

RUTE ALVES PEREIRA E COSTA

**PROTEÇÃO POR L-CARNITINA OU PIRACETAM CONTRA A MORTE
CELULAR CAUSADA POR SINVASTATINA EM CÉLULAS TUMORAIS E
NÃO TUMORAIS**

CAMPINAS

UNICAMP

2010

RUTE ALVES PEREIRA E COSTA

**PROTEÇÃO POR L-CARNITINA OU PIRACETAM CONTRA A MORTE
CELULAR CAUSADA POR SINVASTATINA EM CÉLULAS TUMORAIS E
NÃO TUMORAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANÍBAL EUGÊNIO VERCESI

COLABORADORA: MARIANA PINHEIRO FERNANDES

CAMPINAS

UNICAMP

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Costa, Rute Alves Pereira e

C823p Proteção por L-carnitina ou piracetam contra a morte celular causada por simvastatina em células tumorais e não tumorais / Rute Alves Pereira e Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores : Aníbal Eugênio Vercesi; Mariana Pinheiro Fernandes

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mitocôndria. 2. Estresse oxidativo. 3. Morte celular. 4. Carnitina. 5. Simvastatina. I. Vercesi, Aníbal Eugênio. II. Fernandes, Mariana Pinheiro. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Protection by L-carnitine or piracetam against cell death caused by simvastatin in tumor and non tumorigenic cell lines

- Keywords:**
- Mitochondria
 - Oxidative stress
 - Cell death
 - Carnitine
 - Simvastatin

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Área de Concentração : Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Prof^o. Dr^o. Aníbal Eugênio Vercesi

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

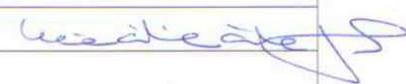
Prof^a. Dr^a. Luciane Carla Alberici

Data da defesa: 22-02-2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Rute Alves Pereira e Costa

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Aníbal Eugênio Vercesi

Membros:	
Professor(a) Doutor(a) Aníbal Eugênio Vercesi	
Professor(a) Doutor(a) Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes	
Professor(a) Doutor(a) Luciane Carla Alberici	

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/02/2010

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Professor Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de Campinas (FAEPEX-Unicamp).

DEDICO

À minha família pelo amor e confiança
depositados diariamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amor incondicional.

Ao meu orientador Professor Aníbal Eugênio Vercesi, pela oportunidade de aprender com seus ensinamentos e pelas valiosas discussões científicas.

A colaboradora do meu trabalho, Mariana Pinheiro Fernandes, pelo incentivo, encorajamento, orientação, conselho e principalmente pelo exemplo de ética.

Aos professores membros da banca e pré-banca Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, Luciane Carla Alberici, Roger Frigério Castilho, Helena Coutinho Franco de Oliveira e Eliana Cotta de Faria pelas revisões e sugestões.

Ao meu esposo Jonathan Costa, pelo amor, carinho, paciência que dispensou a mim em todos os momentos.

Aos meus queridos pais Jaime e Edna e irmão Rafael, por serem sempre minha base e fonte de encorajamento.

Aos amigos do laboratório de Bioenergética, em especial ao Felipe G. Ravagnani pela ajuda constante e convivência mais que agradável.

Aos demais familiares e amigos que estão sempre presentes em todos os momentos.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

	PÁG.
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiv</i>
1 - INTRODUÇÃO	16
1.1 – Estatinas	17
1.1.1 – Propriedades químicas e funcionais das estatinas	17
1.2 – L-carnitina	23
1.3 - Piracetam	27
1.4 – Mitocôndria e morte celular	30
2 – OBJETIVOS	35
2.1 – Objetivo geral	36
2.2 – Objetivos específicos	36
3 – MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 - Reagentes	38
3.2 – Cultura de células	38
3.3 – Citometria de fluxo	38
3.3.1 – Avaliação de taxas de morte celular	39
3.4 – Determinação do potencial de membrana mitocondrial	39
3.5 – Determinação do consumo de oxigênio	39
3.6 – Análise estatística	40

4 - RESULTADOS	41
4.1 - Testes dose resposta	42
4.2 - Ciclosporina A, L-carnitina ou piracetam protegem da disfunção mitocondrial em células PC-3 causada por sinvastatina ou tert-butyl hidroperóxido	45
4.3 - Proteção contra a morte celular de fibroblastos (GN16-P6) ou queratinócitos (HaCaT) pela L-carntina ou piracetam	49
5 - DISCUSSÃO	53
6 - CONCLUSÃO	60
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
AV	anexina V
CAT	carboxiatractilosídeo
CR	controle respiratório
CsA	ciclosporina A
DNA	ácido desoxirribonucléico
$\Delta\Psi_m$	potencial elétrico de membrana mitocondrial
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	ácido etileno glicol-bis (β -aminoetil éter) – N,N,N',N' - tetraacético
EROs	espécies reativas de oxigênio
CCCP	carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona
HEPES	ácido N-(2-hidroxi-1-piperazino)etano-sulfônico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
IP	iodeto de propídio
L-c	L-carnitina
NADH	nicotinamida adenina-dinucleotídeo (estado reduzido)

NADPH	nicotinamida	adenina-dinucleotídeo-fosfato	(estado reduzido)
NADP⁺	nicotinamida	adenina-dinucleotídeo-fosfato	(estado oxidado)
O₂	oxigênio		
O₂^{•-}	ânion radical superóxido		
OH[•]	radical hidroxil reativo		
PBS	tampão fosfato-salina		
PC-3	linhagem celular de câncer de próstata		
Pi	fosfato inorgânico		
Pira	piracetam		
PTP	poro de transição de permeabilidade mitocondrial		
SFB	soro fetal bovino		
t-BOOH	tert-butyl hidroperóxido		
TPM	transição de permeabilidade mitocondrial		

LISTA DE FIGURAS

		PÁG.
Figura 1	Estruturas químicas das estatinas	19
Figura 2	Via de síntese do colesterol	20
Figura 3	Ciclo da carnitina na oxidação de ácidos graxos.	25
Figura 4	Efeito do piracetam na fluidez de membrana	29
Figura 5	TPM induzida por aumento de Ca^{2+} e acúmulo de EROs	33
Figura 6	Proteção pela L-carnitina ou piracetam contra a morte de células PC-3 induzida por sinvastatina	43
Figura 7	Proteção pela L-carnitina ou piracetam contra a morte de células PC-3 induzida por t-BOOH	44
Figura 8	Efeito protetor da L-carnitina, piracetam e CsA à diminuição do $\Delta\Psi_m$ de células PC-3 causado por sinvastatina ou tert-butyl hidroperóxido	46
Figura 9	Morte celular de GN16-P6 e HaCaT por sinvastatina	50
Figura 10	Proteção por L-carnitina ou piracetam contra a morte celular causada por sinvastatina	52
Tabela 1	Diminuição da respiração celular sensível à CsA e L-carnitina no processo de necrose de células PC-3	48

RESUMO

Estatinas são fármacos amplamente utilizadas no tratamento das hipercolesterolemias. Elas são inibidores competitivos da 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase impedindo, dessa forma, a síntese do colesterol. L-carnitina é sintetizada a partir dos aminoácidos essenciais lisina e metionina no fígado e no rim. Desempenha função importante na célula onde está envolvida na oxidação dos ácidos graxos agindo como um cofator no transporte de grupos acil através da membrana mitocondrial interna. Piracetam é uma droga nootrópica cuja função é melhorar o desempenho cognitivo, e as funções envolvidas nos processos de aprendizagem, memória, atenção e consciência. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação protetora da L-carnitina ou piracetam contra a morte por necrose de células PC-3 induzida por sinvastatina 60 μM ou tert-butyl-hidroperóxido (t-BOOH) 500 μM . Tanto a sinvastatina quanto o t-BOOH causam transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), seguida de morte celular por necrose. L-carnitina e piracetam protegeram contra a morte celular induzida por sinvastatina ou t-BOOH por meio de um mecanismo dose-dependente (1-12 μM). Na avaliação da disfunção mitocondrial causada por sinvastatina ou t-BOOH, tanto a L-carnitina quanto o piracetam protegeram contra a perda de potencial de membrana mitocondrial de forma semelhante à ciclosporina A. As quedas nas velocidades de respiração de estado III e estado IV, (fosforilação e repouso), também foram prevenidas por L-carnitina, piracetam e ciclosporina A. Quando linhagens de células não tumorais (GN16-P6 e HaCaT) foram analisadas, observou-se que tanto L-carnitina quanto o piracetam também protegeram contra a morte celular induzida por sinvastatina. Podemos concluir que nas células PC-3, estes compostos protegem contra necrose celular através da inibição da TPM e que em linhagens não tumorais estes compostos apresentam efeitos semelhantes.

ABSTRACT

Statins are drugs widely used in the treatment of hypercholesterolemia. They are competitive inhibitors of 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase preventing in this way, the synthesis of cholesterol. L-carnitine is synthesized from the essential aminoacids lysine and methionine in liver and kidney and plays an important role in the cell, where it is involved in fatty acid oxidation by acting as a cofactor in the transport of acyl groups across the inner mitochondrial membrane. Piracetam is a nootropic drug which function is to improve cognitive performance, and the functions involved in the processes of learning, memory, attention and consciousness. This study aimed to evaluate the protective action of L-carnitine or piracetam against necrosis in PC-3 cells induced by 60 μ M simvastatin or 500 μ M tert-butyl-hydroperoxide (t-BOOH). Both simvastatin and t-BOOH causes mitochondrial permeability transition (MPT) followed by necrosis. L-carnitine and piracetam protected against cell death induced by simvastatin or t-BOOH by a dose-dependent mechanism (1-12 μ M). In the assessment of mitochondrial dysfunction caused by simvastatin or t-BOOH, L-carnitine or piracetam similarly to cyclosporin A protected against the loss of mitochondrial membrane potential. The decrease in state III or state IV respiration rates, were also prevented. When non-tumor cell lines (GN16-P6 and HaCaT) were analyzed, it was observed that both L-carnitine and piracetam also protected against cell death induced by simvastatin. We can conclude that these compounds protected against cell necrosis by inhibiting MPT in both tumor or non tumor cell lines.

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Estatinas

As estatinas são compostos naturais (produzidos por fungos) ou sintéticos (Davidson, 2002), capazes de diminuir a concentração de colesterol plasmático através da inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A (HMG-CoA) redutase, que catalisa a conversão de HMG-CoA em mevalonato, etapa que limita a síntese *de novo* de colesterol (Shepherd et al., 1995).

Em 1971, Endo e colaboradores iniciaram um projeto com o objetivo de pesquisar metabólitos microbianos capazes de inibir a HMG-CoA redutase, a fim de reduzir as taxas de colesterol plasmático em humanos. Estes estudos resultaram na descoberta de um potente inibidor da HMG-CoA redutase, chamado mevastatina (anteriormente chamado ML-236B ou compactina) (Endo et al., 1976). Posteriormente vários estudos mostraram que a mevastatina era capaz de reduzir os níveis de colesterol LDL em modelos experimentais e em seres humanos (Tsujita et al., 1979; Yamamoto et al., 1980). Estas descobertas estimularam o desenvolvimento mundial de análogos da mevastatina. Em 1990 três drogas, a lovastatina (inicialmente chamada mevinolina), sinvastatina e pravastatina, foram aprovadas e comercializadas em muitos países (Grundy, 1988; Hunninghake, 1992).

1.1.1- Propriedades químicas e funcionais das estatinas

Lovastatina, sinvastatina e pravastatina são estatinas naturais produzidas por fungos, enquanto atorvastatina, rosuvastatina, cerivastatina, pitavastatina e fluvastatina são estatinas sintéticas (Davidson, 2002). As estruturas químicas das estatinas podem ser divididas em três grupos: (1) estrutura análoga ao HMG-CoA, substrato da enzima alvo, (2) estrutura hidrofóbica de anel covalentemente ligada ao análogo da HMG-CoA e envolvida na ligação da estatina à enzima alvo e (3) grupos laterais dos anéis que definem as propriedades de solubilidade dessas drogas e portanto, muitas de suas propriedades farmacocinéticas (Gaw et al., 2000).

Atorvastatina, fluvastatina, lovastatina e sinvastatina são compostos relativamente lipofílicos, enquanto pravastatina, e rosuvastatina são mais hidrofílicos como resultado do grupo polar hidroxil e do grupo metano sulfonamida, respectivamente (McTavish et al., 1991; McTaggart et al., 2001). O mecanismo estrutural de inibição de HMG-CoA redutase por estatinas revelou que esses compostos agem através da ligação ao sítio ativo da enzima impedindo estericamente o substrato de se ligar (Istvan et al., 2001; Schachter, 2004).

Comparações do complexo enzima-estatina revelaram diferenças sutis em seus modos de ligação. Atorvastatina e rosuvastatina contém uma cadeia lateral polar com grupo carbonila e sulfonamida, respectivamente, que realiza interação por ligação de hidrogênio com o resíduo de Ser565 da enzima. Somente rosuvastatina realiza interação polar com o resíduo de Arg568 da enzima, pela interação com grupo sulfonamida o que aumenta sua hidrofobicidade e amplia sua interação com a enzima HMG-CoA, proporcionando resultados clínicos mais expressivos (Istvan, 2003). O significado dessas diferenças continua a ser estudado e o melhor conhecimento destas interações entre estatinas e a enzima pode contribuir para o desenvolvimento de moléculas com ações mais específicas e mais potentes. (Schachter, 2004). Veja as estruturas químicas das principais estatinas na Fig. 1.

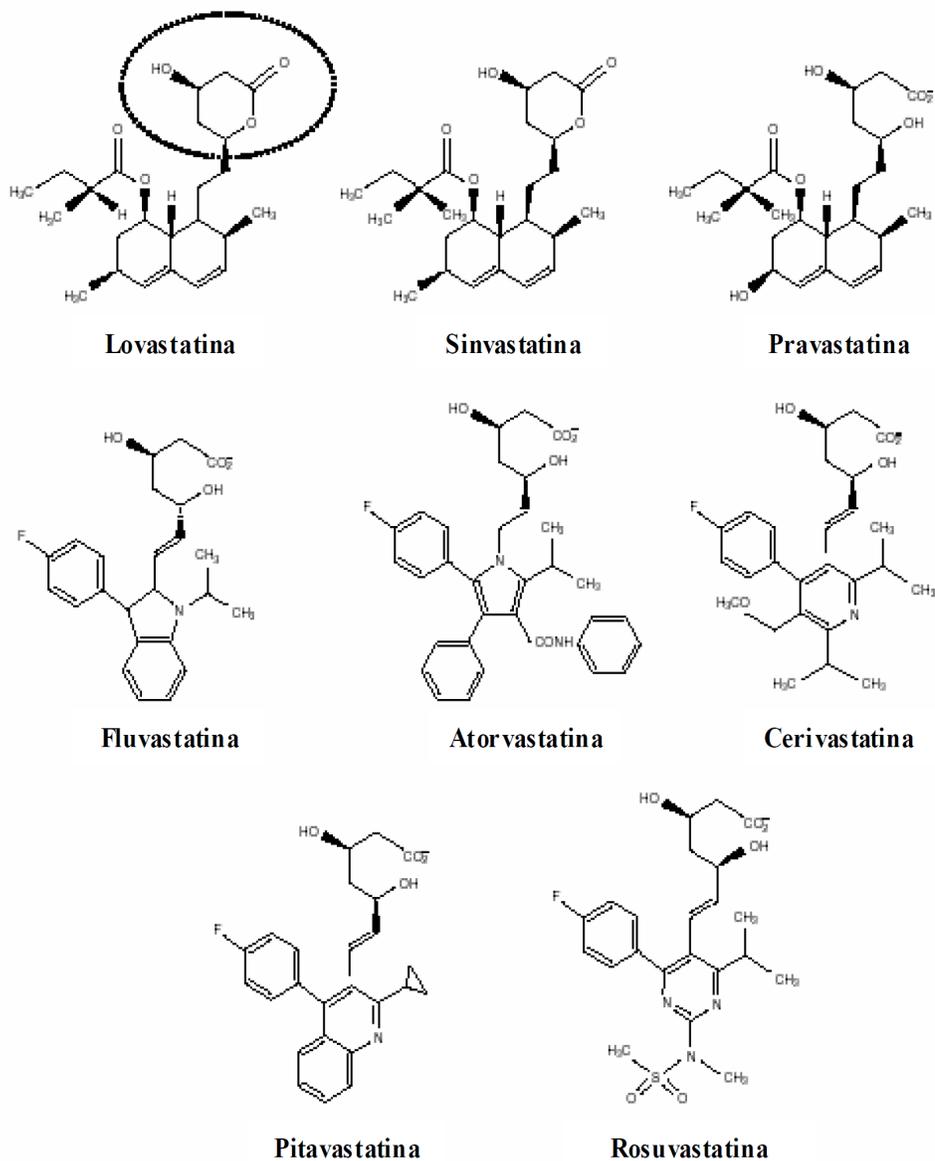


Figura 1- Estruturas químicas das estatinas. Do ponto de vista estrutural as estatinas podem ser divididas em 3 grupos: (1) estrutura análoga ao HMG-CoA, substrato da enzima alvo (circulada na estrutura da lovastatina); (2) estrutura hidrofóbica de anel covalentemente ligada ao análogo da HMG-CoA e envolvida na ligação da estatina à enzima alvo; (3) grupos laterais dos anéis que definem as propriedades de solubilidade dessas drogas. Adaptado de Schachter, 2004.

Atualmente, as estatinas são amplamente utilizadas nos tratamentos de hipercolesterolemias. Esses fármacos inibem reversível e competitivamente a HMG-CoA redutase devido a sua alta afinidade pela enzima e similaridade com o substrato HMG-CoA (Figura 2). A diminuição intracelular de colesterol estimula a síntese de receptores LDL (low density lipoprotein), o que determina maior captação das LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol) em circulação e conseqüente diminuição da concentração de LDL-C no plasma (Hobbs et al., 1992). As estatinas também aumentam a concentração de HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol) e diminui a concentração de triglicerídeos (Maron et al., 2000).

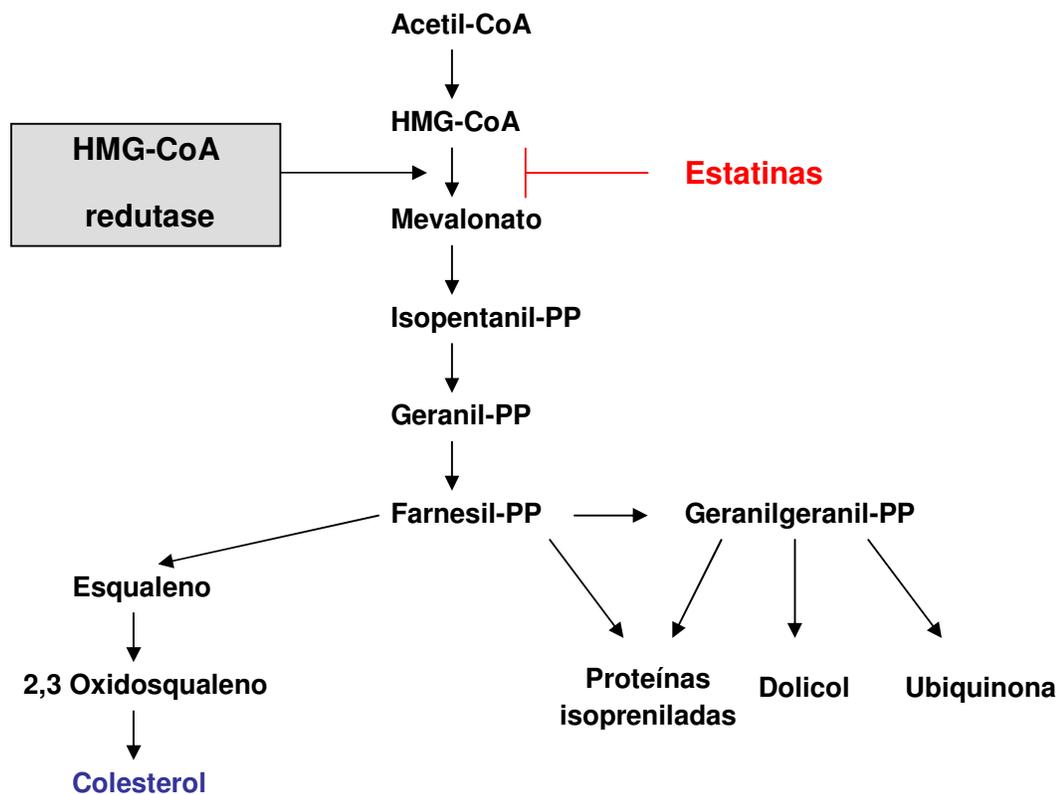


Figura 2 – Via de síntese do colesterol. As estatinas inibem a conversão de HMG-CoA em mevalonato. Sem a presença do precursor mevalonato, não é produzido o geranilpirofosfato (Geraniil-PP) e conseqüentemente não há produção de colesterol. Adaptado de Sirvent et. al., 2008.

Alguns efeitos adversos, contudo, tem sido observados em pacientes tratados com estatinas, entre eles, hepatotoxicidade e miotoxicidade. A hepatotoxicidade, que caracteriza-se por um dano ao fígado causado por substâncias químicas ou efeito colateral de algum medicamento (Horsmans et al., 1990; MacDonald et al., 1998), foi verificada num estudo em que as estatinas promoveram elevação dos níveis de transaminase hepáticas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) (Arduini et al., 2004). AST e ALT são indicadores sensíveis de dano hepático em diferentes tipos de doenças sendo liberadas na corrente sanguínea em grande quantidade quando há dano à membrana do hepatócito (Bhardwaj et al., 2007).

O efeito adverso mais comum, contudo, são as várias formas de miotoxicidade que vão de mialgia a rabdomiólise. A mialgia é uma dor muscular, localizada ou não que surge devido a tensões nos músculos. A razão pode se devido a um excessivo esforço, o que pode ocorrer com uma sobrecarga além da capacidade usual do indivíduo (Venero et al., 2009). Já a rabdomiólise é a quebra (lise) rápida de músculo esquelético (rabdomio) devido a lesão no tecido muscular. A lesão muscular pode ser causada por fatores físicos, químicos ou biológicos (Staffa et al., 2002). A destruição do músculo leva à liberação de produtos das células musculares na corrente sanguínea; alguns dos quais, como a proteína mioglobina são lesivos para os rins, podendo causar insuficiência renal aguda. Essa manifestação ocorre em até 7 % dos pacientes tratados com estatinas (Baer et al., 2007; Christopher-Stine, 2006).

A administração aguda de estatinas em miócitos humanos diminuiu a concentração de ATP intracelular sugerindo um efeito direto da estatina na função mitocondrial (Nishimoto et al., 2003). Sirvent et al. (2008) observaram que após administração de sinvastatina de forma aguda em biópsias de músculo humano houve inibição do complexo I da cadeia respiratória levando a uma disfunção mitocondrial. Este efeito também foi confirmado em biópsias de músculo de rato (Sugiyama, 1998). Wagner et al (2008) demonstraram que 3 estatinas (fluvastatina, lovastatina e sinvastatina) reduziram os níveis de ATP e viabilidade celular através do método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-brometo difeniltetrazolium), que mede a capacidade das desidrogenases mitocondriais reduzirem o MTT a formazan.

Resultados recentes do nosso laboratório demonstraram claramente que estatina induz transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) por promover oxidação cálcio dependente de grupamentos tióis de proteínas de membrana. Em estudo com ratos hipercolesterolêmicos, knockout para receptor LDL, tratados 15 dias com doses terapêuticas de lovastatina (100 mg/Kg) verificou-se uma maior susceptibilidade de desenvolvimento da TPM em mitocôndrias isoladas de fígado desses animais. Em experimentos *in vitro*, a lovastatina ou sinvastatina induziram TPM dose-dependente (10-80 μ M) e este mecanismo foi sensível à ciclosporina A (sequestrador de ciclofilina), ditioneitol (agente redutor), ADP, catalase (redutor H_2O_2) e EGTA (quelante de cálcio). Através deste trabalho foi demonstrado que estatinas podem agir diretamente na mitocôndria tanto *in vivo* quanto *in vitro* induzindo TPM, que é um evento do processo de morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (Velho et. al., 2006).

Outro resultado recente do nosso laboratório revelou que sinvastatina pode causar tanto apoptose quanto necrose em células de tumor de próstata (PC-3). Na concentração de 10 μ M, sinvastatina induziu principalmente apoptose, evento que foi prevenido por mevalonato, mas não por ciclosporina A, inibidor clássico da TPM. No entanto, a uma concentração de 60 μ M, a sinvastatina induziu necrose, processo que foi insensível à mevalonato mas sensível à ciclosporina A. A necrose celular foi precedida por um aumento considerável na concentração de Ca^{2+} citosólico livre e uma significativa queda na respiração celular e potencial elétrico de membrana mitocondrial. Tanto a disfunção mitocondrial quanto a necrose celular foram revertidas por ciclosporina A e boncrecato revelando que esses eventos são decorrentes da TPM. Por outro lado a apoptose, induzida por concentrações mais baixas de estatina (1-10 μ M) foi inibida por mevalonato, indicando que a apoptose nessas células foi dependente da inibição da HMG-CoA redutase. (Oliveira et al., 2008).

1.2 - L-carnitina

A mitocôndria é uma organela central na manutenção da função e integridade celular. A geração de ATP, um processo muito sensível à demanda celular de energia, é regulada por múltiplos mecanismos para balancear o uso e síntese do mesmo. A ligação entre formação de ATP mitocondrial e processos citosólicos envolve não somente o transportador de nucleotídeo de adenina, mas também as quinases mitocondriais (creatina quinase, hexoquinase, adenilato quinase) localizados nos sítios de contato entre as membranas mitocondrial externa e interna. Na maioria dos tecidos de mamíferos, a fosforilação oxidativa mitocondrial ocorre por meio de dois substratos: piruvato (derivado de glicose, lactato ou aminoácidos) ou ácidos graxos, mais especificamente ácidos graxos de cadeia longa, que para atravessarem a membrana interna da mitocôndria e se tornarem oxidáveis (após a conversão à forma de acil-carnitinas) precisam de um transportador: a carnitina (Zammit, et al., 2009).

A carnitina (β -hidroxi- γ -trimetilamônio butirato), $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{COO}^-$, encontra-se amplamente distribuída no organismo com maior concentração no músculo. É sintetizada a partir da lisina e metionina no fígado e no rim (Mayes & Botham, 2003). A dieta normal de um adulto, provê aproximadamente 75% da carnitina diária necessária, vinda essencialmente da ingestão de carne (Rebouche & Engel, 1984; Borum, 1995; Stanley, 2004). A carnitina é requerida para a realização do transporte de ácidos graxos do citoplasma para a matriz mitocondrial onde são oxidados (Roe & Ding, 2001).

A ativação de ácidos graxos de cadeias carbônicas menores e suas oxidações dentro da mitocôndria podem ocorrer independentemente da carnitina, porém as acil-CoA de cadeias carbônicas longas não conseguem atravessar a membrana interna da mitocôndria e só se tornarão oxidáveis após conversão à forma de acil-carnitinas. Uma enzima, a carnitina palmitoil-transferase I, presente no lado externo da membrana da mitocôndria, converte as acil-CoA de cadeia longa à acil-carnitina, que é capaz de atravessar a membrana interna da mitocôndria e ter acesso ao sistema de enzimas da β -oxidação. A carnitina-acilcarnitina-translocase atua na membrana mitocondrial interna como um transportador intermediário de carnitina. A acil-carnitina é transportada para

dentro da mitocôndria acoplada ao transporte de uma molécula de carnitina para fora. Desta forma, a acilcarnitina reage com a CoA em uma reação catalisada pela carnitina-palmitoil-transferase II, que se encontra do lado interno da membrana interna (Figura 3). Em seguida a acil-CoA é novamente formada na matriz mitocondrial e a carnitina é liberada (Mayes & Botham, 2003; Longo et al., 2006). A figura 3 apresenta os eventos da oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa.

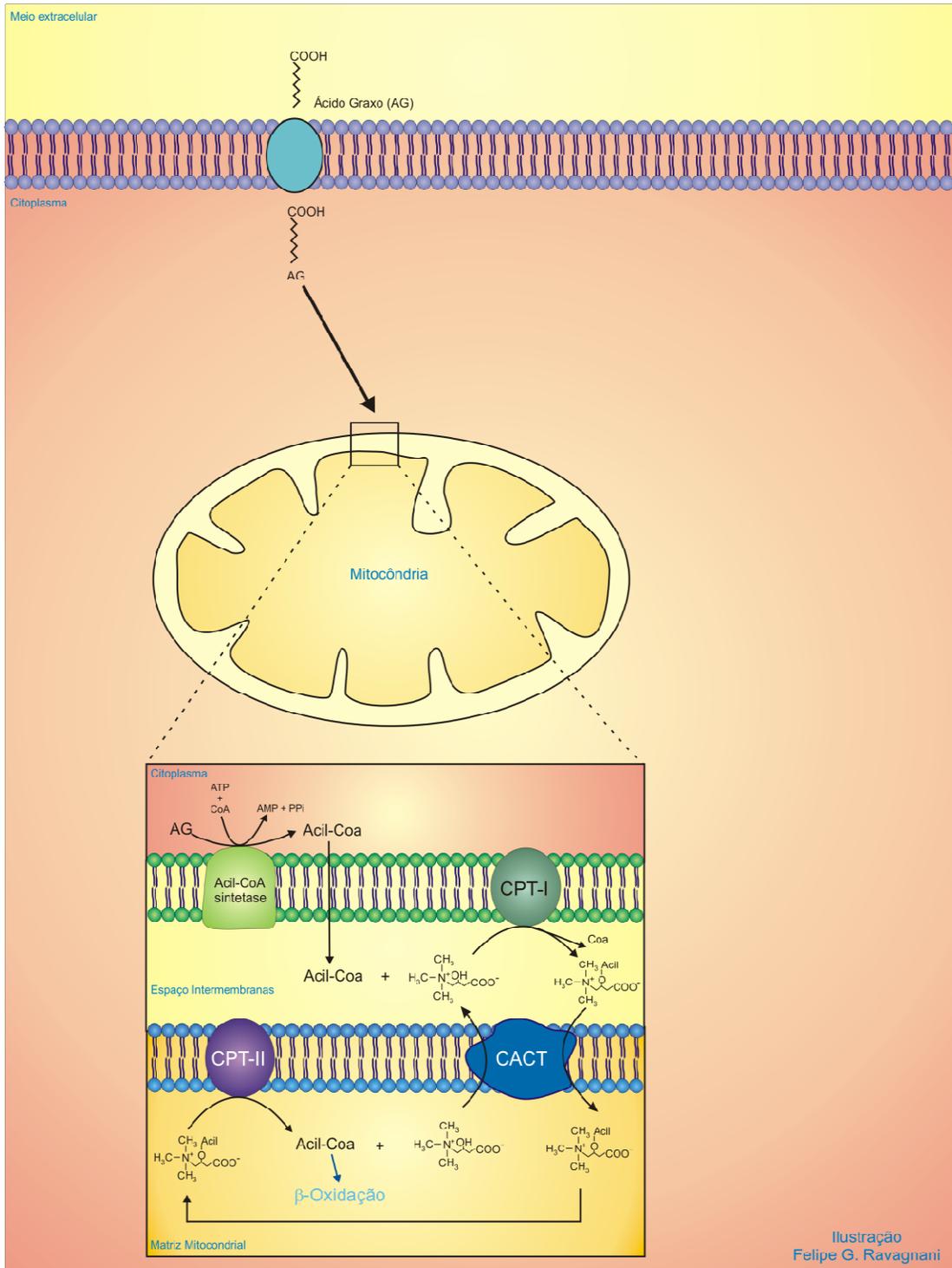


Figura 3 – Ciclo da carnitina na oxidação de ácidos graxos. CPT-I: carnitina palmitoil transferase I; CPT-II: carnitina palmitoil transferase II; CACT: carnitina acil carnitina translocase. Adaptado de Mayes & Botham, 2003.

Estudos recentes tem demonstrado muitos efeitos benéficos da L-carnitina. Virmani et al. (2003) verificaram uma redução da neurotoxicidade induzida por metanfetamina em ratos tratados com L-carnitina, através da redução da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Semelhantemente, esse efeito neuroprotetor da L-carnitina foi observado em ratos tratados com ácido 3-nitropropiónico (3-NPA), conhecido por produzir quedas no nível de ATP neuronal por inibir o complexo II da cadeia transportadora de elétrons. O pré-tratamento com L-carnitina preveniu totalmente os efeitos deletérios de 3-NPA (Virmani et al., 2002).

Vários estudos mostram a ação protetora da L-carnitina na função mitocondrial prevenindo o evento conhecido como TPM, caracterizado pela permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna. Estudos realizados com o hormônio tireóideo (T3) e palmitoil-CoA mostraram que ambos os compostos causam disfunção na mitocôndria levando à TPM e liberação de citocromo c. Nesses estudos, a TPM foi inibida por CsA, albumina sérica bovina (BSA) e L-carnitina (Kashiwagi et al., 2001; Furuno et al., 2001). Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, foi verificado que o ácido oléico inibe a respiração, causa despolarização de membrana, inchamento da organela e liberação de citocromo c. Tendo conhecimento de que a L-carnitina é indispensável para a β -oxidação do ácido oléico na mitocôndria e que esta reação requer ATP e coenzima A (CoA), na presença de ATP e CoA, a L-carnitina estimulou a oxidação do ácido oléico impedindo desta forma os efeitos deletérios desse ácido na mitocôndria. Este resultado sugere que a L-carnitina administrada mantém a função mitocondrial através da aceleração da β -oxidação (Oyanagi et al., 2008).

As ações antioxidantes da L-carnitina também foram avaliadas num estudo em que o ácido linoléico foi usado como indutor de peroxidação lipídica. Os compostos α -tocoferol e trolox foram usados como antioxidantes de referência para comparação dos efeitos antioxidantes da L-carnitina. Nas concentrações de 15, 30 e 45 $\mu\text{g/ml}$, a L-carnitina mostrou 94,6%, 95,4% e 97,1% de inibição da peroxidação lipídica respectivamente, enquanto que 45 $\mu\text{g/ml}$ dos antioxidantes padrões apresentaram uma inibição de 88,8% e 86,2%, respectivamente (Gülçin, 2005).

Arduini et al. (2004) apresentaram dados recentes bastante relevantes num estudo feito para avaliar a ação protetora da L-carnitina na miotoxicidade. Nesta

pesquisa, ratos jovens foram tratados com doses miotóxicas de sinvastatina, em combinação ou não com L-carnitina. Os resultados observados revelaram os efeitos preventivos e terapêuticos da L-carnitina nas miopatias causadas por estatinas. Altas doses de sinvastatina produziram elevados níveis de creatina quinase no plasma quando comparados ao controle, efeito revertido pela co-administração de L-carnitina. Também foi observado que a L-carnitina impediu a elevação das transaminases hepáticas, AST e ALT. Os animais tratados com sinvastatina também foram avaliados em relação à capacidade motora. Foi verificado que após tratamento com altas doses de sinvastatina, a capacidade dos animais caminharem em esteiras foi severamente prejudicada em relação ao grupo controle. Quando a L-carnitina foi usada em associação com a sinvastatina foi observada uma melhora significativa nesses animais. Este e outros estudos sustentam o conceito de que pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de quantificar o efeito protetor da L-carnitina frente à administração de estatinas.

1.3 – Piracetam

Piracetam, 2-pirrolidona acetamida, é um derivado cíclico do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA), originalmente comercializado em 1971 pela UCB (*Union chimique belge*) Pharma. Foi a primeira droga nootrópica, ou seja, um potencializador da cognição, cuja função é melhorar a memória e desempenho cognitivo sem causar sedação ou estimulação (Giurgea, 1972). O mecanismo de ação do piracetam não foi totalmente elucidado, porém sua influência nas funções neuronal e vascular já é conhecida. Há ainda evidências de que o benefício do piracetam vá além da ação nootrópica sendo indicado seu uso em vertigem, dislexia, anemia falciforme e desordens cognitivas relacionadas a idade.

Apesar do piracetam ser um derivado do GABA, seu mecanismo de ação parece não estar relacionado às propriedades desse neurotransmissor. O exato mecanismo de ação do piracetam ainda é alvo de debates, mas há evidências crescentes de que seu efeito fundamental seja na restauração da fluidez de membrana celular (Winblad, 2005). A fluidez de membrana é importante para uma série de atividades incluindo transporte,

atividade enzimática, secreção química e ligação a receptores (Alberts et al., 1994; Crews, 1982).

A interação do piracetam com membranas celulares foi primeiramente testada num estudo onde o piracetam parcialmente preveniu mudanças relacionadas ao álcool numa monocamada de fosfatilcolina sintética (Fassoulaki et al., 1985). Essas observações foram posteriormente confirmadas por um estudo de espectroscopia de ressonância magnética envolvendo membranas artificiais, que mostrou moléculas de piracetam envolvendo o grupo polar de fosfolípideos. Isso resulta na formação de um complexo móvel droga-lípide, o qual induz a reorganização de lipídeos de membrana melhorando sua fluidez e função (Peuvot et al., 1995). Essa interação também foi observada em outro estudo *in vitro* que investigou o efeito tóxico de agregados do peptídeo amilóide, que causa desorganização lipídica, em membranas neuronais. Após incubação com piracetam foi observada uma diminuição significativa dos efeitos de instabilidade de membrana causados pelo peptídeo amilóide (Mingeot-Leclercq et al., 2003). O efeito do piracetam na restauração da fluidez de membrana também foi avaliado em processos de envelhecimento celular. Müller et al. (1999) mostraram que o piracetam restaurou a fluidez de membranas cerebrais de ratos velhos, mas não apresentou efeito em membranas de ratos jovens. Efeitos protetores similares também foram observados em membranas de hipocampo de pacientes com doença de Alzheimer (Eckert et al., 1999).

Os benefícios do piracetam também foram observados na função vascular. Em eritrócitos, o piracetam diminui a adesão dos mesmos ao endotélio facilitando seu movimento na circulação (Nalbandian et al., 1983) além de estimular a síntese de prostaciclina, que é um vasodilatador, e inibir a agregação plaquetária (Moriau et al. 1993).

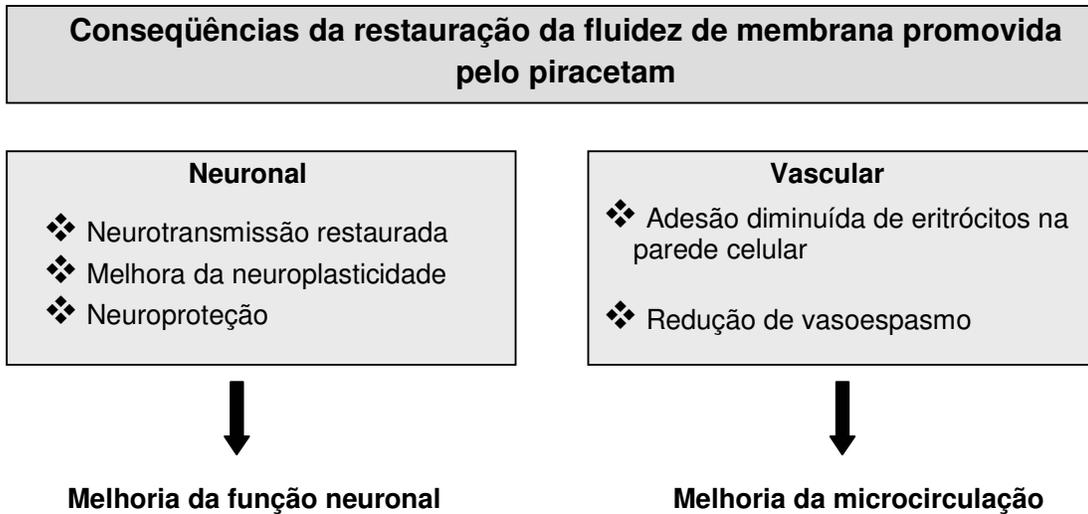


Figura 4 – Efeito do piracetam na fluidez de membrana. A restauração da fluidez de membrana promovida pelo piracetam leva a uma série de benefícios fisiológicos neuronal e vascular. Adaptado de Winblad, 2005.

O efeito do piracetam na disfunção mitocondrial seguida de estresse oxidativo foi investigado num recente trabalho usando-se células PC12 (células de feocromocitoma de rato) e células dissociadas de cérebro de animais tratados com piracetam. O tratamento com piracetam melhorou o potencial de membrana mitocondrial e a produção de ATP, bem como reduziu a atividade de caspase 9 depois do tratamento com nitroprussiato de sódio (SNP) nas células PC12. O tratamento *in vivo* com o piracetam apresentou resultados semelhantes ao da célula PC12, melhorando o potencial de membrana mitocondrial e os níveis de ATP (Keil et al., 2006).

1.4 - Mitocôndria e morte celular

Durante a segunda metade do século XX, a mitocôndria era considerada uma organela cuja função se restringia à produção de energia através da fosforilação oxidativa. Contudo, cerca de uma década atrás, ficou claro que a mitocôndria tinha uma segunda função crucial: o controle da morte celular.

Segundo Kroemer et al., 2007, essa morte pode ser classificada em: apoptose, necrose, autofagia e catástrofe mitótica. A apoptose é um mecanismo pré-determinado geneticamente que pode ocorrer através de várias cascatas de sinalização, as quais podem ser divididas em via extrínseca e intrínseca. A apoptose pela via extrínseca é caracterizada pela ativação de receptores de membrana localizados na superfície celular, enquanto a apoptose pela via intrínseca é resultado de cascatas de eventos intracelulares nas quais a permeabilização mitocondrial tem um papel fundamental.

A apoptose mediada pela mitocôndria pode ocorrer através da via intrínseca ou da comunicação entre as vias extrínseca e intrínseca promovida pela proteína Bid. A apoptose é iniciada quando proteínas do espaço intermembrana mitocondrial, como o citocromo c, os fatores indutores de apoptose e as pró-caspases, são liberadas dessa organela e vão para o citosol (Liu et al., 1996, Susin et al, 1999, Zhivotovsky et al., 1999). Essa liberação geralmente envolve somente a membrana mitocondrial externa pela permeabilização causada por proteínas da família Bcl-2, uma situação em que há a vantagem de manter a membrana interna íntegra e portanto, a fosforilação oxidativa se mantém em funcionamento (Crompton, 1999). Contudo, a mitocôndria também pode liberar fatores apoptogênicos depois que sua membrana interna for danificada ou permeabilizada por TPM, levando ao inchamento da matriz e à ruptura da membrana externa (Green & Reed, 1998). Essa forma de apoptose ocorre quando as células são danificadas de alguma forma que seja capaz de induzir a TPM, e, por isso, é frequentemente vista em associação com a morte celular por necrose. Sob essas condições, o fator determinante que leva à apoptose ou à necrose será a capacidade de manter os níveis fisiológicos de ATP intracelular (Leist et al., 1997). Portanto, além de causar necrose, a TPM pode levar à apoptose, uma vez que essas organelas contêm

proteínas envolvidas nesse processo como o citocromo c, fatores indutores de apoptose e pró-caspases (Liu et al., 1996, Susin et al., 1999, Zhivotovsky et al., 1999).

A decisão da célula de morrer por necrose ou apoptose é ditada pelo menos em parte pela abundância de energia celular armazenada. Enquanto a apoptose requer uma quantidade mínima de ATP intracelular, a necrose é geralmente acompanhada pelo seu esgotamento total (Nicotera et al., 1998). Assim a necrose pode ser vista como um tipo de morte acidental, não geneticamente determinada e ocorrendo dentro de um curto período após o insulto desencadeante (2-4 h). A aparência final das células necróticas é altamente dependente da gravidade da lesão. As principais características da necrose incluem um ganho de volume da célula (oncoses) que leva à ruptura da membrana plasmática e desmantelamento desorganizado de organelas inchadas.

A necrose é considerada prejudicial, porque muitas vezes é associada à perda celular patológica e por promover inflamação local, o que pode sustentar o crescimento de tumores (Vakkila et al., 2004). Recentemente os eventos moleculares que ocorrem durante a morte celular induzida por TNF tem sido investigados em maiores detalhes, o que tem revelado uma contribuição da ativação de caspase e síntese de proteína para necrose (Kromer & Martin, 2005; Saelens et al., 2005). Essas observações argumentam contra o conceito de que a necrose é uma morte meramente acidental e sugere que ela pode ser parcialmente determinada pela célula e não só pelo estímulo recebido, envolvendo enzimas celulares, o que implica que a necrose é sujeita à regulação. Um estudo recente demonstrou que a quinase PIR (proteína que interage com receptor), essencial para a ocorrência de necrose induzida por TNF, pode inibir a troca ATP/ADP nas membranas mitocondriais através de uma interação direta com o translocador nucleotídeo de adenina (ANT), causando disfunção mitocondrial e morte celular (Temkin et al., 2006). Assim as alterações mitocondriais podem constituir um passo limitante da morte celular por necrose.

A autofagia é um fenômeno lento e localizado, no qual partes do citoplasma são seqüestrados em vacúolos de membrana dupla e digeridos por hidrolases lisossomais, o que pode levar a morte celular ou constituir uma defesa da célula contra estresses agudos, principalmente os induzidos por privação de nutrientes. A catástrofe mitótica representa um tipo de morte celular que ocorre durante a mitose e é resultado

de uma deficiência de pontos de checagem do ciclo celular, principalmente nos pontos de checagem de danos ao DNA e da formação do fuso mitótico e de danos celulares.

Todos os tipos de morte celular podem ter a participação mitocondrial através da permeabilização de membrana mitocondrial interna e/ou externa. A permeabilização da membrana interna é resultado da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) enquanto a permeabilização da membrana externa pode ocorrer como consequência da permeabilização da membrana interna ou por ação de proteínas pró-apoptóticas da família de proteínas Bcl-2 (Bax, Bid, Bad) (Cory et al, 2003).

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é caracterizada por permeabilização não-seletiva da membrana interna da mitocôndria promovida pelo estresse oxidativo (acúmulo de EROs – espécies reativas de oxigênio) e pelo acúmulo do íon Ca^{2+} , em um processo estimulado por vários compostos e por várias condições (Kowaltowski et al., 2001, Gunter et al, 2004). A Figura 5 apresenta os eventos que culminam em TPM.

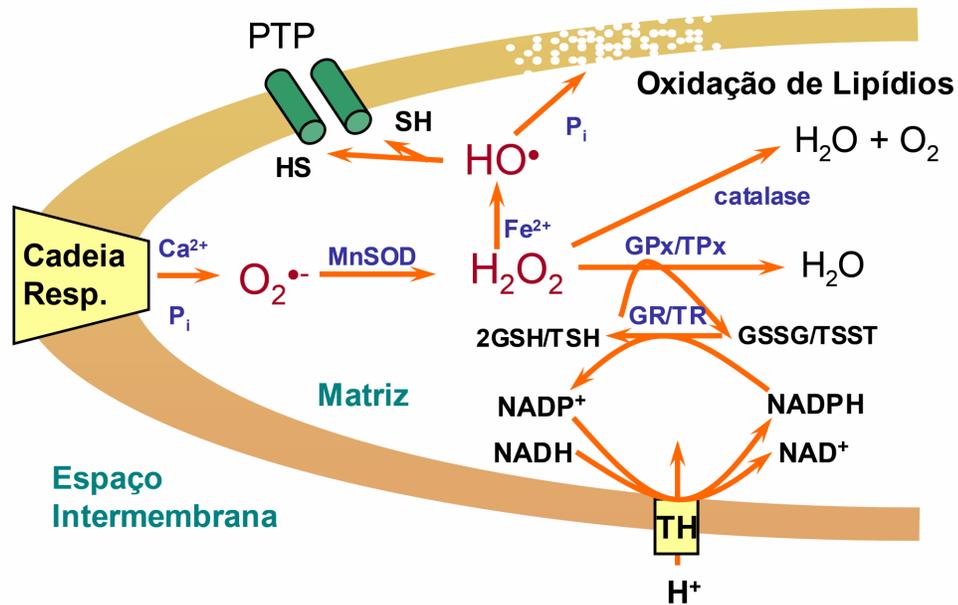


Figura 5- TPM induzida por aumento de Ca^{2+} e acúmulo de EROs. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, gera constantemente pequenas quantidades de radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Esses radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), a qual promove a geração de H_2O_2 . O H_2O_2 é reduzido à H_2O pelas enzimas glutaciona peroxidase (GPx), tiorredoxina peroxidase (TPx) ou catalase (em mitocôndria de coração). A glutaciona (GSH), oxidada pela GPx, e a tiorredoxina (TSH), oxidada pela TPx são recuperadas pela glutaciona e pela tiorredoxina redutases (GR e TR), as quais utilizam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz NADP^+ usando NADP transidrogenase (TH). Quando a geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ aumenta na presença de Ca^{2+} e P_i , e/ou quando os mecanismos de remoção de H_2O_2 estão desativados, H_2O_2 acumula-se em grandes quantidades e na presença de Fe^{2+} gera o radical hidroxil (OH^\bullet) altamente reativo. OH^\bullet oxida grupos tiólicos (-SH) de proteínas de membranas específicas levando à abertura do poro. OH^\bullet também pode promover permeabilização da membrana interna através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i (Kowaltowski et al., 2001).

O fenômeno da TPM foi primeiramente caracterizado por Hunter e Haworth no final dos anos 70, quando sugeriu-se ser o resultado da abertura de um poro de tamanho de aproximadamente 1,5 KDa na membrana mitocondrial interna (Haworth & Hunter, 1979). Em 1990, Fagian et al. (1990), sugeriram a hipótese de polímeros protéicos na membrana mitocondrial interna, via ligações S-S, confirmado por eletroforese em SDS-PAGE de mitoplastos (mitocôndrias desprovidas de membrana externa) expostos a prooxidantes.

Apesar do grande número de investigações científicas, a natureza das alterações de membrana que levam a TPM ainda permanece em debate. Alguns autores sugerem a participação de outras proteínas de membrana externa na formação do poro: VDAC (canal aniônico voltagem dependente), o ANT (translocador de nucleotídeos de adenina) e ciclofilina D (Cy D), um membro da família das isomerases (Haworth & Hunter, 1979; Zoratti & Szabo, 1995; Green & Reed, 1998; Woodfield et al. 1998, Crompton, 1999; Scheffler, 2001). Segundo esses autores essas proteínas interagem com sítios específicos entre as membranas mitocôndrias externa e interna e formam a estrutura básica do poro de transição de permeabilidade mitocondrial interagindo possivelmente com outros constituintes, incluindo o receptor benzodiazepínico, bem como a creatina e adenilato quinases (Zoratti & Szabo, 1995; Crompton et al. 1998; Green & reed, 1998; Crompton, 1999, 2000; Breckernridge & Xue, 2004).

Resultados pilotos do nosso laboratório (dados não publicados), usando-se mitocôndrias e mitoplastos mostram que a abertura do poro de transição de permeabilidade pode ocorrer sem a participação de componentes de membrana externa. A ciclosporina A (CsA) e o boncrecato (BA) são inibidores da abertura do PTP, e conseqüentemente da TPM (Halestrap et al., 1997 e Halestrap et al., 2003) por se ligarem à ciclofilina D e ao translocador de nucleotídeos de adenina, respectivamente. Muitas condições que levam a danos mitocondriais com enfraquecimento da função mitocondrial, como a TPM, causam morte celular por necrose (Kroemer et al, 1998; Crompton, 1999).

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Resultados do nosso grupo demonstraram que o tratamento de células de tumor de próstata (PC-3) por sinvastatina numa concentração de 60 μ M causava morte celular por necrose decorrente da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (Oliveira et al., 2008).

Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar o efeito protetor de L-carnitina ou piracetam sobre a morte por necrose de células PC-3 tratadas com sinvastatina.

2.2 - Objetivos específicos

2.2.1 - Avaliar a ação protetora de L-carnitina ou piracetam na necrose de células PC-3 causada por sinvastatina.

2.2.2 - Avaliar a ação protetora de L-carnitina ou piracetam na necrose de células PC-3 causada por outro indutor de morte celular, o tert-butyl hidroperóxido.

2.2.3 - Analisar o efeito protetor da L-carnitina ou piracetam na função mitocondrial de células PC-3 durante o processo de morte celular causado por sinvastatina ou tert-butyl hidroperóxido, através do monitoramento do potencial elétrico de membrana mitocondrial e do consumo de O_2 .

2.2.4 - Verificar o efeito protetor da L-carnitina ou piracetam na morte celular de fibroblastos (GN16-P6) e queratinócitos (HaCaT) tratados com sinvastatina.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Reagentes

Sinvastatina foi adquirida da empresa Galena Química e Farmacêutica Ltda (Campinas, SP, Brasil). L-carnitina foi obtida da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Piracetam foi obtido da empresa BioLab Farmacêutica (São Paulo, SP, Brasil). Todos os demais reagentes utilizados nesse trabalho foram obtidos das empresas Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Cultilab (Campinas, SP, Brasil) e Molecular Probes (Eugene, OR, USA). A sinvastatina foi diluída em DMSO e tert-butyl hidroperóxido, L-carnitina e piracetam foram diluídos em água.

3.2- Cultura de células

Células PC-3 foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*). Elas foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e HEPES 10 mM (pH 7,4). A linhagem celular não tumorigênica HaCaT, derivada de queratinócitos humanos foi adquirida da Cell Line Service (CLS, Heidelberg, Alemanha). A linhagem celular não tumorigênica GN16-P6 derivada de fibroblastos foi obtida através de biópsia de gengiva normal e gentilmente cedida pelo professor Dr. Ricardo Della Coletta (Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, Unicamp). Ambas as linhagens não tumorigências foram cultivadas em meio DMEN contendo alta glicose suplementado com SFB 10%, gentamicina 100 µg/ml, penicilina 100 IU/ml e estreptomicina 100 mg/ml. Todas as linhagens celulares foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera de ar com CO₂ 5%. A confluência das células foi mantida menor que 80%.

A viabilidade celular foi avaliada previamente ao preparo dos experimentos e somente garrafas com células que apresentaram viabilidade acima de 90% foram utilizadas. A viabilidade e a proliferação celular também foram avaliadas durante os experimentos realizados. Para isso, as células foram tratadas com solução de tripsina 0,25% e EDTA 0,03% para se desprenderem das garrafas e amostras dessas células foram encubadas com azul de trypan 0,1%, contadas em câmara de Neubauer e visualizadas por microscopia de luz. Foram consideradas inviáveis as células que estavam marcadas com azul de trypan ou que apresentavam morfologia apoptótica (corpos apoptóticos e *shrinkage*).

3.3- Citometria de fluxo

Para os experimentos utilizando a citometria de fluxo, as amostras foram analisadas no citômetro FACSCalibur System equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). As populações de células foram analisadas através de suas características de reflexão de luz e analisadas pela intensidade do sinal fluorescente da sonda utilizada. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

3.3.1- Avaliação de taxas de morte celular

As porcentagens de morte celular apoptótica e necrótica foram determinadas por citometria de fluxo, utilizando-se os marcadores anexina V-FITC (AV) e iodeto de propídio (IP). Depois de serem desprendidas das garrafas com tripsina 0,25% e EDTA 0,03%, após 24 h de manutenção em cultura, a viabilidade celular foi verificada com azul de trypan 0,1% e 1×10^6 das células viáveis foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após 24 h, essas células plaqueadas, foram tratadas com sinvastatina ou t-BOOH e L-carnitina ou piracetam por 2 h. Após esse período, elas foram lavadas com PBS, desprendidas das placas com tripsina 0,25% e EDTA 0,03%, e ressuspensas em tampão de ligação (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM e $CaCl_2$ 1,8 mM) contendo AV 1:500. Depois de 20 minutos de incubação em temperatura ambiente acrescentou-se IP 1:50 e as leituras foram realizadas a seguir. A apoptose e a necrose foram quantificadas como porcentagem de células AV^+/IP^- e IP^+ , respectivamente.

3.4- Determinação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi estimado em células permeabilizadas com digitonina através de alterações de fluorescência de safranina O, utilizando-se um espectrofluorímetro (Hitachi, modelo F4500, Tokyo, Japão) operando nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 495 e 586, respectivamente. O indicador safranina O se adsorve em membranas de mitocôndrias energizadas, o que causa alteração do seu espectro de fluorescência proporcional à amplitude do potencial até valores de aproximadamente 170-180 mV (Akerman & Wiström, 1976).

Após 30 min. de tratamento, as células PC-3 foram desprendidas das placas de 60 mm com tripsina 0,25% e EDTA 0,03%, ressuspendidas em meio de reação (sacarose 125 mM, KCl 65 mM (pH 7,2), Na₂HPO₄ 2,5 mM, EGTA 0,33 mM) contendo a sonda safranina O 5 μM e o substrato respiratório succinato 5 μM, e permeabilizadas com digitonina 20 μM. Durante os experimentos as amostras foram mantidas sob constante agitação a 37 °C. O protonóforo CCCP 1 μM foi utilizado para dissipar o $\Delta\Psi_m$ e permitir a comparação das diferenças de amplitude do $\Delta\Psi_m$ entre as células controle e as células tratadas.

3.5- Determinação do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio pelas células foi medido utilizando-se um eletrodo tipo Clark (Hansatech II Instruments Limited, Norfolk, UK). Após 30 min. de tratamento, as células PC-3 (10⁶ células) foram desprendidas das placas de 60 mm com tripsina 0,25% e EDTA 0,03% e adicionadas ao meio de reação (descrito no item anterior) 0,5 ml em uma câmara de acrílico fechada equipada com agitador magnético. As células foram mantidas sob constante agitação a 37 °C. Nessa condição experimental, a concentração inicial de oxigênio é de 107,5 nmol (Robinson & Cooper, 1970). As velocidades do consumo de O₂ das células permeabilizadas com digitonina 20 μM foram avaliadas após a adição de ADP 40 μM e CAT 4 μM.

A fosforilação oxidativa foi analisada pelo cálculo do controle respiratório (CR), razão entre as velocidades de consumo de oxigênio nos estados de respiração III e IV, ou seja, respiração de fosforilação e de repouso, respectivamente.

3.6- Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 6 experimentos independentes, exceto para os experimentos de potencial de membrana e respiração celular (n=4). O “n” se refere ao número de experimentos realizados com preparações biológicas independentes. Comparações entre os grupos foram realizadas utilizando

one-way Analysis of Variance (ANOVA) com análise pelo pós-teste Kruskal-Wallis.
Considerou-se significativo $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Testes Dose-Resposta

Inicialmente foram realizados experimentos dose-resposta para avaliar o efeito protetor da L-carnitina (L-c) e do piracetam (pira) contra a morte de células PC-3 tratadas com sinvastatina (Sin) 60 μ M (Oliveira et al., 2008) ou tert-butyl hidroperóxido (t-BOOH) 500 μ M (Degasperi et al., 2008). Para isso, as células foram incubadas na presença destes compostos durante duas horas e as análises foram feitas utilizando citometria de fluxo. Ambos os compostos causaram efeito protetor em concentrações acima de 4 μ M. Em concentrações de 6 μ M a L-carnitina inibe 97 % (Fig 6 A) e o piracetam 82 % (Fig 6 B) da morte celular por necrose induzida por 60 μ M de sinvastatina.

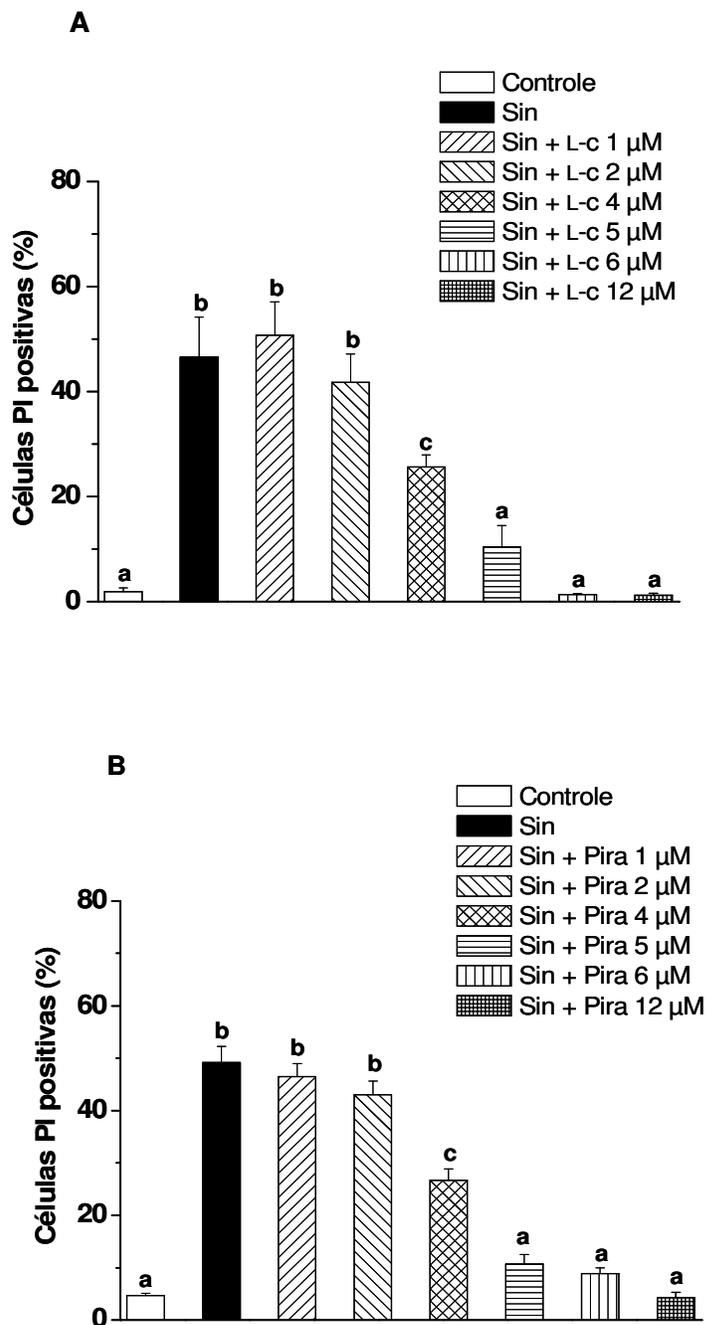


Figura 6- Proteção pela L-carnitina ou piracetam contra a morte de células PC-3 induzida por simvastatina. Curvas dose-resposta de células PC-3 tratadas com simvastatina 60 μ M e L-carnitina (A) ou simvastatina 60 μ M e piracetam (B). Os valores representam a média \pm EPM (n=6). O valor de *p* entre grupos distintos estatisticamente é $< 0,05$.

O experimento da figura 7 analisou a proteção contra morte celular, induzida pelo tert-butyl hidroperóxido (t-BOOH) 500 μ M. Tanto a L-carnitina (Fig 7 A) quanto o piracetam (Fig 7 B) promoveram uma proteção dose dependente superior a 90 % na concentração de 6 μ M.

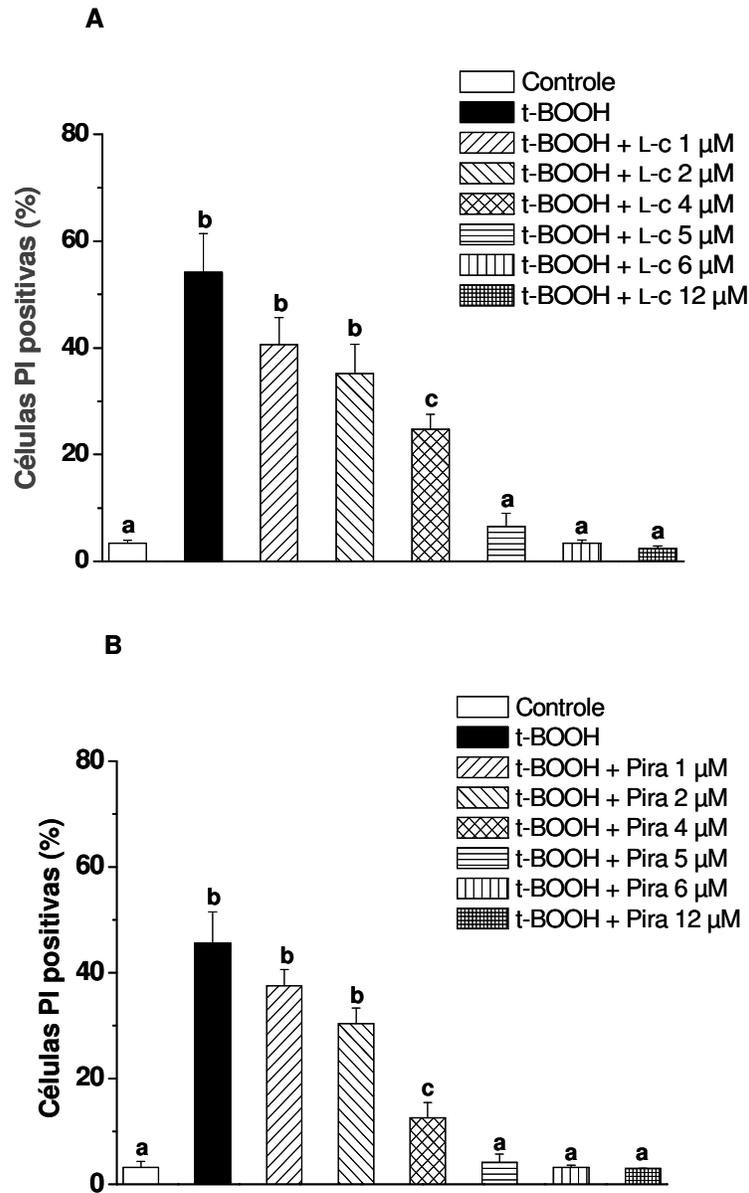


Figura 7- Proteção pela L-carnitina ou piracetam contra a morte de células PC-3 induzida por t-BOOH. Curvas dose-resposta de células PC-3 tratadas com t-BOOH 500 μ M e L-carnitina (A) ou t-BOOH 500 μ M e piracetam (B). Os valores representam média \pm EPM (n=6). O valor de *p* entre grupos distintos estatisticamente é < 0,05.

4.2- Ciclosporina A, L-carnitina ou piracetam protegem contra a disfunção mitocondrial em células PC-3 causada por sinvastatina ou tert-butyl hidroperóxido

Com o objetivo de caracterizar a participação da TPM no processo de necrose, as alterações de $\Delta\Psi_m$ que ocorrem anteriormente ao início da detecção de necrose foram avaliadas. As células PC-3 foram tratadas com sinvastatina (Sin) 60 μM (Fig 8 A) ou tert-butyl hidroperóxido (t-BOOH) 500 μM (Fig 8 B) na presença ou ausência de CsA, L-carnitina ou piracetam. Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas e colocadas em meio de reação (veja metodologia) na presença de safranina O e as alterações de fluorescência foram monitoradas. A permeabilização da membrana plasmática por digitonina permite a entrada de safranina nas células, a qual se adsorve nas membranas das mitocôndrias energizadas diminuindo a quantidade de fluorescência emitida. O carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP), protonóforo que leva a eliminação de $\Delta\Psi_m$, causa liberação da safranina O das mitocôndrias e permite estimar as diferenças de $\Delta\Psi_m$ ao final dos experimentos. Dessa forma, os resultados mostram que tanto a sinvastatina quanto o tert-butyl hidroperóxido causaram diminuição significativa no $\Delta\Psi_m$ em células PC-3. Os efeitos da diminuição no $\Delta\Psi_m$ foram protegidos por CsA, L-carnitina ou piracetam na mesma faixa de concentração que estes compostos inibem a morte celular.

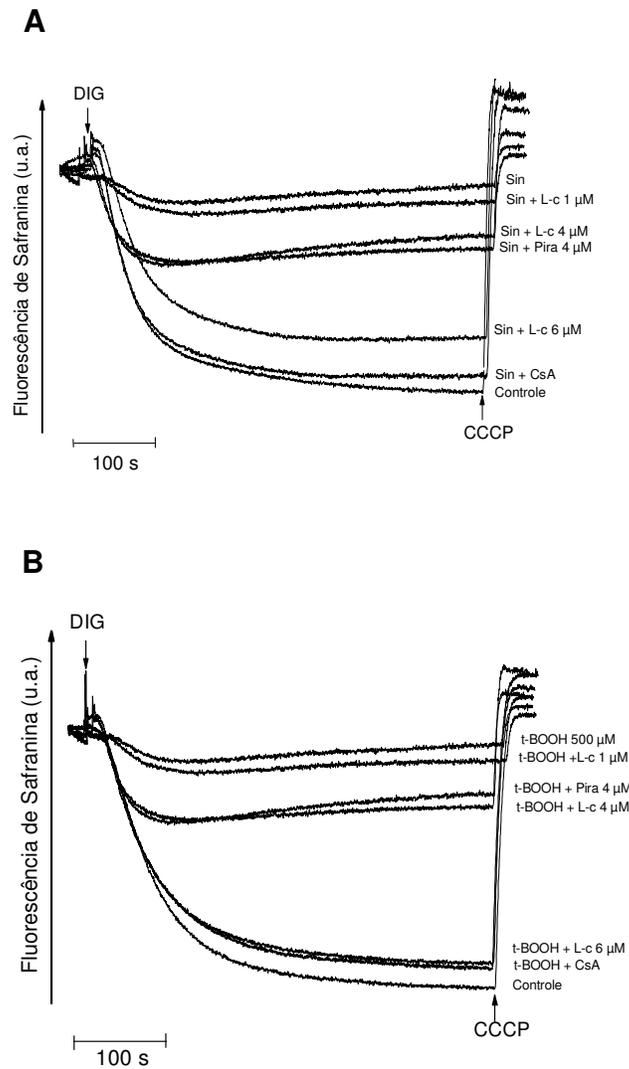


Figura 8- Efeito protetor da L-carnitina, piracetam e CsA à diminuição do $\Delta\Psi_m$ de células PC-3 causado por sinvastatina ou tert-butyl hidroperóxido. Células PC-3 (1×10^6 cels/ml) foram tratadas com sinvastatina (Sin 60 μ M, Fig 8 A) ou tert-butyl hidroperóxido (t-BOOH 500 μ M, Fig 8 B) por 30 min na presença (ou ausência) de ciclosporina A (CsA, 0,5 μ M), L-carnitina (L-c 1 μ M, 4 μ M ou 6 μ M) ou piracetam (Pira 4 μ M) como indicado na figura, lavadas e ressuspendidas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM (pH 7,2), Na_2HPO_4 2,5 mM, EGTA 0,33 mM, safranina O 5 μ M e succinato 5 mM. As setas indicam as adições de digitonina (DIG, 20 μ M) e CCCP 1 μ M. A figura é representativa de quatro experimentos independentes.

Com o objetivo de entender o mecanismo de diminuição de $\Delta\Psi_m$ nos experimentos das figuras 8 A e 8 B analisamos o consumo de oxigênio por estas células incubadas na presença de sinvastatina (Sin) 60 μM (Tabela 1 A) ou tert-butyl hidroperóxido (t-BOOH) 500 μM (Tabela 1 B). Os resultados apresentados nas tabelas 1 A e B mostram que tanto sinvastatina quanto tert-butyl hidroperóxido causam diminuição da respiração de repouso (estado respiratório III) e de fosforilação (estado respiratório IV). Nos dois casos a CsA protege contra a inibição da respiração indicando que esta inibição está associada à abertura do poro de transição de permeabilidade, condição em que o inchamento mitocondrial de grande amplitude causa perda de citocromo c.

A

Grupos	V4	V3	CR
	(nmol O ₂ /10 ⁶ cels/ml/min)	(nmolO ₂ /10 ⁶ cels/ml/min)	
Controle	2.52 ± 0.38*	4.49 ± 0.47*	1.78 ± 0.85
Sin 60 μM	0.99 ± 0.37	1.31 ± 0.03	1.32 ± 0.40
Sin + L-C 6 μM	2.60 ± 0.33*	4.49 ± 0.61*	1.72 ± 0.94
Sin + CsA	2.36 ± 0.24*	3.90 ± 0.42*	1.65 ± 0.66

B

Grupos	V4	V3	CR
	(nmol O ₂ /10 ⁶ cels/ml/min)	(nmolO ₂ /10 ⁶ cels/ml/min)	
Controle	3.18 ± 0.49*	4.33 ± 0.23*	1.36 ± 0.72
t-BOOH 500 μM	1.41 ± 0.21	1.61 ± 0.29	1.14 ± 0.5
t-BOOH + L-C 6 μM	3.54 ± 0.19*	4.64 ± 0.09*	1.31 ± 0.28
t-BOOH + CsA	3.78 ± 0.19*	4.59 ± 0.33*	1.21 ± 0.52

Tabela 1- Diminuição da respiração celular sensível à CsA e L-carnitina no processo de necrose de células PC-3. Células PC-3 (1x10⁶ cels/ml) foram tratadas com sinvastatina (Sin, 60 μM, Tab. 1 A) ou tert-butyl hidroperóxido (t-BOOH, 500 μM, Tab. 1 B) por 30 minutos na presença (ou ausência) de ciclosporina A (CsA, 0,5 μM) ou L-carnitina (6 μM), como indicado na figura, lavadas e ressuspensas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM (pH 7,2), Na₂HPO₄ 2,5 mM, EGTA 0,33 mM e succinato 5 mM. Foram feitas adições digitonina 20 μM, ADP 60 μM, CAT 4 μM e CCCP 1 μM. Os valores da velocidade de respiração representam a média ± EPM (n = 4). CR = controle respiratório. * *p* < 0.05 em relação a sin 60 μM ou t-BOOH 500 μM.

4.3- Proteção contra a morte celular de fibroblastos (GN16-P6) ou queratinócitos (HaCaT) por L-carnitina ou piracetam

Para verificar se a proteção contra morte celular promovida pela L-carnitina ou piracetam, observada em células tumorais PC-3, se aplicaria a outros modelos celulares, testamos os efeitos desses compostos em fibroblastos (GN16-P6) e queratinócitos (HaCaT).

A fim de caracterizar o(s) tipo(s) de morte celular induzido(s) por sinvastatina, GN16-P6 e HaCaT após 2 horas de tratamento com sinvastatina, foram marcadas com AV (anexina V), durante 20 min, e IP (iodeto de propídio) imediatamente antes das leituras para análise de apoptose e necrose, respectivamente. Foi realizada uma curva dose-resposta com ambas as linhagens para verificar em que concentração havia aproximadamente 50 % de morte celular (Figs. 9 A e 9 B).

Com fibroblastos (GN16-P6) foram utilizadas concentrações de sinvastatina de 5 a 60 μM . Verificou-se que 40 μM desse indutor de morte causou 50 % de morte nesse modelo celular, principalmente por necrose (Fig 9 A). Quando queratinócitos foram avaliados verificamos a necessidade de doses maiores de sinvastatina (60-140 μM) para causar morte celular, uma vez que essas células são mais resistentes. A partir dos resultados obtidos, foi escolhida a concentração de 100 μM de sinvastatina por causar 65 % de morte celular (Fig 9 B).

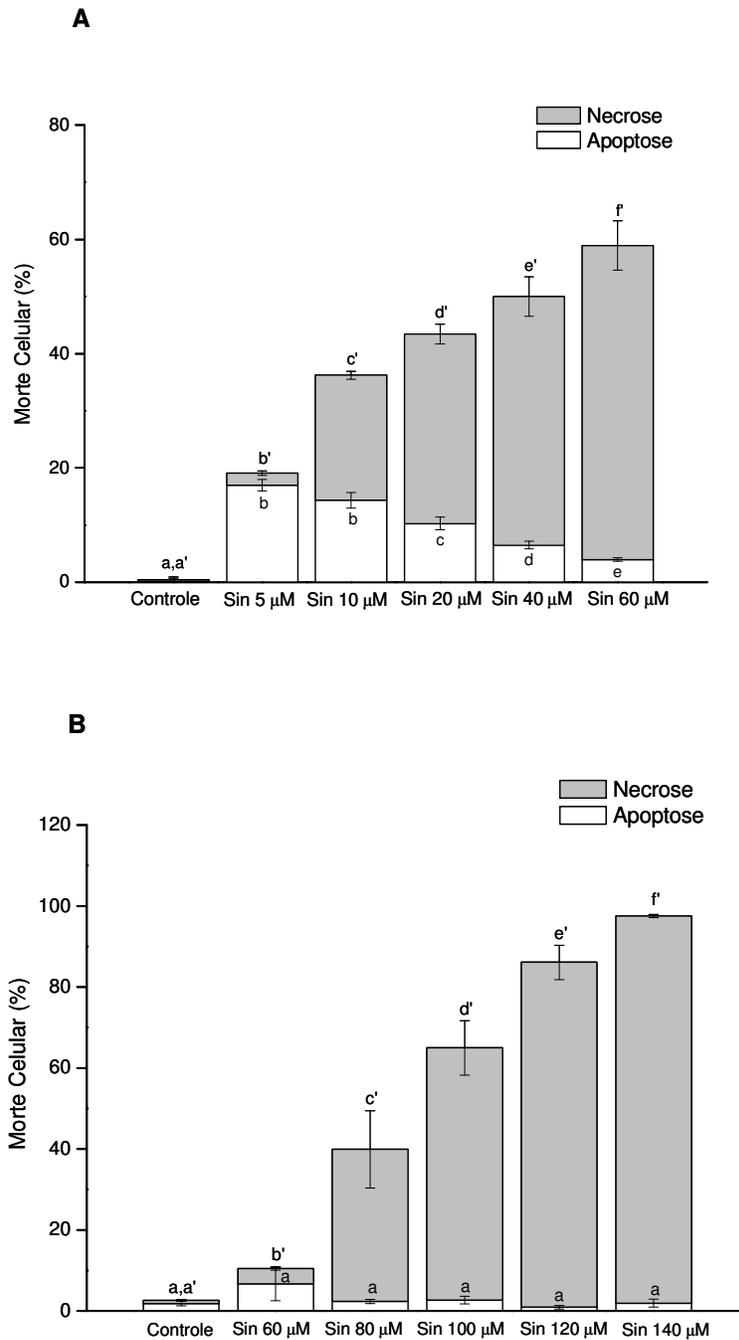


Figura 9 - Morte celular de GN16-P6 e HaCaT por sinvastatina. Curvas dose resposta de células GN16-P6 (A) e HaCaT (B) tratadas com sinvastatina durante 2 h. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). O valor de p entre grupos distintos estatisticamente é $< 0,05$.

Após determinar a concentração de sinvastatina que causava aproximadamente 50 % de morte celular, avaliamos o efeito protetor de L-carnitina ou piracetam em fibroblastos (Fig 10 A) e queratinócitos (Fig 10 B). Tanto a L-carnitina quanto o piracetam foram utilizados na concentração de 6 μ M, uma vez que já tinha sido verificada ação protetora acima de 80 % em células PC-3 nessa concentração. Verificamos que em ambos os modelos, tanto a L-carnitina quanto o piracetam promoveram proteção da morte celular superior a 70 % em fibroblastos e 85 % em queratinócitos.

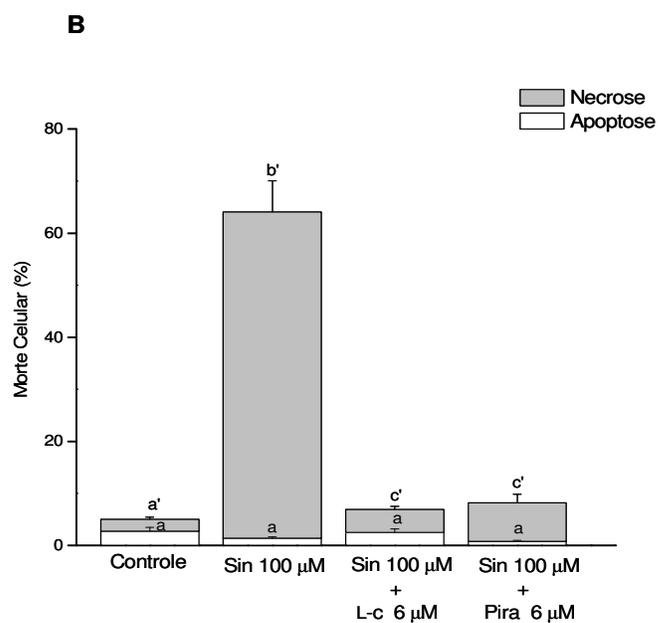
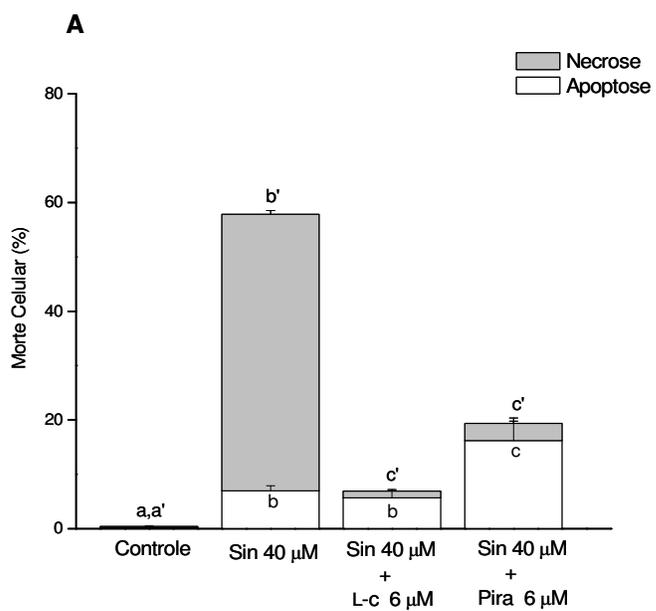


Figura 10- Proteção por L-carnitina ou piracetam contra a morte celular causada por sinvastatina. As células GN16-P6 (A) e HaCaT (B) foram tratadas com sinvastatina 40 µM ou 100 µM, respectivamente na presença de L-carnitina ou piracetam (6 µM). Os valores representam a média \pm EPM (n=6). O valor de p entre grupos distintos estatisticamente é $< 0,05$.

5- DISCUSSÃO

As estatinas, inibidoras da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, reduzem as concentrações de colesterol no sangue através do bloqueio da etapa limitante da via do mevalonato. São drogas amplamente usadas em pacientes com hipercolesterolemias para reduzir os riscos cardiovasculares (Shepherd et al., 1995). Contudo as estatinas ocasionalmente induzem miotoxicidade bem como miopatia e rabdomiólise, além de ocasionar a morte de alguns tipos celulares (Yasuda et al., 2005; Itagaki et al., 2009; Oliveira et al., 2008; Sirvent et al., 2008)

A L-carnitina é sintetizada a partir de dois aminoácidos essenciais, a lisina e a metionina e é transportada para os músculos cardíaco e esquelético depois de ser produzida no fígado e rim. Sua função é transportar os ácidos graxos de cadeia longa para a matriz mitocondrial onde serão oxidados (Brevetti e Perna, 1992; Visioli et al., 1992). Ela também é conhecida por sua ação antioxidante, prevenindo o acúmulo dos produtos finais da oxidação de lipídeos (Lowitt et al., 1995; Fabriello e Calabrese, 1988). O piracetam, é uma droga nootrópica, isso é, atua melhorando o desempenho cognitivo. É usado em muitos países para tratar disfunções cognitivas relacionadas à idade, injúrias cerebrais, bem como demência. Seu mecanismo de ação ainda é alvo de muitos debates, mas há evidências crescentes de que seu fundamental efeito seja na melhora da fluidez de membrana celular. (Croisile et al., 1993; Waegemans et al., 2002). No presente estudo avaliamos as ações protetoras da L-carnitina e do piracetam contra a morte celular por necrose causada por sinvastatina em células de tumor de próstata PC-3, fibroblastos (GN16-P6) ou queratinócitos (HaCaT).

A maioria dos estudos *in vitro* mostram que as estatinas (1-200 μM) causam morte celular principalmente pelo processo de apoptose (Demierre et al., 2005), a qual pode ocorrer por mecanismos distintos em tipos celulares diferentes (Hindler et al., 2006). No trabalho de Oliveira et al., (2008) nosso grupo mostrou que sinvastatina 10 μM causa apoptose em células LNCaP e PC-3, mas que em maiores concentrações (60 μM) a morte é predominantemente por necrose. Esse efeito de morte por necrose em células PC-3 observado anteriormente, foi inibido de forma dose-dependente tanto por L-carnitina como por piracetam, ambos na faixa de concentração de 1-12 μM (Figs. 6 A e 6 B). Mostramos também que ambos os compostos, L-carnitina e piracetam, protegem as mitocôndrias de células PC-3 contra a perda de potencial elétrico de membrana mitocondrial (Figs. 8 A e 8 B) e das quedas nas velocidades de respiração (Tabela 1 A e

1 B). Esses resultados reforçam a hipótese de que o efeito tóxico dessa estatina é mediado por alteração funcional das mitocôndrias (Velho et al., 2006; Oliveira et al., 2008). Como estes efeitos da estatina sobre as mitocôndrias são também protegidos por ciclosporina A, nossos dados comprovam, usando novos protocolos, que tanto L-carnitina como piracetam são protetores da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial.

A morte celular causada por sinvastatina na linhagem celular PC-3 concorda com o trabalho de Ukomadu & Dutta (2003), mostrando que, a sinvastatina bloqueia o crescimento celular na fase de transição de G1 para S em linhagens de câncer de próstata. Esse mesmo efeito foi também observado em linhagens de câncer de mama (Rao et al., 1998). De uma maneira geral, a parada do ciclo celular, induzida por sinvastatina, que ocorre na fase G1 parece estar relacionada com a inibição da síntese de mevalonato. A deficiência deste composto leva à morte celular devido à não prenilação das proteínas GTPases Ras e Rho. Isso inviabiliza a transdução de sinais de vários receptores de membrana essenciais à transcrição de genes relacionados à proliferação celular (Soma et al., 1992). A literatura também relata a ação de estatinas em outros modelos de células tumorais como leucemia, mesotelioma, astrocitoma, câncer cervical, de cabeça e de pescoço (Rubins et al., 1998; Bouterfa et al., 2000; Dimitroulakos et al., 2001; Dimitroulakos et al., 2002; Koyuturk et al., 2007), e também em células não tumorais, como fibroblastos e linfoblastos (Yasuda et al., 2005; Itagaki et al., 2009).

Enquanto o presente trabalho mostrou uma ação protetora da L-carnitina, contra a morte celular induzida pela sinvastatina em células PC-3, numa faixa de concentração de 1-12 μ M (Fig. 6 A e 6 B), Pastorino et al. (1993) usaram L-carnitina numa faixa de concentração duas ordens de grandeza superior (2 mM) para proteger culturas de hepatócitos contra a morte celular. Estes autores também propuseram que a proteção por L-carnitina era mediada por inibição de abertura do poro de transição de permeabilidade uma vez que nas mesmas condições experimentais os hepatócitos eram também protegidos por CsA. Em nossos experimentos as ações protetoras tanto de L-carnitina quanto de piracetam foram também testadas em células PC-3 frente à toxicidade induzida por tert-butyl hidroperóxido (t-BOOH), indutor clássico de TPM via geração de estresse oxidativo e oxidação de tióis protéicos da membrana mitocondrial interna (Degasperi et al., 2008). Os resultados obtidos com o t-BOOH (Fig. 7 A e 7 B)

confirmaram a ação protetora da L-carnitina e do piracetam contra a TPM e a consequente morte por necrose. A proteção contra a TPM induzida por t-BOOH confirma a ação antioxidante destes dois compostos.

Os resultados obtidos por Oliveira et. al., (2008) já indicavam a participação da TPM na indução de necrose por sinvastatina, na concentração de 60 μM , uma vez que a redução de $\Delta\Psi_m$ e da respiração celular que precedia a morte celular eram bloqueados por CsA. Essa diminuição do $\Delta\Psi_m$ leva à morte celular por impedir a fosforilação oxidativa, que é dependente do acoplamento entre o potencial eletroquímico transmembrana e a fosforilação de ADP (Mitchell, 1961).

Na avaliação da disfunção mitocondrial, quando as células PC-3 foram tratadas com sinvastatina ou t-BOOH e L-carnitina, houve proteção da TPM (Fig. 8 A e 8 B) e das quedas nas velocidades de respiração tanto de estado III como de estado IV (Tabela 1 A e 1 B). Tanto o $\Delta\Psi_m$ quanto a capacidade de respiração residuais mostrados nesses experimentos explicam a ocorrência de sobrevivência de aproximadamente 50 % de células no período de tempo estudado. Como a fosforilação oxidativa exige potencial elétrico superior a 130 mV, podemos concluir que o potencial residual é remanescente das mitocôndrias das células sobreviventes que não perderam a capacidade de fosforilação oxidativa.

A ação protetora da L-carnitina contra a disfunção mitocondrial já havia sido também evidenciada por Furuno et. al. (2001) que mostraram proteção da L-carnitina na redução da respiração e na TPM induzidos por palmitoil Coa, em mitocôndrias de fígado de rato. No trabalho de Oyanagi et al., (2008) foi visto que a L-carnitina protege contra a TPM causada pelo ácido oléico prevenindo assim a despolarização de membrana, inibição da respiração e liberação de citocromo *c* em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A L-carnitina também foi testada em mitocôndrias de fígado de rato tratadas com o hormônio tireóideo T-3. Neste estudo, ela também protegeu contra a TPM, induzida por esse hormônio (Kashiwagi et al, 2001). Esses últimos três trabalhos propõem que a L-carnitina protege contra os efeitos do ácido oléico e do hormônio T-3 por acelerar a β -oxidação, através da regulação do metabolismo dos ácidos graxos.

A L-carnitina também apresentou resultados bastante relevantes em células neuronais expostas à estresse oxidativo. Assim, Virmani et al. (2003), demonstraram que

após tratamento de ratos com metanfetamina, a L-carnitina reduziu significativamente a produção de 3- nitrotirosina (3-NT), um marcador de estresse nitrosativo, em estriatum de ratos adultos machos, por aumentar a produção de dopamina. Outro trabalho também mostrou que a L-carnitina protege contra a disfunção mitocondrial induzida por ácido 3-nitropropiónico (3-NPA) em ratos machos adultos Sprague-Dawley. É conhecido que o 3-NPA diminui os níveis de ATP neuronal via inibição da succinato desidrogenase no complexo II da cadeia transportadora de elétrons. Os autores acreditam que a L-carnitina, nesse caso, aumenta o metabolismo mitocondrial e juntamente com a sua forma acetilada, a acetil L-carnitina, via transferência de grupamentos acetil, desempenham um importante papel modulatório em vias de transdução de sinais neurotransmissores e expressão gênica em células neuronais (Binienda, 2003). A literatura também apresenta trabalhos associando o efeito de proteção celular exercido pela L-carnitina à sua ação antioxidante, uma vez que a mesma é capaz de formar complexos com o ferro livre impedindo, dessa forma, a peroxidação lipídica exercida pelo ácido oléico, por exemplo (Gülçin, 2005).

A mesma associação que usamos no nosso trabalho, sinvastatina + L-carnitina, foi também analisada em modelos de miopatias causadas por estatinas (Arduini et al. 2004). Neste estudo, ratos jovens foram tratados com doses miotóxicas de sinvastatina (210 mg Kg^{-1}), em combinação ou não com L-carnitina (200 mg Kg^{-1}). Foi observado que a L-carnitina impediu a elevação das transaminases hepáticas, AST e ALT e reduziu os níveis plasmáticos de creatina quinase. Esses animais tratados com sinvastatina também foram avaliados em relação à capacidade motora. Foi verificado que após tratamento com altas doses de sinvastatina, a capacidade dos animais caminharem em esteiras foi severamente prejudicada, efeito esse revertido significativamente após administração da associação, sinvastatina + L-carnitina.

Nos nossos resultados observamos que da mesma forma que a L-carnitina, o piracetam também protege contra a morte celular induzida tanto por sinvastatina quanto por t-BOOH (Fig 6 B e 7 B) e que em concentração intermediária ($4 \mu\text{M}$) protege parcialmente as células PC-3 da disfunção mitocondrial (Fig. 8 A e 8 B) causadas por ambos os indutores de morte. O exato mecanismo de ação do piracetam, como citado anteriormente, ainda é alvo de muitos debates, contudo há evidências crescentes de que seu efeito fundamental seja na restauração da fluidez de membrana celular (Winblad,

2005), regulando assim funções de transporte, atividade enzimática, secreção química e ligação a receptores (Crews, 1982; Alberts et al., 1994).

Em um estudo recente, a ação *in vitro* e *in vivo* do piracetam foi avaliada na disfunção mitocondrial seguida de estresse oxidativo (Keil et al. 2008). No trabalho de Keil et al. (2008) foram avaliadas células PC-12 e células cerebrais de animais tratados com piracetam em associação com nitroprussiato de sódio. Nas concentrações entre 100 e 1000 μM , o tratamento com piracetam melhorou o potencial de membrana mitocondrial e a produção de ATP em células PC-12, além de reduzir a atividade de caspase 9. No tratamento *in vivo* (100-500 mg/Kg^{-1} diário) também houve melhora significativa da função mitocondrial, com redução da produção de H_2O_2 e NO^- em células cerebrais, principalmente em animais velhos. Os autores sugerem que a ação do piracetam seja de inibição da TPM através de suas propriedades de estabilização de membrana.

Posteriormente a ação da sinvastatina foi avaliada em células não tumorais, como fibroblastos (Fig. 9 A) e queratinócitos (Fig. 9 B), uma vez que a literatura também relata alguns efeitos de estatinas em linhagens celulares não transformadas (Yasuda et al., 2005). A toxicidade de estatinas em fibroblastos foi avaliada no trabalho de Itagaki et al., 2009. Neste estudo, fibroblastos (L6) foram tratados com pravastatina, sinvastatina e fluvastatina por 72 h. As estatinas hidrofóbicas, sinvastatinas e fluvastatina, diminuíram a viabilidade celular de maneira dose-dependente e transferiram a localização de RhoA da membrana celular para o citosol.

Nossos resultados revelaram que de forma semelhante ao que ocorre em células tumorais a sinvastatina causou morte celular principalmente por necrose, tanto em fibroblastos (GN16-P6) quanto em queratinócitos (HaCaT) de maneira dose-dependente. No entanto, na linhagem celular HaCaT foi necessário usar concentrações maiores de sinvastatina visto que é uma célula mais resistente, por produzir queratina, que é uma proteína impermeável e responsável pela proteção (Bradbury, 1973). Quando os compostos L-carnitina ou piracetam foram utilizados associados com a sinvastatina (Fig. 10 A e 10 B) verificou-se uma proteção superior a 70 % da morte por necrose em fibroblastos e queratinócitos.

Um dos pontos importantes destes resultados é que o efeito tóxico das estatinas sobre as mitocôndrias ocorre tanto em células tumorais quanto em células não tumorais numa mesma faixa de concentração indicando que não há preferência das estatinas pelas mitocôndrias de células tumorais. Isso questiona o conceito contido em dados da literatura (Rao et al., 1999; Sivaprasad et al., 2006) de que o uso de estatinas tem efeitos benéficos contra o desenvolvimento de tumores nos usuários hipercolesterolêmicos. Esses dados da literatura induzem os leitores a acreditar numa ação preferencial das estatinas na indução de morte de células tumorais.

6- CONCLUSÕES

- ❖ A sinvastatina (60 μM) ou tert-butyl hidroperóxido (500 μM), causam morte predominantemente por necrose em células PC-3, por processo dependente de TPM.

- ❖ L-carnitina e piracetam protegem contra a disfunção mitocondrial e morte de células PC-3 induzida tanto por sinvastatina quanto por tert-butyl hidropéroxido.

- ❖ L-carnitina ou piracetam protegem contra a morte de células não tumorais, fibroblastos (GN16-P6) e queratinócitos (HaCaT).

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. Molecular biology of the cell. Chapter 10. 3rd Edition. New York: Garland publishing Inc., 1994.

Åkerman, KEO & Wikstron, KF. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Lett 68: 191-197, 1976.

Arduini A, Peschechera A, Giannessi F & Carminati P. Improvement of statin-associated myotoxicity by L-carnitine. International Society on Thrombosis and Haemostasis 2: 2270-2271, 2004.

Baer CF, Miyamoto MM, Denver DR : Mutation rate variation in multicellular eukaryotes : causes and consequences. Nat Rev Genet 8 : 619-631, 2007.

Bhardwaj SS, Chalasani N: Lipid-lowering agents that cause drug-induced hepatotoxicity. Clinical Liver Disease 11: 597-613, 2007.

Binienda ZK. Neuroprotective effects of L-carnitine in induced mitochondrial dysfunction. Ann N Y Acad Sci 993: 289-295, 2003.

Borum PR. Carnitine in neonatal nutrition. Journal Child Neuronal 10: 25-31, 1995.

Bouterfa HL, Sattelmeyer V, Czub S, Vordermark D, Roosen K & Tonn JC. Inhibition of Ras farnesylation by lovastatin leads to downregulation of proliferation and migration in primary cultured human glioblastoma cells. Anticancer res 20: 2761-2771, 2000.

Bradbury JH. The structure and chemistry of keratin fibers. Adv Protein Chem. 27: 111-121, 1973.

Breckenridge DG, Xue D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. Cell Biol., 16: 647-652, 2004.

Brevetti G & Perna S. Metabolic and clinical effects of L-carnitine in peripheral vascular and its role in medicine: from function to therapy. Acad Press London 359-378, 1992.

Christopher-Stine L : Statin myopathy : an update. Current Opinion Rheumatology 18: 647-653, 2006.

Cory S. Huang DC & Adams JM. The Bcl-2 family, roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607, 2003.

Crews FT. Effects of membrane fluidity on secretion and receptor stimulation. *Psychopharmacol Bull* 18: 135-143, 1982.

Croisile B, Trillet M, Fondaral J, Laurent B Manguiere F & Billardon M. Long-term and high dose piracetam treatment of Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 301-305.

Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} dependent pore in heart mitochondria activated by phosphate and oxidative stress. *J. Biochem*, 255: 357-360, 1998.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249, 1999.

Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.*12: 419-9, 2000.

Davidson MH. Rosuvastatin: a highly efficacious statin for the treatment of dyslipidaemia. *Expert Opin. Invest. Drugs* 11: 125-141, 2002.

Degasperi GR, Castilho RF, Vercesi AE. High susceptibility of activated lymphocytes to oxidative stress-induced cell death. *An Acad Bras Cienc.* 80:137-148, 2008.

Demierre M-F, Higgins PDR, Gruber SB, Hawk E & Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nat rev Cancer* 5: 930-942, 2005.

Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, freedman MH, Yeger H & Penn LZ. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cells carcinomas to lovastatin induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer res* 7: 158-167, 2001.

Dimitroulakos J, Marhin WH, Tokunaga J, Irish J, Gullane P, Penn LZ & Kamel-Reid S. Microarray and biochemical analysis of lovastatin-induced apoptosis of squamous cell carcinomas. *Neoplasia* 4: 337-346, 2002.

Eckert GP, Cairns NJ & Müller WE. Piracetam reverses hippocampal membrane alterations in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm* 106: 757-761, 1999.

- Endo A, Kuroda M & Tsujita Y. ML-236A, ML-236B and ML-236C. New inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. J. Antibiot 29:1346-1348, 1976.
- Fabriello RG & calabrese F. Prevention of ischemia induced increase in MDA by acetyl carnitine. Annals of Neurology 24: 114-118, 1988.
- Fagian MM, Pereira-da-Silva L, Martins IS & Vercesi AE. Membrane protein thiol cross-link associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ plus prooxidants. J. Biol. Chem., 265:19955-19960, 1990.
- Fassoulaki A, Kostopanagiotou G, Kaniaris P & Varonos DD. Piracetam attenuates the changes in the surface potential of the phosphatidylcholine monolayer produced by alcohols. Acta Anaesthesiol Belg 36: 47-51, 1985.
- Furuno T, Kanno T, Arita K, Asami M, utsumi T, Doi Y, Inoue M & Utsumi K. Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. Biochemical Pharmacology 62: 1037-1046, 2001.
- Gaw A & Packard CJ. Comparative chemistry, pharmacology and mechanism of action of the statins, in: Gaw A, Packard CJ & Shepherd J. (Eds), Statins. The HMG-CoA reductase inhibitors in perspective, Martin Dunitz, London, p 49-61, 2000.
- Giurgea C. Vers une pharmacologie de l'activité integrative du cerveau. Tentative du concept nootrope en psychopharmacologie. [Towards an integrative pharmacology of the activity of the brain. Attempt at the nootropic concept in psychopharmacology]. Actual Pharmacol (Paris) 25: 115-176, 1972.
- Green DR & Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 281, 1309-1312, 1998.
- Grundy SM. HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. N. Engl. J. Med. 319: 24-33, 1988.
- Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA & Salter JD. Calcium and mitochondria. FEBS Lett 567: 96-102, 2004.
- Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. Life Sciences 78: 803-811, 2005.

Halestrap AP, Connern CP, griffths EJ & Kerr PM. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects heart from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 174: 167-172, 1997.

Halestrap AP & Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 10: 1507-1525, 2003.

Hindler K, Cleeland CS, Rivera E & Collard CD. The role of statins in cancer therapy. *Oncologist* 11: 306-315, 2006.

Hobbs HH, Brown MS & Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1: 445-466, 1992.

Horsmans Y, Desager JP, Harvengt C. Biochemical changes and morphological alterations of the liver in guinea-pigs after administration of simvastatin (HMG CoA reductase-inhibitor) *Pharmacol Toxicol* 67: 336-339, 1990.

Hunninghake DB. HMG-CoA reductase inhibitors. *Curr. Opin. Lipidol.* 3: 22-28, 1992.

Hunter DR & Haworth, RA. The Ca²⁺ induced membrane transition in mitochondria. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 195: 453-459, 1979.

Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292: 1160-1164, 2001.

Istvan E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atherosclerosis Supplements* 4: 3-8, 2003.

Itagaki M, Takaguri A, Kano S, Kaneta S, Ichihara K & Satoh K. Possible mechanisms underlying-induced skeletal muscle toxicity in L6 fibroblasts and in rats. *J of Pharmacol Scien* 109: 94-101, 2009.

Kashiwagi A, Kanno T, Arita K, Ishisaka R, Utsumi T & Utsumi K. Suppression of T3 and fatty acid-induced membrane permeability transition by L-carnitine. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130 : 411-418, 2001.

Keil U, Scherping I, Hauptmann S, Schuessel K, Eckert A & Müller WE. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress. *British Journal of Pharmacology* 147: 199-208, 2006.

Koyuturk M, Ersoz M & Altioek NA. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signaling through JNK. *Cancer Lett* 250: 220-228, 2007.

Kowaltowski AJ, Vercesi AE & Castilho RF: Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495: 12-15, 2001.

Kroemer G, Galluzzi L & Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Ver* 87: 99-163, 2007.

Kromer & Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11: 725-730, 2005.

Kroemer G, Dallaporta B & Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu rev Physiol* 60: 619-642, 1998.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S & Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis *J Exp Med* 185: 1481-1486, 1997.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R & Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157, 1996.

Longo N, Di San Filippo CA & Pasquali M. Disorders of Carnitine Transport and the Carnitine Cycle. *American Journal of Medical Genetics* 142: 77-85, 2006.

Lowitt S, Malone JJ, Salem AF, Korhals J & Benford S. Acetyl-L-carnitine corrects the altered peripheral nerve function of experimental diabetes. *Metabolism* 44: 667-680, 1995.

MacDonald JS, Gerson RJ, Kornbrust DJ, et al. Preclinical evaluation of lovastatin. *Am J Cardiol* 62: 16-27, 1998.

Maron DJ, Fazio S & Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 101: 207-213, 2000.

Mayes PA, Botham KM. Oxidation of Fatty Acids: Ketogenesis. In: Murray , R. K. et al. Harper's Illustrated Biochemistry. Twenty-sixth edition. United States of America: McGraw-Hill, chap. 22, 180-189, 2003.

McTaggart F, Buckett L, Davidson R., et al. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am. J. Cardiol.* 87: 28-32, 2001.

McTavish D & Sorkin EM. Pravastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 42: 65-89, 1991.

Mingeot-Leclercq M-P, Lins L, Bensliman M, et al. Piracetam inhibits the lipid-destabilising effect of the amyloid peptide A β C-terminal fragment. *Biochim Biophys Acta* 1609: 28-38, 2003.

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

Moriau M, Crasborn L, Iavonne-Pardonge E, Von Frenckell R & Col-Debeys C. Platelet anti-aggregant and rheological properties of piracetam. *Arzneimittelforschung* 43: 110-118, 1993.

Müller WE, Eckert GP & Eckert A. Piracetam : novelty in an unique mode of action. *Pharmacopsychiatry* 32: 2-9, 1999.

Nalbandian RM, Henry RL, Burek CL, et al. Diminished adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium by piracetam. *Am. J Hematol* 15: 147-151, 1983.

Nicotera P & Orrenius S. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23: 173-180, 1998.

Nishimoto T, Tozawa R, Amano Y, Wada T, Imura Y, Sugiyama Y: Comparing myotoxic effects of squalene synthase inhibitor, T-91485, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in human myocytes. *Biochemistry pharmacology* 66 : 2133-2139, 2003.

Oliveira KAP, Zecchin KG, Alberici LC, Castilho RF & Vercesi AE. Simvastatin inducing PC3 prostate cancer cell necrosis mediated by calcineurin and mitochondrial dysfunction. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 4: 307-314, 2008.

Oyanagi E, Yano H, Kato Y, Fujita H, Utsumi K & Sasaki J. L-carnitine suppresses oleic acid-induced membrane permeability transition of mitochondria. *Cell Biochemistry and Function* 26: 778-786, 2008.

Pastorino JG, Snyder JW, Serroni A, Hoek JB & Farber JL. Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of culture hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *The J of Biol Chem* 19: 13791-13798, 1993.

Peuvot J, Schank A, Deleers M & Brasseur R. Piracetam-induced changes to membrane physical properties. A combined approach by ³¹P nuclear magnetic resonance and conformational analysis. *Biochem Pharmacol* 50 : 1129-1134, 1995.

Rao S, Lowe M, Herliczek TW & Keyomarsi K. Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of cdk2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. *Oncogene* 17: 2393-2402, 1998.

Rao S, Porter DC, Chen X, Herliczek T, Lowe M & Keyomarsi K. Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci* 96: 7797-7802, 1999.

Rebouche CJ & Engel AG. Kinetic compartmental analysis of carnitine metabolism in the human carnitine deficiency syndromes. Evidence from alterations in tissue carnitine transport. *The Journal of Clinical Investigation* 73: 857-867, 1984.

Robinson J & Cooper, JM. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem.* 33: 390-399, 1970.

Roe C. & Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill 8: 2297-2326, 2001.

Rubins JB, Greatens T, Kratzke RA, Tan AT, Polunovsky VA & Bitterman P. Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. *Am J Resp Crit Care Med* 157: 1616-1622, 1998.

Saelens X, Festjens N, Parthoens E, Vanoverberghe I, MK, vKF & Vandenabeele P. protein synthesis persists during necrotic cell death. *J Cell Biol* 168: 545-551, 2005.

Schachter, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & Clin Pharm* 19: 117-125, 2004.

Scheffler IE. Mitochondria make a come back. *Adv. Drug Deliv.* 2: 3-26, 2001.

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH & Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 333: 1301-1307, 1995.

Sirvent P, Mercier J & Lacampagne A. New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity. *Current Opinion in Pharmacology* 8: 1-6, 2008.

Sivaprasad U, Abbas T & Dutta A. Differential efficacy of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors on the cell cycle of prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5(9):2310-2316, 2006.

Soma MR, Corsini A & Paoletti R. Cholesterol and mevalonic acid modulation in cell metabolism and multiplication. *Toxicol Lett* 64-65 Spec n°: 1-15, 1992.

Sugiyama S : HMG-CoA reductase inhibitor accelerates aging effect on diaphragm mitochondrial respiratory function in rats. *Biochem Mol Biol Int* 46 : 923-931, 1998.

Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 346: 539-540, 2002.

Stanley CA. Carnitine deficiency disorders in children. *Annals NY Acad Sci* 1033: 42-51, 2004.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion JE, Jacotot P, Costantini M, Ioffler N, Larochette DR, Goodlett R, Aebersold DP,

- Siderovski JM, Penninger & Kromer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446, 1999.
- Temkin V, Huang Q, Liu H, Osada H, Pope RM. Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis. *Mol Cell Bio* 26: 2215-2225, 2006.
- Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K, Kitano N & Endo A. Hypolipidemic effects in dogs of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Atherosclerosis* 32: 307-313, 1979.
- Ukomadu C & Dutta A. Inhibition of cdk2 activating phosphorylation by mevastatin. *J. Biol Chem* 278: 4840-4846, 2003.
- Vakkila J, Lotze M. Inflammation and necrosis promote tumor growth. *Nat Rev Immunol* 4: 641-648, 2004.
- Velho JA Okanobo H, Degasperi GR, Matsumoto MY, Alberici LC, Cosso RG, Oliveira HCF & Vercesi AE. Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology* 219: 124-132, 2006.
- Venero C & Thompson P. Managing statin myopathy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 38: 121-136, 2009.
- Virmani A, Gaetani F, Imam S, Binieda Z & Ali S. The protective role of L-carnitine against neurotoxicity evoked by drug of abuse, methamphetamine, could be related to mitochondrial dysfunction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 965: 225-232, 2002.
- Virmani A, Gaetani F, Imam S, Binieda Z & Ali S. Possible mechanism of the neuroprotective effects of L-carnitine on methamphetamine-evoked neurotoxicity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 993: 197-207, 2003.
- Visioli O, Pasini E, De Giuli F & Ferrari R. Molecular mechanism of action of l-carnitine in treatment of myocardial disorders at the experimental levels. In Ferrari R, DiMauro S, Sherwood G (Eds), *L-carnitine and its role in medicine: from function to therapy*. Acad Press London 237-262, 1992.

Waegemans T, Wilsher CR, Danniau A, Ferris SH, Kurz A & Winblad B. Clinical efficacy of piracetam in cognitive impairment: a meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord* 13: 217-224.

Wagner BK, Kitami T, Gilbert TJ, Peck D, Ramanathan A, Schreiber SL, Golub TR & Mootha VK. Large-scale chemical dissection of mitochondrial function. *Nature Biotech.* 26: 343-351, 2008.

Winblad B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses. *CNS Drug Reviews* 11: 169-182, 2005.

Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, Halestrap A.P. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *J. Biochem*, 336: 287-90, 1998.

Yamamoto A, Sudo H & Endo A. Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 35: 259-266, 1980.

Yasuda N, Matzno S, Iwano C, Nishikata M & Matsuyama K. Evaluation of apoptosis and necrosis induced by statins using fluorescent-enhanced flow cytometry. *J of Pharmac and Biom Anal* 39: 712-717, 2005.

Zammit VA, Ramsay RR, Bonomini M, Arduini A. Carnitine, mitochondrial function and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 14: 1353-1362, 2009.

Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A & Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ.* 6: 644-651, 1999.

Zoratti M. & Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1241: 139-176; 1995.