifugadas, o MeOH foi removido, e o sedimento de células remanescente foi lavado com PBS. As células foram suspensas em PBS, incubadas com 0,2 mg/mL de RNase por 1 h a 37°C coradas com $10 \mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio e analisadas através da citometria de fluxo usando o equipamento FACSCanto (BD Biosciences). A quantificação dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo. Pelo menos 10^4 células foram analisadas para cada amostra¹⁵⁴.

3.7.6. Análise dos níveis de superóxido mitocondrial

As células A2780 foram semeadas em placas de 12 poços com uma densidade de 10^5 células/mL e deixadas a aderir durante a noite. Em seguida foram tratadas com DFO-MPPs e incubadas durante 24h, depois o meio foi removido e as células foram lavadas com uma solução tamponada salina (PBS) e, em seguida, incubadas com $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de reagente MitoSox (Invitrogen) em PBS durante 30 min na ausência de luz. Depois foram lavadas três vezes com PBS, colhidas após a tripsinização, e foram analisadas através de citometria de fluxo com FACSCanto. Pelo menos 10^4 células foram analisadas para cada amostra ¹⁵⁴.

3.7.7. Ensaio de Apoptose (Anexina V)

As células A2780 foram semeadas em placas de 12 poços com uma densidade de 10^5 células/mL e deixadas a aderir durante a noite. Em seguida, as células foram tratadas com DFO-MPP durante 24 h. Após a incubação, as células à temperatura ambiente foram coradas com anexina V-FITC durante 15 min e 5 nmol L^{-1} de Sytox vermelho por mais 15 min. A análise foi realizada por meio de citometria de fluxo com FACSCanto (BD Biosystems). Pelo menos 10^4 células foram analisadas para cada amostra ¹⁵⁴.

3.8. CÁTIONS LIPOFÍLICOS DESLOCALIZADOS

3.8.1. SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO TPP-DFO

Foram usados os reagentes FTP_(s) da Sigma-Aldrich Chemical Co.(St Saint Louis/MO, EUA) e DFO_(s) da Novartis Biociência S. A. (SP, BRASIL) e os solventes abaixo listados: Os solventes para: DMF, CHCl₃, C₆H₆ e H₂O do equipamento (Millipore, Bedford/MA/EUA). Foram preparados para uso como eluentes para RP-HPLC e LC/MS os seguintes solventes. Solvente A: 0,1%TFA/H₂O, Solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O e Solvente B^c: 80%ACN/0,09%TFA/H₂O.

A síntese foi realizada da seguinte forma: em balão de fundo redondo foi adicionado FTP (0,65 mmol) dissolvido em 20 mL de clorofórmio e, gota a gota, uma solução de DFO (0,185 mmol) em 5 mL DMF (Figura 23). A mistura foi deixada a 140 °C sob agitação por 20 h, eliminando a água que foi produto secundário da reação com o extrator Soxhlet. Esta metodologia foi modificada da referência²⁰⁰. Os solventes foram eliminados por rota-evaporação,o composto marrom foi lavado várias vezes com benzeno e água. e foi submetido à recristalização em clorofórmio/acetato de etila.

Figura 23. Frasco reacional para a síntese da imina.

As análises da imina bruta e da purificada, assim como a purificação em coluna semi-preparativa da imina bruta, também foram feitas no Laboratório de Química de Peptídeos do IQ-USP, sob supervisão da Profa. Dra. M. Terêsa Machini, HPLC analítico: foram injetados 10 µL de amostra de uma solução 1 g/L dissolvido em solvente B^c e usados o gradiente linear de 5%-95% do solvente B por 60 min e o fluxo de 3 mL/min.

RP-HPLC semi-preparativo: Foram injetados 500 µL de amostra de uma solução 50 mg/L dissolvida em solv. B, e usados um gradiente linear 30%B → 10' → 30%B → 60' → 90%B → 10' → 95%B fluxo de 3 mL x 1 min

A imina purificada foi caracterizada por LC-ESI/MS num equipamento composto por um sistema de RP-HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão, fluxo 0,8 mL/min), composto por um degaseificador modelo DGU-20A₃, duas bombas modelo LC-20AD, um injetor Rheodyne 8125, um forno de coluna modelo CTO-20A, uma pré-coluna C₁₈ (5 x 2 mm, 4,6 mm) Shim-pack GVP-ODS e uma coluna C₁₈ (150 x 2 mm, diâmetro de partícula = 4,6 µm e diâmetro de poro = 12 nm) Shim-pack GVP-ODS acoplada a um espectro de massas AmaZon X da Bruker Daltonics (Alemanha) com fonte de ionização do tipo eletrospray, modo ESI positivo e com analisador do tipo 'Iontrap'. As voltagens aplicadas foram 3500 V (capilar) e 37 kV (cone). Para as análises dos espectros foi utilizado o software HyStar 3.2. Os solventes utilizados na cromatografia foram o solvente A e B, a gradiente linear foi 5 a 95% de solvente B em 30 min.

O composto purificado foi também analisado por ¹H RMN, tendo sido usado o espectrômetro Bruker modelo A3-500 disponível na Central Analítica do IQUSP. A amostra foi preparada em DMSO deuterado e o espectro foi obtido a 298 K.

3.9. AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA MORFOLOGIA MITOCONDRIAL EMMIÓCITOS CARDÍACOS

Esta parte do trabalho foi feita no Laboratório de Bioquímica do Estresse Oxidativo da Universidade de Lleida-Espanha sob supervisão da Prof. Dr. Joaquim Ros.

3.9.1. Experimentação em animais

A pesquisa com animais de experimentação seguiu as diretrizes da Generalitat de Catalunya e do governo da Espanha (artigo 33^a 214/1997) e foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética de Animais Experimentais da Universidade de Lérida. Foram utilizados 12 ratos neonatos P3-P4 SpragueDawley, sendo sacrificados por decapitação.

Todo o procedimento para o estudo do déficit de frataxina em cardiomiócitos foi apresentado na Figura 25.

3.9.2. Isolamento e cultura de NRVMs (*Neonatal Rat Ventricular Myocytes*)

Os NRVMs foram obtidos dos corações ²⁰¹, com algumas modificações ²⁰². Brevemente, os ventrículos de ratos recém-nascidos foram triturados e as células foram isoladas por digestões com 4 unidades/mL de solução de collagenase (Worthington, EUA) a 15% em termo-mixer por 15 min a 37 °C a 1100 rpm. As células que não eram cardiomiócitos foram separadas por um replaqueamento depois de 45 min. Os cardiomiócitos foram cultivados em microplacas de cultura (4 poços) com 0,2% de recobrimento de gelatina (Falcon, Bectonand Dickinson, EUA), a 7,5×10⁴ células/cm², gerando uma monocamada confluenta de células que se contraem espontaneamente depois de 24 h. Para inibir a proliferação dos fibroblastos cardíacos, as células foram tratadas com 10 mg/mL de mitomicina C (Sigma) por 4 h, depois de começar a cultura. O meio de cultura utilizado foi o

DMEM com glicose 5 m.mol.L⁻¹ de 3:1, 8% de soro equino e 4% de soro fetal bovino, GlutaMAX e hepes (Gibco) de pH 7,4.

A pureza dos cardiomiócitos foi verificada através de imunofluorescência com o anticorpo β -actinina cardíaca (Sigma), sendo necessário ter uma resposta superior a 90% depois de 24 h de incubação *in vitro*.

3.9.3. Inoculação de lentivírus na cultura de NRVMs

Para ter uma medida relativa da quantidade de vírus necessária para infectar os cardiomiócitos, estes foram plaqueados e adicionados diferentes quantidades de vírus contendo a proteína fluorescente verde (GFP). As células infectadas foram contadas e a porcentagem em relação ao número total de células foi medida. Para a transdução dos NRVM, após 4 h de incubação com mitomicina C, o meio foi trocado por outro enriquecido com 5,5 ng/1000 células de mitomicina C. Após 20 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco. Esse protocolo garante uma eficiência de transdução superior a 70%, de acordo com o vetor de controle GFP.

Para a produção dos lentivírus, são necessários dois plasmídeos, um para o envólucro e outro que contenha o transgene que se deseja entregar às células-alvo. Os plasmídeos lentivírus shRNA (pLKO.1-puro) para frataxina humana/rato/camundongo foram adquiridos da Sigma. A RefSeq usada foi NM_008044, que corresponde à frataxina de rato. Os clones TRCN0000197534, referidos por sh34, foram desenhados pela interferência de frataxina de rato em uma região 100% idêntica à frataxina de rato. Uma sequência “scrambled” não específica (shscr, ativação de infecção e maquinaria de interferência) serviu como controle (Figura 14). Foi utilizada a proteína GFP contendo o vetor para otimizar a eficiência da transdução. Os lentivírus foram titulados utilizando o kit ELISA Quicktiter Lentivírus (CellBiolabs), que quantifica a proteína frataxina^{93,202}.

3.9.4. Aplicação dos conjugados mtDFO na cultura de NRVM tratada com lentivírus

Após 20 h da inoculação de lentivírus o meio de cultura foi trocado por meio fresco (controle) ou por meio contendo os conjugados de DFO, nas concentrações finais de 2,5 e 25 μ mol L⁻¹, como mostra a Figura 24. As células foram incubadas por 48 h, e novamente o meio foi trocado seguindo os mesmos tratamentos acima. Esse procedimento foi repetido por seis dias, sendo o tratamento feito em dias alternados.

3.9.5. Marcação subcelular e análise das imagens

No sétimo dia, as mitocôndrias foram marcadas através da adição de MitoTrackerRedCMXRos 100 nmol.L⁻¹ por 3 min e lavadas com meio sem soro. As imagens foram obtidas em um microscópio Olympus IX71 equipado com ótica de epifluorescência e uma câmera CCD DP70 (Olympus), com aumento de 40 $\times$.

Nos cardiomiócitos, as mitocôndrias estão arranjadas de maneira regular, distribuídas em linhas com pequenas manchas de tamanhos semelhantes. As células são classificadas como desarranjadas quando suas mitocôndrias não mostram uma aparência tão regular, tanto em tamanho como em distribuição espacial. Uma estimativa do percentual de mitocôndrias desarranjadas pode ser obtida utilizando a ferramenta “analisador de partículas” do software ImageJ, buscando por mitocôndrias inchadas (definidas pelo tamanho maior que 2 μ m² e

circularidade entre 0,5 e 1), em pelo menos 75 células de oito campos microscópicos distintos. As imagens de fundo foram subtraídas ²⁰².

Um resumo de todo o procedimento da avaliação da morfologia mitocondrial dos cardiomiócitos se encontra na Figura 25.

Figura 24. Montagem experimental para o estudo dos miócitos com deficiência de frataxina. a) Placa do controle/sem droga, b) placa para um composto/droga (DFO, mtDFO, TPP-DFO e FTP) a concentrações alta ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) ou baixa ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) c) disposição das 8 placas de Petri, drogas e controle. Shscr= scrambled (controle só com o lentivirus).

Figura 25. Procedimento para o estudo do déficit de frataxina em cardiomiócitos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – SÍNTESE DOS mtDFO

4.1.1. Sínteses manuais das peptidil-resinas

A Tabela 2 em materiais e métodos refere-se às sínteses dos peptídeos ligados à resinas acompanhadas pelo teste de ninidrina (Figura 26). Quando existe amina livre (desprotegida pelo grupo Fmoc), o teste dá coloração azulada (positiva), quando não (protegida por outro aminoácido ou pelo Fmoc) a coloração é amarelada (teste negativo). A cor púrpura intensa provém do ânion estabilizado por ressonância denominado *púrpura de Ruhemann*. A ninidrina produz a mesma coloração púrpura, independentemente da estrutura do aminoácido original, detectando todos eles. A cadeia lateral do aminoácido se perde na forma de aldeído ¹⁷⁷. A sensibilidade de detecção é de cerca de 1 µmol/g de resina ²⁰³.

Figura 26. Reação de aminoácido amina livre com ninidrina.

Na síntese do peptídeo Tat (49-57), após reação do Fmoc-aminoácido à resina, o teste de ninidrina revelou alguns grãos azuis indicativos de aminas livres (que podem ocasionar reações não desejadas) ²⁰³. Por isso, foi feita a sua acetilação usando anidrido acético (Figura 27).

Figura27. Reação de aminoácido com anidrido acético.

Os outros peptídeos-resina que mostraram na etapa de acoplamento um teste de ninidrina inconclusivo foram submetidos ao reacoplamento do Fmoc-aminoácido, sem mostrar dificuldades. A Figura 28 sumariza a formação de ligação peptídica em presença de DIC e HOBt ²⁰³.

O fato de os peptídeos brutos obtidos (a partir de tomada de amostras de 10 mg das peptidil-resinas obtidas, exposição delas à condições de desligamento dos peptídeos das resina/desproteção total, isolamento dos peptídeos dos meios reacionais e análise deles por RP-HPLC e espectrometria de massas) terem fornecido os resultados analíticos condizentes com os teóricos esperados, indicaram o sucesso do trabalho sintético realizado.

Figura28. Mecanismo de formação de ligação peptídica através da ativação carbodiimida ²⁰³.

Nossas sequências de MPPs foram desenhadas a partir de duas propriedades importantes que permitem a passagem através das membranas celular plasmática e mitocondrial: a carga positiva e o caráter lipofílico ¹⁶¹. Oligômeros baseados em arginina conseguem altos níveis de absorção celular ¹¹⁴. Moléculas carregadas positivamente também podem ser facilmente transportadas, devido ao gradiente de potencial o qual carrega as espécies catiônicas desde o espaço extracelular ¹⁶¹. Por outro lado, as membranas mitocondriais são mais hidrofóbicas que as membranas citoplasmáticas, o qual exige peptídeos com alta lipofilicidade que possam atravessar esta bicamada lipídica ¹²⁸. Zhao e colaboradores ¹⁶⁹ descreveram a entrega bem sucedida de peptídeos antioxidantes contendo resíduos catiônicos e hidrofóbicos dispostos de forma alternada. Nós usamos esses mesmos resíduos que proporcionaram carga positiva, lisina (K) e arginina (R) e lipofilicidade, fenilalanina (F) e ciclohexilalanina (Fx). Anexo(A1-A). Estes peptídeos também foram selecionados para a conjugação porque não exibem toxicidade significativa para células humanas ²⁰⁴, e alguns contêm aminoácidos não usuais, sendo menos sensíveis à digestão total catalisada por proteases ¹⁵².

O peptídeo Tat (47-57) da proteína trans-ativadora VIH com sequência YGRKKRRQRRRP não pode entrar na mitocôndria ^{189,181}, além de ter muitos resíduos catiônicos. A exclusão de resíduos muito básicos gerou uma nova sequência RKKRRQRRR, Tat (49-57) que permite uma maior facilidade no acesso à mitocôndria ¹⁵⁷. Aparentemente, não há necessidade de se alternar os resíduos lipofílicos com os carregados para facilitar a penetração mitocondrial, já que peptídeos com dois ou três resíduos adjacentes carregados positivamente podem entrar na mitocôndria ¹⁵⁷.

O peptídeo 1A foi estudado com diversas cargas lipofílicas e fluoróforos, a maioria de conjugados gerados mostrou uma absorção na membrana mitocondrial ¹⁶¹. O tetrapeptídeo SS02 apresenta um resíduo Dmt com similaridade estrutural à vitamina E ¹¹⁴, sendo também conhecido como peptídeo endógeno opióide que atravessa a barreira hemato-encefálica (BBB) ²⁰⁵. Seu análogo SS20 não apresenta esta atividade antioxidante mas pode ingressar à mitocôndria ¹⁶¹.

Estes MPPs possuem características favoráveis como vetor de administração: síntese simples, fácil derivatização e biocompatibilidade ²⁰⁶. Este estudo é o primeiro em identificar sistematicamente níveis de toxicidade, localização mitocondrial e o efeito da carga DFO como molécula bioactiva, que permitem o acesso à mitocôndria.

4.1.2. Sínteses automatizadas das peptidil-resinas

O uso do sintetizador automático Prelude Protein Technologies Inc propiciou um ganho de tempo, pois ele permite 6 sínteses simultâneas e necessita de apenas 27 h para a síntese do peptídeo mais longo, Tat (49-57).

4.1.3. Síntese e caracterização do DFO-NSuc

A síntese de N-succinildesferrioxamina ou DFO-NSuc foi muito utilizada na avaliação de função renal há uma década atrás ^{207,180,208} pois este composto pode se ligar fortemente a vários metais através do DFO e a outras moléculas de importância biológica como proteínas, antioxidantes ¹⁹¹, peptídeos ¹⁸⁹, anticorpos monoclonais através do succinato²⁰⁸. Ligada ao NSuc, a DFO não perde sua habilidade como quelante ^{189,208}. Este é um novo protocolo para a formação de mtDFOs estabelecido em trabalho anterior para obter informações sobre a capacidade ligante e toxicidade desses compostos ¹⁸⁹.

Considerando-se a fórmula do DFO-NSuc como C₂₉H₅₂N₆O₁₁ (660,37 g/mol), obtivemos uma excelente concordância experimental na análise elementar (Tabela 9) comparada com a literatura²⁰⁹.

Tabela 9: Análise elementar do DFO-NSuc

	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio
Teórico	52,71	7,93	12,72
Experimental	52,53	7,91	12,72

Os deslocamentos químicos do espectro 1H RMN (500 MHz, D₆-DMSO) do DFO-NSuc são apresentados na Figura 29 e Tabela 10 com as respectivas interpretações baseadas no software MestRe-C (<http://mestrelab.com>).

A partir da Figura 29 e da Tabela 10, observam-se dezoito prótons (A,B e C) **m** com deslocamento entre 1,00-1,60 ppm; três prótons D, **s** com 1,97 ppm; doze prótons (E,G e I) **m** entre 2,29-3,01 ppm; seis prótons (H) **m** com 2,79 ppm; seis prótons (K) **t** com 3,46 ppm; três prótons (L) com 7,85 ppm, sendo alguns picos confirmados pela literatura ^{210,209,208}.

Figura29. Espectro ^1H RMN do DFO-NSuc

Tabela 10. Tabela de deslocamento químico de hidrogênio para o DFO-NSuc.

Tipo de hidrogênio	Próton	δ (ppm)	Referência
A		1,21 (6H)	210
B		1,38 (6H)	210
C		1,47 (6H)	210
D		1,97 (3H)	210
δ	$-\text{N}(\text{OH})-$	2,0(3H)	197
E		2,29 (4H)	210
F	DMSO (CH_3)	2,53 (3H)	211
G		2,59 (3H)	210
H		2,49(4H)	197
I	$-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$	3,01 (4H)	210

J	H ₂ O (Impureza do solvente)	3,46 (2H)	210
K		3,37 (6H)	210
L	-NH-CO-	7,85 (3H)	210
M	-CO-H	9,7 (1H)	197

4.1.4. Sínteses dos DFO-conjugados (mtDFO) feitas na Universidade de São Paulo

Nosso grupo descreveu recentemente conjugados entre CPPs com Deferasirox (DFX) ¹⁸¹ e DFO ¹⁸⁹ (quelantes de ferro tridentado e hexadentado respectivamente)²¹². O DFO foi a primeira droga utilizada no tratamento de doenças de sobrecarga de ferro ¹⁹¹. Tratamentos clínicos de doenças neurodegenerativas, como a Ataxia de Friedrich, caracterizada pela sobrecarga de ferro na mitocôndria ¹²², são pouco eficientes devido à baixa permeabilidade do DFO à barreira hemato-encefálica (BBB) ¹⁸⁹. Até agora, foram desenvolvidos diversos ligantes bidentados, neuroprotetores e permeáveis à BBB, entretanto as altas concentrações necessárias (3:1, quelante : ferro) comparados com ligantes hexadentados (1:1, quelante : ferro) podem comprometer sua eficácia¹⁸⁹. Por isso, existe um enorme interesse na concepção de novos agentes quelantes de ferro, que sejam específicos transportadores mitocondriais de DFO.

Nas sínteses dos mtDFO, o ácido succínico (NSuc) foi utilizado como um ligante bifuncional contendo dois grupos carboxila, onde o primeiro serviu para a conjugação com o extremo N (nitrogênio) das peptídil-resinas. A segunda carboxila forma uma ligação amida quando reage com a amina livre do DFO.

A Figura 30A mostra o acoplamento do anidrido do ácido succínico (NSuc) e a deferrioxamina (DFO) que mostrou um teste de ninidrina negativo, o que foi confirmado pela adição de uma solução de FeCl₃ em DMF, onde os grãos amarelos se converteram vermelhos em poucos min (Figura 30B) devido à ligação DFO-Fe. As estruturas dos mtDFO sintetizados são mostradas no Anexo (A1-B).

Figura 30. Rota sintética para obter os mtDFOs e teste qualitativo para verificar o acoplamento DFO ao NSuc-peptidil-resina.

4.1.5. Síntese dos mtDFO marcados com TAMRA feitos na Universidade de Toronto

Peptídeos de penetração celular (CPPs) e mitocondrial (MPPs) que derivam de vírus e proteínas mamíferas ²¹³ podem transportar cargas macromoleculares dentro de células vivas ¹⁶¹. No entanto, a eficiência de entrega celular destes reagentes é frequentemente sub-ótima porque muitas vezes os conjugados CPP-carga permanecem presos dentro dos endossomos ²¹⁴. É por isso que uma marcação com o fluoróforo TAMRA (derivado da Rodamina) ajuda a acompanhar visualmente sua penetração celular e mitocondrial. As diferenças entre as estruturas da Rodamina e TAMRA se mostram no Anexo (A2-A). Curiosamente, alguns estudos descrevem que a irradiação com luz aos CPPs com marcação fluorescente (CPP-TAMRA) aumenta a liberação do peptídeo e suas cargas para o citosol ²¹⁵. No entanto, o mecanismo do fenômeno não é claro. Alguns estudos relatam a foto-citotoxicidade deste tipo de compostos ²¹⁶.

Os peptídeos que foram marcados com o TAMRA vieram da síntese feita com o sintetizador automático, através do procedimento 1 e procedimento 2 de materiais e métodos. Nos dois casos a marcação foi muito bem sucedida, a diferença entre elas foi a eficiência da marcação; os resultados obtidos são apresentados nas seções de HPLC e MALDI (embaixo) e nos Anexos (A3 e A5 respectivamente). As estruturas dos mtDFO-TAMRA sintetizados se mostram no Anexo (A2-B), mas a Figura 31 mostra uma ideia geral da construção destes compostos.

Figura 31. Estrutura do mtDFO marcado com TAMRA: DFO-NSuc-tat-K-TAMRA.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS E mtDFO

4.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)

O peptídeo Tat (49-57) vindo das sínteses manuais feitas na USP foi obtido na forma bruta após exposições aos reagentes X, R e K (ver Tabela 5) e mostraram diferentes perfis cromatográficos (Figura 32). Como se observa, o de melhor qualidade é aquele vindo do uso do reagente X. Isso foi esperado porque os scavengers tioanisol, anisol e etanodiol reagem com os carbocátions altamente reativos e espécies gerados na desproteção total do peptídeo que são suscetíveis aos alquilatos e sulfonatos (grupos protetores), deixando os resíduos aminoácidos livres de reações indesejadas ²¹⁷. O mesmo tipo de estudo foi realizado também para os peptídeos 1A, SS02, SS20 e mtDFO, resumidos na Tabela 11.

Figura 32. Perfis cromatográficos do peptídeo Tat (49-57) bruto resultante da SPFS a 60°C-aquecimento convencional obtidos a partir da clivagem do peptídeo da resina/desproteção total com: a) reagente X, b) reagente K e c) reagente R por 3h. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min, V: 10 µL.

Tabela 11: Condições de clivagem dos peptídeos das resinas/desproteção total dos peptídeos e DFO-conjugados feitos na USP.

Peptídeos e DFO-conjugados	Mistura reacional	Tempo	Rendimento (%)
TAT(49-57)	Reagente K*	3 h	37
DFO-Nsuc-TAT(49-57)		3 h 30min	47
1A	Reagente X	1 h	68
DFO-Nsuc-1A		1 h 30min	80
SS02	Reagente K	1 h 30min	79
DFO-Nsuc-SS02	Reagente K	1 h 45min	40
SS20	Reagente K	1h 30min	82
DFO-Nsuc-SS20	Reagente SH	30min	80

Os peptídeos Tat (49-57) obtidos após tratamento com o reagente X por 3 e 6 h, mostraram perfis cromatográficos diferentes (Figura 33), sendo o de 6 h o de melhor qualidade. O efeito do tempo também foi verificado para os peptídeos 1A, SS02, SS20 e mtDFO (Tabela 11).

Figura 33. Cromatogramas dos peptídeos brutos obtidos: a) branco contendo o scavenger TIS, b) Tat (49-57) bruto obtido em 3h e c) Tat (49-57) bruto obtido em 6h de incubação com a mistura reacional, clivagem do peptídeo da resina/desproteção total. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min, V: 10 µL.

Tat (49-57) contém aminoácidos polares (glutamina) e com carga (arginina e lisina) ¹¹⁴, sendo uma sequência de aminoácidos muito hidrofílica. E a partir desses cromatogramas (Figura 33) se deduz que o nosso peptídeo pode ser representado pelos picos menores (8 – 9 min): peptídeo desejado (pico 2), contendo peptídeo acetilado no quarto aminoácido (pico 1). Enquanto que o contaminante eluído em 23 min corresponde a um composto mais hidrofóbico que (Tat (49-57), não desprotegido totalmente (pico 3).

DFO-NSuc-Tat (49-57) contém Tat (49-57), DFO e NSuc, que apresentam tempo de retenção maior (14 min) porque tem uma estrutura mais volumosa e interage com a fase imóvel apolar (coluna C₁₈). A Figura 34 mostra o perfil cromatográfico do DFO-NSuc-Tat (49-57) bruto e purificado. Em geral todos os conjugados são mais volumosos e lipofílicos e apresentam maior tempo de retenção.

1A e DFO-NSuc-1A contém resíduos de aminoácidos com carga (arginina e lisina) e hidrofóbicos (ciclohexilalanina) ^{114,218}, este último resíduo profere maior hidrofobicidade (Anexo A1-A) geral da molécula interagindo mais fortemente com a coluna C₁₈ mostrando seus picos no min 19 e 20 respectivamente. O SS02 e DFO-NSuc-SS02 contêm o aminoácido Dmt (tirosina modificada) que é mais lipofílico que o Phe apresentando uma maior retenção na coluna que os SS02 e DFO-NSuc-SS02. Os cromatogramas destes peptídeos e respectivos conjugados são apresentados no Anexo (A3-A).

Figura 34. Cromatogramas do DFO-Nsuc-Tat (49-57). Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min, V: 10 μ L.

Os produtos brutos (peptídeos, mtDFO e mtDFO-TAMRA) obtidos nas sínteses automatizadas na Univ. de Toronto obtidos após exposições das peptidil-resinas ao reagente SH por 2 h sob agitação. As figuras 35, 36 e 37 mostram os perfis cromatográficos DFO-NSuc-Tat (49-57)-K-TAMRA bruto e purificado. Os perfis dos outros também são apresentados no Anexo (A3-B).

Figura 35. Cromatograma do DFO-NSuc-tat-K-TAMRA, bruto. mtDFO sintetizada através do procedimento 1. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 100% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 60min, V: 30 μ L.

Figura 36. Cromatograma do DFO-NSuc-tat-K-TAMRA, bruto. mtDFO sintetizada através do procedimento 2. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 100% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 60min, V: 30 µL.

Figura 37. Cromatograma do DFO-NSuc-tat-K-TAMRA, purificado. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 100% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 60min, V: 30 µL.

As sínteses realizadas com o procedimento 2 geraram produtos de melhor qualidade e em maior quantidade, facilitando as purificações.

4.2.2. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI/MS) dos compostos obtidos na USP

A fonte de ionização *Electrospray* (ESI) usualmente empregada na análise peptídica, tendo a função de ionizar o peptídeo de maneira suave, preservando assim as estruturas, e de transferir os íons formados de acordo com suas relações m/z ²¹⁹. Os íons característicos de cada peptídeo ou conjugado são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Massas molares teóricas e íons detectados por análise dos peptídeos e DFO-conjugados obtidos na USP

Peptídeo ou Conjugado (Mw teórica)	Mw Experimental (g/mol)	Carga	Íon detectado
Tat (49-57) (Mw=1339,6g/mol)	1339,2	3+	447,4
	1339,0	2+	670,5
DFO-Nsuc-Tat (49-57) (Mw=1981,5g/mol)	1981,5	4+	496,6
	1981,5	3+	661,5
1A (Mw=1199,65g/mol)	1198,2	3+	400,4
	1198,0	2+	600,0
DFO-Nsuc-1A (Mw=1841,65g/mol)	1841,2	4+	461,3
	1841,4	3+	614,8
SS02 (Mw=639,33g/mol)	639,4	1+	640,4
	639,4	2+	320,7
DFO-Nsuc-SS02 (Mw=1282,40g/mol)	1282,0	2+	642,0
	1281,9	3+	428,3
SS20 (Mw=595,74g/mol)	595,8	2+	298,9
	595,9	1+	596,9
DFO-Nsuc-SS20 (Mw=1237,74g/mol)	1237,8	2+	619,9
	1237,8	1+	1238,8

Na seção de anexos (A4), são apresentados os perfis de cromatografia UV (210nm), o espectro de íons e o espectro de massas do pico desejado, de cada um dos peptídeos e conjugados obtidos com alta pureza. A Figura 38 exemplifica mostrando os dados do conjugado DFO-Nsuc-1A.

Figura 38. Análise do DFO-NSuc-1A purificado, a) Cromatograma UV (210nm), b) Cromatograma de íons e c) Espectro de massas do material eluído em 18-20 min). Condições de LC: injeção de 5 µL, coluna Vydac C₁₈ (250 x 4,6 mm, o diâmetro da partícula é 5 µm e o diâmetro do poro é 300Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min. Condições de ESI: capilar de 4,5kV, modo de ionização: ES⁺. Peptídeo desejado [M+H]⁺1199,0.

4.2.3. Análise de aminoácidos (AAA) dos compostos obtidos na USP

A porção peptídica do conjugado, por exemplo, o DFO-Nsuc-Tat (49-57) apresentou uma relação teórica 6:2:1 (Arg:Lys:Glu) e uma relação experimental 5,47:1,70:1,00, confirmando que o produto obtido era o desejado. Através dessa técnica foi possível quantificar a molécula do conjugado que se encontra em meio de cargas, contra-íons e moléculas de água, mesmo em alta pureza química. A Tabela 13 lista os conteúdos peptídicos dos peptídeos e mtDFO obtidos no Laboratório de Química de Peptídeos do IQ-USP. No caso do aminoácido Cha, ele não foi quantificado nas nossas condições de análise pela ausência deste aminoácido na mistura-padrão usada para calibrar o cromatógrafo. Os conteúdos peptídicos foram usados para calcular a concentração efetiva dos peptídeos e seus conjugados nos experimentos que os utilizarão.

Tabela 13: Proporção molar e conteúdo peptídico dos compostos obtidos na USP

Peptídeos	Proporção Molar Teórica	Aminoácidos	Conteúdo Peptídico (%)
DFO-NSuc-Tat (49-57)	6	Arg	45,43
	2	Lys	
	1	Gln	
DFO-NSuc-1A	2	Ard	45,62
	2	Lys	
	4	Cha	
1A	2	Ard	60,61
	2	Lys	
	4	Cha	
DFO-NSuc-SS02	1	Arg	35,59
	1	Lys	
	1	Phe	
SS02	1	Arg	68,12
	1	Lys	
	1	Phe	
DFO-NSuc-SS20	1	Arg	50,0
	1	Lys	
	2	Phe	
SS20	1	Arg	58,03
	1	Lys	
	2	Phe	

4.2.4. Espectrometria de massas (MALDI) dos compostos obtidos na Univ. de Toronto

Os peptídeos, mtDFO e mtDFO-TAMRA sintetizados automaticamente, foram clivados das resinas/desprotegidos totalmente, purificados e os purificados foram analisados, tendo mostrado massas molares experimentais similares às teóricas. Os cromatogramas e espectros de massas de todos os compostos são apresentadas no Anexo (A5). As Figuras 39 e 40 exemplificam os resultados obtidos.

Figura 39. Espectro de massas do Tat (49-57) purificado

Figura 40. Espectro de massas do DFO-NSuc-Tat (49-57) purificado (marcação feita com o procedimento 1).

A Figura 40 mostra que no espectro de massas do conjugado DFO-NSuc-Tat (49-57) obtido por síntese automática a partir do procedimento 1, o pico mais intenso corresponde ao conjugado contendo 3 moléculas TAMRA, o que pode ser devido à desproteção não desejada do grupo Fmoc que liberou o grupo amina para reação com NSuc seguida de reação com TAMRA. Também é revelada maior quantidade de impurezas (conjugado com número diferente de marcações). Por outro lado, o espectro de massas do conjugado DFO-NSuc-Tat (49-57) obtido pelo procedimento 2 mostra que o pico mais intenso representa mtDFO-TAMRA, Figura 41.

Figura 41. Espectro de massas do DFO-NSuc-Tat (49-57) purificado (marcação feita com o procedimento 2).

4.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE QUELANTE DOS mtDFO

A afinidade dos conjugados pelo ferro foi determinada mediante complexação competitiva com calceína, monitorada por fluorimetria. A calceína é utilizada como sensor químico de ferro em células e fluidos biológicos de pacientes com sobrecarga de ferro ¹⁸⁹. Inicialmente, a complexação de ferro à calceína provoca a supressão da fluorescência desta molécula. Quando o ferro é adicionado na forma ferrosa à solução, ele rapidamente se oxida ao ferro(III) dado que a constante de estabilidade Fe(III)-calceína é grande ($\log K_{Fe(calceína)}=24,0$) ¹⁹⁰, devido à maior dureza dos átomos doadores (O) que interagem melhor com o ácido duro Fe(III) (Figura 42). Os íons Fe(III) suprimem estequiometricamente a fluorescência da calceína.

O íon metálico tem maior afinidade pelo DFO ($\log K_{Fe(DFO)}=26,6$) ¹⁸⁹ do que pela calceína. Portanto, o DFO é capaz de regenerar a fluorescência do complexo Fe-calceína através do equilíbrio competitivo ²²⁰. Dessa forma, é possível verificar se a conjugação do DFO com peptídeos preserva a capacidade quelante dos conjugados (Figura 43). O DFO é um sideróforo hexadentado, contém três grupos hidroxamatos que coordenam ao Fe(III) resultando um complexo muito estável ²²¹.

Figura 42. Reação da supressão de fluorescência da calceína devido à formação do complexo Fe(calceína).

Os ligantes mtDFO em pH fisiológico mostraram perfis parecidos ao do DFO livre e Nsuc-DFO de acordo com os resultados mostrados na Figura 45. Os mtDFO não comprometem os sítios de ligação do DFO, os quais são preservados para exercerem atividade quelante. De fato, DFO-Tat (47-57)¹⁸⁹ e Deferasirox-Tat (47-57)¹⁸¹ mostram este mesmo comportamento em avaliações feitas em pH fisiológico, 5,5 e 8,1¹⁸⁹ confirmando que qualquer mudança no pH não tem efeito sobre a capacidade de ligação do ferro nos mtDFO. Por outro lado, os peptídeos não mostraram atividade quelante, ou seja, eles não recuperaram a fluorescência da calceína como pode-se observar na Figura 43.

Figura 43. Recuperação de fluorescência da calceína pelos conjugados mtDFO e demais controles a partir do complexo Fe(calceína)₂ 2 μM.

A utilização da sonda transferrina fluorescente (FI-aTf) permitiu caracterizar e avaliar as propriedades dos mtDFO frente a alvos biológicos mais realistas. A transferrina é uma glicoproteína plasmática que transporta ferro às células da medula, baço, fígado e músculo²²², atua como tampão e entrega ferro às células e tecido, mantendo uma baixa concentração deste livre no corpo.

A reação entre o 5-DTAF e a apotransferrina é mostrada na Figura 44. A lisina foi utilizado para se combinar com o excesso das moléculas do 5-DTAF que não reagiram com a proteína. A purificação da Fl-a-tf foi feita por diálise por 12 h a 4°C frente ao citrato (pH da reação 5,5), metodologia comumente aplicada a compostos com altas massas moleculares (neste caso, > 10 kDa) ^{187,190}. As membranas utilizadas, tamanho de poro 6-8 kD, foram completamente limpas de gorduras e metais assegurando uma boa purificação ²²³.

Figura 44. Reação do 5-DTAF com apotransferrina para formar a sonda fluorescente Fl-aTf.

Calculou-se a partir de uma curva de calibração do 5-DTAF que a proteína marcada foi ao redor de 73%.

A formação do complexo ferro-transferrina depende da ligação de um ânion adequado. Na natureza, o bicarbonato é o ânion de escolha, o qual está diretamente coordenado ao íon metálico, estabilizando a união e atuando como ligante ponte entre o metal e proteína (Figura 45) ²²⁴. No meio fisiológico o ferro deve ter as suas seis posições de coordenação bloqueadas, a fim de evitar a formação de EROs ou precipitar. No caso do ferro com a transferrina ou o DFO, todas as posições são sítios de ligação (Figura 45) ²²⁴.

Figura 45. Quelantes importantes do ferro, a) seis sítios de ligação para o ferro, b) ferro ligado à transferrina e c) ferro ligado à desferrioxamina.

Pacientes com sobrecarga de ferro apresentam elevada saturação da transferrina plasmática (~80%). Como tratamento utiliza-se DFO porque ela tem uma constante de afinidade ($\log K_{ML}$) maior do que o da transferrina (26,6 contra 23,6) ¹⁸⁹. Entretanto, essa reação é cineticamente desfavorável, dado que na transferrina o ferro encontra-se enclausurado no seio do esqueleto polipeptídico ^{225, 226}.

Para avaliar a capacidade de competição da FI-aTf e DFO/mtDFO pelo ferro foram desenhados três experimentos (ver Anexo A6). No primeiro experimento adicionou-se FAS à FI-aTf, observando-se a supressão da fluorescência devido à união ao ferro e não recuperação da fluorescência pela adição de outro ligante. No segundo experimento adicionou-se o complexo mtDFO-Fe à FI-aTf, não sendo observada supressão da fluorescência da sonda, ou seja, o ferro ligado aos conjugados DFO-peptídeos não pode ser retirado pela quelação com ligantes específicos de ferro provavelmente devido à uma constante de estabilidade muito alta. No terceiro experimento foi adicionado FAS à mistura de quelantes FI-aTf e DFO/mtDFO; o aumento da concentração do mtDFO, o ferro foi complexado preferivelmente por este quelante, deixando livre a FI-aTf (e, portanto, não causando supressão de fluorescência) (Figura 46). Na ausência de quelante, todo o ferro é ligado à FI-aTf (100 %). Aumentando-se a concentração de DFO livre ou dos mtDFO, a porcentagem de ferro ligada à FI-aTf caiu, estabilizando-se entre 20-40%.

Este teste confirmou que a conjugação do Nsuc-DFO aos peptídeos não comprometeu os sítios de ligação do DFO, ou seja, a sua capacidade de união ao ferro (mesmo sendo peptídeos de muitos aminoácidos, em sua maioria polares e com carga positiva que poderiam afastar os íons Fe(III)).

Figura 46. Porcentagem de FI-aTf saturada com ferro a partir de cada conjugado.

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS mtDFO

Em presença de pró-oxidantes como o ascorbato, íons Fe(III) catalisam a formação de espécies reativas de oxigênio, detectáveis através da oxidação da sonda 1,2,3 dihidrorodamina (DHR), que passa de não-fluorescente a fluorescente (Figura 47). A velocidade de oxidação (e, portanto, de surgimento de fluorescência) é diretamente proporcional à concentração de ferro livre. Em presença de determinados quelantes de alta afinidade que bloqueiam todos os sítios de coordenação do metal (como o DFO ou a deferiprona (DFP), outro quelante também utilizado na terapia de sobrecarga de ferro), a oxidação da sonda é paralisada ¹⁸⁸. Testamos a capacidade anti-oxidante de todos os conjugados obtidos, como uma outra forma de verificar a sua plena capacidade de quelação (Figura 48). Nesses testes, o padrão de ferro redox-ativo foi o nitrilotriacetato férrico, Fe(III) .

Figura 47. Reação do ácido ascórbico com ferro para produzir ROS que oxida a DHR em Rodamina, composto fluorescente ²²⁷.

Através desses dados, é possível verificar que os novos conjugados apresentam capacidade antioxidante idêntica à da deferiprona. Como ela é um quelante bidentado, necessitaria de concentrações ~3x maiores do que a de um ligante hexadentado para bloquear todas as posições de coordenação do ferro e, portanto, evitar a oxidação da sonda. Como mostrado na Figura 48A, o Fe(III) sozinho provoca um aumento constante na taxa de oxidação de DHR. As vezes uma ligeira oxidação de DHR é devido à presença de vestígios do ferro no tampão, ou do próprio oxigênio atmosférico).

As propriedades antioxidantes dos mtDFO foram corroboradas pela taxa praticamente nula de oxidação DHR comparável com a capacidade do sideróforo padrão DFO e o quelante de ferro DFP, ativo pela via oral.

Os conjugados mtDFO também foram capazes de diminuir a taxa de oxidação da sonda DHR a partir dos soros de pacientes com sobrecarga de ferro (Figura 48B) em grau semelhante ao exibido pela DFO. O efeito dos peptídeos (Tat (47-57), 1A, SS02 e SS20) também foi avaliado, mas como era esperado, eles não apresentaram propriedades antioxidantes na configuração experimental empregada (dados não mostrados).

Figura 48. A) Efeito dos ligantes (20 μM) na velocidade de oxidação da sonda DHR catalisada por ferro/ascorbato em tampão HBS/Chelex (pH 7,4). (B) Efeito dos quelantes (20 μmol.L⁻¹) na velocidade de oxidação da sonda DHR por soro de pacientes com sobrecarga de ferro. Os resultados são a média de duplicatas e representativos de pelo menos duas experiências isoladas (au: unidades relativas de fluorescência).

4.5. ESTUDO DA PERMEABILIDADE DOS mtDFO

Os testes foram feitos em triplicata e o ensaio colorimétrico azul de Trypan foi utilizado para avaliar a citotoxicidade da sobrecarga de FAS nas células HeLa, utilizando um protocolo já descrito ¹⁹². A partir das curvas de dose-resposta (Figura 49), os valores da concentração inibitória de 50% do crescimento (IC₅₀) determinados por interpolação foi 164 μmol.L⁻¹.

Figura 49. Curva IC₅₀ através do ensaio colorimétrico azul de Trypan.

Depois da determinação da quantidade de ferro tóxica na célula, se sobrecarregou as mesmas com 10 μmol.L⁻¹ de FAS por 10 min, condição que não induz morte celular, e se empregou mínimas concentrações de DHR, que segundo a literatura também não induz morte celular²¹⁵. O monitoramento de moléculas fluorescentes nos permitiu acompanhar o ingresso dos quelantes (mtDFO) nas células. Para isso, empregou-se um cátion lipofilicamente deslocado como a DHR (Dihidrorodamina 123), que é uma sonda permeável às células e se acumula nas mitocôndrias¹¹⁴. Por outro lado, o excesso de ferro (induzido por ascorbato/Fe(II)²²⁸) na mitocôndria foi usado para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs)¹¹³.

A DHR em presença de EROs é oxidada convertendo-se em rodamina-123 (Figura 50). O produto de oxidação é altamente reativo e intensamente colorido e fluorescente²²⁹, que absorve principalmente na região de 489 a 512 nm²²⁹.

Figura 50. Oxidação do DHR para Rodamina.

As células plaqueadas depois do procedimento experimental já descrito foram levadas ao microscópio de fluorescência, e suas imagens foram registradas na Figura 51. O controle (placa 1) recebeu apenas DHR, que se acumula nas mitocôndrias e apresenta leve oxidação natural. As células da placa 2 foram sobrecarregadas com ferro antes da marcação com DHR. Observou-se o aumento da intensidade da fluorescência do marcador alojado nas mitocôndrias, devido à formação excessiva de EROs²³⁰. A placa 3 recebeu o mesmo tratamento da placa 2, mas com a adição de DFO ao meio de cultura antes da DHR. Observou-se uma diminuição de fluores-

cência de volta, aos valores basais, possivelmente porque a DFO sequestrou o ferro antes dele se alojar na mitocôndria.

As placas 4 a 6 foram tratadas como a placa 2, mas com a adição dos mtDFO (DFO-Nsuc-Tat (49-57), DFO-Nsuc-1A e DFO-Nsuc-SS20 respectivamente) antes da DHR. Observa-se que a fluorescência recua para valores menores que os basais, indicando que os conjugados conseguem penetrar nas mitocôndrias e eliminar mesmo os níveis de ferro basais, suprimindo completamente a formação de EROs. Não foi realizado o ensaio com o conjugado DFO-Nsuc-SS02 porque não dispúnhamos de quantidades suficientes.

Figura 51. Microscopia de fluorescência das células HeLa. Placa 1) Branco 1. Placa 2) Branco 2. Sobrecarga de ferro nas células e internalização de DHR: Placa 3) tratadas com DFO, Placa 4) tratadas com DFO-Nsuc-Tat(49-57), Placa 5) tratadas com DFO-Nsuc-1A e Placa 6) tratadas com DFO-Nsuc-SS20.

Foram estudadas as distribuições de fluorescência nas diversas populações de células (figuras 52-57), obtendo-se o parâmetro x_c , que corresponde à densidade luminosa da maior população das células (Tabela 14).

Figura 52. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas apenas com DHR (Branco 1).

Figura 53. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com DHR e sobrecarregadas com Fe (Branco 2).

Figura 54. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com DHR, sobrecarregadas com Fe e tratadas com DFO.

Figura 55. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com DHR, sobrecarregadas com Fe e tratadas com DFO-Nsuc-Tat (49-57).

Figura 56. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com DHR, sobrecarregadas com Fe e tratadas com DFO-Nsuc-1A.

Figura 57. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com DHR, sobrecarregadas com Fe e tratadas com DFO-Nsuc-SS20.

Tabela 14. x_c para cada tratamento (pixel/área)

Branco 1	Branco 2	DFO	DFO-Nsuc-Tat (49-57)	DFO-Nsuc-1A	DFO-Nsuc-SS20
23,2±0,3	28,8±0,4	21,4±0,3	19,1±0,2	18,0±0,2	18,7±0,2

Como se observa, a maioria das células apresentou aumento de fluorescência após a adição de ferro devido à maior oxidação da DHR. A adição do DFO diminuiu muito pouco o valor de x_c em relação ao branco 1, o que era esperado, já que o DFO não é permeável às células (ingresso vagaroso através da pinocitose)²³¹ devido à sua baixa lipofilicidade²³².

Os mtDFOs mostraram uma diminuição notória do x_c em relação aos brancos 2 e 1, o que indicou um possível ingresso dos conjugados à mitocôndria, bloqueando a oxidação da DHR. Nossos resultados são coerentes com resultados prévios do nosso grupo. Ao se utilizar a sonda citoplasmática calceína-AM, apenas aqueles derivados de DFO permeáveis às células foram capazes de ligar-se ao ferro intracelular. Tais derivados incluíam a DFO-cafeína¹⁹¹, o DFO-Tat (47-57) e o DFO-penetratina¹⁸⁹.

4.6. AVALIAÇÃO CELULAR

Para determinar o efeito do direcionamento do DFO às mitocôndrias e sua atividade como um agente quelante, é necessário investigar a localização mitocondrial e citotoxicidade dos conjugados mtDFO.

4.6.1. Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade dos mtDFO e mtDFO-TAMRA foram estudadas usando o Kit-8 de contagem celular que permite ensaios muito convenientes, utilizando um sal tetrazólio altamente solúvel em água²³³. O WST-8 produz um corante de formazan laranja solúvel em água após a redução na presença de um mediador de elétrons, p. ex. desidrogenases²³⁴, tal como é mostrado nas figuras 58 e 59. Estes ensaios colorimétricos sensíveis foram utilizados para determinar a proliferação e citotoxicidade de células HeLa (A2780). A quantidade de corante gerado por desidrogenases em células é diretamente proporcional ao número de células viáveis²³³. Em comparação com outros ensaios de citotoxicidade como o que utiliza MTT, este Kit-8 não é tóxico nem degenera as células próprias do ensaio, fornecendo 90% de sobrevivência celular²³³.

Figura 58. Estrutura de WST-8 e WST-8 formazan²³⁴.

Figura 59. Princípio da detecção da viabilidade celular com o Kit-8 de contagem²³⁴.

Uma dosagem de 200 mg kg⁻¹ dia⁻¹ de DFO intravenoso num paciente com sobrecarga de ferro pode levar ao surgimento de náuseas, dor da cabeça, perda de visão, cataratas, toxicidade de retina e efeitos no sistema nervoso central ^{235,236}. O DFO na janela terapêutica reduz lesões cerebrais, diminui a formação de radicais hidroxilas e de estresse oxidativo e evita apoptose neuronal, tendo um papel de neuroproteção²³⁵. O DFO, em concentrações mili-molares, não induziu citotoxicidade grave em células tumorais^{236,237}. Ou seja, o DFO tem uma toxicidade geral baixa devido à baixa solubilidade em lipídeos (logP_{OW}= 0,01)²³² ou alta hidrofiliicidade, tendo como contrapartida uma baixa absorção gastrointestinal e baixa penetração na maioria das células^{99,238}. E isso é coerente com o valor encontrado em nossa Tabela 15.

O DFO-NSuc é um composto mais polar e hidrofílico (logP_{OW} = -0,98) que o DFO (logP_{OW} = -0,49), segundo cálculos do software ChemDraw Ultra e, portanto, não deveria atravessar a membrana citoplasmática. Mas o composto DFO-NSuc já foi avaliado em células Caco-2 onde se obteve uma permeabilidade 50 vezes maior que o DFO²³⁸, demonstrando que o este composto é mais citotóxico, resultados similares são apresentados em nosso experimento com a linhagem celular A2780. A ligação de ferro ao DFO-Nsuc gerou um produto de maior citotoxicidade, mas ainda não se conhece que fatores afetam a permeabilidade da célula para esse composto.

Nosso grupo introduziu recentemente conjugados entre CPPs e quelantes de ferro, DFO-Tat (47-57), DFO-penetratina e DFX-TAT(47-57) como uma forma de permeabilizar a membrana citoplasmática ¹⁸¹ e ativar as características destes quelantes. Tais conjugados não apresentaram citotoxicidade até concentrações de 20 µmol.L⁻¹ ^{189,181}. Os conjugados obtidos neste trabalho tiveram toxicidades entre 38 e 110 µmol.L⁻¹ (Tabela 15), coerente com os resultados anteriores. Tais conjugados contêm resíduos lipofílicos e catiônicos alternados^{161,169}, o que lhes confere caráter lipofílico; quanto maior esse caráter, maior localização mitocondrial específica melhorando o seu transporte¹⁵⁷.

Os conjugados mtDFO são todos mais tóxicos do que o DFO isoladamente, o que pode ser explicado pelo fato de que a conjugação leva um quelante extremamente poderoso para dentro da célula, o que pode perturbar a sua metabolização de ferro, cobre e outros metais.

Os conjugados mtDFO podem ser divididos em duas categorias de toxicidade (Tabela 15). DFO-NSuc-Tat(49-57) e DFO-NSuc-1A são menos tóxicos (IC₅₀ ~ 100 µmol.L⁻¹) do que DFO-NSuc-SS02 e DFO-NSuc-SS20 (IC₅₀ ~ 40 µmol.L⁻¹). Determinou-se que o ingresso de compostos bioativos em peptídeos com carga líquida +2 depende de logP_{OW}>-1,7 ¹⁶¹. No caso dos peptídeos com carga +4, logP_{OW}>+1,4 ¹⁵⁷. Ou seja o ingresso de com-

postos hidrofílicos como o DFO é melhor em peptídeos SS02 e SS20 (carga +2) que nos hidrofóbicos 1A e Tat (49-57). Então, pode-se explicar que DFO-NSuc-SS02 e DFO-NSuc-SS20 tem maior citotoxicidade por sua alta solubilidade em lipídeos.

Ainda de acordo com os dados da Tabela 15, todos os mtDFO marcados com TAMRA apresentaram grande toxicidade ($IC_{50} \sim 2 - 4 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Quando peptídeos marcados com TAMRA, fluoresceína, cianina ou outros fluoróforos, foram irradiados com lasers por longos períodos de tempo, observou-se a liberação do peptídeo e seu carregamento dos endossomos^{214,216} e a liberação de oxigênio singlete, o qual provoca peroxidação lipídica em uma reação em cadeia²¹⁵. Curiosamente, TAMRA tem um baixo rendimento quântico de oxigênio singlete e não apresenta nenhuma atividade fotolítica e fotocitotóxica. Ou seja, o Tat(49-57) pode converter um cromóforo inócuo num potente agente fotolítico, através da ligação. A incubação de uma mistura de peptídeo Tat(49-57) e TAMRA não resulta em morte celular o qual sugere que a conjugação entre elas é requerida para este efeito²¹⁵.

No Anexo A6, são apresentadas as curvas dose-resposta de cada um dos compostos estudados.

Tabela 15: IC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) dos compostos em estudo (mtDFO com ou sem marcações) e dos seus precursores em células A2780 após 24 h.

COMPOSTOS	IC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
DFO-NSuc-tat	$110,80 \pm 1,17$
DFO- NSuc-1A	$108,00 \pm 2,51$
DFO- NSuc-SS20	$38,07 \pm 1,13$
DFO- NSuc-SS02	$42,88 \pm 1,06$
DFO- NSuc-Tat(49-57)(TAMRA)-OH	$4,21 \pm 1,30$
DFO- Nsuc-1A(TAMRA)-OH	$2,97 \pm 1,06$
DFO- Nsuc-SS20(TAMRA)-OH	$4,82 \pm 1,19$
DFO- Nsuc-SS02(TAMRA)-OH	$2,45 \pm 1,43$
DFO-NSuc-	$1452,00 \pm 1,13$
DFO	$3207,00 \pm 1,15$
NSuc-DFO-Fe	$148,5 \pm 2,21$

4.6.2. Estudos de localização celular

A localização foi avaliada em células A2780, porque elas têm uma rede mitocondrial bem definida^{239,154} e pode-se obter imagens com facilidade¹⁵⁴.

Na literatura mostra que os peptídeos que contêm resíduos de Fx (exemplo: 1A) apresentam níveis altos de localização mitocondrial ($R_r = +0,5$ a $+0,6$), os peptídeos que contêm resíduos de F (exemplo: SS02 e SS20) apresentam níveis mais baixos ($R_r = +0,2$). Compostos de carga +2 (SS02 e SS20) e valores de $\log P_{OW}$ superiores a -1,7 exibem uma forte localização mitocondrial, valores de $\log P_{OW}$ inferiores a -2,0 não penetram na mitocôndria, ficam no citoplasma ou núcleo¹¹⁴. Compostos que tem carga +4 (Tat (49-57) e 1A) com valores

maiores ao $\log P_{OW} = 1,4$ exibem uma forte localização mitocondrial ¹¹⁴. Então, um composto ligado num CPP ou MPP pode ter maior absorção celular e o mecanismo de entrada modificado por eles ¹¹⁴.

No nosso trabalho os peptídeos carregados positivamente promoveram uma maior localização mitocondrial proporcionaram uma maior força de condução eletroquímica para transportar espécies hidrofílicas ¹⁵⁷, como o DFO, através da membrana hidrofóbica. De fato, os conjugados mtDFO, exibiram significativa localização mitocondrial (Figura 62). O coeficiente de Pearson (Rr) foi calculado para quantificar o grau de internalização. Os resultados foram que o conjugado que provém do peptídeo 1A apresenta um $Rr = +0,45$; os conjugados que provém dos peptídeos SS02 e SS20 apresentam um $Rr \sim +0,60$ e o conjugado DFO-Tat (49-57) um $Rr = +0,68$ (ver Tabela 16).

Os valores de coeficiente de Pearson para os conjugados estão de acordo com a faixa reportada que indica localização mitocondrial ($0,36 < Rr < 0,53$ ¹⁵⁴), e que por sinal coincidem com os coeficientes encontrados para os peptídeos livres ¹⁶¹. É importante notar que tanto a quantidade como a posição relativa dos aminoácidos afetará diretamente o êxito da localização mitocondrial. Por exemplo, os peptídeos FrF_xKFrF_xK (peptídeo 1α) e FF_xrKrKFF_x (peptídeo 1δ) são octâmeros e tem os mesmos tipos de resíduos, mas as suas sequências de aminoácidos são diferentes. Resíduos K (lisina) e r (arginina) fornecem a carga positiva e os resíduos F (fenilalanina) e Fx (ciclohexilalanina) conferem lipofilicidade. A lipofilicidade do peptídeo 1δ é maior ($\log P_{OW} = -1,8$) com um $Rr = 0,0$ comparado com a lipofilicidade ($\log P_{OW} = -2,4$) e constante de Pearson ($Rr = +0,4$) do peptídeo 1α ¹¹⁴. A tendência aponta a distribuição de carga como o efeito que altera a lipofilicidade e o acesso à mitocôndria ¹¹⁴.

Nossos conjugados com DFO exibem tempos de retenção maiores nas colunas cromatográficas empregadas (ver Anexo A4). Embora DFO seja um composto hidrofílico mtDFO são mais lipofílicos. Esse fenômeno pode ser devido a:

- (i) estrutura mais volumosa dos conjugados mtDFO;
- (ii) aumento de lipofilicidade dos conjugados ¹¹⁴.

E como se mostrou no exemplo anterior a distribuição de carga global no peptídeo pode alterar a lipofilicidade. Mas níveis de lipofilicidade muito altos podem limitar a absorção celular e transporte eficaz, gerando seu próprio sequestro num entorno hidrofóbico ¹⁶¹; a falta de solubilidade em água poderia impedir o uso de conjugados altamente lipofílicos.

Já foi estudada a localização celular em células HeLa *in vivo* do peptídeo 1A, transportando diferentes cargas lipofílicas (seja fluoróforos como a carboxifluoresceína, sejam sondas lipofílicas deslocalizadas como a rodamina, independentemente da carga elétrica das mesmas). Quanto mais lipofílica a carga ligada ao peptídeo 1A, maior foi o coeficiente Rr ¹⁵⁷. O potencial de membrana negativo da mitocôndria (- 170 mV) não impediu que o peptídeo 1A carregasse a organela com essas sondas, independentemente das suas cargas elétricas ²⁴⁰. Nossos conjugados foram marcados com TAMRA da família das sondas *rox*, que não apresenta localização mitocondrial *per se*. Portanto, utilizamos um método tradicional para marcar peptídeos com novos carregamentos bioativos ²⁴¹(ver Figura 60).

A capacidade de ligar grupos como DFO e TAMRA a peptídeos na fase sólida através de ligações peptídicas representa uma estratégia promissora na entrega de carga molecular dentro de mitocôndrias em células vivas. Já foi demonstrado que o Tat (49-57) entra nas células por endocitose ²⁴², e alguns peptídeos não naturais

como os descritos neste trabalho atravessam a membrana plasmática por difusão passiva ²⁴³. Segundo a Tabela 16, todos os conjugados apresentaram localização mitocondrial, ou seja, a absorção do DFO (molécula neutra de baixa lipofilicidade e elevado peso molecular ²⁴⁴) é favorecida pelos MPPs.

Tabela 16: Coeficientes de correlação de Pearson (Rr) para conjugados mtDFO-TAMRA (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e MitoTracker em células A2780

COMPOSTOS	Carga	Rr ^a
DFO-Nsuc-Tat (49-57) DFO-Nsuc-RKKRRGRRRK-K(TAMRA)-OH	+4	0,68 $\pm$ 0,08
DFO-Nsuc-1A DFO-Nsuc-F _x rF _x KF _x rF _x K K(TAMRA)-OH	+4	0,45 $\pm$ 0,08
DFO-Nsuc-SS02 DFO-Nsuc-Dmt-rFK K(TAMRA)-OH	+2	0,63 $\pm$ 0,18
DFO-Nsuc-SS20 DFO-Nsuc-FrFK K(TAMRA)-OH	+2	0,62 $\pm$ 0,13

^aRr valores medidos por microscopia confocal e comparação entre a fluorescência do Mitotracker e peptídeo marcado.

Figura 60. As imagens mostradas em verde correspondem aos conjugados ligados a TAMRA e as vermelhas correspondem ao Mitotracker. Estas imagens foram analisadas e calculou-se Rr para determinar o grau de localização mitocondrial dos conjugados. Os valores foram calculados a partir de mais de 100 células analisadas em multiplex experimentos. Barra de escala, 10 μm .

4.6.3. Determinação de danos no mtDNA por qPCR

A partir dos anos 70 ocorreu um grande desenvolvimento em termos técnicos do estudo do DNA com a introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR) ²⁴⁵. A informação genética humana está codificada em dois tipos de genomas, o DNA nuclear (nDNA) e DNA mitocondrial (mtDNA) ²⁴⁶. O mtDNA é uma molécula circular localizada na matriz mitocondrial¹¹⁴, constituindo 0,25 % do DNA total numa célula ²⁴⁷. Esses genes mitocondriais codificam 13 polipeptídios, extremamente importantes na fosforilação oxidativa, sete dos quais estão incluídos no complexo I, um no complexo III, três no complexo IV e dois no complexo V²⁴⁸. Estes complexos encontrados na membrana interna da mitocôndria compõem a cadeia de transporte de elétrons (ETC) ²⁴⁹, que man-

têm o gradiente eletroquímico necessário para a síntese de ATP ¹¹⁴. Mutações patogênicas foram relacionadas a doenças mitocondriais ²⁵⁰. Por conseguinte, atualmente estudam-se as diversas aplicações clínicas do mtDNA ²⁵¹.

Neste trabalho, buscamos estudar o efeito de eventuais danos promovidos pelos mtDFOs no mtDNA, através da alteração na taxa de progressão da PCR (DNA com menos lesões amplifica mais do que DNA danificado) ²⁵². O mtDNA foi extraído de células A2780 incubadas por 24 h com drogas (mtDFO) e sem drogas (controle), seguindo o procedimento experimental. Esta linhagem celular foi utilizada porque não interfere na ação dos fármacos focalizados na mitocôndria (não evade a ação da droga e não aumenta o reparo por excisão de nucleotídeos ²⁵³), permitindo-lhes ser mais retidos ¹⁵⁴.

Realizou-se a extração e isolamento do mtDNA através do Kit Taq DNA polymerase. O mtDNA purificado é muito estável, obtendo-se amplificações comparáveis durante longos períodos de armazenamento. O corante dsDNA PicoGreen ligado ao DNA mostrou um aumento de 1000 vezes no seu sinal de fluorescência, o qual nos permitiu quantificar as amplificações de DNA após os tratamentos das células como conjugados e controle.

Os *primers*, sequências de DNA adjacentes à sequência que será amplificada ¹⁵⁴, de uma região de 8,9 kb genômico mitocondrial, foram selecionados segundo o protocolo do laboratório da Dra. Shana O. Kelley.

Os danos ao DNA mitocondrial foram avaliados pelo monitoramento da eficiência da amplificação por PCR destes segmentos isolados. Os mtDFOs em geral não causaram uma redução estatisticamente significativa na amplificação mitocondrial (Figura 63). Estes resultados indicaram que os mtDFO não causaram danos ao DNA. Esta conclusão foi reconfirmada por estudos de citometria de fluxo.

Como se viu nos ensaios de citotoxicidade acima, o DFO em concentrações milimolares, não induz citotoxicidade nesta linhagem celular. Seria de se esperar pouco ou nenhum dano ao mtDNA ocasionado pelo DFO.

A maioria dos MPPs não induzem lesões ao mtDNA ²⁰⁶. O peptídeo 1A transportou outras cargas (biotina e trolox, análogos da vitamina E) similares ao DFO, solúveis em água e toxicidade sem apresentar dano ao DNA ¹¹⁴. Muitos MPPs (com os mesmos resíduos de aminoácidos utilizados nossas sínteses) como mtDOX ^{254,255}, mtCbl ¹⁵¹ e mtPt ¹⁵⁴ apresentam direcionamento às mitocôndrias, danificando o mtDNA devido à alta toxicidade das cargas transportadas.

Os conjugados DFO-1A e DFO-SS02 não causaram uma redução estatisticamente significativa na amplificação mitocondrial com o controle (Figura 61).

Figura 61. Danos no DNA causados pelos fármacos de DFO. Amplificação relativa de um segmento de gene específico mitocondrial de 8,9 kb que é reduzida por 24 h de tratamento com concentrações para cada droga igual a 50% do $[IC_{50}]$ (DFO-Tat (49-57)=55,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, DFO-1A=54,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, DFO-SS02=19 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e DFO-SS20=21,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Os valores médios plotados correspondem a $n = 3$, e todos os valores foram normalizados em relação a um controle não tratado (ANOVA). **, $p < 0,01$.

As lesões ao DNA apresentadas pelos conjugados DFO-Tat (49-57) e DFO-SS20 e o controle apresentaram diferenças significativas (**, $p > 0,01$) (Figura 61), por motivos que desconhecemos. De qualquer forma, o mtDNA foi avaliado depois de 24 h de tratamentos com os mtDFO, sendo que todos apresentam baixa capacidade de gerar lesões, o que se compara favoravelmente com outros protocolos de trabalhos anteriores (90 min¹⁵⁴ ou 6h²⁵⁵) que utilizam a mesma sequencia de aminoácidos.

Os testes foram feitos tanto com mtDNA armazenado por 1 semana como mtDNA recém obtido, produzindo exatamente os mesmos resultados.

4.6.4. Análise do ciclo celular

O ciclo celular é coordenado por meio de eventos que possibilitam que as células dupliquem seu material genético e, posteriormente, entrem em divisão (mitose)²⁵⁶. O ciclo celular está dividido em quatro fases: a fase G1 (G para *gap*, que significa intervalo), durante a qual a célula cresce devido às sínteses proteicas; a fase S (S para síntese), durante a qual a célula duplica seu DNA; a fase G2, que é uma outra fase de crescimento onde as células aumentam de tamanho, e a fase M (M para mitose), que representa a divisão celular propriamente dita²⁵⁷. Uma exceção nesse ciclo clássico é fase G0, na qual as células são quiescentes (não se dividem mais)²⁵⁸. O ciclo celular é controlado pela ação de quinases dependentes de ciclinas (Cdk)²⁵⁹. A formação, ativação e separação dos complexos de quinase dependentes de ciclina são eventos fundamentais que coordenam o ciclo celular²⁵⁶.

Uma vez que o conteúdo em DNA nuclear reflete a posição da célula no ciclo celular, a citometria de fluxo pode ser utilizada na análise do ciclo celular²⁶⁰. O controle e os conjugados DFO-Tat (49-57), DFO-1A, DFO-SS02 e DFO-SS20 levaram a uma maior população de células em fase proliferativa G0/G1, como se pode observar na Figura 62, com um percentagem de 60%. Os dados G0/G1, S ou G2 foram apresentados em percentagens no Anexo (A8).

Figura 62. (A) Fases do ciclo celular na avaliação dos conjugados de DFO. A análise quantitativa da distribuição em G1, S e G2 foram avaliadas pela coloração com iodeto de propídio e citometria de fluxo ($n = 3$), com concentrações para cada conjugado igual a 50% do $[IC_{50}]$ (DFO-Tat (49-57)=55,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, DFO-1A=54,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, DFO-SS02=19 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e DFO-SS20=21,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Os resultados da determinação de danos no mtDNA apresentados acima indicaram que os mtDFO (DFO-1A, DFO-SS02) não causaram dano significativo ao mtDNA. Esta conclusão foi corroborada por este estudo usando citometria de fluxo, o qual revelou que todos os mtDFO não induzem o arraste do ciclo celular nestas células. A absorção celular de muitas sequências de peptídeos como: $rF_xrF_xrF_xr$ ¹⁵⁴, 1A e SS20 ¹⁶¹, avaliadas em células HeLa (A2780), já foram estudadas por citometria de fluxo, e tampouco apresentaram arraste do ciclo celular. Dependendo do tipo de carga transportada o ciclo celular pode ser comprometido. O peptídeo $rF_xrF_xrF_xr$ ao ser ligado à platina forma o conjugado mtPt ($[Pt(NH_3)_2(acac)-rF_xrF_xrF_xr]$), um agente quimioterapêutico efetivo que induz um arraste celular na fase S ¹⁵⁴.

Na literatura ²⁶¹ foram descritos os efeitos tóxicos do DFO no crescimento das células, potenciados com oxigênio, gerando uma parada irreversível na fase G2 devido aos ataques diretos de radicais livres em resíduos de timidina, sendo contra-indicado seu uso no tratamento de condições de estresse oxidativo elevado. Em nosso caso, a carga transportada (DFO) não apresentou evidências de reação com oxigênio, tendo um perfil de ciclo celular bem parecido ao do controle.

O ruído de fundo encontrado no quadrante respectivo pode levar a erros na estimativa da proporção de células que se encontrava na fase S. Em nosso caso, o ruído foi eliminado antes das análises dos histogramas de DNA, individualmente. Outra possível fonte de erro seria a formação de agregados nucleares nas amostras, com a formação de dupletos (e.g. dois núcleos G1) ²⁶⁰, o qual poderia levar a um aumento artificial na frequência de células na fase G2, mas o programa computacional utilizado dá a possibilidade de selecionar regiões do quadrante que permitiram eliminar este tipo de células da análise do ciclo celular, ver Anexo (A8-3).

4.6.5. Análise dos níveis de superóxido mitocondrial

Espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenham um papel fundamental na promoção da liberação mitocondrial do citocromo c e indução de apoptose¹⁶⁹. Citocromo c pode então ser liberado através do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM)¹²⁸. Nós utilizamos peptídeos que focalizam a membrana mitocondrial interna (IMM) para investigar o papel das ERO geradas na sua interação com a organela.

No caso do peptídeo antioxidante SS02, é descrito que o seu acúmulo na mitocôndria não altera a função mitocondrial¹⁶⁹ e a liberação do citocromo c mitocondrial não é significativamente inibida, o que não ocorre para o peptídeo SS20¹¹⁴. A substituição de Dmt em SS02 com Phe (SS20) resulta na completa perda da atividade antioxidante¹¹⁴. O peptídeo SS02 é muito potente na redução de EROs intracelular com IC₅₀ na faixa nanomolar¹⁶⁹, em contraste muitos antioxidantes requerem 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para evitar morte celular oxidativa²⁶². Os outros peptídeos, Tat (49-57) e 1A podem ingressar na mitocôndria sem provocar citotoxicidade, mas não exibem papel antioxidante¹⁵⁷.

Aproximadamente 1-3% do oxigênio presente na mitocôndria é incompletamente reduzido. O superóxido mitocondrial (ERO predominante nas mitocôndrias⁴²) é gerado como subproduto da fosforilação oxidativa, pela doação de um elétron ao estado fundamental O₂²¹². Endogenamente isso ocorre comumente através da ETC na mitocôndria¹¹⁴. Por outro lado, o radical superóxido pode oxidar e inativar proteínas com centros ferro-enxofre (Fe-S) tal como a aconitase, resultando na liberação de Fe(II) e H₂O₂, os quais podem levar à formação do radical hidroxila (aumentando o dano oxidativo)²⁶³. O incremento da produção de superóxido celular está implicado em doenças neurodegenerativas²³⁰.

O novo corante fluorogênico MitoSOX[™] Red é um indicador de superóxido mitocondrial, altamente seletivo²⁶⁴. Dentro da mitocôndria, este reagente é oxidado pelo superóxido, mas não por outros sistemas geradores de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio²⁶⁴.

Em nosso experimento, após análise de variância, comparações multiplex (teste de Tukey) e múltiplas comparações com o controle (Método de Dunns, Figura 63), observamos que os mtDFOs (exceto o DFO-SS02) não levam à produção significativamente diferente de superóxido mitocondrial, em relação ao controle.

Figura 63. Avaliação da produção de ERO mitocondrial por coloração das células A2780 tratados com MitoSox, com concentrações de mtDFO igual a 50% do [IC₅₀] (DFO-Tat (49-57)=55,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, DFO-1A=54,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, DFO-SS02=19 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e DFO-SS20=21,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), durante 24 h. Desvio padrão (n = 5) apresentado por barras (*, P < 0.05).

O conjugado DFO-SS02 não provoca lesões ao DNA mitocondrial, nem arraste do ciclo celular, mas apresentou significativa atividade antioxidante, coerente com a presença do peptídeo SS02 (antioxidante) aliada à presença da DFO, que pode sequestrar o ferro mitocondrial.

Embora não seja possível determinar de forma inequívoca o exato mecanismo dessa ação, é provável que a sobrecarga de ferro seja reduzida pela quelação com o DFO. Portanto, é razoável esperar uma diminuição na produção de ERO, aliviando o estresse oxidativo na situação de deficiência de frataxina (portadores de Ataxia de Friedrich apresentam só 30% frataxina de uma pessoa saudável) e removendo empecilhos para a produção dos cluster Fe-S.

Realizou-se o mesmo teste com diferentes procedimentos nos quais foram variadas as concentrações dos mtDFOs e os tempos de incubação com MitoSox. Os resultados são apresentados no Anexo 9, mas comparações do seus perfis com a Figura 63 são muito parecidos.

4.6.6. Ensaio de apoptose (Anexina V)

A morte celular ocorre de duas formas distintas: a “morte celular acidental” é chamada necrose e a “morte celular programada” é chamada apoptose²⁶⁵. A apoptose é um tipo de autodestruição celular que requer energia e síntese proteica para a sua execução, e exerce um papel oposto ao da mitose²⁶⁶. A mitocôndria tem a habilidade de desencadear a apoptose, liberando para o citoplasma proteínas pró-apoptóticas (BAX e Bcl_{XL})²⁶⁷.

O processo de apoptose está associado com mudanças bioquímicas características como dissipação do potencial e permeabilização da membrana mitocondrial, ativação de caspases, clivagem do DNA, condensação da cromatina, exposição do fosfolípido fosfatidilserina na superfície celular e formação de vesículas (*blebs*)¹⁹⁸.

A detecção da apoptose pode ser realizada por métodos diretos e indiretos. A técnica imunocitoquímica pode determinar a ocorrência da apoptose. A anexina V é uma proteína de 37 kD com capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípidios de carga negativa na superfície celular na presença de íons cálcio²⁶⁸.

Quando a célula entra em processo de morte celular por apoptose, um dos eventos é a exposição da fosfatidilserina para o exterior da membrana celular. A anexina V é uma molécula que não é capaz de difundir através da membrana mas tem uma alta afinidade pela fosfatidilserina²⁶⁹.

Anexina V é acompanhada de uma segunda marcação com Sytox Red²⁷⁰ (necroses e apoptose tardia), a qual nos permite saber se a integridade da membrana foi perdida. Esta marcação dupla permite a identificação de células que se encontram em uma etapa inicial ou tardia da morte celular.

O mecanismo de morte celular causada pelo estresse oxidativo nas mitocôndrias foi determinada pelo ensaio anexina V. Os resultados gerados pela citometria de fluxo foram populações de células distribuídas em quadrantes como se mostra na Figura 66, onde o quadrante Q3 apresenta o número de células vivas, o quadrante Q2 apresentou o número de células em apoptose tardia ou necrose e o quadrante Q4 apresentou apoptose antecipada.

Muitos tipos de células de câncer são conhecidos porque apresentam elevado limiar da indução apoptótica, tendo alta resistência quimioterapêutica²³⁹. As células A2780 mostraram taxas reduzidas de apoptose

^{239,271,151}. A super-expressão de fatores anti-apoptóticos é um mecanismo comum da resistência. Estas células também apresentaram níveis altos da proteína anti-apoptótica Bcl_o_{XL}, contribuindo à resistência contra morte ²³⁹.

Os valores de IC₅₀ dos mtDFO para as células A2780 empregadas neste estudo estão mostrados na Tabela 15. Nessas concentrações, eles não foram tóxicos, mesmo após 24 h. Apenas 7% das células, tal como o controle, apresentaram 7% de apoptose tardia ou antecipada (Anexo 10). Além disso, o mecanismo de morte celular entre todos os mtDFOs foram muito parecidos, como se mostra na Figura 64. O conjugado DFO-SS02 apresenta uma ligeira maior porcentagem de células vivas comparado com o controle. Já a tendência do DFO-Tat (49-57) é oposta, o qual confirma o resultado obtido da análise dos níveis de superóxido mitocondrial, o qual facilitaria a entrada dessas células na via apoptótica.

Figura 64. Anexina V / Sytox Vermelho marcam as células A2780 tratadas com mtDFO a uma concentração igual a 50% do [IC₅₀] (DFO-Tat (49-57)=55,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, DFO-1A=54,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, DFO-SS02=19 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e DFO-SS20=21,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 24 horas (n = 3). (A) Diagrama de barras comparativo dos mtDFO com o controle em cada estágio celular. (B) Exemplo de distribuição de populações de células em cada quadrante.

Os ensaios com Anexina V de alguns conjugados de platina (mtPt¹⁵⁴) e clorambucil (mtCbl²³⁹) (mt = F_xrF_xrF_xr ((F_xr)₃) mostraram aumento dramático da atividade protease dentro das células, e isso resultou em uma queda dos níveis celulares de ATP²⁷¹, mostrando uma maior necrose primária e que a atividade necrótica é dependente do tipo da carga transportada por estes peptídeos, já que platina e o clorambucil são tóxicos. Os vetores MPP com elevada lipofilicidade podem atuar como agentes líticos em concentrações elevadas ¹⁵¹, por comprometimento da integridade da membrana plasmática, que resulta no aparecimento de necrose primária²⁷¹. A conjugação do (F_xr)₃ com clorambucil aumenta a lipofilicidade global do conjugado e induz necrose primária²³⁹.

Em nosso caso, a conjugação dos peptídeos Tat (49-57), 1A, SS02 e SS20 com o DFO não compromete a integridade plasmática e mitocondrial como foi confirmado pelas poucas lesões causadas ao mtDNA. O fato de que nossos conjugados apresentam níveis de toxicidade baixos indicam que o transporte do mtDFO não é tóxico para as mitocôndrias e que os peptídeos são um meio eficaz para levar biomoléculas ativas, como o DFO, sem induzir fortemente as vias de apoptose ou necrose.

4.7. ESTUDOS COM CÁTIOS LIPOFÍLICOS DESLOCALIZADOS.

A mitocôndria tem muitos papéis que são essenciais para a sobrevivência celular e a disfunção mitocondrial contribui para uma ampla gama de doenças ²⁷², incluindo ataxia de Friedreich⁴⁶, doença de Parkinson, diabetes, doença de Huntington²⁷³, distúrbios associados a mutações do DNA mitocondrial²⁷⁴, doenças degenerativas e fisiopatologia do envelhecimento²⁴⁰. O desenho de um vetor celular permeável eficiente orientado à mitocôndria é um desafio, devido à estrutura da mitocôndria ser impermeável à uma vasta gama de moléculas ¹²⁸. Entre as estratégias para o transporte de moléculas bioativas para a mitocôndria além dos MPPs já mencionados e estudados, encontram-se os cátions lipofílicamente deslocalizados (DLC).

Desde que o DFO estava sendo dirigido às mitocôndrias através do vetor MPP, nos perguntamos se este vetor foi o mais efetivo para esse carregamento e se desempenhou um papel no mecanismo de morte celular ou se sua localização foi a melhor. Para responder a esta pergunta, o DFO precisava ser guiado para as mitocôndrias usando um vetor diferente.

Escolhemos o cátion trifenílfosfônio (TPP) como outro vetor, já que eles têm sido estudados e usados amplamente na entrega de cargas terapêuticas às mitocôndrias ^{275,110}. A conjugação das biomoléculas como os TPPs geralmente ocorrem através da reação simples S_N2 ¹²⁸, uma ligação covalente entre TPP e uma cadeia alquílica ²⁷². Também se tem a ligação entre o aldeído de trifenílfosfônio com aminas primárias para a formação específica de enaminas ou iminas²⁰⁰.

O TPP apresenta uma única carga positiva que é estabilizada por ressonância através dos três grupos fenila. Além da carga positiva deslocalizada, a grande área de superfície hidrofóbica do TPP permite uma interação favorável com a membrana mitocondrial interna (IMM), já que tem um potencial de membrana negativo no interior (-150 a -180 mV) comparado com o potencial de membrana plasmática (-30 a -60 mV) ²⁷⁶. Isto permite a absorção de TPP na matriz mitocondrial, onde é livremente solúvel ou adsorvido na dobra interna da IMM dependendo da hidrofobicidade da carga ^{109,194}, fazendo com que os cátions lipofílicos se concentrem ainda mais dentro das mitocôndrias, em percentagens superiores a 90% ²⁷⁷.

Na Figura 65, o cátion TPP lipofílico se une covalentemente a uma molécula biologicamente ativa (X). O cátion lipofílico é acumulado de 5 a 10 vezes dentro do citoplasma desde o espaço extracelular pelo potencial de membrana plasmático ($\Delta\psi_p$) e, continua se acumulando na matriz mitocondrial de 100 a 500 vezes pelo potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Estes cátions lipofílicos passam diretamente através da bicamada lipídica sem o uso de sistemas de captação específica, porque se tem o potencial suficiente para distribuir às mitocôndrias a todos os órgãos, incluindo o cérebro²⁷².

Figura 65. Captação pela mitocôndria de TPP ligado a moléculas bioativas.

A literatura tem mostrado que muitas das sínteses entre um aldeído de trifenílfosfônio com aminas primárias podem gerar produtos de condensação, enaminas, diminuindo a possibilidade de obter bases de Schiff ²⁰⁰, como se mostra na Figura 66.

Figura 66. Reação do aldeído de trifenílfosfônio (FTP) com uma amina primária.

Os aldeídos em geral apresentam tautomeria ceto-enólica que é um processo facilmente reversível. O aldeído de trifenílfosfônio por captação de um átomo de hidrogênio do carbono contíguo, dá lugar a uma reação intramolecular com formação de dupla ligação e uma função hidroxila, ou seja, um enol ¹⁷⁷. O grupo carbonila (C=O) do aldeído de trifenílfosfônio confere polaridade à molécula. A Figura 67 apresenta a estrutura do produto formado TPP-DFO e seu precursor FTP.

Figura 67. Estrutura dos compostos: A) TPP-DFO e precursor B) FTP

O TPP-DFO obtido foi purificado em escala semi-preparativa por RP-HPLC nas condições já descritas com rendimento de 38,3%. A pureza do composto foi >95% (Figura 68).

Segundo Liu e colaboradores ²⁷⁸, conjugados de DFO apresentam tempo de retenção maior do que os da DFO livre. De forma importante, vários conjugados de DFO, como adamantano, ácido 4-metilfenoxiacético, entre outros, apresentam lipofilicidade semelhante à do trifenilfosfônio. A lipofilicidade da DFO ($\log P_{OW}$) foi de -1,45, menor que a do aldeído FTP (5,37; valor obtido a partir do software ChemDraw Ultra).

Ao comparar os cromatogramas obtidos nas análises por LC-ESI/MS de todos os mtDFOs (acima) com o cromatograma da TPP-DFO (Figura 68), pode-se apreciar a alta lipofilicidade deste último a partir de seu t_r maior. Essa lipofilicidade é devida aos grupos fenilos que acompanha ao íon fosfônio ^{177,110}.

Figura 68. TPP-DFO purificado, a) Cromatograma UV (210nm), b) Cromatograma de íons, c) Espectro de massas do material eluído em 25,4 min. Condições de LC: injeção de 5 μ L, coluna Vydac C₁₈ (250 x 4,6 mm, o diâmetro da partícula é 5 μ m e o diâmetro do poro é 300Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min. Condições de ESI: capilar de 4,5kV, modo de ionização: ES⁺. Composto desejado $[2M+H_2O]^+$ 1712,9.

Os íons gerados por ionização eletrôn-spray (ESI) podem ser protonados de várias formas ²¹⁹. Neste processo, os íons presentes na fase líquida são dessorvidos de uma forma tão suave que podem manter os mesmos complexos moleculares derivados das interações não covalentes existentes na solução ²⁷⁸. A ionização por ESI gera íons multicaregados sendo a extensão da carga dependente do pH da solução e do número de grupos básicos (ou ácidos) da molécula. A conjugação dessas duas moléculas forma um novo composto que gera três íons principais, como se observa na Figura 68-c e a Tabela 17.

Tabela 17: Data ESI/MS da Imina9A

[M] (g/mol)	Exp.	calcd	espécie
847,45	279,2	278,8	[M+2TFA+ 2H ₂ O] ⁺
	557,2	554,7	[M+2TFA+ 2H ₂ O] ⁺
	856,9	846,9	[2M+H ₂ O] ⁺

Exp. Experimental, calcd: calculado

O [M+2TFA+ 2H₂O]⁺ é dominante e foi sugerida a partir de muitos conjugados DFO estudados na literatura ¹⁸⁹ onde seus picos correspondem às espécies [M+nTFA]⁺, [M+nTFA+Mes]⁺. O TFA (ácido trifluoroacético) e o Mes (mesilato) atuam muitas vezes como contra-íons, e n=1-3. A espécie [2M+H₂O]⁺ também é concordante com muitos outros conjugados de DFO (DFOB-MPOAc ²⁷⁸), que tem espécies predominantes como o [2M+H₂O]⁺ e [2M+Na⁺]⁺ ^{278,279}.

Estruturalmente pode-se concluir que a espécie formada pode ser uma imina, sendo corroborado no espectro ¹H RMN do TPP-DFO, registrado em DMSO deuterado (Figura 69). Os sinais dos prótons foram atribuídos na Tabela 18. Paralelamente, o espectro teórico do TPP-DFO foi obtido com o software ChemDraw Ultra, apresentando boa concordância (Anexo A11).

O deslocamento mais importante do espectro de RMN foi δ de 8,33 ppm experimental (calculado: 8,46-8,49 ppm) referente ao grupo hidrogênio da base de Schiff, a ligação -CH=N- entre FTP e DFO, confirmando a formação da imina ^{211,280}.

As bases de Schiff desempenham um papel muito importante em muitas reações biológicas e químicas, devido à presença da ligação imina ²⁸². Elas são geralmente ligantes bi- ou tri-dentados capazes de formar complexos muito estáveis com metais de transição ²⁸⁰. As bases de Schiff derivadas de aminas e aldeídos aromáticos são importantes porque estão envolvidas na ligação ao DNA, construção de estruturas supra-moleculares e em atividade contra células cancerígenas ²⁸².

Figura 69.A) Estrutura do composto TPP-DFO e B) Espectro ^1H RMN da Imina9A.

Tabela 18. Tabela de deslocamentos químicos da TPP-DFO

Próton	δ (ppm)	Referência
1,21 (6H)	210
1,38 (6H)	210
1,47 (6H)	210
-CO-CH ₃	1,97 (3H)	210
NH ₂ -CO-CH ₂ -	2,29 (4H)	210
DMSO (CH ₃)	2,53 (3H)	211
-CH ₂ -CO-N(OH)-	2,59 (4H)	210
-CH ₂ -CH=N-	2,61	211
-CH ₂ -NH-CO-	3,01 (4H)	210
H ₂ O (Impureza do solvente)	3,37 (2H)	210
-NH-CO-	7,85 (4H)	210
Aromático: -CH=CH-	7,68-7,98 (15H)	281
-HC=N-	8,33	280
-CO-N(OH)-	9,67 (3H)	210

Finalmente, observamos que o conjugado TPP-DFO apresenta fluorescência (Figura 70), o que será útil para os testes de microscopia confocal.

Figura 70. Fluorescência na câmara escura (UV, $\lambda = 254\text{nm}$ e 365nm) do TPP-DFO e aldeído de trifenilfosfônio (FTP).

O novo conjugado TPP-DFO foi avaliado em células A2780 (Tabela 19) e encontramos que a toxicidade da droga foi reduzida até 3,5 vezes em relação a alguns dos mtDFOs, mas continua sendo mais tóxica que o DFO (Tabela 15).

Tabela 19: Viabilidade celular do TPP-DFO e do precursor contra células A2780 após 24 h.

COMPOSTOS	$\text{IC}_{50}(\mu\text{mol.L}^{-1})$
FTP	$4,34 \pm 1,06$
TPP-DFO	$135,60 \pm 1,08$

Quando se trabalha com drogas altamente tóxicas, utilizar vetores mitocondriais (por exemplo, MPPs) não aumenta a toxicidade do carregamento, como por exemplo no caso da cisplatina (IC_{50} em A2780 de $0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e seu conjugado mtPt (IC_{50} de $7,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$)¹⁵⁴. Experimentos com a mesma droga tóxica (por exemplo o clorambucil, Cbl) transportada por MPPs e TPPs mostraram que a morte celular ocorre via um mecanismo de caspases, que é independente do tipo de vetor utilizado²⁷⁵. Comparado com a cisplatina e Cbl, a DFO é uma droga menos tóxica^{154,275}.

Na comparação (IC_{50}) dos vetores MPP e DLC levando uma carga como DFO (tabelas 15 e 19), verificam-se diferenças significativas. Isso pode ser explicado pela menor localização mitocondrial do TPP-DFO, $\text{Rr} = +0,20$ (Figura 71), em comparação aos mtDFO que tiveram valores de Rr entre $0,45$ - $0,68$. O FTP não apresentou localização mitocondrial. O FTP foi usado para aproveitar o potencial de membrana da mitocôndria¹²⁴, tendo êxito na entrega de cargas de espécies não polares, mas menor eficiência quando carregamentos bem polares foram dirigidos¹¹⁴.

Em nosso caso, o DFO é uma molécula polar e sua conjugação com TPP não gerou um bom vetor transportador. Segundo as características apresentadas pelos dois vetores de transporte, os MPP tem maior facilidade na entrega de DFO à mitocôndria que o vetor trifenilfosfônio, mas a vantagem deste último sistema foi a facilidade na síntese e purificação.

Figura 71. As imagens mostradas em verde correspondem à marcação com os DLC e as vermelhas correspondem à marcação com Mitotracker. Calculou-se Rr para determinar o grau de localização mitocondrial. Os valores reportados foram calculados a partir de mais de 100 células analisadas em multiplex experimentos. Barra de escala, 10 μ m.

4.8. ESTUDOS COM CARDIOMIÓCITOS (NRVMs)

Ataxia de Friedreich (FA) é uma doença causada pela diminuição da expressão de proteína frataxina mitocondrial, 30% menos da média dos valores normais ²⁰². A maioria de pacientes de FA apresenta evidência de problemas cardíacos, que podem ser causados pela disfunção dos cardiomiócitos, que são ricos em mitocôndrias e apresentam um metabolismo oxidativo alto ⁹⁸.

Apesar dos progressos obtidos em muitos modelos celulares, os efeitos específicos de esgotamento da frataxina em cardiomiócitos são mal compreendidos, pois estas células não são comumente estudadas, e outras linhagens não refletem corretamente a depleção de frataxina nestas células ^{283,284}. Assim, no laboratório do Professor Dr. Joaquin Ros (Universidade de Lérida, Espanha) foi desenvolvido um modelo cardíaco deficiente em frataxina, baseado em culturas primárias de miócitos ventriculares de ratos neonatos (NRVMs), ou cardiomiócitos modificados por meio de DNA recombinante para serem deficientes em frataxina²⁰².

As cardiomiopatias aparecem como uma das manifestações clínicas mais claras das doenças mitocondriais, onde o $\Delta\psi_m$ se vê comprometido ^{285,286}. Nosso experimento foi avaliar o inchamento mitocondrial (*swelling*) através do acúmulo de uma sonda fluorescente catiônica lipofílica, que permite o monitoramento de mudanças relativas do $\Delta\psi_m$, e não emite fluorescência até que seja oxidada na mitocôndria.

São feitos três controles:

- (a) Cardiomiócitos não tratados com shcRNA;
- (b) Cardiomiócitos tratados com shcRNA mas sem plasmídeos;
- (c) Cardiomiócitos contendo o plasmídeo sh-34, que provocou uma diminuição de proteína frataxina

Diminuições no nível da frataxina se refletem numa morfologia com alterações importantes de tamanho e distribuição mitocondrial (Figura 72).

O inchamento mitocondrial é devido à exposição a altas concentrações de EROs, o que aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial através da formação de um poro (transição de permeabilidade mitocondrial; PTPM) ^{287,288}. O canal de importação PTPM permanece aberto, permitindo a entrada de muitos solutos, que incham as mitocôndrias ⁹³, induzindo à morte celular ²⁸⁹.

Figura 72. Marcação mitocondrial e avaliação de potencial de membrana mitocondrial. (a) Imagem típica de cardiomiócitos. (b) Imagem de cardiomiócitos cultivado com shcRNA e marcados com MitoTracker Red CMXRos. (c) Imagem de cardiomiócitos cultivado com sh-34 de depois da transdução e marcados com MitoTracker Red CMXRos. Teste preliminar.

As células cultivadas com sh-34 foram tratadas com DFO, mtDFOs e TPP-DFO nas concentrações de 2,5 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. O DFO nas duas concentrações não apresentou uma melhora na inflamação das mitocôndrias, o que é esperado devido à sua baixa lipofilicidade²⁷⁸ e não localização mitocondrial (ver pagina xxxx). Os mtDFO apresentaram uma melhora em altas concentrações (25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), sendo reduzido o inchamento mitocondrial uniformizando sua aparência (Figura 73).

O conjugado DFO-SS02 mostrou um dos melhores resultados para este experimento, uma diminuição aproximada de 45% do inchamento mitocondrial (Figura 73). O peptídeo SS02 já tem atividade antioxidante é muito permeável às células e o seu acúmulo é 100 vezes maior no IMM que no citoplasma, inibindo a geração de EROs mitocondrial ou inchaço e impedindo o *stunning* do miocárdio¹⁶⁹. Além disso, seu conjugado mostrou níveis mínimos de geração de superóxido mitocondrial (pagina 83). Para que a mitocôndria volte à sua morfologia anterior deve existir inibição do canal PTPM, que impede a liberação do citocromo c^{169,262}. Na literatura, as EROs e o PTPM têm sido implicados no *stunning* do miocárdio associado com reperfusão em corações isquêmicos²⁶². O conjugado antioxidante DFO-SS02 melhora a força contrátil neste modelo, o que foi observado claramente através do microscópio.

Figura73. Cardiomiócitos tratados com mtDFO. Para cada condição foram avaliadas pelo menos 50 células em 8 campos microscópicos diferentes através do software ImageJ.

Vale ressaltar que o peptídeo SS20 não tem as características de seu análogo do SS02¹⁶⁹, mas seu conjugado DFO-SS20 apresenta uma melhora no tratamento das mitocôndrias inchadas. O mesmo ocorre com

os conjugados DFO-Tat (49-57) e DFO-1A, que também apresentaram uma diminuição de aproximadamente 80% do inchamento mitocondrial (Figura 73), mesmo não sendo formados a partir de peptídeos antioxidantes ¹⁶¹.

Na concentração $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a morfologia de todas as mitocôndrias tratadas com mtDFO estavam desarranjadas, com forma de balão e inchadas de maneira semelhante ao controle, sem melhoras visíveis.

Os DLCs são normalmente utilizados como corantes específicos da mitocôndria, estudo da fisiologia mitocondrial ¹¹⁴, e transportadores de carga exógena, como antioxidantes ²⁴⁰; no entanto, esta classe de moléculas tem algumas limitações como vetor de entrega. A toxicidade é uma causa de preocupação dos DLCs, sendo que altas concentrações comprometem a função mitocondrial e despolarização do potencial de membrana, devido ao acúmulo de carga ^{128,137} e interferência com vários complexos da cadeia de transporte de elétrons ^{114,290}. De fato, DLCs têm sido utilizados como agentes citotóxicos em células tumorais ^{114, 291}.

Em baixas concentrações ($2,5 \mu\text{M}$) as imagens obtidas para o tratamento com o TPP-DFO (Figura 74 A e B) revelaram apenas uma leve diminuição na quantidade de mitocôndrias inchadas. Já o tratamento com FTP (precursor do TPP-DFO) causou alterações na rede mitocondrial (Figura 74B), mostrando que esse composto foi menos eficiente para os cardiomiócitos. Em altas concentrações ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$), os TPP-DFO e FTP provocaram mitocôndrias extremamente inchadas e causaram apoptose dos cardiomiócitos (dados não apresentados). Este resultado para o FTP foi esperado devido à sua toxicidade (IC_{50} de $4,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, Tabela 19).

Figura 74. A) Imagens representativas dos cardiomiócitos, marcados com MitoTracker, tratados com FTP e TPP-DFO. **B)** Porcentagem de cardiomiócitos foram tratados com FTP e TPP-DFO. Para cada condição, foram avaliadas pelo menos 50 células em 8 campos microscópicos diferentes avaliados utilizando o software ImageJ. Os miocárdios foram tratados com os DLCs.

A entrega mediada por DLCs é uma ferramenta relevante para transporte de pequenas moléculas, mas não tão eficaz para grandes construções polares ²⁹². Presume-se que as propriedades das moléculas grandes anulam o efeito carregador dos DLCs, o que seria o caso do DFO ^{114, 292,221}.

5. CONCLUSÕES

Não há nenhum tratamento que diminua ou previna totalmente a sobrecarga de ferro nas mitocôndrias (patogênese da FA), ficando o seu controle a cargo de uma terapia de quelação. Esta tese identifica quelantes de ferro altamente efetivos como os conjugados de DFO a partir dos peptídeos que penetram a mitocôndria (MPPs) como dos cátions lipofílicamente deslocalizados (DLC).

Os conjugados de DFO que provêm de MPPs (mtDFOs) são usados na distribuição de muitas cargas antioxidantes e anticancerígenas. Estes conjugados DFO-NSuc-Tat(49-57), DFO-NSuc-1A, DFO-NSuc-SS02 e DFO-NSuc-SS20 conservaram sua capacidade de quelação de ferro, verificada através de equilíbrios competitivos com as sondas fluorescentes calceína e transferrina. Da mesma forma, os mtDFO foram capazes de suprimir a atividade de redox do ferro a partir de soluções tamponadas e soros de pacientes sobrecarregados.

Os mtDFOs apresentaram boa permeabilidade celular e localização mitocondrial. Os ligantes mtDFO demonstraram uma maior localização mitocondrial do que o conjugado feito com o cátion trifênil fosfônio (que provem de DLC) chamado TPP-DFO.

Frente à linhagem A2780, os mtDFOs apresentaram uma baixa citotoxicidade, pouco dano ao DNA mitocondrial, um ciclo celular normal e baixa indução à apoptose. Além disso, o DFO-SS02 foi o único conjugado que apresentou atividade antioxidante, inibindo superóxido mitocondrial gerado. No caso do ligante TPP-DFO, sua citotoxicidade foi menor do que a de seu precursor FTP.

Finalmente, os mtDFOs apresentaram uma melhora significativa de morfologia mitocondrial, diminuindo em 45-70% o inchamento dessa organela. O tratamento com TPP-DFO não proporcionou uma melhora tão visível como os mtDFOs, mostrando só uma diminuição de 10% do inchamento mitocondrial.

O conjunto dos dados desta tese mostram que temos uma nova família promissora de compostos com potencial de serem usados para o tratamento de sobrecarga de ferro mitocondrial.

6 Bibliografia

1. Bleackley, M. R. & MacGillivray, R. T. A. Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *BioMetals* **24**, 785–809 (2011).
2. Shi, W. & Chance, M. R. Metallomics and metalloproteomics. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3040–3048 (2008).
3. Aisen, P., Enns, C. & Wessling-Resnick, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 940–59 (2001).
4. Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A. & Devireddy, L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* **51**, 5705–24 (2012).
5. Wang, J. & Pantopoulos, K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.* **434**, 365–81 (2011).
6. McKie, A. T. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1239–1241 (2008).
7. West, A.-R. & Oates, P.-S. Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World J. Gastroenterol.* **14**, 4101–10 (2008).
8. Ryter, S. W., Alam, J. & Choi, A. M. K. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* **86**, 583–650 (2006).
9. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Camaschella, C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* **142**, 24–38 (2010).
10. Kovac, S., Anderson, G. J. & Baldwin, G. S. Gastrins, iron homeostasis and colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 889–95 (2011).
11. Ganz, T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* **117**, 4425–33 (2011).
12. Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. & Lodish, H. F. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 2258–62 (1983).
13. Aisen, P. Transferrin receptor 1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2137–2143 (2004).
14. Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A. & Fleming, M. D. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* **108**, 1388–94 (2006).
15. Kruszewski, M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res.* **531**, 81–92 (2003).
16. Richardson, D. R. 24p3 and its receptor: dawn of a new iron age? *Cell* **123**, 1175–7 (2005).
17. Hider, R. C. & Kong, X. Iron speciation in the cytosol: an overview. *Dalton Trans.* **42**, 3220–9 (2013).
18. Jenkitkasemwong, S., Wang, C.-Y., Mackenzie, B. & Knutson, M. D. Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *Biomaterials* **25**, 643–55 (2012).

19. Oudit, G. Y. *et al.* L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat. Med.* **9**, 1187–94 (2003).
20. Oudit, G. Y., Trivieri, M. G., Khaper, N., Liu, P. P. & Backx, P. H. Role of L-type Ca²⁺ channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. *J. Mol. Med. (Berl)*. **84**, 349–64 (2006).
21. Tsushima, R. G. *et al.* Modulation of iron uptake in heart by L-type Ca²⁺ channel modifiers: possible implications in iron overload. *Circ. Res.* **84**, 1302–9 (1999).
22. Mühlenhoff, U. *et al.* Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab.* **12**, 373–85 (2010).
23. Richardson, D. R. *et al.* Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10775–82 (2010).
24. Ajioka, R. S., Phillips, J. D. & Kushner, J. P. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 723–36 (2006).
25. Stehling, O., Wilbrecht, C. & Lill, R. Mitochondrial iron–sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* **100**, 61–77 (2014).
26. Rouault, T. A. Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis. Model. Mech.* **5**, 155–64 (2012).
27. Stehling, O. & Lill, R. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a011312 (2013).
28. Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A. S., Martin, S. & Pastore, A. A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1865–77 (2002).
29. Campuzano, V. *et al.* Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423–7 (1996).
30. Gibson, T. J., Koonin, E. V., Musco, G., Pastore, A. & Bork, P. Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* **19**, 465–8 (1996).
31. Koutnikova, H. *et al.* Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat. Genet.* **16**, 345–51 (1997).
32. Babcock, M. Regulation of Mitochondrial Iron Accumulation by Yfh1p, a Putative Homolog of Frataxin. *Science (80-.)*. **276**, 1709–1712 (1997).
33. Huynen, M. A., Snel, B., Bork, P. & Gibson, T. J. The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2463–8 (2001).
34. Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G. & Lill, R. The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2025–36 (2002).
35. Lesuisse, E. *et al.* Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum. Mol. Genet.* **12**, 879–89 (2003).

36. Bulteau, A.-L. *et al.* Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* **305**, 242–5 (2004).
37. Park, S. *et al.* Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J. Biol. Chem.* **278**, 31340–51 (2003).
38. Ristow, M. *et al.* Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *J. Clin. Invest.* **112**, 527–34 (2003).
39. Gakh, O. *et al.* Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 467–79 (2006).
40. O'Neill, H. A. *et al.* Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry* **44**, 537–45 (2005).
41. Park, S., Gakh, O., Mooney, S. M. & Isaya, G. The ferroxidase activity of yeast frataxin. *J. Biol. Chem.* **277**, 38589–95 (2002).
42. Marmolino, D. Friedreich's ataxia: Past, present and future. *Brain Res. Rev.* **67**, 311–330 (2011).
43. Adamec, J. *et al.* Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 549–62 (2000).
44. Huang, J., Dizin, E. & Cowan, J. A. Mapping iron binding sites on human frataxin: implications for cluster assembly on the ISU Fe-S cluster scaffold protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 825–36 (2008).
45. Gakh, O. *et al.* Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* **41**, 6798–804 (2002).
46. Puccio, H. *et al.* Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* **27**, 181–6 (2001).
47. Rötig, A. *et al.* Aconitase and mitochondrial iron–sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* **17**, 215–217 (1997).
48. Amela, I., Delicado, P., Gómez, A., Querol, E. & Cedano, J. A Dynamic Model of the Proteins that Form the Initial Iron-Sulfur Cluster Biogenesis Machinery in Yeast Mitochondria. *Protein J.* **32**, 183–196 (2013).
49. Schagerlöff, U. *et al.* Structural Basis of the Iron Storage Function of Frataxin from Single-Particle Reconstruction of the Iron-Loaded Oligomer †. *Biochemistry* **47**, 4948–4954 (2008).
50. Becker, E. M., Greer, J. M., Ponka, P. & Richardson, D. R. Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in Friend cells: characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization. *Blood* **99**, 3813–22 (2002).
51. Yoon, T. & Cowan, J. A. Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 25943–6 (2004).
52. Irazusta, V., Cabisco, E., Reverter-Branchat, G., Ros, J. & Tamarit, J. Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia. *J. Biol. Chem.* **281**, 12227–32 (2006).

53. Bayot, A., Santos, R., Camadro, J.-M. & Rustin, P. Friedreich's ataxia: the vicious circle hypothesis revisited. *BMC Med.* **9**, 112 (2011).
54. Ceaser, E. K. *et al.* Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 151–155 (2004).
55. Zmijewski, J. W. *et al.* Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1385–1389 (2005).
56. Forman, H. J., Maorino, M. & Ursini, F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* **49**, 835–42 (2010).
57. Paulsen, C. E. & Carroll, K. S. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem. Biol.* **5**, 47–62 (2010).
58. Redox, O., Networks, S., Regulatory, T. & Switches, C. HHS Public Access. **5**, 47–62 (2015).
59. Winterbourn, C. C. & Hampton, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 549–561 (2008).
60. Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 81–128 (1991).
61. Monnier, V. M. Nonenzymatic Glycosylation, the Maillard Reaction and the Aging Process. *J. Gerontol.* **45**, B105–B111 (1990).
62. Uchida, K., Szveda, L. I., Chae, H. Z. & Stadtman, E. R. Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8742–6 (1993).
63. Halliwell, B. & Gutteridge, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (2007). at https://books.google.com.br/books/about/Free_Radicals_in_Biology_and_Medicine.html?hl=pt-BR&id=DrN4QgAACAAJ&pgis=1
64. Denicola, A. *et al.* Diffusion of nitric oxide into low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **277**, 932–6 (2002).
65. Liu, X., Miller, M. J., Joshi, M. S., Thomas, D. D. & Lancaster, J. R. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2175–9 (1998).
66. Ischiropoulos, H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 1–11 (1998).
67. Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109–42 (1991).
68. Wink, D. A. & Mitchell, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 434–56 (1998).
69. Butterfield, D. A. & Dalle-Donne, I. Redox proteomics. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 1487–9 (2012).
70. Nordberg, J. & Arnér, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1287–312 (2001).

71. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. & Noguchi, N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 668–76 (2005).
72. Pryor, W. A. *et al.* Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**, R491–511 (2006).
73. Schneider, C., Pratt, D. A., Porter, N. A. & Brash, A. R. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem. Biol.* **14**, 473–88 (2007).
74. Muftuoglu, M., Mori, M. P. & de Souza-Pinto, N. C. Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion* **17**, 164–81 (2014).
75. Burgoyne, J. R., Mongue-Din, H., Eaton, P. & Shah, A. M. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ. Res.* **111**, 1091–106 (2012).
76. Santos, C. X. C., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A. C. & Shah, A. M. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 777–93 (2011).
77. Sheftel, A. D. & Lill, R. The power plant of the cell is also a smithy: the emerging role of mitochondria in cellular iron homeostasis. *Ann. Med.* **41**, 82–99 (2009).
78. Lapice, E., Masulli, M. & Vaccaro, O. Iron deficiency and cardiovascular disease: an updated review of the evidence. *Curr. Atheroscler. Rep.* **15**, 358 (2013).
79. Prentice, A. M. Iron metabolism, malaria, and other infections: what is all the fuss about? *J. Nutr.* **138**, 2537–41 (2008).
80. Richardson, D. R., Mouralian, C., Ponka, P. & Becker, E. Development of potential iron chelators for the treatment of Friedreich's ataxia: Ligands that mobilize mitochondrial iron. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1536**, 133–140 (2001).
81. Koeppen, A. H. Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J. Neurol. Sci.* **303**, 1–12 (2011).
82. Friedreich, N. Ueber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Arch. für Pathol. Anat. und Physiol. und für Klin. Med.* **26**, 391–419 (1863).
83. Koeppen, A. H. & Mazurkiewicz, J. E. Friedreich ataxia: neuropathology revised. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**, 78–90 (2013).
84. Koeppen, A. H. The hereditary ataxias. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**, 531–43 (1998).
85. Lodi, R. *et al.* Cardiac energetics are abnormal in Friedreich ataxia patients in the absence of cardiac dysfunction and hypertrophy: an in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. *Cardiovasc. Res.* **52**, 111–9 (2001).
86. Meyer, C. *et al.* Cardiomyopathy in Friedreich's ataxia-assessment by cardiac MRI. *Mov. Disord.* **22**, 1615–22 (2007).
87. Lamarche, J. B., Côté, M. & Lemieux, B. The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *Can. J. Neurol. Sci.* **7**, 389–96 (1980).

88. Michael, S. *et al.* Iron and iron-responsive proteins in the cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *Cerebellum* **5**, 257–67 (2006).
89. Dürr, A. *et al.* Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1169–75 (1996).
90. Filla, A. *et al.* The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **59**, 554–60 (1996).
91. Harding, A. E. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* **104**, 589–620 (1981).
92. Calmels, N. *et al.* Limitations in a frataxin knockdown cell model for Friedreich ataxia in a high-throughput drug screen. *BMC Neurol.* **9**, 46 (2009).
93. Mincheva-Tasheva, S., Obis, E., Tamarit, J. & Ros, J. Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-xL protein. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 1829–41 (2014).
94. Cossee, M. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1219–1226 (2000).
95. Coppola, G. *et al.* Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the PPAR pathway as a therapeutic target in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2452–2461 (2009).
96. Cañizares, J. *et al.* dfh is a Drosophila homolog of the Friedreich's ataxia disease gene. *Gene* **256**, 35–42 (2000).
97. Ventura, N. *et al.* Reduced expression of frataxin extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **4**, 109–12 (2005).
98. Moreno-Cermeño, A. *et al.* Frataxin depletion in yeast triggers up-regulation of iron transport systems before affecting iron-sulfur enzyme activities. *J. Biol. Chem.* **285**, 41653–64 (2010).
99. Richardson, D. R., Muralian, C., Ponka, P. & Becker, E. Development of potential iron chelators for the treatment of Friedreich's ataxia: ligands that mobilize mitochondrial iron. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1536**, 133–140 (2001).
100. Kalinowski, D. S. The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer. *Pharmacol. Rev.* **57**, 547–583 (2005).
101. Wilson, R. B., Lynch, D. R., Farmer, J. M., Brooks, D. G. & Fischbeck, K. H. Increased serum transferrin receptor concentrations in Friedreich ataxia. *Ann. Neurol.* **47**, 659–61 (2000).
102. Wilson, R. B. Iron dysregulation in Friedreich ataxia. *Semin. Pediatr. Neurol.* **13**, 166–75 (2006).
103. Richardson, D. R. Friedreich's ataxia: iron chelators that target the mitochondrion as a therapeutic strategy? *Expert Opin. Investig. Drugs* **12**, 235–45 (2003).

104. Li, K., Besse, E. K., Ha, D., Kovtunovych, G. & Rouault, T. A. Iron-dependent regulation of frataxin expression: implications for treatment of Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2265–73 (2008).
105. Perlman, S. L. A review of Friedreich ataxia clinical trial results. *J. Child Neurol.* **27**, 1217–22 (2012).
106. Lynch, D. R. *et al.* Management and therapy for cardiomyopathy in Friedreich's ataxia. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **10**, 767–777 (2012).
107. Richardson, T. E., Kelly, H. N., Yu, A. E. & Simpkins, J. W. Therapeutic strategies in Friedreich's Ataxia. *Brain Res.* **1514**, 91–97 (2013).
108. FARA - Home. at <<http://www.curefa.org/index.php>>
109. Smith, R. A. J., Hartley, R. C., Cochemé, H. M. & Murphy, M. P. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 341–52 (2012).
110. Smith, R. A. J., Hartley, R. C. & Murphy, M. P. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 3021–38 (2011).
111. Yamada, Y. & Harashima, H. Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1439–62
112. Fulda, S., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 447–64 (2010).
113. Hoye, A. T., Davoren, J. E., Wipf, P., Fink, M. P. & Kagan, V. E. Targeting mitochondria. *Acc. Chem. Res.* **41**, 87–97 (2008).
114. Yousif, L. F., Stewart, K. M. & Kelley, S. O. Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: Strategies and applications. *ChemBioChem* **10**, 1939–1950 (2009).
115. Mukhopadhyay, A., Ni, L., Yang, C.-S. & Weiner, H. Bacterial signal peptide recognizes HeLa cell mitochondrial import receptors and functions as a mitochondrial leader sequence. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1890–9 (2005).
116. Srivastava, S. & Moraes, C. T. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 3093–9 (2001).
117. De la Loza, M. C. D. & Wellinger, R. E. A novel approach for organelle-specific DNA damage targeting reveals different susceptibility of mitochondrial DNA to the anticancer drugs camptothecin and topotecan. *Nucleic Acids Res.* **37**, e26–e26 (2008).
118. Weissig, V. Targeted drug delivery to mammalian mitochondria in living cells. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2**, 89–102 (2005).
119. Horobin, R. W., Trapp, S. & Weissig, V. Mitochondriotropics: a review of their mode of action, and their applications for drug and DNA delivery to mammalian mitochondria. *J. Control. Release* **121**, 125–36 (2007).
120. Kang, B. H. *et al.* Combinatorial drug design targeting multiple cancer signaling networks controlled by mitochondrial Hsp90. *J. Clin. Invest.* **119**, 454–464 (2009).

121. Grotto, H. Z. W. Metabolismo do ferro : uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase Iron metabolism : an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **5**, 390–397 (2008).
122. Pandolfo, M. & Hausmann, L. Deferiprone for the treatment of Friedreich's ataxia. *J. Neurochem.* **126 Suppl** , 142–6 (2013).
123. Kelley, S. O., Stewart, K. M. & Mourtada, R. Development of novel peptides for mitochondrial drug delivery: amino acids featuring delocalized lipophilic cations. *Pharm. Res.* **28**, 2808–19 (2011).
124. Ross, M. F. *et al.* Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochem. Biokhimiia* **70**, 222–30 (2005).
125. Frantz, M.-C. & Wipf, P. Mitochondria as a target in treatment. *Environ. Mol. Mutagen.* **51**, NA–NA (2010).
126. Reily, C. *et al.* Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics. *Redox Biol.* **1**, 86–93 (2013).
127. Rowe, T. C., Weissig, V. & Lawrence, J. W. Mitochondrial DNA metabolism targeting drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49**, 175–87 (2001).
128. Rin Jean, S. *et al.* Molecular vehicles for mitochondrial chemical biology and drug delivery. *ACS Chem. Biol.* **9**, 323–333 (2014).
129. Patel, N. R. *et al.* Mitochondria-targeted liposomes improve the apoptotic and cytotoxic action of sclareol. *J. Liposome Res.* **20**, 244–9 (2010).
130. Weissig, V., Boddapati, S. V, Cheng, S.-M. & D'Souza, G. G. M. Liposomes and liposome-like vesicles for drug and DNA delivery to mitochondria. *J. Liposome Res.* **16**, 249–64 (2006).
131. Biswas, S., Dodwadkar, N. S., Deshpande, P. P. & Torchilin, V. P. Liposomes loaded with paclitaxel and modified with novel triphenylphosphonium-PEG-PE conjugate possess low toxicity, target mitochondria and demonstrate enhanced antitumor effects in vitro and in vivo. *J. Control. Release* **159**, 393–402 (2012).
132. Boddapati, S. V, D'Souza, G. G. M., Erdogan, S., Torchilin, V. P. & Weissig, V. Organelle-targeted nanocarriers: specific delivery of liposomal ceramide to mitochondria enhances its cytotoxicity in vitro and in vivo. *Nano Lett.* **8**, 2559–63 (2008).
133. Weissig, V., D'Souza, G. G. & Torchilin, V. P. DQAsome/DNA complexes release DNA upon contact with isolated mouse liver mitochondria. *J. Control. Release* **75**, 401–8 (2001).
134. Milane, L., Duan, Z. & Amiji, M. Therapeutic efficacy and safety of paclitaxel/Ionidamine loaded EGFR-targeted nanoparticles for the treatment of multi-drug resistant cancer. *PLoS One* **6**, e24075 (2011).
135. Marrache, S. & Dhar, S. Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16288–93 (2012).
136. Marrache, S., Tundup, S., Harn, D. A. & Dhar, S. Ex vivo programming of dendritic cells by mitochondria-targeted nanoparticles to produce interferon-gamma for cancer immunotherapy. *ACS Nano* **7**, 7392–402 (2013).

137. Kelso, G. F. *et al.* Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.* **276**, 4588–96 (2001).
138. Skulachev, V. P. *et al.* An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 437–61 (2009).
139. Skulachev, V. P. A biochemical approach to the problem of aging: 'megaproject' on membrane-penetrating ions. The first results and prospects. *Biochem. Biokhimiia* **72**, 1385–96 (2007).
140. Filipovska, A. *et al.* Synthesis and characterization of a triphenylphosphonium-conjugated peroxidase mimetic. Insights into the interaction of ebselen with mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 24113–26 (2005).
141. Kelso, G. F. *et al.* A mitochondria-targeted macrocyclic Mn(II) superoxide dismutase mimetic. *Chem. Biol.* **19**, 1237–46 (2012).
142. Dikalova, A. E. *et al.* Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ. Res.* **107**, 106–16 (2010).
143. Antonenko, Y. N. *et al.* Derivatives of rhodamine 19 as mild mitochondria-targeted cationic uncouplers. *J. Biol. Chem.* **286**, 17831–40 (2011).
144. Lou, P.-H. *et al.* Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range. *Biochem. J.* **407**, 129–40 (2007).
145. Lei, W. *et al.* Mitochondria-targeting properties and photodynamic activities of porphyrin derivatives bearing cationic pendant. *J. Photochem. Photobiol. B.* **98**, 167–71 (2010).
146. Prime, T. A. *et al.* A mitochondria-targeted S-nitrosothiol modulates respiration, nitrosates thiols, and protects against ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 10764–10769 (2009).
147. Malouitre, S., Dube, H., Selwood, D. & Crompton, M. Mitochondrial targeting of cyclosporin A enables selective inhibition of cyclophilin-D and enhanced cytoprotection after glucose and oxygen deprivation. *Biochem. J.* **425**, 137–48 (2010).
148. Filipovska, A., Eccles, M. R., Smith, R. A. & Murphy, M. P. Delivery of antisense peptide nucleic acids (PNAs) to the cytosol by disulphide conjugation to a lipophilic cation. *FEBS Lett.* **556**, 180–186 (2004).
149. Chalmers, S. *et al.* Selective uncoupling of individual mitochondria within a cell using a mitochondria-targeted photoactivated protonophore. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 758–761 (2012).
150. Sikora, A. *et al.* Reaction between Peroxynitrite and Triphenylphosphonium-Substituted Arylboronic Acid Isomers: Identification of Diagnostic Marker Products and Biological Implications. *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 856–867 (2013).
151. Mourtada, R. *et al.* Re-directing an alkylating agent to mitochondria alters drug target and cell death mechanism. *PLoS One* **8**, e60253 (2013).
152. Fonseca, S. B. *et al.* Rerouting chlorambucil to mitochondria combats drug deactivation and resistance in cancer cells. *Chem. Biol.* **18**, 445–53 (2011).
153. Chamberlain, G. R., Tulumello, D. V & Kelley, S. O. Targeted delivery of doxorubicin to mitochondria. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1389–95 (2013).

154. Wisnovsky, S. P. *et al.* Targeting mitochondrial DNA with a platinum-based anticancer agent. *Chem. Biol.* **20**, 1323–1328 (2013).
155. Pereira, M. P. & Kelley, S. O. Maximizing the therapeutic window of an antimicrobial drug by imparting mitochondrial sequestration in human cells. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 3260–3 (2011).
156. Lei, E. K., Pereira, M. P. & Kelley, S. O. Tuning the intracellular bacterial targeting of peptidic vectors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 9660–3 (2013).
157. Yousif, L. F., Stewart, K. M., Horton, K. L. & Kelley, S. O. Mitochondria-penetrating peptides: Sequence effects and model cargo transport. *ChemBioChem* **10**, 2081–2088 (2009).
158. Li, L., Geisler, I., Chmielewski, J. & Cheng, J.-X. Cationic amphiphilic polyproline helix P11LRR targets intracellular mitochondria. *J. Control. Release* **142**, 259–66 (2010).
159. Ji, J. *et al.* Lipidomics identifies cardiolipin oxidation as a mitochondrial target for redox therapy of brain injury. *Nat. Neurosci.* **15**, 1407–13 (2012).
160. Green, M. & Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**, 1179–88 (1988).
161. Horton, K. L., Stewart, K. M., Fonseca, S. B., Guo, Q. & Kelley, S. O. Mitochondria-Penetrating Peptides. *Chem. Biol.* **15**, 375–382 (2008).
162. Machado, A. *et al.* Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine alpha-hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity. *Biopolymers* **88**, 413–26 (2007).
163. Torchilin, V. P. Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery. *Biopolymers* **90**, 604–10 (2008).
164. Schwarze, S. R. In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science* (80-.). **285**, 1569–1572 (1999).
165. Pinto, A., Hoffmanns, U., Ott, M., Fricker, G. & Metzler-Nolte, N. Modification with organometallic compounds improves crossing of the blood-brain barrier of [Leu5]-enkephalin derivatives in an in vitro model system. *Chembiochem* **10**, 1852–60 (2009).
166. Gupta, B., Levchenko, T. S. & Torchilin, V. P. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 637–51 (2005).
167. Vivès, E., Schmidt, J. & Pèlegri, A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta* **1786**, 126–38 (2008).
168. Snyder, E. L. & Dowdy, S. F. Cell penetrating peptides in drug delivery. *Pharm. Res.* **21**, 389–93 (2004).
169. Zhao, K. *et al.* Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* **279**, 34682–34690 (2004).
170. YAJIMA, H. *et al.*, Based on procedures in Goo, S.; *et al.* *Chem. Pharm. Bull.* 1988, 36, 4989; Tetrahedron, 1988, 44, 805-819. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 1689–1699 (2013).

171. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. & Cook, P. I. in *Analytical Biochemistry* **34**, 595–598 (1970).
172. Varanda, L. M. & Miranda, M. T. Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for and optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. *J. Pept. Res.* **50**, 102–8 (1997).
173. Merrifield, B. in *Methods in enzymology* **289**, 3–13 (1997).
174. Loffredo, C. *Estudo das sínteses de peptídeos em fase sólida passo a passo e convergente a 60 °C usando aquecimento convencional e micro-ondas.* (2009).
175. Ruiz, C. M. R. *Estudo da Síntese Convergente de peptídeos em fase sólida: abordagem clássica e uso de temperatura alta. Dissertação* (2003).
176. Atherton, E. & Sheppard, R. C. *Solid phase peptide synthesis: a practical approach.* (1989). at <https://books.google.com.br/books/about/Solid_phase_peptide_synthesis.html?id=SQrwAAAAMAAJ&pgis=1>
177. Wade, L. G. *Aminoacids, Peptides and Proteins. Em: Organic Chemistry, 5th edition, Pearson Prentice Hall, Spain, 2003, p. 1145-1151.* (Pearson, 2003).
178. Miranda, M. T., Liddle, R. A. & Rivier, J. E. Synthesis of human CCK26-33 and CCK-33 related analogues on 2,4-DMBHA and TMBHA. *J. Med. Chem.* **36**, 1681–8 (1993).
179. STEWART, J. M.; YOUNG, J.D. *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford, USA. 1984. p. 1-49. 1984 (1984).
180. Herscheid, J. D., Hoekstra, A. & Vos, C. M. N-Succinyl-desferrioxamine B: a potential radiopharmaceutical for assessing renal function. *Eur. J. Nucl. Med.* **9**, 508–10 (1984).
181. Goswami, D. *et al.* Deferasirox-TAT(47–57) peptide conjugate as a water soluble, bifunctional iron chelator with potential use in neuromedicine. *BioMetals* (2015). doi:10.1007/s10534-015-9873-5
182. CYNTHIA, A. GUY; GREG FIELDS. *Solid Phase Peptide Synthesis*, Academic Press, New York, USA. 1997. p. 67-71. 1997 (1997).
183. Machado, A., Liria, C. W., Proti, P. B., Remuzgo, C. & Miranda, M. T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. *Quim. Nova* **27**, 781–789 (2004).
184. LARISSA, C.M.R. *Estudo da síntese de peptídeos em fase sólida: Abordagem clássica e uso de microondas*, 2012, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo. 2012 (2012).
185. SMILLIE, L.B.; NATRISS, M. *Amino acid analyses of proteins and peptides of peptide and proteins: separation analyses and conformation.* CRC Press, Florida, U.S.A., 1991, P. 847-858. 1991 (1991).
186. Baccan, M. M., Chiarelli-Neto, O., Pereira, R. M. S. & Espósito, B. P. Quercetin as a shuttle for labile iron. *J. Inorg. Biochem.* **107**, 34–9 (2012).
187. Breuer, W. & Cabantchik, Z. I. A Fluorescence-Based One-Step Assay for Serum Non-Transferrin-Bound Iron. *Anal. Biochem.* **299**, 194–202 (2001).
188. Espósito, B. P. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood* **102**, 2670–2677 (2003).

189. Goswami, D. & Esposito, B. P. Cell Penetrating Peptide (CPP)-Conjugated Desferrioxamine for Enhanced Neuroprotection: Synthesis and in Vitro Evaluation. (2014).
190. Vitorino, H. A., Mantovanelli, L., Zanotto, F. P. & Espósito, B. P. Iron metallodrugs: stability, redox activity and toxicity against *Artemia salina*. *PLoS One* **10**, e0121997 (2015).
191. Alta, E. C. P. *et al.* Desferrioxamine-cafeine (DFCAF) as a cell permeant moderator of the oxidative stress caused by iron overload. *BioMetals* **27**, 1351–1360 (2014).
192. Ortega, P. *et al.* Cytochemical characterization of gill and hepatopancreatic cells of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura) validated by cell metal transport. *Fundação Zoobotânica do Rio Gd. do Sul* (2014).
193. Todorovski, T., Fedorova, M. & Hoffmann, R. Identification of isomeric 5-hydroxytryptophan-and oxindolylalanine- containing peptides by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **47**, 453–459 (2012).
194. Murphy, M. P. & Smith, R. A. J. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 629–56 (2007).
195. Wilson, J. J. & Lippard, S. J. In Vitro Anticancer Activity of cis -Diammineplatinum(II) Complexes with β -Diketonate Leaving Group Ligands. *J. Med. Chem.* **55**, 5326–5336 (2012).
196. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
197. Silverstein, L. R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. & De, I. E. LIBRO: Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle; Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos, sétima edição.
198. Amanda Do Rocio Andrade Pires, Dra. Silvia Maria Suter Correia. Cadena Derivados 1,3,4- Tiadiazóis Mesoiônicos: Disfunção Mitocondrial E Toxicidade Em Células HEPG2. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011. 1–157 (2011).
199. Santos, J. H., Meyer, J. N., Mandavilli, B. S. & Van Houten, B. Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* **314**, 183–99 (2006).
200. G. Wittig und U. Schoch-Grubler, Liebigs Ann. Chem. 1978,362-375..pdf.
201. Sanchis, D., Mayorga, M., Ballester, M. & Comella, J. X. Lack of Apaf-1 expression confers resistance to cytochrome c-driven apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Death Differ.* **10**, 977–86 (2003).
202. Obis, È., Irazusta, V., Sanchís, D., Ros, J. & Tamarit, J. Frataxin deficiency in neonatal rat ventricular myocytes targets mitochondria and lipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **73**, 21–23 (2014).
203. ALBERICIO, F. and CARPINO, L. Coupling Reagents and Activation. Em: Methods in Enzimology, v. 289, FIELDS, G. B.; Ed., Academic Press, San Diego, 1997, p. 104-127. 1997 (1997).
204. Horton, K. L., Pereira, M. P., Stewart, K. M., Fonseca, S. B. & Kelley, S. O. Tuning the activity of mitochondria-penetrating peptides for delivery or disruption. *ChemBiochem* **13**, 476–85 (2012).
205. Szeto, H. H., Soong, Y., Wu, D., Qian, X. & Zhao, G.-M. Endogenous opioid peptides contribute to antinociceptive potency of intrathecal [Dmt1]DALDA. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 696–702 (2003).

206. Mourtada, R. *A Journey Down the Cell Death Pathway of Mitochondria- Targeted Chlorambucil*. (2012).
207. Herscheid, J. D., Isaacs, H., de Jong, R. B. & Hoekstra, A. Evaluation of the renal scanning agent N-succinyl-desferrioxamine B in dogs. *Eur. J. Nucl. Med.* **11**, 363–4 (1986).
208. Verel, I. *et al.* 89Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.* **44**, 1271–81 (2003).
209. Von Srinivas Adapa, Peter Huher, W. K.-S. Isolation, Structure And Synthesis Of Ferrioxamine H; *Helvetica Chimica Acta*; 1982, 65, 1818-1824. *Helv. Chim. Acta* **65**, 1818–1824 (1982).
210. Elizabeth C. Pastrana A., Breno P. Espósito. 2014. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo. (2014).
211. Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. & Nudelman, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* **62**, 7512–7515 (1997).
212. Kalinowski, D. & Richardson, D. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **57**, 547–583 (2005).
213. Szyrwił, Ł. *et al.* A novel branched TAT 47–57 peptide for selective Ni 2+ introduction into the human fibrosarcoma cell nucleus. *Metallomics* **7**, 1155–1162 (2015).
214. Matsushita, M. *et al.* Photo-acceleration of protein release from endosome in the protein transduction system. *FEBS Lett.* **572**, 221–6 (2004).
215. Srinivasan, D. *et al.* Conjugation to the cell-penetrating peptide TAT potentiates the photodynamic effect of carboxytetramethylrhodamine. *PLoS One* **6**, 1–10 (2011).
216. Maiolo, J. R., Ottinger, E. A. & Ferrer, M. Specific redistribution of cell-penetrating peptides from endosomes to the cytoplasm and nucleus upon laser illumination. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15376–7 (2004).
217. Novabiochem, San Diego/CA, U. Catalogo, 2002-2003, pg 2.64-2.65.
218. Green, M. & Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**, 1179–1188 (1988).
219. Cantú, M. D., Carrilho, E., Wulff, N. A. & Palma, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quim. Nova* **31**, 669–675 (2008).
220. Espósito, B. P., Epsztejn, S., Breuer, W. & Cabantchik, Z. I. A Review of Fluorescence Methods for Assessing Labile Iron in Cells and Biological Fluids. *Anal. Biochem.* **304**, 1–18 (2002).
221. Raymond, K. N. & Dertz, E. A. *Biochemical and physical properties os siderophores.Iron Transport in Bacteria*. (American Society of Microbiology, 2004). doi:10.1128/9781555816544
222. Van Eijk, H. G. & de Jong, G. The physiology of iron, transferrin, and ferritin. *Biol. Trace Elem. Res.* **35**, 13–24 (1992).
223. Breuer, W. & Cabantchik, Z. I. A fluorescence-based one-step assay for serum non-transferrin-bound iron. *Anal. Biochem.* **299**, 194–202 (2001).

224. Mostert, L. J., Van Dorst, J. A., Koster, J. F., Van Eijk, H. G. & Kontoghiorghes, G. J. Free radical and cytotoxic effects of chelators and their iron complexes in the hepatocyte. *Free Radic. Res. Commun.* **3**, 379–88 (1987).
225. Pollack, S., Vanderhoff, G. & Lasky, F. Iron removal from transferrin. An experimental study. *Biochim. Biophys. Acta* **497**, 481–7 (1977).
226. Pollack, S., Aisen, P., Lasky, F. D. & Vanderhoff, G. Chelate Mediated Transfer of Iron from Transferrin to Desferrioxamine. *Br. J. Haematol.* **34**, 231–235 (1976).
227. Cerqueira, F. M., De Medeiros, M. H. G. & Augusto, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova* **30**, 441–449 (2007).
228. Dunlap, W., Llewellyn, L., Doyle, J. & Yamamoto, Y. A microtiter plate assay for screening antioxidant activity in extracts of marine organisms. *Mar. Biotechnol. (NY)* **5**, 294–301 (2003).
229. Walter Dunlap, Lyndon Llewellyn, Jason Doyle, Y. Y. A microtiter plate assay for screening antioxidant activity in extracts of marine organisms. *Mar Biotechnol (NY) 2003 May-Jun;5(3):294-301* (2003).
230. Napoli, E., Taroni, F. & Cortopassi, G. A. Frataxin, iron-sulfur clusters, heme, ROS, and aging. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 506–16 (2006).
231. Lloyd, J. B., Cable, H. & Rice-Evans, C. Evidence that desferrioxamine cannot enter cells by passive diffusion. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1361–1363 (1991).
232. Porter, J. B. & Huehns, E. R. 11 The toxic effects of desferrioxamine. *Baillieres. Clin. Haematol.* **2**, 459–474 (1989).
233. GmbH, D. E. Dojindo Cell counting Kit-8. 2014 (2014). at <<http://www.dojindo.eu.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.aspx>>
234. Assay, C. P. & Assay, C. Cell Counting Kit-8 Technical Manual. **8**, 4–5 (2013).
235. Carbonell, T. & Rama, R. Iron, oxidative stress and early neurological deterioration in ischemic stroke. *Curr. Med. Chem.* **14**, 857–74 (2007).
236. Voest, E. E., Rooth, H., Neijt, J. P., van Asbeck, B. S. & Marx, J. J. The in vitro response of human tumour cells to desferrioxamine is growth medium dependent. *Cell Prolif.* **26**, 77–88 (1993).
237. Doulias, P.-T., Christoforidis, S., Brunk, U. T. & Galaris, D. Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 719–28 (2003).
238. Kalinowski, D. S., Sharpe, P. C., Bernhardt, P. V. & Richardson, D. R. Structure-activity relationships of novel iron chelators for the treatment of iron overload disease: The methyl pyrazinylketone isonicotinoyl hydrazone series. *J. Med. Chem.* **51**, 331–344 (2008).
239. Fonseca, S. B. *et al.* Rerouting chlorambucil to mitochondria combats drug deactivation and resistance in cancer cells. *Chem. Biol.* **18**, 445–53 (2011).
240. Smith, R. A. J., Porteous, C. M., Gane, A. M. & Murphy, M. P. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5407–12 (2003).

241. Phagocytosis, Endocytosis, and Receptor Internalization. at <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/endocytosis-exocytosis-and-phagocytosis.html>>
242. Gump, J. M. & Dowdy, S. F. TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol. Med.* **13**, 443–8 (2007).
243. Henriques, S. T., Costa, J. & Castanho, M. A. R. B. Re-evaluating the role of strongly charged sequences in amphipathic cell-penetrating peptides: a fluorescence study using Pep-1. *FEBS Lett.* **579**, 4498–502 (2005).
244. Selig, R. A. *et al.* Ferritin production and desferrioxamine cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines. *Anticancer Res.* **13**, 721–5
245. Oliveira, A. R. R. De. Quantificação De Adn Nuclear E Adn Mitochondrial Por Pcr Em Tempo Real. 131 (2009).
246. Makalowski, W. The human genome structure and organization. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 587–598 (2001).
247. Butler, J. Aspects of Forensic DNA Typing using John M Butler ' s slides. *Most* (2006).
248. Wallace, D. C. The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene* **354**, 169–80 (2005).
249. Hunter, S., Jung, D., Giulio, R. Di & Meyer, J. The QPCR assay for analysis of mitochondrial DNA damage, repair, and relative copy number. *Methods* **51**, 444–451 (2010).
250. Wallace, D. C. Mitochondrial defects in neurodegenerative disease. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **7**, 158–66 (2001).
251. Bernard, P. S. & Wittwer, C. T. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin. Chem.* **48**, 1178–85 (2002).
252. Santos, J. H., Meyer, J. N., Mandavilli, B. S., Houten, B. Van & Molecular, M. Janine H. Santos, Joel N. Meyer, Bhaskar S. Mandavilli, and Bennett Van Houten; *Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols: Mammalian Systems*, Second Editio, Edited by: D. S. Henderson © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
253. Parker, R. J., Eastman, A., Bostick-Bruton, F. & Reed, E. Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *J. Clin. Invest.* **87**, 772–7 (1991).
254. Chamberlain, G. R. *Mitochondria-Targeted Doxorubicin is Active and Resistant to Drug Efflux by.* (2012).
255. Jean, S. R. *et al.* Mitochondrial Targeting of Doxorubicin Eliminates Nuclear Effects Associated with Cardiotoxicity. *ACS Chem. Biol.* **10**, 2007–2015 (2015).
256. Francisco Erivaldo Vidal Barros, Primavera Borell, Avaliação Do Ciclo Celular De Células Hematopoiéticas Da Medula Óssea De Camundongos Submetidos À Desnutrição Protéica, Dissertação De Mestrado, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTI. 2007 (2007).
257. Biology, W. M. BRUCE, A.; ALEXANDER, J.; JULIAN, L.; MARTIN, R.; KEITH, R.; PETER, W. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. Garland Science, 2002. 1616p. 2002 (2002).

258. Jesus, R. P. de, Waitzberg, D. L. & Campos, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **46**, 242–254 (2000).
259. Blain, S. W., Montalvo, E. & Massagué, J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J. Biol. Chem.* **272**, 25863–72 (1997).
260. Loureiro, J. & Santos, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Bol. Biotechnol.* **77**, 18–29 (2004).
261. Poot, M., Rabinovitch, P. S. & Hoehn, H. Free Radical Mediated Cytotoxicity of Desferrioxamine. *Free Radic. Res. Commun.* (2009). at <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10715768909055158#.VjJsILerRD8>>
262. Pias, E. K. *et al.* Differential effects of superoxide dismutase isoform expression on hydroperoxide-induced apoptosis in PC-12 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 13294–301 (2003).
263. Orrenius, S., Nicotera, P. & Zhivotovsky, B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicol. Sci.* **119**, 3–19 (2011).
264. Facts, Q. MitoSox Red mitochondrial superoxide indicator for live-cell imaging. 1–3 (2005). at <<papers2://publication/uuid/1035A4AF-054F-4A3F-B136-BE4CC9F17410>>
265. João Ferreira De Lima Neto, Fernanda da Cruz L., Análise Da Viabilidade E Ciclo Celular De Fibroblastos Equinos Cultivados In Vitro : Comparação Pré- E Pós-Descongelação, Dissertação de Mestrado, Botucatu-SP, 2007. 2007 (2007).
266. Barcinski, M. A. Apoptosis in Trypanosomatids: Evolutionary and phylogenetic considerations. *Genet. Mol. Biol.* **21**, (1998).
267. Kowaltowski, A. J., Cosso, R. G., Campos, C. B. & Fiskum, G. Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. *J. Biol. Chem.* **277**, 42802–7 (2002).
268. Landi, E. P. & Marques Júnior, J. F. C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **25**, 39–46 (2003).
269. Walsh, G. M., Dewson, G., Wardlaw, A. J., Levi-Schaffer, F. & Moqbel, R. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J. Immunol. Methods* **217**, 153–163 (1998).
270. Ahmed, S., Liu, C.-C. & Nawshad, A. Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) beta3. *Dev. Biol.* **309**, 193–207 (2007).
271. Mahon, K. P. *et al.* Deconvolution of the Cellular Oxidative Stress Response with Organelle-Specific Peptide Conjugates. *Chem. Biol.* **14**, 923–930 (2007).
272. Murphy, M. P. & Smith, R. A. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **41**, 235–50 (2000).
273. Nishikawa, T. *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**, 787–90 (2000).

274. Pitkanen, S. & Robinson, B. H. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* **98**, 345–51 (1996).
275. Mourtada, R. *et al.* Re-Directing an Alkylating Agent to Mitochondria Alters Drug Target and Cell Death Mechanism. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
276. Lieberman, E.A., Topali, V.P., Tsofina, L.M., Jasaitis, A.A. and Skulachev, V.P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. *Nature*, **222**, 1076-1078. Hdoi:10.1038/2221076a0|Reference|Scientific Resea. at <<http://www.ljemail.org/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=540822>>
277. Berry, M. N., Edwards, A. M., Barrit, G. J., Grivell, M. B., Halls, H. J., Gannon, B. J. & Friend, D. S., in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, eds. Burdon, R. H. & van Knippenberg, P. H. (Elsevier, Amsterdam), 1991, Vol. 21, pp. (Elsevier). doi:10.1016/S0075-7535(08)00002-8
278. Abián, J., Carrascal, M. & Gay, M. Introducción a la Espectrometría de masas para la caracterización de Péptidos y proteínas en Proteómica. *Seppo* **2**, 16–34 (2008).
279. Waters. Background Ion List for ESI. *Tech. Note* 1–4 (1999).
280. Suresh, R. *et al.* Solvent-free synthesis, spectral correlations and antimicrobial activities of some aryl imines. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **101**, 239–248 (2013).
281. Livros Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos - Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle (8521615213) - 29% de Economia - Buscapé. at <<http://www.buscape.com.br/identificacao-espectrometrica-de-compostos-organicos-robert-m-silverstein-francis-x-webster-david-j-kiemle-8521615213.html>>
282. Hyman, L. M. & Franz, K. J. A cell-permeable fluorescent prochelator responds to hydrogen peroxide and metal ions by decreasing fluorescence. *Inorganica Chim. Acta* **380**, 125–134 (2012).
283. Cnop, M. *et al.* Central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Ann. Neurol.* **72**, 971–82 (2012).
284. Stanton, B. K. B. *Berne & Levy Physiology, Updated Edition, 6th Edition* | Bruce Koeppen, Bruce Stanton | ISBN 9780323073622. (2009). at <<http://store.elsevier.com/Berne-and-Levy-Physiology-Updated-Edition/Bruce-Koeppen/isbn-9780323073622/>>
285. Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482–8 (1999).
286. Coppola, G. *et al.* Gene expression profiling in frataxin deficient mice: microarray evidence for significant expression changes without detectable neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **22**, 302–11 (2006).
287. Rasola, A. & Bernardi, P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* **50**, 222–33 (2011).
288. Zago, E. B., Castilho, R. F. & Vercesi, A. E. The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. *FEBS Lett.* **478**, 29–33 (2000).

289. Batandier, C., Leverve, X. & Fontaine, E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **279**, 17197–204 (2004).
290. Ross, M. F. *et al.* Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochem.* **70**, 222–230 (2005).
291. Sun, X. *et al.* AA1, a newly synthesized monovalent lipophilic cation, expresses potent in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* **54**, 1465–71 (1994).
292. Ross, M. F., Filipovska, A., Smith, R. A. J., Gait, M. J. & Murphy, M. P. Cell-penetrating peptides do not cross mitochondrial membranes even when conjugated to a lipophilic cation: evidence against direct passage through phospholipid bilayers. *Biochem. J.* **383**, 457–68 (2004).
293. Research Updates November-December 2008 | Quest Magazine Online. at
<<http://quest.mda.org/article/research-updates-november-december-2008>>

7 SÚMULA CURRICULAR

ROXANA YESENIA PASTRANA ALTA – Lima – Perú

1) Formação

Ano	Título ou atividade	Instituição
2008	Bacharel em Química	Universidad Nacional de Ingeniería – Lima-Perú*
2008	Licenciada em Química	Universidad Nacional de Ingeniería – Lima-Perú
2010	Especialista em HSEQ	Universidad Nacional de Ingeniería – Lima-Perú
2015	Doutorando em Química	Universidade de São Paulo – São Paulo- Brasil

*Selecioneado no terço superior na Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) – Lima – Perú (2007).

Trabalho de conclusão de curso:

- I. “LIBERACIÓN CONTROLADA DEL COMPLEJO $[\text{Cu}(\text{O}_2\text{CCH}_3)(\mu\text{-Qn})]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ EM MICRO-ESFERAS DE QUITOSO RETICULADOS COM GLUTARALDEHIDO” (Dezembro 2008). (Orientador : Ana Cecilia Valderrama Negrón)
- II. “SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL COMPLEJO $[\text{Cu}(\text{O}_2\text{CCH}_3)(\mu\text{-Qn})]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ” (Dezembro 2010). (Orientador : Ana Cecilia Valderrama Negrón)

2) Histórico profissional

Supervisor de Laboratório Químico de controle de qualidade:

Instituto geológico, minero, metalúrgico del Perú. (INGEMMET) – Lima – Perú: 2007 (enero-marzo).

Fábrica de proceso y elaboración de Cerveza (CERVEZATASKI) – Lima – Perú: 2007 (marzo-julho).

Consultora geológica, área de médio-ambiente y muestreo de aguas (ACOMISA) – Lima – Perú: 2008.

Corporación Peruana de Productos Químicos (CPPQ) – Lima – Perú: 2008-2010

Estágio em docência:

- Auxiliar de laboratório de Química Inorgânica (50h), Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) – Lima-Perú: 2008 (março-julho).

- Auxiliar de laboratório de Productos Naturales (50h), Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) – Lima–Perú: 2008 (março-julho).

Doutorando em pesquisa em Química, Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos (LAQBAM), Instituto de Química – USP: 2011-2015.

Monitor da disciplina prática/teórica de Química, alunos do curso bacharelado em química, farmácia, oceanografia, Instituto de Química (USP), 6 horas semanais por semestre.

- Monitoria Acadêmica em Química Geral II QFL-4020 (01-08-2012 – 1-12-2012)
- Monitoria Acadêmica em Química Inorgânica I QFL-4110 (01-02-2013 – 30-06-2013)
Monitoria Acadêmica em Química Inorgânica QFL-0140 (02-07-2013 – 07-12-2013)
- Monitoria Acadêmica em Fundamentos de Química Experimental QFL-1102 (02-02-2014 – 30-06-2014)
- Monitoria Acadêmica em Fundamentos de Química Experimental QFL-1102 (01-08-2014 – 12-12-2014)

Doutorado Sanduíche:

- Peptídeos que penetram à mitocôndria: Sínteses caracterização e purificação. University of Toronto, Toronto, Canada. Orientador: Shana O. Kelley. 2015 (febrero-Junho).
- Deficiência de Frataxina em miócitos ventriculares de rata neonatal: Avaliação dos mtDFO. University of Lleida, Barcelona, Espanha. Orientador: Joaquim Ros. 2015 (Julho).

3) Artigos completos publicados em periódicos

GOSWAMI, D; VITORINO, H. A.; **ALTA, R. Y. P.**; SILVESTRE, D. M; NOMURA, C. S ; MACHINI, M. T. ; ESPOSITO, B. P. . Deferasirox-TAT(47-57) peptide conjugate as a water soluble, bifunctional iron chelator with potential use in neuromedicine. BioMetals (Oxford), 2015.

4) Resumos publicados em anais de congressos e apresentações orais

- **ALTA, R. Y. P.**; MACHINI, M. T.; ESPOSITO, B. P. Revisão: Sínteses em fase solida (SPFS) de peptídeos que penetram à mitocôndria. In: II Congresso institucional IQ-USP, 2012, Guarujá-São Paulo, Brasil.

- **ALTA, R. Y. P.**; ESPOSITO, B. P. Síntesis, caracterização de complex de cobre (II) e sua atividade antimalarica. In: 1st International Conference on Environmental Bioinorganic and Toxicology Research, 2012. UNIFESP, DiademaSão Paulo, Brasil. **(Prêmio de melhor pôster)**.
- **ALTA, R. Y. P.**; ESPOSITO, B. P. Synthesis of Desferrioxamine-Peptide Conjugates for Mitochondrial Labile Iron Chelation. In: 5th Congress of the International Bioiron Society (Bioiron 2013), 2013, London. American Journal of Hematology, 2013. v. 88. p. E47-E47.
- **ALTA, R. Y. P.** ; VITORINO, H. A. ; KATZIN, A. M ; NEGRON, A. C. V. ; ESPOSITO, B. P. Synthesis, characterization and anti-malarial activity of a binuclear copper(II) acetate-quinine complex. In: 12th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine, 2013, Punta del Este, Uruguay. Book of abstracts, 2013. **(Apresentação oral)**.
- **ALTA, R. Y. P.**; MACHINI, M. T.; ESPOSITO, B. P. Conjugates Desferrioxamine-Cell penetrating Peptides Inhibit Iron-Catalyzed Generation of Reactive Oxygen species. In: IV Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry - V WOQUIBIO, 2014, Chascomús Buenos Aires. Book of abstracts, 2014.
- **ALTA, R. Y. P.**; MACHINI, M. T.; ESPOSITO, B. P. Development of Mitochondria-Targeted Iron Chelators for the Treatment of Friedrich Ataxia. 2014. Bioinorganic: Metal Overload in Medicine and Environment (BIOMET 2014), 2014. Lima-Perú. **(Apresentação oral)**.
- **ALTA, R. Y. P.**; MACHINI, M. T.; ESPOSITO, B. P. Mitochondrial Iron as a Potential Therapeutic Target in Friedreich's Ataxia Neurodegeneration: Desferrioxamine peptide Conjugate. In: The 29th Annual Symposium of The Protein Society. 2015, Fira de Barcelona-Montjuic, Barcelona, Espanha. Book of abstracts, 2015.
- **ALTA, R. Y. P.**; MACHINI, M. T.; ESPOSITO, B. P. Molecular Vehicles for Mitochondrial Chemical Biology and Drug Delivery. 2015. Bioinorganic Chemistry in Medicine and Environment (BIOMET 2015), 2015. Lima-Perú. **(Apresentação oral)**.

5) Organização de eventos

- **Organizador de evento com interesse científico, I Symposium:** Bioinorganic: Metal Overload in Medicine and Environment (BIOMET 2014), Dezembro 22, 2014. Universidad Nacional de Ingeniería (UNI).Lima-Perú. (<http://www.bicsociety.org>)

- **Organizador de evento com interesse científico, II Symposium:** Bioinorganic Chemistry in Medicine and Environment (BIOMET 2015), Dezembro 21 – 22, 2015. Universidad Nacional de Ingeniería (UNI). Lima-Perú. (<http://www.bicsociety.org>)

6) Financiamento à pesquisa:

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (2012-2016)

Doutorado Direto.

Projeto: Compostos de ferro de interesse farmacológico: avaliação da estabilidade de metalofármacos e capacidade de geração de reservatórios de ferro lábil.

Orientador: Professor Dr. Breno Pannia Espósito.

Co-Orientador: Professora Dra. Maria Teresa Machini.

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

8. ANEXOS

ANEXO A1: (A) Estruturas dos DFO-conjugados (mtDFO) sintetizados:

Fmoc-Arg(Pmc)-OH <p>Log P_{OW}= -1,43</p>	Fmoc-Arg(Pbf)-OH
Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Gln-OH <p>Log P_{OW}= -2,0</p>
Fmoc-Lys(Boc)-OH <p>Log P_{OW}= -1,15</p>	Fmoc-Cha-OH <p>Log P_{OW}= 1,09</p>
Fmoc-Phe-OH <p>Log P_{OW}= 0,78</p>	Fmoc-L-(2,6-di-Me)Tyr-OH <p>Log P_{OW}= 1,36</p>

Log P_{OW} calculado do software ChemDraw Ultra para cada aminoácido desprotegido.

(B)Estruturas dos DFO-conjugados (mtDFO) sintetizados:

DFO-Nsuc-tat

Chemical Formula: $C_{82}H_{156}N_{36}O_{21}$

Molecular Weight: 1982,38

DFO-Nsuc-1A

Chemical Formula: $C_{89}H_{161}N_{23}O_{18}$

Molecular Weight: 1841,41

DFO-Nsuc-SS20

Chemical Formula: $C_{59}H_{95}N_{15}O_{14}$

Molecular Weight: 1238,50

DFO-Nsuc-SS02

Chemical Formula: $C_{61}H_{99}N_{15}O_{15}$

Molecular Weight: 1282,55

ANEXO A2:

(A) Diferenças entre as estruturas da Rodamina e TAMRA:

(B) Estruturas dos DFO-conjugados (mtDFO) sintetizados:

DFO-Nsuc-tat-K-TAMRA

Chemical Formula: $C_{113}H_{188}N_{40}O_{26}$

Molecular Weight: 2522,95

DFO-Nsuc-1A-K-TAMRA

Chemical Formula: $C_{120}H_{193}N_{27}O_{23}$

Molecular Weight: 2381,98

DFO-Nsuc-SS02-K-TAMRA

Chemical Formula:

$C_{92}H_{131}N_{19}O_{20}$

Molecular Weight: 1823,14

DFO-Nsuc-SS20-K-TAMRA

Chemical Formula: $C_{90}H_{127}N_{19}O_{19}$

Molecular Weight: 1779,09

ANEXO A3:

(A) Cromatogramas brutos e purificados dos peptídeos e mtDFO

Figura A3-A1. Cromatogramas do DFO-Nsuc-Tat (49-57) bruto e purificado. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C18 (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min, V: 10 μ L.

Figura A3-A2. Cromatogramas do peptídeo 1A bruto e purificado. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C18 (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min, V: 10 μ L.

Figura A3-A3. Cromatogramas do DFO-Nsuc-1A bruto e purificado. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C18 (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min, V: 10 μ L.

Figura A3-A4. Cromatogramas do DFO-Nsuc-SS02 bruto e purificado. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C18 (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 40% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min, V: 10 μ L.

Figura A3-A5. Cromatogramas do DFO-Nsuc-SS20 bruto e purificado. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C18 (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 40% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min, V: 10 μ L.

(B) Cromatogramas purificados dos mtDFO- TAMRA

Figura B-1. Cromatograma do DFO-Nsuc-tat-K-TAMRA, Purificado. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 100% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 60min, V: 30 µL.

Figura A3-2. Cromatograma do DFO-Nsuc-1A-K-TAMRA, Purificado. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 100% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 60min, V: 30 µL.

Figura A3-1. Cromatograma do DFO-Nsuc-SS-02-K-TAMRA, Purificado. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 100% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 60min, V: 30 µL.

Figura A3-1. Cromatograma do DFO-Nsuc-SS-20-K-TAMRA, Purificado. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm, 300 Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 100% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 60min, V: 30 µL.

ANEXO A4: Análise por LC/ESI-MS dos peptídeos e respectivos conjugados

Figura A4-1. Peptídeo TAT (49-57) bruto. a) Cromatograma UV (210nm), b) Espectro de íons e c) Espectro de massas do segundo pico (4,2-7,8 min) e c1) Espectro de massas do primeiro pico. Condições de LC: injeção de 5 µL, coluna Vydac C₁₈ (250 x 4,6 mm, o diâmetro da partícula é 5 µm e o diâmetro do poro é 300Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min. Condições de ESI: capilar de 4,5kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: peptídeo acetilado Ac-NH-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-NH₂ [M+2xTFA+H₂O]⁺1196,6, [M]⁺ 959,58.; 2: peptídeo desejado [M]⁺1338,8.

Figura A4-2. mtDFO: DFO-Nsuc-TAT(49-57) purificado a) Cromatograma UV (210nm), b) Espectro de íons e c) Espectro de massas (13,6-14,7min). Condições de LC: injeção de 5 µL, coluna Vydac C₁₈ (250 x 4,6 mm, o diâmetro da partícula é 5 µm e o diâmetro do poro é 300Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min. Condições de ESI: capilar de 4,5kV, modo de ionização: ES⁺. Conjugado desejado [M+H]⁺1982,4.

Figura A4-3. Peptídeo 1A purificado a) Cromatograma UV (210nm), b) Espectro de íons e c) Espectro de massas (18,6-20,1min). Condições de LC: injeção de 5 μ L, coluna Vydac C₁₈ (250 x 4,6 mm, o diâmetro da partícula é 5 μ m e o diâmetro do poro é 300Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min. Condições de ESI: capilar de 4,5kV, modo de ionização: ES⁺. Peptídeo desejado [M+H]⁺1199,0.

Figura A4-4. mtDFO: DFO-Nsuc-1A purificado a) Cromatograma UV (210nm), b) Espectro de íons e c) Espectro de massas (20,7-23,3min). Condições de LC: injeção de 5 µL, coluna Vydac C₁₈ (250 x 4,6 mm, o diâmetro da partícula é 5 µm e o diâmetro do poro é 300Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min. Condições de ESI: capilar de 4,5kV, modo de ionização: ES⁺. Conjugado desejado [M+H]⁺1199,0.

Figura A4-5. Peptídeo SS02 buto a) Cromatograma UV (210nm), b) Espectro de íons e c) Espectro de massas do primeiro pico (10,0-11,3min). Condições de LC: injeção de 5 μ L, coluna Vydac C₁₈ (250 x 4,6 mm, o diâmetro da partícula é 5 μ m e o diâmetro do poro é 300Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min. Condições de ESI: capilar de 4,5kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: peptídeo desejado [M+H]⁺ 640,4; 2: impureza.

Figura A4-6. Peptídeo DFO-nsuc-SS02 buto a) Cromatograma UV (210nm), b) Espectro de íons e c) Espectro de massas do primeiro pico (10,0-11,3min). Condições de LC: injeção de 5 μ L, coluna Vydac C₁₈ (250 x 4,6 mm, o diâmetro da partícula é 5 μ m e o diâmetro do poro é 300Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min. Condições de ESI: capilar de 4,5kV, modo de ionização: ES⁺. Conjugado desejado [M+2H]⁺ 642,0.

Figura A4-7. Peptídeo SS20 purificado a) Cromatograma UV (210nm), b) Espectro de íons e c) Espectro de massas do primeiro pico (9,9-10,7 min). Condições de LC: injeção de 5 μ L, coluna Vydac C_{18} (250 x 4,6 mm, o diâmetro da partícula é 5 μ m e o diâmetro do poro é 300Å), solvente A: 0,1% TFA/ H_2O , solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/ H_2O , λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min. Condições de ESI: capilar de 4,5kV, modo de ionização: ES^+ . Peptídeo desejado $[M+H]^+$ 596,4.

Figura A4-8. mtDFO: DFO-Nsuc- SS20 purificado a) Cromatograma UV (210nm), b) Espectro de íons e c) Espectro de massas do primeiro pico (15,5-11,3min). Condições de LC: injeção de 5 μ L, coluna Vydac C₁₈ (250 x 4,6 mm, o diâmetro da partícula é 5 μ m e o diâmetro do poro é 300Å), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30min. Condições de ESI: capilar de 4,5kV, modo de ionização: ES⁺. Conjugado desejado [M+H]⁺ 1238,8.

ANEXO A5: Espectro de íons obtidos a traves de MALDI

Os peptídeos sintetizados pelo equipamento Peptide Synthesizer foram clivados e analisados por MALDI, e mostraram massas moleculares experimentais similares às teóricas.

(A) Espectro MALDI-MS do peptídeo e Fmoc-peptídeo-K

(B) Espectro MALDI-MS dos compostos mtDFO-3xTAMRA

(C) Espectro MALDI-MS dos compostos mtDFO-TAMRA

ANEXO A5.5: Test com apo-Transferrina Fluorescente (FI-a-tf)

Figura A5.5-1. Perfil da fluorescência dos experimentos: 1) formação do complexo com ferro, FI-a-tf—Fe, 2) mínima formação de complexo com ferro, FI-a-tf—Fe, 3) formação de complexos com ferro, FI-a-tf—Fe e mtDFO—Fe.

ANEXO A6: Ensaios de citotoxicidade

Figura A6-1. Viabilidade de células A2780 tratadas por 24h com mtDFO. Os valores são a média de pelo menos, 3 experiências independentes e erros reportados são o erros padrões.

Figura A6-2. Viabilidade de células A2780 tratadas por 24h com mtDFO-TAMRA. Os valores são a média de pelo menos, 3 experiências independentes e erros reportados são o erros padrões.

Figura A6-3. Viabilidade de células A2780 tratadas por 24h com DLCs. Os valores são a média de pelo menos, 3 experiências independentes e erros reportados são o erros padrões.

Figura A6-4. Viabilidade de células A2780 tratadas por 24h com outros conjugados DFO. Os valores são a média de pelo menos, 3 experiências independentes e erros reportados são o erros padrões.

ANEXO A7: Estudos de Imagem Celular

Figura A7-1. Células A2780, marcadas com Mito Tracker sem droga e analisadas por microscopia de fluorescência.

Figura A7-2. Localização intracelular de mtDFO-Tat-TAMRA em células A2780, marcadas com Mito Tracker e analisadas por microscopia de fluorescência em diferentes concentrações ate eliminar os Blebs.

Figura A7-3. Localização intracelular de mtDFO-1A-TAMRA em células A2780, marcadas com Mito Tracker e analisadas por microscopia de fluorescência em diferentes concentrações ate eliminar os Blebs.

Figura A7-4. Localização intracelular de mtDFO-SS20-TAMRA em células A2780, marcadas com Mito Tracker e analisadas por microscopia de fluorescência em diferentes concentrações ate eliminar os Blebs.

Figura A7-5. Localização intracelular de mtDFO-SS02-TAMRA em células A2780, marcadas com Mito Tracker e analisadas por microscopia de fluorescência em diferentes concentrações ate eliminar os Blebs.

ANEXO A8: Análise do ciclo celular

Figura A8-1. Fases do ciclo celular na avaliação dos fármacos de DFO. Os mtDFO não induz a paragem do ciclo celular e tem perfis muito parecidos à células não tratadas. Os valores médios plotados, $n = 3$.

Figura A8-2. Fases do ciclo celular na avaliação dos fármacos de DFO. Comparação de cada fases G1, S e G2 entre todos os mtDFO. Os valores médios plotados, $n = 3$, não mostram diferenças significativas ($P < 0.05$).

Figura A8-3. Ciclo celular, (a) Regiões criadas pelo software, se tem dois detectores um na linha do feixe da luz (*Forward Scatter* ou *FSC*) e vários perpendiculares a este (*Side Scatter* ou *SSC*). (b) Contagem de população de cada região. (c) Histograma do Ciclo Celular – Exemplo de resultado para a amostra DFO-1A.

ANEXO A9: Análise dos níveis de superóxido mitocondrial

Avaliação da produção de EROs mitocondrial por coloração das células A2780.

Figura A9-a. No primeiro procedimento trabalhou-se com concentrações de cada mtDFO ([mtDFO])= à metade de concentração IC_{50} ($[IC_{50}]$), incubadas por 24 h, em seguida lavou-se com PBS e novamente incubou-se com MitoSox por 30 min (protocolo 2 ou protocolo oficial no Laboratório da professora Kelley), desviação standard (s.d.) apresentado por barras não tem diferenças significativa entre os mtDFOs com o controle (Método de Dunns). Por outro lado mostraram diferenças significativas só entre o DFO-Tat e DFO-SS02 (a,b, $P < 0.05$), pelo Test Turkey.

A figura mostrou que o conjugado DFO-SS02 apresentou o menor nível de superóxido gerado ao redor de 1,6, sendo nível de superóxido do controle ao redor 2,8.

Figura A9-b. Células tratadas com mtDFO em concentrações =50% $[IC_{50}]$, se tripsinizo, se incubou com MitoSox por 30min e foi medido por citometria de fluxo (Protocolo 1) d.s. apresentado por barras, não apresentam diferenças significativas ($P < 0.05$).

A diferença com o protocolo 2 fica na parte depois da lavagem com PBS, as células são primeiro tripsinizadas e depois incubadas com MitoSox por 30 min. Se trabalhou com células em solução (não pegadas na parede da placa) as quais tem uma maior área de contato com o MitoSox gerando uma maior proporção de superóxido, sendo nível de superóxido do controle ao redor 6,3. As células pegadas nas paredes da placa, formam uma rede que ajuda no processo de regeneração das mesmas por algum dano ⁷³, não apresentando níveis de superóxido por células, mas sim por rede.

Figura A9-c. Células tratadas com mtDFO em concentrações >50% [IC₅₀], incubadas com MitoSox por 30min se tripsinizo e foi medido por citometria de fluxo (Protocolo 2), d.s. apresentado por barras, tem diferenças significativa do DFO-Tat com todos os mtDFO e controle (Test Dunnett ($P < 0.05$))

O terceiro procedimento mostrou o nível de superóxido do controle similar ao do procedimento 1 ao redor 2,8 e mostrando um perfil similar. Ou seja uma maior concentração dos mtDFO não geram um incremento de superóxido.

Figura A9-d. Células tratadas com mtDFO em concentrações =50% [IC₅₀], incubadas com MitoSox por 45min se tripsinizo e foi medido por citometria de fluxo (Protocolo 2) d.s. apresentado por barras, não apresentam diferenças significativas ($P < 0.05$).

O quarto procedimento parecido ao terceiro, é notória a diferença do nível de superóxido do controle ao redor de 8 quando é incrementado o tempo de incubação, mas o perfil é parecido a todos os procedimentos apresentados, sendo o DFO-SS02 o conjugado com menor geração de superóxido.

Figura A9-2. Avaliação da produção de ROS mitocondrial por coloração das células A2780 comparação dos quatro procedimentos utilizados.

Figura A9-3. Avaliação da produção de ROS mitocondrial. (a) Regiões criadas pelo software a partir dos detetores de luz FSC e SSC. (b) População da região selecionada. (c) Histograma Contagem vs PE-A. (d) Histograma Contagem vs SSC-A.

ANEXO A10: Ensaio de Apoptose (Anexina V)

Figura A10-1. Anexina V / Sytox Vermelho tinham as células A2780 tratadas com mtDFO a uma conc.=50%IC₅₀ por 24 horas, valores médios plotados, n = 3. (A) Os mtDFO induz apoptose de início lento. (A) Comparação dos estágios de morte celular em cada droga. (B) Comparação de um tipo de estágios de morte celular entre todos os compostos.

Figura A10-2. Ensaio de Apoptose (Anexina V). (a) Regiões criadas pelo software a partir dos detetores de luz FSC e SSC. (b) Histograma Contagem vs FITC-A. (c) População da região selecionada.

Figura A10-3. Ensaio de Apoptose (Anexina V). FACS analyses de células A2780 com V-FITC (A-FITC) e marcador SYTOX depois do tratamento com os mtDFOs por 90min. Percentagem das células em cada quadrante indicado. Tratamento com mtDFO não causa morte celular necrótica. A) controle, b) DFO-Tat (49-57)...etc

ANEXO A11: TPP-DFO

ChemNMR ¹H Estimativa

Qualidade estimativa é indicada pela cor: bom, médio, malo