UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Estudo da toxicidade induzida pelo antiinflamatório sulindaco e seus metabólitos sulfona e sulfeto”.

SAMARA LEITE

Ribeirão Preto

2006

SAMARA LEITE

“Estudo da toxicidade induzida pelo antiinflamatório sulindaco e seus metabólitos sulfona e sulfeto”.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, no Programa de Pós-graduação em Toxicologia da Universidade de São Paulo (USP), para obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio C. dos Santos

Ribeirão Preto

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Leite, Samara

Estudo da toxicidade induzida pelo antiinflamatório sulindaco e seus metabólitos sulfona e sulfeto.

Ribeirão Preto, 2006.

92 p.

Bibliografia: p. 74-92

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Toxicologia – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Santos, Antonio Cardozo.

1. AINE. 2. Sulindaco. 3. Células Hep G2. 4. Permeabilidade mitocondrial. 5. Desacoplamento. 6. Estresse oxidativo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Samara leite

Título: Estudo da toxicidade induzida pelo antiinflamatório sulindaco e seus metabólitos sulfona e sulfeto.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor.

Área de Concentração: Toxicologia

Aprovado em: 26/05/2006

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos (orientador)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr. Carlos Curti

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr. Orlando Castro e Silva junior

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr. Iguatemi Lourenço Brunetti

Faculdade Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

HOMENAGEM

O impressionista francês Claude Monet (1840 – 1926) atingiu a idade avançada de 86 anos. Mas a velhice afetou seriamente a sua vista. A catarata embaçou sua visão, e o amarelecimento dos cristalinos alterou a sua percepção das cores. Sua obra apresenta uma ilustração vívida de como essas deficiências distorcem a visão humana.

O amarelecimento começou primeiro. As proteínas que absorvem as cores frias (violeta, azul e verde) acumularam-se no cristalino, impedindo que esses raios de luz atingissem a retina. A luz vermelha e a amarela ainda passavam, traduzindo o mundo de Monet em cores cada vez mais quentes.

Depois, a catarata embaçou-lhe a visão, forçando a perceber seu ambiente como se estivesse olhando através de um vidro coberto de gelo. Com o tempo, ele acabou tendo dificuldade para discernir as formas, a luz normal do dia tornou-se ofuscante e, nos estágios finais, só conseguia diferenciar luz da escuridão.

Monet começou a notar que seus olhos estavam mudando durante uma viagem a Veneza, em 1908. O pintor, então com 68 anos, achava difícil selecionar as cores. Em 1912, seu médico diagnosticou uma catarata em cada olho e recomendou uma cirurgia, mas o artista teve medo. No seu tempo, a remoção de cataratas muitas vezes significava o fim da carreira de um artista. Daquele momento em diante, porém, a obra de Monet exibe menos detalhes. Predominam tons de vermelho e marrom. No início de 1922, escreveu que já não conseguia criar nada que fosse belo.

O olho direito de Monet conseguia apenas detectar a luz e a direção de onde ela vinha; o olho esquerdo conseguia enxergar apenas 10% do que é considerado normal. Em janeiro de 1923, aos 83 anos de idade, ele finalmente operou da catarata do olho direito, mas queixava-se de que os óculos tornavam as cores estranhas. Em 1925, finalmente encontrou óculos adequados e ficou exultante. Escreveu que podia enxergar bem e que voltaria a trabalhar intensamente. Infelizmente, morreu um ano mais tarde.

(autor desconhecido)

Trajatória admirável da vida deste pintor impressionista, a quem admiro pela grandiosa obra artística, pela percepção e interpretação que teve do mundo ao seu redor em função da leitura que sua visão oferecia, e pela perseverança e medo em encontrar o real e o verdadeiro ofuscado em seus olhos, mas vivo em sua mente.

DEDICATÓRIA

A Deus

A religião sempre esteve presente em diversos momentos importantes de nossa civilização, e principalmente, se fez acompanhar pela crença da existência de um ser perfeito, de personalidade inquestionável, adorável, protetor. Deus faz parte de nossas vidas como pilar para nossas inseguranças, temores, alegrias, e compartilha conosco a magia da nossa existência. Assim, dedico principalmente a Ele este trabalho, e agradeço imensamente por Ele ter me escutado e atendido em diversas vezes, auxiliado em momentos difíceis, e compartilhado comigo os sucessos e insucessos de minha jornada.

Aos meus pais

Celso Rodrigues Leite e Rosa Maria Rodrigues Leite

Dedico dois pensamentos para vocês, e que estão intimamente relacionados com a vida que viveram e vivem, os ensinamentos que repassaram, e os ideais de honra e honestidade que sempre cultivaram. Amor e carinho sempre estiveram presentes em nossa família.

“Não possuir algumas das coisas que desejamos é parte indispensável da felicidade”.
(Bertrand Russel)

“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio”.
(Martin Luther King Jr.)

Este pensamento em especial à minha mãe, pelas idas e vindas com sua saúde, O Yin e o Yang, a doença e a cura, o bem e o mal.

“Aprendi com a primavera a me deixar cortar. E a voltar inteira”.
(Cecília Meirelles)

Aos meus irmãos

Sinara Leite, Rafael Leite e Ismael Leite

Cada um com sua particularidade, sua trajetória e história de vida. Por mais que nos separemos, sempre estamos juntos. Este é nosso maior trunfo. Uma das alegrias que guardo e cultivo com muito carinho é exatamente esta. De compartilhar minha vida com vocês. A conquista de um é a comemoração de todos nós. O obstáculo de um sempre reflete no auxílio e dedicação de todos para a superação deste.

À minha cunhada e minha sobrinha

Caroline Leite e Dalya Pasquetti

A cada instante de nossas vidas, aprendemos o quanto é importante nos cercarmos de pessoas amáveis, delicadas, que representam a pureza e a segurança para viver a vida. Estas duas admiráveis pessoas entraram em meu mundo, conquistaram seu espaço em meu coração e me ensinaram que sempre existe um lado positivo, onde investir energias não só é necessário, como muitas vezes fornece a serenidade que faz falta.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Pelas horas infindáveis de paciência e compreensão dedicadas, sempre no sentido de impulsionar o crescimento espiritual, pessoal, intelectual e profissional; pela busca incessante de lapidar e despertar qualidades nas pessoas ao seu redor. Permanece como referência, um exemplo de vitória, sabedoria e de vida para mim.

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido que facilitaram e foram muitas vezes decisivos para a trajetória e conclusão deste trabalho.

- Às docentes dos Laboratórios de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), Dras. Regina Helena Costa Queiroz e Vera Lucia Lanchote, por contribuírem com minha formação e estarem sempre dispostas à auxiliar em questões científicas e trocarmos palavras amigas e reconfortantes em diversos momentos.

- Aos funcionários dos Laboratórios de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), Maria Aparecida Buzeto Pereira, Eduardo Tozatto, Natalino Bocardo, Neife A. G. dos Santos, Sandra H. A. dos Reis e Sônia A. C. Dreossi, pelo apoio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

- Aos docentes do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), Drs. Ana Isabel de Assis Pandochi, Augusto César Cropanese Spadaro, Carem Gledes Vargas Rechia e Yara Maria Lucisano Valim, pela receptividade e acolhimento que sempre tive, pela atenção e compreensão dispensadas.

- Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), Alcides Silva Pereira, Ana Cristina Morseli Pollizelo, Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, Ieda Maria

Razaboni Prado, Maria Regina de Pila Raphaloski e Nadir Mazzucato, pela intensa colaboração e auxílio para o desenvolvimento do meu trabalho, além da valorosa amizade refletida durante todos estes anos de convivência.

- Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), Antônio Zanardo Filho, João José Franco, Nancy Maria Rodrigues, por demonstrarem companheirismo, amizade e paciência em minhas “visitas”.

- Aos inesquecíveis amigos, Acácio Antônio Pigoso, Adriana Rocha, Alexandre Kanashiro, Anaísa Fernandes Calgaro Helena, Ana Paula Garcia Landi, Celma Gonçalves Duarte, Cláudia da Silva Bitencourt, Cleni Mara Marzochi Machado, Daniela Trinca Bertazzi, Denise Pimenta da Silva Leitão, Elisa Maria de Souza Russo, Fábio Ermínio Mingatto, Flávia Martinello, Flávio Vasconcelos, Frederico Marianetti Soriami, Kátia C. de Marco, Livia M. C. Simões, Luciana Mariko Kabeya, Miriam Ribeiro Moreira, Paulo Vinicius Gonçalves, Sheila Maria Soares, Taisa Magnani, Tiago Rodrigues, Vanessa Boralli, Vicente de Paulo Martins, Wanessa Garcia e Wilson Malfará; e especialmente Daniel Junqueira Dorta, Nádia Maria Martins, Rubens Bravalheri, e Valéria Gomes Tudella, pelo incondicional apoio e participação efetiva em minha vida.

- Aos novos amigos conquistados na Universidade Comunitária Regional de Chapecó (UNOCHAPECÓ), que atualmente convivem comigo, me proporcionam agradáveis momentos, e que muito enriquecem meu novo começo de vida.

- Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Biblioteca Central do campus da USP de Ribeirão Preto, do Biotério e da Vigilância (em especial ao “seu Antônio”).
- Agradeço de forma geral a todos que participaram e contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.
(Fernando Pessoa)

RESUMO

O sulindaco é um antiinflamatório não esteroide (AINE) classificado quimicamente como ácido carboxílico, da classe dos acetatos, que inibe de forma não seletiva a ciclooxigenase 1 e 2. Terapeuticamente, é utilizado como agente analgésico e antiinflamatório para o tratamento de sintomas da artrite reumatóide aguda e crônica, osteoartrite e espondilite anquilosante, no entanto, seu uso não está restringido somente a estas patologias, pois apresenta atividade quimiopreventiva, sendo atualmente também utilizado para este fim, apesar de inúmeros relatos de toxicidade gastrointestinal e hepática terem sido relatados na literatura. Ele é ingerido como um pró-fármaco, e por reações de biotransformação hepática origina um metabólito reduzido (sulindaco sulfeto, ativo farmacologicamente) e outro oxidado (sulindaco sulfona, inativo). Para avaliar os efeitos do sulindaco e seus metabólitos, foram realizados estudos *in vitro* em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, para explorar aspectos mecanísticos de toxicidade mitocondrial, e ensaios com linhagem celular de hepatoma humano HepG2, para avaliar seus efeitos após metabolização, uma vez que estas células mantêm enzimas responsáveis pelas reações de biotransformação de fase I e II.

Nossos resultados demonstram que o sulindaco sulfeto estimula a respiração de estado 4 e promove a liberação de cálcio pré-acumulado pela organela de maneira concentração-dependente, sendo evidente o efeito desacoplador sobre a fosforilação oxidativa, refletidos na diminuição da viabilidade celular em associação com a diminuição do conteúdo de ATP, provocado pela dissipação do potencial de membrana mitocondrial, sugerindo um mecanismo protonoforético de desacoplamento,

responsável pela toxicidade deste antiinflamatório. Além disso, foi observado o inchamento das mitocôndrias em meio energizado, condição que ocorre independente de cálcio presente no meio reacional. Este evento foi parcialmente sensível a ciclosporina A e Mg^{2+} , teve prevenção total com a adição de BHT e insensibilidade a outros moduladores, como ADP, ATP, DTT e NEM. Os resultados não condizem com a transição de permeabilidade mitocondrial clássica, uma vez que é dependente de cálcio, e o mecanismo de prevenção deste efeito obtida com a adição de BHT é desconhecido, pois não foi observada a indução de formação de radicais livres nos dois modelos experimentais utilizados. No entanto, a indução de intumescimento mitocondrial pode contribuir para seus efeitos tóxicos.

O sulindaco e o sulindaco sulfona não apresentaram quaisquer efeitos descritos para o sulindaco sulfeto, indicando que somente o metabólito farmacologicamente ativo é responsável pelos efeitos tóxicos observados. A biotransformação por reações de Fase I e II podem contribuir para a toxicidade *in vivo*, por originarem o metabólito reduzido, e como o sulindaco é utilizado em terapias que envolvem uso por tempo prolongado, é prudente realizar um monitoramento da função hepática antes e durante o período de tratamento, no sentido de prevenir complicações do uso na terapia convencional.

ABSTRACT

Sulindac is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) known to inhibit non-selectively cyclooxygenases (COX) 1 and 2. Sulindac is therapeutically used as anti-inflammatory and analgesic in the symptomatic treatment of acute and chronic rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and ankylosing spondylitis. In addition to this property, a role in the prevention/regression of colonic carcinogenesis, has been described for both sulindac and metabolites. Nevertheless, its therapeutic use has been limited because of its toxicity to the gastrointestinal tract and liver, reported in the literature. Sulindac is a prodrug that is "*in vivo*" metabolized to its pharmacological active metabolite, sulindac sulfide and its pharmacological inactive one, sulindac sulfone. In order to assess the effects of sulindac and its metabolites, we used "*in vitro*" studies with isolated rat liver mitochondria, to evaluate the aspects of its toxicity in mitochondria; and studies with human hepatoma cell line (HepG2), to evaluate its effects after biotransformation.

The present study shows that sulindac sulfide, but not sulindac sulfone or sulindac itself, cause mitochondrial uncoupling, releasing pre-accumulated Ca^{2+} from the organelle, and decrease Hep-G2 cell viability in an apparent association with cellular ATP depletion resulted from mitochondrial uncoupling-associated membrane potential dissipation. We therefore propose mitochondrial uncoupling by sulindac sulfide as a potential mechanism for the well established toxicity of sulindac, at least to the liver in humans. It was also observed a mitochondrial swelling in energized media that can occur without dependence on the calcium present in the media. This event was partially inhibited by CsA and Mg^{2+} , and completely inhibited with the addition of BHT. It did not show any inhibition with the addition of ADP, ATP, DTT or NEM. These results can not

be associated to the classical mitochondrial permeability transition that is dependent to calcium, and the mechanism of inhibition observed with BHT is not known, since it was not observed any production of free radicals in our models, but the swelling observed can also contribute to the toxic effects observed. The sulindac itself and the sulfone metabolite did not show any toxic effect observed for the sulfide form, indicating that just the pharmacological active metabolite is responsible for the toxic effects.

The biotransformation (phase I and II reactions) can contribute to sulindac toxicity, because they generate the reduced form. Sulindac is also used in long term treatment, so it is necessary the monitoring of the hepatic function is necessary before and during the treatment, in order to prevent any further complication.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina 5'-difosfato
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
ANT	Translocador de nucleotídeos de Adenina
APAF-1	Fator ativador de apoptose 1
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
CAVD	Canal aniônico voltagem-dependente
CI50	Concentração inibitória
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C_{máx}	Concentração máxima
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
CsA	Ciclosporina A
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
DCF	Diclorofluoresceína
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EGTA	Ácido etilenoglicol bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	Carbonilcianeto- <i>p</i> -trifluormetoxifenilhidrazina
GSH	Glutathiona reduzida
GMP_c	Guanidina monofostato cíclica

GPx	Glutathiona peroxidase
GRd	Glutathiona redutase
H₂DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3-tetraetilbenzimidazolilcarbicina
JNK	Quinase c-Jun NH ₂ terminal
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
MDA	Malondialdeído
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato), forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato), forma reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-<i>κ</i>B	Fator nuclear <i>κ</i> B
OH[•]	Radical hidroxila
O₂^{•-}	Ânion superóxido
OPT	o-ftaldialdeído
PKG	Proteína quinase G
RCR	Razão de controle respiratório
SOD	Superóxido dismutase

SUC	Succinato
<i>t</i>-BOOH	<i>Tert</i> -butil hidroperóxido
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TBARs	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano
UVB	Radiação ultravioleta tipo B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do sulindaco e arranjo tridimensional molecular.....	07
Figura 2	Estrutura química do sulindaco sulfona e arranjo tridimensional molecular.....	08
Figura 3	Estrutura química do sulindaco sulfeto e arranjo tridimensional molecular.....	09
Figura 4	Consumo de oxigênio mitocondrial.....	43
Figura 5	Transporte de cálcio mitocondrial.....	44
Figura 6-A	Intumescimento osmótico mitocondrial, efeitos do sulindaco.....	51
Figura 6-B	Intumescimento osmótico mitocondrial, efeitos do sulindaco sulfona.....	51
Figura 6-C	Intumescimento osmótico mitocondrial, efeitos do sulindaco sulfeto.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Potencial de membrana avaliado em células HepG2.....	44
Gráfico 2	Estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais.....	45
Gráfico 3	Efeito do sulindaco e seus metabólitos sobre o conteúdo de ATP em células HepG2.....	47
Gráfico 4	Efeitos do sulindaco e seus metabólitos sobre a viabilidade celular em células HepG2.....	48
Gráfico 5	Avaliação da indução de formação de radicais livres em mitocôndrias isoladas.....	55
Gráfico 6	Avaliação da lipoperoxidação mitocondrial.....	56
Gráfico 7	Análise do conteúdo de glutathione reduzida em mitocôndrias isoladas....	57
Gráfico 8	Determinação do conteúdo de proteína sulfidril.....	58
Gráfico 9	Efeitos do sulindaco e seus metabólitos na indução de formação de radicais livres em células HepG2.....	59
Gráfico 10	Efeitos do sulindaco e seus metabólitos na indução de formação de malondialdeído em células HepG2.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO TEÓRICA.....	05
2.1 Características farmacológicas do sulindaco.....	05
2.2 Estruturas químicas.....	07
2.3 Aplicações terapêuticas.....	10
2.4 Reações adversas.....	13
2.5 Pesquisa toxicológica por diferentes modelos experimentais.....	14
2.5.1 Mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	14
2.5.2 Linhagem celular de hepatoma humano HepG2.....	23
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
4 METODOLOGIA.....	28
4.1 Ensaio com mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	28
4.1.1 Isolamento da fração mitocondrial.....	28
4.1.2 Determinação da proteína mitocondrial.....	29
4.1.3 Respiração mitocondrial.....	29
4.1.4 Intumescimento osmótico mitocondrial (<i>swelling</i>).....	30
4.1.5 Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais.....	30
4.1.6 Estimativa do transporte de cálcio mitocondrial.....	31
4.1.7 Monitoramento da formação de espécies reativas de oxigênio.....	31
4.1.8 Determinação da lipoperoxidação da membrana mitocondrial.....	32

4.1.9 Determinação do conteúdo de glutathione reduzida.....	32
4.1.10 Oxidação dos grupos tiólicos de proteínas.....	33
4.2 Ensaio em células de hepatoma humano HepG2.....	34
4.2.1 Cultura e tratamento das células.....	34
4.2.2 Avaliação da viabilidade celular.....	35
4.2.3 Potencial de membrana mitocondrial.....	35
4.2.4 Determinação do ATP intracelular.....	36
4.2.5 Geração de espécies reativas de oxigênio pelas células.....	36
4.2.6 Determinação da lipoperoxidação celular.....	37
4.3 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos em parâmetros bioenergéticos.....	39
5.2 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos em relação à transição de permeabilidade mitocondrial.....	49
5.3 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos sobre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e lipoperoxidação.....	53
6 DISCUSSÃO.....	61
6.1 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos sobre a fosforilação oxidativa e liberação de cálcio: relação com a bioenergética celular.....	61
6.2 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos em relação à transição de permeabilidade mitocondrial.....	66
6.3 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos no estresse oxidativo e relação com bioenergética.....	69
7 CONCLUSÕES.....	73

8 REFERÊNCIAS.....	74
---------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

Os antiinflamatórios constituem um grupo de medicamentos com ampla prescrição mundial, pois são agentes que auxiliam na terapia de vários processos patológicos, visto que oferecem ação farmacológica antiinflamatória, analgésica e antipirética como efeitos primários. Além disso, existem estudos que relatam a indução do processo apoptótico celular, e esta propriedade particular faz com que estes medicamentos sejam utilizados terapêutica e experimentalmente no tratamento de processos cancerígenos das mais variadas etiologias.

A população exposta a estes medicamentos é bastante expressiva, e o risco de desenvolvimento de reações adversas aumenta à medida que cresce o padrão de consumo destas substâncias. Devido ao uso na terapia de doenças reumáticas, como febre tifóide, espondilite anquilosante, osteoartrite, entre outras, estes usos somados à facilidade de aquisição destes fármacos (pois possuem a venda relativamente facilitada pelo comércio farmacêutico de alguns países), e ao preço acessível (entre outros fatores), os riscos de indução de toxicidade a órgãos alvo como fígado e rins tende a aumentar, visto que os clínicos de forma geral não atentam para os sinais e sintomas de uma possível intoxicação medicamentosa.

O fígado é o órgão central do metabolismo, portanto, os danos hepáticos induzidos por drogas são uma complicação em potencial de quase toda a medicação que é prescrita. Estas drogas são comumente biotransformadas sem danos hepáticos, mas alguns compostos podem causar danos dose-dependentes ou formar sub-produtos tóxicos. Outras lesões ao fígado incluem a interrupção da função intracelular ou indiretamente através de alterações da integridade da membrana celular. Os

compostos químicos que são absorvidos oralmente são transportados via circulação portal para o fígado, onde sofrem metabolismo hepático seguido de eliminação pela bile ou pelos rins. Uma via típica de metabolismo de drogas é a oxidação (reações da fase I), seguida de conjugação da molécula oxidada com moléculas altamente polares (reações da fase II).

Os hepatócitos também possuem uma quantidade considerável de mitocôndrias, organelas essenciais para manter o equilíbrio das funções celulares energia-dependentes, incluindo o metabolismo intermediário, regulação de íons e outros processos de transporte ativo e proliferação celular. Devido à capacidade energética corporal ser suprida principalmente pela fosforilação oxidativa, interferências na função mitocondrial resultam em profundo *déficit* bioenergético, levando à perda de várias funções vitais para a sobrevivência da célula e portanto, do organismo. Entretanto, as mitocôndrias são também a principal fonte de espécies reativas de oxigênio na célula, e estão envolvidas com a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Disfunções mitocondriais podem ser, portanto, o maior mecanismo de indução de doenças hepáticas por drogas e/ou medicamentos.

A presença de defesas antioxidantes no organismo reduz os efeitos maléficos que os radicais livres provocam. O tripeptídeo GSH é substrato para várias enzimas antioxidantes, e alterações em sua disponibilidade podem afetar o balanço das defesas antioxidantes naturais. Os grupos tióis são essenciais para a manutenção das atividades enzimáticas e de outros processos que dependem da integridade das macromoléculas, porque participam de processos metabólicos complexos. Alterações no balanço dissulfeto, como oxidação destes grupamentos, podem afetar a integridade das membranas, a homeostasia do cálcio, alterações enzimáticas e protéicas, bem

como de outras macromoléculas essenciais, e, assim, ocasionando danos celulares irreversíveis e letais.

Alguns antiinflamatórios não esteroidais possuem efeitos diretos na bioenergética mitocondrial e este fato caracteriza uma propriedade comum a estes fármacos, o desacoplamento da fosforilação oxidativa. Os antiinflamatórios não esteroidais possuem estrutura química semelhante, e a afinidade lipofílica, acidez e alguns grupos substituídos possuem um importante papel no efeito desacoplador. Porém, existe atualmente uma extrema dificuldade para explicar porque alguns antiinflamatórios não esteroidais são mais potentes do que outros para induzir o efeito desacoplador, e seu papel na toxicidade a órgãos alvo (hepatotoxicidade e nefrotoxicidade) figuram como ações tóxicas mais comuns. Os mecanismos de indução destas lesões permanecem pouco elucidados, mas existem hipóteses que sugerem que um dos mecanismos está relacionado a metabolização de drogas pelas enzimas hepáticas.

Dentre os antiinflamatórios, o sulindaco desperta a atenção dos pesquisadores devido a propriedade de indução da apoptose. Em humanos, pesquisas recentes consideram os possíveis efeitos da aspirina e de alguns antiinflamatórios não esteroidais na quimioprevenção do câncer. Efeitos protetores não foram encontrados em pacientes com câncer colorretal para acetaminofeno e paracetamol; porém, em pacientes com a mesma síndrome e com a administração concomitante de sulindaco (300-400 mg/dia), os pólipos são eliminados quase completamente após quatro meses do início da terapia. Estas informações indicam que os antiinflamatórios não esteroidais podem levar à regressão da neoplasia estabelecida, mas estudos recentes mostram

que os efeitos protetores são rapidamente reversíveis se o tratamento for interrompido (BARON e SANDLER, 2000).

Considerando que a hepatotoxicidade é um efeito tóxico comum à maioria dos antiinflamatórios não esteroidais, e em virtude do sulindaco ser um antiinflamatório com diversos empregos clínicos, este estudo visa a investigação dos efeitos do sulindaco e de seus metabólitos (sulfeto e sulfona) em modelo experimental *in vitro* de mitocôndrias isoladas de fígado de rato e seus efeitos em células de hepatoma HepG2, sobre parâmetros bioenergéticos mitocondriais e formação de espécies reativas de oxigênio, no sentido de sugerir um possível mecanismo de indução de toxicidade, visto que o sulindaco sofre processos de detoxificação celular e origina um metabólito com atividade farmacológica.

2. REVISÃO TEÓRICA

2.1. Características farmacológicas do sulindaco

O sulindaco é um antiinflamatório não esteroidal ácido, classificado quimicamente como ácido carboxílico, da classe dos acetatos. A absorção é rápida quando ingerido oralmente. Ele é metabolizado reversivelmente a sulfeto, e metabolizado irreversivelmente a sulfona. O sulindaco e seus produtos metabólicos ligam-se extensivamente à albumina plasmática, e acumulam-se no plasma. A eliminação do fármaco e de seus produtos de biotransformação (sulindaco sulfonado e metabólitos conjugados) é feita através da excreção na urina, e somente uma pequena quantidade da forma sulfeto é eliminada através desta via (DAVIES e WATSON, 1997; GALA; SUN; YANG, 2002).

O pró-fármaco age através da inibição da síntese de prostaglandinas endógenas, como consequência do bloqueio da enzima ciclooxygenase (COX) (FERNANDES et al., 2003). O sulindaco sulfeto, derivado farmacologicamente ativo do sulindaco, é um potente inibidor da COX-1, mas fraco inibidor da COX-2. A CI50 para inibição da COX-1 está na escala de níveis realizáveis em seres humanos, mas a CI50 para a COX-2 não é conseguida prontamente com um regime de dose entre 150 a 200 mg. O sulindaco sulfona não é por si um antiinflamatório não esteroidal, mas, como já mencionado anteriormente, é formado como metabólito do pró-fármaco sulindaco, sendo ineficaz para inibir a COX-1 ou a COX-2 (MYERS et al., 2001).

O sulindaco é uma molécula pequena e lipossolúvel. Apresenta um anel indênico, no qual estão inseridos ácido acético, flúor, estireno e metil sulfinil na posição *para* do benzeno. Move-se livremente através das membranas plasmáticas e é carregado

negativamente, sendo capaz de interagir com cátions. Ele é ingerido como um pró-fármaco sulfóxido, que é parcialmente oxidado no fígado para estabelecer e manter um equilíbrio aproximado de 50:50 entre seus metabólitos oxidado e reduzido no plasma. No intestino, o sulindaco é reduzido a sulfeto pela ação de bactérias da flora do colo. Através da circulação entero-hepática ocorre uma renovação cíclica da forma reduzida presente com a forma oxidada na circulação sanguínea. Isto representa um meio de transporte de elétrons sistêmico, que mantém os tecidos periféricos expostos para as formas oxidada e reduzida do fármaco. No sangue, os dois derivados do sulindaco, a forma oxidada sulfona e a forma reduzida sulfeto estão aproximadamente 95% ligadas à albumina, e o restante é livre. O pK_a do sulindaco é de $5,8 \pm 0,5$, e no pH citoplasmático (7,2 – 7,4) está mais ionizado e apresenta-se como base de Lewis. Quando o ácido acético no anel indênico do sulindaco dissocia a íon hidrogênio, resulta em um ânion carboxilado carregado negativamente ($X-COO^-$), onde X representa o restante da molécula. Estes ânions podem ser capazes de interações iônicas com moléculas carregadas positivamente, como lisina e arginina, e com prótons acumulados no espaço intermembrana da mitocôndria (WADDELL, 1998; MUIR e LOGAN, 1999).

2.2 Estruturas Químicas

Figura 1. **Estrutura química do sulindaco e arranjo tridimensional molecular.** As moléculas foram montadas com base no programa ACD, versão de software livre para Windows Chems sketch 2.0 e 3D, da empresa Advanced Development Inc, de acordo com estruturas citadas por FERNANDES et al (2003).

Figura 2. **Estrutura química do sulindaco sulfona e arranjo tridimensional molecular.** As moléculas foram montadas com base no programa ACD, versão de software livre para Windows Chems sketch e 3D, da empresa Advanced Development Inc, de acordo com estruturas citadas por FERNANDES et al (2003).

Figura 3. **Estrutura química do sulindaco sulfeto e arranjo tridimensional molecular.** As moléculas foram montadas com base no programa ACD, versão de software livre para Windows Chems sketch e 3D, da empresa Advanced Development Inc, de acordo com estruturas citadas por FERNANDES et al (2003).

2.3 Aplicações terapêuticas

Terapeuticamente o sulindaco é utilizado como agente analgésico e antiinflamatório para o tratamento de sintomas da artrite reumatóide aguda e crônica, osteoartrite e espondilite anquilosante. No entanto, seu uso clínico não está restringido apenas para estas patologias, pois este fármaco apresenta atividade quimiopreventiva, sendo atualmente também utilizado para este fim (DAVIES e WATSON, 1997; FERNANDES et al., 2003).

Existem evidências derivadas de diferentes linhas de investigação sugerindo que as prostaglandinas (metabólitos do ácido araquidônico), possuem um importante papel no desenvolvimento do câncer de colo. Elevados níveis de prostaglandinas são encontrados em pacientes com esta patologia, bem como suas lesões, os pólipos adenomatosos. Os agentes que inibem a geração destes metabólitos do ácido araquidônico são associados com o decréscimo do risco de desenvolvimento ou mortalidade do câncer de colo. Dados obtidos através de triagens humanas também sugerem que alguns AINEs, como o sulindaco, possuem a habilidade de prevenir e eliminar carcinomas intestinais, carcinomas esofagianos, e câncer de pâncreas, bexiga, fígado, peito e pulmão e podem reduzir um grande número de pólipos em indivíduos com polipose adenomatosa familiar, devido à inibição da enzima COX-2, uma forma que aumenta os níveis dos estados antiinflamatórios e pode estar associada com lesões pré-malignas (FOURNIER e GORDON, 2000; SUN et al., 2005).

No estudo conduzido por Athar et al., (2004), o tratamento de animais através da administração oral e tópica de sulindaco demonstraram que a inibição da ciclooxigenase é efetiva na redução de eventos induzidos por UVB (fato importante na carcinogênese). O

estudo abre perspectivas futuras da utilização do fármaco como agente quimiopreventivo, para reduzir o risco de fotocarcinogênese em humanos. O sulindaco inibe a aldose redutase, prevenindo o acúmulo de sorbitol na catarata e em neurônios incubados com alta concentração de glicose. Como outros antiinflamatórios não esteroidais, mostra-se efetivo contra lesões definidas e retinopatia diabética em ratos e cães, e previne o aumento da espessura da membrana capilar retinal em cães diabéticos (GARDINER et al., 2003). Outros usos clínicos incluem tratamento da doença de Alzheimer (WEGGEN et al., 2003; BEHER et al., 2004; GASPARINI; ONGINI; WENK, 2004) e câncer de próstata (STERNBERG, 2003).

Em doze pacientes que apresentaram polipose adenomatosa familiar e anastomoses ileorectal e que receberam uma dosagem média de 158 mg diários de sulindaco, houve uma redução acentuada de pólipos após uma média de $63,4 \pm 31,3$ meses (ASANO e McLEOD, 2004). A habilidade de inibição da COX-1 e da COX-2 parece ser responsável ao menos em parte pelos efeitos antitumorais observados relativos ao sulindaco. No entanto, somente a inibição das ciclooxigenases não explica completamente os efeitos biológicos do sulindaco contra a proliferação celular *in vitro* e *in vivo*; como exemplo pode ser citado o metabólito sulfonado do sulindaco, que inibe a proliferação de células tumorais *in vitro* e *in vivo*, embora não apresente atividade inibitória da ciclooxigenase (BROOKS e DAY, 1991; RICE et al., 2004).

O estudo do sulindaco sulfona tem sido o foco de pesquisadores do metabolismo celular. As investigações começaram com a observação de que o sulindaco sulfonado diminuía o número de pólipos de colo em pessoas afetadas com polipose adenomatosa familiar (MYERS et al., 2001). Em estudos recentes desenvolvidos por diversos

pesquisadores, surge uma hipótese que indica um possível mecanismo de indução da morte celular programada pelo sulindaco sulfona, que consiste em inibir fosfodiesterases 2 e 5 GMPc, moléculas bastante expressadas em diversos tipos de câncer. A inibição resulta em elevação substancial de GMPc, que induz à ativação de proteína quinase G dependente de GMPc (PKG). A ativação desta proteína promove a degradação proteossômica de β -catenina e ativação de quinase c-Jun NH₂ terminal (JNK), levando a apoptose (RICE et al; 2004; WITTA et al., 2004).

Evidências sugerem que os efeitos antiproliferativos e antineoplásicos do sulindaco sulfeto não dependem somente do metabolismo eicosanóico. Experimentos demonstraram que ele pode inibir: a) a ativação da via do fator nuclear *kB* (NF-*kB*), reduzindo a proliferação celular, b) a transativação dependente de Ras/Raf, afetando diretamente a transdução de sinal Ras-mediada, e c) identificam o δ -receptor ativador da proliferação no peroxisomo como alvo para este fármaco. No entanto, o mecanismo de indução da apoptose ainda é controverso e alvo de pesquisas. Efeitos na transformação e proliferação celular em diferentes concentrações de sulindaco sulfeto podem ser importantes para melhor compreender seu mecanismo de ação quimiopreventivo (BERMAN et al., 2002; GALA; SUN; YANG, 2002).

O sulindaco pode mediar seus efeitos quimiopreventivos por múltiplos mecanismos e representa uma ferramenta farmacológica para identificar potenciais alvos bioquímicos contra a sobrevivência de células cancerígenas. Utilizando terapia combinada com agentes que modulam especificamente alvos bioquímicos relevantes do sulindaco, podemos obter vantagens deste sinergismo para inibir o crescimento de células

cancerígenas e assim poder reduzir a toxicidade associada com o uso crônico do pró-fármaco (RICE et al., 2004).

2.4 Reações adversas

Os mecanismos responsáveis pela hepatotoxicidade são pouco conhecidos, e muito do que se sabe foi inferido a partir de observações clínicas. Não há nenhuma correlação clara entre a classe química do antiinflamatório e o risco de hepatotoxicidade. Por exemplo, o benoxapreno apresenta uma alta incidência de efeitos adversos e o ibuprofeno, que é quimicamente similar tem uma baixa incidência. O sulindaco, por sua vez, é duas vezes mais tóxico do que a indometacina, apesar de pertencerem à mesma classe (MASUBUCHI et al., 1998).

O interesse no desenvolvimento do sulindaco sulfona como agente quimiopreventivo fez com que pesquisas fossem realizadas para avaliar aspectos farmacocinéticos e toxicidade deste composto. Em estudo de triagem de fase I, o sulindaco sulfona foi administrado duas vezes diárias por seis meses em pacientes com polipose adenomatosa familiar e que sofreram colectomia parcial. A toxicidade dose-limitante foi obtida em 800 mg/dia, com elevação das transaminases hepáticas. Os efeitos locais foram comuns para todas as doses e incluíram elevação das transaminases, náusea, vômito, dispepsia abdominal, dor, diarreia e cefaléia. A dose máxima tolerada foi obtida em 300 mg duas vezes ao dia. Estudos de triagem de fase I também foram conduzidos em quinze pacientes que possuíam câncer de pulmão, onde o sulindaco sulfona administrado na dose de 250 mg duas vezes/dia (500 mg/dia),

causou desconforto gastrointestinal e elevação dos testes de função hepática dose limitante (WITTA et al., 2004).

O potencial tóxico do sulindaco inclui reações de hipersensibilidade facial, febre, erupções cutâneas, eosinofilia e ocasionalmente reações graves como o desenvolvimento da síndrome de Stevens-Johnson. O pró-fármaco induz pancreatite aguda devido à acentuada colestase causada por obstrução biliar extra-hepática, atribuída a inibição do transporte de sais biliares. Mortes ocorridas foram associadas com falência hepática fulminante e hipersensibilidade generalizada (CHITTURI e GEORGE, 2002).

As reações tóxicas estão entre as maiores causas de morbidade e representa uma significativa causa de mortalidade entre os pacientes, e muitas vezes a toxicidade provocada pode mimetizar uma doença natural. As reações mais comuns geralmente são anafiláticas, e aquelas que envolvem órgãos específicos, como o fígado, a pele e o sistema hematopoiético (PARK et al., 2000).

2.5 Pesquisa toxicológica por diferentes modelos experimentais

2.5.1 Mitocôndrias isoladas de fígado de rato

Modelos animais *in vitro* foram usados para investigar os mecanismos possíveis de hepatotoxicidade relacionada aos antiinflamatórios não esteroidais. Estudos usando mitocôndrias isoladas de células hepáticas de ratos mostraram que a difenilamina, que é comum na estrutura dos AINEs, desacopla a fosforilação oxidativa, diminui o conteúdo de ATP hepático e danifica hepatócitos. A incubação de mitocôndrias com

difenilamina, ácido mefenâmico e diclofenaco causa intumescimento mitocondrial. Além do mais, a alteração no espectro da safranina indica a dissipação do potencial de membrana (uma das características do desacoplamento da fosforilação oxidativa). A adição de oligomicina, que bloqueia a ATP sintase, protege contra danos celulares (MINGATTO et al., 1996; MINGATTO et al., 2000; O'CONNOR; DARGAN; JONES, 2003).

Medicamentos que interagem com a mitocôndria podem ser divididos em dois grupos: 1) aqueles que afetam a função mitocondrial e 2) aqueles que possuem como alvos primários outras funções celulares e interagem com a mitocôndria secundariamente. Em todos os casos, a identificação dos alvos primários e secundários de um composto pode facilitar o entendimento de seus mecanismos de ação e abrem novas perspectivas para suas aplicações. Por exemplo, estudos recentes na ação cardioprotetora da abertura dos canais de potássio revelaram que as mitocôndrias cardíacas são mais importantes como alvos primários destes compostos do que a membrana plasmática. O reconhecimento da interação de compostos com a mitocôndria como alvo secundário pode auxiliar na compreensão dos mecanismos responsáveis pelos efeitos adversos e ao desenvolvimento de novos fármacos que eliminam ou minimizam estas reações (SZEWCZYK e WOJTCZAK, 2002).

O interesse em entender como o metabolismo energético mitocondrial é controlado é alvo de intensas pesquisas. A análise do controle metabólico foi desenvolvida como uma teoria efetiva e um conjunto de princípios e regras experimentais para investigar o controle e a regulação do sistema metabólico. A mitocôndria está envolvida na fosforilação oxidativa, termogênese, morte celular,

formação de radicais e modulação da homeostase de cálcio. Danos à organela induzem a uma série de patologias (MURPHY, 2001).

Para gerar continuamente ATP, a mitocôndria remove elétrons oriundos de substratos reduzidos e os transfere para o oxigênio através de complexos respiratórios especializados. De acordo com as descobertas de Peter Mitchell's, a energia gerada neste processo é utilizada para mover prótons vindos da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana em um processo conhecido como bomba de prótons. A membrana mitocondrial interna é altamente impermeável a estas cargas, e o bombeamento destas espécies químicas geradas na cadeia respiratória produz uma diferença de potencial eletroquímico, que é utilizado pela ATP sintase para gerar ATP às custas de ADP e fosfato inorgânico (KOWALTOWSKI, 2000; KADENBACH, 2003).

Um mecanismo de “controle respiratório” originalmente foi definido como a estimulação da respiração em mitocôndrias isoladas (consumo de oxigênio) pelo ADP (ativo, estado 3 da respiração), seguida da diminuição após a conversão do ADP em ATP (basal, estado 4 da respiração). Este fenômeno foi explicado pela teoria quimiosmótica: a captação de ADP pelas mitocôndrias estimula a ATP sintase, com diminuição do potencial de membrana. Como consequência, ocorre um estímulo da respiração mitocondrial, pela indução da atividade das três bombas de prótons da cadeia transportadora de elétrons. Estas bombas são inibidas com altos valores de potencial de membrana (150-200 mV). A teoria foi reforçada pelo efeito dos “desacopladores”, que aumentam a condutância de prótons de membranas biológicas, dissipam o potencial de membrana e resultam em um aumento da respiração não acoplada a fosforilação. A razão de controle respiratório (RCR), originada pela relação entre a respiração do estado 3 e do estado 4, fornece um parâmetro de função

mitocondrial que indica o grau de acoplamento da mitocôndria, e a razão ADP/O relaciona a quantidade de ADP fosforilada com o consumo de oxigênio mitocondrial, mostrando a sua eficiência para sintetizar ATP (CHANCE e WILLIAMS, 1956).

As mitocôndrias têm a capacidade de captar grandes quantidades de Ca^{2+} muito rapidamente, podendo assim proteger a célula de grandes variações de Ca^{2+} citoplasmático, mantidos por períodos limitados de isquemia e outras condições patológicas. Entretanto, quando o Ca^{2+} é acumulado na matriz por um período prolongado de tempo, a integridade mitocondrial pode ser comprometida (LITSKY e PFEIFFER, 1997; GUNTER et al., 2004).

Através de mecanismo de influxo, o Ca^{2+} é captado muito rapidamente por um transportador (uniporter) não específico, que também é capaz de captar outros íons bivalentes com a seguinte seletividade: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Pb}^{2+} >$ lantanídeos. Para o influxo de Ca^{2+} , o transportador utiliza principalmente a energia do componente elétrico do potencial de membrana gerado pelo gradiente eletroquímico de prótons. Vários estudos têm demonstrado que as mitocôndrias não conseguem captar Ca^{2+} na ausência de potencial de membrana (KÀPUS et al., 1991; GUNTER et al; 1994; BABCOCK et al., 1997). O transportador de Ca^{2+} , entre outros fatores, pode ser ativado pela presença de altas concentrações do íon (GUNTER et al., 1994), por nucleotídeos de adenina (LITSKY & PFEIFFER, 1997) e por espermina (GUNTER & PFEIFFER, 1990). O influxo de Ca^{2+} pode ser inibido por inibidores competitivos, que são os íons capazes de serem transportados pelo mesmo transportador; por H^+ ; por alguns íons bivalentes, como o Mg^{2+} ; por policátions, tais como o vermelho de rutênio e hexamina de cobalto; e por agentes farmacológicos, tais como β -bloqueadores, guanidinas e

diuréticos (GUNTER *et al.*, 1994). Dentre estes, o inibidor mais clássico é o vermelho de rutênio.

O mecanismo de efluxo Na^+ -independente ocorre predominantemente em tecidos não excitáveis, tais como o fígado e rim. Ele promove o influxo de prótons e o efluxo de Ca^{2+} contra o gradiente, e apresenta uma estequiometria de 1:2 ($\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$), sendo eletrogênico. A análise do efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado indica que mais energia do que a produzida pela troca $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ (mecanismo ativo) é necessária, sendo a cadeia respiratória a mais provável fonte adicional (BRAND, 1985; GUNTER *et al.*, 1994; GUNTER *et al.*, 2004). O efluxo de Ca^{2+} dá-se também através de processos de alta capacidade, os quais, quando ativados, liberam instantaneamente o Ca^{2+} acumulado e dissipam completamente o potencial de membrana. Uma dessas vias está associada ao transportador de Ca^{2+} , o ‘uniporter’ operando no sentido reverso. Também tem sido descrito um mecanismo de efluxo induzido por pró-oxidantes, semelhante ao da troca $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, porém sensível à inibição por ciclosporina A. Uma outra importante via de liberação do Ca^{2+} mitocondrial é a transição de permeabilidade de membrana mitocondrial, devido à sua alta capacidade de efluxo (RICHTER; THEUS; SCHLEGER, 1990; GUNTER *et al.*, 1994).

A transição de permeabilidade de membrana (TPM), caracterizada em meados de 1970, é um fenômeno patológico iniciado pela abertura de um poro de transição de permeabilidade de alta condutância na membrana mitocondrial interna. Em condições fisiológicas, a membrana mitocondrial é impermeável a todos os solutos exceto àqueles que possuem transportadores específicos. Quando o poro de membrana é aberto, todos os solutos com peso molecular abaixo de 1500 Da difundem-se de maneira não seletiva para dentro da mitocôndria. Como consequência da despolarização induzida

pela TPM, ocorre desacoplamento, acentuado intumescimento mitocondrial, que posteriormente causa redução do conteúdo de ATP e morte celular. Como o poro é caracterizado por um canal de alta condutância, a abertura de um ou poucos poros pode ser suficiente para induzir a despolarização da membrana e o intumescimento (WALTER et al., 2002; KIM et al., 2003).

A constituição molecular do poro de transição de permeabilidade ainda é alvo de pesquisas. Acredita-se que ele é formado por um complexo de proteínas, incluindo o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), localizado na membrana mitocondrial interna, um canal aniônico voltagem-dependente (CAVD), localizado na membrana mitocondrial externa, ciclofilina D na matriz mitocondrial e outras proteínas. O translocador de nucleotídeos de adenina é essencial para as trocas de ADP por ATP durante a fosforilação oxidativa. O canal aniônico voltagem-dependente permite que a membrana mitocondrial externa seja permeável a metabólitos, que se movem para dentro e para fora da organela durante o metabolismo. A ciclofilina D é uma enzima que confere sensibilidade à ciclosporina A. Essas proteínas atuam em conjunto para a formação do poro de transição de permeabilidade, que apresenta sítios de ligação para ativadores e inibidores que regulam o estado aberto e fechado deste processo, respectivamente (BRATTON e COHEN, 2001; McSTAY; CLARK; HALESTRAP, 2002; KIM et al., 2003).

A transição de permeabilidade da membrana, portanto, é um fenômeno sensível e classicamente prevenido por ciclosporina A. A prevenção também pode ser vista por outros agentes, como Mg^{++} , pH ácido, inibidores de fosfolipases (ex: dibucaína, quinacrina e trifluoperazina). Este processo pode ser induzido por Ca^{2+} , diferença do potencial de membrana, radicais livres de oxigênio, reagentes oxidantes de grupos

sulfidrilas de proteínas da membrana mitocondrial, fosfato inorgânico e desacopladores da fosforilação oxidativa (CASTILHO et al., 1995; ZORATTI e SZABÓ, 1995; BERNARDI, 1996, KOWALTOWSKI et al., 1995; KIM, et al., 2003). É cada vez mais evidente que a TPM é um evento importante durante uma variedade de formas tóxicas, hipóxicas e oxidativas de dano celular, bem como da apoptose (KROEMER, 2003).

As mitocôndrias utilizam constantemente oxigênio e como consequência produzem espécies reativas de oxigênio como subprodutos. Dos elétrons que são transportados através da cadeia respiratória, cerca de 1-2% são transferidos diretamente ao oxigênio molecular (O_2), em etapas intermediárias, formando o radical superóxido (O_2^-). A produção desses radicais pode ocorrer em nível de NADH desidrogenase ou, principalmente, em nível de Coenzima Q (KOWALTOWSKY et al., 1995; DRÖGE, 2002). Esses radicais são altamente reativos e podem causar a oxidação dos principais constituintes celulares (proteínas, lipídios, açúcares e ácidos nucléicos). De fato, o início da peroxidação ocorre pelo ataque de qualquer espécie capaz de subtrair um hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados laterais das membranas. Dessa forma, um radical peroxila é formado. Esse radical pode atuar em um ácido graxo adjacente e assim propagar a reação (peroxidação lipídica). Uma série de reações é estabelecida e peróxidos se acumulam na membrana. Os lipídios peroxidados desestabilizam a membrana e fazem com que ocorra um vazamento de íons. Os radicais peroxila podem agir não somente sobre os lipídios, mas também em proteínas de membranas, danificando enzimas, receptores e sistemas de transdução de sinais, além de oxidar o colesterol (HALLIWELL, 1994; KOWALTOWSKY e VERCESI, 1999).

As mitocôndrias possuem um eficiente sistema de defesa antioxidante contra a produção fisiológica e contínua desses radicais, o qual é composto pelas enzimas

superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione redutase. A superóxido dismutase transforma o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um composto menos reativo. A glutathione peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em água, oxidando a glutathione. A glutathione redutase regenera a glutathione reduzida às custas de equivalentes redutores do NAD(P)H, o qual mantém-se reduzido por ação da NAD(P) transidrogenase. Esse sistema antioxidante é utilizado, também, na transformação de outros hidroperóxidos em álcoois menos reativos (KEHRER e LUND, 1994; KOWALTOWSKY e VERCESI, 1999; VAYA, 2001). Embora o H_2O_2 seja menos reativo que o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, algumas condições que resultam em inibição da cadeia respiratória ou esgotamento do sistema antioxidante, podem provocar estresse oxidativo. Nesta situação, o peróxido de hidrogênio pode reagir com o Fe^{2+} , formando o radical hidroxil ($\text{OH}^{\bullet}$), altamente reativo, via reação de Fenton (KOWALTOWSKY e VERCESI, 1999; KASPRZAK, 2002).

A oxidação de substratos ricos em energia na mitocôndria gera equivalentes redutores, que são transferidos *via* nucleotídeos de piridina. O sistema NAD opera como um acceptor de elétrons e prótons nas reações de oxidação de substratos orgânicos, e o sistema NADP funciona como um doador de equivalentes redutores em processos de biossíntese. A proporção entre [metabólito oxidado]/[metabólito reduzido] reflete o estado redox dos nucleotídeos de piridina na relação NAD^+/NADH e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Além do mais, os nucleotídeos de piridina são uma fonte de equivalentes redutores necessários para remover radicais livres de oxigênio endógenos e exógenos (MINGATTO et al., 2000; VELIKY et al., 2001). O NADPH também é

importante no processo de regeneração da glutathione oxidada, através da glutathione reductase (DRÖGE, 2002).

Os grupos tióis são essenciais para a manutenção das atividades enzimáticas e de outros processos que dependem da integridade das macromoléculas, porque participam de processos metabólicos complexos. Componentes de baixo peso molecular, como a glutathione, bem como numerosas enzimas são ativas somente no estado reduzido. Alterações no balanço dissulfeto, como oxidação destes grupamentos, podem afetar a integridade das membranas, a homeostasia do cálcio, alterações enzimáticas e protéicas, bem como de outras macromoléculas essenciais, incluindo danos ao DNA, e assim ocasionando danos celulares irreversíveis e letais. A formação de espécies reativas de oxigênio, através da oxidação de grupamentos sulfidríla pode induzir a transição de permeabilidade mitocondrial (ZIEGLER, 1985; KOWALTOWSKI; VERCESI; CASTILHO, 1997; HAUGAARD, 2000).

O papel da mitocôndria e do estado celular energético na morte celular ganhou novos enfoques com o seu envolvimento no processo de apoptose. Diversas proteínas liberadas por essas organelas foram identificadas, juntamente com suas funções nas vias de indução ou inibição desse tipo de morte celular. O inchamento mitocondrial resultante da TPM pode causar rompimento da membrana mitocondrial externa e formação de um mega canal, que em muitos modelos de apoptose ocorre simultaneamente com o colapso do potencial de membrana mitocondrial e liberação de diversas proteínas, entre elas o citocromo *c*, o fator indutor de apoptose (AIF) e o segundo ativador mitocondrial de caspases (SMAC, também conhecido como DIABLO). (SUSIN; ZAMZAMI; KROEMER, 1998; BRATTON e COHEN, 2001; ZAMZAMI e

KROEMER, 2003). O citocromo *c* liberado pelas mitocôndrias durante a TPM liga-se a Apaf-1, uma proteína citosólica que possui um domínio de ligação para caspases, aumentando sua afinidade por ATP ou dATP . A ligação do nucleotídeo ao complexo citocromo *c*/Apaf-1 inicia sua oligomerização e forma o complexo multimérico denominado apoptossoma, capaz de atrair várias moléculas de pró-caspase-9, e promovendo a sua clivagem a caspase 9, a qual cliva e ativa a pró-caspase 3. A caspase 3 ativa induz então a proteólise de enzimas responsáveis pelo rearranjo do citosol, núcleo e membrana plasmática, causando alterações como condensação da cromatina, fragmentação do DNA nucleossomal, rompimento da membrana nuclear, exteriorização de fosfatidilserina e formação de corpos apoptóticos, achados característicos da apoptose. Inibidores do poro de transição de membrana, como por exemplo a ciclosporina A, são capazes de inibir a morte celular em alguns modelos de apoptose. Além disso, proteínas da família Bcl-2 parecem regular este evento através da modulação da transição de permeabilidade, como ocorre com Bcl-2 e Bcl-x_L, que favorecem o seu fechamento, e de Bax e Bak, que promovem sua abertura. Dessa forma, a mitocôndria parece estar envolvida nos processos de morte celular, inclusive aqueles de natureza tóxica, visto que as mitocôndrias são um alvo importante para os efeitos tóxicos de xenobióticos (ROY e NICHOLSON, 2000; KAPLOWITZ, 2000; BROATRIGT e SALVESEN, 2003; ZAMZAMI e KROEMER, 2003).

2.5.2 Linhagem celular de hepatoma humano HepG2

Os ensaios citotóxicos são rotineiramente utilizados por toxicologistas para avaliação de mecanismos tóxicos, e possuem importância devido à seleção de

estruturas químicas para *screening* farmacológico utilizando células intactas. No entanto, muitos ensaios farmacológicos são realizados usando linhagens de células tumorais, que possuem pouca capacidade de metabolização. As informações obtidas com estas células refletem principalmente a “toxicidade intrínseca” dos compostos (reflete o composto testado intacto), mas pouca informação é obtida pela detoxificação metabólica ou por uma possível formação de metabólitos ativos através deste processo (LI, 2001).

Para reduzir custos e analisar uma variedade de compostos sintéticos na indústria farmacêutica, os testes *in vitro* podem ser introduzidos, diminuindo as pesquisas que utilizam animais. Maior desenvolvimento desta área pode levar à previsão no início dos efeitos tóxicos de compostos em ensaios celulares. Testes são necessários para identificar aspectos da toxicidade celular, interferências com a fisiologia celular normal, metabolismo energético e proliferação celular podem ser marcadores toxicológicos simples (SCHOONEN et al., 2005).

A biotransformação é uma parte essencial para a proteção contra efeitos tóxicos de compostos hidrofóbicos (por exemplo, xenobióticos) que podem estar presentes no organismo. Estas substâncias em condições fisiológicas apresentam baixa solubilidade, sendo necessária a conversão destas moléculas para uma forma mais hidrofílica, que pode ser excretada pelo organismo. Dois importantes mecanismos de detoxificação atuam no fígado, conhecidos como reações metabólicas de Fase I e de Fase II. As reações de Fase I convertem moléculas hidrofóbicas a metabólitos mais polares por reações de oxidação, redução ou hidrólise. Estas reações expõem ou introduzem um grupo funcional (-OH, NH₂, -SH ou CO₂H), que resulta em um pequeno aumento da polaridade do composto. No entanto, a bioativação pode gerar metabólitos que algumas vezes podem

ser mais tóxicos que o composto que lhe deu origem. Os metabólitos originados da Fase I são detoxificados por reações de Fase II, através da conjugação com macromoléculas como glucoronato, sulfato, acetato ou aminoácidos. As reações de Fase II podem preceder as reações de Fase I, embora seja um mecanismo menos comum. O conjunto destas reações são responsáveis pela formação de produtos excretáveis pelo organismo (YAN e CALDWELL, 2001).

Na linhagem celular HepG2 estão presentes enzimas de fase I, como diferentes isoenzimas do citocromo *P450* (responsáveis pela ativação de diversos pró-mutagênicos), nitro-redutase, *N*-desmetilase, catalase, peroxidase, monoflavina oxigenase, NAD(P)H citocromo *c* redutase, citocromo *P450* redutase, NAD(P)H quinona oxidoreductase. As oxidoreductases estão envolvidas nos processos de transferência de elétrons para o citocromo *P450* ou na ativação de espécies reativas de oxigênio. As enzimas conhecidas de Fase II, como epóxido hidrolase, sulfotransferases e *N*-acetiltransferases também estão presentes, e sua atividade é pouco afetada com relação aos diferentes substratos, apresentando correlação com hepatócitos humanos isolados *a fresco*. A presença de enzimas de conjugação possui importância, primeiro porque os compostos que sofreram ativação metabólica podem ser conjugados, e em segundo porque diminuem a probabilidade de compostos mutagênicos causarem danos ao DNA, devido às conseqüentes reações de conjugação (KNASMÜLLER et al., 1998).

Como exposto, a cultura de células empregada em pesquisas da linhagem de hepatoma celular HepG2, conserva várias enzimas de fase I e fase II, que possuem um papel crucial na ativação/detoxificação de procarcinógenos genotóxicos e reflete o metabolismo de compostos *in vivo* melhor que modelos experimentais com células metabolicamente incompetentes. Foi demonstrado que várias classes de carcinógenos

ambientais, como nitrosaminas, aflatoxinas, aminas aromáticas e heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos podem ser detectados em ensaios com células HepG2. Além do mais, foi demonstrado que estes ensaios podem distinguir entre estruturas carcinógenas e não-carcinógenas, e resultados positivos foram obtidos com hexametilfosforamida, que fornece resultado falso-negativo em ensaios *in vitro* convencionais com homogenatos de fígado de rato. As células HepG2 também podem ser usadas em estudos antimutagênicos e podem identificar mecanismos não detectáveis em sistemas *in vitro*, como a indução de enzimas detoxificantes, inativação de metabólitos formados e inibição intracelular de enzimas ativas (KNASMÜLLER et al., 1998).

Recentemente, o sulindaco foi analisado neste modelo celular. O pró-fármaco induz a apoptose de maneira dose-dependente, revelando efeitos semelhantes para sulindaco sulfona e sulfeto. A apoptose foi acompanhada pelo aumento da atividade da caspase 3 e diminuição da proliferação celular, resultados sugestivos de um possível mecanismo indutor da apoptose mediado pela ativação deste fator apoptótico (WANG; HERTEVIG; DUAN, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial tóxico do sulindaco e de seus metabólitos sulfeto e sufona, nos parâmetros funcionais de mitocôndrias isoladas de fígado de rato e em células de hepatoma celular HepG2 para explorar os aspectos mecanísticos de indução de toxicidade.

3.2 Específicos

(a) Relacionar possíveis elos bioquímicos para elucidar os mecanismos de ação do sulindaco e de seus metabólitos em parâmetros de formação de radicais livres de oxigênio nos dois modelos experimentais propostos.

(b) Entender o mecanismo de ação destes fármacos em relação aos efeitos provocados em parâmetros bioenergéticos mitocondriais e celulares para avaliação da capacidade de indução de toxicidade.

4 METODOLOGIA

O sulindaco, sulindaco sulfeto e sulindaco sulfona foram adquiridos de Biomol Research Laboratories Inc. (Plymouth, PA, USA). Todos os demais reagentes apresentam o mais alto grau de pureza dentre os disponíveis comercialmente. O pró-fármaco e seus metabólitos foram solubilizados em DMSO, e armazenados de acordo com instruções do fabricante. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água destilada e deionizada.

No estudo também foram utilizados ratos machos Wistar, de peso aproximado entre 180-200 g, acondicionados a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ em ciclos de claro e escuro de 12:12h, com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos de manipulação dos animais estão de acordo com as normas éticas da Associação Internacional para estudos da Dor (ZIMMERMANN, 1983).

4.1 Ensaios com mitocôndrias isoladas de fígado de rato

4.1.1 Isolamento da fração mitocondrial

As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial (PEDERSEN et al., 1978). Ratos Wistar machos de aproximadamente 200g foram sacrificados por deslocamento cervical, o fígado foi alcançado por incisão na cavidade abdominal, imediatamente removido e cortado em pequenos fragmentos em 50 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7.2. Os fragmentos

foram lavados no mesmo meio e homogeneizados três vezes em Potter-Elvehjen por 15 segundos, com intervalos de 1 minuto. O homogeneizado foi centrifugado a 580 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 10.300 g por 10 minutos na mesma temperatura. O sedimento resultante foi ressuspensão em 10 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 0,3 mmol/L, e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7.2, e centrifugado a 3.400 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento mitocondrial final foi ressuspensão em 1 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L, e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7.2. Todo o processo de isolamento e os ensaios com as mitocôndrias foram efetuados dentro de um período máximo de 4 horas após o isolamento.

4.1.2 Determinação de Proteína mitocondrial

A proteína mitocondrial foi determinada espectrofotometricamente a $\lambda=540$ nm pelo método do biureto, de acordo com Cain e Skilletter (1987). A concentração de proteína foi determinada a partir de uma curva de calibração com albumina de soro bovino.

4.1.3 Respiração mitocondrial

A respiração mitocondrial foi monitorada polarograficamente, em um oxígrafo equipado com um eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Gilson Medical Electronics, USA), e os parâmetros respiratórios foram determinados de acordo com Chance e Willians (1956). Para fins experimentais, a quantidade de proteína mitocondrial utilizada nas análises foi de 1 mg/mL, o substrato utilizado foi succinato (5 mmol/L) com inibição do sítio I feito pela

adição de rotenona 5 $\mu\text{mol/L}$. As mitocôndrias foram incubadas em meio de respiração (volume final de 1,5 mL), contendo K_2HPO_4 10 mmol/L, EGTA 0,5 mmol/L, sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2. A respiração de estado 3 foi iniciada com 0,4 $\mu\text{mol/L}$ de ADP, e o efeito desacoplador foi observado com a adição do sulindaco e seus metabólitos no estado 4.

4.1.4 Intumescimento osmótico mitocondrial (*Swelling*)

O intumescimento mitocondrial foi avaliado pela diminuição da absorbância das mitocôndrias (0,4 mg/mL de proteína) a $\lambda=540$ nm em espectrofotômetro DU-70, (FULLERTON, CA, USA), em 1,5 mL de um meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, succinato 5 mmol/L, rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, a 30°C. As reações foram iniciadas com CaCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$ e em seguida pela adição do sulindaco e seus metabólitos após um minuto e meio (SANTOS et al., 1998).

4.1.5 Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais

O estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais foi monitorado fluorimetricamente em aparelho marca HITACHI, modelo F-4500, usando-se como comprimentos de onda de excitação 366 nm (fenda de 5,0 nm) e emissão 450 nm (fenda de 5,0 nm). Uma quantidade de 1 mg/mL de mitocôndrias em suspensão foram incubadas (volume final de 2 mL) em meio composto de sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, acrescido de rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e succinato

5 mmol/L, a 30°C. O sulindaco e seus metabólitos foram adicionados após a energização mitocondrial (PIGOSO et al., 1998).

4.1.6 Estimativa do transporte de cálcio mitocondrial

O efluxo de cálcio foi estimado em 1mg/mL de proteína mitocondrial pelo monitoramento por dez minutos das variações na absorbância do Arsenazo III, utilizando os comprimentos de onda de 675-685 nm (DU-600 BECKMAN). O meio de incubação (volume final de 2 mL) foi composto de sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, acrescido de rotenona 2,5 µmol/L e CaCl₂ 10 µmol/L, a 30°C. A captação de cálcio foi iniciada com a adição de succinato 5 mmol/L. A adição do sulindaco e seus metabólitos foi realizada após 3 minutos da indução (SCARPA, 1979).

4.1.7 Monitoramento da formação de espécies reativas de oxigênio

A produção de radicais livres de oxigênio pelas mitocôndrias (1 mg/mL) foi monitorada com o corante não fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) 2 µmol/L, que em presença de H₂O₂ é oxidado ao composto fluorescente DCF, detectado em λ =503 nm excitação (fenda 5,0 nm) e λ =529 nm emissão (fenda 10 nm). O meio de incubação (volume final de 2 mL) foi composto de sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, acrescido de rotenona 2,5 µmol/L, succinato 5 mmol/L e EGTA 50 mmol/L. O controle positivo foi induzido com

t-butilhidroperóxido 300 $\mu\text{mol/L}$. A adição do sulindaco e seus metabólitos foi realizada após 1,6 minutos (CATHCART; SCHWIERS; AMES, 1983).

4.1.8 Determinação da lipoperoxidação da membrana mitocondrial

A lipoperoxidação da membrana mitocondrial foi determinada pela formação de complexo entre o malondialdeído e o ácido tiobarbitúrico (complexo MDA-TBA). As mitocôndrias (1 mg/mL) foram pré-incubadas a 30°C em 1 mL de meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, acrescido de rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e succinato 5 mmol/L. O controle positivo foi induzido com *t*-butilhidroperóxido 250 $\mu\text{mol/L}$, e o sulindaco e seus metabólitos foram adicionados no lugar do indutor para observação da lipoperoxidação. Após 30 minutos, foi adicionado em cada tubo 0,04 mL de NaOH 10 M, 0,5 mL de H₃PO₄ 20% (v/v) e 1 mL de TBA 1% (v/v) em NaOH 0,05 M (preparado no momento do uso), com incubação por 20 minutos a 85°C. Após resfriamento, o complexo foi extraído com 2 mL de *n*-butanol e a absorbância foi medida em $\lambda=535$ nm em espectrofotômetro DU-70 (BECKMAN). A concentração do cromógeno foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do complexo MDA-TBA de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (KOWALTOWSKY e VERCESI, 1999).

4.1.9 Determinação do conteúdo de glutatona reduzida

O conteúdo de glutatona reduzida foi medido por fluorescência através do agente químico *o*-ftaldialdeído (OPT) em fluorímetro marca HITACHI, modelo F-4500

em $\lambda=350$ nm excitação (fenda de 5,0 nm) e $\lambda=420$ nm de emissão (fenda de 5,0 nm). As mitocôndrias (1 mg/mL) foram pré-incubadas a 30°C em 1 mL de meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L e succinato 5 mmol/L. O controle positivo foi induzido com *t*-butilhidroperóxido 250 μ mol/L. O sulindaco e seus metabólitos foram adicionados para observação do efeito oxidante de grupamentos GSH. Respeitando um período de incubação de 30 minutos. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 3400 *g* por 3 minutos. Alíquotas de 100 μ L do sobrenadante foram adicionadas a 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,0 e 100 μ L de OPT (concentração final de 1 mg/mL). A concentração da glutathiona reduzida foi estimada a partir de uma curva de calibração obtida nas mesmas condições experimentais (TIETZE, 1969).

4.10 Oxidação dos grupos tiólicos de proteínas

A determinação dos grupamentos tiólicos foi realizada através da adição do reagente ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB). As mitocôndrias (1 mg/mL) foram pré-incubadas a 30°C em 1 mL de meio contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L e succinato 5 mmol/L. O controle positivo foi induzido com *t*-butilhidroperóxido 250 μ mol/L. O sulindaco e seus metabólitos foram adicionados para observação do efeito oxidante nos grupamentos sulfidríla. Após 30 minutos, foi adicionado ao meio reacional 130 μ L de ácido perclórico 70% (p/v), e as amostras foram centrifugadas a 3.400 *g* por 6 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado

1,5 mL de tampão tris-HCl 0,5 M pH 7,6, com solubilização do precipitado em homogeneizador. As amostras foram incubadas em banho-maria 37°C por 10 minutos, e após foi adicionado DTNB 2 mmol/L, com nova centrifugação em 3.400 *g* por 3 minutos. A leitura foi realizada em $\lambda=412$ nm em espectrofotômetro DU-70 (BECKMAN). A quantidade de grupamentos tiólicos foi calculada através do coeficiente de extinção molar de 13600 M⁻¹ (YAMAMOTO et al., 2002).

4.2 Ensaios em células de hepatoma humano HepG2

4.2.1 Cultura e tratamento das células

Células Hep G2 (American Type Culture Collection, N° HB 8065) foram mantidas em meio de Williams, suplementado com soro fetal a 10%, penicilina G 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL em placas de cultura de 24 poços (Nunc, Roskilde, Dinamarca), 1x10⁶ células por poço em 1,0 mL de meio de cultura a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de O₂ por 24 horas. O sulindaco, sulindaco sulfeto e sulindaco sulfona foram solubilizados em DMSO e adicionados ao meio de cultura em volumes nunca superiores a 5 µL, de modo a se obter a concentração desejada. As células controle foram cultivadas na presença somente de meio padrão. Ao término do período de incubação, as células foram lavadas com salina tamponada e submetidas ao diversos procedimentos analíticos.

4.2.2 Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi estimado medindo a captação da sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3-tetraetilbenzimidazolilcarbocinina). A cada condição definida da incubação com o sulindaco e seus metabólitos, alíquotas de 2×10^6 células foram incubadas com 10 $\mu\text{mol/L}$ de JC-1 por 20 minutos a 37°C. Após, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 10 segundos, e a suspensão celular resultante foi lavada com salina tamponada. A fluorescência foi determinada em $\lambda=485$ nm para excitação e $\lambda=590$ nm para emissão por citometria de fluxo, em procedimento descrito por TUSCHL e SCHWAB (2003).

4.2.3 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) segundo procedimento descrito por Roberto et al (2004). As células foram incubadas com o sulindaco e seus metabólitos em procedimento de incubação padrão, e adicionados de 10 μL MTT em cada poço, respeitando um período de incubação adicional de 4 horas. Após, o meio de cultura foi descartado, seguido da adição em alíquotas de 5×10^4 células de 200 μL de SDS 20% (p/v) em dimetilformamida 50% (v/v), pH 4,7, para lise celular. Após 12 horas de incubação a 37°C, a absorbância da solução foi determinada em $\lambda=570$ nm usando um leitor de microplacas (μQUANT , Biotek Instruments, Inc.). A solução de lise foi usada como branco de reagentes.

4.2.4 Determinação do conteúdo de ATP intracelular

Os teores intracelulares de ATP foram determinados segundo Ryll e Wagner, (2001). Alíquotas de 2×10^6 células após o período de incubação com os compostos em estudo foram tratadas com ácido perclórico na concentração final de 3,8% (v/v). O extrato celular ácido foi neutralizado com KOH 10 M e centrifugado para remover a proteína e o perclorato insolúvel formado. Alíquotas de 25 μ L do sobrenadante límpido foi injetado em um sistema CLAE Waters Model 510 equipado com coluna cromatográficas de fase reversa LichroCART (LiCrospher 200RP-18, 5 μ m) e um detector de UV-VIS operando em $\lambda=260$ nm. A fase móvel foi composta de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH= 6,0), com fluxo de 1,5 mL/minuto. O ATP foi quantificado pela injeção no sistema de quantidades conhecidas do nucleotídeo e expresso como porcentagem em relação ao controle celular.

4.2.5 Geração de espécies reativas de oxigênio pelas células

A geração de EROs (hidroperóxidos) foi realizada com a utilização da sonda fluorescente 2,7'-diclorofluoresceína (DCF). Antes da incubação com o fármaco e seus metabólitos, as células foram pré-carregados com diacetato de 2,7'-diclorofluoresceína (H_2DCFDA) por 30 minutos a 37° C no próprio meio de incubação, lavados 2 vezes e ressuspensas. As células foram então incubadas como descrito anteriormente. Alíquotas das células foram removidas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos e a fluorescência foi determinada nos comprimentos de onda de 490 nm para excitação e

520 nm para emissão, usando o espectrofluorímetro Hitachi 3000. A fluorescência emitida foi comparada com uma curva de calibração confeccionada com 2',7'-diclorofluoresceína e os resultados foram expressos em pmoles/ 10^6 células.

4.2.6 Determinação da lipoperoxidação celular

A ocorrência da lipoperoxidação foi avaliada medindo a quantidade de malondialdeído (MDA), liberadas pelas células para o meio de cultura. Transcorridos os tempos desejados de incubação das células com o fármaco e seus metabólitos em concentração de 1 mmol/L nas condições desejadas, alíquotas de foram retiradas e centrifugadas a 16000 g por 10 segundos e o sobrenadante foi coletado. Alíquotas de 0,125 mL foram adicionadas a um tubo contendo 0,25 mL de TCA concentrado, 25 μ L de butilado hidroxitolueno a 2% (v/v) em etanol, e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,67% (p/v). Em seguida foram agitados em *mixer*, e aquecidos por 20 minutos a 90°C. Após o resfriamento, os tubos foram centrifugados para remover qualquer precipitado e 0,2 mL das amostras foram transferidas para microplacas; a determinação da fluorescência foi efetuada em $\lambda=530$ e $\lambda=590$ nm para excitação e emissão respectivamente. Uma curva de calibração foi confeccionada com a utilização de 1,1',3,3'-tetraetoxipropano e os resultados foram expressos em nmoles/ 10^6 células.

4.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados através do Programa GraphPad Prism, versão 3.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, U. S. A.). A significância estatística dos dados experimentais foi analisada pela análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett para comparação entre vários grupos tratados em relação a um controle, e pelo cálculo da média dos valores $\pm$ desvio padrão da média em análises que compreendem traçados representativos. Os resultados com valor de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes para os tratamentos relacionados à variância.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos em parâmetros bioenergéticos

A figura 4 nos mostra o efeito do sulindaco e seus metabólitos no estímulo da respiração de estado 4, na presença de succinato como substrato oxidável, adicionado de rotenona para inibição do sítio I. O pró-fármaco não alterou o consumo de oxigênio nas concentrações testadas (25, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$), com valores para Razão de Controle respiratório (RCR) estimados em $5,42 \pm 0,18$, e consumo de oxigênio de $27,73 \pm 1,76$ nÁtomos $\text{O}_2/\text{min}^{-1}/\text{mg}$ proteína mitocondrial ($n = 6$) para a concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$. O mesmo efeito foi observado para o seu metabólito sulfona ($23, 52 \pm 3,56$ nÁtomos $\text{O}_2/\text{min}^{-1}/\text{mg}$ proteína, RCR de $5,38 \pm 0,23$, $n = 6$), que apresentou estado 4 da respiração semelhante ao obtido com o controle ($22,51 \pm 1,22$ nÁtomos $\text{O}_2/\text{min}^{-1}/\text{mg}$ proteína, RCR de $5,45 \pm 0,18$, $n = 6$). Concentrações acima de 500 $\mu\text{mol/L}$ foram testadas, indicando um fraco efeito estimulante e nenhum efeito inibidor do estado 3 nas concentrações de 0,1-1 mM (resultados não mostrados). O efeito desacoplador foi constatado somente para o metabólito reduzido sulfeto, que apresentou resposta estimulatória em concentrações dose-dependentes, e na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$ o consumo de oxigênio forneceu valor de $66,83 \pm 1,77$ nÁtomos $\text{O}_2/\text{min}^{-1}/\text{mg}$ proteína e RCR de $1,87 \pm 0,85$ em relação ao controle, resultado representativo do potente efeito deste metabólito sobre a fosforilação oxidativa.

Efeito semelhante foi encontrado na análise do potencial de membrana das mitocôndrias em células HepG2 (Gráfico 1), na concentração de 1 mM para o pró-

fármaco e seus metabólitos. Este parâmetro foi avaliado com base na captação da sonda JC-1, um composto totalmente permeável a membranas biológicas, que é captado intracelularmente pela mitocôndria, na dependência direta do potencial eletroforético gerado pela cadeia transportadora de elétrons. A escolha deste marcador foi uma alternativa a métodos tradicionais de análise que utilizam rodamina 123 ou safranina O, visto que o sulindaco apresenta interferências espectrais quando contraposto com estes dois componentes, dificultando a análise correta do parâmetro. O gráfico mostra que o sulindaco sulfeto dissipa o potencial eletroquímico de forma acentuada (média e DPM de $49 \pm 9,87$ de porcentagem de intensidade de fluorescência, $n = 6$), chegando a metade dos valores encontrados para o controle (média e DPM de $100,00 \% \pm 13,23$, $n = 6$). No entanto, o sulindaco e seu metabólito sulindaco sulfona não exercem efeitos sobre o potencial de membrana mitocondrial, visto que os valores encontrados estão correlacionados com o controle ($95,29 \% \pm 7,52$ e $93,29 \% \pm 8,60$, $n = 6$, respectivamente).

O gráfico 2 mostra que o sulindaco e seus metabólitos comportam-se como supostos agentes oxidantes de nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) mitocondriais, fornecendo respostas dependentes da concentração analisada. O sulindaco sulfeto tende a valores de saturação superiores a $50 \mu\text{mol/L}$. Os valores médios e desvios padrão encontrados para as reduções na intensidade de fluorescência na concentração de $100 \mu\text{mol/L}$ são, respectivamente: sulindaco ($42,69 \% \pm 4,52$, $n = 6$), sulfona ($40,80 \% \pm 1,34$, $n = 6$) e sulfeto ($27,66 \% \pm 2,16$, $n = 6$), todos comparados em relação ao controle ($83,97 \% \pm 4,53$, $n = 6$). A oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais observada, neste caso, pode ser considerada artefato da técnica

empregada para análise, visto que este antiinflamatório, bem como os metabólitos sulfeto e sulfona podem se comportar como *quenchers*, suprimindo a intensidade da fluorescência em comprimentos de onda próximos ao pico máximo de absorção ($\lambda = 340$ nm) correspondente às suas estruturas químicas.

Como pode ser observado na Figura 5, o sulindaco sulfeto induz o efluxo de cálcio em concentrações de 5-10 $\mu\text{mol/}$ (resultados não mostrados), e a liberação do cálcio pré-acumulado pela organela é quase total em concentrações superiores a 25 $\mu\text{mol/L}$, sugerindo um mecanismo de toxicidade gradativo e em seqüência de eventos que pode ser originado pela sua capacidade de desacoplamento da fosforilação oxidativa e de dissipação do gradiente químico de membrana (figura 4 e gráfico 1, respectivamente), com posterior liberação de cálcio. O sulindaco e seu metabólito oxidado não apresentaram efeitos equiparáveis, e por não agirem como agentes desacopladores, este resultado de certa forma é esperado.

Da mesma forma, ao analisar o conteúdo de ATP celular (Gráfico 3), o sulindaco sulfeto reduz o ATP intracelular de maneira dose-dependente, fato que ocorre associado ao pronunciado efeito desacoplador da fosforilação oxidativa observado, alcançando valor médio e DPM de $12,73 \% \pm 4,8$ em relação ao controle (média e DPM de $100,00 \% \pm 14,00$) na concentração de 1 mmol/L. Os valores encontrados para sulindaco (média e DPM de $95,61 \% \pm 14,75$) e para sulindaco sulfona (média e DPM de $94,17 \% \pm 7,6$) na mesma concentração indicam permanência do conteúdo de ATP intracelular, em estreita relação com os resultados obtidos em parâmetros bioenergéticos mitocondriais, visto que a ausência de efeito desacoplador da fosforilação oxidativa mantém a produção de ATP pela cadeia respiratória. De acordo

com Wu et al (1990), a produção de ATP pela via glicolítica pode ser utilizado pelas células para manter o gradiente eletroquímico, e a dissipação do potencial de membrana mitocondrial pode ocorrer somente quando o suprimento de ATP é diminuído. Além disso, pode-se observar a correlação entre o efeito desacoplador provocado pelo sulindaco sulfeto e a diminuição da viabilidade celular (gráfico 4). Estes resultados sugerem uma relação causa-efeito para sulindaco sulfeto, visto que ocorre aumento de morte celular concentração-dependente, com citotoxicidade pronunciada na concentração de 1 mmol/L, chegando a valores aproximados de 15% de células vivas após o término do período de incubação. O sulindaco e o metabólito sulfona não apresentaram efeitos aparentemente citotóxicos, com valores encontrados semelhantes ao controle (média e DPM para sulindaco de $93,47 \% \pm 7,49$, para sulindaco sulfona de $90,97 \% \pm 7,89$ e para o controle de $100 \% \pm 6,5$). Estes resultados estão em concordância com os obtidos em mitocôndrias, sugerindo que somente o sulindaco sulfeto induz a efeitos danosos relacionados com o estado bioenergético.

Figura 4. **Consumo de oxigênio mitocondrial.** O traçado representativo mostra os efeitos do sulindaco e de seus metabólitos sulfeto e sulfona na velocidade de respiração do estado 4 em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, na presença de meio reacional contendo K_2HPO_4 10 mmol/L, EGTA 0,5 mmol/L, sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2. A respiração foi iniciada com 0,4 μ mol/L de ADP, o substrato utilizado foi succinato 5 mmol/L e inibição do sítio I por adição de rotenona 2,5 μ mol/L. Foi fixada a quantidade de 1 mg/mL de mitocôndria em volume final de 1,5 mL para fins experimentais. O efeito desacoplador foi analisado com adições de diferentes concentrações pós energização mitocondrial, representados na figura somente os efeitos relacionados à concentração de 50 μ mol/L. O consumo médio de oxigênio está inserido entre parêntesis. As adições estão demonstradas por setas. $n = 6$. M = mitocôndria, C = controle, S = sulindaco, SFO = sulindaco sulfona, SFE = sulindaco sulfeto; A = adições.

Gráfico 1. **Potencial de membrana avaliado em células HepG2.** Os efeitos do sulindaco e seus metabólitos sobre o potencial de membrana foram avaliados com a sonda fluorescente JC-1, na concentração de 10 μ M, conforme descrito em materiais e métodos. As respostas sobre a variação do gradiente eletroquímico foram determinadas após 20 minutos de incubação das células com o sulindaco, sulindaco sulfona e sulindaco sulfeto na concentração de 1 mM. Os valores representam a média $\pm$ DPM das análises. As condições de análise estão descritas em maiores detalhes em materiais e métodos. (*) significativo para $P < 0,05$ em relação ao controle negativo, $n = 6$.

■ Controle ■ Sulindaco ■ Sulindaco sulfona ■ Sulindaco sulfeto

Gráfico 2. **Estado redox dos nucleotídeos de piridina mitocondriais.** O gráfico mostra os efeitos do sulindaco e de seus metabólitos sulfeto e sulfona frente ao conteúdo de NAD(P)H mitocondrial, em meio reacional composto de sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, acrescido de rotenona 2,5 µmol/L e succinato 5 mmol/L a 30°C, em volume final fixado em 2 mL. A quantidade de proteína mitocondrial foi estipulada de 1 mg/mL. O antiinflamatório e seus metabólitos foram adicionados em diferentes concentrações após energização. Os valores representam a média $\pm$ DPM de experimentos com diferentes preparações. (*) significativo para valores de $P < 0,05$, em relação ao controle; $n = 6$.

—■— Controle —▲— Sulindaco —●— Sulindaco sulfona —▼— Sulindaco sulfeto

Figura 5. **Transporte de cálcio mitocondrial.** Traçado representativo dos efeitos do sulindaco e seus metabólitos no efluxo de cálcio em meio composto de sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, e Hepes-KOH 10 mmol/L, adicionado de rotenona 2,5 μ mol/L e CaCl_2 10 μ mol/L, pH 7.2, a 30°C. A concentração de proteína mitocondrial utilizada foi de 1,0 mg/mL, em volume final de 2, mL. As reações foram iniciadas com succinato 5 mmol/L e em seguida pela adição do sulindaco e seus metabólitos. As adições estão representadas por setas. $n = 6$. Mit = mitocôndria; Suc = succinato; FCCP = clássico agente desacoplador (*p*-trifluorometoxifenilhidrazona).

Gráfico 3. Efeitos do sulindaco e seus metabólitos sobre o conteúdo de ATP em células Hep G2. As células foram expostas a diferentes concentrações de sulindaco e seus metabólitos em procedimento de incubação padrão e os níveis de ATP foram determinados por cromatografia líquida em fase reversa utilizando uma curva de calibração, conforme procedimento descrito com maiores detalhes em materiais e métodos. Foi utilizado como controle células sem tratamento, representado como “concentração zero” no gráfico. Os valores representam a média $\pm$ DPM das análises. (*) significativo para $P < 0,05$ em relação ao controle celular. $n = 6$.

■ Sulindaco ■ Sulindaco sulfona ■ Sulindaco sulfeto

Gráfico 4. Efeitos do sulindaco e seus metabólitos sobre a viabilidade celular em células Hep G2. As células foram expostas a diferentes concentrações de sulindaco e seus metabólitos em procedimento de incubação padrão e a porcentagem de células viáveis estimada pelo método MTT, conforme procedimento descrito com maiores detalhes em materiais e métodos. Foi utilizado como controle células sem tratamento, representado como “concentração zero” no gráfico. Os valores representam a média $\pm$ DPM das análises. (*) significativo para $P < 0,05$ em relação ao controle celular. $n = 6$.

■ Sulindaco ■ Sulindaco sulfona ■ Sulindaco sulfeto

5.2 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos em relação à transição de permeabilidade mitocondrial

A figura 6-A, 6-B e 6-C mostra os efeitos do sulindaco, sulindaco sulfona e sulindaco sulfeto em relação à indução do intumescimento mitocondrial utilizando succinato de potássio como substrato oxidável. O sulindaco sulfeto induz o inchamento mitocondrial e a extensão desse efeito foi estreitamente correlacionada com a concentração usada (Figura 6-C). Na concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$, a indução observada representou a metade da obtida em relação ao controle induzido, e nas concentrações de 25-100 $\mu\text{mol/L}$, os valores ultrapassam o mesmo, em seis experimentos com preparações diferentes. Este efeito também foi observado quando as análises foram conduzidas em meio contendo EGTA (resultados não mostrados), conferindo a este metabólito propriedades de indução de *swelling* mitocondrial na presença e na ausência de cálcio ao meio reacional. No entanto, tanto o sulindaco (Figura 6-A) quanto seu metabólito oxidado sulfonado (Figura 6-B) não apresentaram efeitos de indução de transição de permeabilidade mitocondrial.

Por provocar desacoplamento e efeito de indução de intumescimento mitocondrial, foi avaliado o comportamento do sulindaco sulfeto frente a moduladores clássicos da transição de permeabilidade mitocondrial na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$, como pode ser observado na tabela 1. Apesar do intumescimento induzido pelo metabólito reduzido ser independente da presença de cálcio, foi observada uma prevenção parcial deste evento promovida pela adição de ciclosporina A e Mg^{2+} (33 % $\pm$ 8 e 45 % $\pm$ 10, respectivamente), aparentemente correspondendo à via clássica de

indução da transição de permeabilidade. No entanto, o processo não foi inibido em iguais proporções de ADP, ATP, DTT e NEM, moduladores potenciais da transição de permeabilidade mitocondrial, e apesar de não ser observada a condição de estresse oxidativo em mitocôndrias e células isoladas, a adição de BHT suprime 100% da indução do inchamento mitocondrial, por mecanismo não esclarecido.

Figuras 6-A, 6-B e 6-C. **Intumescimento Osmótico Mitochondrial.** Traçado representativo dos efeitos do sulindaco e seus metabólitos no Inchamento mitocondrial em meio composto de sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, adicionado de rotenona 2,5 μ mol/L e succinato 5 mmol/L pH 7.2, a 30°C. A concentração de proteína mitocondrial utilizada foi de 0,4 mg/mL, em volume final de 1,5 mL. As reações foram iniciadas com CaCl_2 10 μ mol/L e em seguida pela adição dos fármacos após um minuto e meio. O controle positivo foi induzido por fosfato inorgânico. As adições estão representadas por setas. (*) representativo para ensaio conduzido na presença de ciclosporina A. Em A = ensaios com sulindaco; em B, ensaios com sulindaco sulfona e em C, com sulindaco sulfeto. $n = 6$. M = mitocôndria; A = adições.

Tabela 1 Efeito de moduladores da TPM no inchamento mitocondrial induzidos pelo sulindaco sulfeto na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$

Modulador	Inchamento mitocondrial (Porcentagem de inibição)
ADP 0,2 mmol/L	0.0
ATP 0,2 mmol/L	0.0
DTT 1 mmol/L	0.0
NEM 25 $\mu\text{mol/L}$	0.0
BHT 5 $\mu\text{mol/L}$	100
Mg ²⁺ 1 mmol/L	45 $\pm$ 10
CsA 1 $\mu\text{mol/L}$	33 $\pm$ 8
CsA 1 $\mu\text{mol/L}$ + ADP 0,2 mmol/L	35 $\pm$ 7

Os ensaios foram realizados conforme descrito na legenda das figuras 6-A, 6-B e 6-C. Os moduladores da TPM foram adicionados ao meio no início, imediatamente antes da adição do sulindaco sulfeto. Os percentuais de inibição foram calculados em relação aos resultados obtidos com a adição de sulindaco sulfeto sem os moduladores, 5 minutos após a adição do metabólito. Os valores representam a média $\pm$ DPM de 3-5 experimentos.

5.3 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos sobre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e lipoperoxidação

Os efeitos em relação à formação de espécies reativas de oxigênio podem ser observados no gráfico 5. Nossos resultados indicam que o sulindaco e seus metabólitos não apresentaram capacidade de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em mitocôndrias isoladas quando comparado ao grupo controle induzido por *t*-butil hidroperóxido, visto que os resultados encontrados para a concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ permanecem próximos aos encontrados para o controle não induzido em seis preparações mitocondriais diferentes. Pode-se observar no gráfico 6 o envolvimento do sulindaco e seus metabólitos na formação de malondialdeído (MDA) mitocondrial, onde os valores encontrados em seis preparações mitocondriais diferentes e em várias concentrações do fármaco e seus metabólitos indicam ausência de formação destas espécies químicas (valores médios e desvio padrão encontrados para sulindaco 4,27 nmol/mg proteína $\pm$ 1,34, sulindaco sulfeto 4,61 nmol/mg proteína $\pm$ 0,74 e sulindaco sulfona 4,27 nmol/mg de proteína $\pm$ 1,34, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$), fato que não comprometeu a integridade funcional da mitocôndria por mecanismo indutor de formação de radicais livres.

Os resultados relativos ao comportamento dos grupamentos sulfidríla solúveis (glutathiona reduzida) e grupamentos não solúveis (proteína sulfidríla) em mitocôndrias isoladas estão representados nos gráficos 7 e 8, respectivamente. Pode-se observar que não ocorreram alterações significativas nestes parâmetros em relação ao sulindaco, sulindaco sulfeto e sulindaco sulfona. A manutenção do conteúdo das

defesas antioxidantes endógenas possibilita interpretar que é inexistente a indução de formação de espécies reativas de oxigênio e ausência de um efeito cascata associado a este evento. Além disso, como mostra o gráfico 9, o sulindaco bem como seu metabólito sulfonado não foram capazes de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio em nenhuma concentração utilizada em cultura de células, resultados equivalentes com os ensaios conduzidos em mitocôndrias isoladas (gráfico 5). A ausência de participação ativa na formação destas espécies químicas reativas também foi observada para o sulindaco sulfeto, apesar deste metabólito ter exercido efeitos tóxicos em parâmetros bioenergéticos mitocondriais e celulares (Figura 4 e 5, Gráficos 1, 3 e 4). Da mesma forma, não foi observada nenhuma indução de formação de malondialdeído em células HepG2 (figura 10) pelo pró-fármaco ou seus metabólitos.

Gráfico 5. **Avaliação da indução de formação de radicais livres em mitocôndrias isoladas.** A formação de espécies reativas de oxigênio foi observada em diferentes concentrações do sulindaco e seus metabólitos. O controle positivo foi induzido com *t*-butil hidroperóxido 250 $\mu\text{mol/L}$. Foi fixada uma concentração protéica mitocondrial de 1 mg/mL para as análises. Maiores detalhes estão descritos em materiais e métodos. (*) significativo para $P < 0,05$ em relação ao controle negativo.

—■— Controle —◇— Controle positivo —▲— Sulindaco —●— Sulindaco sulfona —▼— Sulindaco sulfeto

Gráfico 6. **Avaliação da lipoperoxidação mitocondrial.** A formação de malondialdeído foi observada em diferentes concentrações do sulindaco e seus metabólitos. O controle positivo foi induzido com *t*-butil hidroperóxido 250 μ mol/L. Foi fixada uma concentração protéica mitocondrial de 1 mg/mL para as análises. Maiores detalhes estão descritos em materiais e métodos. (*) significativo para $P < 0,05$ em relação ao controle negativo. C- = controle negativo; C+ = controle positivo; S = sulindaco; SFO = sulindaco sulfona; SFE = sulindaco sulfeto.

■ C-
 ■ C+
 ■ Sulindaco
 ■ Sulindaco sulfona
 ■ Sulindaco sulfeto

Gráfico 7. **Análise do conteúdo de glutathiona reduzida em mitocôndrias isoladas.** As mitocôndrias (1mg/mL) foram incubadas em 1 mL de meio de reação composto por sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, acrescido de rotenona 2,5 μmol/L e succinato 5 mmol/L. As análises foram observadas em diferentes concentrações do sulindaco, sulindaco sulfeto e sulindaco sulfona. Os valores representam a média ± DPM de 5-6 experimentos com diferentes preparações. A indução da oxidação de GSH foi realizada com *t*-butil hidroperóxido 250 μmol/L. (*) significativo para $P < 0,05$ em relação ao controle negativo. C - = controle negativo, C+ = controle positivo; S = sulindaco, SFO = sulindaco sulfona, SFE = sulindaco sulfeto.

■ Controle negativo
 ■ Controle positivo
 ■ Sulindaco
 ■ Sulindaco sulfona
 ■ Sulindaco sulfeto

Gráfico 8. **Determinação do conteúdo de proteína sulfidril.** As mitocôndrias (1mg/mL) foram incubadas em 1 mL de meio de reação composto por sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L e succinato 5 mmol/L. As análises foram observadas em diferentes concentrações do sulindaco, sulindaco sulfeto e sulindaco sulfona. Os valores representam a média $\pm$ DPM de 5-6 experimentos com diferentes preparações. A indução da oxidação de grupamentos sulfidril foi realizada com *t*-butil hidroperóxido 250 μ mol/L. (*) significativo para $P < 0,05$ em relação ao controle negativo. C = controle, S = sulindaco, SFO = sulindaco sulfona, SFE = sulindaco sulfeto.

■ Controle negativo
 ■ Controle positivo
 ■ Sulindaco
 ■ Sulindaco sulfona
 ■ Sulindaco sulfeto

Gráfico 9. **Efeitos do sulindaco e seus metabólitos na indução de formação de radicais livres em células Hep G2.** Os ensaios representam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cultura de células na concentração de 1 mM do sulindaco e seus metabólitos. Os valores representam a média $\pm$ DPM de seis experimentos com preparações diferentes. As condições de análise estão descritas em maiores detalhes em materiais e métodos. (*) significativo para $P < 0,05$ em relação ao controle.

Controle Sulindaco Sulindaco sulfona Sulindaco sulfeto

Gráfico 10. **Efeitos do sulindaco e seus metabólitos na indução de formação de malondialdeído em células Hep G2**, Os ensaios representam a formação de malondialdeído em cultura de células na concentração de 1 mM do sulindaco e seus metabólitos. Os valores representam a média $\pm$ DPM de seis experimentos com preparações diferentes. As condições de análise estão descritas em maiores detalhes em materiais e métodos. (*) significativo para $P < 0,05$ em relação ao controle.

■ Controle ■ Sulindaco ■ Sulindaco sulfona ■ Sulindaco sulfeto

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos sobre a fosforilação oxidativa e liberação de cálcio: relação com a bioenergética celular

A habilidade para desacoplar a fosforilação oxidativa mitocondrial é uma característica comum aos agentes antiinflamatórios com um grupo ionizável (MAHMUD et al., 1996). Esta propriedade também é associada ao sulindaco (WADELL, 1998) e foi confirmada em nossos estudos, no entanto sendo atribuída somente ao metabólito reduzido do sulindaco. Os desacopladores clássicos são protonóforos, que aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial a prótons, dissipando o gradiente eletroquímico observado entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial. Muitos antiinflamatórios são ácidos fracos que possuem um próton dissociável presente nos grupos carboxila, hidroxila ou amino (KRAUSE et al., 2003). De acordo com nossos resultados, o sulindaco ou o sulindaco sulfona não causam nenhum efeito em mitocôndrias isoladas ou células HepG2; o efeito desacoplador é exercido pelo metabólito farmacologicamente ativo, sulindaco sulfeto. Esta propriedade pode ser relacionada ao deslocamento dos elétrons π acima e abaixo do anel indênico e benzênico da molécula, com contribuição ao enxofre e átomos de oxigênio, dissociando o íon hidrogênio do ácido acético presente nas estruturas químicas e presumivelmente aumentando suas propriedades ácidas em pH fisiológico. Os resultados obtidos indicam que o substituinte metil sulfinil na posição *para* é essencial. A ressonância de elétrons e a dissociação do próton do ácido acético são determinantes para esta propriedade o

que sugere um mecanismo protonoforético de desacoplamento mitocondrial, que é conhecido por causar liberação do cálcio pré-acumulado dentro da organela. O mecanismo de efluxo de Ca^{2+} é Na^{+} -independente e dominante em mitocôndrias de fígado, realizado de forma não eletrogênica pelo *antiporter* que troca íons $2\text{H}^{+}:\text{Ca}^{2+}$ com energia recebida do transporte de elétrons pela cadeia respiratória (SULEIMAN et al., 2001; FALL & KEIZER, 2001; GUNTER et al., 2004). A liberação do cálcio promovida pelo sulindaco sulfeto demonstra que este efeito é altamente dependente do potencial de membrana mitocondrial e originado como consequência à dissipação do gradiente químico.

As três formas químicas do sulindaco diminuem a intensidade de fluorescência dos nucleotídeos de piridina na forma reduzida, de maneira dose-dependente em mitocôndrias isoladas. Um efeito oxidante mais acentuado parece estar associado com o sulindaco sulfeto, visto que a intensidade de fluorescência é quase extinguida na concentração de $100\text{ }\mu\text{mol/L}$. Este fato sugere de início uma oxidação espontânea dos NAD(P)H induzida por reação de oxidação/redução *in vitro* das moléculas dos fármacos testadas, ou possivelmente estes compostos se comportam como *quenchers* no meio reacional. A supressão da fluorescência pode ser considerada um “artefato químico” na técnica empregada, o que dificultou a análise. Para investigar a ação real do sulindaco e seus metabólitos em relação à oxidação dos nucleotídeos de piridina, foram realizados ensaios eletroquímicos por voltametria (resultados não mostrados), onde foram observados um pico de oxidação e um fraco pico redutor para todas as estruturas analisadas. Este pico de oxidação pode ser associado ao grupamento ligado ao anel indólico, que contém um átomo de enxofre, enquanto que o pico redutor pode ser

associado ao ácido acético ligado ao anel indólico presente na estrutura química do sulindaco e seus metabólitos. Quando este grupamento está dissociado, origina um ânion carregado negativamente, que é capaz de interagir com moléculas com carga positiva ou com prótons acumulados no espaço intermembrana da mitocôndria. O NAD(P)H quando adicionado ao meio reacional não sofreu oxidação mensurável para sulindaco sulfeto, fortalecendo a hipótese que este metabólito não provoca alterações de estado redox.

No entanto, o sulindaco e o sulindaco sulfona apresentam fraca oxidação do NAD(P)H pelo método utilizado, mas este evento aparentemente não alterou a relação NAD^+/NADH mitocondrial, evento benéfico para as células, uma vez que o sulindaco é metabolizado por enzimas de fase I (oxidativas) que consomem estas espécies químicas em reações oxidativas de biotransformação. Estas reações são catalisadas por flavinas monooxigenases, presentes em grande quantidade no fígado, que catalisam a oxigenação do sulindaco (HISAMUDDIN et al., 2004). Além disso, o uso de células HepG2, que mantém este sistema enzimático é apropriado porque reflete a biotransformação do sulindaco em um modelo celular, no entanto, a biotransformação do sulindaco por reações de Fase I e de Fase II *in vivo* podem contribuir para o aumento da citotoxicidade, uma vez que através delas ocorre a formação do metabólito reduzido do sulindaco, única estrutura responsável pelos efeitos tóxicos observados neste estudo. A preocupação em determinar se existe a oxidação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais assume importância na análise do mecanismo de toxicidade induzido pelo sulindaco e seus metabólitos. Os sistemas desidrogenase no citosol e na mitocôndria são conhecidos por operarem nas concentrações de seus metabólitos e coenzimas, aproximando o equilíbrio termodinâmico. Portanto, a relação entre

metabólito oxidado / metabólito reduzido para cada desidrogenase reflete o estado redox da relação $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ e $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ (VELIKY et al., 2001). Além disso, os nucleotídeos de piridina são extensivamente armazenados no interior da mitocôndria, onde são envolvidos em diferentes funções relacionadas ao metabolismo energético e sinalização celular. A liberação de NAD^+ pelas organelas pode iniciar e amplificar eventos patológicos e fisiológicos (DI LISA e ZIEGLER, 2001). Desta forma, uma possível ausência de efeitos oxidantes do conteúdo de NAD(P)H , associada à preservação da glutatona e dos grupamentos tiólicos de proteínas em seu estado reduzido suportam a hipótese que o sulindaco sulfeto não interfere com eventos associados ao estresse oxidativo.

A conservação da energia acoplada à respiração na forma de ATP é a mais importante função mitocondrial (SKULACHEV, 1999). A dissipação do potencial de membrana e a diminuição do conteúdo de ATP podem resultar em efeitos tóxicos (WU et al., 1990). Além do mais, a síntese é dependente da integridade de membrana e sua diminuição pode estar envolvida com efeitos tóxicos, que induzem a um desbalanço funcional. Em nossos resultados, o sulindaco sulfeto induz de maneira semelhante e dose-dependente a redução no conteúdo de ATP e na viabilidade celular. Estes eventos não ocorrem para o pró-fármaco ou para o metabólito oxidado. A toxicidade celular é evidente em relação ao metabólito reduzido, e reflete os efeitos da perda do potencial transmembrana e estímulo da respiração basal, por agir como transportador de membrana para H^+ e assim interferir com o movimento dos prótons através da membrana mitocondrial, inibindo a síntese de ATP.

A concentração utilizada em nosso estudo (100 $\mu\text{mol/L}$ em mitocôndrias isoladas e 1 mmol/L na linhagem de hepatoma celular HepG2) estão aumentadas em relação às concentrações séricas obtidas em pacientes através da administração convencional, e podem ser consideradas tóxicas. Após a administração oral, o pico de concentração sérica é alcançado em 1 hora para o pró-fármaco ($C_{\text{máx}}$ de aproximadamente 10-34 $\mu\text{mol/L}$), e após 2 a 4 horas para sulindaco sulfeto ($C_{\text{máx}}$ próxima de 3-33 $\mu\text{mol/L}$) e sulindaco sulfona ($C_{\text{máx}}$ entre 4-19 $\mu\text{mol/L}$) (FERNANDES et al., 2003). Embora as concentrações experimentalmente usadas não sejam equiparadas às dosagens séricas, é possível alcançar estes valores *in vivo*, visto que pode ocorrer bioacúmulo em locais específicos ou sobredosagem deste antiinflamatório. Além do mais, o tratamento com 100 $\mu\text{mol/L}$ de sulindaco sulfeto por um período de 14 dias em cultura de células sugere efeitos citotóxicos (GALA et al., 2002).

Desta forma, é possível especular um mecanismo de citotoxicidade provocada pelo sulindaco, mais especificamente para seu metabólito reduzido e farmacologicamente ativo. O desacoplamento promovido pelo metabólito ativo farmacologicamente em concentração passível de ser alcançada *in vivo*, sugere que as mitocôndrias sejam o alvo primário dos efeitos tóxicos observados. Como consequência ao desacoplamento, ocorre a liberação do Ca^{2+} e redução dos níveis de ATP, provocando diminuição da viabilidade celular, conferindo ao metabólito reduzido potencial habilidade em interferir com o estado energético celular. Considerando esta particularidade, é prudente realizar um monitoramento da função hepática antes e durante o período de tratamento com este pró-fármaco, no sentido de prevenir complicações advindas de seu uso prolongado ou contínuo na terapia convencional.

6.2 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos em relação à transição de permeabilidade mitocondrial

A transição de permeabilidade da membrana mitocondrial é um evento que pode ocorrer em situações de desbalanço redox, e é controlada em dois locais: o primeiro está em um aparente equilíbrio redox com os nucleotídeos de piridina; o segundo local está em equilíbrio com o *pool* de glutathione (BINDOLI et al., 1997). No entanto, a preservação dos nucleotídeos de piridina mitocondriais em relação ao sulindaco sulfeto, associada à preservação dos grupamentos tiólicos e da glutathione reduzida tanto para mitocôndrias isoladas quanto para células HepG2 suportam a hipótese de que este metabólito não interfere com a homeostase iônica. A regulação do fluxo de íons através da membrana mitocondrial interna é essencial para a regulação metabólica e para a conservação de energia, de modo que alterações neste fluxo podem induzir a abertura do poro. Outros mecanismos implicados com a homeostase celular podem estar relacionados: (1) a dissipação do potencial de membrana causada por protonóforos e a oxidação de NAD(P)H são capazes de induzir o efluxo de cálcio pelas mitocôndrias (RICHTER; THEUS; SCHLEGEL; 1990; ZORATTI e SZABÒ, 1995), (2) a indução da transição de permeabilidade mitocondrial por protonóforos pode ser regulada pelo potencial de membrana (PETRONILLI et al., 1994). Dentro deste contexto, nossos resultados sugerem que a indução da TPM não foi promovida pelo cálcio, e a liberação deste íon provocada pelo sulindaco sulfeto pode ser um evento associado com a dissipação do potencial de membrana e ao desacoplamento, fatores que possivelmente resultam em transição de permeabilidade mitocondrial. Desta forma, o cálcio captado pelas mitocôndrias pode estar sendo liberado devido à capacidade de efluxo do poro.

Uma composição molecular aceita atualmente sugere que a transição de permeabilidade mitocondrial opera em dois estados abertos, o primeiro estado é de baixa condutância, onde existe permeabilidade somente para Ca^{2+} e H^+ . Esta conformação é induzida pelo alto pH da matriz e pode estar relacionado à função sinalizadora intracelular do cálcio, bem como com a regulação dos níveis deste íon na matriz. O segundo estado aberto é representado por um canal de alta condutância, no qual o poro adota uma conformação larga, aumentando a permeabilização a moléculas de baixo peso molecular. Esta conformação parece ser irreversível e aparentemente está relacionada com a resposta apoptótica, mediada pela liberação do citocromo c do espaço intermembrana para o citosol, o que leva a um desequilíbrio de vários solutos mitocondriais, como K^+ e Ca^{2+} (PRESTON et al., 2001).

É sugerido que o poro de transição de membrana pode ser composto por um complexo protéico formado por adenina nucleotídeo translocase (ANT) localizado na membrana interna, um canal aniônico voltagem dependente (CAVD) e porina localizados na membrana externa, ciclofilina D localizada na matriz mitocondrial, e proteínas relacionadas com o receptor benzodiazepínico periférico (HE e LEMASTERS, 2002; KROEMER, 2003). O sítio de contato entre a membrana externa e interna da mitocôndria é formado por porina e ANT, além de hexoquinase, creatina quinase e membros da família de proteínas Bcl-2 pró e anti-apoptóticos. A adenina nucleotídeo translocase pode funcionar em duas conformações: o “estado-c” (no qual a ligação do substrato ocorre na face citoplasmática da membrana mitocondrial) e no “estado-m” (no qual o substrato liga-se na face da matriz) (PANOV; ANDREEVA; GREENAMYRE, 2004).

A acentuada transição de permeabilidade observada em concentrações micromolares de sulindaco sulfeto aparentemente corresponde ao mecanismo clássico de indução, uma vez que a adição de ciclosporina A ao meio reacional previne parcialmente este efeito. Além disso, a TPM pode funcionar de duas formas: (1) um modo regulado, ativado por cálcio e inibido por CsA e Mg^{2+} ; (2) um modo não regulado, independente de cálcio e insensível à CsA e Mg^{2+} . Em geral, uma pequena indução de TPM abre o modo regulado, e uma forte indução de TPM abre o poro não regulado (HE e LEMASTERS, 2002). Este evento também foi prevenido de maneira semelhante com a adição de Mg^{2+} , demonstrando um possível envolvimento da adenina nucleotídeo translocase no processo de indução da TPM. No entanto, contraditória às propriedades clássicas atribuídas a este evento, a indução de TPM promovida pelo sulindaco sulfeto ocorre independente de cálcio, visto que é observado o inchamento mitocondrial com a presença de EGTA no meio reacional, e é conhecido que este evento é dependente do mesmo. Além disso, a adição de outros moduladores clássicos, como ADP, ATP, DTT e NEM não exercem nenhum efeito preventivo e, de forma não esperada, a adição de BHT ao meio previne 100% da transição de permeabilidade observada. Pode ocorrer sensibilização da abertura do poro na presença de cálcio, radicais livres ou oxidação dos grupamentos tióis presentes na matriz protéica da adenina nucleotídeo translocase, no entanto, não foi observada a formação destas espécies reativas de oxigênio, bem como a oxidação de NAD(P)H, GSH ou grupamentos tióis induzida pelo sulindaco sulfeto, por isso a surpresa ao adicionar BHT, que possui atividade antioxidante.

6.3 Efeitos do sulindaco e seus metabólitos no estresse oxidativo e relação com bioenergética

O estresse oxidativo é um achado freqüente no curso da hepatotoxicidade induzida por xenobióticos. É um evento mediado pela formação de radicais livres diversos que resultam na degradação oxidativa de lipídios e proteínas presentes em diversos sistemas de membranas das células. Outras macromoléculas como glicídios e ácidos nucleicos também podem ser afetadas. Esse processo pode ser iniciado por radicais livres derivados dos xenobióticos gerados em reações catalisadas pelas isoenzimas do citocromo *P450*, ou ainda pela redução dos radicais livres oriundos do oxigênio, podendo ser estendido aos lipídios insaturados, estabelecendo uma seqüência de reações em cadeia, de modo que os danos às membranas podem ser propagados. Como consequência, ocorrem alterações das propriedades físicas e químicas das membranas, e indiretamente, perda das funções especializadas (ROSS, 1989).

A lipoperoxidação pode ser originada nas células por formação de radicais livres de oxigênio originados de diversas fontes, como estresse oxidativo, reações enzimáticas ou por xenobióticos. O maior mecanismo de ativação do oxigênio por metais ocorre pela reação de Fenton/Haber-Weiss, com substratos correspondentes ao radical superóxido e peróxido de hidrogênio, que promovem a oxidação de metais de transição (KASPRZAK, 2002). Os radicais peróxidos podem ser gerados experimentalmente pelo composto químico *t*-butilhidroperóxido (*t*-BOOH), um análogo de cadeia curta de hidroperóxidos lipídicos, que mimetiza os efeitos tóxicos dos ácidos graxos peroxidados por interações com íon ferro, em reação semelhante à reação de

Fenton (PIRET et al., 2004), ou através de indução pelo complexo Fe^{3+} /citrato, que também causa lipoperoxidação através da via clássica de Fenton (RODRIGUES et al., 2002). A cadeia respiratória mitocondrial também é uma fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio, que incluem o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A formação destas espécies químicas é aumentada quando os níveis de ADP estão reduzidos e o potencial de membrana está aumentado, condição que reflete o estado 4 da respiração. No estado 3, quando o potencial de membrana está diminuído, mas os níveis de ADP estão altos, ocorre diminuição da formação de radicais livres oriundos da cadeia transportadora de elétrons (TURUNEN; OLSSON; DALLNER, 2004). Por outro lado, a diminuição do potencial de membrana mitocondrial devido ao desacoplamento inibe a geração de radicais livres de oxigênio através da cadeia respiratória (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001).

O sulindaco e o sulindaco sulfonado não exerceram ação desacopladora da fosforilação oxidativa, evidenciada pela manutenção do potencial de membrana e do consumo de oxigênio basal, e sua habilidade de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio não foi observada nos ensaios envolvendo mitocôndrias isoladas e células HepG2, fato que previne a lipoperoxidação e preserva a integridade da membrana. O sulindaco sulfeto apresenta efeito desacoplador da fosforilação oxidativa, e em nossas análises demonstrou ser incapaz de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio. É possível supor que a formação de radicais livres oriundos da cadeia transportadora de elétrons seja suprimida, aspecto que pode ser considerado benéfico sob esta perspectiva. Estas evidências abrem novos caminhos para

investigação de uma possível ação *scavenger* promovida pelo sulindaco e seus metabólitos sulfona e sulfeto contra danos oxidativos induzidos por radicais livres.

A mitocôndria possui um sistema de defesa antioxidante bastante eficiente, composto pela superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRd), glutathione reduzida (GSH) e NAD(P)H, além das vitaminas C e E (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). As células HepG2 possuem aumento da catalase por expressão acentuada desta enzima em mitocôndrias e citoplasma, além de outras enzimas antioxidantes e pertencentes a reações de Fase I e Fase II (KNASMÜLLER et al., 1998; PRESTON et al., 2001). Como exposto, a manutenção destas enzimas, particularmente as enzimas responsáveis por biotransformação na linhagem celular, possibilita analisar a instalação de uma situação de estresse oxidativo em etapas pré e pós metabolização do antiinflamatório, permitindo pressupor que não ocorre indução da formação de radicais livres ou consumo de defesas antioxidantes mesmo por uma possível bioativação do sulindaco por reações de detoxificação. A presença de alta atividade enzimática da catalase em células HepG2 é um fator que merece atenção, visto que aumenta a capacidade destas células em neutralizar radicais livres gerados (particularmente o peróxido de hidrogênio, substrato desta enzima), e pode ter contribuído para a ausência de formação destas espécies químicas nos ensaios realizados, caso formados *via* biotransformação do antiinflamatório. No entanto, o pró-fármaco, bem como seus metabólitos foram analisados isoladamente e em concentrações tóxicas, não ocasionando alterações mensuráveis nos parâmetros analisados, o que reforça a hipótese do sulindaco, bem como do sulindaco sulfona e sulindaco sulfeto não induzirem o estresse oxidativo.

Conforme demonstrado em estudos conduzidos por Fernandes et al., (2003), existe uma atividade *scavenger* do sulindaco, sulindaco sulfeto e sulindaco sulfona em sistemas *in vitro*. Os resultados obtidos nesta investigação demonstraram que o sulindaco e o seu metabólito oxidado possuem ação contra os radicais superóxido, hidroxila, óxido nítrico e peroxinitrito, enquanto que o sulindaco sulfeto tem ação contra a formação de ácido hipocloroso, superóxido, radical hidroxila, óxido nítrico e peroxinitrito. A atividade *scavenger* parece estar relacionada com o estado redox do átomo de enxofre presente na estrutura química do sulindaco e de seus metabólitos, no entanto maiores investigações devem ser realizadas para elucidar este mecanismo, no sentido de contribuir para um possível mecanismo protetor deste antiinflamatório e seus metabólitos contra danos induzidos pela formação de espécies radicais pelas células.

7 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste estudo podem ser arroladas nos seguintes tópicos:

- (a) O principal alvo dos efeitos tóxicos causados pelo sulindaco sulfeto é a mitocôndria, com ação associada ao desacoplamento da fosforilação oxidativa e dissipação do potencial de membrana mitocondrial, através de um mecanismo protonofórico, evento preponderante de indução da citotoxicidade observada, diminuindo o conteúdo de ATP celular disponível oriundo da fosforilação oxidativa, o suficiente para provocar de maneira dose-dependente a diminuição da viabilidade celular, induzindo a morte, eventos não atribuídos ao pró-fármaco sulindaco ou ao sulindaco sulfonado.
- (b) O desacoplamento da fosforilação oxidativa pelo sulindaco sulfeto pode ter desencadeado a indução de permeabilidade mitocondrial, processo aparentemente correspondente à via clássica de indução, e que pode contribuir na sua toxicidade.
- (c) O sulindaco, bem como seu metabólito oxidado e reduzido não apresentaram indícios de envolvimento em uma situação de estresse oxidativo e/ou de desbalanço redox de ordem mitocondrial ou celular, mesmo quando analisados em doses consideradas tóxicas.
- (d) O processo de metabolização deste antiinflamatório (evidenciado no modelo celular empregado, que mantém as enzimas que catalisam as reações de biotransformação) pode ser responsável *in vivo* pelos efeitos citotóxicos, uma vez que estas reações ocorrem no fígado e originam o metabólito reduzido.

8 REFERÊNCIAS

ASANO, T. K.; McLEOD, R. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the aspirin for the prevention of colorectal adenomas and cancer: a systematic review. **Diseases of the Colon & Rectum**, Philadelphia, v. 47, n.5, p. 665-673, 2004.

ATHAR, M.; AN, K. P.; MOREL, K. D.; KIM, A. L.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R. Photoprotective effects of sulindaco against ultraviolet B-induced phototoxicity in the skin of SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 195, p. 370-378, 2004.

BABCOCK, D. F.; HERRINGTON, J.; GOODWIN, P. C.; PARK, Y. B.; HILLE, B. Mitochondrial participation in the cellular Ca^{2+} network. **Journal of Cellular Biology**, New York, v. 136, n. 4, p. 833-844, 1997.

BARON, J. A.; SANDLER, R. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. **Annual Review of Medicine**; Palo Alto, v. 51, p. 511-523, 2000.

BEHER, D.; CLARKE, E. E.; WRIGLEY, J. D. J.; MARTIN, A. C. L.; NADIN, A.; CHURCHER, I.; SHEARMAN, M. S. Selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives target γ -secretase at a novel site. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 43419-43226, 2004.

BERMAN, K. S.; VERMA, U. N.; HARBURG, G.; MINNA, J. D.; COBB, M. H.; GAYNOR, R. B. Sulindac enhances tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis of lung cancer cell lines by inhibition of nuclear factor-kB. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 8, p. 354-360, 2002.

BERNARDI, P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. **Biochemistry et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1275, p. 5-9, 1996.

BINDOLI, A.; CALLEGARO, M. T.; BARZON, E.; BENETTI, M.; RIGOBELLO, M. P. Influence of the redox state of pyridine nucleotides on mitochondrial sulfhydryl groups and permeability transition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 342, n. 1, p. 22-28, 1997.

BRAND, M. D. Electroneutral efflux of Ca^{2+} from liver mitochondria. **Biochemical Journal**, London, v. 225, p. 413-419, 1985.

BRATTON, S. B.; COHEN, G. M. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? **TRENDS in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 22, n. 6, p. 306-315, 2001.

BROATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current opinion in Cell Biology**, Hilversum, v. 15, p. 725-731, 2003.

BROOKS, P. M.; DAY, R. O. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs – differences and similarities. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 324, p. 1716-1725, 1991.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Ed.). **Biochemical Toxicology**, Oxford: IRL Press, 1987, p. 217-254.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKY, A. J.; BECHARA, E. J. H.; MEINICKE, A. R.; VERCESI, A. E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 18, p. 479-486, 1995.

CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; AMES, B. N. Detection of picomoles levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 134, p. 111-116, 1983.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**, New York, v. 17, p. 65-134, 1956.

CHITTURI, S.; GEORGE, J. Hepatotoxicity of commonly used drugs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihypertensives, antidiabetic agents, anticonvulsivants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 22, n. 2, p. 169-183, 2002.

DAVIES, N. M.; WATSON, M. S. Clinical pharmacokinetics of sulindac – A dynamic old drug. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v. 32, n. 6, p. 437-459, 1997.

DI LISA, F.; ZIEGLER, M. Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD⁺ metabolism. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 492, p. 4-8, 2001.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**, Washington, v. 82, p. 47-95, 2002.

FALL, C. P.; KEIZER J. E. Mitochondrial modulation of intracellular Ca²⁺ signaling. **Journal of Theory Biology**, v. 210, p. 151-165, 2001.

FERNANDES, E.; TOSTE, S. A.; LIMA, J. L. F. C.; REQUIMTE, S. R. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 35, n. 9, p. 1008-1017, 2003.

FOURNIER, D. B.; GORDON, G. B. COX-2 and colon cancer: potential targets for chemoprevention. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 34, p. 97-102, 2000.

GALA, M.; SUN, R.; YANG, V. W. Inhibition of cell transformation by sulindac sulfide of confined to specific oncogenic pathways. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 175, p. 89-94, 2002.

GARDINER, T. A.; ANDERSON, H. R.; DEGENHARDT, T.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W.; ARCHER, D. B.; STITT, A. W. Prevention of retinal capillary basement membrane thickening in diabetic dogs by a non-steroidal anti-inflammatory drug. **Diabetologia**, Berlin, v. 46, p. 1269-1275, 2003.

GASPARINI, L.; ONGINI, E.; WENK, G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 91, p. 521-536, 2004.

GENOVA, M. L.; PICH, M. M.; BERNACCHIA, A.; BIANCHI, C.; BIONDI, A.; BOVINA, C.; FALASCA, A. I.; FORMIGGINI, G.; CASTELLI, G. P.; LENA, Z. G. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 1011, p. 86-100, 2004.

GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **American Journal of Physiology**, Washington, v. 258, p. C755-C789, 1990.

GUNTER, Y. E.; BUNTINAS, L.; SPARAGNA, G. C.; GUNTER, K. K. The mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **American Journal of Physiology**, Washington, v. 267, n. 36, p. C313-C339, 1994.

GUNTER, T. E.; YULE, D. I.; GUNTER, K. K.; ELISEEV, R. A.; SALTER, J. D. Calcium and mitochondria. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 567, p. 96-102, 2004.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal review. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 52, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.). **Free Radical in Biology and Medicine**, Oxford: University Press, 1999, 936 p.

HASMALL, S. C.; ROBERTS, R. A. The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 63-70, 1999.

HAUGAARD, N. Reflections on the role of the thiol group in biology. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, p. 148-158, 2000.

HE, L.; LEMASTERS, J. J. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 512, p. 1-7, 2002.

HISAMUDDIN, I. M.; WEHBI, M. A.; CHAO, A.; WYRE, H. W.; HYLIND, L. M.; GIARDELLO F. M.; YANG V. W. Genetic polymorphisms of human *flavin monooxygenase 3* in sulindac-mediated primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 10, p. 8357-8362, 2004.

KADENBACH, B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1604, p. 77-94, 2003.

KAPLOWITZ, N. Mechanisms of liver cell injury. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 32(1), p. 39-47, 2000.

KÁPUS, A.; SZÁSZI, K.; KÁLDI, K.; LIGETI, E.; FONYÓ, A. Is the mitochondrial Ca^{2+} uniporter a voltage-modulated transport pathway? **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 282, n. 1, p. 61-64, 1991.

KASPRZAK, S. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 32, n. 10, p. 958-967, 2002.

KEHRER, J. P.; LUND, L. G. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 17, n. 1, p. 65-75, 1994.

KIM, J. S.; HE, L.; QIAN, T.; LEMASTERS, J. J. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 3, p. 527-535, 2003.

KIRKINEZOS, I. G.; MORAES, C. T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 12, p. 449-457, 2001.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 402, p. 185-202, 1998.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A., E. Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. **American Journal of Physiology**, Washington, v. 269, n. 38, p. C141-C147, 1995.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with *N*-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} : correlation with mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1318, p. 395-402, 1997.

KOWALTOWSKI, A.; VERCESI, A. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, p. 463-471, 1999.

KOWALTOWSKI, A. J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 33, p. 241-250, 2000.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. The mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 495, p. 12-15, 2001.

KRAUSE, M. M.; BRAND, M. D.; KRAUSS, S.; MEISEL, C.; VERGIN, H.; BURMESTER, G. R.; BUTTGEREIT, F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and a selective cyclooxygenase 2 inhibitor uncouple mitochondria in intact cells. **Arthritis & Rheumatism**, New York, v. 48, n. 5, p. 1438-1444, 2003.

KROEMER, G. The mitochondrial permeability transition pore complex as a pharmacological target. An introduction. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 10, p. 1469-1472, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (Ed.). **Principles of Biochemistry**, New York: Work Publishers, 3 ed, cap. 19, p. 515-539, 2002.

LEMASTERS, J. J. Mechanisms of hepatic toxicity v. necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **American Journal of Physiology**, Washington, v. 276, p. G1-6, 1999.

LI, A. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 6 (7), p. 357-366, 2001.

LITSKY, M. L.; PFEIFFER, D. R. regulation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by external adenine nucleotides: The uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations. **Biochemistry**, Washington, v. 36, p. 7071-7080, 1997.

MAHMUD, T.; RAFI, S. S.; SCOTT, D. L.; WRIGGLESWORTH, J. M.; BJARNASON, I. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. **Arthritis & Rheumatism**, New York, v. 39, n. 12, p. 1998-2003, 1996.

MASUBUCHI, Y.; SAITO, H.; HORIE, T. Structural requirements for the hepatotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in isolated rat hepatocytes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 287, p. 208-213, 1998.

McSTAY, G. P.; CLARKE, S. J.; HALESTRAP, A. P. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. **Biochemical Journal**, London, v. 367, p. 541-548, 2002.

MINGATTO, F. E.; SANTOS, A. C.; UYEMURA, S. A.; JORDANI, M. C.; CURTI, C. *In vitro* interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 334, p. 303-308, 1996.

MINGATTO, F. E.; SANTOS, A. C.; RODRIGUES, T.; PIGOSO, A. A.; UYEMURA, S. A.; CURTI, C. Effects of nimesulide and its reduced metabolite on mitochondria. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 131, p. 1154-1160, 2000.

MUIR, K. R.; LOGAN, R. F. A. Aspirin, NSAIDs and colorectal cancer – what do the epidemiological studies show and what do they tell us about the *modus operandi*? **Apoptosis**, London, v. 4, p. 389-396, 1999.

MURPHY, M. P. How understanding the control of energy metabolism can help investigation of mitochondrial dysfunction, regulation and pharmacology. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1504, p. 1-11, 2001.

MYERS, C.; KOKI, A.; PAMUCKU, R.; WECHTER, W.; PADLEY, R. Pro-apoptotic anti-inflammatory drugs. **Urology**, New York, v. 57, n. 4-A, p. 73-76, 2001.

O'CONNOR, N.; DARGAN, P. I.; JONES, A. L. Hepatocellular damage from non-steroidal anti-inflammatory drugs. **The Quarterly Journal of Medicine**, Oxford, v. 96, p. 787-791, 2003.

PANOV, A. V.; ANDREEVA, L.; GREENAMYRE, J. T. Quantitative evaluation of the effects of mitochondrial permeability transition pore modifiers on accumulation of calcium phosphate: comparison of rat liver and brain mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 424, p. 44-52, 2004.

PARK, B. K.; KITTINGHAM, N. R.; POWELL, H.; PIRMOHAMED, M. Advances in molecular toxicology – towards understanding idiosyncratic drug toxicity. **Toxicology**, Amsterdam, v. 153, p. 39-60, 2000.

PEDERSEN, P. L.; GRENAWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMANTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Methods in Cell Biology**, New York, v. 20, p. 411-481, 1978.

PETRONILLI, V.; CONSTANTINI, P.; SCORRANO, L.; COLONNA, R.; PASSAMONTI, S.; BERNARDI, P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is turned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 16638-16642, 1994.

PIGOSO, A. A.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; RODRIGUES, T.; MINGATTO, F. E.; CURTI, C. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on calcium efflux in isolated rat renal cortex mitochondria and aspects of the mechanisms involved. **International Journal of Biochemical & Cell Biology**, Exeter, v. 30, p. 961-965, 1998.

PIRET, J. P.; ARNOULD, T.; FUKS, B.; CHATELAIN, P.; REMACLE, J.; MICHIELS, C. Mitochondria permeability transition-dependent *tert*-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 67, p. 611-620, 2004.

PRESTON, J. T.; ABADI, A.; WILSON, L.; SINGH, G. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 49, p. 45-61, 2001.

RAFFRAY, M.; COHEN, G. M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 153-177, 1997.

RICE, P. L.; BEARD, K. S.; DRIGGERS, L. J.; AHNEN, D. J. Inhibition of extracellular-signal regulated kinases $\frac{1}{2}$ is required for apoptosis of human colon cancer cells *in vitro* by sulindac metabolites. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, p. 8148-8151, 2004.

RICHTER, C.; THEUS, M.; SCHLEGEL, J. Cyclosporine A inhibits mitochondrial pyridine nucleotide hydrolysis and calcium release. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 779-782, 1990.

ROBERTO. P. G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J.O.; ASTOLFI-FILHO S.; NOMIZO A.; GIGLIO J.R.; FONTES M.R.; SOARES A.M.; FRANCA S.C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A2 from Bothrops jararacussu venom. **Protein Journal**, Netherlands, v. 23, p. 273-285, 2004.

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

ROSS, D. Mechanistic toxicology: a radical perspective. **Journal Pharmaceutical Pharmacology**, Pergamon Press, v. 41, p. 505-511, 1989.

ROY, S.; NICHOLSON, D. W. Programmed cell-death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. **American Association for Cancer Research Special Conference**, Denville, v. 6, p. 264-266, 2000.

RYLL, T.; Wagner, R. Improved ion-pair high performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animals cells. **Journal of Chromatography**, Elsevier, v. 570, p. 77-88, 1991.

SANTOS, A.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, N. A. G.; MINGATTO, F. E.; CURTI, C. Hg(II)-induced renal cytotoxicity: *In vitro* and *in vivo* implications for the bioenergetic and oxidative status of mitochondria. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Kluxer Academic, v. 177, p. 53-59, 1997.

SCARPA, A. measurements of cation transport with metallochromic indicators. In: FLEISCHER, S.; PACKER, L (Eds.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, v. 56, p. 301-352, 1979.

SCHOONEN, W. G. E. J.; de ROOS, J. A. D. M.; WESTERINK, W. M. A.; DÉBITON, E. Cytotoxic effects of 110 reference compounds on HepG2 cells and for 60 compounds on HeLa, ECC-1 and CHO cells. II Mechanistic assays on NAD(P)H, ATP and DNA contents. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 19, p. 491-503, 2005.

SKULACHEV, V. P. Mitochondrial physiology and pathology: concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. **Molecular Aspects of Medicine**, Elsevier Science, v. 20, p. 139-184, 1999.

STERNBERG, C. N. What's new in the treatment of advanced prostate cancer? **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 39, p. 136-146, 2003.

SULEIMAN, M. S; HALESTRAP A. P.; GRIFFITHS, E.J. Mitochondria: a target for myocardical protection. **Pharmacological Therapy**, Urban, v. 89, p. 26-46, 2001.

SUN, BAO-CUN, ZHAO, XIU-LAN, ZHANG, SHI-WU; LIU, YI-XIN; WANG, L.; WANG, X. Sulindac induces apoptosis and protects against colon carcinoma in mice. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 11, n. 18, p. 2822-2826, 2005.

SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: dorebt no more. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1336, p. 151-165, 1998.

SZEWCZYK, A.; WOJTCZAK, L. Mitochondria as a pharmacological target. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 54, p. 101-127, 2002.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and others tissues. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 27, p. 502-522, 1969.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1660, p. 171-199, 2004.

TUSCHL, H.; SCHWAB, C. Cytotoxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Elsevier Science, v. 41, p. 385-393, 2003.

VAYA, J.; AVIRAM, M. Nutritional antioxidants: mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. **Current Medical Chemistry**, Schipol, v. 1, n. 1, p. 99-117, 2001.

VELIKY, M. M.; VOVK, O. I.; APHONYUSHKIN, T. A.; ZABABURINA, M. L.; GURSKA, N. I.; DROBOT, L. B. Redox state of nicotinamide nucleotides and antioxidant enzyme activities in C-27 hepatoma tissue and liver of tumor-bearing rats. **Experimental Oncology**, Kyiv, vol. 23, p. 39-42, 2001.

WADDELL, W. Stimulation of apoptosis by sulindac e piroxicam. **Clinical Science**, London, v. 95, p. 385-388, 1998.

WALTER, L.; MIYOSHI, H.; LEVERVE, X.; BERNARDI, P.; FONTAINE, E. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. A progress report. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 36, n. 4, p. 405-412, 2002.

WANG, L. J. J.; HERTEVIG, J. Y.; DUAN, N. A. Sulindac induces apoptosis, inhibits proliferation and activates caspase 3 in HepG2 cells. **Anticancer Research**, Athens, v. 22, n. 1-A, p. 263-266, 2002.

WEGGEN, S.; ERIKSEN, J. L.; SAGI, S. A.; PIETRZIK, C. U.; OZOLS, V.; FAUQ, A.; GOLDE, T. E.; KOO, E. H. Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid β 42 production by direct modulation of γ -secretase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 31831-31837, 2003.

WITTA, S. E.; GUSTAFSON, D. L.; PIERSON, A. S.; MENTER, A.; HOLDEN, S. N.; BASCHE, M.; PERSKY, M.; O'BRYANT, C. L.; ZENG, C.; BARON, A.; LONG, M. E.; GIBBS, A.; KELLY, K.; BUNN, P. A. Jr.; CHAN, D. C.; PALLANSCH, P.; ECKHARTD, S. G. A phase I and pharmacokinetic study of exsisulind and docetaxel in patients with advanced solid tumors. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 10, p. 7229-7237, 2004.

WU, E. Y.; SMITH, M. T.; BELLOMO, G.; DI MONTE, D. Relationships between the mitochondrial transmembrane potential, ATP concentration, and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 282, n. 2, p. 358-362, 1990.

YAMAMOTO, K.; MASUBUCHI, Y.; NARIMATSU, S.; KOBAYASCHI, S.; HORIE, T. Toxicity of ethacrynic acid in isolated rat hepatocytes. **Toxicology in vitro**, Oxford, Oxford, v. 16, p. 151-158, 2002.

YAN, Z.; CALDWELL, G. Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 1, p. 403-435, 2001.

ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization – the (w)hole story? **Current Biology**, Schiphol, v. 13, p. R71-R73, 2003.

ZIEGLER, D. M. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme tilos-disulfides in metabolic regulation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 54, p. 305-329, 1985.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain and conscious animals. **Pain**, Amsterdam, v. 16, p. 109-110, 1983.

ZORATTI, M.; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1241, p. 139-176, 1995.