



Universidade do Minho
Escola de Ciências

João Pedro Martins Soares de Castro e Silva

Efeito de novos compostos azotados com potencial farmacológico na protecção do stresse oxidativo

*Dissertação apresentada à Escola de Ciências
da Universidade do Minho para prestação de
provas de Mestrado em Genética Molecular*

2004

Agradecimentos

Assim se faz ciência: de sucessos e fracassos, de momentos de grande alegria e momentos de desespero. Ao longo do último ano, em que trabalhei no laboratório de Culturas de Células Animais no âmbito do Mestrado em Genética Molecular, também eu provei essas diferentes sensações. A meu lado, apoiando-me, sempre as mesmas pessoas...pessoas mais próximas a quem eu agora agradeço por, de uma forma ou de outra, me terem aturado e ajudado a alcançar o objectivo de finalizar este trabalho. Agradeço por isso:

Em primeiro lugar, à minha orientadora, a Prof^a Doutora Olga Coutinho, por ter acreditado em mim e ter-me proposto o trabalho que agora apresento; pela sua disponibilidade e por ter partilhado comigo alguma da sua experiência e conhecimentos científicos, guiando-me por entre os tortuosos caminhos da ciência; e também por, acima de tudo, ter sido uma boa amiga.

Ao Filipe e à Prof^a Doutora Fernanda Proença, do Departamento de Química, por terem sintetizado e me terem fornecido os compostos com que trabalhei; por estarem sempre disponíveis para me esclarecerem dúvidas sobre a parte “mais química” do trabalho.

A todos os docentes do Departamento de Biologia que partilharam comigo e com os meus colegas de Mestrado os seus conhecimentos; e a todos os não docentes do mesmo Departamento, por nunca me terem deixado ficar sem material ou reagentes para trabalhar.

Às pessoas com quem partilhei o laboratório nos últimos tempos: ao Cristóvão, por seres um bom amigo, por estares sempre disposto a ajudar e pelo teu espírito crítico (às vezes, exagerado); à Marina, pela amizade e pela enorme boa disposição (só tu para desafiares o meu mau humor matinal com as tuas melodias nem sempre afinadas); à Sílvia, pela serenidade inspiradora com que afastaste as minhas frustrações e me fizeste acreditar em mim próprio; ao Bruno, por teres sempre promovido discussões científicas de grande qualidade e me teres dado outra visão da ciência; à Fábria e à Patrícia, por terem sido capazes de me aturar (o que é bastante difícil) e contribuírem para um bom ambiente de trabalho; à Marisa, pela tua simplicidade e sinceridade; ao pessoal dos 3B's, pelo vosso contributo para um bom ambiente de trabalho; ao “Puto”, pela irreverência e optimismo.

Às pessoas do CNC, em Coimbra, nomeadamente à Prof^a Doutora Cristina Rego, à Prof^a Doutora Cláudia Pereira, à Sandra (não, ainda não me esqueci...), à Teresa e à Inês, com quem

tive o enorme prazer de discutir ideias e que, mesmo ao longe, tiveram sempre uma disponibilidade inigualável para me ajudar quando as coisas não me corriam da melhor maneira.

Ao Paulo, por continuares a ser o que sempre foste: o melhor amigo que se pode ter, sincero e sempre disponível para me ajudares e ouvires as minhas frustrações. Ao Conde, porque apesar de o som não parecer tão audível, continuas sempre lá...em cima...da coluna...a dançar! À “lindinha” Rita, por estares sempre presente, por me ouvires e por todos aqueles pequeninos, mas deliciosos pormenores, com que me brindaste diariamente. Ao Raul, acima de tudo por me compreenderes, e por me fazeres sentir que poderei sempre confiar em ti. À Sofia e ao Luís, por estarem sempre disponíveis para ouvir os meus desabafos, e por todos os aprazíveis e incisivos momentos de “cusquice”. À Sandrina, pelas vitórias que me ajudaste a conquistar, dentro, e essencialmente fora, da mesa de matraquilhos. Ao Artur e ao Huguinho, por me fazerem acreditar em mim próprio e por todos os momentos de pândega no horário extra laboral. À Joaquina: apesar de longe, nunca me esquecerei de ti. Ao Manu e ao Louie, por terem sempre uma palavra de apoio e confiança. À Júlia, por me fazeres acreditar que, apesar de na vida nada correr como nos filmes, ela pode ser doce como ovos-moles. À Clarinha, pelo teu modo inocente de ver as coisas. À Patrícia Ramalho, por me teres adoçado os dias com os teus bolinhos e com a tua maneira de ser. À Andreia, pelos insanos momentos de boa disposição. À “pequenita” Paty, por teres iluminado as minhas noites com o teu sorriso etéreo...

Aos meus colegas de Mestrado, por todos os bons momentos que partilhámos.

A todos os outros colegas e amigos a quem não me referi, mas que sempre me presentearam com um sorriso ou uma palavra amiga e que por isso foram, e continuarão a ser, importantes para mim.

Aos meus pais, simplesmente por tudo!

Obrigado a todos. Sem vós, nada faria sentido...

Listas de abreviaturas

<u>Abreviatura</u>	<u>Nome completo</u>
BHT	butil-hidroxitolueno
BSA	albumina sérica bovina
CI ₅₀	concentração necessária para reduzir a resposta inicial em 50%
CP	coeficientes de partilha
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
Eoxi	potenciais de oxidação-redução
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogénio
LDH	lactato desidrogenase
MDA	malonildialdeído
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	nicotinamida-adenina dinucleótido reduzida
NO [•]	óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	anião superóxido
[•] OH	radical hidroxilo
PBS	tampão salino de fosfato
PI	iodeto de propídio
Rf	factor de retardação
ROS	espécies reactivas de oxigénio
RNS	espécies reactivas azoto
rpm	rotações por minuto
RPMI	meio de cultura criado no “Roswell Park Memorial Institute”
STS	staurosporina
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TLC	cromatografia de camada fina

Sumário

As espécies reactivas de oxigénio (ROS), cuja formação ocorre maioritariamente na mitocôndria, são conhecidas mediadoras de cascatas de sinalização intracelular. A produção excessiva de ROS pode levar ao stresse oxidativo, à perda de funções celulares e por fim à morte celular. Actualmente, o stresse oxidativo é considerado como sendo um dos principais factores responsáveis por inúmeras doenças neuronais e não neuronais, incluindo aterosclerose, isquémia cerebral, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Sendo assim, as abordagens que envolvem o desenvolvimento e utilização de anti-oxidantes, que protejam as células para além das suas defesas naturais, para a prevenção e terapia destas doenças, adquiriu especial interesse.

Este trabalho experimental teve como principal objectivo a determinação da actividade biológica de novos compostos, de síntese orgânica, com potencial anti-oxidante, com vista ao seu eventual desenvolvimento como moléculas de interesse farmacológico. Além disso, pretendeu-se também elucidar o seu efeito na reversão de fenómenos apoptóticos decorrentes de processos de stresse oxidativo. A possibilidade de modificação da estrutura química dos compostos, em função dos resultados obtidos, constitui, por seu turno, uma mais valia para o eventual melhoramento do seu potencial terapêutico.

Os compostos testados apresentaram uma elevada actividade anti-radicalar intrínseca. A posterior avaliação da sua citotoxicidade (através dos testes de redução do MTT e da libertação da LDH) demonstrou que nenhum dos compostos é tóxico para as células.

Os compostos (FMA4, FMA5, FMA7 e FMA8) evidenciaram um perfil protector da peroxidação lipídica induzida pelo par oxidante ascorbato-ferro, o que se correlaciona com a sua lipossolubilidade.

Os compostos FMA4 e FMA7 revelaram protecção da morte celular induzida na presença de um estímulo apoptótico de staurosporina. No entanto, verificou-se ser necessário um período de pré-incubação de 3 horas para penetrarem na membrana plasmática e exercerem o seu efeito protector intracelularmente. Essa protecção, que resultou num significativo decréscimo da actividade da caspase-3, parece derivar de

uma protecção tanto da via mediada por receptores membranares (caspase-8) como da via mitocondrial (caspase-9).

Por último, a ciclização das estruturas dos novos compostos fazia prever compostos com uma actividade anti-oxidante superior. No entanto, os compostos cíclicos não evidenciaram qualquer efeito anti-oxidante, como demonstrado pela incapacidade para reduzir o radical DPPH até uma concentração de 500 μ M e pelos elevados potenciais de oxidação-redução, pelo que o seu uso terapêutico potencial como agente pró-oxidantes continua a ser investigado.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS), whose formation occurs mainly in mitochondria, are known mediators of intracellular signalling cascades. The excessive production of ROS may lead to oxidative stress, loss of cell function, and ultimately to cell death. Nowadays, oxidative stress is considered as one of the main causes of several neuronal and non-neuronal diseases, such as atherosclerosis, cerebral ischemia, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson and Alzheimer's. Therefore, there has been a great interest in approaches involving the development and utilization of antioxidants that can act beyond the cells natural defences, for prevention and therapy of these diseases.

The main goal of the present research was the evaluation of the biological activity of new compounds, of organic synthesis, with antioxidant potential, outlooking to its eventual development as molecules of pharmacological interest. Moreover, we also intended to elucidate their effect on the reversal of apoptotic phenomena derived from oxidative stress. The possibility of modifying the chemical structure of the compounds, in function of the results obtained, is also of great worth to the improvement of its therapeutical potential.

The compounds tested showed a very high intrinsic antiradicalar activity. The subsequent cytotoxicity evaluation (as assessed by the MTT reduction and LDH release methods) indicated that none of the compounds was toxic to the cells.

The compounds (FMA4, FMA5, FMA7 and FMA8) revealed a protective profile on lipid peroxidation induced by the ascorbate-iron oxidative pair, which can be correlated to their liposolubility.

The compounds FMA4 and FMA7 presented a high cellular death protection in the presence of a staurosporine apoptotic stimulus. However, a pre-incubation period of three hours was needed for them to penetrate the plasmic membrane and yield their protective effect intracellularly. That protection, which resulted in a significant reduction of caspases-3 activity, seems to result from protection observed in the membrane receptor pathway (caspase-8) and in the mitochondrial pathway (caspase-9).

Last of all, the cyclization of the new compounds structures was expected to obtain compounds with higher antioxidant activities. Nevertheless, the cyclic compounds did not show any antioxidant effect, as demonstrated by their inability to reduce the DPPH

radical for concentrations up to 500 μ M and by their elevated redox potentials, so its potential therapeutical use as prooxidant agents is currently under investigation.

Enquadramento e objectivos

O presente trabalho enquadra-se no Mestrado em Genética Molecular da Universidade do Minho e centra-se na determinação da actividade biológica de novos compostos com potencial anti-oxidante, no sentido do seu eventual desenvolvimento como moléculas de interesse farmacológico em doenças envolvendo stresse oxidativo.

Os novos compostos a testar neste trabalho são compostos azotados, de síntese orgânica, cuja estrutura química, através da presença de grupos hidroxilo nas posições C-3 e C-4 do substituinte aromático, revelam uma capacidade de tamponização de radicais livres, o que dá indicações sobre o seu potencial como “scavengers” de oxigénio. Além disso, a introdução dessas estruturas numa base de dados criada para o efeito por um grupo de investigadores russos revelou o seu potencial farmacológico em doenças que envolvam stresse oxidativo. O acesso directo aos novos compostos com potencial farmacológico e a possibilidade, no âmbito da investigação em curso, de eventual modificação das estruturas no sentido de aumentar a actividade anti-oxidante pretendida, constitui uma mais valia no sentido de conseguir os objectivos propostos e que a seguir se descrevem.

Como principal objectivo deste trabalho, pretende-se avaliar a real eficácia dos novos compostos, no que diz respeito à sua capacidade anti-oxidante. Numa fase inicial, serão efectuados estudos de avaliação da sua citotoxicidade, assim como da sua lipofilicidade. Posteriormente, proceder-se-á à avaliação da capacidade destes compostos para exercer protecção quer a nível da oxidação primária (através da determinação da sua actividade anti-radicalar), quer a nível da oxidação secundária (através da avaliação da capacidade dos compostos para reverter danos causados em células expostas a agentes oxidantes, tais como o par ascorbato-ferro).

A produção de ROS desencadeia processos de morte celular programada. Sendo assim, outro objectivo do trabalho é o de elucidar outras vias bioquímicas em que os compostos possam ser activos, nomeadamente na reversão de fenómenos de apoptose, em células expostas a um estímulo apoptótico tradicional, como a staurosporina.

Com a ciclização das estruturas dos novos compostos espera-se obter uma maior actividade anti-oxidante. Por esse motivo, pretende-se igualmente, numa fase posterior deste trabalho, comparar a actividade exercida por essas estruturas cíclicas com a exercida pelos compostos de cadeia linear.

Índice

<i>Agradecimentos</i>	<i>i</i>
<i>Lista de abreviaturas</i>	<i>iii</i>
<i>Sumário</i>	<i>iv</i>
<i>Abstract</i>	<i>vi</i>
<i>Enquadramento e objectivos</i>	<i>viii</i>
<i>Índice</i>	<i>ix</i>
1. Introdução geral	1
1.1 Biologia da cultura de células animais	1
1.1.1 Linhas celulares	1
1.1.2 As condições de cultura	3
1.2 Stresse Oxidativo	5
1.2.1 Formação de espécies reactivas de oxigénio	6
1.2.2 Funções fisiológicas das espécies reactivas de oxigénio	9
1.2.3 As defesas antioxidantes	12
1.3 Morte celular	15
1.3.1 As principais vias apoptóticas	17
1.4 O estudo de novas moléculas com potencial farmacológico	20
1.4.1 Avaliação da citotoxicidade	20
1.4.2 Relação concentração-resposta	21
1.4.3 Coeficientes de partilha	21
1.4.4 Os novos compostos em estudo	22
1.5 Objectivos do trabalho	23
2. Material e métodos	24
2.1 Material biológico	24
2.1.1 Fibroblastos (linha celular L929)	24
2.1.2 Linha celular PC12	25
2.2 Compostos estudados	26
2.3 Método de descoloração do DPPH	26
2.4 Determinação da viabilidade celular	28
2.4.1 Método de redução do MTT	28
2.4.2 Libertação da lactato desidrogenase	30
2.5 Avaliação da hidrofobicidade dos compostos	31

2.6	Determinação da protecção dos compostos na peroxidação lipídica	32
2.6.1	Quantificação da proteína: método de Sedmak	34
2.7	Determinação da actividade das caspases	35
2.8	Determinação da morte celular: marcação com Hoechst 33342 e PI	36
2.9	Análise estatística	37
2.10	Reagentes químicos	38
3.	Resultados e Discussão	39
3.1	Determinação do CI_{50} para os compostos de cadeia linear	39
3.2	Avaliação da citotoxicidade dos compostos	40
3.3	Avaliação do grau de hidrofobicidade dos compostos	42
3.4	Protecção dos compostos na peroxidação lipídica	44
3.5	Activação da caspase-3 induzida por staurosporina e Apoptose	49
3.5.1	Efeito protector dos compostos nas vias apoptóticas	53
3.6	Compostos cíclicos	59
3.7	Perspectivas futuras	63
4.	Conclusões	65
5.	Referências bibliográficas	67

1. Introdução

1.1. Biologia da cultura de células animais

As culturas de tecidos foram iniciadas no início do século XX, como um método para estudar o comportamento das células animais sem a interferência de variações sistêmicas que possam surgir no animal, tanto durante a homeostasia normal como sob o stresse de uma experiência. Tal como o nome indica, a técnica foi elaborada inicialmente com fragmentos desagregados de tecidos, encontrando-se o crescimento restrito à migração das células a partir desses fragmentos, com mitoses ocasionais durante o posterior desenvolvimento. Actualmente, o termo “cultura de tecidos” pode ser utilizado genericamente para incluir as culturas de órgãos e de células.

As culturas de tecidos apresentam algumas desvantagens, como a necessidade de as culturas serem mantidas em condições de assepsia (uma vez que as células animais crescem mais lentamente do que os contaminantes comuns), e os custos elevados em material necessário para cultivar e manter as células. No entanto, essas desvantagens são superadas pela possibilidade de controlar o ambiente físico-químico (pH, temperatura, pressão osmótica e a tensão de O₂ e CO₂) e as condições fisiológicas, que podem ser mantidas relativamente constantes, embora nem sempre possam ser definidas (Freshney, 1994).

1.1.1. Linhas celulares

As culturas de células têm sido utilizadas desde há várias décadas com bons resultados. Inicialmente, as culturas celulares poderiam ser definidas, de um modo rudimentar, como um método para realizar experiências em populações celulares sem o embaraço causado pelos organismos inteiros. Este sistema experimental *ex vivo* torna-se relevante quando se pretende trabalhar com animais de grandes dimensões, impossíveis de serem sujeitos a qualquer tipo de manipulação experimental. No entanto, existe alguma dificuldade em adquirir células para estes estudos *ex vivo*, que pode ser ultrapassada através da “imortalização” e multiplicação das células em estudo, o que pode marcar a passagem de *ex vivo* para *in vitro*. O termo “linha celular” tem sido assim utilizado para descrever as células que proliferam continuamente por indução química

e/ou outra. O aparecimento da criopreservação foi outro dos grandes avanços verificados na tecnologia das culturas celulares, que veio permitir a recuperação das células armazenadas (Drexler *et al.*, 2000).

A primeira subcultura representa uma transição importante na obtenção deste tipo de culturas. A necessidade de subcultivar implica que a cultura primária atingiu um crescimento que levou à ocupação de toda a superfície de adesão disponível. Com cada subcultura sucessiva, a parte da população com capacidade para proliferar mais depressa irá predominar gradualmente, enquanto que as células com menor capacidade proliferativa irão desaparecendo (Freshney, 1994).

Quando uma cultura já se duplicou mais de 150-200 vezes (número de Hayflick), ou quando cresceu ininterruptamente durante mais de um ano, esta pode ser então considerada como imortal. Este carácter de imortalização pode ser conseguido por agentes químicos, irradiação, entre outros factores. Por vezes, podem também ocorrer alterações nas características do crescimento das células (como independência da adesão, perda da inibição de crescimento devida ao contacto, e limitação da densidade de crescimento) que levam frequentemente, mas não necessariamente, ao crescimento ilimitado. Este processo de transformação pode resultar de um fenómeno de instabilidade genética que as transforma em células em tudo semelhantes às células neoplásicas (células geneticamente modificadas) (Drexler *et al.*, 2000; Freshney, 1994). No entanto, a manutenção do fenótipo inicial é hoje em dia perfeitamente assegurada pelos dois bancos mundiais, onde as linhas celulares podem ser adquiridas (ATCC, de “American Type Culture Collection” e ECACC, de “European Collection of Animal Cell Cultures”).

Os fibroblastos são as células dermais mais utilizadas para o estabelecimento de linhas celulares “imortalizadas”, nomeadamente em estudos de citotoxicidade de diversos compostos. O termo “fibroblastos” cobre uma população celular muito heterogénea, diferindo na sua morfologia, nas macromoléculas que sintetizam, na capacidade de proliferação, entre outras (Roguet e Schaefer, 1997).

De um modo geral, os fibroblastos são os principais constituintes do tecido conjuntivo, sendo os mais relevantes produtores de colagénio neste tecido. Além disso, possuem uma morfologia fusiforme, o seu crescimento é limitado pela densidade, têm um tempo de vida limitado a cerca de 50 gerações e são diplóides. Contudo, quando a

cultura se prolonga por um longo período de tempo, estas células têm tendência para se tornarem aneuplóides, originando assim culturas contínuas.

Devido à sua capacidade de diferenciação em múltiplos tipos celulares, estas células têm sido consideradas bons modelos para diversas abordagens, incluindo como modelos neuronais, por terem a mesma origem na ectoderme embrionária (Freshney, 1994).

No entanto, para estudos envolvendo fenómenos de apoptose, as linhas celulares de fibroblastos mostraram-se resistentes, pelo que foram substituídas por uma linha celular neuronal, PC12. As células da linha celular PC12 derivam de um feocromocitoma (tumor da glândula adrenal) de rato e expressam uma grande variedade de receptores e canais iónicos, assim como continuam a libertar dopamina, norepinefrina e catecolaminas (Westerink *et al.*, 2002). Além disso, possuem as características dopaminérgicas intactas, razão pela qual são bastante utilizadas em estudos de neurobiologia e neuroquímica, ou como modelos neuronais para doenças neurodegenerativas (Kim *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2002).

1.1.2. *As condições de cultura*

A influência do ambiente de cultura é expressa sob quatro formas: a natureza da superfície de adesão; a constituição da fase gasosa; a constituição (físico-química e fisiológica) do meio; e a temperatura de incubação.

Na maioria das células é necessária a adesão das mesmas a uma superfície para ocorrer a divisão celular, de tal modo que quanto mais firme for essa adesão, maior será a proliferação celular (Paine e Ward, 1999). Quando essa adesão é fraca, ou quando as células crescem sobrepondo-se umas às outras, a proliferação celular é inibida (Freshney, 1994).

No caso das células em cultura, apesar de inicialmente o vidro ser o material mais utilizado como superfície de adesão, hoje em dia o poliestireno, após sofrer um tratamento que torna a sua superfície carregada negativamente, constitui uma superfície de adesão mais comum para favorecer a adesão das células em cultura (Freshney, 1994). Nos últimos anos, vários estudos demonstraram que a adesão de algumas culturas celulares, como por exemplo as células da linha celular PC12, pode ser melhorada através do tratamento da superfície de adesão com polímeros carregados positivamente,

tais como a poli-D-lisina ou a poli-L-lisina. Por ser uma molécula sintética, a poli-lisina não estimula qualquer actividade biológica nas células a si aderidas. Além disso não introduz impurezas muitas vezes presentes nos polímeros naturais. A poli-D-lisina é geralmente preferida em relação à poli-L-lisina para certos tipos celulares, uma vez que não é quebrada pelas proteases libertadas pelas células em cultura (McKeehan, 1984).

No que respeita à fase gasosa, os constituintes mais significativos são o oxigénio e o dióxido de carbono.

As culturas variam na quantidade de oxigénio necessária, sendo uma menor quantidade preferível para as culturas celulares em relação às culturas de órgãos (que podem chegar a necessitar de cerca de 95% de oxigénio na fase gasosa).

A tensão atmosférica de CO_2 regula directamente a concentração de CO_2 dissolvido, em função da temperatura, originando H_2CO_3 , que por sua vez se dissocia, formando HCO_3^- . No entanto, o HCO_3^- possui uma constante de dissociação baixa e tende a reassociar-se, provocando a acidificação do meio. Esta diminuição do pH é neutralizada pelo aumento da concentração de bicarbonato no meio, atingindo-se um equilíbrio a um pH 7.4. Este valor, ao qual cresce a maioria das linhas celulares pode ser controlado através do uso de um indicador, sendo o mais comum o vermelho de fenol. O vermelho de fenol apresenta uma cor vermelha a pH 7.4 e torna-se laranja para um pH ácido, ou violeta para um pH alcalino (Freshney, 1994).

De um modo geral, os meios definidos contêm diferentes aminoácidos (incluindo aminoácidos não essenciais e vitaminas), e são frequentemente suplementados com metabolitos extra (e.g. nucleosídeos, intermediários do ciclo de Krebs e lípidos) e minerais. Na maior parte dos meios inclui-se ainda glucose como fonte de energia.

Outro constituinte do meio de cultura é o soro, que constitui um suplemento adicional de vários factores de crescimento e que pode ter diferentes origens, de acordo com os requisitos específicos de cada tipo celular em cultura. O soro fetal bovino, ou o soro bovino simplesmente, são os mais frequentemente utilizados, seguidos do soro de cavalo, geralmente usado para linhas celulares mais exigentes, como é o caso das células PC12. O soro humano é o adequado para culturas de células humanas

Os tampões de CO_2 /bicarbonato são base da tamponização contínua do meio de cultura. Se a actividade metabólica das células em cultura for muito grande, como é normalmente o caso das linhas celulares imortalizadas há necessidade de tamponização

adicional. Neste caso, um dos tampões mais utilizados é o HEPES, que possui uma forte capacidade de tamponização para uma gama de pH entre 7.2 e 7.6 (Freshney, 1994).

A temperatura de incubação, além de influenciar directamente o crescimento celular, influencia também o pH do meio, devido ao aumento da solubilidade do CO₂ a baixas temperaturas e, possivelmente, devido a alterações na ionização e no pK_a do tampão. De um modo geral, as células são cultivadas a 37°C, correspondendo este valor aproximadamente à temperatura corporal do animal do qual as células foram retiradas. As células em cultura podem tolerar decréscimos consideráveis de temperatura, sobrevivendo a 4°C e podendo ser congeladas a -196°C. No entanto, não conseguem resistir a temperaturas mais do que 2°C acima do normal, morrendo rapidamente a uma temperatura de 40°C (Freshney, 1994).

1.2. Stresse Oxidativo

Com a acumulação de oxigénio na atmosfera terrestre há cerca de 2 biliões de anos atrás, os organismos anaeróbios existentes tiveram que se adaptar ao novo ambiente que os envolvia. Ao passo que alguns organismos optaram por viver num micro-ambiente livre de oxigénio, outros tornaram-se capazes de realizar tanto a respiração como a fermentação (anaeróbios facultativos). Mais tarde, surgiram novas espécies, que utilizavam somente a respiração como forma de obter energia: organismos aeróbios (Behl, 1999). Todos estes organismos aeróbios produzem e degradam espécies reactivas de oxigénio, originando tanto concentrações fisiológicas (resultantes da realização de funções celulares normais), como quantidades excessivas que, ao superarem as defesas anti-oxidantes naturais dão origem a um estado denominado de stresse oxidativo (Nordberg e Arner, 2001). Resumidamente, o stresse oxidativo pode resultar de dois factores: da diminuição dos anti-oxidantes, devida a mutações afectando enzimas anti-oxidantes ou a depleção de anti-oxidantes e outros constituintes essenciais na dieta humana; ou da produção elevada de espécies reactivas de oxigénio e de azoto, por exemplo através da exposição a níveis elevados de O₂, da presença de toxinas que são metabolizadas para produzir ROS/RNS, entre outros (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Devido aos seus potenciais efeitos indesejáveis, as espécies reactivas de oxigénio e todos os eventos associados ao stresse oxidativo têm sido relacionados com uma grande

variedade de patologias neuronais e não neuronais, incluindo aterosclerose, isquemia cerebral, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (Cardoso *et al.*, 1998; Schroeter *et al.*, 2000).

1.2.1. Formação de espécies reactivas de oxigénio

Entre as espécies reactivas de oxigénio incluem-se diferentes moléculas. Os radicais livres intracelulares (moléculas livres de baixo peso molecular, com um electrão desemparelhado) são considerados como espécies reactivas de oxigénio, e vice-versa, sendo os dois termos usados muitas vezes como equivalentes (Nordberg e Arner, 2001).

Estudos realizados anteriormente demonstraram que a mitocôndria é a principal fonte de radicais livres intracelulares (Sharma e Morgan, 2001). Esse facto deve-se à presença de uma cadeia de transporte de electrões, onde cerca de 95% do oxigénio é reduzido pela citocromo oxidase, levando o restante à formação de radicais livres. Uma diminuição da actividade da citocromo oxidase pode assim levar a uma maior libertação de radicais livres a partir da cadeia respiratória mitocondrial (Curti *et al.*, 1997).

Além da fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria, existem outros mecanismos moleculares que podem levar à formação de espécies reactivas de oxigénio, tais como a conversão enzimática de catecolaminas e indolaminas pela monoamina oxidase ou a auto-oxidação não enzimática de catecolaminas (Behl, 1999). Podem também ocorrer alterações no metabolismo da glucose, na oxidação da glutamina e na homeostasia do cálcio. A activação pelo cálcio da fosfolipase A2 liberta ácido araquidónico, cuja conversão enzimática a tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos pelas ciclooxigenases e lipooxigenases leva à formação de espécies reactivas de oxigénio (Curti *et al.*, 1997; Markesbery, 1997).

O centro activo das lipooxigenases contém iões ferro (Percival, 1991). Na sua forma inactiva, os iões encontram-se presentes como Fe^{2+} , transformando-se em Fe^{3+} quando a enzima é activada. Os iões Fe^{3+} reagem com os lípidos da membrana, levando à sua oxidação. Contudo, quando a quantidade de produtos das lipooxigenases aumenta, ou quando se verifica uma diminuição de oxigénio, as lipooxigenases são desactivadas, levando assim à libertação dos iões ferro, tendo como consequência também a iniciação da peroxidação lipídica (Spiteller, 2001).

O anião superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é uma das mais deletérias espécies reactivas de oxigénio. A formação do anião superóxido ocorre na membrana mitocondrial interna pela adição de um electrão ao oxigénio molecular induzida pela NADPH oxidase. Pode também ser produzido endogenamente por flavoenzimas (e.g. xantina oxidase), por lipooxigenases e ciclooxigenases. Apesar de ser um radical livre, não é muito reactivo, embora possa ser transformado facilmente pela acção de uma dismutase em espécies muito mais reactivas, como o peróxido de hidrogénio e o oxigénio molecular. Além disso, este radical não é capaz de atravessar as membranas lipídicas, limitando-se a sua acção ao local onde é produzido (Nordberg e Arner, 2001; Spiteller, 2001).

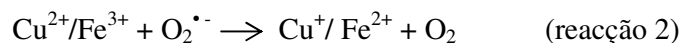
O peróxido de hidrogénio (H_2O_2), embora não seja considerado um radical livre, é considerado como sendo uma espécie reactiva de oxigénio, uma vez que pode funcionar como um intermediário na produção de espécies mais reactivas, como o ácido hipoclorico (formado pela acção das mieloperoxidases) e o radical hidroxilo. A produção deste último dá-se na presença de ferro, através da reacção de Fenton (reacção 1) (Nordberg e Arner, 2001; Behl, 1999).

Embora o peróxido de hidrogénio possua uma reactividade limitada, tem a capacidade de atravessar as membranas biológicas, o que lhe confere uma maior perigosidade (Multhaup *et al.*, 1997).

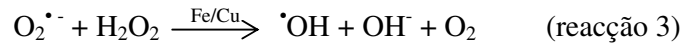
Devido à sua reactividade com as biomoléculas, o radical hidroxilo ($\bullet OH$) é possivelmente o radical que mais danos causa nos sistemas biológicos. Este radical forma-se a partir do peróxido de hidrogénio numa reacção catalizada por iões metálicos (Fe^{2+} ou Cu^+), frequentemente complexados com diferentes proteínas e outras moléculas. Esta reacção é denominada de reacção de Fenton:



O superóxido desempenha igualmente um papel importante, em associação com a reacção 1, levando à reciclagem dos iões metálicos (reacção 2):



Os metais de transição desempenham assim um papel importante na formação de radicais hidroxilo. Estes metais podem ser libertados a partir de proteínas, como as ferritinas e pelos centros [4Fe-4S] de algumas enzimas, através de reacções com o anião superóxido (Levi *et al.*, 1996; Nordberg e Arner, 2001). A este mecanismo, específico das células vivas, denomina-se reacção de Haber-Weiss (reacção 3) e corresponde à soma das reacções 1 e 2 (Nordberg e Arner, 2001).



O ferro e o cobre são iões metálicos essenciais no corpo humano para a síntese de diversas enzimas e outras proteínas envolvidas na respiração, transporte de O_2 , formação de NO^{\bullet} e outras reacções redox. Contudo, estes metais são potencialmente perigosos devido à sua capacidade para participarem em transferências de electrões, o que os torna bons catalisadores em reacções de auto-oxidação, conversão de H_2O_2 em OH^{\bullet} e decomposição de peróxidos lipídicos em radicais peroxilo e alcoxilo (altamente reactivos). Sendo assim, os organismos necessitam de manter estes iões metálicos em níveis baixos, diminuindo desse modo a probabilidade de causarem danos celulares através de reacções com radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O óxido nítrico (NO^{\bullet}) forma-se na mitocôndria e assemelha-se ao anião superóxido, na medida em que não reage de uma forma eficaz com a maioria das biomoléculas, apesar de possuir um electrão desemparelhado. Por outro lado, reage facilmente com outros radicais livres (e.g. radicais alquilo e peroxilo), originando moléculas menos reactivas, o que leva assim à remoção de radicais livres.

O óxido nítrico pode reagir com o anião superóxido, levando à formação de peroxinitrito, um composto altamente citotóxico, que pode, por sua vez, levar à oxidação de lípidos e proteínas. Além disso, pode ser decomposto para originar catiões NO_2^+ ou radicais NO_2^{\bullet} , sendo que ambos são capazes de formar nitrotirosina a partir de tirosina.

Este radical é sintetizado enzimaticamente pela acção da NO sintetase, a partir da L-arginina. Em concentrações fisiológicas, o óxido nítrico funciona apenas como um mensageiro intracelular, estimulando a ciclase do guanilato e algumas cinases, levando por exemplo ao relaxamento do músculo liso dos vasos sanguíneos (Nordberg e Arner,

2001; Spiteller, 2001; Beal, 2002). Além disso, foi também já confirmado o seu efeito anti-oxidante (Kelley *et al.*, 1999).

1.2.2. Funções fisiológicas das espécies reactivas de oxigénio

Todas as células produzem quantidades fisiológicas de espécies reactivas de oxigénio, necessárias para levar a cabo diversas funções.

Uma das funções das espécies reactivas de oxigénio é participar na defesa contra a infecção. Quando os fagócitos são activados, eles produzem estas espécies em quantidades suficientes para destruir os microrganismos intrusos.

Além disso, as espécies reactivas de oxigénio podem afectar directamente a conformação e as actividades de todas as moléculas contendo grupos sulfidrílo, através da oxidação do grupo tiol. Este tipo de regulação redox afecta muitas proteínas importantes na transdução de sinal e na carcinogénese, tais como a proteína cinase C, a Ca^{2+} -ATPase, a colagenase, a tirosina cinase, entre outras enzimas e receptores membranares. Para muitos factores de transcrição, as espécies reactivas de oxigénio funcionam como mediadores fisiológicos do controlo da transcrição, uma vez que esses factores também são sensíveis a uma regulação redox (Nordberg e Arner, 2001; Dalton *et al.*, 1999).

Apesar disso, as espécies reactivas de oxigénio podem, devido à sua elevada reactividade, causar danos em diversas macromoléculas, sendo por isso consideradas como potencialmente tóxicas, mutagénicas e carcinogénicas (Nordberg e Arner, 2001). Esses danos podem ser também induzidos pelo ferro, embora ainda não se conheça pormenorizadamente os mecanismos pelos quais este ião, em conjunto com o oxigénio, amplifica os danos em alvos celulares oxidáveis, tais como: a) ácidos nucleicos; b) proteínas; c) lípidos (Eaton e Qian, 2002), conforme a seguir se sumaria.

a) Ácidos nucleicos

Tanto o DNA como o RNA são susceptíveis a modificações por oxidação, dando origem a produtos hidroxilados das suas bases. O RNA citoplasmático e o DNA mitocondrial são dois dos alvos mais sensíveis (Miranda *et al.*, 2000).

Diversas alterações (e.g. clivagem do DNA, ligações DNA-proteínas, oxidação das purinas, etc.) podem ser causadas por espécies reactivas de oxigénio, em especial pelo radical hidroxilo. Se o DNA danificado não for imediatamente reparado, pode ocorrer uma mutação devido ao emparelhamento errado das bases durante a replicação. Este mecanismo pode ser, em parte, responsável pela elevada incidência de cancro em indivíduos sujeitos a stresse oxidativo (Nordberg e Arner, 2001).

As mitocôndrias não são apenas uma fonte de radicais livres, mas são também o alvo imediato dos danos mediados por esses radicais. O DNA mitocondrial é o primeiro alvo de ataques oxidativos, devido à sua proximidade com a fonte de produção de radicais livres e devido a não possuir mecanismos de reparação do DNA (Sharma e Morgan, 2001). Por sua vez, estudos recentes demonstraram ainda que os danos causados no DNA mitocondrial são amplificados pela presença de ferro no interior da célula, podendo este efeito ser evitado pela adição de agentes complexantes do ferro (Eaton e Qian, 2002).

b) Proteínas

A oxidação de proteínas aumenta dramaticamente no último terço de vida, de tal modo que, em média, uma em cada três proteínas é afectada (Beal, 2002).

Os danos oxidativos causados em proteínas resultam na fragmentação das cadeias polipeptídicas, formação de ligações proteína-proteína e modificações dos aminoácidos das cadeias laterais em derivados de hidroxilos ou carbonilos (Fagan *et al.*, 1999). Entre estes aminoácidos encontram-se a prolina, a arginina, a histidina e a treonina (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

Os grupos carbonilo podem formar-se igualmente através de reacções dos resíduos de cisteína, histidina e lisina tanto com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica (4-hidroxi-2-nonenal, malonildialdeído) como com os derivados reactivos dos carbonilos (cetoaminas, cetoaldeídos, desoxiosonas) formados como uma consequência da reacção dos açúcares redutores, ou os seus produtos de oxidação, com os resíduos de lisina das proteínas (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Berlett e Stadtman, 1997).

Como consequências destas reacções de oxidação, podem ocorrer alterações funcionais nas proteínas (através da modificação directa de aminoácidos catalíticos,

resíduos críticos em locais de ligação ou de regulação; e através da alteração da susceptibilidade proteolítica, estados de agregação, etc.) (Choi *et al.*, 2003).

Hoje em dia, a quantificação de grupos carbonilo nas proteínas é um dos indicadores da oxidação proteica mais utilizados e a sua acumulação nas proteínas foi já relacionada com o envelhecimento, o stresse oxidativo e algumas doenças, tais como a doença de Alzheimer e a diabetes (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Berlett e Stadtman, 1997).

A acumulação de proteínas oxidadas não reflecte apenas a taxa de oxidação proteica, mas também a velocidade com que ocorre a degradação dessas proteínas oxidadas, que por sua vez depende de diversas variáveis, incluindo a concentração de proteases que degradam preferencialmente proteínas oxidadas e inúmeros factores (iões metálicos, inibidores, activadores e proteínas regulatórias) que afectam a sua actividade proteolítica (Berlett e Stadtman, 1997).

c) *Lípidos*

A peroxidação lipídica é provavelmente a área de investigação mais explorada quando se fala de espécies reactivas de oxigénio. Isto deve-se ao facto de os ácidos gordos poli-insaturados serem alvos excelentes para ataque por parte dos radicais livres, devido a possuírem múltiplas ligações duplas (Nordberg e Arner, 2001).

Podem distinguir-se três passos na peroxidação lipídica: iniciação, propagação e terminação. A peroxidação pode ser induzida por radicais suficientemente reactivos para remover um átomo de hidrogénio aos ácidos gordos poli-insaturados. Este é o ponto de partida para um ciclo de propagação que leva ao aumento da produção de radicais livres e ao aumento de hidroperóxidos lipídicos formados pela oxidação de inúmeras moléculas lipídicas. Este ciclo de propagação é quebrado quando dois radicais se juntam, formando não-radicaís. Estas últimas reacções designam-se de reacções de terminação (Lehuédé *et al.*, 1999).

Os principais ácidos gordos poli-insaturados presentes nas membranas celulares dos mamíferos são os ácidos araquidónico e linoleico. Ambos são vulneráveis à peroxidação lipídica, tanto enzimática como não enzimática. No entanto, uma vez que o ácido linoleico é muito mais abundante do que o ácido araquidónico, a maioria dos produtos da peroxidação lipídica derivam do ácido linoleico (Spiteller, 2001).

Os diversos produtos originados pela peroxidação lipídica permitem a sua quantificação (Meagher e Fitzgerald, 2000). Os produtos obtidos pela redução dos hidroperóxidos do ácido linoleico (ácidos 9-hidroxi-10,12-octadecadienóico e 13-hidroxi-9,11-octadecadienóico), por exemplo, são susceptíveis de ser detectados em grandes quantidades (Spiteller e Spiteller, 1997). Os aldeídos são os produtos produzidos em maior quantidade, especialmente o 4-hidroxinonal (4-HNE), que deriva do ácido araquidónico e é altamente reactivo, sendo responsável pela maioria dos efeitos citotóxicos verificados em situação de stresse oxidativo (Markesbery, 1997; Pereira *et al.*, 1999). No entanto, a medição do malonildialdeído é o método mais utilizado para quantificar a peroxidação lipídica.

A acroleína, um produto da oxidação dos ácidos gordos poli-insaturados, leva à inactivação da redutase responsável pela redução dos radicais da vitamina E e, em conjunto com a depleção de glutatona, leva ao aumento da peroxidação lipídica. Sendo assim, pode ser igualmente utilizada como marcador da peroxidação lipídica (Lovell *et al.*, 2000).

A peroxidação lipídica pode ser ainda quantificada recorrendo à medição de dienos conjugados, gases de etano e pentano, isoprostanos, ou até recorrendo à inserção do ácido cis-parinárico (ácido gordo fluorescente) em vesículas e posterior integração na estrutura da membrana (Meagher e Fitzgerald, 2000; Steenbergen *et al.*, 1997).

1.2.3. As defesas anti-oxidantes

Com a hipótese da associação do stresse oxidativo a diversas doenças desenvolveram-se inúmeras abordagens para uma protecção anti-oxidante eficaz (Behl, 1999). Apesar de bastante utilizado, existe alguma dificuldade em definir o termo “anti-oxidante”. De um modo geral, o termo anti-oxidante pode ser utilizado para descrever qualquer composto que seja capaz de complexar espécies reactivas de oxigénio, sem no entanto se converter num radical destrutivo (Noctor e Foyer, 1998). Quando as espécies reactivas de oxigénio ou de azoto se formam *in vivo*, muitos anti-oxidantes entram em acção. A sua importância relativa depende de diferentes factores, tais como o tipo de ROS/RNS que é formado, o modo como é formado, onde se forma e a que nível provoca danos. Os sistemas anti-oxidantes das próprias células podem ser divididos em dois tipos: enzimáticos e não enzimáticos (Nordberg e Arner, 2001).

No que diz respeito aos sistemas anti-oxidantes enzimáticos, a superóxido dismutase (SOD) foi a primeira enzima a ser descoberta que era capaz de metabolizar as espécies reactivas de oxigénio. Esta enzima metaboliza o anião superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio (Nordberg e Arner, 2001).

O peróxido de hidrogénio, por sua vez, é convertido pela catalase (que se encontra presente nos peroxissomas) em água e oxigénio molecular. No entanto, a sua afinidade pelo peróxido de hidrogénio é relativamente baixa e conseqüentemente algum H_2O_2 pode permanecer na célula. Isto pode tornar-se problemático, uma vez que o H_2O_2 pode reagir com o anião superóxido formado no metabolismo oxidativo e originar o radical hidroxilo que é altamente reactivo (Arrigoni e De Tullio, 2002).

A glutathione peroxidase (GPx) apresenta uma elevada afinidade para o peróxido de hidrogénio, sendo capaz de remover quantidades muito pequenas desta molécula. Esta enzima cataliza a redução do peróxido de hidrogénio utilizando a glutathione como substrato.

Além destes sistemas enzimáticos, existem ainda outros que participam na remoção do excesso de espécies reactivas de oxigénio, tais como as superóxido redutases, as peroxirredoxinas e o sistema associado à tioredoxina (composto por duas oxidoredutases anti-oxidantes) (Nordberg e Arner, 2001).

Conjuntamente com os mecanismos enzimáticos, existem alguns compostos anti-oxidantes celulares que, ao participarem em reacções redox, contribuem com um electrão para neutralizar os radicais livres. Estes são designados de anti-oxidantes directos, uma vez que interagem quimicamente com os radicais livres formados. No entanto, um anti-oxidante biológico eficaz deve fazer mais do que simplesmente reagir com os radicais livres: deve estar presente em concentrações adequadas na célula, deve poder reagir com uma grande variedade de radicais livres e a sua regeneração deve ser possível. Esta combinação é típica do ácido ascórbico e do α -tocoferol, que são por isso considerados bons anti-oxidantes (Arrigoni e De Tullio, 2002; Behl e Moosmann, 2002).

O ácido ascórbico (também conhecido como vitamina C) é um anti-oxidante hidrossolúvel que participa em diversas reacções do metabolismo celular. Devido a possuir um grande potencial de redução é capaz de reagir com as diferentes espécies reactivas de oxigénio. Destas reacções forma-se o radical ascorbilo, que pode ser posteriormente oxidado a desidroascorbato (Shapiro e Saliou, 2001; Chepda *et al.*,

2001). Em estudos recentes, demonstrou-se que o ascorbato podia induzir a apoptose das células. Esse efeito deve-se à acção do principal produto da sua oxidação, o radical ascorbilo, que actua maioritariamente como um oxidante. Desse modo, o ascorbato pode actuar tanto como um anti-oxidante como um pró-oxidante (via radical ascorbilo) (Lopez-Lluch *et al.*, 1998; Sakagami *et al.*, 1997).

A vitamina E engloba oito formas de anti-oxidantes lipossolúveis, de ocorrência natural, presentes no plasma, em membranas e nos tecidos. Dessas formas, o α -tocoferol é a forma mais abundante. Pode actuar como anti-oxidante, na medida em que é capaz de complexar rapidamente os radicais lípido-peroxilo, antes que estes reajam com outros lípidos e impedindo assim a propagação da peroxidação lipídica nas membranas (Shapiro e Saliou, 2001). No entanto, através do seu mecanismo de auto-reciclagem, o α -tocoferol pode provocar uma diminuição de outros anti-oxidantes, actuando assim como um pró-oxidante (Fuchs, 1998).

Além destes anti-oxidantes directos, existem ainda outros dois tipos: anti-oxidantes indirectos, que actuam impedindo a formação de radicais livres, e dos quais são exemplo os antagonistas de cálcio, os quelantes iónicos ou os inibidores da sintetase do óxido nítrico); e os anti-oxidantes metabólicos, que limitam os danos causados às células através da redução dos níveis elevados de radicais livres resultantes do metabolismo secundário (Behl e Moosmann, 2002).

A procura de novos anti-oxidantes que possam colmatar as defesas das células quando sujeitas a situações de stresse oxidativo, impedindo desse modo o desencadear de reacções conducentes a degenerações várias, continua a ser objecto de investigação.

Os novos anti-oxidantes devem possuir propriedades melhoradas quando comparados com as vitaminas E e C, tal como uma maior lipofilicidade e uma maior capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica no caso de se pretender que actuem a nível do sistema nervoso central (Behl, 1999). Recentemente, têm-se testado alguns anti-oxidantes naturais, tais como o estrogénio (Bonfont *et al.*, 1998), ácidos fenólicos e polifenóis presentes no vinho tinto (German e Walzem, 2000), flavonóides presentes em alguns frutos (du Toit *et al.*, 2001; Schroeter *et al.*, 2000) e extractos naturais de *Ginkgo biloba* ou de outras plantas medicinais (Bastianetto e Quirion, 2002). Alguns destes têm sido, devido às suas propriedades, incluídos como conservantes alimentares. No entanto, e ainda no que diz respeito aos extractos naturais, o facto de constituírem misturas de composição indefinida dificulta o exacto conhecimento do

modo como actuam, logo o seu desenvolvimento como compostos de interesse farmacológico.

As defesas anti-oxidantes procuram apenas controlar os níveis de espécies reactivas de oxigénio, em vez de proceder à sua eliminação por completo. Uma possibilidade para a ocorrência deste fenómeno relaciona-se com os gastos energéticos necessários para manter um excesso de defesas anti-oxidantes: pode tornar-se energeticamente menos dispendioso reparar (no caso do DNA) ou destruir (no caso das proteínas e dos lípidos) biomoléculas danificadas. Outra possibilidade é a das espécies reactivas de oxigénio se tornarem fisiologicamente úteis, desde que em quantidades controladas, de modo a que a sua não eliminação tenha sido privilegiada a nível evolutivo pelos sistemas vivos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Na figura 1 apresenta-se de uma forma esquemática e resumida alguns dos sistemas responsáveis pela ocorrência de danos nas biomoléculas, assim como alguns dos sistemas anti-oxidantes presentes a nível celular com a função de evitar esses danos.

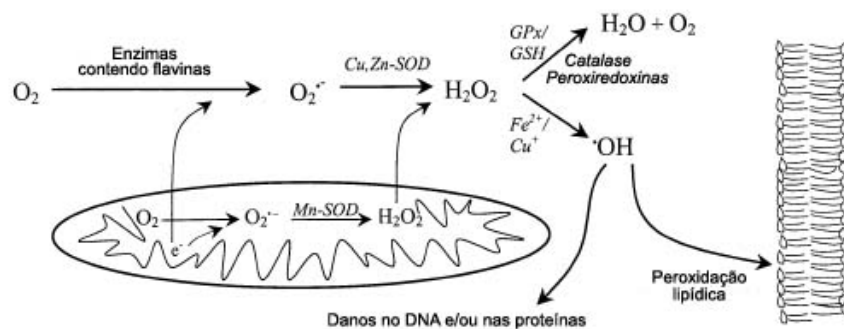


Figura 1 – Esquema simplificado dos sistemas oxidantes e anti-oxidantes que actuam na célula. O superóxido é produzido intracelularmente, tanto no citosol como na mitocôndria. Duas moléculas de superóxido são rapidamente dismutadas, quer espontaneamente quer por via de superóxido dismutases, sendo que estas permitem o posterior fluxo de ROS entre compartimentos celulares. O peróxido de hidrogénio resultante da dismutação do superóxido pode depois ser enzimaticamente metabolizado em dióxigénio e água, ou convertido no radical hidroxilo através de reacções catalizadas por iões metálicos. Segundo (Nordberg e Arner, 2001).

1.3. Morte celular

A desregulação das vias fisiológicas para a indução da morte celular encontra-se relacionada com o aparecimento de diversas patologias, incluindo doenças

neurodegenerativas (tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington), doenças cardiovasculares, doenças imunológicas, SIDA e cancro em geral, e é muitas vezes desencadeada por stresse oxidativo (Reed, 2001).

Os danos celulares podem resultar de um estímulo químico ou físico, quer pelo seu excesso quer pela sua carência, que temporária ou permanentemente provoca alterações na homeostasia da célula. A resposta a estes danos pode ser reversível: a célula entra num estado de latência que pode ou não ser prolongado, e que não leva à morte celular. As respostas reversíveis podem ser transitórias ou podem reflectir eventos precoces de resposta a um insulto que eventualmente leva a danos irreversíveis. Por vezes, estas respostas reversíveis são prolongadas, designando-se de adaptações celulares, que incluem fenómenos como a indução de defesas anti-oxidantes, proteínas de choque térmico ou dos citocromos P450 (em resposta a xenobióticos) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A morte celular pode ocorrer por duas vias distintas, apoptose ou necrose, embora possa ocorrer morte por mecanismos com características de ambas as vias. Tanto a necrose como a apoptose podem resultar da exposição a stresse oxidativo. A necrose é o processo resultante de uma disfunção celular aguda em resposta a condições de stresse ou após exposição das células a agentes tóxicos. É um processo passivo associado a uma rápida depleção de ATP celular. Morfologicamente, a necrose caracteriza-se pelo aumento do volume celular e ruptura da membrana plasmática, seguida da consequente libertação dos conteúdos celulares para o meio intercelular. Esta libertação do conteúdo celular das células mortas pode provocar danos nas células vizinhas, assim como resultar no desenvolvimento de uma resposta inflamatória (Chandra *et al.*, 2000).

A apoptose é um processo activo de morte celular programada que desempenha um papel crucial no desenvolvimento e homeostasia dos organismos multicelulares. Este processo permite a remoção das células (danificadas ou indesejadas) que de outra forma poderiam prejudicar o bom funcionamento das células circundantes através do contacto com os seus conteúdos citoplasmáticos (Leist e Jaattela, 2001). Durante a apoptose ocorre a diminuição do tamanho celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (vesículas de pequenas dimensões que contêm no seu interior componentes celulares que são posteriormente fagocitados por células adjacentes). Além disso, verifica-se igualmente a clivagem do DNA em regiões internucleossómicas, resultando no aparecimento de fragmentos de DNA que formam um padrão característico (“DNA ladder”) após electroforese em gel de agarose. Na

figura 2 pode observar-se um esquema comparativo das alterações morfológicas ocorrentes durante os fenómenos de necrose e apoptose.

Outro processo característico da apoptose é a activação de caspases (proteases cisteínicas específicas para o ácido aspártico), que existem como zimogéneos no citoplasma, espaço intermembranar e matriz nuclear, e que são responsáveis pela clivagem e activação de diversas proteínas intracelulares. É possível também observar a externalização de fosfatidilserina, que pode contribuir para o reconhecimento da célula apoptótica pelas células vizinhas ou por macrófagos, facilitando a sua fagocitose. Estas células apoptóticas são rapidamente fagocitadas, anteriormente à libertação dos conteúdos celulares, minimizando a resposta inflamatória e possibilitando assim a sobrevivência das restantes células (Chandra *et al.*, 2000; Hutchins e Barger, 1998; Zimmermann *et al.*, 2001).

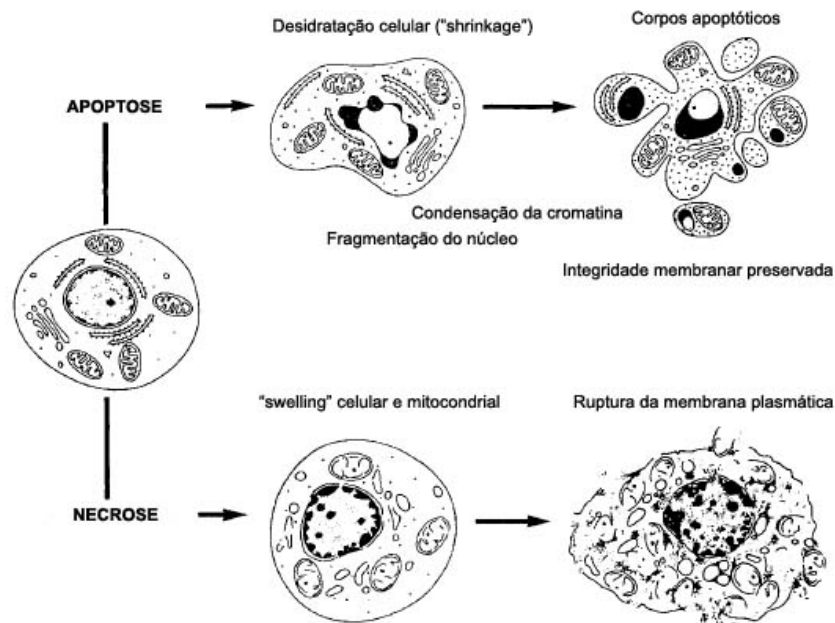


Figura 2 – Esquema ilustrativo das alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem durante os fenómenos de apoptose e necrose (segundo Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

1.3.1. As principais vias apoptóticas

Todas as células dos organismos superiores expressam a maquinaria necessária para o processo apoptótico. Este pode ser dividido em quatro fases distintas: fase de iniciação, durante a qual a célula recebe sinais que podem resultar na activação da

apoptose; fase de compromisso, em que a apoptose se torna irreversível (pode dever-se a alterações mitocondriais); fase de amplificação, durante a qual ocorre a activação das caspases; e fase de execução, onde as estruturas celulares são degradadas, quer por acção das caspases quer por activação de outras enzimas (Slee *et al.*, 1999).

Existem duas vias pelas quais a apoptose pode ser induzida: a via apoptótica mitocondrial e a via apoptótica mediada por receptores membranares, designados de “death receptors” (Ferri e Kroemer, 2001).

A via apoptótica mitocondrial pode ser desencadeada por vários estímulos, como por exemplo algumas substâncias citotóxicas, radiação, choque térmico e pela privação de factores de crescimento indispensáveis à sobrevivência da célula (Slee *et al.*, 1999). Esta via apoptótica pode ser iniciada pela translocação de alguns dos membros pró-apoptóticos da família da Bcl-2 (como por exemplo a Bax, a Bid ou a Bad) para a mitocôndria, onde vão levar à libertação de determinadas proteínas presentes no espaço intermembranar, incluindo uma proteína chave, o citocromo c. Além do citocromo c podem ser igualmente libertados o Factor Indutor da Apoptose (AIF, do inglês “Apoptosis Inducing Factor”), a Smac (do inglês “Second mitochondria-derived activator of caspases), também designada por DIABLO (do inglês “Direct IAP Binding Protein With Low pI”) e a Omi/HtrA2 (do inglês “High Temperature Requirement A2”). Após a sua libertação, o citocromo c liga-se ao factor Apaf-1 (do inglês “Apoptotic Protease Activating Factor-1”), formando o apoptossoma. Ao mesmo tempo, a Smac/DIABLO promove também a activação das caspases pela ligação ao apoptossoma e pela inibição dos inibidores das proteínas apoptóticas (IAPs, do inglês “Inhibitors of Apoptosis Proteins”) (Cain *et al.*, 2002; Cande *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2001).

No que diz respeito aos receptores apoptóticos membranares, aqueles cuja função se encontra mais bem estudada são os pertencentes à família do TNF (do inglês “Tumor Necrosis Factor”), como por exemplo o TNFR1 (do inglês “Tumor Necrosis Factor Receptor-1”), e o Fas (também conhecido como Apo-1 ou CD95, do inglês “Cell Death 95”) (Leist e Jaattela, 2001). Estes receptores possuem um motivo comum nas suas porções citoplasmáticas, designado de domínio apoptótico (“death domain”). Após a activação destes receptores apoptóticos pelos respectivos ligandos, os seus domínios vão recrutar moléculas adaptadoras, tais como a FADD (do inglês “Fas-associated Death Domain”). Posteriormente, a interacção entre as moléculas adaptadoras e os pró-domínios das caspases 2, 8 ou 10 leva à formação do complexo DISC (do inglês

“Death-Inducing Signaling Complex”) e à subsequente activação das caspases. Uma vez activadas, estas podem amplificar o sinal apoptótico através da activação de outras caspases (como por exemplo as caspases 3, 6 e 7) (Krammer, 2000; Wajant, 2002).

As duas vias apoptóticas (via mitocondrial e via mediada por receptores membranares) encontram-se interligadas. Essa ligação é efectuada pela proteína pró-apoptótica Bid (pertencente à família da Bcl-2). Esta proteína, que geralmente se encontra no citoplasma, pode ser clivada pela caspase-8. Após essa clivagem, a porção do terminal carboxílico da Bid é translocada para a mitocôndria onde promove, directa ou indirectamente (através da interacção com a proteína pró-apoptótica Bax), a libertação de citocromo c (Tang *et al.*, 2000).

Verifica-se assim que todos os processos apoptóticos conduzem à activação de caspases, as quais amplificam o sinal apoptótico, levando à activação de outras caspases que são necessárias para a fase de execução celular. Durante esta fase, são degradadas ou clivadas diversas proteínas celulares por acção das caspases. As duas vias apoptóticas encontram-se esquematizadas na figura 3.

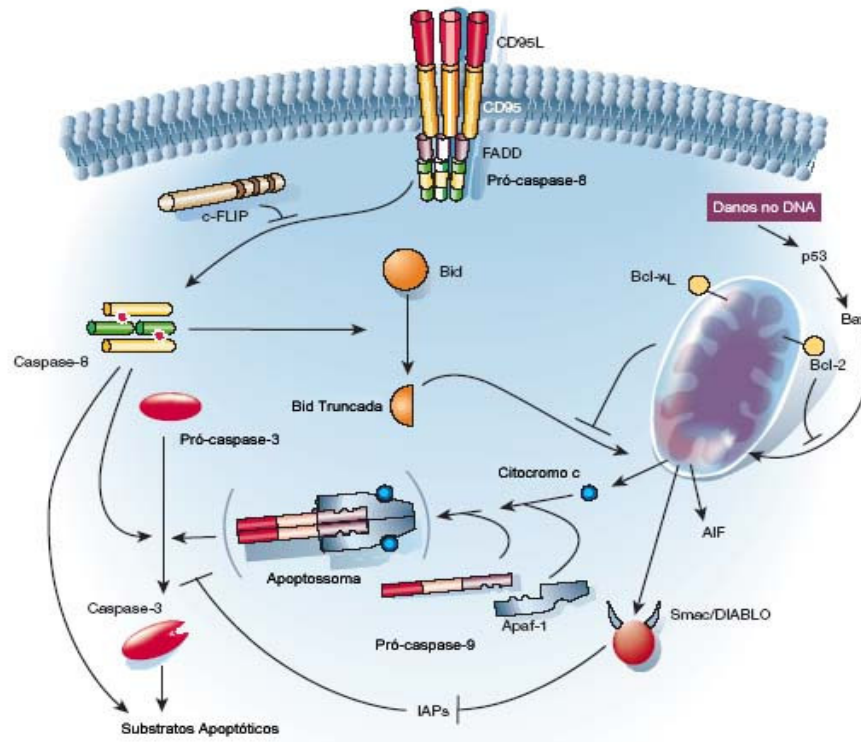


Figura 3 – As duas principais vias apoptóticas nas células animais: no lado esquerdo, a via mediada por receptores de membrana; no lado direito, a via mitocondria (adaptado de Hengartner, 2000).

Recentemente, foi demonstrado que o retículo endoplasmático (RE) pode também participar na iniciação da apoptose. Por um lado, as suas membranas possuem alguns membros pró e anti-apoptóticos da família da bcl-2, e por outro lado, foi já evidenciado que o cálcio (presente em concentrações elevadas no RE) pode funcionar como um segundo mensageiro pró-apoptótico, encontrando-se envolvido na iniciação da apoptose e na regulação de enzimas responsáveis pela morte celular. Uma dessas enzimas é a caspase-12, que se encontra especificamente associada a fenómenos de apoptose resultantes do stresse observado ao nível do RE.

1.4. O estudo de novas moléculas com potencial farmacológico

A descoberta, desenvolvimento e introdução clínica de novos fármacos é um processo que envolve uma cooperação próxima entre investigadores, a indústria farmacêutica, classe médica e os organismos reguladores da entrada de novos fármacos no mercado (e.g. “Food and Drug Administration”, nos E.U.A., ou o INFARMED em Portugal). O processo de desenvolvimento de um novo fármaco inicia-se com a síntese, ou isolamento, de um novo composto com actividade biológica e com potencial para uso terapêutico. Posteriormente, este composto tem que ser sujeito a diversos testes, antes de se tornar disponível no mercado como um fármaco eficaz e terapêuticamente seguro, nomeadamente estudos bioquímicos *in vitro*, testes de farmacocinética e farmacodinâmica, comumente designados por testes pré-clínicos, seguidos finalmente dos ensaios clínicos em humanos (Brody *et al.*, 1998).

1.4.1. Avaliação da citotoxicidade

De entre os estudos bioquímicos necessários ao desenvolvimento de novos fármacos, os testes de citotoxicidade são de importância primordial. Hoje em dia, a utilização de culturas celulares em placas multipoços é uma prática corrente para a avaliação de novos compostos com potencialidade farmacológica, uma vez que permite a manipulação de várias amostras simultaneamente, além de ser um procedimento económico e que permite uma certa automatização (Freshney, 1994). Recentemente, os ensaios de citotoxicidade têm sido dominados pelo uso de técnicas colorimétricas, como

a da redução do MTT ou a da quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) libertada, para determinar o número de células viáveis no final do ensaio, realizado com linhas celulares adequadas crescidas em placas multiposos.

1.4.2. *Relação concentração-resposta*

Existe mais do que um modo de medir a resposta farmacológica produzida por um composto. De um modo geral, a citotoxicidade de um composto aumenta de acordo com o aumento da sua concentração até um determinado valor. É a resposta denominada “gradual”. Uma vez obtidos os valores das respostas para cada concentração de composto estes são representados num gráfico semi-logarítmico, em função da concentração de fármaco utilizada. Na maior parte das vezes, obtém-se uma curva sigmoidal. A partir dessa curva é então possível determinar o valor da concentração de composto necessária para reduzir a resposta inicial em 50%, denominada CI_{50} (Brody *et al.*, 1998).

1.4.3. *Coefficientes de partilha*

Outro dos parâmetros que normalmente se procura determinar quando se pretende desenvolver uma determinada molécula com potencial farmacológico é o coeficiente de partilha, uma vez que a interacção das nossas moléculas com as membranas biológicas tem importantes implicações no tipo, magnitude e duração dos efeitos biológicos induzidos, tornando-se assim importante para compreender melhor a sua acção e toxicologia (Zeng *et al.*, 1999). Além disso, o conhecimento da lipofilicidade relativa de um composto permite formular estratégias que facilitem a absorção ou penetração nos tecidos, que por sua vez levará à libertação do composto no local de acção (Scott e Cleymer, 2002; Leonard *et al.*, 1989). Ao longo dos últimos anos têm-se realizado diversas tentativas para correlacionar a eficácia farmacológica de compostos insolúveis em água com a sua solubilidade em solventes orgânicos, solventes estes que em muitos casos podem ser considerados como bons mimetizadores das propriedades físico-químicas do interior da membrana (Leonard *et al.*, 1989). A medição dos coeficientes de partilha tem sido um método bastante utilizado para obter tanto a lipofilicidade como a hidrofiliicidade relativa de um determinado composto. No entanto, para espécies

ionizáveis o coeficiente de distribuição é um parâmetro mais relevante, embora exista uma maior dificuldade na sua obtenção (Scott e Cleymer, 2002).

1.4.4. Os novos compostos em estudo

Os novos compostos a utilizar neste trabalho são compostos azotados de síntese orgânica, que diferem na sua estrutura química, nomeadamente na presença de grupos hidroxilo localizados nas posições C-3 e C-4 do substituinte aromático (figura 4). A sua estrutura química, especialmente através desses grupos hidroxilo, revela a sua capacidade de tamponização de radicais livres, sendo assim indicativa do seu potencial como “scavengers” de oxigénio. A introdução dessa estrutura numa base de dados criada para o efeito por um grupo de investigadores russos (informação cedida pela Prof. Fernanda Proença), revelou o seu potencial farmacológico em doenças que envolvam stresse oxidativo.

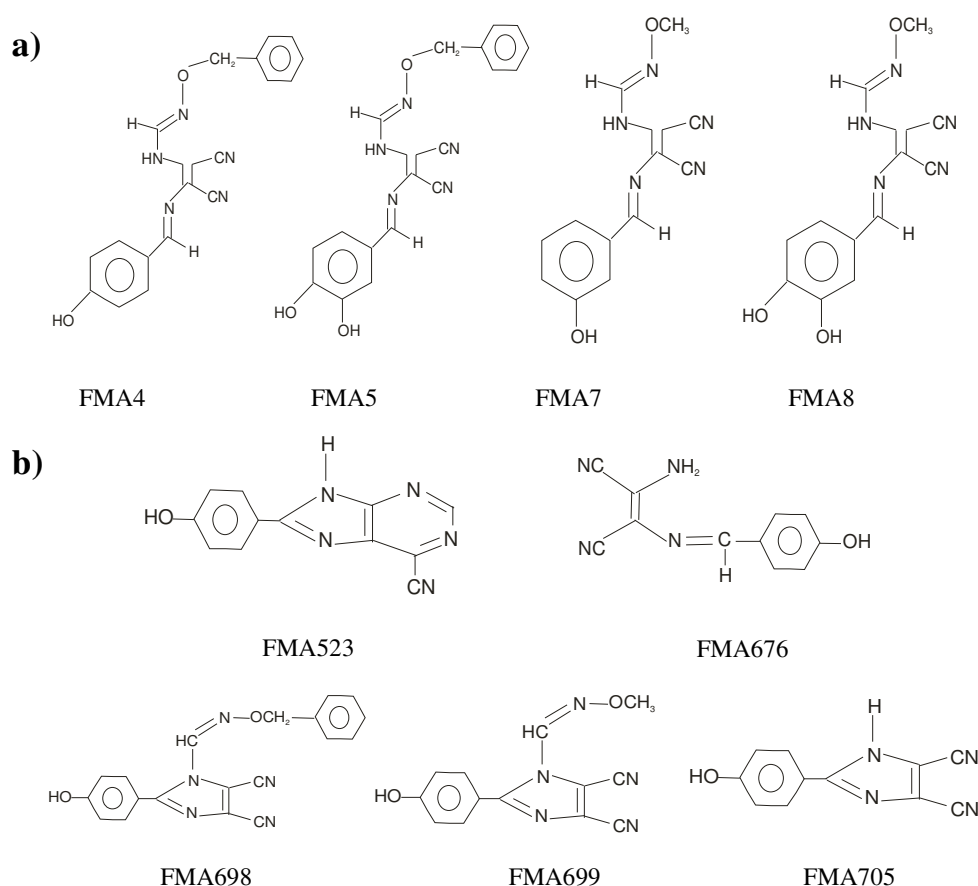


Figura 4 – Representação das estruturas químicas dos novos compostos em estudo: a) estruturas de cadeia linear (FMA4, FMA5, FMA7 e FMA8); b) estruturas de cadeia cíclica (FMA523, FMA676, FMA698, FMA699 e FMA705).

1.5. Objectivo do trabalho

O principal objectivo do presente trabalho é o de determinar a actividade antioxidante destes novos compostos no sentido do seu eventual desenvolvimento como moléculas de interesse farmacológico.

Um segundo objectivo é o de elucidar outras vias bioquímicas em que os compostos possam ser activos, nomeadamente na reversão de fenómenos de apoptose.

Finalmente, a possibilidade de modificação da estrutura química dos compostos, em função dos resultados obtidos, constituirá uma mais valia para o eventual melhoramento do seu potencial terapêutico.

2. Material e Métodos

2.1. Material biológico

No presente trabalho foram utilizadas duas linhas celulares distintas: uma linha celular de fibroblastos (L929), constituída por células não neuronais, indiferenciadas e pluripotentes; e uma linha celular neuronal (PC12), bastante utilizada como modelo de estudo de diferentes processos que podem ser correlacionados com o que ocorre em determinadas doenças neurodegenerativas.

2.1.1. Fibroblastos (linha celular L929)

Os fibroblastos utilizados na realização deste trabalho pertenciam à linha celular L929, obtida a partir da “European Collection of Animal Cell Cultures” (ECACC). Esta linha celular é um subclone da linha parental L, uma das primeiras a ser estabelecida em culturas contínuas, que deriva do tecido subcutâneo normal de ratos adultos (Freshney, 1994).

Esta linha celular foi mantida em meio DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”) ao qual se adicionou 10% (v/v) de soro fetal bovino e 1% (v/v) de antibiótico, numa estufa a 37°C com atmosfera humidificada e 5% de CO₂. As células em estado de confluência foram tripsinizadas, utilizando-se para tal 0.25% tripsina/EDTA, e colocadas a crescer nos recipientes adequados, à densidade desejada.

Resumidamente, o processo de tripsinização consistiu na remoção do meio de cultura e adição de uma solução 0.25% tripsina/EDTA (1ml por cada frasco de cultura de 25cm² e 2ml por cada frasco de 75cm²). Após incubação numa estufa, a 37°C e 5% CO₂, durante cerca de 3 minutos, a tripsina foi removida (para evitar possíveis danos celulares) e as células colocadas de novo na estufa, durante aproximadamente 5 minutos, nas mesmas condições. As células foram de seguida ressuspensas em meio de cultura, através de pipetagens sucessivas sobre a camada de células ainda aderidas ao frasco (operação efectuada com cuidado para evitar a formação de espuma, que pode ter efeito de detergente e danificar irremediavelmente a cultura), levando à sua total desagregação. Procedeu-se então à contagem celular num hemocitómetro, com azul

tripano, efectuando-se de seguida o plaqueamento das células à densidade desejada ou a transferência para novos frascos de cultura.

O azul tripano é um corante cuja reactividade se baseia no facto de o cromóforo ser carregado negativamente e não interagir com as células, a não ser que a membrana se encontre danificada. Sendo assim, todas as células que incluírem o corante consideram-se como não viáveis. Para a determinação da densidade celular, este corante foi misturado com a suspensão celular, numa proporção 1:1, e de seguida relacionou-se o número de células não coradas com o número de células totais e as diluições efectuadas, expressando-se os resultados em termos de percentagem de viabilidade celular.

2.1.2. Linha celular PC12

A linha celular PC12 foi estabelecida pela primeira vez por Greene e Tischler (Greene e Tischler, 1976) a partir de um feocromocitoma transplantável da glândula adrenal de rato e consiste numa população homogénea de células capazes de sintetizar, armazenar e libertar dopamina dum modo semelhante a células neuronais. A suplementação destas células com NGF (do inglês “Nerve Growth Factor”) pode levar à indução do fenótipo neuronal, sendo esta resposta reversível.

Esta linha celular (gentilmente cedida pelo Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra) foi cultivada em suspensão em frascos de cultura de 75cm², em meio RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de soro de cavalo, 5% (v/v) de soro fetal bovino e 1% (v/v) de antibiótico.

As células foram mantidas numa estufa a 37°C, com atmosfera humidificada e 5% de CO₂ e, devido à sua elevada tendência para formar aglomerados, passadas duas vezes por semana. A primeira passagem consistiu apenas numa diluição das células, em que primeiro se procedeu à desagregação mecânica dos aglomerados formados (altamente desaconselhados por poderem resultar na morte celular) com uma pipeta serológica de 5ml, seguida da transferência de 10ml da suspensão celular para um novo frasco de cultura, perfazendo-se de seguida o volume de ambos os frascos até 20ml. A segunda passagem consistiu na transferência do meio de cultura com as células (após desagregação dos aglomerados com uma pipeta serológica de 5ml) para um Falcon, à qual se seguiu uma centrifugação das células a 1000rpm e posterior nova desagregação mecânica dos aglomerados, primeiro com a ajuda de uma pipeta serológica de 5ml e

depois por passagem das células por seringa e agulha estéreis. As células foram então contadas num hemocítmetro, com azul tripano, procedendo-se de seguida ao seu plaqueamento ou à transferência para novos frascos.

As células PC12 foram plaqueadas à densidade de 50.000 células/cm² para ensaios de viabilidade celular e à densidade de 180.000 células/cm² para outros estudos. Devido à sua fraca adesão ao poliestireno, foi necessário proceder-se ao tratamento prévio das placas de cultura com poli-D-lisina (preparada à concentração de 0.1mg/ml em tampão borato 150mM, pH 8.4).

2.2. Compostos estudados

Os compostos em estudo foram sintetizados pelo grupo de Síntese Orgânica do Departamento de Química da Universidade do Minho. As suas estruturas químicas encontram-se representadas na figura 4.

Estes compostos são, conforme evidenciado, compostos azotados com uma estrutura semelhante a compostos naturais com anéis de imidazole. A sua fórmula de estrutura revela capacidade de tamponização de radicais livres, essencialmente através dos grupos hidroxilo situados no anel de imidazole, o que faz prever a sua actividade como anti-oxidantes. Por outro lado, de acordo com os resultados da introdução das suas estruturas numa base de dados, criada para o efeito por um grupo de investigadores russos (informação cedida pela Prof. Fernanda Proença), apresentam potencial farmacológico em doenças que envolvam stresse oxidativo.

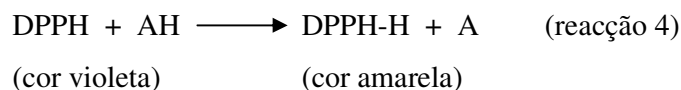
Os compostos estudados foram separados de acordo com a sua estrutura, nomeadamente os que apresentavam cadeia linear e os que apresentavam uma estrutura cíclica (figura 4a e 4b, respectivamente). Com a ciclização dos novos compostos pretendia-se obter um aumento da actividade anti-oxidante.

2.3. Método de descoloração do radical DPPH

De entre os diversos métodos descritos que permitem determinar a remoção de radicais livres (Parejo *et al.*, 2000; Arnao, 2002) foi utilizado no presente trabalho o método de descoloração do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), de acordo com o

descrito por Mathiesen (Mathiesen *et al.*, 1997). Com esta abordagem pretendeu-se determinar o CI_{50} para cada composto.

O DPPH é um radical livre estável que contém um electrão não emparelhado na sua estrutura (Jin e Chen, 1998), o que permite a observação de um pico de absorção a 517nm (Lehuédé *et al.*, 1999). A captação de um átomo de hidrogénio a partir de um dador por parte do radical DPPH leva à formação do radical difenilpicrilhidrazina (DPPH-H) e de um radical fenoxilo (reacção 4). Esta reacção envolve a mudança de cor da solução de violeta para amarelo (Lebeau *et al.*, 2000).



Uma vez que a descoloração resultante possui uma relação estequiométrica com o número de electrões captados, o decréscimo na absorvância que resulta desta reacção é assim representativo da capacidade de um determinado composto remover radicais livres independentemente de qualquer actividade enzimática (Lehuédé *et al.*, 1999).

Para proceder à execução deste teste, foram inicialmente preparadas soluções em etanol, dos compostos, a diferentes concentrações, nomeadamente entre 1 e 200 μ M para os compostos de cadeia linear e entre 1 e 500 μ M para os compostos cíclicos. Colocaram-se então 20 μ l de cada uma destas soluções numa placa de 96 poços, aos quais se adicionaram 180 μ l de uma solução etanólica de DPPH 0.002%.

Os valores de absorvância foram registados num leitor de microplacas Spectra Max 340PC, a 517nm, imediatamente após a adição do DPPH e passados 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos da mesma. Simultaneamente, procedeu-se à leitura da absorvância de um controlo positivo contendo apenas DPPH em etanol (com o intuito de se observar a descoloração do DPPH ao longo do tempo), assim como de controlos negativos contendo apenas os compostos na ausência de DPPH, de modo a verificar se os compostos sofreriam alguma descoloração ao longo do tempo.

Com os dados obtidos foi construído um gráfico de modo a ser possível determinar o tempo de estabilização da descoloração do DPPH para cada composto. Nestes ensaios, foram adicionalmente utilizados o α -tocoferol (vitamina E) e o Trolox, um análogo da vitamina E solúvel em água, como bases de comparação para os compostos.

Obtido o tempo de estabilização do DPPH, utilizaram-se os valores das absorvâncias para esse tempo para calcular as percentagens de descoloração para cada concentração de composto em relação ao controlo positivo e, a partir da curva gerada, determinou-se a concentração de composto necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (CI₅₀).

2.4. Determinação da viabilidade celular

Para a determinação da viabilidade celular foram utilizados dois métodos distintos mas complementares. Este parâmetro foi assim determinado através da capacidade das células para reduzir o MTT e através da libertação da enzima lactato desidrogenase para o meio extracelular.

2.4.1. Método de redução do MTT

Um dos métodos mais utilizados na avaliação da citotoxicidade de diferentes compostos é o teste da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), devido à sua rapidez, versatilidade e alta reprodutibilidade (Supino, 1995). Este teste colorimétrico baseia-se na capacidade das células viáveis converterem um sal de tetrazólio solúvel (MTT) num precipitado de formazan insolúvel, de acordo com a reacção indicada na figura 5. Os sais de tetrazólio atravessam a membrana celular e entram para a célula onde aceitam electrões a partir de substratos oxidados, ou de determinadas enzimas, sendo particularmente reduzidos como resultado da actividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (Supino, 1995). Esta reacção converte os sais de MTT de cor amarela em cristais de formazan de cor violeta que se acumulam em endossomas e são posteriormente transportados para a superfície celular através de um processo de exocitose (Supino, 1995; Liu, 1999). Os referidos cristais de formazan podem ser posteriormente dissolvidos num solvente orgânico, que permita a sua quantificação por espectrofotometria (Supino, 1995; Freshney, 1994).

Estudos mais recentes demonstraram que a mitocôndria não tem um papel exclusivo na redução do MTT, uma vez que outras fracções subcelulares importantes (incluindo a nuclear, a microsomal e a citosólica) podem igualmente reduzir o MTT, funcionando o

NADH ou o NADPH citoplasmáticos eventualmente como melhores substratos para a redução do MTT do que o próprio succinato (Liu, 1999).

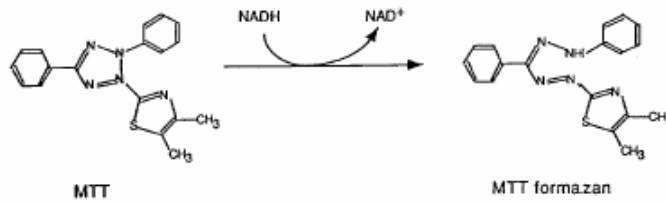


Figura 5 – Estruturas químicas do MTT e do MTT formazan.
Adaptado de Liu (1999).

Sendo assim, deve ter-se em consideração que a redução do MTT poderá não exprimir necessariamente actividade metabólica a nível mitocondrial. Para além disso a toxicidade intrínseca do MTT pode de algum modo contribuir para a morte celular eventualmente verificada (Liu, 1999; Freshney, 1994). Não obstante, a redução do MTT continua a ser um método expedito de determinação da viabilidade celular, tendo em consideração as limitações mencionadas.

O método utilizado neste trabalho foi adaptado a partir do descrito por Mosmann (1983). Sendo assim, colocaram-se 500µl de uma suspensão de fibroblastos com uma densidade de 5×10^5 células/ml em placas de 24 poços, tendo as células sido deixadas a incubar durante 5 horas, a 37°C, sob atmosfera humidificada com 5% CO₂. Após esse período de incubação (necessário para a adesão dos fibroblastos à superfície dos poços) adicionaram-se os compostos previamente diluídos em etanol. Foi utilizado um controlo, contendo apenas células, às quais foi adicionado etanol, no volume máximo de composto utilizado, o que equivale a uma percentagem de etanol que não excede 1% do volume total.

As células com os compostos foram deixadas a incubar “overnight”. No dia seguinte, aspirou-se o meio e lavaram-se os poços com meio de Krebs, tendo-se adicionado de seguida 500µl de uma solução de MTT diluído em meio de Krebs, à concentração de 0.5mg de MTT/ml. A placa foi então coberta com papel de alumínio e deixada a incubar na estufa de CO₂, a 37°C, durante 2 horas. Após esse período, adicionaram-se a cada poço 500µl de uma solução de isopropanol-ácido e as placas, protegidas da luz, foram colocadas num agitador orbital durante 2 horas, de modo a

permitir a melhor dissolução dos cristais. Finalizado esse período de tempo, raspou-se o fundo dos poços com a ajuda de pipetas de Pasteur de plástico, transferindo-se 100µl de cada poço, em duplicado, para uma placa de 96 poços, destinada a posterior leitura da absorvância, a um comprimento de onda de 570nm, num leitor de microplacas Spectra Max 340PC.

A percentagem de viabilidade celular foi então determinada relacionando os valores das absorvâncias obtidos para cada amostra com o controlo contendo as células expostas apenas a 1% etanol.

2.4.2. Libertação da lactato desidrogenase (LDH)

A viabilidade celular foi igualmente determinada através do teste da libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH, do inglês “Lactate dehydrogenase”). Esta enzima é responsável pela redução de piruvato a lactato, na presença de NADH (figura 6) (Stryer, 1998). Uma vez que esta enzima é de origem citoplasmática, a sua presença no meio extracelular fornece indicações sobre a integridade da membrana plasmática.

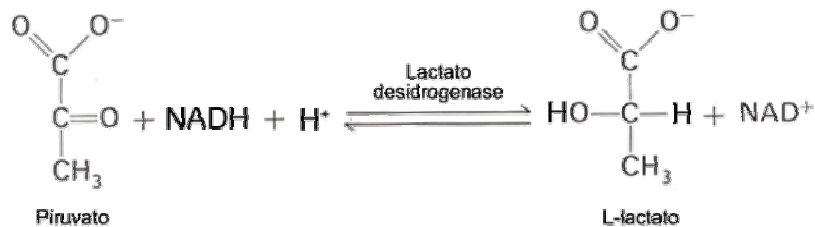


Figura 6 – Redução do piruvato a lactato, catalisada pela lactato desidrogenase, utilizando NADH como poder redutor. Adaptado de Stryer (1998).

As células foram incubadas em placas de 12 poços à concentração de 5×10^5 células/ml, durante o tempo necessário para ocorrer a adesão celular à placa. Após esse período de incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por meio novo, com o objectivo de remover possíveis células mortas. Os compostos a testar foram então adicionados e deixados a incubar na presença das células durante o tempo pretendido.

Após a incubação, recolheu-se um pequeno volume de meio para eppendorfs, com vista à determinação da LDH extracelular. O restante volume foi então removido, lavaram-se os poços uma vez com PBS e recolheram-se as células com 1ml de Tris 15mM. Estas foram posteriormente sujeitas a pulsos de poucos segundos num

sonicador, de modo a provocar a lise celular e a consequente libertação da LDH intracelular.

Tanto as amostras para quantificação da LDH extracelular como da intracelular foram sujeitas a uma centrifugação a 13000rpm, durante 1 minuto, numa centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415C) para eliminar quaisquer fragmentos celulares que se encontrassem em suspensão.

As amostras foram colocadas numa placa de 96 poços e as reacções foram iniciadas pela adição de 10µl de piruvato (concentração final de 0.32mM), na presença de 250µl de NADH (concentração final de 0.28mM). Ambas as soluções foram preparadas em tampão fosfato 0.05M, a pH 7.4. A velocidade de conversão da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) na forma oxidada (NAD⁺) foi então determinada espectrofotometricamente num leitor de microplacas Spectra Max 340PC, a 340nm, ao longo de 3 minutos, a 30°C. A percentagem de LDH libertada foi posteriormente expressa como percentagem da actividade total, de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ LDH libertada} = \text{LDH extracelular} / (\text{LDH extracelular} + \text{LDH intracelular}) \times 100$$

2.5. Avaliação da hidrofobicidade dos compostos

O grau de hidrofobicidade dos diferentes compostos foi determinado através da medição dos coeficientes de partilha (PC, do inglês “Partition Coefficients”) e dos factores de retardação (Rf, do inglês “Retardation factors”).

Os coeficientes de partilha foram medidos num sistema *n*-octanol/HEPES. Os compostos azotados foram dissolvidos em *n*-octanol a uma concentração de 20µM. Misturou-se 1ml de cada solução com 20ml HEPES (20mM, pH 7.4), por inversões várias do conteúdo de cada tubo, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. As duas fases formadas foram de seguida separadas por centrifugação (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0) à temperatura ambiente e a 2000rpm. Os valores dos coeficientes de partilha foram calculados através da fórmula: $CP = \log (C_O / C_H)$, onde C_O e C_H correspondem às concentrações dos compostos em *n*-octanol e HEPES, respectivamente, determinados através dos valores de absorvância lidos a 400nm (para os compostos FMA4 e FMA7) e 410nm (para os compostos FMA5 e FMA8) de acordo

com os picos de absorção previamente determinados. Os valores de C_H foram determinados indirectamente calculando a diferença entre o valor da concentração inicial e o valor final de composto presente no *n*-octanol.

Uma segunda avaliação da hidrofobicidade dos compostos foi feita pela determinação dos factores de retardação, através de cromatografia em camada fina (TLC, do inglês “Thin Layer Chromatography”), em placas de gel de sílica G60 (Merck) (Areias *et al.*, 2001). Para o efeito, utilizou-se um sistema de eluição ascendente, constituído por clorofórmio:acetato de etilo:ácido acético numa proporção de 16:8:1. As placas foram previamente sujeitas a uma corrida com o eluente e deixadas a secar antes da aplicação da amostra. Colocaram-se 2 μ l de cada composto e, após eluição das amostras, observaram-se as bandas dos compostos com o auxílio de um visor iluminado com radiação ultravioleta.

2.6. Determinação da protecção dos compostos na peroxidação lipídica

Os peróxidos lipídicos são compostos instáveis que tendem a degradar-se rapidamente, originando diversos produtos, tais como alcanos de cadeia curta e aldeídos. Alguns exemplos de intermediários ou produtos da peroxidação lipídica que podem ser aplicados em estudos clínicos incluem a medição de dienos conjugados, de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico, da exalação dos gases pentano e etano, e de aldeídos citotóxicos (Meagher e Fitzgerald, 2000).

No presente trabalho experimental procedeu-se à medição do malonildialdeído (MDA) pelo método do doseamento das espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um método desde há muito utilizado (Ohkawa *et al.*, 1979), ao qual foram introduzidas algumas alterações.

Para a realização deste teste, indicativo da peroxidação lipídica, colocaram-se 4ml de uma suspensão celular por cada poço numa placa de 6 poços, tendo-se deixado essa placa a incubar durante 2 dias, a 37°C numa estufa de CO₂, de modo a conseguir obter-se uma densidade celular de cerca de 1.8x10⁶ células/ml. Este período de incubação foi necessário, uma vez que a densidade celular obtida por cada passagem/tripsinização era inferior à densidade final desejada (4.32x10⁷ células para 24ml). Tendo em consideração que o tempo de duplicação das células é de cerca de 24 horas, com os dois dias de incubação conseguia-se obter a densidade celular desejada.

Após esse período de tempo, os poços foram lavados uma vez com meio de Krebs, adicionando-se de seguida 2ml do par oxidante, na presença e na ausência dos compostos a testar, diluídos em meio de Krebs. Para cada condição foram utilizadas duas réplicas. A peroxidação lipídica foi induzida através da adição do par ascorbato-ferro, ascorbato 2mM e ferro(II) 400 μ M, no caso dos fibroblastos, ou ascorbato 2mM e ferro(II) 100 μ M no caso das PC12. O ferro utilizado encontrava-se sob a forma de sulfato de ferro. O efeito protector de cada composto foi estudado pela adição de cada um deles na presença do par oxidante ascorbato/ferro(II) na concentração anteriormente determinada. O ascorbato funciona neste caso como um pró-oxidante, reciclando o Fe²⁺ a partir de Fe³⁺, que por sua vez leva à formação de radicais livres, como o radical hidroxilo (Shapiro e Saliou, 2001), razão pela qual a sua concentração poderá ser crítica no sentido de assegurar a oxidação continuada do ferro presente. Como controlo negativo foi verificada a eventual peroxidação residual em células, na ausência de qualquer par oxidante. Mais uma vez foi utilizado o α -tocoferol e o seu análogo Trolox, como anti-oxidantes tradicionais, de modo a poder comparar o seu efeito com o dos compostos em estudo.

A placa com os reagentes adicionados ficou então a incubar durante 60 minutos, a 37°C e 5% CO₂. O meio foi posteriormente removido por aspiração e a placa colocada em gelo. Adicionaram-se 1560 μ l de Tris 15mM (pH 7.4) a cada poço, de modo a induzir o rebentamento das células. O conteúdo dos poços foi então removido, com o auxílio de raspadores, para tubos cónicos de vidro (volume total de 3120 μ l), fazendo-se um “pool” de dois poços com células sujeitas às mesmas condições. De cada tubo, foram retirados 100 μ l para eppendorfs, para posterior quantificação da proteína total pelo método de Sedmak. Esta quantificação visa a normalização dos resultados para a mesma quantidade de proteína total.

Aos tubos cónicos de vidro adicionaram-se 6ml de uma solução contendo 0.38% TBA (p/v), 37.5% TCA (v/v) e 0.015% BHT (p/v). Os tubos, tapados com esferas de vidro, foram colocados num banho de água a ferver durante cerca de 15 minutos. Este tempo de fervura das células com a solução TBA/TCA/BHT destina-se a detectar o processo de peroxidação lipídica induzido pelo par oxidante. As espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico originaram o aparecimento de um cromogéneo cor de rosa, susceptível de absorver a 530nm (Minotti e Aust, 1987; Tang *et al.*, 2000b).

Após os 15 minutos de fervura, os tubos foram deixados arrefecer e centrifugados durante 10 minutos a 3000rpm numa centrífuga preparativa de baixa velocidade Heraeus-Christ Labofuge. De cada tubo foram retirados 3ml do sobrenadante obtido para cuvetes e lida a absorvância a 530nm num espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 UV/VIS. A concentração de TBARS foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$C = \frac{V \times D.O._{530nm}}{\epsilon \times mg \text{ de proteína} \times l},$$

em que **V** corresponde ao factor de diluição, **l** corresponde à espessura da cuvette (1cm). O coeficiente de extinção molar (ϵ) utilizado foi de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os resultados foram normalizados para a concentração de proteína em cada caso e por isso expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

2.6.1. Quantificação da proteína: método de Sedmak

A determinação da proteína total foi realizada através do método de Sedmak (Sedmak e Grossberg, 1977) que, devido ao facto de apresentar uma grande facilidade de execução e uma alta sensibilidade, é um método vulgarmente utilizado para determinação de baixas gamas de proteína. Este método baseia-se na ligação do corante (Coomassie Blue) à proteína, que resulta num complexo corante-proteína que absorve a um comprimento de onda entre 595 e 620nm. Esta ligação do corante à proteína é mediada pela interacção de grupos amina protonados presentes na proteína. Estes grupos amina, nomeadamente os resíduos de lisina e arginina, formam um par iónico com os grupos de ácido sulfónico do corante, resultando na passagem do corante de castanho para azul (Sapan *et al.*, 1999).

A curva padrão foi obtida a partir de seis soluções contendo quantidades crescentes de albumina sérica bovina (BSA) 0.1%, 20 μ l de tampão Tris 15mM, 2ml de reagente de Sedmak (Coomassie Brilliant Blue G250 0.06%, em ácido perclórico 3% (p/v), previamente filtrado através de filtros de papel Whatman nº1) diluído em ácido perclórico 3% numa proporção de 3 para 7, completando o volume de 3ml com água ultra-pura. Para quantificação da proteína nas amostras, colocaram-se nos tubos 50 μ l de cada uma delas, 2ml de reagente de Sedmak diluído e perpez-se o volume até 3ml com

água ultra-pura. O conteúdo de cada tubo foi misturado num vortex, após o que se esperaram cerca de 10 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi lida num leitor de microplacas Spectra Max 340PC, a um comprimento de onda de 620nm.

2.7. Determinação da Actividade das Caspases

As caspases são uma componente fundamental da maquinaria apoptótica, participando numa cascata enzimática que resulta na morte celular. Estas proteases clivam os seus substratos em ligações Asp-Xxx, ou seja, a seguir a um resíduo de aspartato. A especificidade de uma caspase por um substrato é determinada pelos três a quatro resíduos anteriores a esse aspartato (Hengartner, 2000).

A actividade das caspases 3, 8 e 9 foi determinada através da utilização de substratos contendo o cromóforo *p*-nitroanilida (*p*NA). Após a indução de apoptose nas células, a actividade proteolítica das caspases aumenta, proporcionando a clivagem dos seus substratos e a libertação do cromóforo, que por sua vez pode ser detectado espectrofotometricamente. Desta forma, comparando as absorvâncias obtidas para as amostras controlo com as restantes amostras, é possível determinar o nível de actividade proteolítica para cada uma delas, após indução de apoptose.

O método utilizado foi adaptado do procedimento descrito por Cregan (Cregan *et al.*, 1999). As células foram incubadas em placas de 12 poços tratadas com poli-lisina a uma densidade de 1.8×10^5 células/cm². Após a adesão das células, o meio de cultura foi removido e substituído por meio contendo apenas 4% de soro. A ausência de soro no meio contribui para a indução de apoptose (Oliveira *et al.*, 2002). Foi adicionada staurosporina (STS), um alcalóide isolado a partir da bactéria *Streptomyces staurospores* que, por parecer activar mecanismos de morte celular comuns a todas as células, é utilizado de uma forma generalizada como indutor da apoptose (Kruman *et al.*, 1998). Os compostos a testar, na presença de STS, foram então adicionados a este novo meio.

Após a incubação com os compostos na presença de STS, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS (pH 7.4). De seguida, recolheram-se as células com um tampão de lise (Na-EDTA 1mM, Na-EGTA 1mM, MgCl₂.6H₂O 2mM, HEPES 25mM, pH 7.5, contendo fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100μM e DTT 2mM). As amostras foram sujeitas a uma sonicação de 10 segundos num sonicador “High

Intensity Ultrasonic Processor” a fim de assegurar o processo de lise, seguida de uma centrifugação a 14000rpm (centrífuga Sigma 2K15) durante 10 minutos, a 4°C, para eliminar os fragmentos celulares. Os sobrenadantes foram transferidos para novos eppendorfs e guardados a -80°C até serem utilizadas, quer para determinação da actividade das caspases quer para determinação da proteína total pelo método de Sedmak já descrito.

Para determinar a actividade das caspases 3, 8 e 9, alíquotas de extractos celulares contendo 50µg de proteína foram adicionadas a um tampão de reacção (sacarose 10%, hidróxido de N,N-dimetil-N-(3-sulfopropil)-3-[[3α,5β,7α,12α)-3,7,12-trihidroxi-24-oxocolan-24-il]-amino]-1-propanamónio (CHAPS) 0.1%, HEPES 25mM, pH 7.4, contendo DTT 10mM). As reacções (volume final de 500µl) foram iniciadas pela adição, ao abrigo da luz, dos seguintes substratos colorimétricos: acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilida (Ac-DEVD-*p*NA) 100µM, para determinação da actividade das enzimas semelhantes à caspase-3; acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroanilida (Ac-IETD-*p*NA) 100µM, para determinação da actividade das enzimas semelhantes à caspase-8; ou acetil-Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilida (Ac-LEHD-*p*NA) 100µM, para determinação da actividade das enzimas semelhantes à caspase-9. Ao fim de 2 horas de incubação ao abrigo da luz e a 37°C, foram transferidos 200µl de cada reacção para placas de 96 poços, sendo a clivagem dos substratos colorimétricos medida a 405nm. A actividade das diferentes caspases, expressa em nmol de substrato / mg de proteína, foi posteriormente expressa como o aumento dos valores de absorvância relativamente ao controlo (células incubadas na ausência do indutor apoptótico).

2.8. Determinação da Morte Celular – marcação com Hoechst 33342 e iodeto de propídio

O colapso nuclear característico que ocorre durante a apoptose engloba a fragmentação da cromatina, degradação do envelope nuclear e o “blebbing” nuclear, resultando na formação de micronúcleos. Por conseguinte, os marcadores de ácidos nucleicos tornam-se ferramentas úteis na identificação de células apoptóticas, no meio de uma população celular.

Neste trabalho, as células apoptóticas foram distinguidas das necróticas através da utilização em simultâneo de dois marcadores fluorescentes: o Hoechst 33342 e o iodeto de propídio (PI, do inglês “Propidium Iodide”). O marcador Hoechst penetra livremente

nas células, marcando dessa forma os núcleos (com uma cor azul fluorescente) tanto das células viáveis como das células em apoptose ou necrose. As células apoptóticas podem de seguida ser distinguidas das outras com base na condensação e fragmentação nuclear. O iodeto de propídio entra apenas em células cujas membranas se encontrem danificadas, ou seja, a partir de fases mais avançadas da apoptose, em que ocorre um aumento da permeabilidade da membrana. Logo, as células PI-negativas são consideradas viáveis, enquanto que as células PI-positivas consideram-se como necróticas (Liu *et al.*, 2003).

Para a realização deste procedimento, as células foram incubadas à densidade de 5×10^5 células/ml em lamelas de vidro previamente esterilizadas com etanol a 70% e colocadas em placas de 6 poços. Para a adesão das células PC12, as lamelas foram tratadas com poli-lisina, de acordo com o procedimento descrito anteriormente (secção 2.1.2.).

Após adesão celular, o meio de cultura foi removido e as células aderidas às lamelas foram lavadas duas vezes com PBS. Foram adicionados 100µl/lamela de iodeto de propídio 4µg/ml (em PBS) e aguardados 5 minutos. De seguida, as células foram novamente lavadas com PBS (duas vezes), adicionaram-se 400µl/lamela de paraformaldeído 4% e aguardaram-se mais 10 minutos, para promover a fixação. O paraformaldeído foi então removido e as células novamente lavadas duas vezes com PBS. Adicionaram-se 400µl/lamela de Hoechst 5µg/ml (em PBS). Após 10 minutos nessas condições, procedeu-se a novas lavagens das células com PBS.

Depois de deixar secar bem as lamelas, estas foram montadas em lâminas com uma gota de água, e observadas por microscopia de fluorescência (Leitz Laborlux S). Os núcleos foram identificados pela reacção fluorescente azul ou vermelha e distinguidos pela respectiva morfologia.

2.9. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão, para pelo menos três experiências independentes, executadas em duplicado. A significância estatística foi determinada pelo teste de *t*-Student (“unpaired, two-tailed”). Valores de $p < 0.05$ foram considerados como sendo estatisticamente significativos.

2.10. Reagentes químicos

O soro fetal bovino (FBS) foi adquirido à Biochrom KG (Berlim, Alemanha).

O soro de cavalo foi adquirido à Gibco (Paisley, UK).

O 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e o 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico 97% (Trolox) foram adquiridos à Sigma-Aldrich Chemie (Berlim, Alemanha).

O Coomassie Blue foi adquirido à Fluka (Suíça).

Todos os outros reagentes, incluindo o meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), o meio de cultura RPMI-1640, o HEPES, o antibiótico, a 0.25% tripsina/EDTA, o azul de metileno, o azul tripano, o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), a forma reduzida da β -nicotinamida adenina dinucleótido (β -NADH), o dimetilsulfóxido (DMSO), o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), o ácido tricloroacético (TCA), o hidroxitolueno butilado (BHT), a albumina sérica bovina (BSA), o ácido L-ascórbico, o ácido bórico, a poli-D-lisina, o Hoechst 33342, o iodeto de propídio, o hidróxido de *N,N*-dimetil-*N*-(3-sulfopropil)-3-[[$(3\alpha,5\beta,7\alpha,12\alpha)$ -3,7,12-trihidroxi-24-oxocolan-24-il]-amino]-1-propanamónio (CHAPS), a staurosporina, o acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilida (Ac-DEVD-*p*NA), o acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroanilida (Ac-IETD-*p*NA), o acetil-Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilida (Ac-LEHD-*p*NA), o fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), o ditioneitol (DTT), o ácido Na-etilenodiaminatetraacético (EDTA) e o ácido Na-etilenoglicol-bi-(β -aminoetiléter)-*N,N*-tetraacético (EGTA) foram adquiridos à Sigma Chemical Company (St Louis, EUA)

3. Resultados e Discussão

O stresse oxidativo é uma das principais causas de danos celulares, resultando em diversas disfunções do metabolismo e por conseguinte em morte celular. A procura de novos compostos que possam actuar para além das defesas celulares naturais, em situações em que as células se encontrem danificadas, tem vindo a aumentar drasticamente nos últimos anos, uma vez que estes podem contribuir para uma melhoria significativa de patologias envolvendo stresse oxidativo. Alguns compostos, de origem natural, tais como alguns flavonóides, provaram já ser bons anti-oxidantes (Areias *et al.*, 2001). No entanto, estes flavonóides encontram-se maioritariamente em extractos de plantas ou outros componentes naturais, fazendo parte de misturas que, devido à sua complexidade, impossibilitam a sua utilização directa como fármacos. Por outro lado, o seu isolamento dessas misturas é um processo complexo, nem sempre reprodutível, e por isso pouco viável para a sua obtenção em larga escala.

No presente estudo foram utilizados compostos sintetizados *de novo*, com uma estrutura química bem definida, podendo o seu potencial anti-oxidante ser directamente correlacionado com as suas características estruturais.

3.1 Determinação do CI_{50} para os compostos de cadeia linear

De acordo com Beckman e Ames (1998), a actividade anti-oxidante de um composto depende da sua capacidade como “scavenger” de radicais livres. Neste trabalho, utilizou-se o método de descoloração do radical DPPH para verificar essa capacidade nos novos compostos. Nesta primeira fase, foram testados apenas os compostos de cadeia linear.

De acordo com estudos realizados anteriormente em flavonóides, a presença de dois grupos hidroxilo nas posições C-3 e C-4 da sua estrutura química é responsável por um aumento da capacidade de redução do DPPH (Okawa *et al.*, 2001; Yokozawa *et al.*, 1998). Sendo assim, seria de prever uma maior actividade anti-radicalar por parte dos compostos FMA5 e FMA8. De facto, e tal como demonstram os resultados da tabela I, esses compostos apresentam valores de CI_{50} bastante baixos (2.5 e 3.9 μ M), logo uma

actividade anti-radicalar elevada, sendo inclusivamente superior às duas formas da vitamina E testadas: a forma lipossolúvel (α -tocoferol) e o análogo hidrossolúvel (Trolox). Por sua vez, os compostos FMA4 e FMA7 apresentaram valores de CI_{50} mais elevados, logo menor actividade anti-radicalar, o que também seria de prever pela presença de apenas um grupo hidroxilo na posição C-3 da sua estrutura química.

Tabela I – Valores de CI_{50} obtidos através do método de descoloração do DPPH, para os diferentes compostos testados e sua comparação com dois anti-oxidantes tradicionais.

Composto	CI_{50} (μ M)
FMA4	19,75
FMA5	2,5
FMA7	20,4
FMA8	3,9
Trolox	9
α -tocoferol	9,6

Adicionaram-se diferentes concentrações de cada composto a uma solução etanólica de DPPH cuja descoloração foi lida espectrofotometricamente a 517nm, após 40 minutos. Os resultados foram expressos como a percentagem de descoloração em relação a um controlo positivo contendo apenas uma solução etanólica de DPPH. Todos os compostos apresentam valores de CI_{50} da ordem μ M, indicativos de elevada actividade anti-radicalar. Esta actividade é maior para os compostos FMA5 e FMA8.

3.2 Avaliação da citotoxicidade dos compostos

Os valores de CI_{50} acima determinados foram tomados em consideração na avaliação da citotoxicidade dos novos compostos. Tendo em consideração a eventual metabolização dos compostos *in vivo*, escolheu-se testar os mesmos para uma concentração por excesso (cinco vezes o CI_{50}). A viabilidade celular foi determinada em fibroblastos pertencentes à linha L929. Foram utilizados dois métodos distintos: o teste de redução do MTT, que reflecte a capacidade redutora das células, e o teste de libertação da LDH, relacionado com a integridade da membrana plasmática.

Os resultados representados na figura 7 permitem observar que nenhum dos compostos provocou uma diminuição significativa da actividade redutora das células,

indicando que a maquinaria enzimática responsável pelos processos metabólicos de oxirredução não foi afectada. De igual modo, nenhum dos compostos conduziu ao aumento da enzima lactato desidrogenase no meio extracelular, revelando assim as boas condições da membrana plasmática a nível da sua integridade (figura 8).

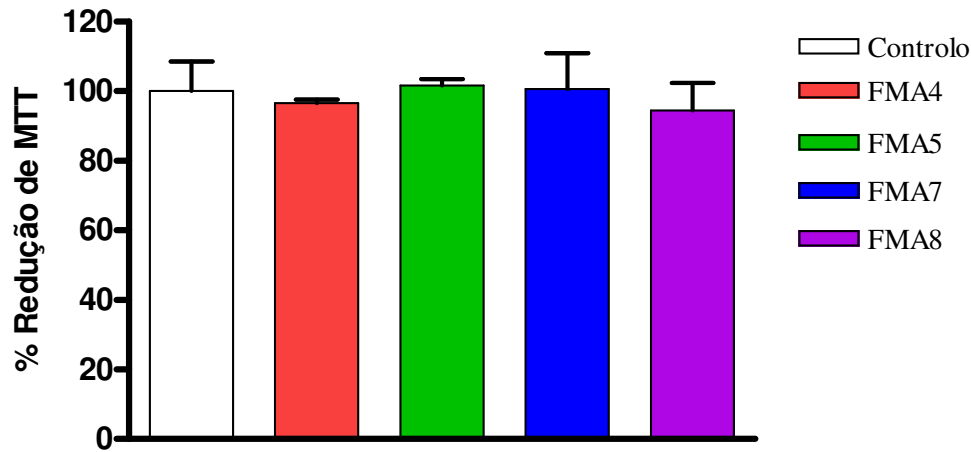


Figura 7 – Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT. Os fibroblastos, à densidade de 5×10^5 células/ml, foram incubados com os compostos (a uma concentração $5 \times \text{CI}_{50}$) “overnight”, após o que se adicionou o MTT. A percentagem de viabilidade celular foi calculada relacionando os valores de absorvância obtidos a 570nm para cada amostra, com um controlo contendo apenas as células expostas a 1% de etanol. Cada coluna representa a média \pm erro padrão, considerando os resultados obtidos para pelo menos 3 experiências independentes.

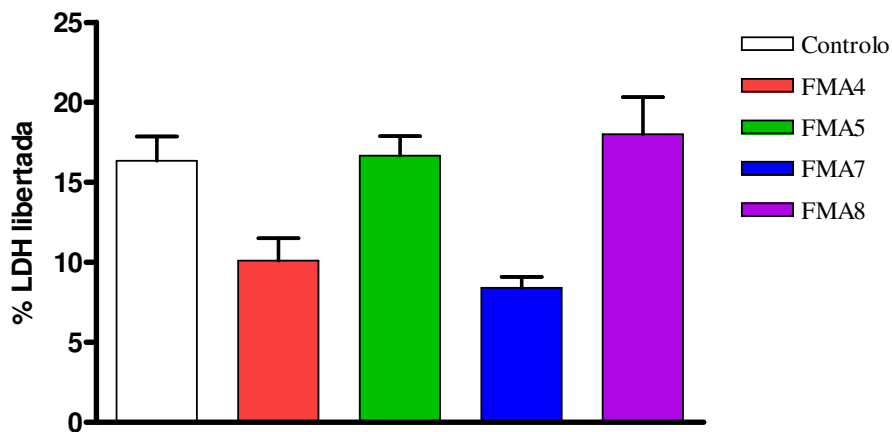


Figura 8 – Avaliação da integridade membrana através da medição da LDH libertada para o meio extracelular. As condições de incubação, assim como as concentrações dos compostos testadas, foram as mesmas que foram utilizadas para a realização do teste de redução do MTT. A percentagem de LDH libertada foi determinada após leitura das amostras a 340nm durante 3 minutos, a 30°C. Esses valores foram depois relacionados com um controlo contendo apenas fibroblastos expostos a 1% de etanol. Para cada barra representa-se a média \pm erro padrão de pelo menos 3 experiências distintas.

Conjuntamente, estes dados revelam que nenhum dos compostos é citotóxico, mesmo para uma concentração cinco vezes superior ao CI_{50} previamente determinado.

3.3 Avaliação do grau de hidrofobicidade dos compostos

A actividade anti-oxidante de um composto encontra-se relacionada, entre outros factores, com a sua capacidade para interagir e penetrar nas membranas lipídicas. Por sua vez, a incorporação de um composto nas membranas celulares é afectada por inúmeros factores, nomeadamente pelas interacções electrostáticas, pela formação de pontes de hidrogénio com os grupos polares dos fosfolípidos, pelas interacções hidrofóbicas com as cadeias de ácidos gordos e igualmente pela geometria molecular dos fosfolípidos e dos compostos (Saija *et al.*, 1995). No sentido de poder vir a relacionar os efeitos dos compostos com estas características, foram utilizados dois métodos complementares para avaliar o grau de hidrofobicidade dos novos compostos em estudo: determinação dos coeficientes de partilha no sistema *n*-octanol/HEPES e cromatografia de camada fina em placas de sílica.

Previamente à determinação dos coeficientes de partilha dos compostos, foi necessário determinar os comprimentos de onda aos quais a sua absorvância é máxima. Para isso, foi varrido o espectro entre 300 e 450nm (resultados não apresentados). Os novos compostos evidenciaram dois picos de absorvância, um situado entre os 300 e os 350nm e outro entre os 400 e os 420nm. Dado que a leitura da absorvância no primeiro pico se torna incompatível com a utilização do método, devido ao facto de o *n*-octanol também possuir um pico de absorvância nessa gama, levando à interferência com os resultados, procurou-se utilizar o segundo pico. Os espectros obtidos indicaram assim a presença do segundo pico por volta dos 400nm para os compostos FMA4 e FMA7 e por volta dos 410nm para os compostos FMA5 e FMA8. As leituras de absorvância efectuadas posteriormente foram realizadas considerando os comprimentos de onda determinados deste modo.

A razão de escolha do sistema *n*-octanol/água para determinação dos coeficientes de partilha relaciona-se com o facto de se encontrar publicada uma grande quantidade de estudos sobre a relação entre o *n*-octanol e a partição de compostos, costumando existir uma boa correlação de tais coeficientes de partilha com a resposta biológica (Bhat *et al.*,

2002; Rogachev *et al.*, 2003). Neste trabalho, utilizou-se HEPES, em vez de apenas água, somente com o objectivo de estabilizar o pH, uma vez que as variações de pH podem afectar a hidrofobicidade (Areias *et al.*, 2001). Para além da informação fornecida pelos coeficientes de partilha, foi também utilizada a cromatografia em camada fina como um processo de avaliar a interacção dos compostos com as membranas biológicas. De facto, no sistema *n*-octanol/HEPES, os factores preponderantes são as interacções hidrofóbicas, ou forças de “van der Waals”, entre a longa cadeia hidrofóbica do *n*-octanol e os compostos, enquanto na cromatografia de camada fina em placas de sílica, os factores dominantes são as pontes de hidrogénio formadas entre a sílica e os compostos. Assim, comparando os dois diferentes sistemas químicos, provavelmente a avaliação da permeabilidade destes compostos nas membranas celulares será a mais realista. Os resultados obtidos para os dois sistemas encontram-se representados na tabela II.

Tabela II – Valores dos coeficientes de partilha e dos factores de retardação para os novos compostos.

Composto	Coefficientes de partilha	Factores de Retardação
FMA4	1,65 ± 0,13	0,67
FMA5	1,31 ± 0,13	0,40
FMA7	1,42 ± 0,03	0,58
FMA8	0,68 ± 0,03	0,36

Os coeficientes de partilha foram determinados num sistema *n*-octanol/HEPES e os factores de retardação foram determinados através de cromatografia de camada fina, em placas de sílica, utilizando um sistema de eluição composto por clorofórmio: acetato de etilo: ácido acético (16:8:1). Os compostos foram testados a uma concentração de 20µM. Os compostos FMA4 e FMA7 apresentam maior lipofilicidade que o FMA5 e o FMA8. Os resultados dos coeficientes de partilha correspondem à média ± erro padrão de duplicados de pelo menos 3 experiências distintas.

Como se pode observar, a capacidade dos compostos testados para penetrarem as membranas biológicas varia de acordo com a mesma ordem, independentemente do sistema usado para avaliação da sua lipofilicidade. Deste modo, o FMA4 é aquele que possui uma maior afinidade para formar interacções hidrofóbicas com o *n*-octanol (maior coeficiente de partilha). Por outro lado, apresenta uma menor afinidade para

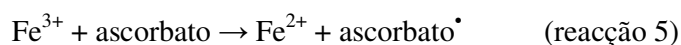
formar pontes de hidrogénio com a sílica (factor de retardação mais elevado). Estes valores, em conjunto, indicam que este composto terá uma maior facilidade em atravessar as membranas lipídicas. A lipossolubilidade dos compostos varia assim, por ordem decrescente: FMA4 > FMA7 > FMA5 > FMA8. Os compostos apresentam valores de coeficientes de partilha e factores de retardação semelhantes a alguns flavonóides utilizados tradicionalmente como anti-oxidantes, tais como o eriodictiol ou a quercetina (Areias *et al.*, 2001) para os quais foram encontrados valores na ordem dos 1.65 ± 0.05 e 2.04 ± 0.04 , respectivamente.

Observando as estruturas químicas dos compostos (figura 4), a maior lipossolubilidade de FMA4 e FMA7 parece estar associada à presença de apenas um grupo hidroxilo na posição C-3, enquanto que os outros dois compostos (FMA5 e FMA8) possuem dois grupos hidroxilo, nas posições C-3 e C-4. Sendo assim, estes resultados indicam que a presença destes grupos hidroxilo, apesar de conferirem uma maior actividade anti-radicalar aos compostos, têm a desvantagem de dificultar o seu acesso ao interior da célula, levando desse modo a uma eventual diminuição da sua eficácia como anti-oxidantes a nível intracelular. Esta aparente discrepância pode vir a ser elucidada nos estudos subsequentes.

3.4. Protecção dos compostos na peroxidação lipídica

Os estudos do efeito protector dos compostos na peroxidação lipídica permitem analisar a sua actividade anti-oxidante secundária, uma vez que se vai observar a capacidade do composto para complexar o ião metálico utilizado para induzir peroxidação (neste caso, o ferro), impedindo dessa forma que esse ião vá peroxidar a membrana.

De modo a induzir a oxidação dos lípidos membranares foi utilizado o par ascorbato-ferro(II), que é frequentemente utilizado para este tipo de estudos (Katayama *et al.*, 1989; Rego *et al.*, 1998). O ascorbato comporta-se como um pró-oxidante, uma vez que a sua função é a de reduzir o ferro, numa reacção permitida pelos seus potenciais de redução, de acordo com a reacção 5:



O Fe^{2+} resultante desta reacção é depois canalizado para a reacção de Fenton, levando à formação de radicais hidroxilo (Shapiro e Saliou, 2001; Halliwell e Gutteridge, 1999). A mistura ascorbato-ferro estimula os danos causados por radicais livres no DNA, lípidos e proteínas *in vitro*. Por vezes surge a questão sobre se o efeito pró-oxidante do ascorbato será fisiologicamente relevante *in vivo*, de modo a determinar o conteúdo adequado de ascorbato na dieta humana e a necessidade ou não de existir uma suplementação. Até ao momento não existem indícios que revelem toxicidade para doses elevadas de ascorbato em pessoas saudáveis, mas essas doses não são aconselháveis (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os resultados da figura 9 mostram que o par ascorbato 2mM / Fe^{2+} 400 μM induz níveis de peroxidação lipídica superiores aos obtidos para outros pares oxidantes testados (parte A). Ao mesmo tempo, não compromete significativamente a viabilidade celular avaliada pela redução do MTT (parte B), sendo o decréscimo na viabilidade celular de apenas 19.85%. Por estas razões, esta combinação foi a escolhida para os estudos subsequentes.

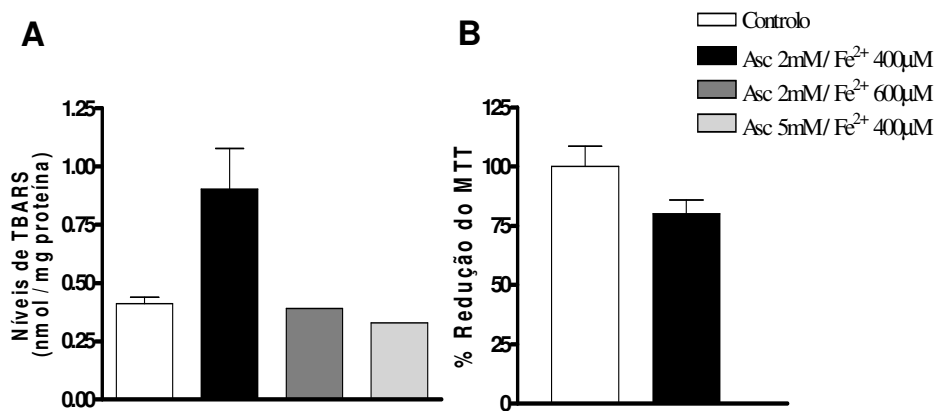


Figura 9 – Escolha do melhor par oxidante para induzir peroxidação lipídica. **A:** Os fibroblastos foram incubados na presença de diferentes concentrações de ascorbato e ferro. A produção de MDA foi determinada pelo método de TBARS com correcção para a quantidade de proteína utilizada em cada caso; **B:** Alterações da viabilidade celular induzidas pelo par ascorbato 2mM / Fe^{2+} 400 μM . Para cada coluna encontra-se representada a média \pm erro padrão de pelo menos 3 experiências independentes.

Os resultados obtidos com os compostos na protecção da peroxidação induzida pelo par ascorbato-ferro estão representados na figura 10 e demonstram que existe uma

protecção elevada exercida pelos novos compostos, sendo esta maior para o FMA4 e FMA7. Em nenhum dos casos se verificou diferenças significativas entre as duas concentrações testadas, CI_{50} e $5xCI_{50}$, tal como evidenciado para o caso do Trolox e do FMA4. O FMA4 foi no entanto o único composto a apresentar diferenças estatisticamente significativas em relação ao Trolox. A razão deste perfil de protecção verificado pode ser explicado pelo relativamente baixo nível de oxidação verificado (2.19 vezes em relação ao controlo, figura 9A) com o par oxidante.

Na verdade, os fibroblastos são células que, pela sua natureza indiferenciada, são difíceis de oxidar. As células PC12, por seu turno, têm sido bons modelos para estudos deste tipo (Kruman *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 1999). Os resultados na figura 11 mostram inequivocamente níveis superiores de peroxidação lipídica (aumento de 7.43 vezes em relação ao controlo), o que facilita a observação de uma possível protecção por parte dos compostos em estudo.

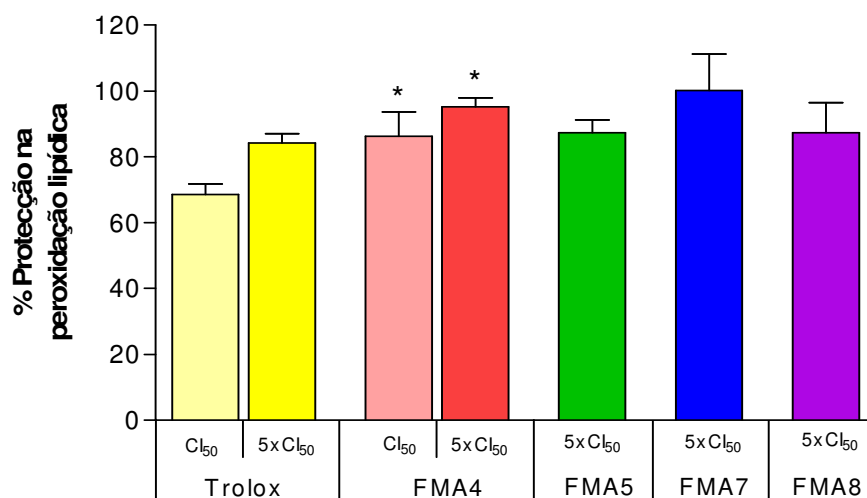


Figura 10 – Protecção dos novos compostos na peroxidação lipídica. Os compostos (às concentrações do CI_{50} e $5xCI_{50}$, foram adicionados simultaneamente com o par oxidante ascorbato 2mM/ Fe^{2+} 400 μ M, a fibroblastos incubados à densidade de 1.8×10^6 células/ml. A produção de MDA foi determinada pelo método de TBARS e corrigida para a quantidade de proteína em cada caso. Para cada coluna representa-se a média \pm erro padrão para pelo menos 3 experiências distintas. * $p < 0.05$ (comparativamente à respectiva concentração de Trolox).

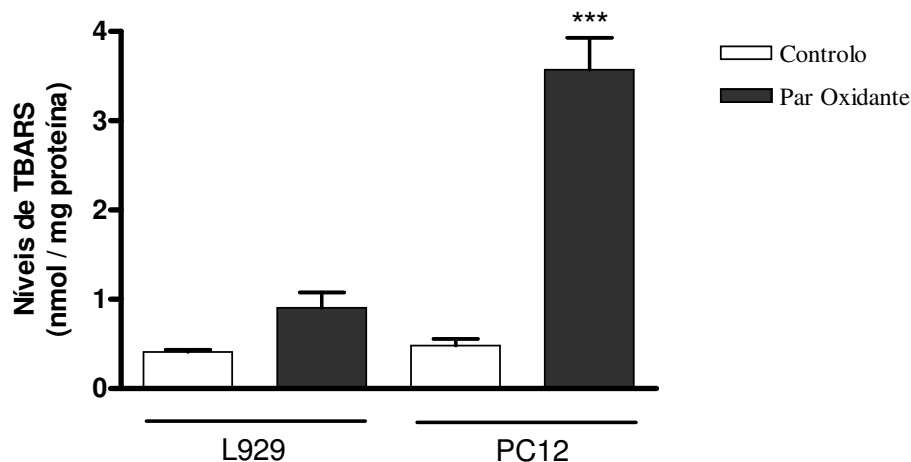


Figura 11 – Diferenças entre os níveis de peroxidação lipídica em células L929 e em células PC12. O par oxidante que apresentou melhores resultados na oxidação dos lípidos membranares nas células L929 foi o ascorbato 2mM/ Fe^{2+} 400 μM , enquanto que para as PC12 o par ascorbato 2mM/ Fe^{2+} 100 μM revelou melhores resultados. Para cada coluna representa-se a média \pm erro padrão de pelo menos 6 experiências distintas. A análise estatística consistiu na realização do teste de *t*-student. *** $p < 0.001$.

Assim, a capacidade dos compostos para reverter a peroxidação lipídica induzida pelo par oxidante ascorbato 2mM / Fe^{2+} 100 μM , avaliada em células PC12 (figura 12), mostra que a incubação com os compostos FMA4 e FMA7 numa concentração igual ao CI_{50} conduz a uma protecção de $46.96 \pm 9.05\%$, no caso do FMA4, e $41.67 \pm 4.72\%$ para o FMA7. Com a incubação dos compostos numa concentração duas vezes superior ao CI_{50} não se verificaram diferenças estatisticamente significativas dos níveis de protecção ($50.05 \pm 6.26\%$ para o FMA4 e $53.31 \pm 0.93\%$ para o FMA7) em relação ao CI_{50} . Em qualquer dos casos, pode afirmar-se que os novos compostos possuem uma capacidade bastante elevada para reverter os danos observados nos lípidos membranares induzidos pelo par oxidante.

Como meio de comparação com os compostos, foram utilizados o α -tocoferol e o seu análogo hidrossolúvel Trolox. O α -tocoferol corresponde à forma da vitamina E mais eficaz em animais. Sabe-se que os tocoferóis inibem a peroxidação lipídica em grande parte por impedirem que os radicais peróxido lipídicos (LO_2^{\bullet}) reajam com as cadeias dos ácidos gordos ou com as proteínas membranares (Halliwell e Gutteridge, 1999). Em termos comparativos, e analisando a figura 12, verifica-se que os novos

compostos possuem um efeito protector superior ao do Trolox ($39.99 \pm 4.65\%$ para o CI_{50} e $42.76 \pm 5.80\%$ para $2xCI_{50}$), mas inferior ao observado para o α -tocoferol ($57.86 \pm 3.39\%$ para o CI_{50} e $68.30 \pm 4.73\%$ para $2xCI_{50}$).

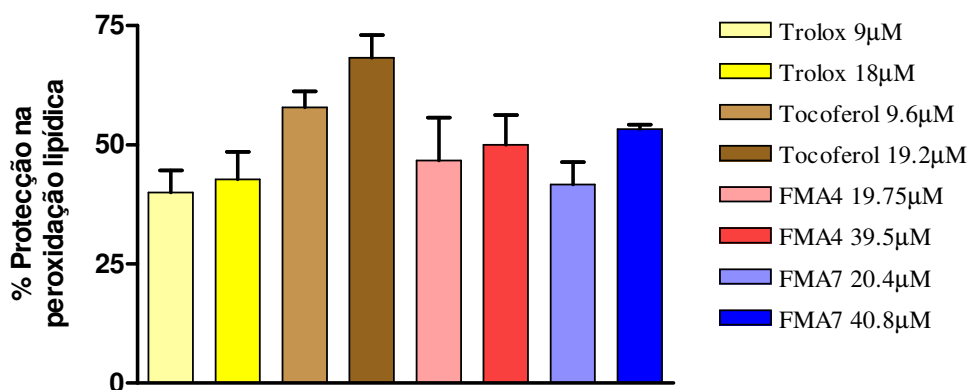


Figura 12 – Protecção dos compostos na peroxidação lipídica em células PC12 expostas ao par oxidante ascorbato $2mM/Fe^{2+} 100\mu M$. Os compostos foram adicionados a uma concentração igual ou duas vezes superior ao CI_{50} , 3 horas antes da incubação com o par oxidante. A produção de MDA foi determinada pelo método de TBARS e normalizada para a quantidade de proteína em cada caso. Para cada coluna está representada a média \pm erro padrão para pelo menos 3 experiências independentes, realizadas em duplicado.

Uma vez que a peroxidação lipídica ocorre maioritariamente devido aos radicais livres formados intracelularmente (Spiteller, 2001b), quanto maior for a facilidade dos compostos para penetrar a membrana lipídica, maior será a sua capacidade para impedir que esses radicais conduzam à peroxidação dos lípidos membranares. De facto, os resultados obtidos através do método de TBARS parecem correlacionar-se com a lipossolubilidade dos compostos testados.

Analisando os resultados das figuras 10 e 12 verifica-se que os compostos FMA4 e FMA7 apresentaram uma protecção elevada na peroxidação lipídica, apesar de não terem sido aqueles que demonstraram uma maior actividade anti-radicalar (tabela I). Esta aparente discrepância de resultados pode ser explicada pela maior lipofilicidade dos compostos FMA4 e FMA7 em relação ao FMA5 e ao FMA8, evidenciada pelos seus coeficientes de partilha (tabela II), e que indica a sua maior capacidade para

atravessar a membrana lipídica e desse modo impedir a formação de radicais intracelulares.

Nenadis *et al.* (2003), utilizando um sistema octanol/água, indicaram os valores de 0.49 ± 0.02 e 6.76 ± 0.39 como coeficientes de partilha para o Trolox e o α -tocoferol, respectivamente. Sendo assim, verifica-se que o composto com menor capacidade para atravessar a membrana lipídica (Trolox) é aquele que apresenta menor protecção a nível da peroxidação lipídica. Por outro lado, o α -tocoferol, que possui uma maior facilidade em penetrar a membrana lipídica, foi o composto com maior protecção na peroxidação lipídica. Os compostos FMA4 e FMA7, que possuem uma lipossolubilidade intermédia entre os dois anti-oxidantes naturais testados, apresentam de facto uma protecção intermédia.

3.5. Activação da caspase-3 induzida por staurosporina e apoptose

Os resultados já apresentados e outros previamente obtidos (Silva *et al.*, 2003) revelaram que os novos compostos não são tóxicos e poderão ser bons protectores de fenómenos de peroxidação lipídica. Com este trabalho pretendeu-se também determinar a sua capacidade para actuarem intracelularmente e desse modo exercerem protecção a nível dos fenómenos apoptóticos.

A caspase-3 é uma caspase que desempenha um papel fundamental na execução do programa apoptótico, uma vez que participa na clivagem ou degradação de inúmeros substratos importantes e eventualmente na activação de outras caspases, contribuindo dessa forma para o aparecimento do fenótipo apoptótico (Boulares *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 2001). De acordo com estudos anteriores, a activação desta caspase possui implicações em diversas patologias, tais como doença de Alzheimer (Jang *et al.*, 2004), doença de Parkinson (Viswanath *et al.*, 2001), isquémia cerebral (Chen *et al.*, 1998), entre outras. Por seu turno, a staurosporina (STS) é um alcalóide isolado a partir da bactéria *Streptomyces staurospores* que, por parecer activar mecanismos de morte celular comuns a todas as células, é utilizado de uma forma generalizada como indutor da apoptose (Kruman *et al.*, 1998). As vias através das quais realiza essa indução não foram ainda completamente esclarecidas (Belmokhtar *et al.*, 2001). No entanto, foi já demonstrado que a staurosporina penetra facilmente a membrana celular e é um potente inibidor da proteína cinase C e de outras cinases proteicas, quando usada em

concentrações mais elevadas (Ruegg e Burgess, 1989) além de levar, à libertação de citocromo *c*, activação de caspases e acumulação de ROS mitocondrial (Kruman *et al.*, 1998; Krohn *et al.*, 1998).

A indução da caspase-3 foi primeiro testada com o modelo celular L929. Os resultados obtidos (figura 13) mostram no entanto que mesmo reduzindo a concentração de soro de 10% para 4% (Stefanis *et al.*, 1996) não há indução significativa da actividade da caspase-3 para as concentrações de STS de 300 e 400nM.

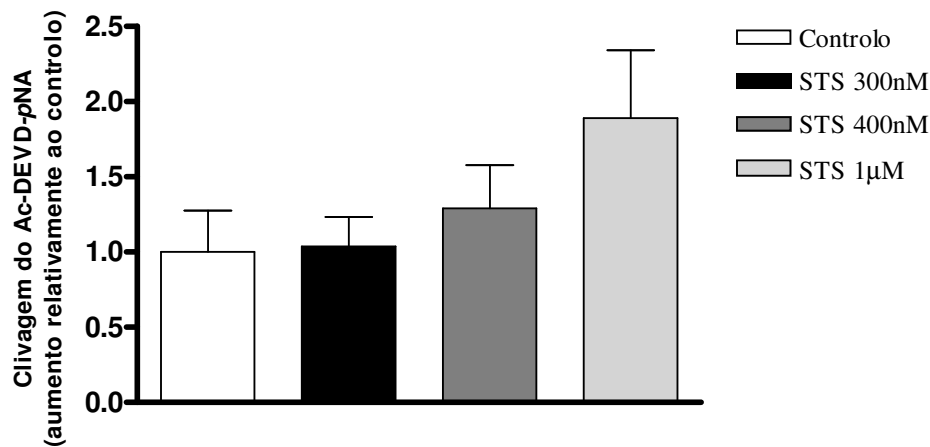


Figura 13 – Avaliação da actividade da caspase-3 em fibroblastos da linha celular L929 através da clivagem do substrato colorimétrico Ac-DEVD-pNA, na presença de meio de cultura contendo apenas 4% soro. A incubação com staurosporina decorreu durante 6 horas. Para cada coluna representa-se a média \pm erro padrão de pelo menos 3 experiências distintas. A análise estatística revelou não haver diferenças significativas quando relacionadas as diferentes concentrações de staurosporina com a condição controlo.

Na presença de 1µM de STS, a actividade da enzima aumenta 1.89 ± 0.45 vezes. No entanto, esta concentração de STS revelou-se deletéria para as células, como mostram os resultados de viabilidade celular avaliada pela libertação de LDH, manifestamente afectada para concentrações superiores a 300nM (figura 14).

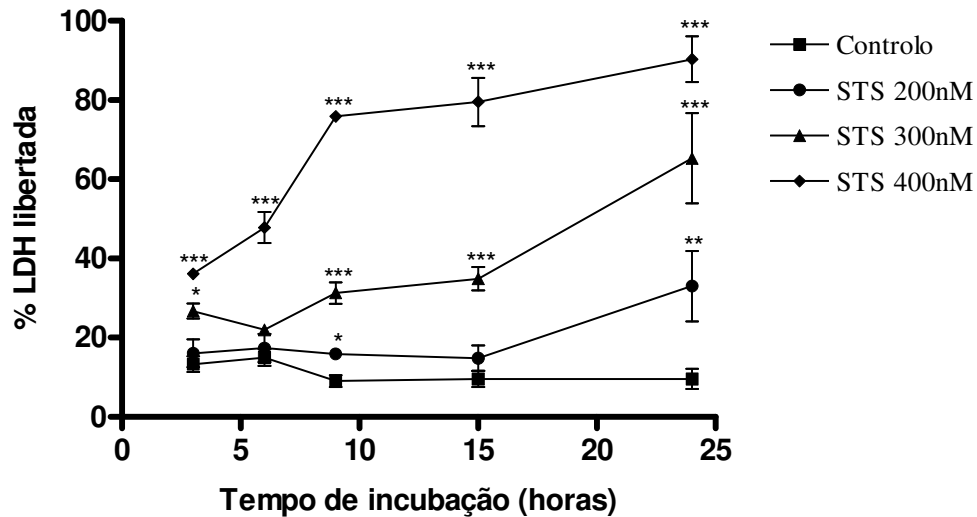


Figura 14 – Avaliação da integridade membranar dos fibroblastos na presença do estímulo apoptótico. As células foram incubadas com staurosporina 200, 300 e 400nM e a viabilidade celular determinada através da libertação de LDH durante 24 horas. As células controlo não foram submetidas ao estímulo apoptótico. A % de LDH libertada para o meio extracelular encontra-se representada como a média \pm erro padrão de pelo menos 3 experiências independentes, realizadas em duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em comparação com o respectivo controlo.

Os resultados obtidos com os marcadores fluorescentes Hoechst 33342 e iodeto de propídio corroboram a falta de resposta à staurosporina (figura 15). O marcador Hoechst penetra nas células indiscriminadamente e marca os seus núcleos com uma cor azul, sendo as células classificadas de acordo com o grau de condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Por outro lado, as células são impermeáveis ao iodeto de propídio, que marca (com cor vermelha) apenas as células cuja membrana se encontre danificada. As células que se encontrem marcadas com iodeto de propídio são consideradas como necróticas (Liu *et al.*, 2003).

Na verdade, a incubação na presença de STS não induz alterações significativas relativamente ao controlo, observando-se apenas um pequeno número de células necróticas (figura 15 (E-H) – setas brancas). Todas as restantes mantinham o aspecto de células viáveis, de acordo com resultados semelhantes de outros autores (Humphreys e Wilson, 1999) que concluem que a morte induzida por STS nesta linha celular poderá ocorrer por um processo tão rápido que inviabilize o seguimento da cascata intracelular de eventos, incluindo a actividade da caspase-3.

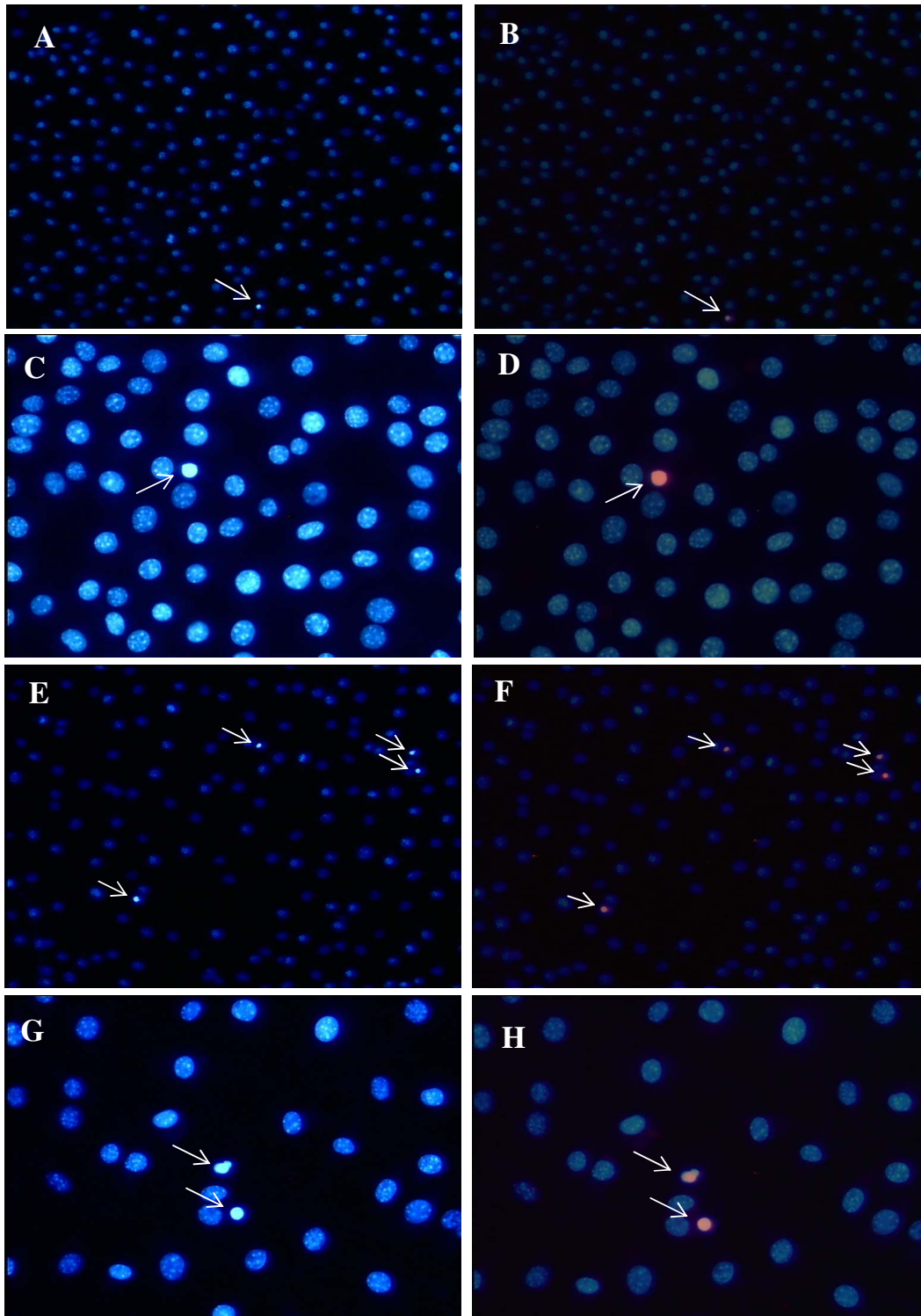


Figura 15 – Análise da condensação da cromatina em fibroblastos da linha celular L929. Após adesão das células a lamelas, os fibroblastos foram sujeitos a um estímulo com staurosporina 300nM, durante 6 horas. De seguida, as células foram marcadas com os marcadores fluorescentes Hoechst 33342 e iodeto de propídio, de modo a determinar a sua viabilidade. A-D: controlo; E-H: STS 300nM; A, C, E e G: células marcadas com o marcador Hoechst; B, D, F e H: sobreposição de ambos os marcadores (Hoechst e iodeto de propídio). As setas indicam células necróticas. Não foram encontradas quaisquer células em estado de apoptose.

3.5.1. Efeito protector dos compostos nas vias apoptóticas

A indução da activação da caspase-3 foi realizada com sucesso, utilizando o modelo celular PC12 nas condições optimizadas por Oliveira *et al.* (2003). Nesta fase, apenas foram testados os compostos FMA4 e FMA7. Apesar de possuírem uma menor actividade anti-radicalar que os compostos FMA5 e FMA8, possuem uma maior lipofilicidade, o que sugere que possam actuar de uma forma mais eficaz a nível intracelular.

Como se observa na figura 16A, a incubação com staurosporina 1 μ M conduz a um aumento significativo da actividade da caspase-3 de 3.63 ± 0.57 vezes, $p < 0.001$, sem afectar significativamente a viabilidade neste modelo celular (resultados não apresentados).

Na presença dos compostos FMA4 e FMA7 verificou-se redução da actividade da enzima induzida pela staurosporina. Para ambos os compostos, os níveis de protecção foram ligeiramente superiores aos evidenciados pelo α -tocoferol, o que revela uma maior capacidade dos novos compostos para actuarem a nível das vias intracelulares relacionadas com a indução da apoptose, impedindo a sua indução. No caso do FMA7, o decréscimo é estatisticamente significativo tanto para o valor de CI_{50} (87.17%) como para o valor de $2xCI_{50}$ (86.87%). Em relação ao FMA4, a protecção é de 89.62% e 74.61% para o CI_{50} e $2xCI_{50}$, respectivamente. Conclui-se assim que ambos os compostos são igualmente efectivos em proteger a actividade da caspase, induzida por STS, a concentrações na ordem dos 20 e 40 μ M, sendo essa protecção superior à conseguida com o α -tocoferol.

No entanto, e como se observa na figura 16B esse efeito protector exige pré-incubação, deixando de se verificar se a incubação com os compostos e a STS for simultânea. Este facto pode ser explicado através do seu perfil de lipofilicidade (ver tabela II). O seu carácter lipofílico não é suficientemente elevado, sendo necessária pré-incubação de modo a que estes possam atravessar devidamente a membrana lipídica e actuar a nível intracelular, prevenindo assim os efeitos deletérios do estímulo apoptótico.

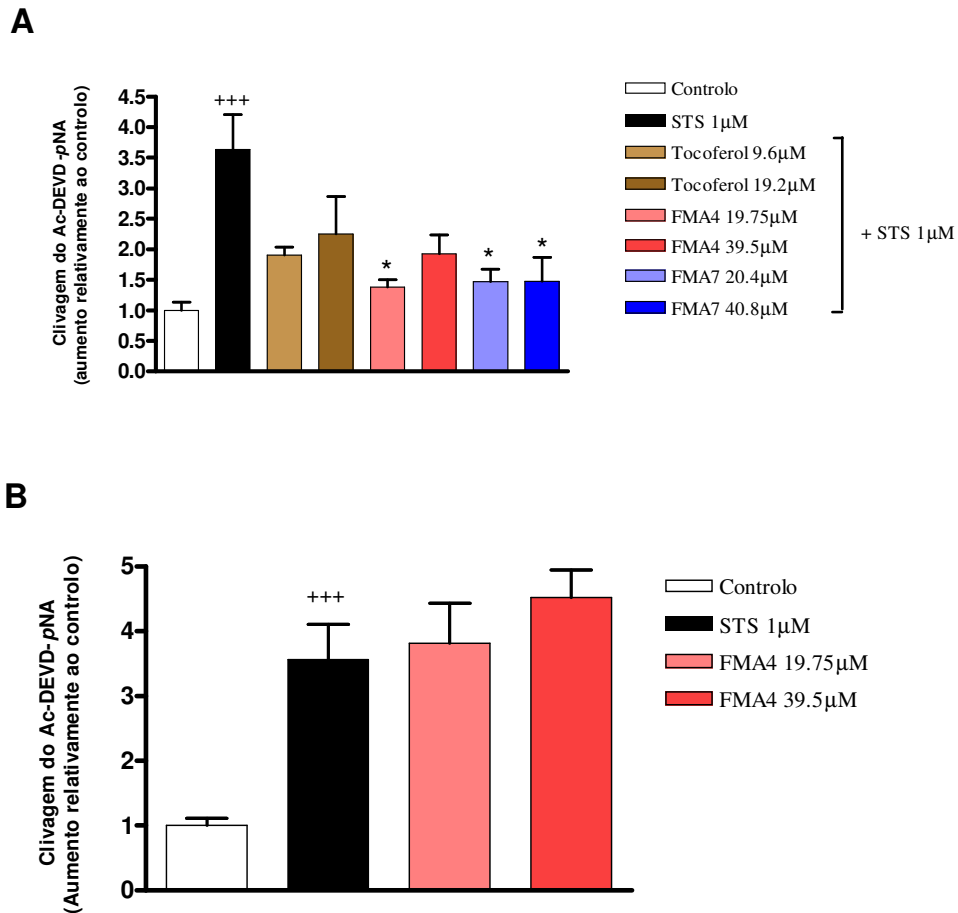


Figura 16 – Avaliação da actividade da caspase-3 em células PC12. Os resultados estão expressos como o aumento da clivagem do substrato colorimétrico Ac-DEVD-pNA, em relação a um controlo contendo apenas células. As células foram incubadas com STS 1µM, durante 5 horas, em meio de cultura com apenas 4% de soro. **A:** As células foram pré-incubadas na presença dos compostos durante um período de 3 horas antes da adição da staurosporina. Nestas condições, os compostos levaram à diminuição da actividade da caspase-3, superior à verificada com o α -tocoferol. **B:** Os compostos foram incubados simultaneamente com a staurosporina, não revelando protecção. Para cada coluna representa-se a média \pm erro padrão de pelo menos 3 experiências independentes. A análise estatística foi efectuada através do teste de *t*-student. * $p < 0.05$, em comparação com a condição staurosporina 1µM. +++ $p < 0.001$, em comparação com o controlo contendo apenas células.

Foi analisada, através de microscopia de fluorescência, a capacidade para os novos compostos em estudo protegerem as células dos efeitos deletérios induzidos pela staurosporina. Para tal, as células foram incubadas durante o mesmo período de tempo e

à mesma concentração de staurosporina utilizada para determinar a protecção na actividade da caspase-3 (figura 17).

As células que apresentavam condensação da cromatina e fragmentação nuclear foram consideradas como sendo apoptóticas. As percentagens de células viáveis, células apoptóticas e células necróticas foram determinadas através da contagem de pelo menos 300 células por cada experiência.

Após a exposição das células a staurosporina 1 μ M (figura 17), foi possível observar em média $17.0 \pm 2.5\%$ de células apoptóticas e $11.7 \pm 2.0\%$ de células necróticas. No entanto, a pré-incubação das células com o composto FMA7, para uma concentração igual ao CI_{50} , foi responsável pela redução de células apoptóticas para $14.3 \pm 1.2\%$ e de células necróticas para $4.7 \pm 0.7\%$. Com o aumento da concentração de composto para o dobro não se verificam grandes diferenças na protecção, sendo possível contar $12.0 \pm 1.7\%$ de células apoptóticas e $5.3 \pm 0.9\%$ de células necróticas. Nas células utilizadas como controlo, a percentagem de células apoptóticas e necróticas foi inferior a 2%. Estes resultados, que inequivocamente mostram protecção de morte celular, corroboram a protecção anteriormente demonstrada para a actividade da caspase-3.

A caspase-3 é uma caspase efectora que pode ser proteoliticamente activada através de duas vias: uma mediada por receptores de membrana e outra regulada a nível da mitocôndria. A caspase-8 desempenha um papel fundamental na iniciação da via mediada por receptores de membrana. Após ligação do ligando, os receptores membranares agregam-se e formam complexos que vão recrutar várias moléculas de pró-caspase-8, resultando na posterior activação de outras caspases. Por sua vez, a caspase-9 desempenha um papel importante na via mitocondrial, onde necessita da presença de outras moléculas, tais como a Apaf-1 e o citocromo *c* para a sua activação (Hengartner, 2000).

Demonstrada a capacidade dos novos compostos para reduzir a actividade da caspase-3, torna-se importante saber de que forma essa redução é atingida, ou seja, sobre qual das vias apoptóticas (a iniciada pela caspase-8 ou a mediada pela caspase-9) é que os compostos exercem o seu efeito protector de forma mais acentuada.

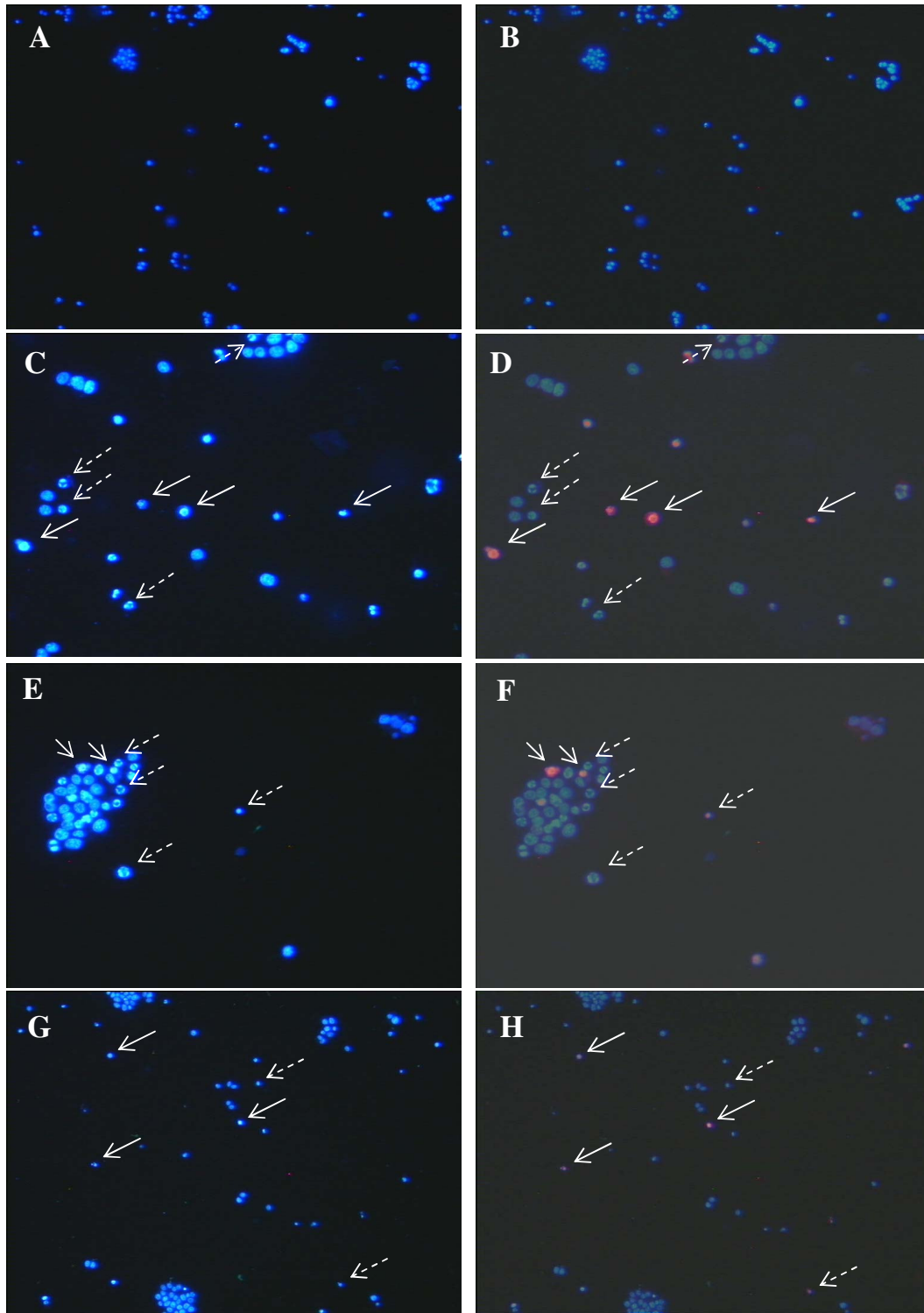


Figura 17 – Análise da condensação da cromatina em células da linha celular PC12. O composto FMA4 foi pré-incubado durante 3 horas, antes da adição de STS 1 μ M, cujo estímulo foi mantido durante 5 horas. A, B: controle; C, D: STS 1 μ M; E, F: FMA7 CI₅₀; G, H: FMA7 2xCI₅₀; A, C, E e G: células marcadas com o marcador Hoechst; B, D, F e H: sobreposição dos marcadores Hoechst e iodeto de propídio. As setas a cheio indicam células necróticas, enquanto que as células a tracejado indicam células em apoptose

A actividade das enzimas aumentou 1.92 ± 0.32 vezes, $p < 0.05$ (caspase-8) e 1.98 ± 0.30 vezes, $p < 0.05$ (caspase-9) (figuras 18 e 19). O efeito dos compostos (figura 18) é indicativo da sua actuação também a nível da via apoptótica mediada por receptores de membrana, uma vez que são capazes de levar à redução da actividade da caspase-8 induzida por staurosporina. Os dois compostos (FMA4 e FMA7) são perfeitamente semelhantes no nível de protecção e as duas concentrações testadas também não revelam qualquer diferença. No entanto, a redução observada na presença dos compostos não é tão pronunciada como no caso do α -tocoferol, em que a clivagem do substrato colorimétrico desce para o nível do controlo contendo apenas células, indicando que o α -tocoferol é eventualmente mais eficaz nessa via.

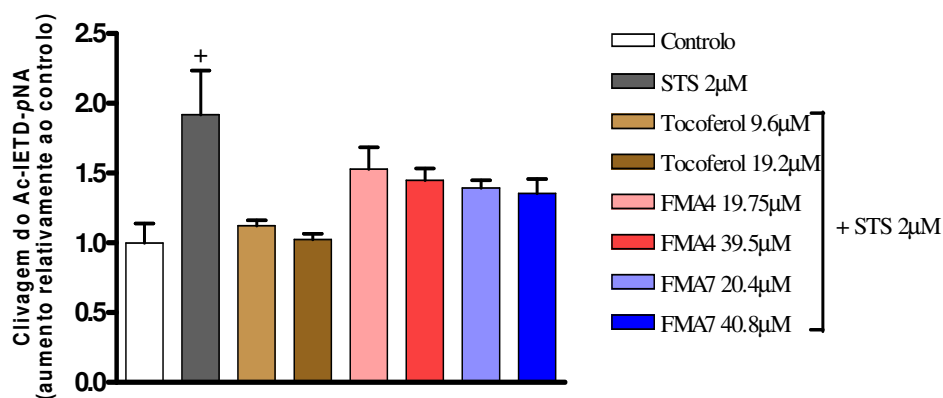


Figura 18 – Avaliação do efeito protector dos compostos na via mediada por receptores de membrana. A actividade da caspase-8 foi induzida através de staurosporina 2µM, durante 5 horas, e os resultados expressos como o aumento da clivagem do substrato colorimétrico Ac-IETD-pNA, em relação a um controlo contendo apenas células. Tanto o FMA4 como o FMA7 (pré-incubados durante 3 horas antes da adição de STS) levam a uma redução da actividade da caspase-8, embora menor que o α -tocoferol. Nenhum dos compostos apresenta diferenças significativas em relação ao controlo contendo staurosporina. Para cada coluna encontra-se representada a média \pm erro padrão. A análise estatística foi efectuada através do teste de *t*-student. ⁺ $p < 0.05$, em comparação com o controlo contendo apenas células.

O aumento da clivagem do substrato colorimétrico Ac-LEHD-pNA, indicativo da actividade da caspase-9, está representado na figura 19, onde é possível observar uma ligeira protecção. Neste caso, a redução da actividade da enzima foi idêntica ao α -tocoferol, responsável por um aumento de cerca de apenas 1.31 vezes para ambas as

concentrações testadas. Estes resultados revelam que tanto os compostos em estudo como o α -tocoferol parecem actuar a nível da via mitocondrial.

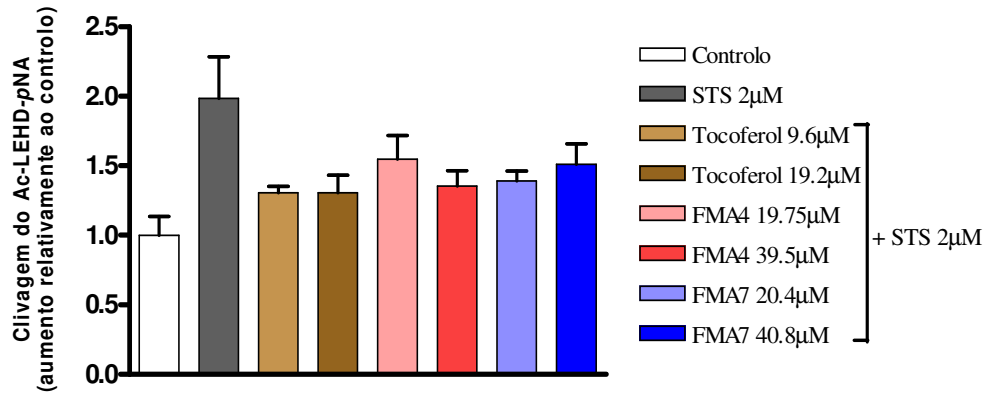


Figura 19 – Avaliação do efeito protector dos compostos na actividade da caspase-9. A actividade da enzima foi induzida por staurosporina 2µM durante 5 horas e os resultados expressos como o aumento da clivagem do substrato colorimétrico Ac-LEHD-pNA, em relação a um controlo contendo apenas células. Os compostos FMA4 e FMA7, pré-incubados durante 3 horas, levaram a uma redução da actividade da caspase-9, semelhante ao α -tocoferol. Nenhum dos compostos apresenta diferenças significativas em relação ao controlo contendo staurosporina. Para cada coluna encontra-se representada a média \pm erro padrão. A análise estatística foi efectuada através do teste de *t*-student. * $p < 0.05$, em comparação com o controlo contendo apenas células.

Utilizando o composto FMA7 como exemplo (figura 20), é possível concluir que estes compostos possuem um efeito protector a nível da apoptose, verificado pelo evidente decréscimo da actividade da caspase-3 induzida por staurosporina. Além disso, é também possível acrescentar que essa protecção é exercida nas duas vias apoptóticas, tanto na via mitocondrial como na via mediada por receptores de membrana, como demonstrado pela diminuição da clivagem dos substratos colorimétricos específicos para as caspases 8 e 9. A protecção exercida pelos compostos nestas duas vias é semelhante, indicando que não existe uma via preferencial para levar à redução final da actividade da caspase-3.

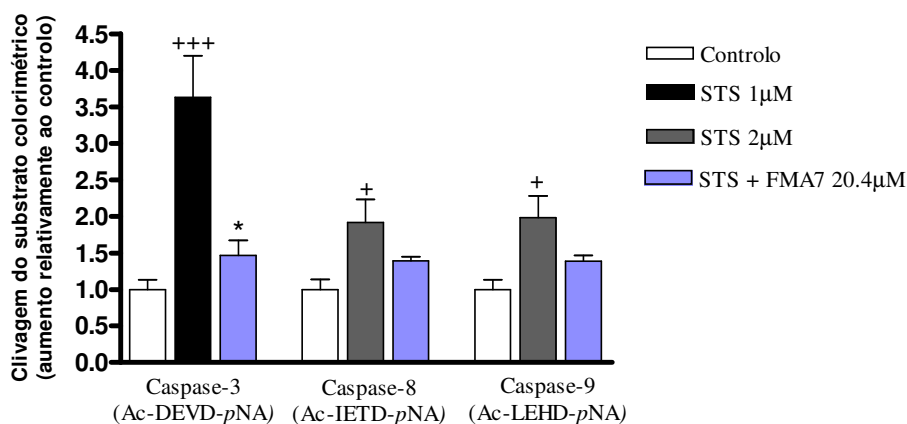


Figura 20 – Protecção nas diferentes vias apoptóticas do composto FMA7. Este composto a uma concentração de 20.4µM protege as células dos efeitos deletérios induzidos pela staurosporina 1µM, quando incubada durante 5 horas. Para cada coluna representa-se a média ± erro padrão. A análise estatística foi efectuada através do teste de *t*-student. * $p < 0.05$, em comparação com a condição staurosporina 1µM. + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$, em comparação com o controlo contendo apenas células.

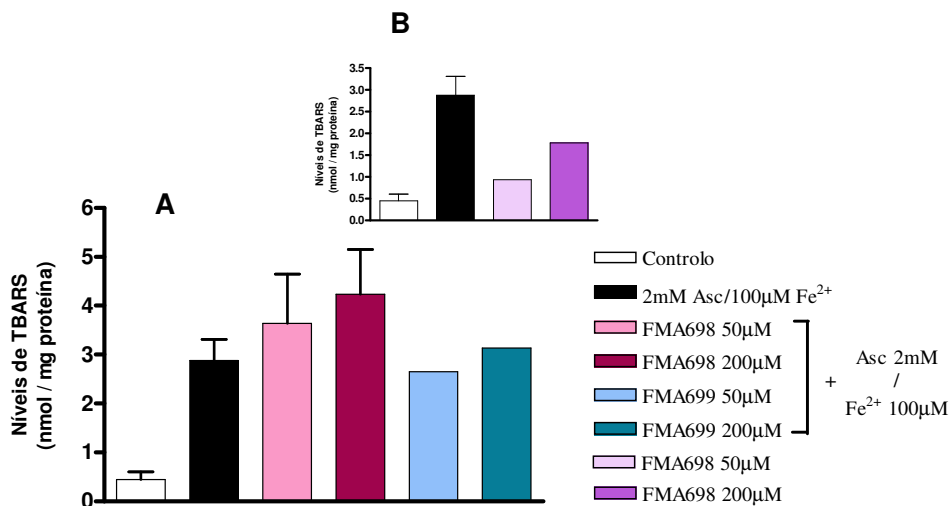
O facto de os níveis de protecção verificados serem maiores para a actividade da caspase-3 do que para as caspases 8 e 9 poderá indicar que a redução final obtida para a caspase-3 pode ser atingida através de outros mecanismos. Um desses mecanismos pode ser a regulação do cálcio intracelular, cuja libertação é também induzida pela própria staurosporina (Kruman *et al.*, 1998). Sendo assim, para a elucidação dos efeitos exercidos pelos compostos nas vias apoptóticas, impõem-se outro tipo de estudos, tais como da regulação da libertação intracelular de cálcio.

3.6. Compostos cíclicos

Um dos objectivos do trabalho prende-se com a eventual alteração da estrutura química dos compostos, no sentido de otimizar o seu potencial, nomeadamente como protectores de stresse oxidativo. A ciclização das suas estruturas fazia prever a obtenção de compostos mais estáveis e com maior actividade anti-oxidante. Numa fase inicial

foram testados os compostos FMA698 e FMA699 (estruturas cíclicas correspondentes aos compostos FMA4 e FMA7, respectivamente).

Os resultados na figura 21A mostram que a incubação com os compostos cíclicos na presença do par oxidante provoca um aumento dos níveis de TBARS, em vez de levar à sua diminuição, o que significa um efeito pró-oxidante em vez de anti-oxidante.



Além disso, verificou-se que os níveis de peroxidação lipídica aumentaram, mesmo quando as células foram incubadas apenas na presença de um desses novos compostos (figura 21B). Estes resultados indicam que os compostos, por si só, são capazes de remover iões hidrogénio directamente aos radicais livres, sendo que para uma concentração relativamente baixa de composto (200µM) os níveis de peroxidação lipídica foram aumentados para aproximadamente metade dos níveis induzidos pelo par oxidante ascorbato-ferro, que actua de uma forma indirecta, uma vez que primeiro o ascorbato reduz o ferro, e só depois este é que leva à formação de radicais livres. Sendo

assim, pode-se afirmar que os compostos de cadeia cíclica possuem um ligeiro efeito pró-oxidante.

A ausência de actividade anti-oxidante por parte dos compostos de estrutura cíclica foi confirmada através do teste de descoloração do DPPH, que por sua vez corrobora os dados paralelamente obtidos por estudos de voltametria cíclica (Areias *et al.*, 2004).

Tal como se pode verificar na tabela III, os compostos cíclicos revelaram uma ausência de actividade anti-radicalar, visto que mesmo quando incubados a uma concentração de 500 μ M, não foram capazes de levar à redução de 50% do radical DPPH. De facto, a descoloração do radical DPPH foi praticamente nula para todos os compostos, à excepção do FMA676 que levou a uma diminuição de aproximadamente 29% para a concentração de 500 μ M.

Tabela III – Valores de CI_{50} obtidos através do método de descoloração do DPPH, para os compostos cíclicos testados.

Composto	CI_{50} (μ M)
FMA523	> 500
FMA676	> 500
FMA698	> 500
FMA699	> 500
FMA705	> 500

Foram adicionadas diferentes concentrações de cada composto a uma solução etanólica de DPPH e a descoloração do DPPH foi lida espectrofotometricamente a 517nm, após 40 minutos. Os resultados foram expressos como a percentagem de descoloração de DPPH, em relação a um controlo positivo contendo apenas uma solução etanólica de DPPH.

Os altos potenciais de oxidação-redução determinados posteriormente para estes compostos através de testes de voltametria cíclica (dados gentilmente cedidos pelo Departamento de Química da Universidade do Minho) (Areias *et al.*, 2004) e apresentados na tabela IV, estão de acordo com os resultados pelo teste de DPPH: os compostos que não apresentaram actividade anti-radicalar, apresentaram potenciais redox elevados.

Um composto anti-oxidante deve possuir um grupo com capacidade remotora de electrões, de modo a que quando o composto perde um ião hidrogénio para um radical livre, o electrão que fica desemparelhado na sua estrutura seja logo removido e a molécula estabilizada. Caso contrário, os radicais livres poderiam começar a remover outros iões hidrogénio da molécula, tornando-a bastante instável. O que acontece no caso destes novos compostos é que com a ciclização da sua estrutura, o efeito do grupo dicianoimidazole (grupo remotor que deveria levar à estabilização do grupo hidroxilo na posição C-3), é bastante forte, estabilizando a estrutura e dificultando a doação do ião hidrogénio a partir do grupo hidroxilo. Esta explicação é evidenciada pela análise dos resultados obtidos para o composto FMA676 e a sua forma cíclica FMA705 (tabelas III e IV), onde se verifica a ausência de actividade anti-radicalar até uma concentração de 500 μ M e potenciais de oxidação-redução elevados (0.476V para o FMA676 e 0.760V para o FMA705) (Areias *et al.*, 2004). É importante referir que um composto anti-oxidante deverá ter um potencial redox situado entre os 0.3 e os 0.4V (van Acker *et al.*, 1996).

Tabela IV – Potenciais redox (Eoxi) para os novos compostos em estudo.

Composto	Eoxi (V)	Composto	Eoxi (V)
Trolox	0.170	FMA676	0.476
FMA4	0.381	FMA698	0.732
FMA7	0.399	FMA699	0.800
FMA523	0.698	FMA705	0.760

Os compostos cíclicos (FMA523, FMA676, FMA698, FMA699 e FMA705) apresentam um potencial redox elevado, o que faz prever a sua dificuldade em ceder um ião hidrogénio. Por outro lado, o potencial redox baixo obtido para os compostos de cadeia linear (FMA4 e FMA7) e para o Trolox são indicativos da sua capacidade para actuarem como anti-oxidantes (Areias *et al.*, 2004).

No caso dos compostos FMA698 e FMA699 (estruturas cíclicas dos compostos FMA4 e FMA7, respectivamente), a presença dos grupos metoxiamidina (FMA698) e benzoxiamidina (FMA699) deveriam levar a uma redução dos potenciais redox, uma vez que são grupos dadores, como se verifica no caso dos compostos de cadeia linear. No entanto, com a ciclização das estruturas, o efeito dador desses grupos torna-se irrelevante (os potenciais redox foram de 0.732V para o FMA698 e de 0.800V para o FMA699), continuando o efeito remotor do grupo di-ciano a fazer-se sentir fortemente

(Areias *et al.*, 2004). Essa ausência de efeito dos grupos doadores nos compostos cíclicos é demonstrada pelos dados obtidos para o composto FMA523, que não possui nenhum desses grupos e apresenta igualmente actividade anti-radicalar praticamente nula até uma concentração de 500 μ M e um potencial redox bastante elevado ($E_{oxi} = 0.698V$). Tendo como base os dados apresentados por van Acker *et al.* (1996), podemos considerar estes compostos como neutros, ou seja, não funcionam como anti-oxidantes nem como pró-oxidantes. De acordo com a mesma referência, para se considerar um composto como pró-oxidante, o seu potencial redox deverá situar-se acima dos 0.9V.

3.7. Perspectivas futuras

No que diz respeito aos compostos de cadeia linear, os estudos efectuados neste trabalho deixaram algumas perspectivas para a sua utilização com fins terapêuticos, nomeadamente como anti-oxidantes e protectores de vias apoptóticas. No entanto, podem realizar-se alguns melhoramentos nas suas estruturas químicas que poderão aumentar este potencial. Dados obtidos recentemente indicam que o potencial redox dos compostos contendo dois grupos hidroxilo, um na posição C-3 e outro na posição C-4 (caso do FMA5 e do FMA8), é reduzido para metade, quando comparado com os compostos que possuem apenas um grupo hidroxilo. A inclusão de um terceiro grupo hidroxilo na posição C-5 parece igualmente promissora no aumento do potencial anti-oxidante destes compostos. Além disso, e na continuação destes estudos, pretende-se estudar o efeito protector destes novos compostos e seus derivados a nível dos danos celulares causados no DNA (através da técnica de TUNEL) e nas proteínas (através da quantificação dos grupos carbonilo). A avaliação do efeito protector dos novos compostos na alteração da actividade de enzimas caracteristicamente associadas à alteração das defesas anti-oxidantes naturais, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutatona redutase e a glutatona peroxidase poderá contribuir para a melhor elucidação do potencial anti-oxidante dos novos compostos.

Os efeitos pró-oxidantes das formas cíclicas poderão vir a ser igualmente explorados futuramente. É sabido que alguns fungos e a maioria das células tumorais possuem níveis mais baixos de enzimas anti-oxidantes do que as células normais (Weydert *et al.*, 2003; Oberley e Oberley, 1997; Jamieson *et al.*, 1996), sendo por isso mais susceptíveis de sofrerem morte celular pelos efeitos de um composto com potencial pró-oxidante.

Por outro lado, moléculas como os imidazóis e os fenóis possuem efeitos anti-fúngicos, anti-cancerígenos e mesmo anti-bacterianos bastante conhecidos, estando inclusive algumas dessas moléculas já em uso clínico. Alguns exemplos conhecidos de imidazóis são: o bifonazole, que possui actividade anti-micótica (Menozzi *et al.*, 2004), o cetoconazole, que é um anti-fúngico aprovado pela FDA para utilização como composto activo de um conhecido champô anti-caspa (Parker *et al.*, 2000), e o dacarbazine, que é utilizado na terapia do melanoma maligno (Gogas *et al.*, 2004). Como exemplos de fenóis com uso terapêutico reconhecido temos o timol (Sanchez *et al.*, 2004) e o carvacrol (Nafisi *et al.*, 2004). Uma vez que os imidazóis e os fenóis em separado possuem elevadas actividades anti-fúngicas, anti-cancerígenas e anti-bacterianas, prevê-se que a associação desses dois tipos de moléculas, presente nos compostos estudados, resulte em compostos ainda mais potentes e com maior capacidade para poderem ser utilizados como anti-fúngicos e anti-cancerígenos.

4. Conclusões

A análise dos resultados obtidos ao longo do trabalho desenvolvido permitem concluir que:

- Os compostos de cadeia linear possuem uma actividade anti-radicalar elevada, determinada pelo método de descoloração do radical DPPH. No caso do FMA5 e do FMA8 esta é mais elevada do que para os anti-oxidantes tradicionais α -tocoferol e a sua forma hidrossolúvel Trolox.
- Os compostos de cadeia linear não apresentam toxicidade para as células: nenhum deles causa alterações a nível da actividade redutora das células (MTT) nem levam à perda da integridade membranar (LDH).
- O par oxidante ascorbato / Fe^{2+} foi o escolhido para a indução da peroxidação lipídica nos dois modelos celulares usados: linha celular L929 e células PC12. Além de induzir níveis superiores de produção de TBARS, não compromete irreversivelmente a viabilidade celular.
- Os compostos testados evidenciaram um perfil protector da peroxidação lipídica induzida por este par oxidante para concentrações da ordem do CI_{50} . O efeito protector verificado, nomeadamente para os compostos FMA4 e FMA7, correlaciona-se com a respectiva solubilidade em lípidos. Em células PC12 a capacidade anti-oxidante destes compostos é claramente superior ao Trolox, mas inferior ao α -tocoferol (protecção na peroxidação lipídica induzida pelo par ascorbato/ Fe^{2+} , de cerca de 50%), confirmando a sua capacidade para reverter os danos a nível da membrana plasmática.
- Igualmente relacionado com o seu perfil de lipofilicidade são os resultados de protecção das vias apoptóticas induzidas pela staurosporina. Na verdade o efeito protector dos compostos apenas se verificou quando estes foram pré-incubados durante um período de 3 horas antes da adição de staurosporina. O

período de pré-incubação é necessário para os compostos penetrarem na membrana plasmática e poderem actuar intracelularmente.

- O envolvimento das diferentes vias apoptóticas na morte celular induzida por staurosporina foi avaliada por activação das caspases 3, 8 e 9. Os compostos mais activos, FMA4 e FMA7, revelaram-se especialmente efectivos na reversão da actividade da caspase-3. No entanto para a protecção verificada nesta caspase efectora parece contribuir, ainda que moderadamente, a protecção verificada tanto a nível da via mitocondrial, mediada pela caspase-9, como da via mediada por receptores membranares, iniciada pela caspase-8.
- A protecção a nível da apoptose foi confirmada através de microscopia de fluorescência, utilizando os marcadores Hoechst e iodeto de propídio. Os resultados mostram que, na presença de staurosporina 1 μ M, e após pré-incubação com o composto (FMA7), a uma concentração de 20.4 μ M (CI₅₀), se verifica uma redução de células apoptóticas para 14.3 \pm 1.2% e de células necróticas para 4.7 \pm 0.7%.
- A ciclização das estruturas dos novos compostos fazia prever compostos com uma actividade anti-oxidante superior. No entanto, os compostos cíclicos, FMA698 (forma cíclica de FMA4) e FMA699 (forma cíclica de FMA7) levam a um ligeiro aumento dos níveis de peroxidação lipídica. A ausência de efeito anti-oxidante por parte dos compostos cíclicos ficou adicionalmente demonstrada através da incapacidade para reduzir o radical DPPH até uma concentração de 500 μ M e pelos elevados potenciais de oxidação-redução, determinados por voltametria cíclica.
O potencial terapêutico destes compostos, como agentes pró-oxidantes, continua a ser investigado.

5. Referências bibliográficas

- Areias, F. M., Bettencourt, A. P., Coutinho, O. P., Fernandes, F., Proença, M. F. e Silva, J. P., *Antioxidant Activity of Phenol Incorporated in Nitrogen-Containing Compounds* (2004) - 1st International Congress on Antioxidant Methods, USA - Poster
- Areias, F. M., Rego, C., Oliveira, C. e Seabra, R. M., *Antioxidant Effect of Flavonoids After Ascorbate/Fe²⁺-Induced Oxidative Stress in Cultured Retinal Cells*, *Biochemical Pharmacology*, vol. 62 (2001), pp. 111-118
- Arnao, M., *Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen: Radicals: a Practical Case*, *Trends in Food Science & Technology*, vol. 11 (2002)
- Arrigoni, O. e De Tullio, M. C., *Ascorbic Acid: Much More Than Just an Antioxidant*, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1569, n.º 1-3 (2002), pp. 1-9
- Bastianetto, S. e Quirion, R., *Natural Extracts As Possible Protective Agents of Brain Aging*, *Neurobiology of Aging*, n.º 5687 (2002), pp. 1-7
- Beal, M. F., *Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease*, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 32, n.º 9 (2002), pp. 797-803
- Beckman, K. B. e Ames, B. N., *The Free Radical Theory of Aging Matures*, *Physiol Rev*, vol. 78, n.º 2 (1998), pp. 547-581
- Behl, C., *Alzheimer's Disease and Oxidative Stress: Implications for Novel Therapeutic Approaches*, *Prog. Neurobiol.*, vol. 57, n.º 3 (1999), pp. 301-323
- Behl, C. e Moosmann, B., *Antioxidant Neuroprotection in Alzheimer's Disease As Preventive and Therapeutic Approach*, *Free Radic. Biol Med.*, vol. 33, n.º 2 (2002), pp. 182-191
- Belmokhtar, C. A., Hillion, J. e Ségal-Bendirdjian, E., *Staurosporine Induces Apoptosis Through Both Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms*, *Oncogene*, vol. 20 (2001), pp. 3354-3362
- Berlett, B. S. e Stadtman, E. R., *Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress*, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n.º 33 (1997), pp. 20313-20316
- Bhat, K., Garg, A. e Bock, C., *Calculated Values of the Octanol-Water Partition Coefficient and Aqueous Solubility for Aminoazobenzene Dyes and Related Structures*, *Dyes and Pigments*, vol. 52 (2002), pp. 145-159

- Bonnefont, A. B., Munoz, F. J. e Inestrosa, N. C., *Estrogen Protects Neuronal Cells From the Cytotoxicity Induced by Acetylcholinesterase-Amyloid Complexes*, FEBS Lett., vol. 441, n.º 2 (1998), pp. 220-224
- Boulares, A. H., Yakovlev, A. G., Ivanova, V., Stoica, B. A., Wang, G., Iyer, S. e Smulson, M., *Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis. Caspase 3-Resistant PARP Mutant Increases Rates of Apoptosis in Transfected Cells*, J Biol Chem., vol. 274, n.º 33 (1999), pp. 22932-22940
- Brody, T., Larner, J. e Minneman, K., *Human Pharmacology: Molecular to Clinical*, 3ª edição, (1998), Brody, T., Larner, J. e Minneman, K., Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri
- Cain, K., Bratton, S. B. e Cohen, G. M., *The Apaf-1 Apoptosome: a Large Caspase-Activating Complex*, Biochimie, vol. 84, n.º 2-3 (2002), pp. 203-214
- Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N. e Kroemer, G., *Apoptosis-Inducing Factor (AIF): a Novel Caspase-Independent Death Effector Released From Mitochondria*, Biochimie, vol. 84, n.º 2-3 (2002), pp. 215-222
- Cardoso, S. M., Pereira, C. e Oliveira, C. R., *The Protective Effect of Vitamin E, Idebenone and Reduced Glutathione on Free Radical Mediated Injury in Rat Brain Synaptosomes*, Bioch. Biophys. Res. Comm., vol. 246 (1998), pp. 703-710
- Chandra, J., Samali, A. e Orrenius, S., *Triggering and Modulation of Apoptosis by Oxidative Stress*, Free Radic. Biol Med., vol. 29, n.º 3-4 (2000), pp. 323-333
- Chen, J., Nagayama, T., Jin, K., Stetler, R. A., Zhu, R. L., Graham, S. H. e Simon, R. P., *Induction of Caspase-3-Like Protease May Mediate Delayed Neuronal Death in the Hippocampus After Transient Cerebral Ischemia*, J Neurosci., vol. 18, n.º 13 (1998), pp. 4914-4928
- Chepda, T., Cadau, M., Lassabliere, F., Reynaud, E., Perier, C., Frey, J. e Chamson, A., *Synergy Between Ascorbate and Alpha-Tocopherol on Fibroblasts in Culture*, Life Sci., vol. 69, n.º 14 (2001), pp. 1587-1596
- Choi, J., Malakowsky, C. A., Talent, J. M., Conrad, C. C., Carroll, C. A., Weintraub, S. T. e Gracy, R. W., *Anti-Apoptotic Proteins Are Oxidized by Ah25-35 in Alzheimer's Fibroblasts*, Biochim. Biophys. Acta, vol. 1637 (2003), pp. 135-141
- Cregan, S. P., MacLaurin, J. G., Craig, C. G., Robertson, G. S., Nicholson, D. W., Park, D. S. e Slack, R. S., *Bax-Dependent Caspase-3 Activation Is a Key Determinant in P53-Induced Apoptosis in Neurons*, J Neurosci., vol. 19, n.º 18 (1999), pp. 7860-7869

- Curti, D., Rognoni, F., Gasparini, L., Cattaneo, A., Paolillo, M., Racchi, M., Zani, L., Bianchetti, A., Trabucchi, M., Bergamaschi, S. e Govoni, S., *Oxidative Metabolism in Cultured Fibroblasts Derived From Sporadic Alzheimer's Disease (AD) Patients*, *Neurosci. Lett.*, vol. 236, n.º 1 (1997), pp. 13-16
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. e Colombo, R., *Protein Carbonyl Groups As Biomarkers of Oxidative Stress*, *Clinica Chimica Acta*, vol. 329 (2003), pp. 23-38
- Dalton, T. P., Shertzer, H. G. e Puga, A., *Regulation of Gene Expression by Reactive Oxygen*, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 39 (1999), pp. 67-101
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Gorczyca, W., Murakami, T. e Traganos, F., *Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis)*, *Cytometry*, vol. 27, n.º 1 (1997), pp. 1-20
- Drexler, H. G., Matsuo, A. Y. e MacLeod, R. A., *Continuous Hematopoietic Cell Lines As Model Systems for Leukemia-Lymphoma Research*, *Leuk. Res.*, vol. 24, n.º 11 (2000), pp. 881-911
- du Toit, R., Volstedt, Y. e Apostolides, Z., *Comparison of the Antioxidant Content of Fruits, Vegetables and Teas Measured As Vitamin C Equivalents*, *Toxicology*, vol. 166, n.º 1-2 (2001), pp. 63-69
- Eaton, J. W. e Qian, M., *Molecular Bases of Cellular Iron Toxicity*, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 32, n.º 9 (2002), pp. 833-840
- Fagan, J., Slecza, B. G. e Sohar, I., *Quantitation of Oxidative Damage to Tissue Proteins*, *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 31 (1999), pp. 751-757
- Ferri, K. F. e Kroemer, G., *Organelle-Specific Initiation of Cell Death Pathways*, *Nat. Cell Biol*, vol. 3, n.º 11 (2001), E255-E263
- Freshney, R. I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3ª edição, (1994), John Wiley & Sons, Inc., New York
- Fuchs, J., *Potentials and Limitations of the Natural Antioxidants RRR-Alpha-Tocopherol, L-Ascorbic Acid and Beta-Carotene in Cutaneous Photoprotection*, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 25, n.º 7 (1998), pp. 848-873
- German, J. B. e Walzem, R., *The Health Benefits of Wine*, *Annu Rev Nutr*, vol. 20 (2000), pp. 561-593
- Gogas, H., Bafaloukos, D. e Bedikian, A. Y., *The Role of Taxanes in the Treatment of Metastatic Melanoma*, *Melanoma Res.*, vol. 14, n.º 5 (2004), pp. 415-420
- Greene, L. A. e Tischler, A. S., *Establishment of a Noradrenergic Clonal Line of Rat Adrenal Pheochromocytoma Cells Which Respond to Nerve Growth Factor*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 73, n.º 7 (1976), pp. 2424-2428

- Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3ª edição, (1999), Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. C., Oxford University Press, New York
- Hengartner, M. O., *The Biochemistry of Apoptosis*, Nature, vol. 407, n.º 6805 (2000), pp. 770-776
- Humphreys, D. T. e Wilson, M. R., *Modes of L929 Cell Death Induced by TNF-Alpha and Other Cytotoxic Agents*, Cytokine, vol. 11, n.º 10 (1999), pp. 773-782
- Hutchins, J. B. e Barger, S. W., *Why Neurons Die: Cell Death in the Nervous System*, Anat. Rec., vol. 253, n.º 3 (1998), pp. 79-90
- Jamieson, D. J., Stephen, D. e Terriere, E. C., *Analysis of the Adaptive Oxidative Stress Response of Candida Albicans*, FEMS Microbiology Letters, vol. 138 (1996), pp. 83-88
- Jang, J. H., Aruoma, O. I., Jen, L. S., Chung, H. Y. e Surh, Y. J., *Ergothioneine Rescues PC12 Cells From Beta-Amyloid-Induced Apoptotic Death*, Free Radic. Biol Med., vol. 36, n.º 3 (2004), pp. 288-299
- Jin, Z. Q. e Chen, X., *A Simple Reproducible Model of Free Radical-Injured Isolated Heart Induced by 1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl (DPPH)*, J. Pharmacol. Toxicol. Methods, vol. 39, n.º 2 (1998), pp. 63-70
- Katayama, H., Demitsu, T. e Yaoita, H., *Biological and Biochemical Responses of Skin Fibroblast to Oxidative Stress Induced by Fe³⁺-Ascorbate*, Dermatologica, vol. 179 Suppl 1 (1989), 142
- Kelley, E., Wagner, B., Buettner, G. e Burns, C., *Nitric Oxide Inhibits Iron-Induced Lipid Peroxidation in HL-60 Cells*, Arch. Biochem. Biophys., vol. 370, n.º 1 (1999), pp. 97-104
- Kim, E. H., Jang, M. H., Shin, M. C., Shin, M. S. e Kim, C. J., *Protective Effect of Aqueous Extract of Ginseng Radix Against 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Apoptosis in PC12 Cells*, Biol Pharm. Bull., vol. 26, n.º 12 (2003), pp. 1668-1673
- Krammer, P. H., *CD95's Deadly Mission in the Immune System*, Nature, vol. 407, n.º 6805 (2000), pp. 789-795
- Krohn, A. J., Preis, E. e Prehn, J. H., *Staurosporine-Induced Apoptosis of Cultured Rat Hippocampal Neurons Involves Caspase-1-Like Proteases As Upstream Initiators and Increased Production of Superoxide As a Main Downstream Effector*, J Neurosci., vol. 18, n.º 20 (1998), pp. 8186-8197
- Kruman, I., Guo, Q. e Mattson, M. P., *Calcium and Reactive Oxygen Species Mediate Staurosporine-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in PC12 Cells*, J Neurosci. Res., vol. 51, n.º 3 (1998), pp. 293-308

- Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J. L., Duriez, P., Teissier, E. e Cotellet, N., *Antioxidant Properties of Di-Tert-Butylhydroxylated Flavonoids*, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 29, n.º 9 (2000), pp. 900-912
- Lehuédé, J., Fauconneau, B., Barrier, L., Ourakow, M., Piriou, A. e Vierfond, J.-M., *Synthesis and Antioxidant Activity of New Tetraarylpyrroles*, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 34 (1999), pp. 991-996
- Leist, M. e Jaattela, M., *Four Deaths and a Funeral: From Caspases to Alternative Mechanisms*, *Nat. Rev Mol. Cell Biol*, vol. 2, n.º 8 (2001), pp. 589-598
- Leonard, M., Noy, N. e Zakim, D., *The Interactions of Bilirubin With Model and Biological Membranes*, *J. Biol. Chem.*, vol. 264, n.º 10 (1989), pp. 5648-5652
- Levi, S., Santambrogio, P., Corsi, B., Cozzi, A. e Arosio, P., *Evidence That Residues Exposed on the Three-Fold Channels Have Active Roles in the Mechanism of Ferritin Iron Incorporation*, *Biochem. J.*, vol. 317 (Pt 2) (1996), pp. 467-473
- Liu, Y., *Understanding the Biological Activity of Amyloid Proteins in Vitro: From Inhibited Cellular MTT Reduction to Altered Cellular Cholesterol Homeostatis*, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 23, n.º 3 (1999), pp. 377-395
- Liu, Y., Song, X. D., Liu, W., Zhang, T. Y. e Zuo, J., *Glucose Deprivation Induces Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in PC12 Cell Line*, *J Cell Mol. Med.*, vol. 7, n.º 1 (2003), pp. 49-56
- Lopez-Lluch, G., Buron, M. I., Alcain, F. J., Quesada, J. M. e Navas, P., *Redox Regulation of CAMP Levels by Ascorbate in 1,25-Dihydroxy- Vitamin D3-Induced Differentiation of HL-60 Cells*, *Biochem. J.*, vol. 331 (Pt 1) (1998), pp. 21-27
- Lovell, M. A., Xie, C. e Markesbery, W. R., *Acrolein, a Product of Lipid Peroxidation, Inhibits Glucose and Glutamate Uptake in Primary Neuronal Cultures*, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 29, n.º 8 (2000), pp. 714-720
- Markesbery, W. R., *Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease*, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 23, n.º 1 (1997), pp. 134-147
- Mathiesen, L., Malterud, K. E. e Sund, R. B., *Hydrogen Bond Formation As Basis for Radical Scavenging Activity: a Structure-Activity Study of C-Methylated Dihydrochalcones From Myrica Gale and Structurally Related Acetophenones*, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 22, n.º 1-2 (1997), pp. 307-311
- McKeehan, W. L., *Methods for Preparation of Media, Supplements, and Substrata for Serum-free Animal Cell Culture*, (1984), A.R. Liss, New York
- Meagher, E. A. e Fitzgerald, G. A., *Indices of Lipid Peroxidation in Vivo: Strengths and Limitations*, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 28, n.º 12 (2000), pp. 1745-1750

- Menozi, G., Merello, L., Fossa, P., Schenone, S., Ranise, A., Mosti, L., Bondavalli, F., Loddo, R., Murgioni, C., Mascia, V., La Colla, P. e Tamburini, E., *Synthesis, Antimicrobial Activity and Molecular Modeling Studies of Halogenated 4-[1H-Imidazol-1-Yl(Phenyl)Methyl]-1,5-Diphenyl-1H-Pyrazoles*, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 12, n.º 20 (2004), pp. 5465-5483
- Minotti, G. e Aust, S. D., *The Requirement for Iron (III) in the Initiation of Lipid Peroxidation by Iron (II) and Hydrogen Peroxide*, *J. Biol. Chem.*, vol. 262, n.º 3 (1987), pp. 1098-1104
- Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L. F., Munoz, F. J., Ruiz, F., Leighton, F. e Inestrosa, N. C., *The Role of Oxidative Stress in the Toxicity Induced by Amyloid Beta-Peptide in Alzheimer's Disease*, *Prog. Neurobiol.*, vol. 62, n.º 6 (2000), pp. 633-648
- Mosmann, T., *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*, *J Immunol. Methods*, vol. 65, n.º 1-2 (1983), pp. 55-63
- Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Masters, C. L. e Beyreuther, K., *Reactive Oxygen Species and Alzheimer's Disease*, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 54, n.º 5 (1997), pp. 533-539
- Nafisi, S., Hajiakhoondi, A. e Yektadoost, A., *Thymol and Carvacrol Binding to DNA: Model for Drug-DNA Interaction*, *Biopolymers*, vol. 74, n.º 5 (2004), pp. 345-351
- Nenadis, N., Zafiropoulou, I. e Tsimidou, M., *Commonly Used Food Antioxidants: a Comparative Study in Dispersed Systems*, *Food Chemistry*, vol. 82 (2003), pp. 403-407
- Noctor, G. e Foyer, C., *Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control*, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 49 (1998), pp. 249-279
- Nordberg, J. e Arner, E. S., *Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System*, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31, n.º 11 (2001), pp. 1287-1312
- Oberley, T. D. e Oberley, L. W., *Antioxidant Enzyme Levels in Cancer*, *Histol. Histopathol.*, vol. 12, n.º 2 (1997), pp. 525-535
- Ohkawa, H., Ohishi, N. e Yagi, K., *Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction*, *Anal. Biochem.*, vol. 95, n.º 2 (1979), pp. 351-358
- Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T. e Ono, M., *DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained From Some Medicinal Plants*, *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 24, n.º 10 (2001), pp. 1202-1205
- Oliveira, M. T., Rego, A. C., Morgadinho, M. T., Macedo, T. R. e Oliveira, C. R., *Toxic Effects of Opioid and Stimulant Drugs on Undifferentiated PC12 Cells*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 965 (2002), pp. 487-496

- Paine, R. e Ward, P. A., *Cell Adhesion Molecules and Pulmonary Fibrosis*, Am. J. Med., vol. 107, n.º 3 (1999), pp. 268-279
- Parejo, I., Codina, C., Petrakis, C. e Kefalas, P., *Evaluation of Scavenging Activity Assessed by Co(II)/EDTA-Induced Luminol Chemiluminescence and DPPH* (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) Free Radical Assay*, J. Pharmacol. Toxicol. Methods, vol. 44, n.º 3 (2000), pp. 507-512
- Parker, R. S., Sontag, T. J. e Swanson, J. E., *Cytochrome P4503A-Dependent Metabolism of Tocopherols and Inhibition by Sesamin*, Biochem Biophys. Res. Commun., vol. 277, n.º 3 (2000), pp. 531-534
- Percival, M. D., *Human 5-Lipoxygenase Contains an Essential Iron*, J. Biol. Chem., vol. 266, n.º 16 (1991), pp. 10058-10061
- Pereira, C., Santos, M. S. e Oliveira, C., *Involvement of Oxidative Stress on the Impairment of Energy Metabolism Induced by Ab Peptides on PC12 Cells: Protection by Antioxidants*, Neurobiology of Disease, vol. 6 (1999), pp. 209-219
- Reed, J. C., *Apoptosis-Regulating Proteins As Targets for Drug Discovery*, Trends Mol. Med., vol. 7, n.º 7 (2001), pp. 314-319
- Rego, A. C., Santos, M. S., Proenca, M. T. e Oliveira, C. R., *Influence of Vitamin E Succinate on Retinal Cell Survival*, Toxicology, vol. 128, n.º 2 (1998), pp. 113-124
- Rogachev, I., Serra, C., Farran, A., Cortina, J. L., Gressel, J. e Warshawsky, A., *Prediction of the Octanol-Water Distribution of Dithiocarbamate Derivatives*, Reactive & Functional Polymers, vol. 54 (2003), pp. 17-24
- Roguet, R. e Schaefer, H., *Overview of In Vitro Cell Culture Technologies and Pharmaco-Toxicological Applications*, Toxicology In Vitro, vol. 11 (1997), pp. 591-599
- Ruegg, U. T. e Burgess, G. M., *Staurosporine, K-252 and UCN-01: Potent but Nonspecific Inhibitors of Protein Kinases*, Trends Pharmacol Sci., vol. 10, n.º 6 (1989), pp. 218-220
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F. e Castelli, F., *Flavonoids As Antioxidant Agents: Importance of Their Interaction With Biomembranes*, Free Radic. Biol Med., vol. 19 (1995), pp. 481-486
- Sakagami, H., Satoh, K., Fukuchi, K., Gomi, K. e Takeda, M., *Effect on an Iron-Chelator on Ascorbate-Induced Cytotoxicity*, Free Radic. Biol. Med., vol. 23, n.º 2 (1997), pp. 260-270
- Sanchez, M. E., Turina, A., V, Garcia, D. A., Nolan, M. V. e Perillo, M. A., *Surface Activity of Thymol: Implications for an Eventual Pharmacological Activity*, Colloids Surf. B Biointerfaces., vol. 34, n.º 2 (2004), pp. 77-86

- Sapan, C. V., Lundblad, R. L. e Price, N. C., *Colorimetric Protein Assay Techniques*, Biotechnol. Appl. Biochem., vol. 29 (Pt 2) (1999), pp. 99-108
- Schroeter, H., Williams, R. J., Matin, R., Iversen, L. e Rice-Evans, C. A., *Phenolic Antioxidants Attenuate Neuronal Cell Death Following Uptake of Oxidized Low-Density Lipoprotein*, Free Radic. Biol. Med., vol. 29, n.º 12 (2000), pp. 1222-1233
- Scott, D. e Clemyer, J., *Estimation of Distribution Coefficients From the Partition Coefficient and pKa*, Pharmaceutical Technology (2002), pp. 30-40
- Sedmak, J. J. e Grossberg, S. E., *A Rapid, Sensitive, and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250*, Anal. Biochem, vol. 79, n.º 1-2 (1977), pp. 544-552
- Shapiro, S. S. e Saliou, C., *Role of Vitamins in Skin Care*, Nutrition, vol. 17, n.º 10 (2001), pp. 839-844
- Sharma, P. e Morgan, P., *Ascorbate Reduces Superoxide Production and Improves Mitochondrial Respiratory Chain Function in Human Fibroblasts With Electron Transport Chain Deficiencies*, Mitochondrion, vol. 1 (2001), pp. 191-198
- Silva, J. P., Santos, M. L., Areias, F. M. e Coutinho, O. P., *Protective Effects of Newly Synthesised Nitrogen Compounds on Oxidative Stress Induced in a Rat Fibroblast Cell Line*, 1st Luso-Spanish Congress on Free Radicals & 6th Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine (2003) - Poster
- Slee, E. A., Adrain, C. e Martin, S. J., *Serial Killers: Ordering Caspase Activation Events in Apoptosis*, Cell Death. Differ., vol. 6, n.º 11 (1999), pp. 1067-1074
- Spiteller, G., *Lipid Peroxidation in Aging and Age-Dependent Diseases*, Exp. Gerontol., vol. 36 (2001), pp. 1425-1457
- Spiteller, P. e Spiteller, G., *9-Hydroxy-10,12-Octadecadienoic Acid (9-HODE) and 13-Hydroxy-9,11-Octadecadienoic Acid (13-HODE): Excellent Markers for Lipid Peroxidation*, Chemistry and Physics of Lipids, vol. 89 (1997), pp. 131-139
- Steenbergen, R. H., Drummen, G. P., Op den Kamp, J. A. e Post, J. A., *The Use of Cis-Parinaric Acid to Measure Lipid Peroxidation in Cardiomyocytes During Ischemia and Reperfusion*, Biochim. Biophys. Acta, vol. 1330, n.º 2 (1997), pp. 127-137
- Stefanis, L., Park, D. S., Yan, C. Y., Farinelli, S. E., Troy, C. M., Shelanski, M. L. e Greene, L. A., *Induction of CPP32-Like Activity in PC12 Cells by Withdrawal of Trophic Support. Dissociation From Apoptosis*, J Biol Chem., vol. 271, n.º 48 (1996), pp. 30663-30671
- Stryer, L., *Biochemistry*, 4ª edição, (1998), W. H. Freeman and Company, New York

- Supino, R., *MTT Assays in Methods in Molecular Biology: In Vitro Toxicity Testing Protocols*, O'Hara, S. e Atterwill, C. K., Human Press Inc., Totowa, NJ, (1995)
- Tang, D., Lahti, J. M. e Kidd, V. J., *Caspase-8 Activation and Bid Cleavage Contribute to MCF7 Cellular Execution in a Caspase-3-Dependent Manner During Staurosporine-Mediated Apoptosis*, J Biol Chem., vol. 275, n.º 13 (2000a), pp. 9303-9307
- Tang, L., Zhang, Y., Qian, Z. e Shen, X., *The Mechanism of Fe(2+)-Initiated Lipid Peroxidation in Liposomes: the Dual Function of Ferrous Ions, the Roles of the Pre-Existing Lipid Peroxides and the Lipid Peroxyl Radical*, Biochem. J., vol. 352 Pt 1 (2000b), pp. 27-36
- van Acker, S. A., van den Berg, D. J., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., van Bennekom, W. P., van der Vijgh, W. J. e Bast, A., *Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids*, Free Radic. Biol Med., vol. 20, n.º 3 (1996), pp. 331-342
- Viswanath, V., Wu, Y., Boonplueang, R., Chen, S., Stevenson, F. F., Yantiri, F., Yang, L., Beal, M. F. e Andersen, J. K., *Caspase-9 Activation Results in Downstream Caspase-8 Activation and Bid Cleavage in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Parkinson's Disease*, J Neurosci., vol. 21, n.º 24 (2001), pp. 9519-9528
- Wajant, H., *The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm*, Science, vol. 296, n.º 5573 (2002), pp. 1635-1636
- Westerink, R. H., Klompmakers, A. A., Westenberg, H. G. e Vijverberg, H. P., *Signaling Pathways Involved in Ca²⁺- and Pb²⁺-Induced Vesicular Catecholamine Release From Rat PC12 Cells*, Brain Res., vol. 957, n.º 1 (2002), pp. 25-36
- Weydert, C., Roling, B., Liu, J., Hinkhouse, M. M., Ritchie, J. M., Oberley, L. W. e Cullen, J. J., *Suppression of the Malignant Phenotype in Human Pancreatic Cancer Cells by the Overexpression of Manganese Superoxide Dismutase*, Mol. Cancer Ther., vol. 2, n.º 4 (2003), pp. 361-369
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. I. e Nishioka, I., *Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids Against the 1,1-Diphenyl-2 Picrylhydrazyl Radical*, Biochem. Pharmacol., vol. 56, n.º 2 (1998), pp. 213-222
- Zeng, Y., Han, X. e Gross, R., *Phospholipid-Subclass-Specific Partitioning of Lipophilic Ions in Membrane-Water Systems*, Biochem. J., vol. 338 (1999), pp. 651-658
- Zimmermann, K. C., Bonzon, C. e Green, D. R., *The Machinery of Programmed Cell Death*, Pharmacol Ther., vol. 92, n.º 1 (2001), pp. 57-70