UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

DANIEL JUNQUEIRA DORTA

**Efeitos citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides:
estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos
mitocondriais, com ênfase na apoptose**

Ribeirão Preto
2007

DANIEL JUNQUEIRA DORTA

**Efeitos citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides:
estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos
mitocondriais, com ênfase na apoptose**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para a obtenção do
Título de Doutor em Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Curti

**Ribeirão Preto
2007**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

* As tiras em quadrinhos reproduzidas nesta tese, foram autorizadas pelo autor, Jorge Cham, desde que indicada à fonte (www.phdcomics.com).

FICHA CATALOGRÁFICA

Dorta, Daniel Junqueira

Efeitos citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides: estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose. Ribeirão Preto, 2007.

134 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia.

Orientador: Curti, Carlos.

1. Flavonóides.
2. Mitocôndria.
3. Células HepG2.
4. Apoptose.
5. Estudo estrutura-atividade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Junqueira Dorta

Efeitos citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides: estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose.

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

Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Curti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho...

...Ao meu pai, Eduvaldo, que sempre foi e será modelo de dedicação à profissão, de justiça e de honestidade. Por todo amor dedicado à família e pelo apoio e incentivo constantes para realização dos meus sonhos.

...À minha mãe, Eliane, por todo amor, incentivo e compreensão. Muito obrigado por me ensinar a lutar pelos meus sonhos, me mostrando que vale a pena transpor obstáculos para conquistá-los.

...Ao meu irmão, Gustavo (Bob), por todos momentos de convivência (apesar de cada vez mais raros) e palavras de apoio nos momentos em que precisei.

...Aos meus avós, que foram sempre alicerce para todas as conquistas.

...Aos meus tios, tias, primos e primas que sempre me deram apoio e carinho ao longo desta caminhada.

JORGE CHAM ©THE STANFORD DAILY

phd.stanford.edu/comics

www.phdcomics.com

Agradecimento Especial

À Minha Querida namorada, Daniellê...

... pelo seu amor e compreensão, compartilhando com dedicação e paciência o final desta etapa importante de minha vida. Sua companhia me deu forças nos momentos difíceis e me motivaram a continuar sempre.

... pelo conforto e carinho nos momentos de angústia e que tanto me fazem bem.

TE AMO!!!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Curti...

... pela dedicação ao ensino, à pesquisa e pela orientação segura e paciente que possibilitou a realização deste trabalho.

... pela convivência diária e amizade sincera e atenciosa.

Aos amigos de hoje e sempre...

.... Claudia da Silva Bitencourt, amiga desde a faculdade,
companheira de todos os momentos, cuja amizade estará sempre ao
meu lado

....Wagner Rodrigo de Souza, que com suas brincadeiras sempre
alegra a todos ao seu redor e cuja companhia pude contar da mesma
forma nos momentos de dificuldade, quanto na alegria.

.... Daiani Cristini de Oliveira Andrade, amiga sempre disposta a
auxiliar e por todos os momentos de convívio (sempre muito
divertidos) e paciência.

.... Anaísa Fernandes Calgaro Helena, pela paciência com minha
bagunças na bancada, os dias compartilhados no laboratório e todo o
auxílio para que chegasse até aqui.

Ao Prof. Dr. Kendall B. Wallace, que abriu as portas de seu laboratório e me proporcionou a possibilidade de grande crescimento profissional, e que junto com toda sua família (Gail, Zach, Josh e Derick) me fizeram sentir em casa durante o ano que passei longe.

Ao Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos, pelos auxílios tanto na execução dos experimentos quanto na discussão de resultados, suporte para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, pela colaboração na execução deste trabalho, como também na minha formação como pesquisador.

Aos grandes amigos de Portugal, Paulo, Carlos, Vilma e Anabela, que me ensinaram profissionalmente, mas acima de tudo cujas amizades se tornaram muito importante em minha vida.

À grande amiga Raquel, que me ensinou que todos devemos ser um pouco “Fred” em nossas vidas, e cujas palavras de carinho e compreensão serão sempre bem vindas.

Aos Profs. Drs. Fábio Ermínio Mingatto e Tiago Rodrigues, por todos os ensinamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao grande amigo Acácio Antonio Pigoso, pelas sugestões, amizade e companheirismo.

Ao Laboratório de Bioquímica, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, onde foi desenvolvido este trabalho.

Aos Profs. Drs. do Laboratório de Bioquímica: Ana Isabel de Assis Pandochi, Augusto César C. Spadaro, Carem Gledes Vargas Rechia e Yara Maria Lucisano Valim, pela amizade e agradável convívio.

À Ana Cristina Morseli Polizello pela amizade e colaboração em todos os momentos de dificuldade.

À Ieda Maria Razaboni Prado e Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini pela agradável convivência e pelo carinho apresentado durante todos estes anos.

A Maria Regina de Pila Raphaloski, pela preciosa amizade e auxílio na organização de documentos.

Ao funcionário do Laboratório de Bioquímica da F.C.F.R.P., Alcides Silva Pereira, por todo o suporte técnico que possibilitou o desenvolvimento experimental deste projeto.

A Funcionária do Laboratório de Bioquímica da F.C.F.R.P., Nadir Mazzucato, por todo carinho e apoio durante toda a realização do projeto.

Aos amigos Pós-Graduandos Adriana Pascolato, Alexandre Kanashiro, Ana Paula Garcia Landi, Cássio Pontes, Denise Pimenta da Silva Leitão, Frederico M. Sorriani, Livia Maria Cordeiro Simões, Luciana Mariko Kabeya, Miriam Ribeiro Moreira, Samara Leite, Valéria Gomes Tudella, Vicente (Tuba), César Rangel Pestana, Elisa Maria de S. Russo Carbolante, Fabiana da Silva Paula, Fernando Aparecido Mariano de Souza, Laura Marins Valdevite, Mateus Freire Leite, José F. de Lima, Roberta de Melo e Viviane C. Gumiero pelo apoio, auxílio e amizade construída.

Aos alunos de iniciação científica Andréia Silva Garcia de Figueiredo, Cláudia Meirelles de Siqueira, Daniela Godoy, Daniela Paula dos Santos Phelippin, Jennifer Michiko Chauca Vokoya, Joel Gonçalves de Souza, Larissa Deadame de Figueiredo, Sílvia Almeida Cardoso, Tais Nader Chrysostomo, Tatiana Santos Marasca, Viviane Keiko dos Santos Kawata.. Agradeço pela oportunidade de conhecê-los e pelos momentos compartilhados.

À Gilmara, por todo auxílio e pela grande amizade construída nesses meses de convívio.

A todos que de alguma forma contribuíram (direta ou indiretamente) para a realização do trabalho:

Ao grande amigo, Fabio Cícero de Sá Galetti, por todos estes anos de convivência e apoio para trilhar este caminho.

Aos sempre amigos, Rodrigo (Digão), Getúlio, Herlon, William e Wirlley, pela inesquecível convivência, e principalmente pela criatividade com que levam o dia a dia.

Ao amigo e “irmão” Jefferson, por todos os momentos (apesar de cada vez mais raros).

E a todos, aqui não citados, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento:

...Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido a este projeto (Processo nº. 2004/02171-8).

...Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de doutorado para a parte realizada no país (Processos nºs. 141437/2003-0 e 143032/2005-4).

...Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa do Programa de Estágio de Doutorando no Exterior – PDEE para a parte desenvolvida nos Estados Unidos durante o doutorado (Processo nº. BEX0386/04-9).

“... Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele se assemelhará, com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que uma criatura harmoniosamente desenvolvida. Deve aprender a compreender as motivações dos homens, suas quimeras e suas angústias para determinar com exatidão seu lugar exato em relação a seus próximos e à comunidade...”

Albert Einstein

JORGE CIAM © 2006

WWW.PHDCOMICS.COM

Este trabalho foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, no Departamento de Física e Química, laboratório de Bioquímica e no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, laboratório de Toxicologia, com a colaboração do Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos e na Escola de Medicina da Universidade de Minnesota – Duluth, departamento de Bioquímica e Biologia Molecular através de colaboração com o Prof. Dr. Kendall B. Wallace.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 FLAVONÓIDES.....	2
1.2 MITOCÔNDRIA	5
1.2.1 Estrutura e fisiologia da mitocôndria	5
1.2.2 Mitocôndria: função energética	8
<i>Mitocôndria como fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs).....</i>	<i>10</i>
<i>Movimentação de Ca²⁺ nas mitocôndrias.....</i>	<i>11</i>
<i>Transição de permeabilidade mitocondrial (TPM).....</i>	<i>13</i>
1.3 MORTE CELULAR POR NECROSE E APOPTOSE	15
<i>Mitocôndria e morte celular por necrose e apoptose</i>	<i>16</i>
<i>Prevenção/indução da apoptose e estados patológicos.....</i>	<i>19</i>
1.4 UTILIZAÇÃO DE SISTEMA CELULAR NOS ESTUDOS DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE	20
1.5 ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E PRÓ-OXIDANTE DOS FLAVONÓIDES.....	21
1.6 PROPOSTA	23
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 CONDIÇÕES PADRÃO DE INCUBAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS	27
3.2 AVALIAÇÕES EM SISTEMAS LIVRES DE MITOCÔNDRIAS/ CÉLULAS.....	27
3.2.1 Atividade sequestradora de EROs	27

3.2.2 Atividade seqüestradora do radical superóxido.....	28
3.2.3 Atividade quelante de Fe^{2+}	28
3.3 AVALIAÇÕES EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS.....	29
3.3.1 Isolamento das mitocôndrias de fígado de rato.....	29
3.3.1.1 Determinação da concentração de Proteínas mitocôndriais.....	29
3.3.2 Interação com a membrana mitocondrial	30
3.3.3 Respiração mitocondrial.....	30
3.3.4 Potencial de membrana mitocondrial	31
3.3.5 Inchamento mitocondrial	32
3.3.6 Movimentação de Ca^{2+}	33
3.3.7 Produção de H_2O_2	33
3.3.8 Níveis mitocondriais de ATP	33
3.3.9 Lipoperoxidação de membrana.....	34
3.3.10 Liberação do citocromo c pelas mitocôndrias	35
3.3.10.1 Tampões, soluções e reagentes	36
3.3.10.1.1 Tampão de amostra 4x concentrado	36
3.3.10.1.2 Tampão de corrida Tris/Glicina	36
3.3.10.1.3 TBS-T (<i>Western-Blotting</i>)	36
3.3.10.1.4 Tampão de Transferência (<i>Western-Blotting</i>)..	37
3.3.10.2 Preparo das amostras para <i>Western-Blotting</i>	37
3.3.10.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	37
3.3.10.4 Análise por <i>Western-Blotting</i>	38
3.4 AVALIAÇÕES EM CÉLULAS HepG2.....	40
3.4.1 Cultura das células HepG2	40
3.4.2 Proliferação celular	41
3.4.3 Viabilidade Celular	41

3.4.4 Potencial de membrana mitocondrial	42
3.4.5 Condensação e Fragmentação nuclear	43
3.4.6 Medida da atividade da caspase 9 e 3 celulares.....	43
3.4.7 Determinação dos nucleotídeos de adenina	44
3.4.8 Exposição de fosfatidil serina na face externa da membrana celular (Anexina V).....	45
3.4.9 Determinação do acúmulo de H ₂ O ₂ em células HepG2	45
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4. RESULTADOS.....	47
4.1 INTERAÇÃO DOS FLAVONÓIDES COM A MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	48
4.2 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A RESPIRAÇÃO E O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	51
4.3 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL (TPM).....	55
4.4 EFEITO DOS FLAVONÓIDES SOBRE O EFLUXO MITOCONDRIAL DE Ca ²⁺	55
4.5 EFEITO DOS FLAVONÓIDES SOBRE OS NÍVEIS MITOCONDRIAIS DE ATP.....	58
4.6 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A LIBERAÇÃO DO CITOCROMO C PELAS MITOCÔNDRIAS	60
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FLAVONÓIDES EM SISTEMAS NÃO-MITOCONDRIAIS.....	61
4.8 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO DA MEMBRANA MITOCONDRIAL	61
4.9 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂	63
4.10 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	65
4.11 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	67
4.12 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM CÉLULAS HepG2	69

4.13 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A CAPACIDADE ENERGÉTICA MITOCONDRIAL.....	76
4.14 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDIL SERINA	78
4.15 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A ATIVIDADE DA CASPASE-3	79
4.16 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A ATIVIDADE DA CASPASE-9	80
4.17 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A CONDENSAÇÃO DA CROMATINA.....	81
4.18 EFEITOS DA CATEQUINA E TAXIFOLINA SOBRE A MORTE CELULAR INDUZIDA POR t-BOOH	83
4.19 EFEITOS DA CATEQUINA E TAXIFOLINA SOBRE O ACÚMULO DE EROs.....	84
4.20 EFEITOS DA CATEQUINA E TAXIFOLINA SOBRE A EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA INDUZIDA POR t-BOOH.....	85
5. DISCUSSÃO	86
5.1 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A ENERGÉTICA MITOCONDRIAL.....	87
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FLAVONÓIDES SOBRE AS MITOCÔNDRIAS	94
5.3 ATIVIDADE DOS FLAVONÓIDES SOBRE AS CÉLULAS HepG2	97
6. CONCLUSÕES	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXOS	135

*“Tentar e falhar é, pelo menos,
aprender. Não chegar a tentar é
sofrer a inestimável perda do que
poderia ter sido”.*

(Geraldo Eustáquio)

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

βME	β mercaptoetanol
$\Delta\Psi$	Potencial elétrico de membrana
Δp	Gradiente de prótons
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'- monofosfato
ANT	Translocador de nucleotídeos de adenina
ANS	1-anilino-8-naftaleno sulfonato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BPS	Ácido dissulfônico da batofenantrolina
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catequina
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
Citc	Citocromo c
CM-DCFDA	Carboximetil-diacetato de 2,7, diclorofluoresceína
CsA	Ciclosporina A
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleíco
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EGTA	Ácido etilenoglicol bis(β -aminoetil éter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtHD	Homodímero de etídio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
FADH₂	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FIA	Fator indutor de apoptose
GAL	Galangina
GSH	Glutathiona reduzida
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico
HPLC	High performance liquid chromatography

HVA	Ácido homovanílico
K Da	Kilo Dalton
LOO•	Radical lipoperoxil
LPO	Lipoperoxidação
LUT	Luteolina
MDA	Malondialdeído
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NBT	Nitro Blue tetrazolium
O₂•⁻	Ânion superóxido
•OH	Radical hidroxil
Pi	Fosfato inorgânico
PI-3 quinase	fosfatidilinositol 3-quinase
PM	Peso Molecular
pNA	p-nitroanilina
PTP	Poros de transição de permeabilidade
QUER	Quercetina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SUC	Succinato de potássio
TAX	Taxfolina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
t-BOOH	Tert-butil hidroperóxido
TMA-DPH	1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenilhexa-1,3,5 trieno
TMRM	Tetrametilrodamina metil éster
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
UQ	Ubiquinona
VDAC	Canal de ânions voltagem-dependente

*“Aprender é a única coisa de
que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se
arrepende”.*

(Leonardo da Vinci)

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estrutura química dos flavonóides estudados.....	3
FIGURA 2.	Estrutura clássica da mitocôndria.....	6
FIGURA 3.	Imagem obtida por tomografia eletrônica de mitocôndrias isoladas a partir de fígado de rato.....	7
FIGURA 4.	Esquema do funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial acoplada a síntese de ATP.....	9
FIGURA 5.	Proposta de estrutura do Poro de Transição de Permeabilidade (PTP).....	14
FIGURA 6.	Cascata de eventos apoptóticos.....	18
FIGURA 7.	Interação dos flavonóides com a membrana mitocondrial.....	49
FIGURA 8.	Efeito dos flavonóides sobre a fluidez de membrana mitocondrial.....	50
FIGURA 9.	Efeitos dos flavonóides (50 µmol/L) sobre as respirações de estado 3 e estado 4 em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	52
FIGURA 10.	Efeitos dos flavonóides (50 µmol/L) sobre o potencial de membrana das mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	53
FIGURA 11.	Curvas concentração-resposta para os efeitos da galangina sobre a velocidade da respiração de estado 4 e potencial de membrana, e da quercetina e luteolina sobre a velocidade da respiração de estado 3.....	54
FIGURA 12.	Curvas concentração-resposta para indução de inchamento mitocondrial pelos flavonóides em mitocôndrias isoladas do fígado de rato.....	56
FIGURA 13.	Efeitos da CsA (1 µmol/L) sobre a indução do inchamento das mitocôndrias pelos flavonóides (50 µmol/L).....	57
FIGURA 14.	Curvas concentração-resposta para indução da liberação pelos flavonóides do Ca^{2+} acumulado em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	58

FIGURA 15.	Efeito dos flavonóides sobre o nível de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	59
FIGURA 16.	Efeito dos flavonóides sobre a liberação do citocromo <i>c</i> pelas mitocôndrias.....	60
FIGURA 17.	Efeitos dos flavonóides sobre a redução do radical DPPH (A), sequestro do radical superóxido (B) e complexação do ferro (C).....	62
FIGURA 18.	Efeito dos flavonóides sobre a LPO em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	63
FIGURA 19.	Efeito dos flavonóides sobre a produção de H ₂ O ₂ induzida por <i>t</i> -BOOH 500 µmol/L em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	64
FIGURA 20.	Efeito dos flavonóides sobre a proliferação das células HepG2.....	66
FIGURA 21.	Efeito dos flavonóides sobre a viabilidade das células HepG2.....	68
FIGURA 22.	Efeito dos flavonóides sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2.....	70
FIGURA 23.	Efeito da Quercetina sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2.....	71
FIGURA 24.	Efeito da Catequina sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2.....	72
FIGURA 25.	Efeito da Luteolina sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2.....	73
FIGURA 26.	Efeito da Taxifolina sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2.....	74
FIGURA 27.	Efeito da Galangina sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2.....	75
FIGURA 28.	Efeito dos flavonóides sobre a capacidade energética das células HepG2.....	77
FIGURA 29.	Exposição de fosfatidil serina em células HepG2.....	78

FIGURA 30.	Efeito dos flavonóides sobre a ativação da caspase-3 em células HepG2.....	79
FIGURA 31.	Efeito dos flavonóides sobre a ativação da caspase-9 em células HepG2.....	80
FIGURA 32.	Efeito dos flavonóides sobre condensação e fragmentação nuclear das células HepG2.....	82
FIGURA 33.	Efeito da Catequina e Taxifolina 100 $\mu\text{mol/L}$ sobre a viabilidade das células HepG2.....	83
FIGURA 34.	Efeito da Catequina e Taxifolina 100 $\mu\text{mol/L}$ sobre a produção de H_2O_2 pelas células HepG2 expostas ao <i>t</i> -BOOH 100 $\mu\text{mol/L}$	84
FIGURA 35.	Efeito da Catequina e Taxifolina 100 $\mu\text{mol/L}$ sobre a exposição de fosfatidilserina em células HepG2 expostas ao <i>t</i> -BOOH 100 $\mu\text{mol/L}$	85

“A morte do homem começa no instante em que ele desiste de aprender”.

(Albino Teixeira)

RESUMO

RESUMO

DORTA, D.J. **Efeitos citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides: estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose.** 2007. 134 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Realizou-se um estudo estrutura-atividade sobre os efeitos citoprotetor/citotóxico de 5 flavonóides envolvendo processos mitocondriais, com ênfase na apoptose. Nossos resultados mostram que a dupla ligação na posição 2-3 / grupos 3-OH em conjugação com a função 4-oxo no anel C da estrutura dos flavonóides parece favorecer a interação destes compostos com a membrana mitocondrial, diminuindo a sua fluidez, e tanto inibindo a cadeia respiratória das mitocôndrias, quanto causando desacoplamento. Por outro lado, a estrutura o-di-OH no anel B parece favorecer a inibição da cadeia respiratória, sendo que a ausência desta estrutura parece favorecer a atividade desacopladora. Os flavonóides que não afetaram a respiração mitocondrial, induziram a transição de permeabilidade mitocondrial. A capacidade dos flavonóides em liberar o Ca^{2+} acumulado pelas mitocôndrias correlaciona-se com a sua capacidade de afetar a respiração mitocondrial e sua inabilidade em induzir a transição de permeabilidade mitocondrial. Já os dados referentes aos estudos da atividade protetora contra a formação de radicais livres demonstraram que a quercetina, luteolina e a galangina foram substancialmente mais potentes que a taxifolina e a catequina em conferir proteção contra a lipoperoxidação, embora somente a quercetina tenha sido

um efetivo seqüestrador tanto de DPPH[•], quanto de O₂^{•-}. Esses resultados sugerem que a dupla ligação na posição 2-3 em conjugação com a função 4-oxo na estrutura dos flavonóides são os fatores mais importantes na atividade antioxidante dos flavonóides sobre as mitocôndrias. Ainda, a presença da estrutura *o*-di-OH no anel B, conforme observado na quercetina, favorece essa atividade via seqüestro de O₂^{•-}, enquanto que a ausência dessa característica estrutural na galangina, a favorece via diminuição da fluidez de membrana e/ou desacoplamento mitocondrial. Os ensaios realizados para avaliar o efeito dos flavonóides sobre as células HepG2 mostraram que galangina, luteolina e quercetina são capazes de induzir morte celular. Esse efeito parece estar associado à dissipação do potencial de membrana mitocondrial e à diminuição na capacidade energética celular, mais pronunciada no caso dos dois primeiros; porém, como essa diminuição na concentração de ATP não é drástica, a morte celular pode ocorrer por apoptose. Os experimentos realizados para avaliar essa possibilidade sugerem uma ativação das caspases via mitocôndria, observada pelo aumento das atividades de caspase -9 e -3 e também pela exposição de fosfatidil serina. A taxifolina que não apresentou capacidade de produzir dano celular, apresentou, por outro lado, capacidade de prevenir parcialmente a diminuição de viabilidade das células HepG2 induzida pelo pró-oxidante *t*-butilhidroperóxido, aparentemente por meio de sua atividade antioxidante que inibiu, também de forma parcial, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: Flavonóides. Mitocôndria. Células HepG2. Apoptose. Necrose. Estudo estrutura-atividade

*“Every great advance in science
has issued from a new audacity... of
the imagination”*

(John Dewey)

ABSTRACT

ABSTRACT

DORTA, D.J. **Protective/toxic effects of flavonoids: structure-activity study involving mitochondrial mechanisms, with emphasis on apoptosis.** 2007. 134 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

We carried out a structure-activity study addressing the protective/toxic effects of 5 flavonoids (quercetin, taxifolin, luteolin, catechin and galangin) upon mitochondrial aspects with emphasis on the mechanisms potentially involved in cell apoptosis. The major findings were: The 2,3 double bond/3-OH group in conjugation with the 4-oxo function on the C-ring in the flavonoid structure seems favour the interaction of these compounds with the mitochondrial membrane, decreasing its fluidity either inhibiting the respiratory chain of mitochondria or causing uncoupling; while the o-di-OH on the B-ring seems favour the respiratory chain inhibition, the absence of this structure seems favour the uncoupling activity. The flavonoids not affecting the respiration of mitochondria induced MPT. The ability of flavonoids to induce the release of mitochondria-accumulated Ca^{2+} correlated well with their ability to affect mitochondrial respiration on the one hand, and their inability to induce MPT, on the other. The data concerning the protective activity against the free radical formation showed that quercetin, luteolin and galangin were far more potent than taxifolin and catechin in affording protection against lipid peroxidation, although only quercetin was an effective scavenger of both $\text{DPPH}^{\bullet}$ and $\text{O}_2^{\bullet-}$. These results suggest that the 2,3-double bound in

conjugation with the 4-oxo function in the flavonoid structure are major determinants of the antioxidant activity of flavonoids on mitochondria, the presence of an *o*-di-OH structure on the B-ring, as occurring in quercetin, favouring this activity *via* $O_2^{\bullet-}$ scavenging, while the absence of this structural feature in galangin, favouring it *via* decrease in membrane fluidity and/or mitochondrial uncoupling. The assays addressing the flavonoids effects on HepG2 cells showed that galangin, luteolin and quercetin are able to induce cell death. This effect appears to be linked to the mitochondrial membrane potential dissipation and consequent decrease in the cellular energy charge, more pronounced for the galangin or luteolin treatment. However, since this decrease in ATP content is not drastic, the apoptosis process can occur. The set of experiments performed in order to evaluate this possibility demonstrated caspases-9 and -3 activation and also phosphatidylserine exposure on the cell membrane. On the other hand, taxifolin, that did not present ability to induce injury to the cell, was able to partially inhibit a viability decrease of HepG2 cell exposed to the pro-oxidant *t*-butylhydroperoxide, probably on account of its capacity to partially decrease ROS formation.

Keywords: Flavonoids. Mitochondria. HepG2 cells. Apoptosis. Necrosis. Structure-activity study.

“Você não pode ensinar nada a um homem; você pode apenas ajudá-lo a encontrar a resposta dentro dele mesmo”.

(Galileu Galilei)

JORGE CHAM ©THE STANFORD DAILY

www.phdcomics.com

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são metabólitos secundários polifenólicos, biossintetizados a partir das vias do acetato e do chiquimato. Essa classe de compostos é amplamente distribuída na natureza, sendo que o número de estruturas identificadas já ultrapassa 4200, constituindo, assim, o grupo polifenólico mais diversificado entre os produtos de origem vegetal (ZUANAZZI, 1999). A maioria dos flavonóides possui 15 átomos de carbono no seu núcleo fundamental, formado por dois anéis benzeno (A e B) ligados por um anel heterocíclico pirano ou pirona, com uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 (C) (FIGURA 1). A grande diversidade de flavonóides é decorrente das variações estruturais devidas a diferentes níveis de oxidação, tais como flavonas, flavononas, flavonóis, diidroflavonóis, antocianidinas e isoflavonas (HAVSTEEN, 2002).

Nos vegetais, inúmeras funções têm sido atribuídas aos flavonóides, em particular, a atividade antioxidante (DI CARLO et al., 1999). Esta propriedade, evidenciada em diferentes sistemas experimentais, depende da estrutura e dos substituintes dos anéis heterocíclicos. A presença de uma estrutura *o*-di-OH no anel B, uma dupla ligação 2,3 em conjugação com uma função 4-oxo e a presença adicional de grupos 3-OH e 5-OH no anel heterocíclico, conforme observado na quercetina (FIGURA 1), são determinantes para a atividade antioxidante desses compostos (HODNICK et

al., 1988; BORS et al., 1990; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; VAN ACKER et al., 1996; PIETTA, 2000).

FIGURA 1. Estrutura química dos flavonóides estudados neste trabalho

Embora os flavonóides apresentem inúmeras propriedades farmacológicas, o seu uso terapêutico ainda é empírico por ser mais antigo que o desenvolvimento das análises farmacológicas modernas. Ainda assim, eles são empregados na proteção da integridade vascular e como agentes antiosteoporóticos e hepatoprotetores, destacando-se ainda seus efeitos

analgésico, estrogênico, imunoestimulante, antialérgico, antidiabético e antiinflamatório (DI CARLO et al., 1999; ZUANAZZI, 1999; COTELLE, 2001; REN et al., 2003; LABUDA et al., 2003).

Recentemente, tem-se procurado estabelecer uma correlação entre a ingestão de flavonóides e a incidência de diversas patologias tais como doenças coronarianas e câncer. Evidências epidemiológicas correlacionam elevado consumo de flavonóides com menor risco de desenvolvimento de câncer, em concordância com estudos *in vitro* evidenciando a capacidade de determinados flavonóides de inibir a carcinogênese (HAVSTEEN, 2002; REN et al., 2003; ARTS; HOLLMAN, 2005).

A inibição *in vitro* da proliferação celular e a indução de apoptose em diversas linhagens celulares pelos flavonóides são bem estabelecidas (HSU; KUO; LIN, 2004; YU; LI; LIU, 2004). Entretanto, os mecanismos responsáveis por tais efeitos ainda não são totalmente compreendidos. Sabe-se que a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) tem papel essencial na sinalização e regulação de um grande número de funções celulares, incluindo-se proliferação, diferenciação e apoptose (GAMET-PAYRASTRE et al., 1999; BONDAR et al., 2002). Por outro lado, dependendo de suas estruturas, os flavonóides podem inibir diversas quinases, tais como a proteína quinase C, tirosina quinase e a própria PI-3 quinase (GAMET-PAYRASTRE et al., 1999). AGULLO et al. (1997) demonstraram que a posição, número e substituição do grupamento hidroxil no anel B e a saturação da ligação entre os C2-C3 são fatores importantes para inibição da PI-3 quinase pelos flavonóides. Eles demonstraram ainda que existe uma similaridade nas necessidades estruturais para que os flavonóides exerçam uma potente inibição da PI-3

quinase e para que interajam com a mitocôndria, ou seja, a presença de 2 duplas-ligações no anel C e a ausência de substituição dos grupamentos hidroxil (AGULLO et al., 1997; GAMET-PAYRASTRE et al., 1999).

Apesar de todas as potencialidades dos flavonóides, deve-se considerar que a maioria dos estudos sobre suas propriedades tem avaliado a forma aglicona destes compostos. Entretanto, grande parte dos flavonóides presentes na dieta encontra-se na forma glicosilada, sendo que a extrapolação dos efeitos produzidos pela forma aglicona dos flavonóides para situações *in vivo* é pouco compreendida (WALLE, 2004). Outro fator a se considerar, é a pouca informação existente sobre a absorção e biodisponibilidade dos flavonóides em humanos, embora se assuma que esses compostos são geralmente absorvidos na sua forma aglicona após sofrerem hidrólise no trato digestivo. Os flavonóides são ainda extensivamente metabolizados, seja por conjugação ou por oxidação. No intestino, os flavonóides são substratos de diversas enzimas, passando por modificações que incluem metilação do anel B do grupo catecol e glucoronidação/sulfonação no anel A de suas estruturas (RICE-EVANS, 2004).

1.2 MITOCÔNDRIA

1.2.1 *Estrutura e fisiologia da mitocôndria*

As mitocôndrias, classicamente consideradas como a “casa de força celular”, estão presentes na maioria das células eucarióticas em quantidade

que varia em função do tipo celular e da demanda de energia do tecido em que se encontram.

O modelo clássico de estrutura da mitocôndria (FIGURA 2) a define como uma organela de forma oval, com cerca de 2 μm de comprimento e 0,5 μm de diâmetro (STRYER, 1996), formada por quatro zonas estruturais distintas: uma membrana interna rica em proteínas, uma membrana externa semipermeável, um espaço aquoso interno denominado matriz, e inúmeras invaginações (cristas mitocondriais) da membrana interna que se estendem para a matriz. Entretanto, esse modelo encontra-se desatualizado. Recentemente, imagens tridimensionais obtidas por meio de tomografia eletrônica (FIGURA 3), mostram que as cristas não constituem dobras com amplas aberturas para o espaço intermembranar, conforme descreve o modelo clássico, mas sim estruturas de diferentes formas, com regiões tubulares estreitas e longas que ligam os compartimentos internos (cristas) entre si e à periferia da membrana interna (FREY; MANNELLA, 2000; MANNELLA, 2001)

Figura 2. Estrutura clássica da mitocôndria (STRYER, 1996).

FIGURA 3. Imagem obtida por tomografia eletrônica de mitocôndrias isoladas a partir de fígado de rato. (Adaptado de FREY; MANNELLA, 2000).

Embora as mitocôndrias possam apresentar variabilidade morfológica, é possível definir uma morfologia básica. Elas possuem um sistema duplo de membranas – externa e interna – separadas pelo espaço intermembranar. A membrana externa é permeável à maior parte dos íons e moléculas pequenas ($PM < 1500Da$) e contém proteínas associadas que promovem a comunicação entre as mitocôndrias e a rede metabólica celular (LESNEFSKY et al., 2001).

A membrana interna é impermeável a quase todos os íons e moléculas polares e contém a porcentagem mais elevada de proteínas (cerca de 75%) dentre todas as membranas (NICHOLLS; FERGUSON, 1982), entre elas, proteínas que permitem o transporte de metabólitos selecionados. Esta permeabilidade mediada e regulada por proteínas é fundamental para a integridade morfológica e funcional das mitocôndrias. A membrana interna possui o sistema transportador de elétrons, o sistema de fosforilação e os

transportadores, delimitando um compartimento denominado matriz. Na matriz encontram-se inúmeras enzimas, entre elas as envolvidas no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e na β -oxidação de lipídios, além de múltiplas cópias do genoma mitocondrial (FREY; MANNELLA, 2000). A membrana interna, ao contrário da externa, não possui colesterol, contendo cardiolipina em abundância, que parece reduzir a permeabilidade da membrana a prótons e interagir com proteínas mitocondriais (DAUM, 1985; HOCH, 1992).

1.2.2 Mitocôndria: função energética

A mitocôndria é responsável pela síntese do ATP necessário às funções celulares. A FIGURA 4 ilustra o funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial acoplada à síntese de ATP: os equivalentes redutores removidos de substratos por desidrogenases ligadas a NAD^+ ou a FAD são transferidos para a cadeia respiratória e posteriormente ao O_2 molecular, reduzindo-o a H_2O . Os equivalentes redutores das desidrogenases ligadas a NAD^+ são transferidos inicialmente à NADH desidrogenase (complexo I), enquanto que a succinato desidrogenase (complexo II) recebe os equivalentes redutores do succinato. Ambos os complexos transferem os elétrons para a ubiquinona por meio de uma série de centros Fe-S, que por sua vez os transfere para a ubiquinona-citocromo c oxidorreductase (complexo III), e este para a citocromo oxidase (complexo IV) por meio do citocromo c, uma proteína solúvel associada à parte externa da membrana mitocondrial interna. Esse processo de transporte de elétrons implica na respiração mitocondrial, que pode ser basal (estados 2 e 4) ou acoplada à síntese de ATP (estado 3). O fluxo de elétrons resulta no bombeamento de prótons através da membrana

mitocondrial interna gerando o gradiente eletroquímico responsável pela fosforilação oxidativa, ou seja, a liberação do ATP formado dos sítios catalíticos da F_1F_0 -ATP sintase (MITCHELL, 1961; BOYER; CROSS; MOMSEN, 1973).

FIGURA 4. Esquema do funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial acoplada a síntese de ATP.

Quando a membrana mitocondrial torna-se permeável a H^+ , pela ação de desacopladores, por exemplo, ocorre dissipação do gradiente eletroquímico aumentando a velocidade de respiração basal. Por outro lado, inibidores da cadeia respiratória, como é o caso de rotenona (complexo I) e antimicina A (complexo III), inibem a respiração acoplada à síntese de ATP. Em ambas as situações ocorre comprometimento na capacidade mitocondrial de sintetizar ATP, que consiste na principal ação tóxica dessas substâncias (MITCHELL, 1961, NICHOLLS; CROMPTON, 1980).

Mitocôndria como fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs)

De forma contínua, e em particular na presença de inibidores da cadeia respiratória, uma pequena fração do O_2 disponível para a mitocôndria sofre redução incompleta gerando o radical superóxido, seja por meio da reação catalisada pela NADH desidrogenase ou do ciclo da ubiquinona (coenzima Q). Nestes, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é formado, respectivamente, no átomo central de ferro da NADH desidrogenase e pelo vazamento de elétrons do radical livre semiquinona para o oxigênio molecular. A geração de $O_2^{\bullet-}$ pela NADH desidrogenase é estimulada por substratos respiratórios que geram NADH, como o malato, glutamato e piruvato (TURRENS, 1997), além da inibição da enzima por substâncias como a rotenona (DA SILVA et al., 2003). Por outro lado, a antimicina A e o cianeto, inibidores do complexo III e IV da cadeia respiratória, respectivamente, estimulam o vazamento de elétrons na coenzima Q (TURRENS; ALEXANDRE; LEHNINGHER, 1985; KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 1995).

Uma diminuição do potencial da membrana mitocondrial interna associado ao aumento da taxa respiratória previne a liberação mitocondrial de EROs, enquanto que baixas taxas respiratórias aumentam as suas gerações (SKULACHEV, 1998; KORSHUNOV; SKULACHEV; STARKOV, 1997). Isto ocorre porque o maior fluxo de elétrons na cadeia respiratória diminui a probabilidade de redução monoeletrônica do oxigênio. A geração de EROs na mitocôndria pode ocorrer ainda por transporte reverso, quando a suspensão mitocondrial é energizada com succinato na ausência de inibidores de complexo I (LIU; FISKUM; SCHUBERT, 2002).

Entretanto, a mitocôndria possui um eficiente sistema de defesa antioxidante, que inclui superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione redutase, glutathione reduzida (GSH), NAD(P) transhidrogenase e NAD(P)H, além das vitaminas C e E. Em condições normais, a superóxido dismutase transforma o radical superóxido em H_2O_2 , um composto menos reativo, mais estável e difusível que o $O_2^{\bullet-}$. Este, por ser detectado com facilidade em suspensões de mitocôndrias (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999), tem sido freqüentemente utilizado como indicador de estresse oxidativo mitocondrial. O H_2O_2 é reduzido à água pela glutathione peroxidase às custas da glutathione reduzida, que por sua vez é regenerada pela glutathione redutase utilizando NAD(P)H (BOVERIS; OSHINO; CHANCE, 1972; St-PIERRE et al., 2002). Quando ocorre aumento na geração de superóxido ou deficiência nas defesas antioxidantes, H_2O_2 acumula-se, uma condição conhecida como estresse oxidativo que, na presença de Fe^{2+} , produz o radical hidroxil via reação de Fenton-Haber-Weiss. Este radical, contra o qual não existe qualquer sistema antioxidante enzimático, é capaz de induzir citotoxicidade por meio de danos oxidativos em macromoléculas celulares como proteínas e DNA, além de peroxidação dos lipídios de membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Movimentação de Ca^{2+} nas mitocôndrias

O íon cálcio é um importante segundo mensageiro em vários tipos celulares, levando à respostas intracelulares diversas, como por exemplo, a contração muscular, além da regulação do metabolismo mitocondrial, síntese

protéica, fosforilação e expressão de genes (CARAFOLI, 1987, ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003).

A concentração citosólica de cálcio na célula é mantida em níveis extremamente baixos, na ordem de 10^{-7} M, aproximadamente 10.000 vezes menor quando comparada com a concentração do cátion no líquido extracelular. Esse alto gradiente de cálcio entre os meios intra e extracelular é essencial para a sua função como carreador de sinais bioquímicos para o interior das células. Tal gradiente é mantido pela ação de bombas de cálcio encontradas na membrana plasmática e de organelas subcelulares, como o retículo endoplasmático e a mitocôndria.

O rompimento da homeostasia celular do Ca^{2+} tem sido freqüentemente associado à toxicidade decorrente de agentes químicos e de estados patológicos, sendo que a mitocôndria apresenta função relevante nesse contexto (ORRENIUS et al., 1989). A movimentação de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna ocorre por vias de influxo e efluxo. O influxo é mediado por um transportador eletroforético não específico, o *uniporter*, e impulsionado pelo potencial de membrana mitocondrial (GUNTER et al., 1994). O efluxo, por sua vez, é mediado tanto por vias de baixa capacidade, que compreendem as trocas eletroneutras $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ e $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^{+}$, quanto por vias de alta capacidade, entre elas a induzida por pró-oxidantes, o *uniporter* operando no sentido reverso, além do poro associado ao processo de transição de permeabilidade mitocondrial (GUNTER et al., 1994; BERNARDI; PETRONILLI, 1996). Tanto a reação direta quanto a reversa do *uniporter* de Ca^{2+} são inibidas por vermelho de rutênio (PFEIFFER et al., 1983).

Transição de permeabilidade mitocondrial (TPM)

Em 1976, HUNTER, HAWORTH e SOUTHARD descreveram modificações induzidas por cálcio em mitocôndrias isoladas, incluindo perda de função e aumento de volume das organelas. Três anos após, os mesmos autores demonstraram novos aspectos da relação do cálcio com as mitocôndrias isoladas, entre eles a de que a liberação transiente de cálcio está relacionada com alterações na fisiologia mitocondrial (HUNTER; HAWORTH, 1979). Esse processo constitui a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM).

A TPM consiste na permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna, a qual é mediada pela abertura de poros de natureza protéica (poros de transição de permeabilidade - PTP) e caracterizada pela inibição por ciclosporina A (CsA), um imunossupressor. Esse processo ocorre quando mitocôndrias isoladas são incubadas com Ca^{2+} na presença ou não de uma variedade de compostos ou condições (CROMPTON; ELLINGER; COSTI, 1988; ZORATTI; SZABÒ, 1995; BERNARDI, 1999; KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001; HALLESTRAP; MCSTAY; CLARKE, 2002; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ; HE; LEMASTERS, 2004).

A concentração limite de cálcio para a abertura do PTP parece variar de acordo com o tipo de mitocôndria e a presença conjunta de outros fatores, denominados indutores, tais como o fosfato, o pró-oxidante *t*-butil hidroperóxido e agentes que favoreçam a ligação cruzada entre grupos sulfidril de proteínas (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 1996).

A abertura do PTP também ocorre em condições de estresse oxidativo, com a exaustão do sistema de defesa antioxidante (GSH e NADPH), além de

ser aparentemente regulada pelo potencial de membrana mitocondrial (BERNARDI, 1992; PETRONILLI et al., 1993; HALESTRAP; WOODFIELD; CONNERN, 1997). O limiar para abertura do poro seria levado a valores mais altos de $\Delta\psi$ pela oxidação de grupamentos tióis, resultando na maior probabilidade da abertura em níveis fisiológicos de potencial de membrana. (PETRONILLI et al., 1994).

Embora ainda não exista um consenso em relação à constituição exata do PTP, duas linhas principais de evidência têm levado a postulação de diferentes estruturas: (i) um complexo formado pela associação do canal de ânion voltagem dependente (VDAC) (SZABO; ZORATTI, 1993; SZABO; DE PINTO; ZORATTI, 1993), pelo translocador de nucleótidos de adenina (ANT) da membrana mitocondrial interna (de MACEDO; NEPOMUCENO; PEREIRA-DA-SILVA, 1993; BRUSTOVETSKY; KLINGENBERG, 1996) e a ciclofilina D da matriz (HALESTRAP; DAVIDSON, 1990; CONNERN; HALESTRAP, 1994) (FIGURA 5); ou (ii) um aglomerado de proteínas não-específicas da membrana mitocondrial interna, enoveladas de forma errônea (KIM; HE; LEMASTERS, 2003).

FIGURA 5. Proposta de estrutura do Poro de Transição de Permeabilidade (PTP).
(adaptado de http://www.mitosciences.com/apoptotic_proteins.html)

Independentemente da constituição do PTP, sabe-se que um fator crítico para a ocorrência de TPM é a oxidação de grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial interna, que levariam à formação de ligações cruzadas entre eles (COSTANTINI et al., 1996; HALESTRAP; WOODFIELD; CONNERN, 1997; KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001).

A TPM apresenta diferentes efeitos sobre a mitocôndria, entre eles: difusão de solutos com peso molecular inferior a 1,5KDa pela membrana, dissipação do potencial de membrana, desacoplamento, intumescimento osmótico e depleção do ATP celular.

1.3 MORTE CELULAR POR NECROSE E APOPTOSE

Alguns processos mitocondriais, com ênfase na transição de permeabilidade mitocondrial, têm sido freqüentemente associados à morte

celular tanto por necrose quanto por apoptose (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHE-RIGON, 1998; SKULACHEV, 2000). A necrose é caracterizada por alterações metabólicas que causam depleção do ATP, quebra do equilíbrio iônico, intumescimento mitocondrial e celular, além de ativação de enzimas degradativas, resultando em ruptura da membrana plasmática, perda de proteínas, metabólitos e íons intracelulares. A apoptose, por outro lado, é caracterizada por ativação de endonucleases e caspases, fragmentação do DNA nucleossomal, rompimento da membrana nuclear, condensação nuclear, formação de “blebs” na membrana plasmática, reorganização do citoesqueleto e formação de corpos apoptóticos (EGUCHI; SHIMIZU; TSUJIMOTO, 1997).

Mitocôndria e morte celular por necrose e apoptose

Inúmeras evidências indicam que a mitocôndria, em particular a TPM, apresenta importante implicação nas vias intrínsecas que sinalizam a morte celular por necrose e apoptose. Proteínas moduladoras da apoptose compartmentadas na mitocôndria, como o citocromo *c* integrante da cadeia respiratória, o fator indutor de apoptose (FIA) e o Smac/DIABLO são liberadas da organela para o citosol em resposta a diferentes estímulos apoptóticos. Uma vez no citosol, o citocromo *c* liga-se a Apaf-1 aumentando sua afinidade por ATP/dATP. A ligação desses nucleotídeos ao complexo citocromo *c*/Apaf-1 promove sua oligomerização formando o apoptossoma, o qual recruta moléculas de pró-caspase-9, promovendo sua auto-clivagem em caspase-9. Somente as moléculas de caspase-9 que estão ligadas ao

apoptosoma são capazes de clivar e ativar caspases efetoras, como caspase-3, tornando-as hábeis em clivar macromoléculas celulares desencadeando a apoptose, conforme ilustrado na FIGURA 6 (ZOU et al., 1999; HENGARTNER, 2000; WANG, 2001; KROEMER, 2003, ASHE; BERRY, 2003).

Embora por via distinta, a Smac/DIABLO também atua ativando a caspase-3. O efeito do FIA, entretanto, parece ser independente da ativação de caspases efetoras: uma vez liberado no citosol, ele é conduzido ao núcleo, onde promove fragmentação parcial do DNA e condensação da cromatina. Entre os mecanismos que promovem a liberação dessas proteínas da mitocôndria, inclui-se a transição de permeabilidade mitocondrial.

A morte celular pode ser prevenida por membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, os quais são capazes de prevenir a liberação de citocromo c por interação com membros pró-apoptóticos da mesma família. Duas subfamílias de proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas foram identificadas: Bax (Bax, Bok e Bak) e BH3 (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa e PUMA) (ZOU et al., 1999; HENGARTNER, 2000; WANG, 2001; KROEMER, 2003, ASHE; BERRY, 2003).

Membros pró-apoptóticos da subfamília Bax oligomerizam-se na membrana mitocondrial externa formando canais pelos quais as proteínas moduladoras da apoptose são liberadas, sendo que Bcl-2 pode prevenir a sua oligomerização (WOLTER et al., 1997; GROSS et al., 1999). As vias descritas acima podem ainda sofrer regulação pelo gene supressor de tumores, p53, capaz de promover apoptose via ativação direta da Bax (ZOU

et al., 1999; HENGARTNER, 2000; WANG, 2001; KROEMER, 2003, ASHE; BERRY, 2003).

Evidências experimentais indicam que o efeito protetor da proteína Bcl-2 pode estar relacionado a uma ação antioxidante contra a formação de EROs impedindo a indução de morte celular (HOCKENBERRY et al., 1993). A Bcl-2, no entanto, aparenta possuir ainda efeitos não diretamente ligados a apoptose, porém estes continuam pouco entendidos. Como exemplo, a hiperexpressão de Bcl-2 promove um aumento do poder redutor mitocondrial, levando, inclusive, à resistência da célula à TPM (KOWALTOWSKI; VERCESI; FISKUM, 2000).

O processo de apoptose requer a presença de ATP. Assim, o efeito da TPM sobre a concentração de ATP pode ser determinante na iniciação do processo de morte celular por necrose ou apoptose. Nos casos onde a TPM acontece de forma brusca, levando a depleção substancial do ATP, instala-se o processo de necrose; porém se os níveis de ATP se mantiverem devido à instalação gradativa da TPM ou pela existência de outras fontes de ATP, a sinalização da via apoptótica é iniciada (LEMASTERS, 1999)

FIGURA 6. Cascata de eventos apoptóticos

Prevenção/indução da apoptose e estados patológicos

A apoptose é crítica em inúmeras situações fisiológicas e estados patológicos. Apoptose em excesso, ou não apropriada, tem sido implicada em imunodeficiências tal como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), além das doenças de Alzheimer e Parkinson, entre outras. Por outro lado, a deficiência da célula em sofrer apoptose pode contribuir para a carcinogênese, desencadeando a iniciação do tumor, além de sua progressão e metástase. Dessa forma, diferentes agentes anticâncer podem

atuar sobre as células tumorais por ativação de vias apoptóticas comuns (LOWE; LIN, 2000; LOS et al., 2003). Portanto, a apoptose é um alvo potencial de novas estratégias anticâncer, assim como a mitocôndria, e em particular a TPM quando associada a este processo de morte celular.

1.4 UTILIZAÇÃO DE SISTEMA CELULAR NOS ESTUDOS DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE

As células permanentes ou imortalizadas são amplamente utilizadas nos estudos de toxicidade devido a sua capacidade de bioativação endógena. Grande parte dessas linhagens celulares é de origem hepática por ser o fígado o órgão mais importante envolvido no metabolismo de drogas em mamíferos. Como a capacidade de ativação e especificidade de substrato das enzimas metabolizadoras apresentam grande variação interespecies, as linhagens provenientes de humanos mostram-se vantajosas para a detecção e avaliação do risco de substâncias que apresentam potencial tóxico (KNASMULLER et al., 1998).

As células HepG2 foram isoladas em 1979 a partir de um hepatoblastoma primário de um garoto argentino de 11 anos. Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado humano (KNASMULLER et al., 1998). Elas mantêm as atividades de várias enzimas de fase I e II, as quais desempenham papel crucial na ativação/destoxificação de pró-carcinogênicos, além de refletirem o metabolismo de

tais compostos *in vivo* melhor do que modelos com células metabolicamente inativas (KNASMULLER et al., 1998; DEHN et al., 2004). São ainda consideradas excelentes modelos para investigação de toxicidade mitocondrial, devido à presença de grande quantidade de mitocôndrias, o que as tornam facilmente detectáveis por microscopia confocal ou de fluorescência, além de citometria de fluxo. Além disso, as células HepG2 crescem aderentes ao plástico, não sendo afetadas pela troca do meio de cultura, o que representa expressiva vantagem para estudos a longo prazo (PINTI et al., 2003).

1.5 ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E PRÓ-OXIDANTE DOS FLAVONÓIDES

A capacidade doadora de elétrons dos grupos hidroxil na estrutura dos flavonóides determina a atividade antioxidante desses compostos em diferentes sistemas, seja como seqüestradores de radicais superóxido, hidroxil ou ainda lipoperoxil. Essa capacidade é também influenciada pela atividade quelante de metais de transição e pela capacidade de inserção no interior das membranas biológicas. O radical aroxil resultante reage com um segundo radical adquirindo uma estrutura quinona estável (ARORA; NAIR; STRASBURG, 1998; VAN ACKER et al., 1998; SILVA et al., 2002; MIRA et al., 2002; MORIDANI et al., 2003). A interação dos flavonóides com a cadeia respiratória/fosforilação oxidativa, é particularmente importante em relação à mitocôndria, pois pode promover a auto-oxidação dos mesmos com conseqüente redução do O₂ ou ferro das proteínas carreadoras de elétrons.

O produto oxidado resultante seria capaz de remover equivalentes redutores da cadeia respiratória (HODNICK et al, 1988; UEDA et al., 2001). Neste contexto, a atividade pró-oxidante dos flavonóides sobre diferentes sistemas biológicos, incluindo a mitocôndria, tem sido objeto de recentes investigações (HEIJNEN et al., 2002; CHAN et al., 2003).

A mitocôndria é uma importante fonte de EROs, e como tal, um importante alvo tanto de agentes que estimulam a geração/acúmulo de EROs, quanto de agentes que protegem contra os mesmos, como é o caso dos flavonóides, que, conforme mencionado acima, podem apresentar atividade tanto antioxidante quanto pró-oxidante. Enquanto as características estruturais que determinam a atividade antioxidante dos flavonóides são bem estabelecidas pelos critérios de Bors (BORS et al., 1990), as características estruturais que determinam a atividade pró-oxidante destes compostos, ainda não são tão evidentes.

Conforme já mencionado, a mitocôndria, em particular a TPM, tem sido intensamente associada à morte celular por apoptose, que seria mediada pela liberação para o citosol de proteínas moduladoras compartmentadas na organela (KROEMER, 2003). A apoptose, por sua vez, é importante alvo no tratamento do câncer, uma vez que o desencadeamento e progressão de tumores, além da metástase, parecem ser decorrentes de alterações na habilidade intrínseca da célula em sofrer o processo, e que diferentes fármacos anticâncer parecem atuar por ativação de vias apoptóticas comuns (LOS et al., 2003). Em estudos prévios demonstramos que uma série de flavonóides protege contra a TPM (SANTOS et al., 1998), apresentando assim potencial uso na prevenção da apoptose, em concordância com relato

mais recente demonstrando que o flavonóide quercetina protege contra apoptose induzido por H_2O_2 , via modulação da disfunção mitocondrial (PARK et al., 2003). Por outro lado, outros estudos têm demonstrado que alguns flavonóides, ao invés de inibir podem promover apoptose via mitocôndria, atuando como pró-oxidantes/indutores da TPM (YOON et al., 2000, UEDA et al., 2001), ou simplesmente como pró-oxidantes após ativação metabólica (METODIEWA et al., 1999). (Para revisão sobre a atividade dos flavonóides sobre a mitocôndria, ver DORTA et al, 2006 – ANEXO I).

1.6 PROPOSTA

O presente trabalho foi motivado por essa aparente divergência, além de fatores tais como o atual interesse tanto em relação à mitocôndria, quanto aos flavonóides no que se refere à morte celular por apoptose (WANG, 2001; YOON et al., 2000), à relação da apoptose com o câncer (LOS et al., 2003), além do já estabelecido potencial antioxidante destes compostos contra diversas patologias (MIDDLETON; KANDAWAMI; THEOHARIDES, 2000; HAVSTEEN, 2002). Propusemos assim a realização de um estudo estrutural-atividade sobre os efeitos citoprotetor/citotóxico de 5 flavonóides envolvendo processos mitocondriais, selecionados em função de estudos prévios do nosso laboratório com 10 flavonóides levando-se em consideração a presença de grupamentos determinantes da atividade antioxidante dos mesmos (BORS et al., 1990), ou seja, a estrutura *o*-di-OH no anel B, a dupla ligação 2,3, a função 4-oxo, e o grupo 3-OH no anel heterocíclico.

"I never see what has been done... I only see what remains to be done."

(Marie Curie)

www.phdcomics.com

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Foi objetivo deste estudo estabelecer o potencial farmacológico dos flavonóides quanto à indução/prevenção da apoptose e os requisitos estruturais associados às atividades pró-oxidante e anti-oxidante sobre as mitocôndrias, com ênfase na indução/prevenção da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) e processos associados.

ESTUDOS REALIZADOS

Visando atingir esse objetivo, avaliou-se os efeitos dos flavonóides quercetina, catequina, taxifolina, galangina e luteolina, com relação a:

1. Interação com a membrana mitocondrial.
2. Respiração mitocondrial nos estados 3 e 4, potencial de membrana mitocondrial, transição de permeabilidade mitocondrial, liberação de Ca^{2+} e níveis mitocondriais de ATP.
3. Atividade seqüestradora de radicais livres em geral, do radical superóxido especificamente, além da atividade quelante de Fe^{2+} , todos em sistemas não mitocondriais; proteção contra lipoperoxidação da membrana mitocondrial induzida por Fe^{2+} /citrato e proteção quanto à formação de peróxido de hidrogênio.
4. Caracterização de necrose e/ou apoptose em células HepG2 e potenciais mecanismos envolvidos.

“Se não procurares senão a recompensa, o trabalho vai parecer-te penoso: mas, se apreciares o trabalho por si mesmo, nele próprio terás a tua recompensa.”

(Leon Tolstoi)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, por estarem de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº 05.1.1208.53.1, ANEXO II)

3.1 CONDIÇÕES PADRÃO DE INCUBAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS

O meio de incubação padrão para os ensaios foi sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4, a 30°C.

3.2 AVALIAÇÕES EM SISTEMAS LIVRES DE MITOCÔNDRIAS/CÉLULAS

3.2.1 Atividade seqüestradora de EROs

A atividade seqüestradora de EROs, em geral, foi avaliada pela redução do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (100 µmol/L), monitorada pela alteração da absorvância a 517 nm em um espectrofotômetro Hitachi U-3000, 5 minutos após incubação dos flavonóides em acetato de sódio 40 mmol/L, pH 5,5 e 1 mL de etanol (volume final 2,5 mL) (BLOIS, 1958). O DPPH é um radical livre estável potencialmente reativo com compostos capazes de doar um átomo de hidrogênio.

3.2.2 Atividade seqüestradora do radical superóxido

A atividade seqüestradora do radical superóxido, especificamente, foi avaliada pela redução do *nitro blue tetrazolium* (NBT), utilizando-se como fonte de superóxido o sistema xantina/xantina oxidase (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988). A reação foi monitorada espectrofotometricamente a 560 nm.

3.2.3 Atividade quelante de Fe^{2+}

A atividade quelante de Fe^{2+} foi avaliada por meio de ensaio competitivo, utilizando-se o ácido dissulfônico da batofenatrolina (BPS) como indicador. Ao meio padrão foi adicionado $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ 50 μ mol/L e 10 μ mol/L dos flavonóides (volume final 2,0 mL). Após a adição de BPS 0,2 mmol/L, a absorvância foi monitorada a 530 nm, com correção a 700 nm (BOLANM; ULUIK, 1987). O ácido dissulfônico da batofenantrolina (BPS) é uma substância com alta afinidade por ferro(II), utilizado como indicador por formar um complexo de cor avermelhada, $FeII(BPS)_3$, de intensidade proporcional à quantidade do íon livre existente no meio.

3.3 AVALIAÇÕES EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

3.3.1 *Isolamento das mitocôndrias de fígado de rato*

As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial. Ratos Wistar machos de ~200 g foram eutanasiados por deslocamento cervical; o fígado (10-15 g) foi imediatamente removido, picotado em 50 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 1 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, a 4°C, e homogeneizado três vezes por 15 segundos com intervalos de 1 minuto em homogenizador Potter-Elvehjen. A suspensão foi centrifugada a 770 g por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 9.800 g por 10 minutos. O sedimento 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 4.500 g por 15 minutos. O sedimento mitocondrial final foi suspenso com 1 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, e utilizado dentro de um período de 3 horas (PEDERSEN et al., 1978).

3.3.1.1 *Determinação da concentração de proteínas mitocondriais*

A concentração da proteína mitocondrial foi determinada pela reação de biureto (CAIN; SKILLETER, 1987). Uma alíquota de 10 µL da amostra foi misturada a 100 µL de uma solução de ácido deoxicólico 5% (m/v) e água q.s.p. 1,5 mL. A essa mistura foi adicionado 1,5 mL do reagente de Biureto,

composto por sulfato cúprico 0,15% (m/v), tartarato de sódio e potássio 0,6% (m/v), e NaOH 0,75 mol/L. Após 30 minutos, a absorvância foi determinada a 540 nm contra um branco de reagentes e a concentração foi determinada a partir de uma curva de calibração preparada nas mesmas condições da amostra e usando BSA como padrão (CAIN; SKILLETER, 1987).

3.3.2 Interação com a membrana mitocondrial

A inserção do 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenilhexa-1,3,5-trieno (TMA-DPH) nas membranas causa uma alteração de fluorescência (F) cujo *quenching* estático pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer: $F^0/F = 1 + K_{SV} [Q]$, onde F^0 e F são intensidades de fluorescência na ausência e na presença do *quencher*, respectivamente, e K_{SV} , a constante de Stern-Volmer. As mitocôndrias (0,4 mg de proteína) foram incubadas a 30°C com TMA-DPH 0,56 $\mu\text{mol/L}$ no meio de incubação padrão, previamente à adição dos flavonóides, em um volume final de 2 mL. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 362 e 432 nm, respectivamente. A fluidez de membrana foi estimada pela polarização da fluorescência (P) do TMA-DPH, sobre as mesmas condições experimentais descritas acima (LEE; YU; HERLIHY, 1999).

3.3.3 Respiração mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas foi monitorado polarograficamente usando um oxígrafo equipado com um eletrodo tipo Clark

(Gilson Medical Eletronics, USA) (CHANCE; WILLIAMS, 1956). As mitocôndrias (1,5 mg de proteína) foram incubadas em 1,5 mL do meio padrão. A respiração de estado 3 foi iniciada com 400 nmoles de ADP.

O eletrodo de Clark é constituído por um cátodo de platina acoplado a dois ânodos de prata por meio de uma ponte de KCl saturada, e cobertos por uma membrana de teflon. Quando polarizado com 0,8 V o oxigênio dissolvido no meio de incubação é reduzido no cátodo de platina a íons OH⁻, de acordo com as equações (1) e (2):

O circuito se completa pela reação seguinte, que ocorre no ânodo de prata:

Assim, o fluxo de elétrons do ânodo de prata para o cátodo de platina produz uma corrente elétrica diretamente proporcional à quantidade de oxigênio presente no meio, que se difunde através da membrana de teflon, sendo amplificada e registrada por meio de um potenciômetro (CAIN; SKILLETER, 1987).

3.3.4 Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado espectrofluorimetricamente monitorando-se as alterações na fluorescência da safranina-O, um corante catiônico fluorescente, que se distribui

eletroforeticamente na matriz em resposta a carga negativa da membrana mitocondrial interna (LEMASTERS et al., 1987), usando-se como comprimentos de onda de excitação 495 nm e de emissão 586 nm. As mitocôndrias (2,0 mg de proteína) foram incubadas no meio padrão acrescido de safranina-O 10 $\mu\text{mol/L}$, em um volume final de 2 mL e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L (+ rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$). A diminuição do potencial de membrana observada pelo influxo eletrogênico do cátion, determinado pela equação de Nernst ($\Delta\psi = 59 \log [K^+]_{\text{in}}/[K^+]_{\text{ext}}$, onde $[K^+]_{\text{in}} = 120 \text{ mmol}$), correlaciona-se linearmente com o aumento da intensidade de fluorescência do corante à medida em que ele é liberado das mitocôndrias (ÅKERMAN; WIKSTRÖM, 1976; EMAUS; GRUNWALD; LEMASTERS, 1986).

3.3.5 Inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi monitorado pela diminuição da absorvância aparente da suspensão de mitocôndrias (0,4 mg proteína/mL), incubadas em 1,5 mL do meio padrão, a 540 nm, usando-se um espectrofotômetro Beckman DU-70 (Fullerton, CA, USA).

A suspensão mitocondrial apresenta turbidez, a qual pode ser monitorada por meio de medida da absorvância aparente. O inchamento mitocondrial é acompanhado de diminuição na turbidez da suspensão e, portanto, de diminuição proporcional na absorvância aparente.

3.3.6 Movimentação de Ca^{2+}

A movimentação de Ca^{2+} (10 μmol) foi monitorada pelas variações na absorvância do corante arsenazo III, entre 685 e 675 nm, utilizando-se 2 mg de proteína mitocondrial em um volume final do meio padrão de 2 mL (SCARPA, 1979). O arsenazo III é um agente indicador quelante de Ca^{2+} com estequiometria de 1:1. Ao adicionar cálcio à suspensão mitocondrial contendo arsenazo III, forma-se um complexo Ca^{2+} -arsenazo. À medida que o cálcio é captado pela mitocôndria o indicador é liberado, modificando a coloração do meio

3.3.7 Produção de H_2O_2

A concentração de H_2O_2 foi determinada no meio padrão de incubação pela reação do ácido homovanílico (HVA) 0,1 mmol/L, na presença de peroxidase 12 U/mL, utilizando-se 2 mg de proteína mitocondrial em um volume final de 2 mL do meio padrão (BARJA, 2002). A oxidação enzimática do HVA pelo H_2O_2 na presença da peroxidase de raiz forte forma um dímero fluorescente quantificado em um espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 362 e 432 nm, respectivamente.

3.3.8 Níveis mitocondriais de ATP

O ATP mitocondrial foi determinado por quimioluminescência, utilizando-se o sistema luciferina-luciferase. A suspensão mitocondrial

(1 mg/mL) foi centrifugada a 9.000 *g* por 5 minutos, a 4°C, e o sedimento contendo as mitocôndrias foi tratado com 1 mL de HClO₄. Após centrifugação a 14000 *g* por 5 minutos, a 4°C, alíquotas (100 µL) do sobrenadante foram retiradas, neutralizadas com 70 µL de KOH 2 mol/L, acrescidas de Tris-HCl 100 mmol/L, pH 7,8 (volume final 1 mL), e novamente centrifugadas. A luminescência do sobrenadante foi medida, utilizando-se o “kit” da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) e empregando o luminômetro AutoLumat LB953 Luminescence photometer (Perkin Elmer Life Sciences, Wildbad, Germany).

O ATP presente na amostra é consumido durante a oxidação da luciferina, catalisada pela enzima luciferase com emissão de luz, conforme a reação (4):

Quando as concentrações de luciferina, luciferase e oxigênio são mantidas constantes e o ATP é o reagente limitante, a quantidade de luz emitida é proporcional ao ATP presente no meio (THORE, 1979).

3.3.9 Lipoperoxidação de membrana

A suspensão mitocondrial (1 mg/mL) foi incubada com 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (m/v) (preparado em NaOH 50 mmol/L), 0,1 mL de NaOH 10 mol/L e 0,5 mL de ácido fosfórico 20% (m/v), durante 20 minutos, a 85°C. O complexo malondialdeído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) foi extraído

com 2 mL de n-butanol e a absorvância determinada a 535 nm. A concentração de MDA, expressa como nmoles/mg de proteína, foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar do MDA ($\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (BUEGE; AUST, 1978).

Os ácidos graxos poliinsaturados, componentes dos lipídeos que constituem as membranas biológicas, possuem em sua estrutura grupos metilênicos ($\text{R-CH}_2\text{-R}$) adjacentes às duplas ligações. Algumas espécies de radicais são suficientemente reativas para abstrair um átomo de hidrogênio destes grupos, formando assim um radical centrado no carbono, que por ser muito instável, sofre uma reorganização conformacional dando origem a dienos conjugados, iniciando o processo de lipoperoxidação. Na presença de oxigênio a reação se propaga formando o radical peroxil, podendo ainda formar um endoperóxido cíclico, que por meio de hidrólise ou aquecimento fragmenta-se em aldeídos de baixo peso molecular, principalmente o malondialdeído. Esses aldeídos, ao reagirem com o TBA dão origem a um complexo colorido, determinado em 535 nm (BUEGE; AUST, 1978; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

3.3.10 Liberação do citocromo c pelas mitocôndrias

O citocromo c liberado pelas mitocôndrias foram avaliados por meio de *Western-Blotting* (imunoensaio), conforme descrito a seguir.

3.3.10.1 Tampões, soluções e reagentes

3.3.10.1.1 Tampão de amostra 4x concentrado

TRIS-HCl 1 mol/L pH6,8.....	240mmol/L
Glicerol.....	40% (v/v)
SDS.....	8% (p/v)
β ME.....	0,02%
Azul de Bromofenol.....	0,1% (p/v)

3.3.10.1.2 Tampão de corrida Tris/Glicina

TRIS-HCl pH8,3.....	25mM
Glicina.....	250mM
SDS.....	0,1% (p/v)

3.3.10.1.3 TBS-T (*Western-Blotting*)

TRIS-HCl 1 mol/L pH7,6.....	20mL
NaCl.....	8g
Tween 20	2mL
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1000mL

3.3.10.1.4 Tampão de Transferência (*Western-Blotting*)

TRIS-HCl 1 mol/L pH7,6.....	25mM
Glicina.....	192mM
Metanol.....	20% (v/v)
SDS.....	0,05% (p/v)
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1000mL

3.3.10.2 Preparo das amostras para *Western-Blotting*

As amostras foram preparadas utilizando-se as mitocôndrias obtidas de acordo com o descrito no item 3.3.1. Os precipitados foram ressuspensos em 100 µL do tampão de lise, dos quais foram retirados 20 µL e misturados com 5 µL de tampão de amostra 4x concentrado. Essas misturas de sobrenadante e precipitados foram fervidos por 5 minutos e submetidas a eletroforese (SDS-PAGE).

3.3.10.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras de proteínas foram analisadas por SDS-PAGE, aplicando-se no gel 50 µg de proteína. O gel de poliacrilamida–SDS foi produzido de acordo com LAEMMLI (1970). O gel de separação apresentando 10% de acrilamida e o gel de empilhamento 5% de acrilamida foram preparados de acordo com protocolo descrito a seguir:

Soluções	Gel de empilhamento (5%)	Gel de corrida (10%)
Acrilamida 30,0% / bis-acrilamida 0,8%.....	340 µL	3,2 mL
Tampão TRIS – HCl 1,5 mol/L pH 8,8.....	---	3,0 mL
Tampão TRIS – HCl 0,5 mol/L pH 6,8.....	500 µL	---
H ₂ O deionizada.....	1,1 mL	1,56 mL
SDS 10%	40 µL	160 µL
TEMED 10%.....	10 µL	40 µL
Persulfato de amônio 10%.....	10 µL	40 µL

A eletroforese foi desenvolvida sob corrente constante de 10 mA, utilizando-se o tampão de corrida TRIS–glicina. Como padrão de massa molecular foi utilizado o “Rainbow Molecular Weight Markers” da Amersham Biosciences cujas bandas e respectivas massas moleculares estão descritas abaixo:

PROTEÍNA	Massa Molecular (Daltons)
Ovoalbumina.....	45.000
Anidrase Carbônica.....	30.000
Inibidor de Tripsina.....	20.100
Lisozima.....	14.300
Aprotinina.....	6.500
Insulina – cadeia b.....	3.500
Insulina – cadeia a.....	2.500

3.3.10.4 Análise por Western-Blotting

As proteínas resolvidas eletroforeticamente foram transferidas para membrana de nitrocelulose de acordo com TOWBIN, STAEHELIN e

GORDON (1979), por meio de um sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad). A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada montando-se o gel de SDS-PAGE e a membrana em um sistema “sanduíche” entre filtros protetores. Este sistema foi colocado em uma cuba eletroforética contendo tampão de transferência a 4°C, posicionada sobre um agitador magnético para homogeneização do tampão e aplicada uma corrente de 350 mA por 60 minutos.

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose contendo as proteínas aderidas foram incubadas com tampão TBS-T contendo 5% de leite desnatado por 12 horas, a 4°C. As membranas foram lavadas rapidamente com tampão TBS-T e incubadas com o anticorpo primário (monoclonal de camundongo) anti- citocromo C (BD Pharmingen), na diluição de 1:2.000, por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após este período, as membranas foram lavadas rapidamente por duas vezes, seguidas de uma lavagem de 15 minutos e três de 5 minutos com o mesmo tampão, a uma razão de 4 mL por cm² de membrana.

O anticorpo secundário marcado com peroxidase de raiz forte (anti-anticorpo de camundongo), na diluição de 1:2.000, foi incubado com a membrana por 1 hora a 25°C, sob agitação constante, e um novo processo de lavagem foi realizado, como descrito anteriormente. Após as lavagens, volumes iguais das soluções de revelação contidas no Kit “*ECL Western-Blotting detection reagents and analysis system*” (Amersham Biosciences) foram misturadas, de forma a que o volume final mantivesse uma razão de 0,123 mL/cm² de membrana. A membrana foi incubada com esta mistura por 60 segundos e o excesso de solução foi seco em papel absorvente. A

membrana foi envolvida por papel filme e conduzida a um cassete de autoradiografia para exposição. A marcação do anticorpo primário foi visualizada em filme fotográfico.

3.4 AVALIAÇÕES EM CÉLULAS HepG2

3.4.1 *Cultura das células HepG2*

As células HepG2 (American Type Culture Collection, N^o HB 8065) foram mantidas em meio “Minimum Essential Medium” (GIBCO) (com L-glutamina 2 mM e sais de Earle ajustado para conter 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, amino ácidos não-essenciais 0,1 mmol/L, e piruvato de sódio 1 mmol/L) suplementado com 10% de soro fetal, penicilina G 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL, em frascos de cultura, a 37°C, em atmosfera de CO₂ 5% e O₂ 95%. Células com confluência de 70-80% foram utilizadas para o início dos tratamentos.

As culturas foram incubadas com os flavonóides no mesmo meio de cultura em volumes nunca superiores a 20 µl e as culturas controle receberam quantidade equivalente de veículo dimetil-sulfóxido (DMSO). Ao término do período de incubação, variável de acordo com os procedimentos, as células foram lavadas com solução salina tamponada e submetidas aos procedimentos analíticos descritos a seguir (ZEGURA; LAH; FELIPIC, 2004).

3.4.2 Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada utilizando-se sulforodamina B, de acordo com SKEHAN et al. (1990). Aproximadamente 5×10^4 células/mL foram incubadas em placas de 24 poços durante 24 horas antes do início do tratamento. Após a adição dos flavonóides (25-100 $\mu\text{mol/L}$), as células foram cultivadas por até 72 horas, sem troca do meio de cultura. Após 24, 48 ou 72 horas de incubação, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas 2 vezes com solução salina tamponada a 4°C. As células aderidas foram fixadas com metanol por duas horas, lavadas e coradas com sulforodamina B 0,5%. A absorvância do corante solubilizado foi medida a 540 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV1201.

3.4.3 Viabilidade Celular

A viabilidade das células foi determinada por meio do ensaio de viabilidade/citotoxicidade, utilizando-se citometria de fluxo (PAPADOPOULOS et al., 1994). Nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a incubação com os flavonóides (25-100 $\mu\text{mol/L}$), as células foram tripsinizadas e lavadas em solução salina tamponada. Em seguida foram ressuspensas em meio contendo calceína-AM (2 $\mu\text{mol/L}$) e homodímero de etídio (EtHD; 4 $\mu\text{mol/L}$), e incubadas por 30 min, a 37°C. As células foram então analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Aproximadamente 10^5 células foram analisadas em cada tempo ou tratamento. O EtHD rapidamente penetra nas células mortas intercalando-se

ao DNA, mas não em células com membranas intactas. Já a calceína difunde-se livremente pelas células, sendo clivada por esterases intracelulares à sua isoforma fluorescente, que é polarizada e mantida no interior das células íntegras.

3.4.4 Potencial de membrana mitocondrial

As células foram incubadas com tetrametilrodamina metil éster (TMRM) 1 $\mu\text{mol/L}$, a 37°C, 10 minutos antes da adição dos flavonóides. As amostras foram centrifugadas a 50 g por 5 minutos, lavadas com o meio de incubação, e o sedimento tratado com Triton X-100 0,1% (v/v). Após centrifugação a 5.000 g por 3 minutos, a fluorescência da TMRM captada e retida pelas mitocôndrias foi determinada no sobrenadante a 505 e 535 nm, para excitação e emissão, respectivamente (IMBERTI et al., 1993). Os resultados foram expressos em porcentagem da intensidade de fluorescência (captação da TMRM) em relação ao controle.

O potencial de membrana mitocondrial foi ainda analisado por microscopia de fluorescência. As células foram cultivadas e tratadas sobre placas de petri específicas. Após 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de tratamento com os flavonóides, foi adicionado às placas 300 nmol/L de TMRM, sendo estas incubadas por mais 30 minutos. O potencial de membrana foi avaliado, sendo as células fotografadas utilizando um microscópio de fluorescência Nikon Optiphot epifluorescence acoplado a uma câmera de vídeo Dage MTI SIT-68 (Michigan City, IN).

3.4.5 Condensação e Fragmentação nuclear

As células apoptóticas foram quantificadas pelas mudanças morfológicas nucleares (cromatina com visíveis sinais de marginalização e núcleos fragmentados), detectadas por microscopia de fluorescência das células coradas com *Hoechst* 33342, nos comprimentos de onda de excitação de 330-380 nm e de emissão de 480 nm (HOLY, 2002). As células (5×10^4 células/mL) foram cultivadas e tratadas sobre lamínulas em placas de 6 poços. Após 24 ou 48 horas de tratamento, as células foram lavadas com meio de cultura e fixadas nas lamínulas com metanol por 2 horas, a -20°C , coradas com *Hoechst* 33342 a 5 mg/mL e montadas em lâminas de vidro. Todos os experimentos foram acompanhados de controle positivo, incubando-se as células com *t*-butil hidroperóxido, por 24 horas. A fragmentação nuclear foi avaliada e fotografada empregando o microscópio de fluorescência Nikon Optiphot epifluorescence acoplado à câmera de vídeo Dage MTI SIT-68 (Michigan City, IN). Trezentas células em diversos campos randomicamente escolhidos foram avaliadas e o número de células apresentando fragmentação nuclear foi expresso como porcentagem em relação ao número total de células.

3.4.6 Medida da atividade da caspase 9 e 3 celulares

Após 24 e 48 horas de exposição das células aos flavonóides, as atividades das caspases-9 e -3 foram medidas colorimetricamente através da quebra dos peptídeos Ac-LEHD-pNA e Ac-Deved-pNA, respectivamente. As

células foram tripsinizadas, lavadas em tampão fosfato e centrifugadas a 800 g, por 8 min. Ao sedimento foram adicionados 50-100 µl de tampão contendo HEPES/NaOH 20mM, pH 7,5, sacarose 250 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 2mM e EDTA 1mM, sendo mantido no gelo por 15 min. As amostras foram então homogeneizadas, passando 3 vezes pelo processo de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. A 50 µg de proteína para caspase 9 ou 25 µg para caspase 3 foram adicionados 100 µmol/L do substrato correspondente. Após incubação por 2 horas a 37°C, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro, a 405 nm.

3.4.7 Determinação dos nucleotídeos de adenina

Após incubações de 3-24 horas com os compostos, os nucleotídeos de adenina foram extraídos conforme descrito por RYLL e WAGNER (1991). As células foram tripsinizadas, lavadas em solução salina tamponada e centrifugadas a 750 g por 3 min. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL de ácido perclórico 0,5 mol/L e homogeneizado. Em seguida foram adicionados 75 µL do tampão de neutralização (KOH 2,5 mol/L, K₂HPO₄ 1,5 mol/L). A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante quantificado por HPLC. A quantidade de nucleotídeos de adenina foi expressa pela capacidade energética celular, pela razão $(ATP + \frac{1}{2}ADP) / (ATP + ADP + AMP)$.

3.4.8 Exposição de fosfatidil serina na face externa da membrana celular (Anexina V).

Após 24 e 48 horas de incubação das células com os flavonóides, a exposição de fosfatidil serina foi avaliada pela marcação fluorescente da anexina V, por citometria de fluxo (ZHIVOTOVSKY et al., 1999). As células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes em solução salina tamponada e centrifugadas a 750 g, por 3 min. O sedimento foi ressuspenso em 100 µl de solução contendo 5 µg/mL de iodeto de propídio e 0,25 µg/mL de Anexina V, e então incubados a 37°C, por 15 min. Em seguida foram adicionados 400 µL de tampão (HEPES 100 mmol/L, NaCl 1,5 mol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, CaCl₂ 25 mmol/L, pH 7,4). As células foram então analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA). Aproximadamente 10⁵ células foram analisadas para cada período de incubação ou tratamento.

3.4.9 Determinação do acúmulo de H₂O₂ em células HepG2.

Após 24 horas de incubação das células com os flavonóides, a formação de H₂O₂ medida através da incubação 10⁶ células/mL em meio contendo 5 µmol/L de CM-DCFDA durante 15 minutos, a 37°C. A fluorescência foi analisada por meio de um espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi, Tokyo, Japan) nos comprimentos de onda de 503 e 529 nm respectivamente (CHERNYAK et al., 2006). Para indução do estresse

oxidativo, as células foram tratadas com 200 $\mu\text{mol/L}$ de H_2O_2 por 1 hora em meio completo.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística dos dados experimentais, quando pertinente, foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnet para a comparação de vários grupos tratados em relação aos seus controles, ou pelo teste *t* de Student para comparações entre um único grupo tratado e o seu controle, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 3.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, U.S.A.). Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

(Cora Coralina)

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 INTERAÇÃO DOS FLAVONÓIDES COM A MEMBRANA MITOCONDRIAL

A sonda intrínseca TMA-DPH incorpora-se na camada hidrofóbica das membranas, ancorada à superfície das mesmas e orientada paralelamente ao eixo das cadeias lipídicas, adquirindo fluorescência, cuja atenuação por diferentes substâncias reflete alterações na organização estrutural das membranas. Os valores da constante de Stern-Volmer para a atenuação desta resposta de fluorescência pelos flavonóides (FIGURA 7), mostram que quercetina e galangina interagem com a membrana mitocondrial de forma muito mais eficiente do que a taxifolina e a catequina, enquanto que a luteolina apresenta uma capacidade de interação intermediária comparada com estes flavonóides.

A polarização da fluorescência (P) do TMA-DPH representa a ordem de movimentação na porção hidrofóbica da bicamada lipídica, sendo inversamente proporcional à fluidez de membrana ($1/P$). Quando $1/P$ foi avaliado para as mitocôndrias expostas aos flavonóides (FIGURA 8), observou-se, em concordância com os resultados da interação, que quercetina e galangina, ao contrário de taxifolina, catequina e luteolina, diminuem significativamente a fluidez da membrana mitocondrial.

Duas outras sondas de membrana foram testadas: DPH, que ao contrário do TMA-DPH, não se ancora à superfície da membrana, e 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS), que liga-se aos grupos-cabeça polares dos

fosfolipídios e proteínas na superfície das membranas. Enquanto que os resultados dos ensaios usando DPH foram muito semelhantes aos do TMA-DPH, a atenuação da resposta de fluorescência da membrana mitocondrial marcada com ANS na presença dos flavonóides não foi significativo (resultados não apresentados).

FIGURA 7. Interação dos flavonóides com a membrana mitocondrial, avaliada pela atenuação da resposta de fluorescência da membrana das mitocôndrias (0,4 mg de proteína) marcadas com TMA-DPH, incubadas a 30°C em meio padrão (sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4), em volume final de 1 mL. Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle na ausência dos flavonóides. Os valores correspondem às respectivas constantes de Stern-Volmer.

FIGURA 8. Efeito dos flavonóides sobre a fluidez de membrana mitocondrial, avaliada pela atenuação da resposta de fluorescência da membrana das mitocôndrias (1 mg de proteína) marcadas com TMA-DPH, incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 7. Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle na ausência dos flavonóides. *Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.2 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A RESPIRAÇÃO E O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$, a luteolina, seguida em potência por quercetina, apresentou expressiva inibição da respiração de estado 3, seja em mitocôndrias energizadas com succinato, substrato de sítio II da cadeia respiratória, ou com glutamato+malato, substratos de sítio I (FIGURA 9). Na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$, as inibições da respiração de estado 3 pelos flavonóides avaliados, exceto para a luteolina e quercetina, foram inexpressivos (resultados não apresentados). Por outro lado, também em concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$, somente a galangina estimulou a respiração de estado 4 (FIGURA 9) e dissipou significativamente o potencial de membrana mitocondrial (FIGURA 10). As curvas concentração-resposta para os efeitos da galangina sobre a respiração de estado 4/potencial de membrana e da quercetina e luteolina sobre a respiração de estado 3 são mostradas na FIGURA 11. Taxifolina e catequina não apresentaram efeitos significativos nessa faixa de concentração (resultados não apresentados).

A

B

FIGURA 9. Efeitos dos flavonóides (50 $\mu\text{mol/L}$) sobre as respirações de estado 3 e estado 4 em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,5 mg de proteína), incubadas a 30°C com succinato 5 mmol/L + rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$ (A) ou glutamato 2,5 mmol/L + malato 2,5 mmol/L (B), no meio padrão descrito na legenda da Fig. 7, na presença de EGTA 0,5 mmol/L e K_2HPO_4 10 mmol/L, em volume final de 1,5 ml. A respiração de estado 3 foi iniciada com ADP 0,4 μmol . Os traçados são representativos de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. Os valores correspondem à velocidade das respirações de estado 3 e 4, apresentadas como ng átomos de O. min⁻¹.

FIGURA 10. Efeito dos flavonóides (50 $\mu\text{mol/L}$) sobre o potencial de membrana das mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato (Suc), incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 7.

FIGURA 11. Curvas concentração-resposta para os efeitos da galangina sobre a velocidade da respiração de estado 4 e potencial de membrana (inserção), e da quercetina e luteolina sobre a velocidade da respiração de estado 3, conforme descrito nas legendas das Figs. 9 e 10. Fator de estimulação: razão entre o consumo de oxigênio do experimento tratado e o consumo de oxigênio do experimento controle. *Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

4.3 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

A FIGURA 12 mostra as curvas concentração-resposta para indução de inchamento mitocondrial pelos flavonóides. Taxifolina e catequina podem ser considerados indutores da transição de permeabilidade da mitocôndria, a julgar pelas suas habilidades em induzir o inchamento da organela ao longo de uma ampla faixa de concentração, assim como pela inibição desse mesmo processo por ciclosporina A 1 $\mu\text{mol/L}$ (FIGURA 13). Por outro lado, embora a quercetina e a luteolina tenham apresentado tendência em induzir inchamento mitocondrial em concentrações relativamente baixas, este efeito não foi sustentado em concentrações maiores (FIGURA 12). A galangina não apresentou efeito significativo quanto a esta resposta das mitocôndrias.

4.4 EFEITO DOS FLAVONÓIDES SOBRE O EFLUXO MITOCONDRIAL DE Ca^{2+}

O acúmulo de Ca^{2+} pelas mitocôndrias foi induzido pela energização das organelas com succinato, previamente à adição dos flavonóides. A FIGURA 14 mostra a habilidade dos flavonóides em liberar o Ca^{2+} acumulado pelas mitocôndrias. A quercetina, luteolina, e principalmente a galangina, mostraram-se eficientes em liberar o cátion acumulado pelas organelas, enquanto que a taxifolina apresentou um pequeno efeito e a catequina não apresentou qualquer efeito nesse sentido. O inibidor da TPM, CsA (1 $\mu\text{mol/L}$), inibiu os processos induzidos por luteolina, quercetina e taxifolina 50 $\mu\text{mol/L}$

em 15, 43,3 e 100% respectivamente, mas não inibiu o processo induzido por galangina.

FIGURA 12. Curvas concentração-resposta para indução de inchamento mitocondrial pelos flavonóides em mitocôndrias isoladas do fígado de rato (0,4 mg proteína), incubadas a 30°C com succinato 5 mmol/L e rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$, no meio de incubação padrão descrito na legenda da Fig. 7, na presença de CaCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$, em volume final de 1 mL. Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativa ao controle na ausência dos flavonóides. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle.

FIGURA 13. Efeitos da CsA (1 $\mu\text{mol/L}$) sobre a indução do inchamento das mitocôndrias pelos flavonóides (50 $\mu\text{mol/L}$), incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 12.

FIGURA 14. Curvas concentração-resposta para indução da liberação pelos flavonóides do Ca^{2+} acumulado em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,4 mg proteína), incubadas a 30°C com rotenona 2,5 µmol/L no meio de incubação padrão descrito na legenda da Fig. 7, em volume final de 1 ml. A captação do cálcio foi iniciada pela adição de succinato 5 mmol/L e a liberação pela adição dos flavonóides; as adições e medidas ocorreram após o estabelecimento de um platô. Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle na ausência dos flavonóides: *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.5 EFEITO DOS FLAVONÓIDES SOBRE OS NÍVEIS MITOCONDRIAIS DE ATP

Os níveis mitocondriais de ATP foram avaliados 15 minutos após a incubação das mitocôndrias com os flavonóides, nas mesmas condições descritas para a respiração mitocondrial, e portanto na ausência de Ca^{2+} ,

visando excluir o envolvimento da TPM (FIGURA 15). Os resultados mostram que em concentrações de 25 e 50 $\mu\text{mol/L}$, quercetina e galangina propiciam uma significativa diminuição nos níveis mitocondriais de ATP. A luteolina apresentou o mesmo efeito a partir da concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$, enquanto que catequina e taxifolina não apresentaram efeito sobre os níveis de ATP.

FIGURA 15. Efeito dos flavonóides sobre o nível de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,4 mg proteína), incubadas por 15 min sob as condições descritas na legenda da Fig. 7 (1 mL volume final). As barras representam a média $\pm$ EPM de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle na ausência dos flavonóides. *Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.6 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A LIBERAÇÃO DO CITOCROMO C PELAS MITOCÔNDRIAS.

A liberação do citocromo c induzida pelos flavonóides na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$ após 15 minutos de incubação nas condições descritas para o intumescimento mitocondrial, foi avaliada por “Western-Blotting”. Os resultados demonstram liberação do citocromo c pelos flavonóides catequina, luteolina, quercetina e taxifolina, mas não pela galangina.

FIGURA 16. Efeito dos flavonóides sobre a liberação do citocromo c pelas mitocôndrias incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 7 e analisadas por “Western-Blotting” conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.3.10). As bandas são representativas de experimentos independentes realizados com diferentes preparações mitocondriais. 1 e 2: fração mitocondrial e sobrenadante, respectivamente.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FLAVONÓIDES EM SISTEMAS NÃO-MITOCONDRIAIS

A habilidade dos flavonóides em seqüestrar DPPH[•], um radical livre estável potencialmente reativo com todos compostos capazes de doar um átomo de hidrogênio, é mostrada na FIGURA 17-A, e a habilidade desses compostos em seqüestrar O₂^{•-}, especificamente, é mostrada na FIGURA 17-B. A quercetina foi o mais potente sequestrador tanto de DPPH[•] quanto de O₂^{•-}, seguido pela taxifolina, catequina, luteolina e galangina. A capacidade complexante de ferro dos flavonóides é mostrada na FIGURA 17-C. Todos os flavonóides, exceto a galangina, complexam ferro, conforme pode ser demonstrado pela prevenção da formação do complexo FeII(BPS)₃.

4.8 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

O efeito dos flavonóides sobre a lipoperoxidação (LPO) da membrana mitocondrial induzida por Fe²⁺/citrato é mostrado na FIGURA 18. Todos os flavonóides avaliados protegeram contra este processo em mitocôndrias isoladas. Entretanto, a quercetina, a luteolina e a galangina foram substancialmente mais potentes do que a taxifolina e a catequina.

FIGURA 17. Efeitos dos flavonóides sobre a redução do radical DPPH[•] (A), sequestro do radical superóxido (B) e complexação do ferro (C), conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.2). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle na ausência dos flavonóides.

FIGURA 18. Efeito dos flavonóides sobre a LPO induzida por Fe²⁺/citrato em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, avaliada pela formação de MDA, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.3.9). Os valores representam a média ± EPM de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle na ausência dos flavonóides.

4.9 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A PRODUÇÃO DE H₂O₂

Todos os flavonóides avaliados mostraram atividade protetora sobre a formação de H₂O₂ induzida por *t*-butil hidroperóxido (FIGURA 19); sendo que a quercetina, seguida por galangina e luteolina mostraram ser mais potentes do que taxifolina e a catequina, comportamento similar ao observado na proteção da lipoperoxidação de membrana. Porém, deve-se ressaltar que

quando comparada com a proteção contra lipoperoxidação, as potências de catequina e taxifolina não foram tão diferentes em relação aos outros três flavonóides.

FIGURA 19. Efeito dos flavonóides sobre a produção de H_2O_2 induzida por t -BOOH 500 $\mu\text{mol/L}$ em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.3.7). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais, em relação ao controle na ausência dos flavonóides.

4.10 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR

Inicialmente foi realizado um estudo preliminar no qual foi avaliado a proliferação celular, visando determinar os melhores tempos e concentrações para exposição das células HepG2 aos cinco flavonóides estudados.

As concentrações de 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{mol/L}$ dos flavonóides quercetina, taxifolina, luteolina, catequina e galangina foram analisadas por 24, 48 e 72 horas. A exposição das células HepG2 à taxifolina, durante os períodos (24, 48 e 72 horas) e concentrações estudadas (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{mol/L}$) não resultou em qualquer efeito sobre a proliferação celular. A exposição à catequina resultou em apenas uma tendência de inibição da proliferação celular, e ainda assim após 72 horas de incubação e nas concentrações de 75 e 100 $\mu\text{mol/L}$. Também não foram observadas células não aderentes ao frasco, um indicador inicial de dano celular (FIGURA 20).

Entretanto, a exposição de células HepG2 à galangina e à luteolina mostrou uma inibição da proliferação celular já após 24 horas à concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$. Após 48 horas, foram observadas inúmeras células não aderentes ao frasco, indicando dano celular. A quercetina apresentou efeito semelhante à luteolina e galangina, porém, com uma menor potência (FIGURA 20).

FIGURA 20. Efeito dos flavonóides sobre a proliferação das células HepG2, avaliada pelo aumento da absorvância a 540 nm da sulforodamina B, incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂ 5% e O₂ 95%, em meio de cultura (“Minimum Essential Medium” acrescido de 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e piruvato de sódio 1 mmol/L). Os pontos representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes, relativa ao tempo zero (5 x 10⁴ células/ mL) na ausência dos flavonóides. *Resultados estatisticamente significativos (p < 0,05) em relação ao controle.

4.11 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

Após exposição aos flavonóides, as células HepG2 foram marcadas com calceína-AM e homodímero de etídio e analisadas por citometria de fluxo. Após 24 horas de exposição, não foram observadas quaisquer alterações na viabilidade celular. Entretanto, após 48 horas foi observado uma diminuição na fluorescência da calceína-AM, além de um aumento na fluorescência do homodímero de etídio, nas células expostas à galangina, luteolina e quercetina (FIGURA 21). Essa alteração na permeabilidade da membrana plasmática é característica tanto de morte celular por necrose quanto dos estágios tardios da apoptose.

FIGURA 21. Efeito dos flavonóides sobre a viabilidade das células HepG2, incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 19 e analisadas no citômetro de fluxo como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.3). Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos independentes, relativa ao tempo zero (5×10^4 células/ mL) na ausência dos flavonóides. *Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.12 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM CÉLULAS HepG2

Visando avaliar melhor a contribuição da mitocôndria no processo de dano e morte celular, o potencial de membrana mitocondrial foi determinado em células HepG2 expostas aos flavonóides durante 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Conforme pode ser observado na FIGURA 22, a exposição das células HepG2 à galangina e luteolina resultou em diminuição da captação do TMRM pelas mitocôndrias em até 24 horas. O mesmo não foi observado em relação aos demais flavonóides (quercetina, taxifolina e catequina). Quando comparado aos outros parâmetros estudados, a despolarização mitocondrial ocorreu após um período mais curto de incubação. Nas FIGURAS 23 a 27 esta diferença pode ser melhor observada por meio de microscopia de fluorescência.

FIGURA 22. Efeito dos flavonóides sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2 (10^6 células/ mL), incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas por espectrofluorimetria como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.4). Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos independentes, relativa ao tempo zero na ausência dos flavonóides. *Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

FIGURA 23. Efeito da Quercetina sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2, incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas por microscopia de fluorescência como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.4). As fotos são representativas de três experimentos independentes.

FIGURA 24. Efeito da Catequina sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2, incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas por microscopia de fluorescência como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.4). As fotos são representativas de três experimentos independentes.

FIGURA 25. Efeito da Luteolina sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2, incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas por microscopia de fluorescência como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.4). As fotos são representativas de três experimentos independentes.

FIGURA 26. Efeito da Taxifolina sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2, incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas por microscopia de fluorescência como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.4). As fotos são representativas de três experimentos independentes.

FIGURA 27. Efeito da Galangina sobre o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2, incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas por microscopia de fluorescência como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.4). As fotos são representativas de três experimentos independentes.

4.13 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A CAPACIDADE ENERGÉTICA MITOCONDRIAL

A exposição das células HepG2 aos flavonóides galangina e luteolina por 12 horas na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ resultou em significativa queda da capacidade energética mitocondrial, tornando-se mais acentuada após 24 horas de incubação (FIGURA 28). Esta situação pode levar à morte celular. A luteolina, entretanto, apresentou o mesmo efeito em concentrações inferiores. O processo de apoptose requer ATP, uma vez que uma diminuição substancial de ATP pode contribuir para inibição das caspases (EGUCHI et al., 1999). A diminuição observada em ambos os casos, entretanto, parece não ser drástica a ponto de inibir este processo. A exposição das células HepG2 à quercetina (100 $\mu\text{mol/L}$) durante 24 horas, revelou uma discreta, porém significativa diminuição na capacidade energética celular. A exposição à catequina e taxifolina não revelou qualquer alteração nesse aspecto (FIGURA 28).

FIGURA 28. Efeito dos flavonóides sobre a capacidade energética ((ATP + $\frac{1}{2}$ ADP) / (ATP + ADP + AMP)) das células HepG2, incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas por HPLC como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7). Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos independentes. *Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.14 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDIL SERINA

Um outro objetivo deste trabalho foi elucidar se a morte das células HepG2 observada após tratamento com alguns dos flavonóides se daria por processo apoptótico ou necrótico. Como primeiro parâmetro, avaliou-se a exposição de fosfatidil serina na face externa da membrana dessas células. Observou-se que quercetina, luteolina e galangina induziram, após 24 horas, a exposição de fosfatidil serina na face externa da membrana celular, que se manteve até o período de 48 horas. Entretanto apenas a luteolina foi capaz de apresentar tal efeito em concentrações inferiores (50 $\mu\text{mol/L}$), enquanto que quercetina e galangina mostraram-se eficientes apenas na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$. Catequina e taxifolina não produziram efeito significativo em relação aos controles (FIGURA 29).

FIGURA 29. Exposição de fosfatidil serina em células HepG2, após incubação com flavonóides por 24 ou 48 horas, sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e avaliada pela marcação com Anexina V em citômetro de fluxo, como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.8). Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos independentes. *Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.15 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A ATIVIDADE DA CASPASE-3

A atividade da caspase-3 foi avaliada como outro indicador de indução de apoptose. A atividade da caspase-3, determinada pela liberação do pNA a partir do substrato Ac-Deved-pNA, aumentou significativamente nas células expostas aos flavonóides galangina, luteolina e quercetina (FIGURA 30), sugerindo uma possível participação do processo apoptótico na morte celular induzida pelos mesmos, conforme observada em experimento anterior. Esse aumento de atividade não foi observado em decorrência da exposição das células aos demais flavonóides.

FIGURA 30. Efeito dos flavonóides sobre a ativação da caspase-3 em células HepG2, incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas a 405 nm em espectrofotômetro como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.6). Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos independentes. *Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.16 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A ATIVIDADE DA CASPASE-9

A ativação da caspase-3 em células HepG2 pela galangina, observada no experimento anterior (4.14), sugere o início do processo de apoptose. Entretanto essa ativação pode ou não ser induzida via mitocôndria. Assim, para elucidar o envolvimento da mitocôndria nesse processo, avaliou-se a atividade da caspase-9 nas células tratadas com os flavonóides. A liberação do pNA a partir da clivagem do substrato colorimétrico Ac-LEHD-pNA pela caspase-9 aumentou, conforme observado no experimento anterior, nas células tratadas com a galangina, quercetina e luteolina, mas não nas células tratadas com os demais flavonóides (FIGURA 31).

FIGURA 31. Efeito dos flavonóides sobre a ativação da caspase-9 em células HepG2, incubadas sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas a 405 nm em espectrofotômetro como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.6). Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos independentes. *Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

4.17 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A CONDENSAÇÃO E FRAGMENTAÇÃO DA CROMATINA

Na seqüência avaliou-se a condensação da cromatina utilizando-se a coloração com Hoechst 33342, após exposição das células HepG2 aos flavonóides durante 24 e 48 horas. Neste estudo, em contraste com os experimentos anteriores, não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa entre o número de células normais e as que apresentaram condensação e fragmentação do DNA, quadro característico de células em processo de apoptose (FIGURA 32). Apenas foi observada uma tendência de aumento após 48 horas de exposição das células a luteolina e galangina.

FIGURA 32. (Fotos) Efeito dos flavonóides sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2, incubadas por 48 horas sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas por microscopia de fluorescência como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.5). (Gráfico) Porcentagem de células apresentando características apoptóticas, coradas com Hoechst 33342 e contadas por microscopia de fluorescência. Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos independentes, em relação ao controle na ausência dos flavonóides após 48 horas de incubação. *Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle. O tempo de incubação para o t-BOOH foi de 24 horas. As setas indicam núcleos condensados e/ou fragmentados.

4.18 EFEITOS DA CATEQUINA E TAXIFOLINA SOBRE A MORTE CELULAR INDUZIDA POR *t*-BOOH

A exposição das células HepG2 ao *t*-butil hidroperóxido 100 $\mu\text{mol/L}$ induziu aproximadamente 90-100% de células não viáveis após 24 horas de incubação. Assim, esse sistema foi utilizado para avaliar se os flavonóides que não produziram por si uma queda na viabilidade celular (taxifolina e catequina), seriam capazes de prevenir a morte induzida pelo pró-oxidante. Taxifolina apresentou um efeito protetor significativo na morte celular induzida por *t*-BOOH 100 $\mu\text{mol/L}$ após 24 horas de incubação. A catequina, entretanto, não apresentou efeito protetor significativo sobre este processo (FIGURA 33).

FIGURA 33. Efeito da Catequina e Taxifolina 100 $\mu\text{mol/L}$ sobre a viabilidade das células HepG2, expostas ao *t*-BOOH 100 $\mu\text{mol/L}$ sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 e analisadas no citômetro de fluxo como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.3). Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos independentes, relativa ao tempo zero (5 x 10⁴ células/ mL) na ausência dos flavonóides. *, ** Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle e ao *t*-BOOH 100 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente

4.19 EFEITOS DA CATEQUINA E TAXIFOLINA SOBRE O ACÚMULO DE EROs

O acúmulo de H_2O_2 induzida pelo t -BOOH foi avaliada pela fluorescência da sonda CM- H_2 DCFDA após 30 minutos de incubação com o t -BOOH. Apenas a taxifolina, dentre os dois flavonóides testados, apresentou capacidade de impedir a formação do peróxido de hidrogênio nas células expostas ao agente pró-oxidante (FIGURA 34).

FIGURA 34. Efeito da Catequina e Taxifolina 100 μ mol/L sobre a produção de H_2O_2 pelas células HepG2 expostas ao t -BOOH 100 μ mol/L sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.9). Os pontos representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos independentes, em relação ao tempo zero na ausência dos flavonóides. *, ** Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle e ao t -BOOH 100 μ mol/L, respectivamente

4.20 EFEITOS DA CATEQUINA E TAXIFOLINA SOBRE A EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDIL SERINA INDUZIDA POR *t*-BOOH

A exposição de fosfatidil serina induzida pelo *t*-BOOH foi avaliada pela marcação de Anexina V após 24 horas de incubação com o *t*-BOOH. Taxifolina e catequina diminuíram a exposição deste fosfolípido na face externa da membrana plasmática de forma significativa em relação ao controle, mas não impedindo totalmente o processo apoptótico induzido pelo agente pró-oxidante (FIGURA 35).

FIGURA 35. Efeito da Catequina e Taxifolina 100 µmol/L sobre a exposição de fosfatidilserina em células HepG2 expostas ao *t*-BOOH 100 µmol/L sob as condições descritas na legenda da Fig. 20 como descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.8). Os pontos representam a média ± EPM de 3 determinações com diferentes culturas celulares, em relação ao tempo zero na ausência dos flavonóides. *, ** Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle e ao *t*-BOOH 100 µmol/L, respectivamente.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar”.
(Autor desconhecido)

www.phdcomics.com

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 EFEITOS DOS FLAVONÓIDES SOBRE A ENERGÉTICA MITOCONDRIAL

(publicado em: DORTA et al., *Chem. Biol. Interact.* 152: 67-78, 2005)

(ANEXO III)

A primeira parte desse estudo procurou avaliar os aspectos energéticos das mitocôndrias isoladas de fígado de rato, expostas aos flavonóides quercetina, taxifolina, luteolina, catequina e galangina. A dupla ligação na posição 2-3, os grupos 3-OH e a função 4-oxo no anel C, além da estrutura o-di-OH no anel B, serviram de base para a discussão de aspectos da relação estrutura-atividade dos flavonóides sobre as mitocôndrias. Estas características estruturais determinam importantes propriedades dos flavonóides, em particular suas atividades antioxidante em diferentes sistemas biológicos (BORS et al., 1990). A dupla ligação na posição 2-3 confere maior rigidez ao anel C, mantendo-o em posição mais coplanar em relação ao anel A; o grupo 3-OH, por interagir com o anel B por meio de uma ponte de hidrogênio, posiciona este anel praticamente no mesmo plano dos anéis A e C (ARORA et al., 1998; SILVA et al., 2002).

Como a conformação descrita acima é compatível com a imposição de uma maior ordem de empacotamento dos lipídios e rigidez das estruturas de membrana, e os processos energéticos das mitocôndrias são particularmente susceptíveis à organização da membrana interna da organela, foi avaliada inicialmente a interação dos flavonóides com a membrana mitocondrial,

utilizando o marcador fluorescente TMA-DPH. Os nossos resultados são consistentes com o conceito de que a rigidez conferida pela dupla ligação na posição 2-3 e pelo grupo 3-OH na estrutura dos flavonóides favorece a interação destes compostos com membranas. Esses dados estão ainda, em concordância com resultados prévios demonstrando que alguns flavonóides modulam a fluidez da membrana em lipossomos (SAIJA et al., 1995).

Devido aos expressivos efeitos da quercetina e da galangina quanto aos ensaios utilizando os marcadores DPH/TMA-DPH em relação aos ensaios utilizando ANS, é razoável supor que estes flavonóides se dissolvem na porção hidrofóbica da membrana mitocondrial, promovendo assim uma diminuição na sua fluidez. Nesse sentido, estudos prévios têm associado a restrição na fluidez de membrana decorrente da interação de alguns flavonóides com essas estruturas, com a proteção conferida por estes compostos contra estresse oxidativo, por diminuição na cinética das reações dos radicais livres (SAIJA et al., 1995; ARORA et al., 2000). A luteolina que também possui dupla ligação na posição 2-3, mas não apresenta grupo 3-OH em sua estrutura, interage mais brandamente com a membrana mitocondrial, demonstrando, também em concordância com o observado em outros estudos (SAIJA et al., 1995), a influência dessa estrutura na capacidade de interação do flavonóide com a membrana mitocondrial.

A quercetina, galangina e luteolina, os únicos flavonóides com capacidade de interagir com a membrana mitocondrial, e no caso dos dois primeiros, ainda de diminuir a sua fluidez, foram também os únicos compostos com capacidade de inibir ou desacoplar significativamente a respiração mitocondrial. Portanto, a dupla ligação na posição 2-3, a função 4-

oxo no anel C, além da estrutura *o*-di-OH no anel B, como no caso da quercetina e luteolina, parecem favorecer um efeito inibitório sobre a respiração mitocondrial de estado 3, indicando interferência na cadeia respiratória ou na atividade da ATP sintase. Por outro lado, como os flavonóides são ácidos fracos de caráter hidrofóbico, é provável que eles se encontrem entre as substâncias potencialmente capazes de causar desacoplamento mitocondrial (RAVANEL, 1986; VAN DIJK; DRIESSEN; RE COURT, 2000), embora as características estruturais associadas com essa propriedade ainda não estejam definidas.

Os nossos resultados mostraram que a galangina, que apresenta dupla ligação na posição 2-3/grupo 3-OH/função 4-oxo no anel C, mas não a estrutura *o*-di-OH no anel B, estimulou a respiração mitocondrial de estado 4 e dissipou o potencial de membrana, sugerindo que esta característica estrutural favorece a atividade desacopladora sobre a mitocôndria, aparentemente em decorrência de difusão da forma não carregada da molécula através da membrana mitocondrial.

A inibição da cadeia respiratória por diversos flavonóides tem sido freqüentemente associada aos potenciais de oxidação destes compostos, os quais geralmente estão localizados na mesma faixa dos centros redox mitocondriais. Os valores dos potenciais de oxidação da quercetina, taxifolina, catequina e galangina são respectivamente +0,39 V, +0,46 V, +0,45 V e +0,59 V (HODNICK et al., 1988; FIRUZI et al., 2005). Tal atividade redox poderia propiciar a geração de espécies reativas de oxigênio (HODNICK et al., 1988; SALVI et al., 2002), de tal forma que os flavonóides que possuem estas propriedades podem ser considerados potenciais pró-

oxidantes sobre as mitocôndrias, e conseqüentemente, potenciais indutores do processo de transição de permeabilidade mitocondrial.

Neste contexto, entretanto, os nossos resultados não revelaram aumentos significativos com relação à geração/acúmulo de H_2O_2 nas mitocôndrias incubadas com os flavonóides sob condições de indução da TPM, avaliados tanto com dicloro-dihidrofluoresceína, quanto com ácido homovanílico (resultados não apresentados). Além disso, pode-se observar que a quercetina e luteolina, que inibiram substancialmente a respiração mitocondrial de estado 3, não foram capazes de induzir significativamente a TPM, sugerindo que existe uma aparente relação inversa entre a habilidade indutora da TPM e a inibição da respiração mitocondrial pelos flavonóides, provavelmente envolvendo a cadeia respiratória.

De fato, os flavonóides catequina e taxifolina, que não apresentaram substancial atividade inibitória da respiração mitocondrial de estado 3, induziram a TPM ao longo de praticamente toda a faixa de concentração avaliada. Portanto, estes resultados sugerem, a princípio, que os flavonóides são potenciais indutores da TPM, exceto quando eles inibem a cadeia respiratória. Uma razão aparente é que a desenergização das mitocôndrias devido à inibição da cadeia respiratória impede a captação do Ca^{2+} pela organela, a qual é determinante para o desencadeamento do processo.

Dentro deste mesmo contexto, os resultados demonstrando que a galangina não apresenta capacidade indutora da TPM, são esperados, à medida que como desacoplador, impede que a mitocôndria retenha o Ca^{2+} necessário para o desencadeamento do processo. Estes resultados são coerentes com os obtidos em relação ao efluxo mitocondrial do Ca^{2+} ,

mostrando que a quercetina e luteolina, que inibem substancialmente a cadeia respiratória e não induzem de forma significativa a TPM, liberaram o Ca^{2+} acumulado pelas mitocôndrias, e que a galangina, que como desacoplador não induziu a TPM, foi um indutor bastante efetivo da liberação de Ca^{2+} pelas organelas.

A sinalização do Ca^{2+} é um fator crítico para a função celular, além de dano e morte, e a mitocôndria juntamente com o retículo endoplasmático, apresenta função central na regulação da quantidade do cátion presente no interior da célula. Sabe-se que perturbações na compartimentação do Ca^{2+} intracelular podem causar toxicidade, levando a morte celular tanto por necrose quanto por apoptose. O efluxo de Ca^{2+} da mitocôndria, em particular, pode favorecer a necrose por diminuição nos níveis do cátion na matriz mitocondrial inibindo as desidrogenases estimuladas pelo mesmo, e exaurindo dessa forma o ATP, ou pode favorecer a apoptose mediante ativação de enzimas citosólicas dependentes de Ca^{2+} , tais como proteases, nucleases e fosfolipases (BRINI, 2003; HAJNOCZKY; DAVIES; MADESH, 2003; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003).

Portanto, os nossos resultados sugerem um aparente potencial de alguns flavonóides em induzir morte celular mediada por Ca^{2+} , tanto via necrose quanto via apoptose. Os mecanismos podem incluir a TPM, no caso da taxifolina, cujos efluxos de Ca^{2+} foram inibidos por CsA, ou desacoplamento, no caso da galangina, ou ainda outros processos, como por exemplo as liberações independentes de Na^+ , que são as mais comuns em mitocôndrias de fígado.

É bem estabelecido que o desequilíbrio no metabolismo energético ou no estado redox celular pode ativar mecanismos que conduzem a morte celular por necrose ou apoptose, com importantes participações da TPM, e também da compartimentação do Ca^{2+} . A TPM tem sido associada com necrose ou apoptose de acordo com os níveis de ATP da célula. Assim, enquanto a apoptose depende da ação de caspases iniciadoras e efetoras, a necrose é dependente preferencialmente da exaustão do ATP. Por outro lado, o ATP é necessário para desencadeamento da apoptose, de tal forma que a passagem deste processo para necrose pode ser determinado por estresse oxidativo que seja suficiente para inativar caspases e uma disfunção mitocondrial suficiente para exaurir o ATP (para revisão, ver GRATAGLIANO et al., 2002).

Assim, as observações sobre os níveis de ATP das mitocôndrias expostas aos flavonóides sob as condições de respiração, juntamente com as observações sobre a indução da TPM, sugerem que os flavonóides inibidores da cadeia respiratória ou desacopladores apresentam elevado potencial para indução de necrose, em relação aos flavonóides que induzem a TPM, estes com aparente elevado potencial para indução de apoptose. A razão é que o efeito predominante observado para quercetina, luteolina e galangina sobre as mitocôndrias foi respectivamente inibição da respiração para os dois primeiros e desacoplamento/liberação de Ca^{2+} para a última, as causas mais prováveis da diminuição nos níveis mitocondriais de ATP, enquanto que o efeito predominante observado para a taxifolina e a catequina foi a indução da TPM, processo conhecido por induzir a liberação de fatores apoptogênicos a partir da mitocôndria.

Neste sentido, avaliamos a capacidade dos flavonóides quanto a liberação do citocromo c das mitocôndrias. Pode-se observar que, de acordo com os resultados prévios, taxifolina e catequina liberam o citocromo c possivelmente pela abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, evidente na concentração testada (50 $\mu\text{mol/L}$), reforçando a hipótese de que estes flavonóides possam induzir apoptose. Entretanto, luteolina e quercetina, que inibem a cadeia respiratória, e que na concentração testada já perderam grande parte de sua capacidade indutora da TPM, também parecem liberar citocromo c, de forma que a diminuição do ATP celular pela inibição da cadeia respiratória tornar-se-ia o fator relevante para a diferenciação entre o processo de morte celular por apoptose ou necrose. A galangina como desacoplador, não induz a TPM e não demonstrou, pelo menos até o momento, capacidade de liberar o citocromo c.

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FLAVONÓIDES SOBRE AS MITOCÔNDRIAS

(submetido ao *Phytotherapy Research*)

(ANEXO IV)

A habilidade doadora de elétrons dos grupos hidroxil na estrutura dos flavonóides é a principal propriedade responsável pela atividade antioxidante destes compostos em diferentes sistemas. Entretanto, propriedades tais como capacidade quelante, habilidade em interagir com membranas, além de outras, têm sido freqüentemente associadas a esta atividade (SAIJA et al., 1995; SANTOS et al., 1998; VAN ACKER et al., 1998; ERLEJMAN et al., 2004). Os flavonóides apresentam atividade antioxidante contra EROS tais como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil ($^{\bullet}OH$) ou lipoperoxil ($LOO^{\bullet}$), dando origem a radicais aroxil (HODNICK et al., 1988; BORS et al., 1990; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; SILVA et al., 2002).

O radical $O_2^{\bullet-}$ e seu produto de dismutação H_2O_2 , na presença de ferro produz $^{\bullet}OH$, desencadeando um processo de lipoperoxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Portanto, seqüestradores de $O_2^{\bullet-}$ e $^{\bullet}OH$, bem como agentes complexantes de ferro, provavelmente inibem a iniciação do processo, enquanto que existem agentes que inibem a sua propagação. Neste contexto, nós avaliamos inicialmente a habilidade de redução do $DPPH^{\bullet}$ pelos flavonóides como um indicador geral de atividade seqüestradora de radicais livres, obtendo resultados em concordância com os critérios de Bors para a atividade antioxidante destes compostos (BORS et al., 1990). Os resultados de redução do $DPPH^{\bullet}$ são bastante semelhantes aos do seqüestro

de $O_2^{\bullet-}$, indicando ser esta última espécie um importante alvo do efeito antioxidante dos flavonóides, em especial daqueles que apresentam as propriedades estruturais da quercetina: presença de uma estrutura *o*-di-OH no anel B associado com a dupla ligação na posição 2-3 em conjugação com a função 4-oxo/grupo 5-OH no anel C. Com relação à capacidade complexante de ferro desses flavonóides, a estrutura *o*-di-OH no anel B é um requisito importante, mas não suficiente. A galangina, que não apresenta essa estrutura, não complexou ferro, embora a taxifolina, que a apresenta, mostrou uma baixa capacidade complexante do íon.

A mitocôndria é uma importante fonte de EROs, a principal delas gerada pela organela é $O_2^{\bullet-}$, que é convertida em H_2O_2 por dismutação espontânea ou por ação da superóxido dismutase. O principal elemento responsável pela produção de $O_2^{\bullet-}$ na mitocôndria é o radical ubisemiquinona formado no complexo III da cadeia respiratória, além do próprio complexo I (BOVERIS; OSHINO; CHANCE, 1972; St-PIERRE et al., 2002). A inibição da cadeia respiratória aumenta a produção de $O_2^{\bullet-}$ pela mitocôndria, enquanto que o desacoplamento o diminui (BROOKES, 2005). Entre os flavonóides avaliados, na faixa de 1-50 $\mu\text{mol/L}$, a quercetina e a luteolina causaram inibição substancial da respiração mitocondrial, e somente a galangina causou substancial desacoplamento. Entretanto, parece provável que ao mesmo tempo em que, como inibidor da cadeia respiratória, a quercetina e a luteolina estimulam a produção de $O_2^{\bullet-}$, o flavonóide seqüestra essa mesma espécie à medida que ela é gerada, e que este último efeito sobrepõe ao primeiro. Portanto, a quercetina e luteolina atuam provavelmente na iniciação da lipoperoxidação, diminuindo a viabilidade de $O_2^{\bullet-}$ para a formação de $^{\bullet}\text{OH}$,

não excluindo, entretanto, a participação da capacidade complexante de ferro destes flavonóides sobre esta propriedade.

Em contraste, a galangina, que fortemente inibiu a lipoperoxidação, não apresentou expressiva atividade seqüestradora de $O_2^{\bullet-}$, indicando que outros mecanismos podem ser responsáveis por essa atividade. Duas ações desses flavonóides sobre as mitocôndrias, descritas anteriormente (item 5.1 desse estudo, e DORTA et al., 2005) poderiam ser responsáveis por esses efeitos: a primeira é a habilidade destes compostos em interagir com a membrana mitocondrial, diminuindo sua fluidez; a segunda é a sua atividade desacopladora. Enquanto que a interação da galangina com a membrana mitocondrial poderia impedir estericamente a difusão dos radicais livres na bicamada lipídica, diminuindo a velocidade de propagação do processo de lipoperoxidação, o efeito desacoplador poderia diminuir a geração de $O_2^{\bullet-}$ pela cadeia respiratória, atuando assim, como a quercetina, no início do processo de lipoperoxidação.

5.3 ATIVIDADE DOS FLAVONÓIDES SOBRE AS CÉLULAS HepG2.

O potencial dos flavonóides atuarem como agentes antiproliferativos e indutores de apoptose tem sido demonstrado em diversos estudos realizados com diferentes linhagens celulares, modelos animais e estudos epidemiológicos (LAMBERT et al., 2005). Assim, realizamos estudos visando avaliar a ação dos flavonóides quercetina, taxifolina, luteolina, catequina e galangina sobre a viabilidade e indução de apoptose em células HepG2.

De acordo com estudos prévios, existe uma alta variabilidade em relação às concentrações e aos tempos de exposição dos flavonóides às células. Além disso, muitos dos flavonóides capazes de induzir morte celular também são capazes de inibir a proliferação de diversas linhagens celulares (KUNTZ; WENZEL; DANIEL, 1999; YEE et al., 2003; HSU; KUO; LIN, 2004; LEE et al, 2005). Assim, foi realizada uma triagem com os cinco flavonóides, para o estabelecimento da concentração e tempo de exposição, por meio do ensaio de inibição de proliferação das células HepG2. DASKIEWICZ et al. (2005), em estudo relacionando estrutura-atividade, demonstrou que dentre os flavonóides, as subclasses de flavonas (por ex.: luteolina e galangina) e flavonóis (por ex.: quercetina) apresentam um atividade anti-proliferativa maior que as flavononas (por ex.: taxifolina) e chalconas. Em nosso estudo foi possível observar, em concordância com este trabalho, que dentre os cinco flavonóides testados, apenas os três incluídos nas subclasses de flavonas e flavonóis (quercetina, luteolina e galangina), apresentaram uma significativa atividade antiproliferativa.

Inúmeros flavonóides são capazes de reduzir a viabilidade de diversas linhagens de células, sendo os mais estudados a genisteína e a quercetina (SKIBOLA; SMITH, 2000; DIXON; FERREIRA, 2002; YU; LI; LIU, 2004). MONASTÉRIO et al. (2004) demonstraram em estudo com 22 flavonóides empregando células humanas leucêmicas U937, que flavonóides apresentando pelo menos duas hidroxilações nas posições 3, 5 e 7 são capazes de induzir apoptose. Os autores demonstraram ainda a capacidade dos flavonóides quercetina, luteolina e galangina em induzir morte celular nessa linhagem específica, efeito não apresentado pela catequina e taxifolina. O mesmo efeito foi observado em nosso estudo empregando células HepG2. LEE et al. (2005) demonstraram a capacidade da luteolina em induzir apoptose em células HepG2, com liberação do citocromo *c* da mitocôndria e ativação da caspase 3. Ainda em concordância com nossos resultados, GRANADO-SERRANO et al. (2006) observaram que a quercetina é capaz de induzir morte das células HepG2. A luteolina e a quercetina também mostraram capacidade de induzir morte celular com concomitante queda do potencial de membrana mitocondrial e ativação de caspase-3 em células humanas leucêmicas BV-173 (MATSUI et al., 2005).

A participação da mitocôndria na morte celular por necrose ou apoptose é bem caracterizada. A transição de permeabilidade mitocondrial pode causar morte celular por necrose devido a uma depleção massiva do ATP celular e quebra da homeostasia do Ca^{2+} , levando a um colapso bioenergético sem que haja liberação do citocromo *c*. No entanto, se a diminuição do ATP induzida pela TPM não for drástica, o processo de apoptose se instala e o citocromo *c*, entre outras proteínas, pode ser liberado da mitocôndria para o

citosol por meio do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, promovendo ativação das caspases (SUSIN; ZAMZAMI; KROEMER, 1998; BERNARDI et al., 2001).

É bem estabelecido na literatura que células em processo de apoptose apresentam dissipação do potencial de membrana mitocondrial (FERRI; KROEMER, 2001), sugerindo que alterações na função mitocondrial sejam importantes para desencadear o processo apoptótico. Neste sentido, verificou-se que os flavonóides galangina e luteolina foram capazes de despolarizar as mitocôndrias com conseqüente diminuição na capacidade energética das mesmas. Entretanto, a redução da capacidade energética celular não foi substancial, havendo assim o favorecimento para a iniciação do processo apoptótico. A quercetina apresentou, com relação a estes mesmos parâmetros, uma leve tendência à diminuição da função mitocondrial, com pequena queda de potencial de membrana e diminuição da capacidade energética em concentrações elevadas. A galangina, o único flavonóide que apresentou atividade desacopladora em mitocôndrias isoladas, não causou diminuição do ATP de forma tão expressiva como seria esperado. Tal fato pode ser explicado por uma transição do processo oxidativo para o metabolismo glicolítico à medida que a oxidação fosforilativa torna-se menos eficiente. Efeito semelhante foi observado por KURUVILLA et al. (2003) após exposição de células de rabdomiossarcoma embrional humana ao FCCP.

Nossos resultados sugerem a ativação da via apoptótica em células HepG2 após o tratamento com os flavonóides quercetina, luteolina e galangina, demonstrada por alterações características de apoptose.

A ativação das caspases é reconhecida como um processo fundamental no desencadeamento da apoptose. Numerosos estímulos podem ativar as caspases, que vão da ativação de receptores de membrana celular até os que causam disfunção mitocondrial (SALVESEN; DIXIT, 1997). As caspases podem ser divididas em iniciadoras (caspases-8 e -9) ou executoras (caspases-3 e -7), sendo as executoras as responsáveis pela ativação de mecanismos que levam às mudanças de morfologia celular características da apoptose e fragmentação do DNA (CAI; YANG; JONES, 1998). A ativação da caspase-9, especificamente, ocorre via mitocondrial, por meio da clivagem pelo apoptossoma, formado, entre outros compostos, pelo citocromo c liberado da mitocôndria, e responsável pelo desencadeamento da cascata apoptótica, evidenciando assim uma disfunção nessa organela e culminando na ativação da caspase-3.

Os resultados obtidos em células HepG2 demonstram ativação da caspase-3 pela quercetina, luteolina e galangina. Efeitos semelhantes à exposição da quercetina pelas células HepG2 são descritos por GRANADO-SERRANO et al. (2006). KO, SHEN e CHEN (2004) sugerem que flavononas como a taxifolina, que apresentam hidroxilação na posição C4' possam induzir apoptose por meio da ativação da caspase-3 e -9 devido às EROs. Entretanto, o grande número de hidroxilações encontradas na taxifolina parece favorecer a atividade antioxidante de acordo com o critério de Bors (BORS et al., 1990), em detrimento da formação e acúmulo de H₂O₂. BESTWICK e MILNE (2006) observaram que a galangina é capaz de induzir o processo apoptótico em células HL-60 sem o acúmulo de H₂O₂, da mesma forma e na mesma concentração observada em nossos estudos.

Acredita-se que os flavonóides apresentem um efeito citoprotetor devido a capacidade antioxidante clássica dessa classe de substâncias (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988), embora recentemente tenha sido demonstrado que eles são capazes de induzir morte celular pela geração de EROs (UEDA et al., 2001; LU et al., 2007). Entretanto, não foi observado o acúmulo de H_2O_2 mediante exposição das células HepG2 aos flavonóides testados, sugerindo que o processo apoptótico observado seja decorrente de uma disfunção independente da geração de EROs. KO et al. (2005) observaram o mesmo efeito na citotoxicidade induzida pelo flavonóide miricetina em células HL-60, e propõe que a presença de hidroxilações nas posições C3', C4' e C5' de sua estrutura sejam importantes na citotoxicidade da substância. Entretanto, em nosso estudo, esta característica estrutural parece não ser a responsável pelos efeitos observados, mas sim a presença da dupla ligação na posição 2-3 da estrutura dos flavonóides.

Outra característica do processo apoptótico é a exposição do aminofosfolipídio fosfatidil serina na membrana plasmática (SAVILL, 1997). Assim, em continuidade ao estudo dos mecanismos envolvidos na morte celular induzida pelos flavonóides, foi avaliada a exposição da fosfatidil serina na membrana das células HepG2 e verificou-se, em concordância com os experimentos anteriores, a exposição do aminofosfolipídio induzida por quercetina, luteolina e galangina, reforçando a hipótese de que estes flavonóides estimulam a morte celular por apoptose. Entretanto, utilizando-se microscopia de fluorescência, não foi observado aumento significativo dessa fragmentação cromossômica característica em relação às células controles, seja após 24 ou 48 horas de incubação.

Após a observação de que a quercetina, luteolina e galangina podem induzir morte celular por apoptose, procuramos verificar se a catequina e a taxifolina seriam capazes de prevenir a morte celular induzida por *t*-butilhidroperóxido, um agente pró-oxidante. A taxifolina, mas não a catequina, conseguiu inibir em parte a morte celular induzida pelos EROs acumulados após exposição ao *t*-butilhidroperóxido. Essa constatação é corroborada pela observação de que somente a taxifolina foi eficiente em reduzir o acúmulo de H₂O₂ após exposição ao pró-oxidante.

Em conclusão, o presente estudo mostra que certos flavonóides, no caso galangina, luteolina e quercetina, mesmo apresentando características antioxidantes bem estabelecidas, podem interagir com a mitocôndria, levando a uma disfunção desta organela com conseqüente diminuição da capacidade energética celular e liberação de fatores apoptogênicos, os quais podem iniciar a cascata apoptótica induzindo a morte celular em células HepG2. Portanto, a mitocôndria é um potencial alvo de relevância para a atividade dos flavonóides em sistemas celulares.

*"Smooth seas do not make
skillful sailors"*
(African Proverb)

www.phdcomics.com

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Em relação aos resultados obtidos por meio dos estudos sobre a função energética mitocondrial, pode-se concluir que:

- A dupla ligação na posição 2-3/grupos 3-OH em conjugação com a função 4-oxo no anel C da estrutura dos flavonóides parece favorecer a interação destes compostos com a membrana mitocondrial, diminuindo a sua fluidez, e tanto inibindo a cadeia respiratória das mitocôndrias, quanto causando desacoplamento; enquanto que a estrutura o-di-OH no anel B parece favorecer a inibição da cadeia respiratória; a ausência desta estrutura parece favorecer a atividade desacopladora.
- Os flavonóides que não afetam a respiração mitocondrial, induzem a TPM. A habilidade dos flavonóides em liberar o Ca^{2+} acumulado pelas mitocôndrias correlaciona-se com as suas habilidades em afetar a respiração mitocondrial por um lado, e suas inabilidades em induzir a TPM, por outro lado.
- Os mesmos flavonóides que inibem substancialmente a cadeia respiratória ou promoveram desacoplamento, respectivamente a quercetina e a galangina, também diminuem os níveis mitocondriais de ATP, sugerindo assim maior potencial para indução de necrose em relação aos flavonóides que induziram a TPM, taxifolina e catequina, os quais na ausência de Ca^{2+} não diminuem significativamente os níveis de ATP, sugerindo antes um aparente alto potencial para indução de apoptose.

- A liberação do citocromo c evidenciada para a catequina e taxifolina reforçam o potencial indutor de apoptose destes flavonóides, enquanto que a mesma capacidade induzida pela quercetina e luteolina, sugerem que o fator limitante entre o potencial indutor do processo apoptótico ou necrótico por estas substâncias seja mesmo a diminuição do ATP promovida pela inibição da cadeia respiratória.
- Este estudo está em concordância com relatos prévios propondo que os flavonóides apresentam potencial toxicológico/anti-câncer, e sugerem, além disso, que alterações na energética mitocondrial poderiam estar envolvidas nestes efeitos, seja por indução de necrose ou apoptose.

Por outro lado, os resultados referentes aos estudos da atividade protetora contra os EROs, permitem concluir que:

- A quercetina e a galangina são substancialmente mais potentes que a taxifolina e a catequina em conferir proteção contra a lipoperoxidação, embora somente a quercetina é um efetivo seqüestrador tanto de DPPH[•] quanto de O₂^{•-}.
- Esses resultados sugerem que a dupla ligação na posição 2-3 em conjugação com a função 4-oxo na estrutura dos flavonóides são os determinantes mais importantes da atividade antioxidante dos flavonóides sobre as mitocôndrias.
- Ainda, a presença da estrutura o-di-OH no anel B, conforme observado na quercetina, favorece essa atividade por seqüestro

de $O_2^{\bullet-}$, enquanto que a ausência dessa característica estrutural na galangina, a favorece por diminuição da fluidez de membrana e/ou desacoplamento mitocondrial.

Em relação aos efeitos dos flavonóides sobre as células HepG2, conclui-se:

- A galangina, quercetina e luteolina induzem morte celular após 48 horas de incubação com as células HepG2.
- Galangina e luteolina são também capazes de despolarizar as mitocôndrias, enquanto que a quercetina apresenta apenas pequena tendência neste sentido.
- A morte celular parece acontecer por via apoptótica, já que galangina, quercetina e luteolina expõem fosfatidil serina e estimulam significativamente a atividade das caspases-9 e -3. A cascata apoptótica seria ativada via mitocôndria, devido a ativação da caspase-9 e a disfunção mitocondrial observada.

Já em relação aos estudos da proteção da morte celular induzida pelo pró-oxidante *t*-butilhidroperóxido pela catequina e taxifolina, conclui-se que:

- A taxifolina, mas não a catequina, é capaz de inibir de forma parcial a produção e acúmulo de EROs após exposição das células HepG2 ao *t*-BOOH, efeito que previne assim também de forma parcial, a morte celular via apoptose.

“O que vale na vida não é o ponto de partida, mas sim a caminhada; caminhando e semeando, sempre terás o que colher no final”.

(Cora Coralina)

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; VIALA, C.; RÉMÉSY, C.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochemical Pharmacology**, Londres, v. 53, p. 1649-1657, 1997.

ÅKERMAN, K. E. O.; WIKSTRÖM, M. K. F. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 68, p. 191-197, 1976.

ARORA, A.; BYREM, T.M.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Arch Biochem Biophys.**, New York, v. 373, n. 1, p. 102-109, 2000.

ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.24, p.1355-1363, 1998.

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.81, p. 317S–325S, 2005.

ASHE, P.C.; BERRY, M.D. Apoptotic signaling cascades. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.27, p.199-214, 2003.

BARJA, G. The quantitative measurement of the H₂O₂ generation in isolated mitochondria. **J. Bioenerg. Biomemb.**, v. 34, p. 227-233, 2002.

BERNARDI, P. Mitochondrial transport of cations channels, exchangers and permeability transition. **Physiol. Rev.**, Baltimore, v.70, p.1127-1155, 1999.

BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 8834-8839, 1992.

BERNARDI, P.; PETRONILLI, V.; DI LISA, F.; FORTE, M. A mitochondrial perspective on cell death. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v. 26, p. 112-117, 2001.

BERNARDI, P.; PETRONILLI, V.J. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. **J. Bioenerg. Biomemb.**, v.28, p.131-138, 1996.

BESTWICK, C.S.; MILNE, L. Influence of galangin on HL-60 cell proliferation and survival. **Cancer Letters**, v. 243, p. 80-89, 2006.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v.181, p.1199-1200, 1958.

BOLANM, B.J.; ULUIK, R.J. Release of iron from ferritin by xantine oxidase. Role of the superoxide radical. **Biochemical Journal**, Colchester, v.243, p.55-59, 1987.

BONDAR, V.M.; SWEENEY-GOTSCH, B.; ANDREEFF, M.; MILLS, G.B.; MCCONKEY, D.J. Inhibition of the Phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT Pathway Induces Apoptosis in Pancreatic Carcinoma Cells in Vitro and In Vivo. **Molecular Cancer Therapeutics**. v.1, p. 989-997, 2002.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Meth. Enzymol.**, New York, v.186, p.343-355, 1990.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem. J.**, Tokyo, v.128, p.617-630, 1972.

BOYER, P.D.; CROSS, R.L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.70, p.2837-2839, 1973.

BRINI, M. Ca(2+) signaling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. **Cell Calcium**, v.34, p. 399-405, 2003.

BROOKES, P.S. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v.38, p.12-23, 2005.

BRUSTOVETSKY, N.; KLINGENBERG, M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. **Biochemistry**, v. 35, p. 8483-8488, 1996.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, New York, v.52C, p.302-310, 1978.

CAI, J.; YANG, J.; JONES, D.P. Mitochondrial control of apoptosis. The role of cytochrome c. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1366, p. 139-149, 1998.

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

CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 395-433, 1987.

CHAN, T.S.; GALATI, G.; PANNALA, A.S.; RICE-EVANS, C.; O'BRIEN, P.J. Simultaneous detection of the antioxidant and pro-oxidant activity of dietary polyphenolics in a peroxidase system. **Free Radic. Res.**, London, v.37, p.787-794, 2003.

CHANCE, B.; WILLIAMS; G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol.**, New York, v.17, p.65-134, 1956.

CHERNYAK, B.V.; IZYUMOV, D.S.; LYAMZAEV, K.G.; PASHKOVSKAYA, A.A.; PLETJUSHKINA, O.Y.; ANTONENKO, Y.N.; SAKHAROV, D.V.; WIRTZ, K.W.A.; SKULACHEV, V.P. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, n. 5-6, p. 525-534. 2006.

CONNERN, C.P.; HALESTRAP, A.P. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. **Biochem. J.**, v. 302, p. 321-324, 1994.

COSTANTINI, P.; CHERNYAK, B.V.; PETRONILLI, V.; BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 12, p. 6746-51, 1996.

COTELLE, N. Role of flavonoids in oxidative stress. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.1, p.569-590, 2001.

CROMPTON, M.; ELLINGER, H.; COSTI, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} - dependent pore in hart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochem. J.**, Colchester, v.255, p.357-360, 1988.

DA SILVA, M.M.; SARTORI, A.; BELISLE, E.; KOWALTOWSKI, A.J. Ischemic Preconditioning Inhibits Mitochondrial Respiration, Increases H₂O₂ Release and Enhances K⁺ Transport. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 285, p. H154-H162, 2003.

DASKIEWICZ, J.B.; DEPEINT, F.; VIORNERY, L.; BAYET, C.; COMTE-SARRAZIN, G.; COMTE, G.; M. GEE, J.M.; JOHNSON, I.T.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K.; BARRON, D. Effects of Flavonoids on Cell Proliferation and Caspase Activation in a Human Colonic Cell Line HT29: An SAR Study. **J. Med. Chem.**, v. 48, p. 2790-2804, 2005.

DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochim. Biophys Acta**, v.822, p.1–42, 1985.

DE MACEDO, D.V.; NEPOMUCENO, M.E.; PEREIRA-DA-SILVA, L. Involvement of the ADP/ATP carrier in permeabilization processes of the inner mitochondrial membrane. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, n. 3, p. 595-600, 1993.

DEHN, P. F.; WHITE, C. M.; CONNERS, D. E.; SHIPKEY, G.; CUMBO, T. A. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line as an *in vitro* model for cadmium toxicity studies. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.**, v. 40, n. 5-6, p. 172-182, 2004.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v.65, p.337-353, 1999.

DIXON, R.A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, p. 205–211, 2002.

DORTA, D.J.; CURTI, C.; RODRIGUES, T. Effects of flavonoids on mitochondria: An overview on pharmacological and toxicological aspects. In: MORENO, A.J.M.; OLIVEIRA, P.J.; PALMEIRA, C.M. **Mitochondrial pharmacology and toxicology**. Kerala: Transworld Research Network, cap. 6, p.147-161, 2006.

DORTA, D.J.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E.; RODRIGUES, T.; PRADO, I.M.R.; HELENA, A.F.C.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C.; CURTI, C. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. **Chem. Biol. Interact.**, v.152, p.67-78, 2005.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Res.**, Chicago, v. 57, p.1835-1840, 1997.

EGUCHI, Y.; SRINIVASAN, A.; TOMASELLI, K. J.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction. **Cancer Res.** v. 59, p. 2174–2181, 1999.

EMAUS, R. K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J. J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.850, p.436-448,1986.

ERLEJMAN, A.G.; VERSTRAETEN, S.V.; FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic. Res.*, v.38, p.1311-1320, 2004.

FERRI, K.F.; KROEMER, G. Mitochondria – The suicide organelles. **BioEssays**, v. 23, p. 111-115, 2001.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1721, p. 174-184, 2005.

FREY, T.G.; MANNELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, n.7, p. 319-324. 2000.

GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; GRATACAP, M-P.; TULLIEZ, J.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-Kinase. **General Pharmacology**, v. 32, p. 279-286, 1999.

GRANADO-SERRANO, A.B.; MARTÍN, M.A.; BRAVO, L.; GOYA,L.; RAMOS,S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 2715-2721, 2006.

GRATTAGLIANO, I.; PORTINCASA, P.; PALMIERI, V. O.; PALASCIANO, G. Overview on the mechanisms of drug-induced liver cell death. **Ann. Hepatol.**, v. 1, p. 162-168, 2002.

GROSS, A.; YIN, X.M.; WANG, K.; WEI, M.C.; JOCKEL, J.; MILLIMAN, C.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; KORSMEYER, S. J. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 1156-1163, 1999.

GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S-S.; GAVIN, C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.**, Baltimore, v.267, p.C313-C339, 1994.

HAJNOCZKY, G.; DAVIES, E.; MADESH, M. Calcium signaling and apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 304, p. 445-454, 2003.

HALESTRAP, A.P.; DAVIDSON, A.M. Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. **Biochem J.** v. 268, n. 1, p.153-60, 1990.

HALESTRAP, A.P.; MCSTAY, G.P.; CLARKE, S.J. The permeability transition pore complex: another view. **Biochimie.**, Paris, v. 84, p. 153-166, 2002.

HALESTRAP, A.P.; WOODFIELD, K.Y.; CONNERN, C.P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. **J Biol Chem.**, v. 272, n. 6, p. 3346-3354, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3 ed. Oxford University Press, New York., 1999.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therap.**, New York, v.96, p.67-202, 2002.

HEIJNEM, C.G.M.; HAENEN, G.R.M.M.; OOSTVEEN, R.M.; STALPERS, E.M.; BAST, AALT. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Radic. Res.**, London, v.36, p.575-581, 2002.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2000.

HOCH FL. Cardiolipins and biomembrane function. **Biochim Biophys Acta**. v.1113, n.1, p.71-133, 1992.

HOCKENBERRY, D.M.; OLTVAI, Z.N.; YIN, X.M.; MILLIMAN, C.L.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**, v. 75, p. 241-251, 1993.

HODNICK, W.F.; MILOSAVLJEVIC, E.B.; NELSON, J.H.; PARDINI, R.S. Eletrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. **Biochem. Pharmacol.**, Berlin, v.37, p.2607-2611, 1988.

HOLY, J. M. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 518, p. 71–84, 2002.

HSU, Y.L.; KUO, P.L.; LIN, C.C Acacetin inhibits the proliferation of HepG2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, v.67, p. 823-829, 2004.

HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York., v.1952, p.453-459, 1979.

HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A.; SOUTHARD, J.H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. **J Biol Chem.**, v. 251, n. 16, p. 5069-5077, 1976.

IMBERTI, R.; NIEMINEN, A-L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 265, p. 392-400, 1993.

KIM, J.S.; HE, L.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 304, p. 463-470, 2003.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-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.

KO, C.H.; SHEN, S.C.; CHEN, Y.C. Hydroxylation at C4' or C6 is essential for apoptosis-inducing activity of flavanone through activation of the caspases-3 cascade and production of reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 7, p. 897 – 910, 2004.

KO, C.H.; SHEN, S.C.; HSU, S.C.; CHEN, Y.C. Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, and caspase cascade. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 913–927, 2005.

KORSHUNOV, S.S.; SKULACHEV, V.P.; STARKOV, A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Lett.**, v. 416, p. 15–18, 1997.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Ca(2+)-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. **Am J Physiol.**, v. 269, p. C141-C147, 1995.

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

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Letters**, v. 378, p. 150-152, 1996.

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

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E.; FISKUM, G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. **Cell Death Diff.**, v. 7, p. 903-910, 2000.

KROEMER, G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.304, n.3, p.433-435, 2003.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v.60, p.619-642, 1998.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Eur. J. Nutr.**, v. 38, p.133–142, 1999.

KURUVILLA, S.; QUALLS, C.W.; TYLER, R.D.; WITHERSPOON, S.M.; BENAVIDES, G.R.; YOON, L.W.; DOLD, K.; H. BROWN, R.H.; SANGIAH, S.; MORGAN, K.T. Effects of minimally toxic levels of carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), elucidated through differential gene expresssion with biochemical and morphological correlations. **Toxicological Sciences**, v. 73, p. 348–361, 2003.

LABUDA, J.; BUÈKOVÁ, M.; ·HEILEROVÁ, L.; ŠILHÁR, S.; ·ŠTEPÁNEK, I. Evaluation of the redox properties and anti/pro-oxidant effects on selected flavonoids by means of a DNA-based electrochemical biosensor. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.376, p.168–173, 2003.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n.5259, p. 680-685, 1970.

LAMBERT, J.D.; HONG, J.; YANG, G-Y.; LIAO, J.; YANG, C.S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **Am J Clin Nutr**, v. 81, p. 284S–291S, 2005.

LEE, H.J; WANG, C.J; KUO, H.C.; CHOU, F.P.; JEAN, L.F.; TSENG, T.H. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 124– 131, 2005.

LEE, J.; YU, B.P.; HERLIHY, J.T. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.26, p.260-265, 1999.

LEMASTERS, J.J. Mechanisms of hepatic toxicity V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **Am J Physiol.**, v.276, n.1, p. G1-G6, 1999.

LEMASTERS, J.J.; DIGIUSEPPI, J.; NIEMINEN, A.L.; HERMAN, B. Blebbing, free Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential preceding cell death hepatocytes. **Nature**, New York, v. 325, p. 78-81, 1987.

LESNEFSKY, E.J.; MOGHADDAS, S.; TANDLER, B.; KERNER, J.; HOPPEL, C.L. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 33, p. 1065-1089, 2001.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **J. Neurochem.**, v. 80, p. 780-787, 2002.

LOS, M.; BUREK, C.J.; STROH, C.; BENEDYK, K.; HUG, H.; MACKIEWICZ, A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as target for drug design. **DDT**, v.8, p. 67-77, 2003.

LOWE, S.W.; LIN, A.W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, London, v.21, p.485-495, 2000.

LU, H.F.; HSUEH, S.C.; HO, Y.T.; KAO, M.C.; YANG, J.S.; CHIU, T.H.; HUANG, S.Y.; LIN, C.C.; CHUNG, J.G. ROS mediates baicalin-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells through the expression of the Gadd153 and mitochondrial-dependent pathway. **Anticancer Res.**, v. 27, n. 1A, p.117-125, 2007.

MANNELLA, C.A. Application of electron tomography to mitochondrial research. **Methods Cell Biol.**, v. 65, p. 245-256, 2001.

MATSUI, J.; KIYOKAWA, N.; TAKENOUCHI, H.; TAGUCHI, T.; SUZUKI, K.; SHIOZAWA, Y.; SAITO, M.; TANG, W.; KATAGIRI, Y.U.; OKITA, H.; FUJIMOTO, J. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 29, p. 573–581, 2005.

METODIEWA, D.; JAISWAL, A.K.; CENAS, N.; DICKANCAITÉ, E.; SEGURA-AGUILAR, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. **Free Radic. Biol. Med.**, v.26, p.107-116, 1999.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v.52, p.673-751, 2000.

MIRA, L.; FERNANDEZ, M.T.; SANTOS, M.; ROCHA, R.; FLORÊNCIO, M.H.; JENNINGS, K.R. **Free Radic. Res.**, London, v.36, p.1199-1208, 2002.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v.191, p.144-148, 1961.

MONASTERIO, A.; URDACI, M.C.; PINCHUK, I.V.; LÓPEZ-MORATALLA, N.; MARTÍNEZ-IRUJO, J.J. Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. **Nutrition and Cancer**, v. 50, n. 1, p. 90–100, 2004.

MORIDANI, M.Y.; POURAHMAD, J., BUI, H.; SIRAKI, A.; O'BRIEN, P.J. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.34, p.243-253, 2003.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics 2**. Academic Press Inc.: London, 1982.

NICHOLS, D.G.; CROMPTON, M. Mitochondrial calcium transport. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.111, p.261-268, 1980.

ORRENIUS, S.; McCONKEY, D.J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v.10, p.281-285, 1989.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, p. 552-565, 2003.

PAPADOPOULOS, N. G.; DEDOUSSIS, G. V.; SPANAKOS, G.; GRITZAPIS, A. D.; BAXEVANIS, C. N.; PAPAMICHAIL, M. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v. 177, p.101–111, 1994.

PARK, C.; SO, H-S.; SHIN, C-H.; BAEK, S-H.; MOON, B-S.; SHIN, S-H.; LEE, H-S.; LEE, D-W.; PARK, R. Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis *via* inhibition of mitochondrial dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells. **Biochem. Pharmacol.**, v.66, p.1287-1295, 2003.

PEDERSEN, P.L.; GREENAWALT, J.W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G.L.; SOPER, J.W.; BUSTAMENTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Meth. Cell. Biol.**, v. 20, p.411-481, 1978.

PETRONILLI, V.; COLA, C.; BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporine A-sensitive Permeability transition Pore - II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca^{2+} . **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 1011-1016, 1993.

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

PFEIFFER, D.R.; PALMER, J.W.; BEATRICE, M.C.; STIERS, D.L. The mechanism and regulation of Ca^{2+} efflux from mitochondria. In: LENON, D.F.L.; STRATMAN, F.W.; ZAHTEN, R.N. (Eds.). **Biochemical Metabolism Processes**. New York: Elsevier/North-Holland, p.67-80, 1983.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, Pittsburgh, v.63, p.1035-1042, 2000.

PINTI, M.; TROIANO, L.; NASI, M.; FERRARESI, R.; DOBRUCKI, J.; COSSARIZZA, A. Hepatoma HepG2 cells as a model for in vitro studies on mitochondrial toxicity of antiviral drugs: which correlation with the patient? **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 17, n. 2, p. 166-171, 2003.

RAVANEL, P. Uncoupling activity of a series of flavones and flavonols on isolated plant mitochondria. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1015-1020, 1986.

REN, W.; QIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. **Medicinal Research Reviews**, v.23, p.519-534, 2003.

RICE-EVANS, C. Flavonoids and Isoflavones: Absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Radic. Biol. Med.**, v.36, p. 827-828, 2004.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.20, p.331-342, 1996.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anion. **Biochemical Pharmacology**, London, v.37, p.837-841, 1988.

RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; HE, L; LEMASTERS, J.J. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 2463-2472, 2004.

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 animal cells. **J. Chromatogr.**, v. 570, p. 77–88, 1991.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radic. Biol. Med.**, v.19, p.481-486, 1995.

SALVESEN, G.S.; DIXIT, V. M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, Cambridge, v.91, n.4, p. 443-446, 1997.

SALVI, M.; BRUNATI, A. M.; CLARI, G.; TONINELLO, A. Interaction of genistein in the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1556, p. 187-196, 2002.

SANTOS, A.C.; UYEMURA, S.A.; LOPES, J.L.C.; BAZON, J.N.; MINGATTO, F.E.; CURTI, C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.24, p.1455-1461, 1998.

SAVILL, J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Br Med Bull.**, v.53, n.3, p.491-508, 1997.

SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators.. **Methods in Enzymology**, New York, v. 56, p.301-338, 1979.

SILVA, M.M.; SANTOS, M.R.; CAROÇO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA, L. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids: a re-examination. **Free Radic. Res.**, London, v.36, p.1219-1227, 2002.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.82, p. 1107–1112, 1990.

SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T.. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 375–383, 2000.

SKULACHEV, V.P. Mitochondria in programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong". **IUBMB Life**, v.49, p.365-373, 2000.

SKULACHEV, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1363, p. 100–124, 1998.

St-PIERRE, J.; BUCKINGHAM, J.S.; ROEBUCK, S.J.; BRAND, M.S. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.277, p.44784-44790, 2002.

STRYER L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, 4 ed., 1996.

SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1366, n. 1-2, p. 151-165, 1998.

SZABO, I.; DE PINTO, V.; ZORATTI, M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. **FEBS Lett.**, v. 330, n. 2, p. 206-210, 1993.

SZABO, I.; ZORATTI, M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. **FEBS Lett.**, v. 330, n. 2, p. 201-205, 1993.

THORE, A. Technical aspects of bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. **Science Tools**, Stockholm, v.26, n.2, p.30-34, 1979.

TOWBIN, H; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 237, p. 408–414, 1985.

TURRENS, J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosc. Rep.**, v. 17, p. 3-8, 1997.

UEDA, S.; NAKAMURA, H.; MASUTANI, H.; SASADA, T.; TAKABAYASHI, A.; YAMAOKA, Y.; YODOI, J. Baicalein induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Molecular Immunology**, Elmsford, v.38, p.781-791, 2001.

VAN ACKER, S.A.B.E.; VAN BALEN, G.P.; VAN DEN BERG, D-J.; BAST, A.; VAN DER VIJGH, W.J.F. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochem. Pharmacol.**, London, v.56, p.935-943, 1998.

VAN ACKER, S.A.B.E.; VAN DER BERG, D-J; TROMP, M.N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.; VAN BENNEKOM, W.P.; VAN DER VIJGH, W.J.F., BAST, A.A.L.T. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.22, p.749-760, 1996.

VAN DIJK, C.; DRIESSEN, A. J. M.; RECOURT, D. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. **Biochem. Pharmacol.**, v.60, p. 1593-1600, 2000.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonóides. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 36, p. 829-837, 2004.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes Dev.**, New York, v.15, p.2922-2933, 2001.

WOLTER, K.;G. HSU, Y.T.; SMITH, C.L.; NECHUSHTAN, A.; XI, X.G.; YOULE, R. J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. **J. Cell Biol.** v. 139, p. 1281-1292, 1997.

YEE, S.B.; LEE, J.H.; CHUNG, H.Y.; IM, K.S.; BAE, S.J.; CHOL, J.S.; KIM, N.D. Inhibitory effects of Luteolin isolated from *Ixeris sonchifolia* Hance on the proliferation of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. **Arch. Pharm. Res.**, v. 26, n. 2, p. 151-156, 2003.

YOON, H.S.; MOON, S.C.; KIM, N.D.; PARK, B.S.; JEONG, M.H.; YOO, Y.H. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.276, p.151-156, 2000.

YU, Z.; LI, W.; LIU, F. Inhibition and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. **Cancer Letters**, v. 215, p. 159-166, 2004.

ZEGURA, B. LAH, T.T., FELIPIC, M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. **Toxicology**, v.200, p.59-68, 2004.

ZHIVOTOVSKY, B.; SAMALL, A.; ORRENIUS, S. Determination of apoptosis and necrosis. In: COSTA, L.G.; HODGSON, E.; LAWRENCE, D.A.; REED, D.J.; GREENLEE, W.F. (Eds.), **Current protocols in toxicology**, Wiley Inter Science:Hoboken, USA, p. 192-225, 1999.

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

ZOU, H.; LI, Y.; LIU, X.; WANG, X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.274, p.11549-11556, 1999.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.A.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MANTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC45 cap.23, p.489-516, 1999.