UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos da triacsin C e da clusianona no metabolismo energético de
mitocôndrias e células hepáticas isoladas de rato**

Felippe Henrique Zuccolotto dos Reis

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos da triacsin C e da clusianona no metabolismo energético de
mitocôndrias e células hepáticas isoladas de rato**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientado: Felipe Henrique Zuccolotto dos Reis
Orientador: Profa. Dra. Luciane Carla Alberici

“Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 17/04/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP”.

Ribeirão Preto
2014

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Dos Reis, Felipe Henrique Zuccolotto

Efeitos da triacsin C e da clusianona no metabolismo energético de mitocôndrias e células hepáticas isoladas de rato. Ribeirão Preto, 2014.

102p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Orientador: Profa. Dra. Luciane Carla Alberici

1. Mitocôndria. 2. Hepatócito. 3. Triacsin C. 4. Clusianona

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dos Reis, Felipe Henrique Zuccolotto. **Efeitos da triacsin C e da clusianona no metabolismo energético de mitocôndrias e células hepáticas isoladas de rato.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia

Orientador: Profa. Dra. Luciane Carla Alberici

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho à minha filha **Melissa**:
espero que, de alguma forma, te sirva de
exemplo para as decisões da vida*

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu pai **José Plínio** e minha mãe **Neifla** por tudo o que fizeram por mim nesta vida.

À Minha irmã **Flávia**

Ao Meu padrinho **João Henrique** por se dispor a me ajudar nos meus sonhos

À **Profa. Dra. Luciane Alberici** por me ensinar o valor da atitude no laboratório. Isso refletiu nos artigos que foram publicados durante o meu tempo na pós graduação

Ao **Prof. Dr. Sérgio Akira** por me ensinar o valor do exemplo no laboratório, pois devemos aprender duma forma a ser possível transmitir o conhecimento aprendido

Ao **Prof. Dr. Carlos Curti** por me ensinar o valor do silêncio no laboratório. Muitas vezes o silêncio é a melhor forma para dizer muitas coisas

Ao pesquisador e colaborador cubano **Dr. Gilberto Pardo** pela dedicação nos experimentos de mitocôndria e por complementar minha formação como pesquisador

Ao **Dr. Luiz Ricardo** por me ensinar preciosas técnicas cirúrgicas

À **Profa. Dra. Emy Iwamoto**, **Prof. Dr. Adelar Bracht** e toda sua equipe pela dedicação em me ensinar a técnica de isolamento de hepatócitos

Aos professores **Dr. Zeki Naal**, **Dr. César Spadaro**, **Dra. Yara Valim**, **Dr. Eduardo Brandt**, **Dr. Bernardo Mantovani**, **Dr. Sérgio Zucoloto** (*in memoriam*), **Dr. Leonardo Silveira**, **Dra. Isis Kettelhut** e **Dra. Carem G. V. Rechia** por compartilhar o conhecimento. Foi bastante útil para execução do meu trabalho

Um agradecimento especial ao técnico de laboratório **Alcides**, por não me abandonar nos momentos difíceis da padronização da técnica de isolamento de hepatócitos

Ana Cristina, Nadir, Franco, Hamilton, Emerson, Ana Elisa, Aguinaldo e Ieda por me ajudarem nos desafios experimentais

À **Fernanda Maciel** pela identificação, cultura e antibiograma das bactérias que me atormentaram durante a padronização da cultura de hepatócitos. O projeto teria sido inviabilizado se eu não soubesse qual antibiótico usar na descontaminação das amostras

Ao **Bruno Gonzaga** por me ajudar e ensinar as técnicas de cDNA e RT-PCR. Sem sua ajuda, a biologia molecular seria um tabu pra mim

Aos amigos e amigas do laboratório: **Ingrid, Flávia, Igor, Murilo, Felipe, Vitor, Micássio, Everton, Amanda Ouchida, André, Javier, Michel, Fernando, César, Cristina** e todos que esqueci o nome mas não o rosto pela convivência e harmonia

Aos irmãos da república: **Ricardo, Claudio, Tadeu, Mateus, André** e **Ivone** (mãe) pela convivência, risadas e festas

Aos reais amigos de Frutal e aqueles envolvidos com o rock'n`roll por tranquilizar a alma

Ao **Alisson Moraes** pelas artes gráficas

Página do pós graduando no facebook por me fornecer as engraçadas informações necessárias para sobrevivência na pós graduação

Aos ratos que tornaram esse trabalho possível.....

*"I heard them tell me that this land of dreams was now
I told them I had ridden shooting stars
And said I'd show them how"*

Ozzy Osbourne

RESUMO

DOS REIS, F. H. Z.. **Efeitos da triacsin C e da clusianona no metabolismo energético de mitocôndrias e células hepáticas isoladas de rato**. 2014. 102f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Introdução e objetivos: Tem sido demonstrado que um moderado desacoplamento mitocondrial em células hepáticas pode reverter a hipertrigliceridemia, a doença de fígado gorduroso e a resistência à insulina. A dissipação da energia conservada no espaço intermembranas mitocondrial, como ocorre no desacoplamento, aumenta o uso de substratos energéticos e também podem reduzir a geração mitocondrial de espécies reativas de O₂ (EROs). Duas estratégias de desacoplamento mitocondrial foram estudadas neste trabalho: a primeira consistiu em reduzir a velocidade da via de síntese de triacilgliceróis por meio da triacsin C (inibidor da Acil CoA Sintetase - ACS), e dessa forma aumentar os ácidos graxos livres (AGL) como substratos das proteínas desacopladoras; a segunda foi verificar se clusianona (composto natural das raízes de *Clusia congestiflora*), análogo estrutural do desacoplador químico nemorosoma, é capaz de promover o desacoplamento químico. **Resultados e discussão:** A triacsin C, em concentrações até 1 µM, não apresentou efeito tóxico em mitocôndrias isoladas de fígado e nem em hepatócitos primários. Nesses últimos, aumentou o consumo de oxigênio nos estados de respiração basal e de máxima velocidade respiratória. Além disso, foi verificado um aumento da expressão do fator de transcrição PGC1- alfa e de β-hidroxiacil CoA desidrogenase (HAD), uma enzima da beta-oxidação de ácidos graxos. A clusianona aumentou o consumo de O₂ no estado de repouso, diminuiu o potencial de membrana, reduziu a produção de EROs e preveniu o inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ de forma dose dependente, porém menos potente que a nemorosona. **Conclusões:** Nossos resultados indicam que a triacsin C acelerou o metabolismo mitocondrial, a oxidação de ácidos graxos e a biogênese mitocondrial; a clusianona foi caracterizada como um desacoplador eficaz da fosforilação oxidativa mitocondrial, provavelmente envolvendo um mecanismo protonofórico devido as suas propriedades químicas. Dessa forma, ambas as estratégias estudadas se mostram com potencial terapêutico no tratamento de doenças como esteatose hepática, hipertrigliceridemia e obesidade.

Palavras-chave: mitocôndria, hepatócito, triacsin c, clusianona

ABSTRACT

DOS REIS, F. H. Z. **Effects of triacsin C or clusianone on energy metabolism of mitochondria and isolated rat liver cells.** 2014. 102f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Introduction and Objectives: It has been shown that a mild mitochondrial uncoupling in livers can reverse hypertriglyceridemia, fatty liver disease and insulin resistance. The dissipation of energy stored in mitochondrial intermembrane space as heat, as in uncoupling, increases the use of energy substrates and may also reduce the mitochondrial generation of reactive O₂ species (ROS). Two strategies to induce mitochondrial uncoupling were studied in this work: the first consisted of slowing down the route of triacylglycerols synthesis by triacsin C (acyl CoA synthetase inhibitor), and thus increasing the free fatty acids (FFA) as substrates for uncoupling proteins; the second was to determine whether clusianone (natural compound from the roots of *Clusia congestiflora*), a structural analogue of chemical uncoupler nemorosoma, is capable of promoting the chemical uncoupling. **Results and discussion:** The triacsin C, in concentrations up to 1 µM, showed no toxic effect on liver mitochondria and primary hepatocytes. In hepatocytes triacsin C increased oxygen consumption in the states of basal respiration and maximum respiratory rate. In addition, there was an increase in the expression of the transcription factor PGC1 - α and β - hydroxyacyl CoA dehydrogenase (ADH), an enzyme of β- oxidation of fatty acids. The clusianone increased O₂ consumption in resting state, decreased membrane potential, reduced the production of ROS and prevented the mitochondrial swelling induced by Ca²⁺ in a dose dependent manner, but less potent than nemorosone. **Conclusions:** Our results indicate that triacsin C accelerated mitochondrial metabolism, fatty acid oxidation and mitochondrial biogenesis; the clusianone was characterized as an effective uncoupler of mitochondrial oxidative phosphorylation, probably involving a protonoforic mechanism due to its chemical properties. Therefore, both strategies have therapeutic potential in the treatment of diseases such as liver steatosis, hypertriglyceridemia and obesity.

Keywords: mitochondria, hepatocyte, triacsin c, clusianone

ABSTRACTO

DOS REIS, F. H. Z. **Efectos de la Triacsin C y clusianone en el metabolismo energético de las mitocondrias aisladas y células de hígado de rata.** 2014. 102f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Introducción y objetivos: Se ha demostrado que un desacoplamiento mitocondrial moderada en el hígado puede revertir la hipertrigliceridemia, la enfermedad de hígado graso y resistencia a la insulina. La disipación de la energía almacenada en el espacio intermembranas mitocondrial en forma de calor, como en el desacoplamiento aumenta el uso de sustratos de energía y también puede reducir la generación mitocondrial de especies reactivas de O_2 (ROS). Dos estrategias de desacoplamiento mitocondrial fueron estudiados en este trabajo : la primera consistió en la ralentización de la ruta de síntesis de triglicéridos por Triacsin C (inhibidor de la acil-CoA sintetasa - ACS), y por lo tanto aumentan los ácidos grasos libres (AGL) como sustratos de proteínas de desacoplamiento y el segundo fue determinar si clusianone (compuesto natural de las raíces de *Clusia congestiflora*), análogo estructural de nemorosoma desacoplador química, es capaz de promover la disociación química. **Resultado general y discusión :** La Triacsin C , en concentraciones de hasta 1 μM , no mostraron ningún efecto tóxico en las mitocondrias de hígado y no en hepatocitos primarios . En el aumento del consumo reciente de oxígeno en los estados de respiración basal y la velocidad máxima respiratoria. Además, hubo un aumento de la expresión del factor de transcripción PGC1 - α y β - hidroxiacl CoA deshidrogenasa (ADH), una enzima de α - oxidación de los ácidos grasos. El clusianone aumentó el consumo de O_2 en estado de reposo, disminución de potencial de membrana, reduce la producción de ROS, y evita la hinchazón mitocondrial inducida por Ca^{+2} dependiente de la dosis, pero menos potente que NEMOROSONE. **Conclusiones:** Nuestros resultados indican que C Triacsin acelera el metabolismo mitocondrial, la oxidación de ácidos grasos y la biogénesis mitocondrial, la clusianone se caracterizó como un desacoplador eficaz de la fosforilación oxidativa mitocondrial, probablemente la participación de un mecanismo protonofórico debido a sus propiedades químicas. Por lo tanto, ambas estrategias se muestran estudiado con potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades como la esteatosis hepática, la hipertrigliceridemia y la obesidad.

Palabras clave: mitocondria, hepatocitos, triacsin c, clusianona

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Hepatócitos isolados por técnica de perfusão hepática utilizando collagenase, fixados e corados por hematoxilina/eosina. Aumento de 1000x.....	58
Figura 2.	Vias metabólicas da acil-CoA e inibição pela Triacsin. AA, ácido aracdônico; ACS, acil-CoA sintetase; CL, cardiolipina; FA, ácido graxo; LPA, ácido lisofosfatídico; PC fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; T, Triacsin.....	58
Figura 3.	Ilustração da anatomia de uma mitocôndria. Na figura estão demonstrados os componentes e algumas propriedades das membranas mitocondriais. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)	59
Figura 4.	Catabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas divididos em 3 estágios da respiração celular. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)	59
Figura 5.	Ubiquinona (também chamada de coenzima Q). Na figura é observada a redução completa da ubiquinona em ubiquinol, necessitando de 2 elétrons. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)	60
Figura 6.	Grupos prostéticos dos citocromos. Os citocromos possuem um átomo de ferro ligado a 4 átomos de nitrogênio de uma molécula de porfirina. Observar a cauda isoprenóide (em azul) encontrada no Heme A e as ligações tioéster (em azul) encontradas no Heme C. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011).....	60
Figura 7.	Centros de ferro-enxofre. Eles podem ser simples com apenas um átomo de ferro (a) , dois (b) e até 4 (c) . (Adaptado de Nelson & Cox, 2011).....	61

Figura 8.	Modelo quimiosmótico. Na figura estão demonstrados os complexos da cadeia respiratória e complexo da ATPase inseridos na membrana interna mitocondrial. As setas azuis indicam o fluxo dos elétrons até o oxigênio molecular inserido no complexo IV, intermediado pelo citocromo <i>c</i> (seta preta tracejada). As setas rosas indicam o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranas mitocondrial, formando um potencial eletroquímico, e do espaço intermembranas para a matriz, com a fosforilação do ADP. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)	61
Figura 9.	Formação de EROs nas mitocôndrias e defesas mitocondriais. O ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) é produzido nos complexos I e III à medida que o radical ubiquinona parcialmente reduzido doa um elétron para o O_2 . O superóxido reage com a enzima aconitase (uma proteína 4Fe-4S do ciclo de Krebs) liberando Fe^{2+} . Na presença de Fe^{2+} , a reação de Fenton leva a formação do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), fortemente reativo. As reações em azul mostram a atuação do sistema antioxidante: a glutathiona reduzida (GSH) doa elétrons para a redução de H_2O_2 e dos resíduos oxidados de cisteína (-S-S-) de enzimas e outras proteínas, sendo regenerada através da redução da sua forma oxidada (GSSG) pelo NADPH. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011).....	62
Figura 10.	Resumo das vias intrínseca, extrínseca e efetora da apoptose. As vias intrínsecas e extrínsecas acontecem de maneiras distintas, porém convergentes a uma via efetora, que culmina na ativação de endonucleases e colapso do citoesqueleto, para formar os corpos apoptóticos. (Retirado de Kumar, Abbas e Fausto, 2007)	63
Figura 11.	Desacoplamento por UCPs. As proteínas desacopladoras permitem que a energia conservada pelo bombeamento de prótons seja dissipada como calor, gerando um ciclo fútil dos prótons. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)	64
Figura 12.	Estrutura molecular da Triacsin C: <i>N</i> -(((2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-undeca-2,4,7-trienilideno)amino)nitroso amida.....	64

Figura 13.	Estrutura química do DNP e FCCP. As duas moléculas possuem em comum um próton dissociável e são muito hidrofóbicas, característica que permite a passagem por membranas plasmáticas. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)	65
Figura 14.	(A) Estrutura molecular da clusianona: rel-(1R,5R,7R)-3-benzoil-4-hidroxi-8,8-dimetil-1,5,7-tris (3-metilbut-2-en-1-il)biciclo[3.3.1]non-3-ene-2,9-diona e (B) nemorosona:rel-(1R,5R,7S)-1-benzoil-4-hidroxi-8,8-dimetil-3,5,7-tris(3-metilbut-2-en-1-il)biciclo[3.3.1]non-3-ene-2,9-diona	65
Figura 15.	Diferença entre hepatócitos e outras células hepáticas. Os hepatócitos (seta preta) são binucleados, ao passo que as outras células não (seta vermelha). Células fixadas e coradas com hematoxilina/eosina. Aumento de 400x.....	66
Figura 16.	Efeitos das concentrações crescentes de Triacsin C sobre a velocidade de respiração no (A) estado II, (B) estado III, (C) estado IV e (D) razão do controle respiratório em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM e rotenona 2,5 µM. A oligomicina 1 µg/mL foi adicionada após a determinação do estado IV. Médias ± EPM * <i>P</i> < 0,05 vs controle (<i>n</i> =4)	67
Figura 17.	Efeitos das concentrações crescentes de Triacsin C sobre a velocidade de respiração em presença de palmitato 1µM no (A) estado II, (B) estado III, (C) estado IV e (D) controle respiratório em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM e rotenona 2,5 µM. A oligomicina 1 µg/mL foi adicionada após a determinação do estado IV. Médias ± EPM * <i>P</i> < 0,05 vs controle (<i>n</i> =4)	68
Figura 18.	Produção de H ₂ O ₂ induzida por Triacsin C em mitocôndrias isoladas de fígado. Em (a) Controle, (b) Triacsin C 1 µM, (c) Triacsin C 2 µM, (d) Triacsin C 10 µM, (e) Triacsin C 15 µM e (f) Triacsin C 20 µM. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM, rotenona 2,5 µM e EGTA 0,1 mM. Médias ± EPM * <i>P</i> < 0,05 vs controle (<i>n</i> =4)	69

Figura 19.	Inchamento induzido pela Triacsin C em mitocôndrias de fígado. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5mM, rotenona 2,5 μ M e Ca^{2+} 20 μ M. Médias $\pm$ EPM * $P < 0,05$ vs controle ($n=4$).....	70
Figura 20.	Células hepáticas em cultura. Observar a tendência dos hepatócitos em formar cordões. Cultivo em DMEM completo em condições descritas em materiais e métodos. Aumento de 400x	70
Figura 21.	Análise de viabilidade celular de hepatócitos primários pelo tempo de tratamento com Triacsin C 1 μ M, utilizando PI como marcador fluorescente para morte celular. O PI (1 mg/mL) foi adicionado 1 minuto antes da análise por citometria de fluxo utilizando o citômetro Guava easyCyte 8 HT (Millipore TM).....	71
Figura 22.	Análise de viabilidade celular de hepatócitos primários tratados com Triacsin C, por citometria de fluxo utilizando anexina V e PI como marcadores fluorescentes. Os hepatócitos foram tratados com DMSO 1: 1000 (V: V) como controle, Triacsin C 1 μ M, DMSO 20% e terc butil hidroperóxido (TB) 250 μ M, como controles positivos para necrose e apoptose respectivamente, em DMEM completo, nas condições descritas em materiais e métodos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ vs DMSO	71
Figura 23.	Consumo de O_2 por hepatócitos primários tratados com Triacsin C por 4 (A) e 8 (B) horas. Os hepatócitos foram tratados com Triacsin C 1 μ mol/L e/ou DMSO 1: 1000 (V: V) em DMEM completo nas condições descritas em materiais e métodos. Média $\pm$ EPM * $P < 0,05$ vs DMSO ($n=4$).....	72
Figura 24.	Efeitos da Triacsin C sobre a expressão de (A) PGC1 alfa e (B) HAD. Os hepatócitos foram tratados com Triacsin C 1 μ mol/L e DMSO como controle, como descrito em materiais e métodos. Médias $\pm$ EPM * $P < 0,05$ vs controle ($n=4$).....	73

- Figura 25.** Efeito da clusianona no estado III, estado IV, V_{CCCP} , razão controle respiratório (RCR) e razão ADP/O em mitocôndrias isoladas de fígado. CCCP 1 μM foi adicionado após a determinação do estado IV. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM e rotenona 2,5 μM . As condições foram: (a) o controle, (b) 0,1, (c) 0,3, (d) 0,5, (e) 1 μM de clusianona, e (f) 0,5 μM nemorosona (NEM). Para a determinação de V3 e VCCCP, 100 μM de ADP ou 1 μM de CCCP foram adicionados onde indicado. V4 foi determinada após o esgotamento do ADP. As barras representam a média $\pm$ SEM ($n = 3$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. $P < 0,05$ quando comparados a todos grupos de acordo com teste ANOVA e post hoc Newman-Keuls..... 74
- Figura 26.** Liberação de H_2O_2 induzida por clusianona em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Em (a) controle, (b-d) 0,5, 1,0 e 2,5 μM de clusianona e (e) 0,5 μM de nemorosona. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM, rotenona 2,5 μM e EGTA 0,1 Mm..... 75
- Figura 27.** Prevenção do inchamento por clusianona e nemorosona em mitocôndrias de fígado. Clusianona 0,5, 1 e 2,5 μM (linhas b-d) foram comparadas com o controle (linha a), 1 $\mu\text{mol/L}$ de CSA (linha f) e nemorosona 0,5 μM (linha e). As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM, rotenona 2,5 μM e Ca^{2+} 20 μM 75
- Figura 28.** Dissipação do potencial intermembrana mitocondrial induzido por clusianona e nemorsona em mitocôndrias de fígado. Clusianona 0,1, 1, 2,5 e 5 μM (linhas b-e) foram comparadas com o controle (linha a) e nemorosona 0,5 μM . As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM e rotenona 2,5 μM . O CCCP 1 μM foi adicionado após a estabilização do potencial intermembrana 76

LISTA DE TABELAS

Tabela I.	Porcentagem de hepatócitos em células recém isoladas e células em cultura depois de 24 horas	78
Tabela II.	Sequências de sense e antisense dos primers utilizados nos ensaios de tempo real de RT-PCR, PGC1 α e HAD.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TAG – triacilglicerol

GLUT – transportador de glicose

G-6-P- glicose- 6- fosfato

VLDL- lipoproteína de densidade muito baixa

ATP- adenosina trifosfato

CoA- coenzima A

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)

GSH- glutationa (estado reduzido)

EROs- espécies reativas ao oxigênio

AGL- ácido graxo livre

ACS- acil-CoA sintetase

DNA- ácido desoxirribonucleico

CO₂- gás carbônico

GTP- guanosina trifosfato

NADH- nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

FADH₂- flavina adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

NAD⁺- nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)

FAD⁺- flavina adenina dinucleotídeo (estado oxidado)

H⁺ - próton

O₂- oxigênio molecular

·QH- radical semiquinona

QH₂- ubiquinol

Fe-S- centro de ferro-enxofre

pH- potencial hidrogeniônico

ΔΨ- potencial de membrana mitocondrial

TPM- transição de permeabilidade mitocondrial

O₂^{·-}- ânion superóxido

H₂O₂- peróxido de hidrogênio

Fe²⁺- ferro (estado ferroso)

·OH- radical hidroxila

Ca²⁺- cálcio

CsA- ciclosporina A
 Bcl-2- B-cell lymphoma 2
 Bcl-x- B-cell lymphoma X
 AIF- fator indutor de apoptose
 Apaf-1- fator ativador de proteases pró-apoptóticas-1
 UCP- proteína desacopladora
 $\Delta\mu\text{H}^+$ - gradiente eletroquímico de prótons
 mitoK_{ATP}- canais de K⁺ sensíveis a ATP
 P_i- fosfato
 H₂O- água
 ANT- translocador de nucleotídeos de adenina
 IMAC- canal de condutância de anions pH-dependente
 TAG- triacilglicerol
 DNP- dinitrofenol
 FCCP- *carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*
 CCCP- cianeto de carbonila metaclorofenilhidrazona
 EGTA- *ethylene glycol tetraacetic acid*
 HEPES- *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
 KCl- cloreto de potássio
 KH₂PO₄- fosfato de potássio bibásico
 MgCl₂- cloreto de magnésio
 NaCl- cloreto de sódio
 MgSO₄- sulfato de magnésio
 NaHCO₃- bicarbonato de sódio
 CaCl₂- cloreto de cálcio
 DMEM- *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*
 BSA- albumina de soro bovino
 EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético
 PI- iodeto de propídeo
 PGC1 α - co-ativador α do receptor β do proliferador de peroxissomos ativados
 HAD- β -hidroxiacil CoA desidrogenase
 cDNA- DNA complementar
 PTP- poro de transição de permeabilidade
 PTM- transição de permeabilidade mitocondrial

DMSO- dimetilsulfóxido

PPAR- *Peroxisome proliferator-activated receptor*

HNF4 α - *hepatocyte nuclear factor*

cAMP- AMP cíclico

CREB- *cAMP response element-binding protein*

FOXO1- *forkhead box O1a*

GR- *glucocorticoid receptor*

AGL- ácido graxo livre

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ABSTRACTO	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Metabolismo hepático	2
1.2 Metabolismo da glicose	3
1.3 Metabolismo de aminoácidos	4
1.4 Metabolismo de lipídeos	5
1.5 Mitocôndrias	6
1.6 Respiração	6
1.7 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e transição de permeabilidade mitocondrial (TPM)	9
1.8 Apoptose	10
1.9 Desacoplamento mitocondrial	11
1.10 Desacoplador fisiológico	13
1.11 Desacoplador químico	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Animais	19
3.2 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato	19
3.3 Dosagem de proteínas	20
3.4 Ensaio com mitocôndrias isoladas	20
3.4.1 Consumo de oxigênio mitocondrial	20
3.4.2 Liberação de EROs por mitocôndrias	21
3.4.3 Inchamento mitocondrial	21

3.4.4 Medida do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$).....	21
3.5 Isolamento de hepatócitos primários	22
3.6 Contagem e viabilidade celular.....	23
3.7 Condições de cultura e tratamento de hepatócitos primários com triacsin C.....	23
3.8 Análise da pureza do isolamento de hepatócitos.....	24
3.9 Respiração Celular	24
3.10 Avaliação da morte celular	24
3.11 Análise da expressão de co-ativador α do receptor β do proliferador de peroxissomos ativados (PGC1 α) e β -hidroxiacil CoA desidrogenase (HAD) por PCR.....	25
3.12 Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Análise dos efeitos da Triacsin C sobre a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato	27
4.1.1 Respiração.....	27
4.1.2 Liberação de EROs e inchamento mitocondrial.....	27
4.2 Análise dos efeitos da triacsin C sobre o metabolismo de hepatócitos primários.....	28
4.2.1 Análise da pureza do isolamento de hepatócitos.....	28
4.2.2 Viabilidade celular.....	28
4.2.3 Respiração.....	29
4.2.4 Expressão gênica do co-ativador α do receptor γ do proliferador de peroxissomos ativados (PGC1 α) e β -hidroxiacil CoA desidrogenase (HAD)..	30
4.3 Análise dos efeitos da clusianona sobre a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato	30
4.3.1 Respiração.....	30
4.3.2 Produção de EROs e inchamento mitocondrial	31
4.3.3 Potencial de membrana.....	31
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	37

7. REFERÊNCIAS	39
FIGURAS	57
TABELAS.....	77
ANEXO.....	79

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo hepático

O fígado é uma glândula anexa ao trato gastro-intestinal de papel crítico e central no metabolismo, digestão, detoxicação e eliminação de substâncias do corpo. É um órgão de suprimento sanguíneo duplo, sendo o primeiro pela veia porta hepática, responsável por 70% do suprimento sanguíneo, e o segundo pela artéria hepática. A drenagem venosa ocorre por meio das veias hepáticas direita e esquerda que deságuam na veia cava inferior via veia central. O fígado também possui um sistema de drenagem linfática e biliar (BURTIS, ASHWOOD & BRUNS, 2008).

Durante a digestão nos mamíferos, carboidratos, proteínas e lipídeos sofrem hidrólise enzimática reduzindo-os em seus componentes mais simples (glicose, aminoácidos, dipeptídeos, tripeptídeos e peptídeos pequenos, ácidos graxos e monoacilgliceróis) para serem absorvidos pela mucosa intestinal. Os ácidos graxos e monoacilgliceróis absorvidos são reconvertidos dentro das células da mucosa epitelial em triacilgliceróis (TAG). Os outros componentes passam das células epiteliais para o sangue, e são transportados ao fígado via veia porta (NELSON & COX, 2011). Os TAGs são incorporados em lipoproteínas quilomícrons, entram no sistema linfático e vão para o tecido adiposo, muscular e posteriormente retornam ao fígado na forma de quilomícrons remanescentes (BURTIS, ASHWOOD & BRUNS, 2008). A veia porta é uma rota direta dos órgãos digestivos para o fígado, permitindo o acesso hepático direto e primeiro aos peptídeos e carboidratos provenientes da dieta ingerida (NELSON & COX, 2011).

As principais células funcionais do fígado são os hepatócitos (FIGURA 1), responsáveis pela maioria das funções de síntese e degradação (BURTIS, ASHWOOD & BRUNS, 2008). Eles transformam os nutrientes obtidos da dieta em combustíveis energéticos tanto para seu próprio metabolismo como para os de outros tecidos e as exportam via sangue. Aproximadamente 75% das células

hepáticas são hepatócitos, sendo o restante distribuído entre células de Kupffer (macrófagos), células endoteliais e células de Ito (células armazenadoras de lipídeos) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2006).

1.2 Metabolismo da glicose

A glicose entra no hepatócito pelo transportador de glicose (GLUT 2). A glicose que entra no hepatócito é fosforilada pela hexoquinase IV (glicoquinase) produzindo glicose-6-fosfato (G-6-P). A glicoquinase é a isoenzima de maior K_m para a glicose (10 mM), assegurando a mínima fosforilação da glicose quando a concentração desta for baixa no sangue, poupando glicose para os demais tecidos. O hepatócito também converte a galactose e trealose, absorvidas pelo intestino, em glicose.

A G-6-P pode seguir diversos caminhos, podendo ser convertida em glicogênio hepático ou ser oxidada (via glicolítica) até a formação de piruvato. Este sofre descarboxilação pela piruvato desidrogenase à acetil-CoA, que pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs para a produção de energia através da subsequente transferência de elétrons pela cadeia respiratória, produzindo ATP pela fosforilação oxidativa. O acetil-CoA pode também servir como precursor na síntese de ácidos graxos, que são por sua vez incorporados nos TAGs, nos fosfolipídeos e no colesterol. Os lipídeos sintetizados no fígado são, em grande parte, exportados para outros tecidos pelas lipoproteínas de baixíssima densidade (VLDL).

A G-6-P também pode entrar na via das pentoses- fosfato para a produção de potencial redutor na forma de NADPH, necessário para a biossíntese de ácidos graxos, colesterol e para a redução da glutathione (GSH) necessária para combater as espécies reativas do oxigênio (EROS). O NADPH também é um cofator essencial nos processos de detoxicação e eliminação de muitas drogas e outros xenobióticos. Outro precursor dessa via, a D-ribose 5-fosfato, é necessária como molécula precursora na biossíntese de nucleotídeos.

Por fim, a G-6-P pode também ser desfosforilada pela glicose-6-fosfatase produzindo glicose, a qual é exportada para repor a glicose sanguínea.

1.3 Metabolismo de aminoácidos

Os aminoácidos que entram no hepatócito podem ser precursores para a síntese de proteínas, glicose (via gliconeogênese), ácidos graxos ou ATP. Os hepatócitos renovam suas próprias proteínas constantemente, as quais possuem uma velocidade de degradação alta. A maioria das proteínas plasmáticas são produzidas pelos hepatócitos, sendo que alguns aminoácidos que passam pelo fígado, são transportados para outros órgãos que irão usá-los como precursores na síntese das proteínas teciduais. Certos aminoácidos são precursores na biossíntese de nucleotídeos, de hormônios e de outros compostos nitrogenados.

Os aminoácidos que não são necessários como precursores biossintéticos, são transaminados e/ou desaminados para produzir piruvato e intermediários do ciclo de Krebs. Estes processos de desaminação/transaminação produzem amônia, que é convertida em uréia, um produto de excreção. O piruvato pode ser convertido em glicose através da gliconeogênese ou pode ser convertido em acetil-CoA que tem vários destinos possíveis que já foram mencionados, como a síntese de ácidos graxos ou a oxidação pelo ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa para produção de ATP. Os intermediários do ciclo de Krebs podem ser transformados em glicose pela gliconeogênese.

Os hepatócitos também metabolizam aminoácidos que chegam de outros tecidos. Em situações de jejum, principalmente se for prolongado, há uma degradação de proteínas musculares em aminoácidos. Esses aminoácidos doam seus grupos aminos por transaminação ao piruvato (produto da glicólise) produzindo alanina (um aminoácido de cadeia lateral apolar), que é transportada para o fígado, onde ocorre é transaminada à glutamato, regenerando piruvato. O piruvato resultante é convertido pelos hepatócitos em glicose sanguínea via gliconeogênese, e a amônia é convertida em uréia para excreção (NELSON & COX, 2011).

1.4 Metabolismo de lipídeos

Os TAGs são transportados aos hepatócitos através dos quilomícrons remanescentes, que são lipoproteínas possuidoras das apolipoproteínas B-48, E e C. Os hepatócitos possuem receptores específicos para as apolipoproteínas B e E, permitindo a entrada dos quilomícrons remanescentes na célula por endocitose (BURTIS, ASHWOOD & BRUNS, 2008).

Os hepatócitos também podem sintetizar ácidos graxos em situações onde as enzimas do ciclo de Krebs estão com atividade reduzida, e diante estímulos do hormônio insulina. O acetil-CoA em excesso e o bicarbonato são convertidos em malonil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase em um processo irreversível. No processo de síntese do ácido graxo, todas as reações subsequentes são catalisadas por um complexo multienzimático, a ácido graxo sintase, tendo como agente redutor o NADPH. Neste processo, uma molécula de acetil-CoA e sete moléculas de malonil-CoA são transportadas para o complexo da ácido graxo sintase, e condensadas num ciclo de 4 etapas para cada malonil-CoA adicionado. As etapas consistem na condensação do grupo malonil com o grupo acetil, redução do grupo carbonila, desidratação e redução da dupla ligação formada. Após a adição do sétimo malonil, uma molécula de ácido palmítico (16 carbonos) é formada (NELSON & COX, 2011).

Normalmente, as células hepáticas possuem baixas concentrações intracelulares de ácidos graxos livres (AGL) devido à utilização destes em várias vias metabólicas. A enzima acil-CoA sintetase (ACS) catalisa o primeiro passo no metabolismo de ácidos graxos em mamíferos:

Nessa reação, AGL, CoA e ATP são usados para formar acil-CoA e AMP. A acil-CoA tem diversos destinos metabólicos dentro da célula, como acilar proteínas,

ser catabolizada na beta-oxidação ou seguir caminhos anabólicos como a síntese de novo e reacilação de TAG, lipídeos de membrana e ésteres de colesterol (FIGURA 2). Em mamíferos, cinco isoenzimas da ACS foram identificadas. As ACSL1, ACSL4 e ACSL5 parecem ser as isoformas predominantes no fígado de rato, localizadas no retículo endoplasmático, peroxissomos e associadas à membrana mitocondrial (para revisão Mashek, 2006). No entanto, a ACSL5 é a única isoforma encontrada em ambas as membranas mitocondriais e está envolvida na β -oxidação de ácidos graxos (LEWIN et al., 2001). Em ratos geneticamente obesos, com acúmulo de gordura visceral e hiperlipidemia, tanto o RNAm como a atividade da ACS hepática estão elevados (KURIYAMA et al., 1998). Um polimorfismo em um dos genes da ACS está fortemente associado a dislipidemias, obesidade e hipertensão em humanos (IWAI et al., 2002).

1.5 Mitocôndrias

As mitocôndrias (FIGURA 3) são organelas citoplasmáticas de células eucarióticas, cuja principal função é a síntese de ATP. Elas são constituídas por duas membranas, uma externa lisa e outra interna pregueada; esta última forma cristas que delimitam a matriz mitocondrial. A síntese do ATP necessário às funções celulares se dá por meio da fosforilação oxidativa, associada ao transporte de elétrons pela cadeia respiratória (complexos I – IV) na membrana mitocondrial interna. Na matriz mitocondrial localiza-se o complexo da piruvato desidrogenase, as enzimas do ciclo de Krebs, da β -oxidação de ácidos graxos, algumas da oxidação dos aminoácidos, além de ribossomos, DNA e metabólitos.

1.6 Respiração

Pode-se dizer que a respiração celular ocorre em três grandes estágios (FIGURA 4). No primeiro estágio, as moléculas de glicose, ácido graxo e alguns aminoácidos são oxidadas para gerar acetil-CoA. No segundo estágio, esses

grupos acetil são introduzidos no ciclo de Krebs, o qual os oxida por meio de suas enzimas até CO_2 ; a energia liberada pela oxidação é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos NADH , FADH_2 e em uma molécula de GTP/ATP . No terceiro estágio, as co-enzimas reduzidas são oxidadas a NAD^+ e FAD^+ , desfazendo-se dos prótons (H^+) e elétrons. Esses elétrons são conduzidos ao longo de uma cadeia de moléculas transportadoras de elétrons, conhecida como cadeia respiratória, até o O_2 – aceitor final da cadeia transportadora de elétrons (NELSON & COX, 2011).

A cadeia respiratória em grande parte é composta de proteínas integrais de membrana que possuem grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar um ou dois elétrons. Além do NAD^+ e das flavoproteínas, três outros tipos de moléculas transportadores de elétrons funcionam na cadeia respiratória: uma quinona hidrofóbica (ubiquinona, também chamada de coenzima Q) (FIGURA 5) e dois tipos diferentes de proteínas que contêm ferro (citocromos e proteínas com centro ferro-enxofre) (FIGURA 6 e 7). A ubiquinona é uma benzoquinona lipossolúvel que apresenta longa cadeia lateral isoprenóide. Ela pode aceitar um elétron, originando o radical semiquinona ($\cdot\text{QH}$) ou dois elétrons para formar o ubiquinol (QH_2). As mitocôndrias possuem três classes de citocromos designados por *a*, *b* e *c*, que podem ser distinguidos pelas diferenças nos seus espectros de absorção da luz. Os citocromos *a* e *b* e alguns *c* são proteínas integrais da membrana interna mitocondrial, e os citocromos *c* em sua maioria são proteínas solúveis que se associam com a superfície externa da membrana interna mitocondrial, por meio de interações eletroestáticas. Os co-fatores heme dos citocromos *a* e *b* estão fortemente ligados às suas proteínas associadas, embora de forma não-covalente. Os grupos heme dos citocromos tipo *c* estão ligados covalentemente por meio de resíduos de cisteína. Nas proteínas ferro-enxofre, o ferro está presente não no heme, mas associado a átomos de enxofre inorgânico ou a átomos de enxofre de resíduos de cisteína na proteína, ou ambos. Esses centros de ferro-enxofre (Fe-S) variam desde estruturas simples com um único átomo de Fe, até centros mais complexos possuindo dois ou quatro átomos de Fe. O potencial de redução das proteínas Fe-S varia de -0,65V a +0,45V, dependendo do microambiente do ferro na proteína.

Na reação completa catalisada pela cadeia respiratória mitocondrial, os elétrons movem-se em ordem crescente do potencial de redução, uma vez que os

elétrons fluem espontaneamente dos carregadores com menor potencial de redução para os carregadores de maior potencial de redução. A sequência de passagem dos elétrons pelos carregadores é: $\text{NADH} \rightarrow \text{Q} \rightarrow \text{citocromo } b \rightarrow \text{citocromo } c_1 \rightarrow \text{citocromo } c \rightarrow \text{citocromo } a \rightarrow \text{citocromo } a_3 \rightarrow \text{O}_2$. É importante ressaltar que a ordem dos potenciais de redução padrão não é necessariamente a mesma que a dos potenciais de redução reais em condições celulares, que dependem da concentração das formas reduzida e oxidada das moléculas.

As moléculas transportadoras de elétrons da cadeia respiratória estão organizadas em complexos supramoleculares embebidos na membrana mitocondrial interna. São conhecidos quatro complexos transportadores de elétrons, cada um capaz de catalisar a transferência de elétrons através de uma parte da cadeia (FIGURA 8). O complexo I, também chamado de NADH desidrogenase, é uma enzima grande cuja molécula é composta por 42 cadeias polipeptídicas ligada a FMN e pelo menos seis centros de Fe-S. Catalisa simultânea e obrigatoriamente dois processos acoplados: a transferência exergônica de um íon hidreto do NADH e um próton da matriz para a ubiquinona, e a transferência endergônica de quatro prótons da matriz para o espaço intermembranas. O complexo II, também chamado de succinato desidrogenase, é a única enzima do ciclo de Krebs que é ligada à membrana. Embora menor e mais simples que o complexo I, ele contém cinco grupos prostéticos de dois tipos e quatro subunidades proteicas diferentes, três centros 2Fe-2S, FAD ligado e um sítio de ligação para o substrato, o succinato. O complexo III, também chamado de complexo dos citocromos bc_1 , acopla a transferência de elétrons do ubiquinol (QH_2) para o citocromo c com o transporte vetorial de prótons da matriz para o espaço intermembranas. O complexo IV, também chamado de citocromo oxidase, transporta dois elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, reduzindo-o a H_2O . O complexo IV é uma proteína grande (13 subunidades) da membrana mitocondrial interna (NELSON & COX, 2011).

Segundo Mitchell (1961), a passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas, contra um gradiente eletroquímico (FIGURA 8). A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a fosforilação do ADP. O componente elétrico ($\Delta\Psi$) deste potencial atinge valores de aproximadamente 180 mV, no estado de repouso, enquanto o componente químico

(ΔpH) oscila na faixa de 0 a 1 unidade de pH. O fluxo de H^+ através da F_0F_1 -ATP sintase, de volta ao interior da matriz mitocondrial, desta vez a favor do gradiente, está diretamente acoplado à fosforilação do ADP. Apesar deste processo ser altamente eficiente, parte dessa energia pode ser desviada da síntese de ATP e dissipada na forma de calor, um processo denominado desacoplamento mitocondrial, o qual veremos mais especificamente à frente.

1.7 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e transição de permeabilidade mitocondrial (TPM)

A mitocôndria gera energia reduzindo o oxigênio molecular à água pelo complexo IV da cadeia respiratória em quatro passos consecutivos por elétron, de acordo com a configuração triplete do oxigênio molecular (DEPIERRE & ERNSTER, 1977). Pequenas quantidades de oxigênio parcialmente reduzido (anion superóxido, $O_2^{\bullet -}$) são produzidos como um produto da respiração mitocondrial (FIGURA 9). Até 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria é convertido a $O_2^{\bullet -}$ durante a passagem dos elétrons pelos intermediários da cadeia respiratória (BOVERIS & CHANCE, 1973; TURRENS, 1997), principalmente nos complexos I (TURRENS & BOVERIS, 1980) e III (CADENAS et al, 1977). O $O_2^{\bullet -}$ gera H_2O_2 , pela reação da superóxido dismutase (GRIJALBA et al, 1999), que por sua vez reage com o Fe^{2+} para produzir o radical hidroxila ($\bullet OH$) (reação de Fenton), que é considerada a ERO mais reativa em sistemas biológicos, observado principalmente em reações de lipoperoxidação (FERREIRA et al, 1997).

Visto que a produção de EROs na mitocôndria é um processo contínuo e fisiológico, a mitocôndria possui um eficiente sistema antioxidante, composto por enzimas tiólicas (ex: glutathione peroxidase), enzima superóxido dismutase, GSH, NADPH (FIGURA 9), e vitaminas E e C. Esse sistema tem como função eliminar os $O_2^{\bullet -}$ formados, bloqueando o início da formação de outras EROs deletérias como o radical hidroxil ($\bullet OH$), reduzindo o estresse oxidativo causado por essas espécies (KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2007).

Fortes evidências mostram que o Ca^{2+} é o principal agente estimulador da geração mitocondrial de EROs quando associado a um estímulo patológico

(KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Este fenômeno pode ser explicado pela ligação do Ca^{2+} à cardiolipina, um fosfolípido presente na membrana mitocondrial interna em altas concentrações (14-23%), causando alterações ultraestruturais das proteínas da cadeia respiratória. Isso facilita a produção de O_2^- e subsequentemente $\cdot\text{OH}$. Essa sobrecarga de Ca^{2+} e estresse oxidativo causado pelas EROs culminam no fenômeno denominado transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), mediado pela abertura de poros de natureza protéica, o poro de transição de permeabilidade (PTP). A abertura do PTP está intimamente ligado à liberação do citocromo c, um evento chave no desencadeamento da apoptose, sendo inibido por pH ácido, glutatona reduzida (GSH) e ciclosporina A (CsA). *In vitro*, esse processo é caracterizado por inchamento das mitocôndrias (BERNARDI et al., 2006; CROMPTON; ELLINGER; COSTI, 1988; HALLESTRAP, 2006; HUNTER; HAWORTH, 1979; VERCESI et al., 2006; ZORATTI; SZABO, 1995).

1.8 Apoptose

A apoptose é a via de morte celular induzida por um programa intracelular altamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. A célula apoptótica exibe fosfatidilserina na face externa de sua membrana plasmática, tornando-se um alvo primário de células fagocitárias (FIGURA 10). A apoptose é induzida por uma cascata de eventos moleculares que podem ser iniciados de modos distintos, culminando na ativação das enzimas caspases efetoras. Este processo pode ser dividido em fase de ativação, na qual as caspases se tornam cataliticamente ativas, e fase de execução, na qual essas enzimas atuam provocando a morte celular. O início da apoptose ocorre principalmente através dos sinais de duas vias distintas, porém convergentes – a via extrínseca, iniciada por receptores na membrana plasmática, e a via intrínseca, ou mitocondrial. Ambas as vias convergem para ativar as caspases. Na membrana mitocondrial externa existem proteínas da família Bcl-2 que são reguladoras da apoptose. Quando as células são privadas dos sinais de sobrevivência ou expostas a estresse, elas perdem a Bcl-2 e/ou Bcl-x e são substituídas por membros pró-apoptóticos da família, como Bak, Bax e Bim

(KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2007). Quando os níveis de Bcl-2/Bcl-x diminuem, a permeabilidade mitocondrial aumenta e proteínas compartimentalizadas nas mitocôndrias, tais como o citocromo *c*, o fator indutor de apoptose (AIF), e o Smac/DIABLO, podem ser liberadas da mesma para o citosol em resposta a diferentes estímulos apoptóticos. Uma vez no citosol, o citocromo *c* liga-se ao fator ativador de proteases pró-apoptóticas (Apaf-1) aumentando sua afinidade por ATP/dATP. A ligação do nucleotídeo ao complexo citocromo *c*/Apaf-1 promove sua oligomerização formando o apoptossoma, que recruta moléculas de pró-caspase 9, promovendo sua auto-clivagem em caspase 9. Somente as moléculas de caspase 9 ligadas ao apoptossoma são capazes de ativar caspases efetoras, como a caspase 3, tornando-as hábeis em clivar macromoléculas. Ainda que por via distinta, Smac/DIABLO também atua ativando a caspase 3. O efeito do AIF, entretanto, parece ser independente da ativação de caspases efetoras. A transição de permeabilidade mitocondrial é também um dos mecanismos pelos quais se dá a liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria para o citosol (HENGARTNER, 2000; WANG, 2001).

1.9 Desacoplamento mitocondrial

O desacoplamento mitocondrial ocorre quando o $\Delta\mu\text{H}^+$ gerado pela cadeia respiratória não é utilizado para a síntese de ATP, ou seja, quando os H^+ não retornam à matriz mitocondrial pela estrutura protéica da ATP sintase.

O desacoplamento mitocondrial mais conhecido ocorre através das proteínas desacopladoras (UCP) (FIGURA 11), proteínas de 32 kDa localizadas na membrana mitocondrial interna, identificadas primeiro em mitocôndrias de tecido adiposo marrom (Nicholls, 1976). Na presença de AGL liberados por estímulos do sistema nervoso simpático em adaptação ao frio, esta proteína é capaz de provocar um aumento da condutância a prótons na membrana mitocondrial interna, permitindo a dissipação do $\Delta\mu\text{H}^+$ e gerar calor. O $\Delta\mu\text{H}^+$ é recomposto à custa do aumento de respiração e de oxidação de substratos energéticos. Posteriormente foram identificadas outras isoformas de UCP em quase todos os tecidos, assim como sua ativação também por palmitoil-CoA ou cadeias longas de acil-CoA (CANNON, 1977).

A UCP do tecido adiposo marrom (BAT) foi posteriormente chamada de UCP1, devido ao descobrimento de outras isoformas de UCP, designadas UCP2 (FLEURY et al, 1997), UCP3 (BOSS et al, 1997), BMCP (SANCHIS et al, 1998) e UCP4 (MAO et al, 1999). A UCP2 é expressa em mitocôndrias de vários tecidos humanos, especialmente em tecidos ricos em macrófagos, e a regulação de sua expressão em tecido adiposo branco está relacionada ao estado nutricional (BOSS et al, 1997). Vários dados indicam um importante papel desta proteína no diabetes melitus, hiperinsulinemia, obesidade (FLEURY et al, 1997), aterosclerose (DUVAL et al, 2002) e câncer de colon (KUAIT et al., 2011). A UCP3 é expressa em mitocôndrias de músculo esquelético e parece estar relacionada à termogênese muscular (Boss e col., 1997), peso corporal (GONG et al, 1997) e exportação EROs da mitocôndria (SCHRAUWEN et al, 2001; WOJTCZAK et al., 2011). Clapham e col. (2000) demonstraram que camundongos transgênicos que super-expressam UCP em músculos esqueléticos são hiperfágicos e magros comparados aos animais controles. A UCP4 e BMCP são expressas em cérebro (SANCHIS et al, 1998; MAO et al, 1999) e células sensoriais (SMORODCHENKO et al., 2011) porém suas funções ainda são pouco conhecidas, como a resistência a esquizofrenia em neurônios (MOUAFFAK et al., 2011). No fígado, o aumento da expressão de UCP 2 ocorre na doença do fígado gorduroso de origem não alcoólica (Xi et al, 2013).

Outro sistema de dissipação de energia mitocondrial ocorre através de canais de K^+ sensíveis a ATP (mitoK_{ATP}). A abertura dos mitoK_{ATP} promove a entrada de K^+ , pela atração eletronegativa da matriz mitocondrial, juntamente com H₂O e fosfato inorgânico (P_i). Outro transportador faz a troca de K^+ da matriz por H⁺ do espaço intermembranas, consumindo o potencial de H⁺, o qual é restabelecido às custas de aumento da respiração (GARLID et al, 2003) e queima de substratos energéticos. Os mitoK_{ATP} promovem um aumento de temperatura e metabolismo corporal em camundongos geneticamente hipertrigliceridêmicos (ALBERICI et al, 2003; ALBERICI et al, 2006), o que sugere que este seja um mecanismo adaptativo para dissipação de energia no tecido hepático. Como *in vitro* esses canais são inibidos por palmitoil-CoA (PACEUK et al., 1996), é possível que a ativação dos mitoK_{ATP} em fígados de camundongos hipertrigliceridêmicos ocorra por AGL.

Esses dois sistemas de desacoplamento possuem a ativação por ácidos graxos como ponto em comum. Enquanto AGL exercem efeitos estimulatórios na dissipação de energia, cadeias de acil-CoA exercem diversos controles sobre o

metabolismo energético como a inibição do mitoK_{ATP}, do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) que também é um desacoplador da fosforilação oxidativa (SAMARTSEV, et al, 1997), do canal de condutância de anions pH-dependente (IMAC) e das enzimas glicoquinase, glicose 6-fosfatase e piruvato desidrogenase (FAERGEMAN et al., 1997). Esses dados indicam que o balanço entre AGL/acil-CoA coordena as funções hepáticas entre termogênese e fosforilação oxidativa, devido a conversão de energia ser uma das principais funções deste órgão. Por outro lado, no tecido adiposo marrom onde a termogênese é a função principal, a UCP é modulada positivamente pelas duas formas de AG (CANNON, 1977). Com o aumento a razão AGL/acil-CoA no fígado pode ser possível ativar o metabolismo energético no sentido de aumento de termogênese.

Além de aumentar o metabolismo e a geração de calor, sistemas de dissipação de energia como as UCP (JEZEK, 1998) e os mitoK_{ATP} (ALBERICI et al., 2009) têm a função de diminuir a geração mitocondrial de EROs. Esta função é apoiada pelas evidências de que pequenos desacoplamentos entre respiração e fosforilação oxidativa promovem o aumento da respiração que baixa a tensão de oxigênio e diminui a concentração de intermediários da cadeia respiratória na forma de doadores monoeletrônicos (TURRENS, 1997). As EROs estão envolvidas em uma variedade de patologias como aterosclerose, diabetes (CHISOLM et al., 2000; KANETO et al., 2010) e câncer (KLAUNIG et al., 2004; ZIECH et al., 2011).

1.10 Desacoplador fisiológico

Recentemente, um potente vasodilatador, a triacsin C [*1-hydroxy-3-(E,E,E-2',4',7'-undecatrienylidene) triazene*] (FIGURA 12), isolada de cepas de *Streptomyces* sp SK-1894, foi caracterizado também como potente inibidor da Acil CoA Sintetase (ACS) (OMURA, et al., 1987). Em hepatócitos primários a triacsin C reduz em 70% a síntese de TAG, acompanhada de um pequeno efeito na síntese de fosfolípidos sem interferir na beta-oxidação mitocondrial, devido a isoforma da ACS5 ser resistente a triacsin C (MUOIO et al., 2000). Em adipócitos foi detectado acúmulo de palmitato (AGL) após a incubação com triacsin C (ARAI et al., 2002). Dessa forma, reduzir a atividade das enzimas responsáveis pela síntese de TAG pode ser uma

estratégia importante para aumentar o transiente de AGL intracelulares e consequentemente o desacoplamento mitocondrial. A inibição da ACS por triacsin C também tem sido demonstrada por potencializar preferencialmente a apoptose em células tumorais, via liberação de citocromo c e ativação de caspases (MASHIMA et al., 2009). O tratamento *in vivo* com Triacsin C reduz a área aterosclerótica em aortas e corações de camundongos hiperlipidêmicos (MATSUDA et al., 2008). Recentemente foi descrito que a triacsin C inibe a formação de “Droplet” lipídico em células AML-12 (ZOU et al, 2011).

1.11 Desacoplador químico

Certos compostos químicos possuem uma estrutura que os caracterizam como desacopladores da fosforilação oxidativa sem o rompimento da estrutura mitocondrial. Basicamente são compostos hidrofóbicos que possuem um átomo de hidrogênio dissociável, como por exemplo o 2,4-dinitrofenol (DNP) e a carbonilcianeto-*p*-trifluormetoxifenilidrazina (FCCP) (FIGURA 13). Ambos são ácidos fracos com propriedades hidrofóbicas que permitem que eles se difundam rapidamente através da membrana mitocondrial. Após entrarem na matriz mitocondrial na forma protonada, eles podem liberar um próton, dissipando o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna (NELSON & COX, 2011).

Devido a sua propriedade desacopladora, o DNP foi comercializado como emagrecedor, pois estimula o gasto de energia e aumenta a queima de substratos energéticos. Porém a comercialização do DNP foi descontinuada, pois essa droga tem um baixo índice terapêutico, sendo extremamente perigosa em caso de sobredosagem. Até 2010, foram registrados 62 casos de morte por envenenamento causado pelo DNP, sendo 36 registradas como morte por exposição ocupacional em fábricas de munições em 1919 (PERKINS, 1919). Após a descoberta de seu efeito emagrecedor em 1933, houveram 26 mortes devido à sua elevada ingestão, sendo 14 mortes até o final do século XX e 12 mortes entre os anos 2001 e 2010 (GRUNDLINGH et al 2011). Os principais sintomas devido a altas doses de DNP são hipertermia, taquicardia, sudorese e taquipnéia (BARLETT et al, 2010), devido a complicações fisiológicas pela droga: O desacoplamento eleva a produção de calor,

levando a hipertermia descontrolada (HOCH et al, 1973); estimulação da glicólise, aumentando a produção de ácido láctico (ROGNSTAD et al, 1969); acúmulo de potássio (MUDGE et al, 1951) e fosfato (ISSEKATZ et al, 1984); e efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (TAKAHASHI et al, 2009).

A Clusianona (FIGURA 13A) é um composto natural isolado pela primeira vez em raízes de *Clusia congestiflora*, sendo uma benzofenona poliisoprenilada com um sistema de anel biciclo-nonano (MCCANDISH et al., 1976). Este composto e seu epímero C7 possuem um largo espectro de atividades biológicas, tais como efeito inibitório do vírus HIV (PICCINELLI et al, 2005,.. GARNSEY et al, 2011), efeito inibitório sobre o antígeno de ativação precoce induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato do vírus Epstein-Barr em células Raji (ITO et al., 2003), inibição da proliferação de linhagens de melanoma em cultura (WESTERKEMPER et al., 2012), atividade inibitória de formas promastigotas do protozoário *Leishmania amazonensis* (PEREIRA et al., 2010), antinociceptiva e anti- inflamatórias (SANTA-CECÍLIA et al, 2011.), e atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e cariogênicas (NALDONI et al, 2009;. DE CASTRO ISHIDA et al, 2011). Eles também exibem potentes efeitos vasodilatadores do endotélio em aorta de rato (CRUZ et al., 2006), inibem a liberação de histamina induzida por alérgeno e a contração do íleo desencadeada por alérgeno, histamina ou acetilcolina (NEVES et al., 2007) .

Sua estrutura química é análoga a nemorosona (FIGURA 14B), um composto natural extraído do própolis marrom cubano, que foi caracterizado pelo nosso grupo de trabalho como um potente desacoplador da fosforilação oxidativa. O efeito desacoplador mínimo foi verificado na concentração de 100 nM em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, sem inibição da cadeia respiratória em concentrações mais altas, como 0,5 µM (PARDO-ANDREU et al., 2011). Isso explica, em parte, seu efeito citotóxico que já era conhecido (DIAZ-CARBALLO et al, 2003; DIAZ-CARBALLO et al, 2008).

A diferença estrutural clusianona e nemorosona está na posição do grupo benzofilo no anel biciclo: C3 e C1 para clusianona e nemorosona, respectivamente. Esta mudança de posição favorece a formação de uma ligação ponte de hidrogênio intramolecular, envolvendo o grupo hidroxila (OH) em C4. Desde que o grupo C4 OH parece ser essencial para o mecanismo de desacoplamento (PARDO-ANDREU et al., 2011), é de se esperar que a clusianona tenha um potencial desacoplador diferente da nemorosona.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Verificar se a Triacsin C e a clusianona podem induzir o desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial em fígados de ratos.

A hipótese é de que a triacsin C agiria reduzindo a atividade das isoformas da ACS responsáveis pela síntese de TAG, aumentando assim as concentrações intracelulares de AGL que são substratos para as UCPs. Desta forma ocorreria um desacoplamento “fisiológico”. Para isto, verificaremos primeiro se a triacsin C exerce efeito tóxico direto sobre a bioenergética de mitocôndrias isoladas. A partir daí, verificaremos os efeitos da triacsin C sobre o metabolismo de hepatócitos primários.

A segunda hipótese é de que a clusianona agiria como um desacoplador químico, pois sua estrutura pode se inserir na membrana mitocondrial interna e transportar H^+ para a matriz mitocondrial, dissipando o potencial eletroquímico mitocondrial. Para isto, utilizaremos mitocôndrias isoladas de fígado.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos machos da linhagem Wistar pesando aproximadamente 200 g foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, FCFRP/USP. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), USP. Os ratos tiveram acesso à dieta padrão (Nuvital CR1, PR, Brasil) e água à vontade e foram criados e mantidos em sala climatizada em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro- escuro de 12 horas.

3.2 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

As mitocôndrias foram isoladas pelo método de centrifugação diferencial (SCHNEIDER; HOGEBOM, 1950). Ratos foram sacrificados por decapitação; o fígado (10-15 g) foi imediatamente removido, picotado com tesoura em meio de homogeneização mantido no gelo contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e HEPES 5 mM, pH 7.2. Os pedaços foram homogeneizados três vezes por 15 segundos, com intervalos de 1 minuto, em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado (580 g, 5 min) e o sobrenadante obtido, contendo a fração mitocondrial, submetido à nova centrifugação (10300 g, 10 minutos). O sedimento resultante foi ressuspenso e centrifugado (3400 g, 15 minutos) em meio de lavagem contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2. O sedimento mitocondrial final foi ressuspenso em sacarose 250 mM e HEPES 5 mM, pH 7,2, em volume final de 1 mL. A suspensão mitocondrial foi utilizada em até 3 horas após o isolamento.

3.3 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método do biureto (GORNALL, et al., 1949), modificado pela adição de ácido cólico a 1% (KAPLAN; PERDESEN, 1983). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve a luz no comprimento de onda de 540nm. A absorbância é diretamente proporcional à concentração de proteínas da amostra, de acordo com a lei de Lambert Beer. Uma solução de BSA 1% foi utilizada como padrão.

3.4 Ensaios com mitocôndrias isoladas

Os experimentos com mitocôndrias isoladas foram feitos em meio de reação padrão (MRP) foi composto de sacarose 125 mM, KCl 60 mM e HEPES 10 mM, pH 7,4, à 30°C.

3.4.1 Consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio foi monitorado utilizando-se um eletrodo tipo Clark (Hansatech Instruments Ltd conectado ao software OXIGRAPH V1.10, England) em uma câmara de 1 mL equipada com agitador magnético e temperatura controlada (30°C). As mitocôndrias (0,5 mg proteína/mL) foram incubadas em MRP acrescido de KH_2PO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM e EGTA 0,1 mM.

3.4.2 Liberação de EROs por mitocôndrias

A geração de EROs pelas mitocôndrias isoladas foi monitorada pela redução da sonda Fluorescente Amplex Red em Resorufina (Amplex Red, Molecular Probes) na presença de peroxidase (VOTYAKOVA; REYNOLDS, 2004). As mitocôndrias (1 mg proteína/mL) foram incubadas em 2 mL de MRP, na presença de KH_2PO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM e EGTA 0,1 mM, Amplex Red 1 μM e peroxidase 1 U/mL. A quantidade de H_2O_2 foi determinada pela intensidade de fluorescência, monitorada durante 10 minutos nos comprimentos de onda de 563/587 nm para excitação/emissão, utilizando fluorímetro Fluorescence Spectrophotometer Hitachi F-4500 (Tóquio, Japão) com fenda (slit) 5/5. A intensidade de fluorescência foi convertida em concentração de H_2O_2 utilizando-se uma curva de calibração com concentrações conhecidas de H_2O_2 .

3.4.3 Inchamento mitocondrial

As suspensões mitocondriais são turvas e absorvem a luz incidente. A absorbância é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz e do meio e, qualquer processo que diminua esta diferença, como o inchamento mitocondrial, irá diminuir a luz espalhada e diminuir a absorbância (NICHOLLS, 1982). Dessa forma, as mitocôndrias (0,5 mg proteína/mL) foram incubadas em MRP e o inchamento mitocondrial foi monitorado durante 10 minutos pela diminuição da absorbância aparente em 540 nm, utilizando espectrofotômetro Shimadzu modelo Multispec-1501 (Kyoto, Japão).

3.4.4 Medida do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

O $\Delta\Psi$ foi monitorado pelas alterações na fluorescência emitida da safranina O (ZANOTTI et al, 1980). As mitocôndrias (0,5 mg de proteína/mL) foram adicionadas ao MRP acrescido de safranina O 10 μM , KH_2PO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM e

EGTA 0,1 mM. A dissipação do potencial de membrana correlaciona-se com o aumento da intensidade de fluorescência da sonda, monitorada nos comprimentos de onda de 495/586 nm para excitação/emissão, utilizando fluorímetro Fluorescence Spectrophotometer Hitachi F-4500 (Tóquio, Japão).

3.5 Isolamento de hepatócitos primários

Ratos foram anestesiados com uma mistura 1:1 de cetamina 10% e xilasina 2%. A cavidade abdominal foi aberta longitudinalmente e os intestinos foram deslocados a esquerda do animal. As veias porta e cava no ramo inferior foram amarradas com ligaduras frouxas e a veia porta canulada. A ligadura da veia porta foi apertada e iniciada a perfusão com meio Krebs-Hanselet contendo glicose 10 mM, NaCl 120 mM, KCl 4,8 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, NaHCO_3 24 mM, HEPES 10 mM e pH 7,4, penicilina 50.000 unidades/L, estreptomicina 50 mg/L, anfotericina B 125 $\mu\text{g/L}$ e ciprofloxacino 2 mg/mL, num fluxo de 10 mL/min, oxigenado e aquecido a 37°C. A veia cava foi seccionada no ramo inferior para dessangramento total do animal. A cavidade torácica foi aberta e o ramo superior da veia cava foi canulado. A velocidade do fluxo foi aumentada lentamente para 30 mL/min e a ligadura do ramo inferior apertada para direcionamento do fluxo sentido veia cava ramo superior. A solução foi perfundida por mais 15 minutos em sistema aberto para estabilização das funções hepáticas. Foi perfundido a solução de Krebs-Hanselet contendo collagenase 0,05% e CaCl_2 1,3 mM em sistema de recirculação por 7 minutos. O fígado então foi retirado e colocado numa placa de Petri contendo meio Krebs-Hanselet acrescido de CaCl_2 1,3 mM (meio de lavagem) em banho de gelo. As células foram gentilmente removidas do fígado com auxílio de um pincel e filtradas com 3 camadas de gaze estéril. A suspensão celular foi centrifugada a 60 g por 4 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensionado com meio de lavagem acrescido de BSA 2% e centrifugado nas mesmas condições. O ultimo passo foi repetido mais 3 vezes sendo o *pellet* ressuspensionado em meio de cultura DMEM acrescido de soro bovino fetal 10%, penicilina 100.000 unidades/L, estreptomicina 100 mg/L, anfotericina B 250 $\mu\text{g/L}$ e ciprofloxacino 2 mg/mL (DMEM completo).

3.6 Contagem e viabilidade celular

A amostra contendo hepatócitos isolados foi diluída 5x, ou seja, 200 µL da amostra de células para 800 µL de meio Krebs. Da amostra diluída foram retirados 10 µL e colocados em um eppendorf com 90 µL de Trypan Blue (diluição de 10x). Da amostra diluída e corada com Trypan foram retirados 10 µL e colocados na câmara de Neubauer (2 quadros), onde então em um microscópio foi realizada a contagem das células nos quadrantes (4 no total). As células mortas adquirem cor azul e as vivas não adquirem cor. Para saber a quantidade de células/mL da suspensão, foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{n}^{\circ} \text{ cels/mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total cels}}{\text{n}^{\circ} \text{ quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

O fator de diluição é igual a 50 (5 x 10)

3.7 Condições de cultura e tratamento de hepatócitos primários com triacsin C

Preparações com viabilidade maior que 80% foram plaqueadas em placas de 6 poços. 5×10^5 células em 2mL de DMEM completo por poço, foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂ por no mínimo 5 horas para as células aderirem. Após esse período o meio de cultura de cada poço foi trocado por DMEM completo acrescido de Triacsin C 1 µM, albumina bovina (BSA) 0,5% e palmitato 0,2 mM e verificado tempo-resposta do tratamento em 4, 6, 8, 12 e 16 horas. Foi realizado um tratamento contendo DMSO como controle.

3.8 Análise da pureza do isolamento de hepatócitos

Para verificar a porcentagem de hepatócitos obtida no isolamento, alíquotas das preparações foram fixadas em lâminas por centrifuga citológica FANEM modelo 248 a 1500 RPM por 5 minutos. Também foi verificada a porcentagem de hepatócitos das amostras em cultura depois de tripsinizadas (com solução contendo tripsina 0,5%, EDTA 0,2% e NaCl 0,9%), centrifugadas a 1000 RPM em centrífuga clínica e ressuspensas em meio Krebs-Hanselet. Após fixação, as amostras foram coradas com hematoxilina/eosina e analisadas/contadas em microscópio óptico (Tabela I). Os hepatócitos são binucleados, fato que os diferencia das outras células componentes do fígado (FIGURA 15).

3.9 Respiração Celular

Após a incubação com triacsin C, as células foram tripsinizadas com solução contendo tripsina 0,5%, EDTA 0,2% e NaCl 0,9%, centrifugadas a 1000 RPM em centrífuga clínica e ressuspensas em meio Krebs-Hanselet. As células foram novamente contadas em câmara de Neubauer para correção do número de células. A respiração celular utilizando-se um eletrodo tipo Clark pelo oxígrafo OROBOROS (Oroboros Instruments, Austria), em uma câmara de 2 mL equipada com agitador magnético e temperatura controlada (37°C). As células foram encubadas em meio Krebs-Hanselet e os dados foram coletados através do programa Oxigraphplus.

3.10 Avaliação da morte celular

A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando coloração dupla com anexina V para apoptose e iodeto de propídio (PI) para necrose/apoptose tardia. Após o tratamento, os hepatócitos primários foram tripsinizados e lavados com PBS gelado e tampão de ligação (HEPES-NaOH 10 mM, NaCl 140 mM e CaCl₂

2,5 mM). As células foram então incubadas com APC- conjugado anexina V (1:100) em gelo por 15 minutos adicionais ao abrigo da luz. O PI (1 mg/mL) foi adicionado 1 minuto antes da análise por citometria de fluxo BD FACSCANTO™. 10.000 células foram contadas por amostra, analisadas por BD FACSDIVA software (BD Biosciences).

3.11 Análise da expressão de co-ativador α do receptor β do proliferador de peroxissomos ativados (PGC1 α) e β -hidroxiacil CoA desidrogenase (HAD) por PCR

O RNA total foi isolado utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, EUA). Para análise em tempo real da PCR, o RNA foi transcrito de forma inversa utilizando o reagente Power SYBER green master mix (Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA). Para a síntese de cDNA utilizada nas reações de PCR quantitativo, foi utilizado um kit contendo corante fluorescente SYBR-green (ABI). A expressão relativa de RNAm foi determinada após normalização com beta-actina usando o método $\Delta\Delta C_t$ (BARBOSA et al, 2013). PCR quantitativa foi realizada utilizando Applied Biosystems StepOne® Real-Time PCR System (Applied Biosystems, FosterCity, EUA). Primers para co-ativador α do receptor β do proliferador de peroxissomos ativados (PGC1 α) e β -hidroxiacil CoA desidrogenase (HAD) foram concebidos como descrito na Tabela II.

3.12 Análise estatística

A análise estatística foi determinada pela análise da variância (ANOVA), seguido pelo teste Student-Newman-Keuls post-hoc para comparações pareadas. Resultados com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O programa utilizado foi o GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc. USA) para Windows. Os valores teóricos de pKa, LogP e LogD foram obtidos pela ACD Labs software (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise dos efeitos da Triacsin C sobre a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

4.1.1 Respiração

Foram avaliadas as velocidades de respiração nos estados II (repouso antes da adição de ADP), III (na presença de ADP) e IV (repouso após consumo do ADP) (FIGURA 16). Os resultados mostraram que as concentrações de 1, 2 e 10 μM de triacsin C não alteraram significativamente as velocidades de respiração mitocondrial, apesar da tendência de aumento da velocidade no estado IV. Porém nas concentrações de 15 e 20 μM houve diminuições significativas no controle respiratório (estado III/estado IV) das mitocôndrias.

Os mesmo experimentos foram conduzidos na presença de palmitato 1 μM , com o intuito de verificar se a triacsin C tem efeito direto sobre o desacoplamento mitocondrial via UCP (a qual usa palmitato como substrato). A FIGURA 17 mostra que os resultados foram semelhantes aos obtidos na ausência de palmitato (FIGURA 16).

4.1.2 Liberação de EROs e inchamento mitocondrial

A FIGURA 18 mostra a velocidade de produção de H_2O_2 na presença de EGTA (ausência de Ca^{2+}). Triacsin C aumentou significativamente a produção de H_2O_2 nas concentrações a partir de 2 μM , com efeito mais pronunciado a 10 μM .

Fortes evidências mostram que a produção de EROs pode estar associada ao Ca^{2+} e abertura do PTP em um estímulo nocivo (BROOKES, et al 2004). Essa relação foi verificada através do monitoramento do inchamento mitocondrial (variação da absorbância). A FIGURA 19 demonstra que triacsin C nas

concentrações de 2 e 15 μM induz o inchamento mitocondrial na presença de Ca^{2+} . O inchamento foi prevenido na ausência de Ca^{2+} (presença de EGTA) e na presença do inibidor da abertura do PTP, CsA.

Esses experimentos demonstram que a triacsin C pode ser tóxica para a mitocôndria a partir da concentração de 2 μM . Dessa forma, a concentração escolhida para os estudos em células foi de 1 μM .

4.2 Análise dos efeitos da triacsin C sobre o metabolismo de hepatócitos primários

4.2.1 Análise da pureza do isolamento de hepatócitos

A Tabela I mostra a porcentagem da pureza da preparação de hepatócitos de fígado de rato. Em preparações de células recém isoladas, 70% são hepatócitos, ao passo que essa porcentagem diminui depois de 24 horas de incubação para 62% do total de células.

4.2.2 Viabilidade celular

Os hepatócitos sob nossas condições de cultura (FIGURA 20) não se proliferam rapidamente e não permanecem com alta viabilidade por mais que 2 dias, entrando em fase de senescência em torno de 60 horas a partir do momento em que foi isolado. Por isso, o tempo de incubação das células com triacsin C 1 μM foi delimitado em até 16 horas, visto que neste período não detectamos alterações na viabilidade celular (FIGURA 21).

Para avaliar uma possível indução de apoptose causada pela triacsin C, foi feita análise da viabilidade celular por citometria de fluxo utilizando-se 2 marcadores fluorescentes: Anexina V, que se liga em sítios de fosfatidilserina na face externa da membrana celular (marcação para apoptose); e PI, que se liga ao DNA celular

quando a membrana celular está rompida (marcação para necrose e apoptose tardia). A dupla marcação (apoptose e necrose) indica a fase de apoptose tardia (CAO et al, 2011), onde a célula apoptótica está num estágio avançado, permitindo a ligação do PI ao DNA celular. A FIGURA 22 mostra que na concentração de 1 μ M, a triacsin C não aumenta as marcações para apoptose e/ou necrose quando comparada ao tratamento controle (DMSO). O DMSO 20% foi usado como controle positivo para necrose e, como esperado, aumentou a porcentagem de células marcadas com PI. Já o terc butil hidroperóxido (TB), falhou em induzir a apoptose em hepatócitos primários como ocorre em outros tipos celulares (TRIPATHI et al, 2008). Esses resultados indicam que no tempo de exposição de até 8 horas, não há nenhum tipo de morte celular induzida por triacsin C 1 μ M.

4.2.3 Respiração

A Figura 23A mostra que no tratamento por 4 horas, a triacsin C não alterou os parâmetros de respiração basal, na presença de 1 μ g/mL de oligomicina (estado IV) ou 1 μ M de CCCP (desacoplado). Todavia, quando submetida a tratamento por 8 horas (FIGURA 23B) a triacsin C elevou a velocidade de respiração basal quando comparadas ao controle (DMSO). A inibição da síntese de ATP pela oligomicina (bloqueio da F_0F_1 ATP-sintase) retornou a respiração celular ao estado de repouso (estado IV de respiração mitocondrial), no qual não observou-se efeito significativo da triacsin C. Quando adicionado CCCP, a permeabilidade da membrana mitocondrial interna à H^+ aumenta, fazendo com que o potencial eletroquímico de membrana ($\Delta\psi_m$) se dissipe rapidamente, aumentando o consumo de oxigênio para a velocidade máxima da cadeia respiratória mitocondrial. Nesse estado, foi observada novamente diferença significativa na velocidade de consumo de oxigênio entre as células tratadas com Triacsin C e controles. Um aumento no consumo de O_2 nesses estados respiratório indicam que a triacsin C pode estar induzindo a biogênese mitocondrial (aumento no número de mitocôndrias), a β -oxidação de ácidos graxos e/ou um aumento no número de componentes da cadeia respiratória, e não um desacoplamento mitocondrial, como hipotetizado.

4.2.4 Expressão gênica do co-ativador α do receptor γ do proliferador de peroxissomos ativados (PGC1 α) e β -hidroxiacil CoA desidrogenase (HAD)

Para verificar a hipótese de biogênese mitocondrial foi verificada a expressão gênica de PGC1 α . No hepatócito, a PGC1 α se liga ao domínio E de uma família de receptores nucleares chamados PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*). Este domínio tem a função de transformar os PPARs na sua forma ativa, que se ligam a regiões específicas do DNA para regular a expressão gênica de enzimas relacionadas com o metabolismo energético. Dentre essas enzimas estão as do catabolismo de ácidos graxos, como a β -hidroxiacil CoA desidrogenase (HAD), que catalisa o terceiro passo da β -oxidação dos ácidos graxos. Estas enzimas são reguladas positivamente para acelerar a oxidação de ácidos graxos (CORTON et al, 2000; PUIGSERVER, 2005). O aumento da expressão destas enzimas por triacsin C 1 μ M foi confirmado, como pode ser observado na FIGURA 24. Esses resultados, associados ao aumento da respiração mitocondrial, indicam que a triacsin C induz um aumento no catabolismo de ácidos graxos e aumento do número de mitocôndrias.

4.3 Análise dos efeitos da clusianona sobre a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato

4.3.1 Respiração

A FIGURA 25 mostra os efeitos da clusianona sobre a respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Foram avaliados os estados de fosforilação (V_3), repouso (V_4), de desacoplamento induzido por CCCP (V_{CCCP}) e controle respiratório. A FIGURA 25A demonstra o efeito dose dependente da clusianona 0.1 a 1 μ M (linhas b-e) no aumento da V_4 , alcançando ~ 300% de aumento na velocidade de consumo de oxigênio na concentração de 1 μ M (FIGURA 25B), indicando um efeito desacoplador mitocondrial. Todavia, a clusianona não alterou significativamente a V_3 e nem a V_{CCCP} quando comparado com o controle (FIGURAS

25A e 25B). O aumento da V_4 induzido pela clusianona leva a um decaimento do controle respiratório e da razão ADP/O (FIGURA 25C). A nemorosona exerceu seu conhecido efeito desacoplador, sendo a concentração de 0,5 μM (linha f) mais potente do que a clusianona na mesma concentração (linha d).

4.3.2 Produção de EROs e inchamento mitocondrial

Um leve desacoplamento mitocondrial pode diminuir a produção de EROs por manter os componentes da cadeia respiratória em um estado mais oxidado, diminuindo a redução monoeletrônica do oxigênio (SKULACHEV, 1998). Como esperado (FIGURA 26), a clusianona diminuiu a liberação de EROs em concentrações que causam um leve desacoplamento (linhas b-d) quando comparado com o controle (linha a). Um efeito similar é observado com a nemorosona a 0,5 μM (linha e).

A redução da liberação de H_2O_2 pode prevenir o inchamento mitocondrial. A FIGURA 27 mostra que na presença de Ca^{2+} e em meio isotônico, clusianona previne o inchamento mitocondrial de modo dependente da concentração, atingindo a inibição quase completa a 2,5 μM (linha d). Como esperado, nemorosona a 0,5 mM (linha e) preveniu o inchamento mitocondrial semelhantemente ao inibidor clássico da transição de permeabilidade mitocondrial, ciclosporina A (CSA) (linha f).

4.3.3 Potencial de membrana

O $\Delta\Psi$ mitocondrial é provavelmente o indicador mais sensível do estado de acoplamento energético da organela. Por isso, a diminuição do seu valor na presença da clusianona pode ser considerada como uma prova do seu efeito desacoplador. A FIGURA 28 mostra que clusianona promove uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial de modo dependente da concentração (0,1 - 5 μM , linhas b - e), com um efeito máximo em 5 μM . Isto é consistente com o aumento no estado IV e sugere que esta molécula pode promover a translocação de prótons através da membrana mitocondrial. Mais uma vez, a nemorosona 0,5 μM (linha f) exibiu um efeito mais potente que a clusianona 5 μM (linha e).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Há evidências de disfunção mitocondrial em doenças metabólicas como diabetes (ZHOU et al, 1996), obesidade (SCHRAUWEN et al, 1999) e aterosclerose (OLIVEIRA et al, 2005). Em eucariotos, as mitocôndrias são as responsáveis pela respiração celular e conversão de energia provinda da oxidação de substratos energéticos em ATP. Isso é possível devido à passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória, ocorrendo o bombeamento de H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas contra um gradiente eletroquímico. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a fosforilação do ADP. A dissipação da energia conservada no espaço intermembranas mitocondrial na forma de calor, aumenta o uso de substratos energéticos e consumo de O_2 sem síntese de ATP e também podem reduzir a geração mitocondrial de EROs. Aumentando o gasto energético é possível prevenir ou reduzir o acúmulo de energia corporal na forma de gordura. Sendo assim, estimular sistemas que dissipem levemente o potencial eletroquímico mitocondrial, mesmo que indiretamente, podem ser uma estratégia eficiente na prevenção e tratamento da obesidade e doenças relacionadas.

O primeiro objetivo deste estudo foi induzir a dissipação de energia mitocondrial aumentando o desacoplamento “fisiológico”, ou seja, aumentando os substratos endógenos do desacoplamento, que são os AGLs. Para isto foi utilizada a triacsin C, um inibidor das isoformas da ACS ligadas a síntese de TAG. Primeiramente foi feito um estudo de toxicidade direta da triacsin C sobre o metabolismo mitocondrial. Esses estudos demonstraram que triacsin C 1 μM não induz alterações diretas no metabolismo mitocondrial. Acima desta concentração, triacsin C reduziu o controle respiratório, aumentou a produção de EROs e induziu o inchamento mitocondrial sensível a CSA, indicando envolvimento do PTP. Esse efeito tóxico pode ser explicado pela sua estrutura química lipofílica que permite interações com membranas biológicas.

Os efeitos da triacsin C em hepatócitos primários mostraram que a dose segura para mitocôndrias isoladas (1 μM) também não causou nenhum efeito deletério sobre a viabilidade celular. Nessa concentração, triacsin C aumentou o

consumo do oxigênio mitocondrial, no entanto, não no estado de repouso como esperado, e sim nos estados basal (onde ocorre fosforilação do ADP) e na no estado de velocidade máxima da cadeia respiratória. Isso indicou a indução de biogênese mitocondrial e β -oxidação de ácidos graxos, fato que pode ser explicado pelo aumento da expressão relativa do coativador transcricional PGC1 α . PGC1 α é uma proteína que age como um sensor para diferentes caminhos metabólicos, os quais regulam a sua expressão, fosforilação, estabilidade e atividade transcricional. A regulação da expressão gênica por PGC1 α ocorre por sua interação a fatores de transcrição, com recrutamento de diferentes conjuntos de proteínas, formando um complexo multiprotéico funcional que transcreve genes específicos. Em fígados, a PGC1 α é ativada em caminhos metabólicos ligados ao jejum, como a neoglicogênese. O glucagon ativa, via AMPc, o fator de transcrição CREB (*cAMP response element-binding protein*), um importante regulador da expressão do gene PGC1 α . Uma vez ativada, a PGC1 α se liga e co-ativa diferentes fatores de transcrição, como HNF4 α (*hepatocyte nuclear factor*), FOXO1 (*forkhead box O1a*) e GR (*glucocorticoid receptor*), para coordenar a expressão de genes neoglicogênicos. Além disso, a PGC-1 α também é ativada em outras vias metabólicas sinalizadas pelo jejum, como a oxidação dos ácidos graxos e cetogênese. Isso pode ser explicado pela propriedade de ligação da PGC1 α aos PPAR α , coordenando assim a expressão de genes ligados à oxidação de ácidos graxos e biogênese mitocondrial (PUIGSERVER, 2005; REMELS et al, 2010).

No tecido adiposo marrom e no músculo esquelético, a PGC-1 α coordena, além da biogênese mitocondrial e da β -oxidação, a expressão de UCPs principalmente via PPARs (PUIGSERVER et al., 1998; TANAKA et al., 2003). Isso indica que nos nossos experimentos, a triacsin C pode ter induzido a expressão de UCPs, apesar de não termos detectado sua atividade via respiração celular.

Nossos resultados reforçaram os resultados de LEWIN e colaboradores (2001), que demonstraram que triacsin C não prejudica a β -oxidação hepática. Segundo eles, a isoforma 5 da ACS, a qual sintetiza acil-CoA para a β -oxidação, é resistente à inibição pela triacsin C. Nossos resultados mostraram inclusive que a expressão de enzimas envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos, como a HAD, estão elevadas no tratamento com triacsin C. Isso indica também que a redução na síntese de acil-CoA para a esterificação em TAG promovida pela triacsin C pode

disponibilizar mais ácidos graxos para a síntese de acil-CoA para a β -oxidação. Um aumento na β -oxidação mitocondrial pode elevar o consumo de oxigênio, como verificado, preservando as reservas de glicose celular.

A forma como a triacsin C ativa a expressão de PGC1 α é a próxima questão a ser respondida. Atualmente, nossa hipótese é de que a triacsin C tenha aumentado a expressão de PGC1 α através elevação das concentrações intracelulares de AGL, que por sua vez são ligantes de PPARs. Reduzindo a síntese de TAG, a triacsin C pode ter aumentado as concentrações de acil-CoA para a β -oxidação e as de AGL, como previsto. Esses AGL não foram suficientes para desacoplar a fosforilação oxidativa mitocondrial, no entanto serviram de ligantes aos PPARs, que por sua vez podem aumentar a expressão gênica de PGC1 α . Para completar esses resultados, será necessário mensurar as concentrações intracelulares de AGL, assim como a expressão de outros genes, como os de fatores de transcrição ligados às vias ativadas.

O segundo objetivo deste trabalho foi verificar se a clusianona, assim como seu análogo nemorosona, possui atividade desacopladora em mitocôndrias isoladas de fígados de ratos. Desacopladores químicos são, em geral, ácidos fracos lipofílicos onde a forma protonada (ligada ao H⁺) atravessa a membrana mitocondrial interna, liberando o H⁺ na matriz mitocondrial. Em seguida, a forma desprotonada retorna ao espaço intermembranas, onde adquire outro H⁺ para retornar à matriz, estabelecendo um ciclo fútil (TERADA, 1981; TERADA 1990). Isso acelera o ciclo de Krebs e a passagem dos elétrons pela cadeia respiratória a fim de recompor o potencial intermembranas mitocondrial, utilizando substratos energéticos tais como ácidos graxos, glicose e aminoácidos.

Nossos resultados mostraram que a clusianona é um desacoplador da fosforilação oxidativa, provavelmente por uma ação protonofórica assim como a nemorosona. Os grupamentos químicos que permitem desacoplar as mitocôndrias consistem em um grupo hidroxila dissociável com pKa = 4,5 $\pm$ 0,1 (EGA valor teórico), uma unidade receptora de elétrons (dois grupos carbonilas e um benzóico), e três isoprenilas, que são os grupos contribuintes para a lipofilicidade global de 10,3 (ACD LogP valor teórico). A forma aniônica de moléculas com carga resultante negativa atravessa a membrana mitocondrial, pois os elétrons que compõem a carga negativa são deslocalizados sobre os orbitais p das ligações π , no sistema

conjugado, fazendo com que seu padrão lipofílico se imponha à carga, baixando assim a energia de ativação para o movimento através da membrana (TERADA, 1981; TERADA, 1990).

O equilíbrio ceto-enólico em associação com a conjugação de ligações π , a partir do carbono 4 ligado a uma hidroxila, para os grupos 2-ceto da clusianona, poderia estabilizar as suas formas aniônicas através da transferência de cargas ao longo da sua estrutura, mantendo o seu padrão lipofílico suficiente para atravessar a membrana mitocondrial interna (ACD $\text{LogD}_{\text{pH } 7.4} = 7.49$). Uma vez que a clusianona na forma aniônica retorna ao espaço intermembranas mitocondrial, ela se liga covalentemente a um dos H^+ do compartimento. Consequentemente, a clusianona que se apresenta na forma protonada, pode difundir pelo espaço intermembranas mitocondrial (pH menor) até o interior da matriz mitocondrial (pH mais elevado), dissociar-se para sua forma ionizada e retornar para o espaço intermembranas mitocondrial, onde pode ser protonado novamente repetindo o ciclo. Isso provoca a dissipação do potencial eletroquímico mitocondrial.

Deve ser considerado que uma ponte de hidrogênio intramolecular irá diminuir consideravelmente a acidez de um doador de hidrogênio e, portanto, a interação com uma base externa será reduzida (HUQUE & PLATTS, 2003). Neste sentido, a dissociação do próton ácido (H^+) da clusianona pode ser dificultada pela sua ligação intramolecular com o grupo carbonila em C15. Isto pode explicar a menor potência desacopladora da clusianona em relação a nemorosona. A nemorosona não possui pontes de hidrogênio intramolecular, pois há um grupo isoprenila em C3, ao invés de uma benzoila.

No entanto, observamos que a clusianona tem um efeito profundo sobre a função mitocondrial e tem um potencial efeito citotóxico, uma vez que seu análogo estrutural nemorosona causa morte celular em linhagens HepG2 por dissipação do potencial intermembranar mitocondrial e depleção do ATP celular (PARDO-ANDREU et al, 2011). Desacopladores mitocondriais tais como o DNP e o DNP-metil éter, têm sido caracterizados como potentes redutores da hipertrigliceridemia, doença de fígado gorduroso não alcoólico e resistência a insulina (Perry et al., 2013). Futuros experimentos verificarão a capacidade protonofórica desta molécula, sua toxicidade em células cancerígenas hepáticas e seu potencial uso *in vivo* como agente anti-cancerígeno e anti-obesidade.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A indução do desacoplamento “fisiológico” por meio da redução da atividade das isoformas da ACS relacionadas à síntese de TAG por triacsin C na concentração atóxica, não induziu o desacoplamento mitocondrial, porém ativou as vias metabólicas ligadas à biogênese mitocondrial e β -oxidação de ácidos graxos, resultando em aumento da respiração celular. Esses eventos aumentaram o metabolismo hepático e podem aumentar a utilização de lipídeos como substratos energéticos, podendo contribuir no tratamento de doenças como a esteatose hepática e hipertrigliceridemia. Dessa forma, triacsin C tem um potencial terapêutico no tratamento de doenças como esteatose hepática, hipertrigliceridemia e obesidade.

A clusianona se mostrou um agente desacoplador eficaz da fosforilação oxidativa mitocondrial, provavelmente envolvendo um mecanismo protonofórico devido as suas propriedades químicas. Isso explica em parte seu mecanismo citotóxico em linhagens de células de câncer.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ALBERICI LC, ALBERICI RM, OLIVEIRA HCF, EBERLIN MN, CATHARINO R, VERCESI AE. Analyses of hepatic lipids involved in increased metabolism in hypertriglyceridemic mice by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.**; 401(5):1651-9, 2011.

ALBERICI LC, OLIVEIRA HC, BIGHETTI EJ, DE FARIA EC, DEGASPARI GR, SOUZA CT, VERCESI AE. Hypertriglyceridemia increases mitochondrial resting respiration and susceptibility to permeability transition. **J Bioenerg Biomembr**, 35:451-7, 2003.

ALBERICI LC, OLIVEIRA HC, PAIM BA, MANTELLO CC, AUGUSTO AC, ZECCHIN KG, GURGUEIRA SA, KOWALTOWSKI AJ, VERCESI AE. Mitochondrial ATP-sensitive K(+) channels as redox signals to liver mitochondria in response to hypertriglyceridemia. **Free Radic Biol Med.**;47:1432-9, 2009.

ALBERICI LC, OLIVEIRA HC, PATRÍCIO PR, KOWALTOWSKI AJ, VERCESI AE. Hyperlipidemic mice present enhanced catabolism and higher mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. **Gastroenterology**;131:1228-34, 2006.

ARAI T, KAWAKAMI Y, MATSUSHIMA T, OKUDA Y, YAMASHITA K. Intracellular fatty acid downregulates ob gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** ;297:1291-6, 2002.

AZAIN MJ, HAUSMAN DB, SISK MB, FLATT WP & JEWELL DE. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. **J Nutr** 130, 1548–1554, 2000.

BARBOSA MR, et al. Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin resistant muscle cells: Effect of catalase overexpression. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 1591–1604, 2013.

BARTLETT J, BRUNNER M, GOUGH K. Deliberate poisoning with dinitrophenol (DNP): an unlicensed weight loss pill. **Emerg Med J.** 27:159–160, 2010.

BERNARDI, P.; KRAUSKOPF, A.; BASSO, E.; PETRONILLI, V.; BLACHLY-DYSON, E.; DILISA, F.; FORTE, M.A. The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target. **FEBS J.**, Oxford, v. 273, p. 2077-2099, 2006.

BONNEY RJ, WALKER PR, POTTER VR. Isoenzyme patterns in parenchymal and non-parenchymal cells isolated from regenerating and regenerated rat liver. **Biochem J.**;136:947-54, 1973.

BOSS O., SAMEC, S., PAOLONI-GIACOBINO, A., ROSSIER, C., DULLOO, A., SEYDOUX, J., MUZZIN, P., GIACOBINO, J.P. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. **FEBS Lett.** 408: 39-42, 1997.

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

BURTIS, ASHWOOD, BRUNS. **Tietz**: Fundamentos de química clínica. 6ª edição. Elsevier, 2008

CADENAS, E.; BOVERIS, A.; RAGAN, C. I.; STOPPANI, A. O. M. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 180: 248-257, 1977.

CAMARGO MS, A.M. PRIETO, F.A. RESENDE, P.K. BOLDRIN, C.R. CARDOSO, M.F. FERNÁNDEZ, J.M. MOLINA-MOLINA, N. OLEA, W. VILEGAS, O. CUESTA-RUBIO, E.A. VARANDA. Evaluation of estrogenic, antiestrogenic and genotoxic activity of nemorosone, the major compound found in brown Cuban propolis, **BMC Complement. Altern. Med.** 13 201, 2013.

CANNON B, SUNDIN U, ROMERT L. Palmitoyl coenzyme A: a possible physiological regulator of nucleotide binding to brown adipose tissue mitochondria. **FEBS Lett.**;74(1):43-6, 1977.

CASTEDO M, K. FERRI, T. ROUMIER, D. MÉTIVIER, N. ZAMZAMI, G. KROEMER, Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis, **J. Immunol. Methods.** 265 39–47, 2002.

CHERIAN G, HOLSONBAKE TB, GOEGER MP & BILDFELL R. Dietary CLA alters yolk and tissue FA composition and hepatic histopathology of laying hens. **Lipids** 37, 751–757, 2002.

CHERNAYAEV GA, T.I. BARKOVA, V. EGOROVA, I.B. SOROKINA, S.N. ANACHENKO, G.D. MATARODZE, N.A. SOKOLOVA, V.B. ROZEN, A series of optical structural and isomeric analogues of estradiol: a comparative study of the biological activity and affinity to cytosol receptor of rabbit uterus, **J. Steroid Biochem.** 6 1483–1488, 1975.

CHISOLM, G. M., AND STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radic. Biol. Med.** 28, 1815–1826, 2000.

CLAPHAM JC, ARCH JR, CHAPMAN H, ET AL. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. **Nature**;406:415–418, 2000.

CROMPTON, M.; ELLINGER, H.; COSTI, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in hart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochem. J.**, London, v. 255(1), p. 357-360, 1988.

CRUZ AJ, V.S. LEMOS, M.H. DOS SANTOS, T.J. NAGEM, S.F. CORTES. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta, **Phytomedicine** 13 442–445, 2006.

CUESTA-RUBIO O, H. VELEZ, B. FRONTANA-URIBE, J. CARDENAS. Nemorosone, the main constituent of the floral resins of *Clusia rosea*, **Phytochemistry** 57 279–283, 2001.

DE CASTRO ISHIDA VF, G. NEGRI, A. SALATINO, M.F.C.L. BANDEIRA, A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria, **Food Chem.** 125 966–972, 2011.

DELLE MONACHE F, G. DELLE MONACHE, E. GACS-BAITZ. Prenylated benzophenones from *Clusia sandiensis*, **Phytochemistry** 30 2003–2005, 1991.

DEPIERRE, J.W.; ERNSTER, L. Enzyme topology of intracellular membranes. **Annu Ver Biochem**, 46:201-62, 1977.

DÍAZ-CARBALLO D, S. MALAK, W. BARDENHEUER, M. FREISTUEHLER, H.P. REUSCH. Cytotoxic activity of nemorosone in neuroblastoma cells, **J. Cell Mol. Med.** 12 2598–2608, 2008.

DÍAZ-CARBALLO D, S. SEEBER, D. STRUMBERG, R.A. HILGER. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*, **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.** 41 622–633, 2003.

DUVAL, C., NEGRE-SALVAYRE, A., DOGILO, A., SALVAYRE, R., PENICAUD, L., CASTEILLA, L. Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. **Biochem Cell Biol.** 80: 757-64, 2002.

EALEY KN, EL-SOHEMY A & ARCHER MC. Effects of dietary conjugated linoleic acid on the expression of uncoupling proteins in mice and rats. **Lipids** 37, 853–861, 2002.

EDINGER AL, C.B. THOMPSON, Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, **Curr. Opin. Cell Biol.** 16 663–669, 2004.

FAERGEMAN NJ, KNUDSEN J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. **Biochem J.**;323 (Pt 1):1-12, 1997.

FLEURY C, NEVEROVA M, COLLINS S, RAIMBAULT S, CHAMPIGNY O, LEVI-MEYRUEIS C, BOUILLAUD F, SELDIN MF, SURWIT RS, RICQUIER D, WARDEN CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nat Genet.**;15:269-72, 1997.

GARNSEY MR, J.A. MATOUS, J.J. KWIEK, D.M. COLTART, Asymmetric total synthesis of (+)- and (–) clusianone and (+) and (–)-clusianone methyl enol ether via ACC alkylation and evaluation of their anti-HIV activity, **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 21 2406–2409, 2011.

GAVINO VC, GAVINO G, LEBLANC MJ & TUCHWEBER B. An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9, trans-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. **J Nutr** 130, 27–29, 2000.

GONG, D.W., HE, Y., KARAS, M., REITMAN, M. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. **J Biol Chem.**272: 24129-32, 1997.

GRIJALBA, M.T.; VERCESI, A.E.; SCHREIER, S. Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, Washington, v. 38, p. 13279-13287, 1999.

HALLESTRAP, A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 34, p. 232-237, 2006.

HANKIN JA AND MURPHY RC. MALDI-TOF and electrospray tandem mass spectrometric analysis of fatty acyl-CoA esters. **Intern Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes** 165/166 467-474, 1997.

HARPER JA, K. DICKINSON, M.D. BRAND. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. **Obes. Rev.** 2 255–265, 2001.

HARWOOD,H. J. JRETAL. Isozyme-nonselective N-substituted bipiperidylcarboxamide acetyl-CoA carboxylase inhibitors reduce tissue malonyl-CoA concentrations, inhibit fatty acid synthesis, and increase fatty acid oxidation in cultured cells and in experimental animals. **J. Biol. Chem.** 278, 37099–37111, 2003.

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

HOCH FL, HOGAN FP. Hyperthermia, muscle rigidity, and uncoupling in skeletal muscle mitochondria in rats treated with halothane and 2,4 dinitrophenol. **Anaesthesiology** 38:237–243, 1973.

HOEK JB, J. RYDSTROM, Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase, **Biochem. J.** 254 1–10, 1988.

HOLLER N, R. ZARU, O. MICHEAU, M. THOME, A. ATTINGER, S. VALITUTTI, J.L. BODMER, P. SCHNEIDER, B. SEED, J. TSCHOPP. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule, **Nat. Immunol.** 1 489–495, 2000.

HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 195, p. 453–459, 1979.

HUQUE FTT, J.A. PLATTS, The effect of intramolecular interactions on hydrogen bond acidity, **Org. Biomol. Chem.** 1 1419–1424, 2003.

ISSEKATZ B. Effect of propranolol in dinitrophenol poisoning. **Arch Int Pharmacodyn** 272:310–319, 1984.

ITO C, M. ITOIGAWA, Y. MIYAMOTO, S. ONODA, K.S. RAO, T. MUKAINAKA, H. TOKUDA, H. NISHINO, H. FURUKAWA. Polyprenylated benzophenones from *Garcinia assigu* and their potential cancer chemopreventive activities, **J. Nat. Prod.** 66 206–209, 2003.

IWAI N, KATSUYA T, MANNAMI T, HIGAKI J, OGIHARA T, KOKAME K, OGATA J, BABA S. Association between SAH, an acyl-CoA synthetase gene, and hypertriglyceridemia, obesity, and hypertension. **Circulation.**;105:41-7, 2002.

JEZEK P, ENGSTOVÁ H, ZÁCKOVÁ M, VERCESI AE, COSTA AD, ARRUDA P, GARLID KD. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. **Biochim Biophys Acta.**;1365:319-27, 1998.

JUMP DB, BOTOLIN D, WANG Y, XU J, CHRISTIAN B, DEMEURE O. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **J Nutr.**;135:2503-6, 2005.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia básica**. 10^a edição. Guanabara Koogan, 2006.

KANETO H, KATAKAMI N, MATSUHISA M, MATSUOKA TA. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. **Mediators Inflamm.**;453892, 2010.

KAPLAN, R. R., AND PEDERSEN, P. L. **Biochem. J.** 212, 279–288, 1983.

KLAUNIG JE, KAMENDULIS LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**;44:239-67, 2004.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E.; Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 26: 463-71, 1999.

KRITCHEVSKY D, TEPPER SA, WRIGHT S, TSO P & CZARNECKI SK. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. **J Am Coll Nutr** 19, 472S–477S, 2000.

KROEMER G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways, **Cell Death Differ.** 5 547, 1998.

KUAI XY, JI ZY, ZHANG HJ. Mitochondrial uncoupling protein 2 expression in colon cancer and its clinical significance. **World J Gastroenterol.**;16(45):5773-8, 2010.

KUMAR, ABBAS, FAUSTO. **Robbins & Cotran: Patologia, bases patológicas das doenças**. 7^a edição. Saunders, 2007

KURIYAMA H, YAMASHITA S, SHIMOMURA ET AL. Enhanced expression of hepatic acyl-coenzyme A synthetase and microsomal triglyceride transfer protein messenger RNAs in the obese and hypertriglyceridemic rat with visceral fat accumulation. **Hepatology.**;27:557-62, 1998.

LEWIN TM, KIM JH, GRANGER DA, VANCE JE, COLEMAN RA. Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. **J Biol Chem.**;276:24674-9, 2001.

MARTIN SJ, C.P. REUTELINGSPERGER, A.J. MCGAHON, J.A. RADER, R.C. VAN SCHIE, D.M. LAFACE, D.R. GREEN. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, **J. Exp. Med.** 182 1545– 56, 1995.

MASHEK DG, MCKENZIE MA, VAN HORN CG, COLEMAN RA. Rat long chain acyl-CoA synthetase 5 increases fatty acid uptake and partitioning to cellular triacylglycerol in McArdle-RH7777 cells. **J Biol Chem.**;281(2):945-50, 2006.

MASHIMA T, SATO S, OKABE S, MIYATA S, MATSUURA M, SUGIMOTO Y, TSURUO T, SEIMIYA H. Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. **Cancer Sci.** ;100:1556-62, 2009.

MATSUDA D, NAMATAME I, OHSHIRO T, ISHIBASHI S, OMURA S, TOMODA H. Anti-atherosclerotic activity of triacsin C, an acyl-CoA synthetase inhibitor. **J Antibiot** (Tokyo) 61:318–321, 2008.

MCCANDLISH LE, J.C. HANSON, G.H. STOUT. The structures of two derivatives of bicyclo[3,3,1]nonane-2,4,9-trione. A natural product: clusianone, C₃₃H₄₂O₄, and trimethylated catechinic acid, C₁₈H₂₀O₆, **Acta Crystallogr.** B 32 1793–1801, 1976.

MCLEOD RS, LEBLANC AM, LANGILLE MA, MITCHELL PL, CURRIE DL. Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hepatic very-low-density lipoprotein metabolism. **Am J Clin Nutr.**;79(6 Suppl):1169S-1174S, 2004.

MICELI V, L. COCCIADIFERRO, M. FREGAPANE, M. ZARCONE, G. MONTALTO, L.M. POLITO, B. AGOSTARA, O.M. GRANATA, G. CARRUBA. Expression of wild-type and variant estrogen receptor alpha in liver carcinogenesis and tumor progression, **OMICS** 15 313–317, 2011.

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

MOUAFFAK F, KEBIR O, BELLON A, GOUREVITCH R, TORDJMAN S, VIALA A, MILLET B, JAAFARI N, OLIÉ JP, KREBS MO. Association of an UCP4 (SLC25A27) haplotype with ultra-resistant schizophrenia. **Pharmacogenomics**. 12(2):185-93, 2011.

MUDGE GH. Electrolyte and water metabolism of rabbit kidney slices: effect of metabolic inhibitors. **Amer J Physiol** 167:206, 1951.

MUOIO DM, LEWIN TM, WIEDMER P, COLEMAN RA. Acyl-CoAs are functionally channeled in liver: potential role of acyl-CoA synthetase. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. ;279:E1366-73, 2000.

N. ZAMZAMI, S.A. SUSIN, P. MARCHETTI, T. HIRSCH, I. GÓMEZ-MONTERREY, M. CASTEDO, G. KROEMER. Mitochondrial control of nuclear apoptosis, **J. Exp. Med**. 183 1533–1544, 1996.

NALDONI FJ, A.L.R. CLAUDINO, J.W. CRUZ, J.K. CHAVASCO, P.M. FARIA E SILVA, M.P. VELOSO, M.H. DOS SANTOS, Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*, **J. Med. Food** 12 403–407, 2009.

NAVARRO V, ZABALA A, MACARULLA MT, FERNANDEZ-QUINTELA A, RODRIGUEZ VM, SIMON E & PORTILLO MP (2003) Effects of conjugated linoleic acid on body fat accumulation and serum lipids in hamsters fed an atherogenic diet. **J Physiol Biochem**. 59, 193–199, 2003.

NEDIALKOV PT, D. ZHELEVA-DIMITROVA, G. MOMEKOV, K. KARLOV, U. GIRRESER, G.M. KITANOV. Elegaphenone and 7-epi-clusianone, the major cytotoxic constituents of *Hypericum elegans*, **Nat. Prod. Res**. 25 1743–1750, 2011.

NELSON & COX. **Lehninger**: Princípios de bioquímica. 5ª edição. Sarvier, 2011.

NEVES JS, L.P. COELHO, R.S. CORDEIRO, M.P. VELOSO, P.M. RODRIGUES E SILVA, M.H. DOS SANTOS, M.A. MARTINS. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*, **Planta Med.** 73 644–649, 2007.

NICHOLLS DG. **Bioenergetics**. An introduction to the chemiosmotic theory, first ed. Academic Press, London, 1982.

NICHOLLS DG. The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria. **FEBS Lett.**;61:103-110, 1976.

OHNUKI K, HARAMIZU S, OKI K, ISHIHARA K, FUSHIKI T.A. single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. **Lipids**.;36:583-7, 2001.

OLIVEIRA HC, COSSO RG, ALBERICI LC, MACIEL EN, SALERNO AG, DORIGHELLO GG, VELHO JA, DE FARIA EC, VERCESI AE. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **FASEB J.**;19:278-80, 2005.

OMURA S, TOMODA H, XU QM, TAKAHASHI Y, IWAI Y. Triacsins, new inhibitors of acyl-CoA synthetase produced by *Streptomyces* sp. **Biochim Biophys Acta**.;921:595-8, 1987.

OSTROWSKA E, SUSTER D, MURALITHARAN M, CROSS RF, LEURY BJ, BAUMAN DE & DUNSHEA FR. Conjugated linoleic acid decreases fat accretion in pigs: evaluation by dual-energy X-ray absorptiometry. **Br J Nutr** 89, 219–229, 2003.

OUJI Y, YOSHIKAWA M, MORIYA K, NISHIOFUKU M, OUJI-SAGESHIMA N, MATSUDA R, NISHIMURA F, ISHIZAKA S. Isolation and characterization of murine hepatocytes following collagenase infusion into left ventricle of heart. **J Biosci Bioeng**.;110:487-90, 2010.

PARDO-ANDREU GL, Y. NUÑEZ-FIGUEREDO, V.G. TUDELLA, O. CUESTA-RUBIO, F.P. RODRIGUES, C.R. PESTANA, S.A. UYEMURA, A.M. LEOPOLDINO, L.C. ALBERICI, C. CURTI. The anti-cancer agent nemorosone is a new potent protonophoric mitochondrial uncoupler, **Mitochondrion** 11 255–263, 2011.

PARDO-ANDREU GL, Y. NUÑEZ-FIGUEREDO, V.G. TUDELLA, O. CUESTA-RUBIO, F.P. RODRIGUES, C.R. PESTANA, S.A. UYEMURA, A.M. LEOPOLDINO, L.C. ALBERICI, C. CURTI,. The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: ensuing energetic and oxidative stress implications, **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 253 282–289, 2011.

PARIZA MW, PARK Y, COOK ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Prog Lipid Res.** Jul;40(4):283-9, 2001.

PARIZA MW. Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. **Am J Clin Nutr** 79, 1132S–1136S, 2004.

PARK Y, ALBRIGHT KJ, LIU W, STORKSON JM, COOK ME & PARIZA MW. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids** 32, 853–858, 1997.

PEDERSEN PL, J.W. GREENAWALT, B. REYNAFARJE, J. HULLIHEN, G.L. DECKER, J.W. SOPER, E. BUSTAMANTE. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver derived tissues, **Methods Cell. Biol.** 20 411–481, 1978.

PENG CAO,* XUETING CAI, WUGUANG LU, FEI ZHOU, AND JIEGE HUO. Growth inhibition and induction of apoptosis in SHG-44 glioma cells by chinese medicine formula “Pingliu Keli”. **Evid Based Complement Alternat Med.**; 2011: 958243, 2011.

PEREIRA IO, M.J. MARQUES, A.L.R. PAVAN, B.S. CODONHO, C.L. BARBIÉRI, L.A. BEIJO, A.C. DORIGUETTO, E.C. D’MARTIN, M.H. DOS SANTOS. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. **Fruits, Phytomedicine** 17 339–345, 2010.

PERKINS RG. A study of munitions intoxications in France. **Pub Health Rep** 34:2335, 1919.

PERRY RJ, KIM T, ZHANG XM, LEE HY, PESTA D, POPOV VB, ZHANG D, RAHIMI Y, JURCZAK MJ, CLINE GW, SPIEGEL DA, SHULMAN GI. Reversal of Hypertriglyceridemia, Fatty Liver Disease, and Insulin Resistance by a Liver-Targeted Mitochondrial Uncoupler. **Cell Metab.** Nov 5;18(5):740-8, 2013

PICCINELLI AL, O. CUESTA-RUBIO, M.B. CHICA, N. MAHMOOD, B. PAGANO, M. PAVONE, V. BARONE, L. RASTRELLI. Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron** 61 8206–8211, 2005.

POPOLO A, A.L. PICCINELLI, S. MORELLO, R. SORRENTINO, C.R. OSMANY, L. RASTRELLI, A. PINTO. Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 89 50–57, 2011.

PUIGSERVER P, WU Z, PARK CW, GRAVES R, WRIGHT M, SPIEGELMAN BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**; 92: 829–839, 1998.

Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 431, p. 138–144, 2004.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for the carbonyl assay. **Methods Enzymol.** 233:357–363; 1994.

ROCHE HM, NOONE E, SEWTER C, MCBENNETT S, SAVAGE D, GIBNEY MJ, O'RAHILLY S & VIDAL-PUIG AJ. Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXRalpha. **Diabetes** 51, 2037–2044, 2002.

ROGNSTAD R, KATZ J. The effect of 2,4 dinitrophenol on adipose-tissue metabolism. **Biochem J** 111:431–444, 1969.

SAMARTSEV VN, MOKHOVA EN. ATP/ADP antiporter- and aspartate/glutamate antiporter-mediated fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria in incubation media differing in ion composition. **Biochem Mol Biol Int.** 1997;42:29-34, 1997.

SANCHIS, D.; FLEURY, C.; CHOMIKI, N.; GOUBERN, M.; HUANG, Q.; NEVEROVA, M. ET AL. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. **J Biol Chem.** 273:34611-5, 1998.

SANTA-CECÍLIA FV, L.A.S. FREITAS, F.C. VILELA, C.C. VELOSO, C.Q. DA ROCHA, M.E.C. MOREIRA, D.F. DIAS, A. GIUSTI-PAIVA, M.H. DOS SANTOS, Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*, **Eur. J. Pharmacol.** 670 (2011) 280–285, 2011.

SCHOONJANS K, STAELS B, AUWERX J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. **J Lipid Res.** 1996;37:907-25.

SCHRAUWEN P, WALDER K, RAVUSSIN E. Human uncoupling proteins and obesity. **Obes Res.** Jan;7(1):97-105, 1999.

SCHRAUWEN, P., SARIS, W.H., HESSELINK MK. An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. **FASEB J.** 15: 2497-502, 2001.

SIMPKINS NS, F. HOLTRUP, V. RODESCHINI, J.D. TAYLOR, R. WOLF, Comparison of the cytotoxic effects of enantio pure PPAPs, including nemorosone and clusianone, **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 22 6144–6147, 2012.

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

SMORODCHENKO A, RUPPRECHT A, FUCHS J, GROSS J, POHL EE. Role of mitochondrial uncoupling protein 4 in rat inner ear. **Mol Cell Neurosci.** Mar 10, 2011.

STAELS B, DALLONGEVILLE J, AUWERX J, SCHOONJANS K, LEITERSDORF E, FRUCHART JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation.**;98(19):2088-93, 1998.

SWINBURN BA, CATERSON I, SEIDELL JC, JAMES WP. Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. **Public Health Nutr.**;7(1A):123-46, 2004.

TAKAHASHI M, SUNAGA M, HIRATI-KOIZUMI M, HIROSE A, EMA M. Reproductive and developmental toxicity screening study of 2,4-dinitrophenol in rats. *Environ Toxicol* 24:74–81, 2009.

TAKAHASHI Y, KUSHIRO M, SHINOHARA K & IDE T. Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 133, 395–404, 2002.

TANAKA T, YAMAMOTO J, IWASAKI S, ASABA H, HAMURA H, IKEDA Y, ET AL. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*;100:15924–9, 2003.

TERADA H. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 639 225–242, 1981.

TERADA H. Uncouplers of oxidative phosphorylation, *Environ. Health Perspect.* 87, 213–218, 1990.

TERPSTRA AH. Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature. *Am J Clin Nutr* 79, 352–361, 2004.

TSUBOYAMA-KASAOKA N, TAKAHASHI M, TANEMURA K, KIM HJ, TANGE T, OKUYAMA H, KASAI M, IKEMOTO S, EZAKI O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*. Sep;49(9):1534-42, 2000.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports* 17: 3-8. WHO – World Health Organization – CVD Risk Management Package for Low and Medium-Resource Settings. Geneva: **WHO**, 2003, 38p, 1997.

TURRENS, J.F., BOVERIS, A. Generation of the superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 191: 421-427, 1980

VERCAMMEN D, R. BEYAERT, G. DENECKER, V. GOOSSENS, G. VAN LOO, W. DECLERCQ, J. GROOTEN, W. FIERS, P. VANDENABEELE. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor, **J. Exp. Med.** 187 1477–1485, 1998.

VERCESI AE, The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria, **Arch. Biochem. Biophys.** 252 171–178, 1987.

VERCESI, A.; KOWALTOWSKI, A.J.; OLIVEIRA, H.C.; CASTILHO, R.F. Mitochondrial Ca^{2+} transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. **Front. Biosci.** Tampa, v. 11, p. 2554-2564, 2006.

VOTYAKOVA T.V., REYNOLDS C.I.J. Detection of hydrogen peroxide with Amplex

WANG S, SUBRAMANIAM A, CAWTHORNE MA & CLAPHAM JC. Increased fatty acid oxidation in transgenic mice overexpressing UCP3 in skeletal muscle. **Diabetes Obes Metab** 5, 295–301, 2003.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, New York, v. 15(22), p. 2922-2933, 2001.

WARREN JM, SIMON VA, BARTOLINI G, ERICKSON KL, MACKEY BE & KELLEY DS. Trans-10, cis-12 CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: possible roles of specific lipid metabolism genes. **Lipids** 38, 497–504, 2003.

WEST DB, BLOHM FY, TRUETT AA & DELANY JP. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing UCP gene expression. **J Nutr.**;130, 2471–2477, 2000.

WESTEKEMPER H, M. FREISTUEHLER, N. BORNFELD, K.P. STEUHL, M. SCHEULEN, R.A. HILGER, Chemosensitivity of conjunctival melanoma cell lines to target-specific chemotherapeutic agents, **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.** 251 279–284, 2013.

WHIGHAM LD, WATRAS AC, SCHOELLER DA. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. **Am J Clin Nutr.** 85:1203-11, 2007.

WOJTCZAK L, LEBIEDZIŃSKA M, SUSKI J, WIĘCKOWSKI MR, SCHÖNFELD P. Inhibition by purine nucleotides of the release of reactive oxygen species from muscle mitochondria: Indication for a function of uncoupling proteins as superoxide anion transporters. **Biochem Biophys Res Commun.** Mar 23, 2011.

ZANOTTI A, G.F. AZZONE. Safranine as membrane potential probe in rat liver mitochondria, **Arch. Biochem. Biophys.** 201 255–265, 1980.

ZHOU M, Z. DIWU, N. PANCHUK-VOLOSHINA, R.P. HAUGLAND. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases, **Anal. Biochem.** 15 162–168, 1997.

ZHOU YP, PRIESTMAN DA, RANDLE PJ, GRILL VE. Fasting and decreased B cell sensitivity: important role for fatty acid-induced inhibition of PDH activity. **Am J Physiol.** 270:E988-94, 1996.

ZHOU, M.; DIWU, Z.; PANCHUK-VOLOSHINA, N.; HAUGLAND, R. P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Anal. Biochem.** 15:162–168; 1997.

ZIECH D, FRANCO R, PAPPA A, PANAYIOTIDIS MI. Reactive Oxygen Species (ROS)--Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. **Mutat Res.** Mar 24, 2011.

ZONG WX, D. DITSWORTH, D.E. BAUER, Z.Q. WANG, C.B. THOMPSON, Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death, **Genes Dev.** 18 1272–1282, 2004.

ZORATTI M, I. SZABÓ. The mitochondrial permeability transition, *Biochim. Biophys. Acta* 1241 (1995) 139–176.

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

ZOU J, et al. Potent inhibitors of lipid droplet formation. **Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program.**; 2011.

ZULET MA, MARTI A, PARRA MD, MARTÍNEZ JA. Inflammation and conjugated linoleic acid: mechanisms of action and implications for human health. **J Physiol Biochem.**;61(3):483-94, 2005.

FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Hepatócitos isolados por técnica de perfusão hepática utilizando collagenase, fixados e corados por hematoxilina/eosina. Aumento de 1000x.

Figura 2. Vias metabólicas da acil-CoA e inibição pela Triacsin. AA, ácido aracdônico; ACS, acil-CoA sintetase; CL, cardiolipina; FA, ácido graxo; LPA, ácido lisofosfatídico; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; T, Triacsin.

Figura 3. Ilustração da anatomia de uma mitocôndria. Na figura estão demonstrados os componentes e algumas propriedades das membranas mitocondriais. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)

Figura 4. Catabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas divididos em 3 estágios da respiração celular. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)

Figura 7. Centros de ferro-enxofre. Eles podem ser simples com apenas um átomo de ferro (a), dois (b) e até 4 (c). (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)

Figura 8. Modelo quimiosmótico. Na figura estão demonstrados os complexos da cadeia respiratória e complexo da ATPase inseridos na membrana interna mitocondrial. As setas azuis indicam o fluxo dos elétrons até o oxigênio molecular inserido no complexo IV, intermediado pelo citocromo c (seta preta tracejada). As setas rosas indicam o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranas mitocondrial, formando um potencial eletroquímico, e do espaço intermembranas para a matriz, com a fosforilação do ADP. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)

Figura 9. Formação de EROs nas mitocôndrias e defesas mitocondriais. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido nos complexos I e III à medida que o radical ubiquinona parcialmente reduzido doa um elétron para o O_2 . O superóxido reage com a enzima aconitase (uma proteína 4Fe-4S do ciclo de Krebs) liberando Fe^{2+} . Na presença de Fe^{2+} , a reação de Fenton leva a formação do radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), fortemente reativo. As reações em azul mostram a atuação do sistema antioxidante: a glutatona reduzida (GSH) doa elétrons para a redução de H_2O_2 e dos resíduos oxidados de cisteína (-S-S-) de enzimas e outras proteínas, sendo regenerada através da redução da sua forma oxidada (GSSG) pelo NADPH. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)

Figura 10. Resumo das vias intrínseca, extrínseca e efetora da apoptose. As vias intrínsecas e extrínsecas acontecem de maneiras distintas, porém convergentes a uma via efetora, que culmina na ativação de endonucleases e colapso do citoesqueleto, para formar os corpos apoptóticos. (Retirado de Kumar, Abbas e Fausto, 2007)

Figura 11. Desacoplamento por UCPs. As proteínas desacopladoras permitem que a energia conservada pelo bombeamento de prótons seja dissipada como calor, gerando um ciclo fútil dos prótons. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)

Figura 12. Estrutura molecular da Triacsin C: *N*-(((2*E*,4*E*,7*E*)-undeca-2,4,7-trienilideno)amino)nitroso amida.

Figura 13. Estrutura química do DNP e FCCP. As duas moléculas possuem em comum um próton dissociável e são muito hidrofóbicas, característica que permite a passagem por membranas plasmáticas. (Adaptado de Nelson & Cox, 2011)

Figura 14. (A) Estrutura molecular da clusianona: rel-(1R,5R,7R)-3-benzoil-4-hidroxi-8,8-dimetil-1,5,7-tris(3-metilbut-2-en-1-il)biciclo[3.3.1]non-3-ene-2,9-diona e (B) nemorosona: rel-(1R,5R,7S)-1-benzoil-4-hidroxi-8,8-dimetil-3,5,7-tris(3-metilbut-2-en-1-il)biciclo[3.3.1]non-3-ene-2,9-diona.

Figura 15. Diferença entre hepatócitos e outras células hepáticas. Os hepatócitos (seta preta) são binucleados, ao passo que as outras células não (seta vermelha). Células fixadas e coradas com hematoxilina/eosina. Aumento de 400x.

Figura 16. Efeitos das concentrações crescentes de Triacsin C sobre a velocidade de respiração no (A) estado II, (B) estado III, (C) estado IV e (D) razão do controle respiratório em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM e rotenona 2,5 μM. A oligomicina 1 μg/mL foi adicionada após a determinação do estado IV. Médias ± EPM * $P < 0,05$ vs controle ($n=4$).

Figura 17. Efeitos das concentrações crescentes de Triacsin C sobre a velocidade de respiração em presença de palmitato 1μM no (A) estado II, (B) estado III, (C) estado IV e (D) controle respiratório em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM e rotenona 2,5 μM. A oligomicina 1 μg/mL foi adicionada após a determinação do estado IV. Médias ± EPM **P* < 0,05 vs controle (*n*=4).

Figura 18. Produção de H_2O_2 induzida por Triacsin C em mitocôndrias isoladas de fígado. Em (a) Controle, (b) Triacsin C 1 μ M, (c) Triacsin C 2 μ M, (d) Triacsin C 10 μ M, (e) Triacsin C 15 μ M e (f) Triacsin C 20 μ M. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM, rotenona 2,5 μ M e EGTA 0,1 mM. Médias $\pm$ EPM * P < 0,05, ** P < 0,01 e *** P < 0,001 vs controle (n =4).

Figura 19. Inchamento induzido pela Triacsin C em mitocôndrias de fígado. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5mM, rotenona 2,5 μM e Ca^{2+} 20 μM. Médias $\pm$ EPM * $P < 0,05$ vs controle ($n=4$). Tempo inicial do Δ em 60 segundos e tempo final do Δ em 594 segundos.

Figura 20. Células hepáticas em cultura. Observar a tendência dos hepatócitos em formar cordões. Cultivo em DMEM completo em condições descritas em materiais e métodos. Aumento de 400x.

Figura 21. Análise de viabilidade celular de hepatócitos primários pelo tempo de tratamento com Triacsin C 1 μ M, utilizando PI como marcador fluorescente para morte celular. O PI (1 mg/mL) foi adicionado 1 minuto antes da análise por citometria de fluxo utilizando o citômetro Guava easyCyte 8 HT (Millipore™).

Figura 22. Análise de viabilidade celular de hepatócitos primários tratados com Triacsin C, por citometria de fluxo utilizando anexina V e PI como marcadores fluorescentes. Os hepatócitos foram tratados com DMSO 1: 1000 (V: V) como controle, Triacsin C 1 μ M, DMSO 20% e terc butil hidroperóxido (TB) 250 μ M, como controles positivos para necrose e apoptose respectivamente, em DMEM completo, nas condições descritas em materiais e métodos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ vs DMSO.

A

B

Figura 23. Consumo de O_2 por hepatócitos primários tratados com Triacsin C por 4 (A) e 8 (B) horas. Os hepatócitos foram tratados com Triacsin C 1 μ mol/L e/ou DMSO 1: 1000 (V: V) em DMEM completo nas condições descritas em materiais e métodos. Média $\pm$ EPM * $P < 0,05$ vs DMSO ($n=4$).

A **B**

Figura 24. Efeitos da Triacsin C sobre a expressão de **(A)** PGC1 alfa e **(B)** HAD. Os hepatócitos foram tratados por 8 horas com Triacsin C 1 μmol/L e DMSO como controle, como descrito em materiais e métodos. Médias ± EPM * $P < 0,05$ vs controle ($n=4$).

Figura 25. Efeito da clusianona no estado III, estado IV, V_{CCCP} , razão controle respiratório (RCR) e razão ADP/O em mitocôndrias isoladas de fígado. CCCP 1 μM foi adicionado após a determinação do estado IV. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de EGTA 0,1 mM, succinato 5 mM e rotenona 2,5 μM . As condições foram: (a) o controle, (b) 0,1, (c) 0,3, (d) 0,5, (e) 1 μM de clusianona, e (f) 0,5 μM nemorosona (NEM). Para a determinação de V_3 e V_{CCCP} , 100 μM de ADP ou 1 μM de CCCP foram adicionados onde indicado. V_4 foi determinada após o esgotamento do ADP. As barras representam a média $\pm$ SEM ($n = 3$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. $P < 0,05$ quando comparados a todos grupos de acordo com teste ANOVA e post hoc Newman-Keuls.

Figura 26. Liberação de H_2O_2 induzida por clusianona em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Em (a) controle, (b-d) 0,5, 1,0 e 2,5 μM de clusianona e (e) 0,5 μM de nemorosona. As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM, rotenona 2,5 μM e EGTA 0,1 mM.

Figura 27. Prevenção do inchamento por clusianona e nemorosona em mitocôndrias de fígado. Clusianona 0,5, 1 e 2,5 μM (linhas b-d) foram comparadas com o controle (linha a), 1 $\mu\text{mol/L}$ de CSA (linha f) e nemorosona 0,5 μM (linha e). As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de succinato 5 mM, rotenona 2,5 μM e Ca^{2+} 20 μM .

Figura 28. Dissipação do potencial intermembrana mitocondrial induzido por clusianona e nemorsona em mitocôndrias de fígado. Clusianona 0,1, 1, 2,5 e 5 μM (linhas b-e) foram comparadas com o controle (linha a) e nemorosona 0,5 μM . As mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao MRP na presença de EGTA 0,1 mM, succinato 5 mM e rotenona 2,5 μM . O CCCP 1 μM foi adicionado após a estabilização do potencial intermembrana.

TABELAS

TABELAS

Tabela I: Porcentagem de hepatócitos em células recém isoladas e células em cultura depois de 24 horas.

%	Hepatócitos	Não-hepatócitos
Células recém isoladas	70	30
Células em cultura	62	38

Tabela II: Sequências de sense e antisense dos primers utilizados nos ensaios de tempo real de RT-PCR, PGC1 α e HAD.

Gene	Foward	Reverse	Peso molecular (Da)
PGC1 α	5'CAAGCCAAACCAACAACCTTTATCTCT3'	5'CACACTTAAGGTTGCTCAATAGTC3'	F 7601
			R 7601
HAD	5'TCTTGACTATGTTGGACTGGATAC3'	5'AAGGACTGGGCTGAAATAAGG3'	F 7374
			R 6568
□Actina	5'CACTTTCTACAATGAGCTGCG3'	5'CTGGATGGCTACGTACATGG3'	F 6381
			R 6173

ANEXO

Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Clusianone, a naturally occurring nemorosone regioisomer, uncouples rat liver mitochondria and induces HepG2 cell death

Felippe H.Z. Reis^a, Gilberto L. Pardo-Andreu^{a,b,*}, Yanier Nuñez-Figueredo^c, Osmany Cuesta-Rubio^d, Javier Marín-Prida^b, Sérgio A. Uyemura^{e,f}, Carlos Curti^{a,f}, Luciane C. Alberici^{a,f}

^aDepartamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^bCentro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Ciudad Habana, Cuba

^cCentro para las Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos, Ciudad Habana, Cuba

^dDepartamento de Farmacia, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Ciudad Habana, Cuba

^eDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^fNúcleo Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2013

Received in revised form 15 January 2014

Accepted 23 January 2014

Available online 1 February 2014

Keywords:

Clusianone

Nemorosone

Mitochondria

Uncoupler

Protonophore

HepG2 cell death

ABSTRACT

Clusianone is a member of the polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol family of natural products; its cytotoxic mechanism is unknown. Clusianone is a structural isomer of nemorosone, which is a mitochondrial uncoupler and a well-known cytotoxic anti-cancer agent; thus, we addressed clusianone action at the mitochondria and its potential cytotoxic effects on cancer cells. In the HepG2 hepatocarcinoma cell line, clusianone induced mitochondrial membrane potential dissipation, ATP depletion and phosphatidyl serine externalization; this later event is indicative of apoptosis induction. In isolated mitochondria from rat liver, clusianone promoted protonophoric mitochondrial uncoupling. This was evidenced by the dissipation of mitochondrial membrane potential, an increase in resting respiration, an inhibition of Ca^{2+} influx, stimulation of Ca^{2+} efflux in Ca^{2+} -loaded mitochondria, a decrease in ATP and NAD(P)H levels, generation of ROS, and swelling of valinomycin-treated organelles in hyposmotic potassium acetate media. The cytotoxic and uncoupling actions of clusianone were appreciably less than those of nemorosone, likely due to the presence of an intra-molecular hydrogen bond with the juxtaposed carbonyl group at the C15 position. Therefore, clusianone is capable of pharmacologically increasing the leakage of protons from the mitochondria and with favorable cytotoxicity in relation to nemorosone.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.