



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS, CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Aline Aita Naime

**Estudo do efeito protetor de compostos derivados do probucol e de quelantes de ferro
frente a diferentes indutores de oxitose/ferroptose em células HT22**

Florianópolis
2022

Aline Aita Naime

**Estudo do efeito protetor de compostos derivados do probucol e de quelantes de ferro
frente a diferentes indutores de oxitose/ferroptose em células HT22**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutorado em Bioquímica.
Orientadora: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa; Coorientadora: Profa. Dra. Dirleise Colle

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Naime, Aline Aita

Estudo do efeito protetor de compostos derivados do probucol e de quelantes de ferro frente a diferentes indutores de oxitose/ferroptose em células HT22 / Aline Aita Naime ; orientador, Rozangela Curi Pedrosa, coorientador, Dirleise Colle, 2022.

131 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Oxitose/ferroptose. 3. Probuco. 4. RC363, RC574. 5. Quelantes de ferro. I. Pedrosa, Rozangela Curi. II. Colle, Dirleise. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Aline Aita Naime

Estudo do efeito protetor de compostos derivados do probucol e de quelantes de ferro frente a diferentes indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.

O presente trabalho em nível de defesa de tese de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Dra. Fabiana Ourique da Silva
Instituição Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Profª. Dra. Patricia de Souza Brocardo
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profª. Dra. Rozangela Curi Pedrosa
Orientadora

Profª. Dra. Dirleise Colle
Coorientadora

Florianópolis

2022

Este trabalho é dedicado aos meus familiares, especialmente a minha avó Maria Caritas, que foi e sempre será a minha maior inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus familiares, principalmente aos meus pais Simone e Marcos por todo apoio e incentivo. Obrigado pela dedicação e força que sempre me deram e dão até hoje.

As minhas orientadoras Rozangela e Dirleise pela oportunidade de trabalhar junto ao seu grupo de pesquisa. Agradeço a paciência, apoio e por todos os ensinamentos que me proporcionaram crescimento e aprendizagem.

Um agradecimento especial para a professora Dirleise que vem me acompanhando desde a minha iniciação científica, agradeço a sua disposição a ajudar e ensinar, sempre com muita paciência e dedicação.

Ao professor Marcelo por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar este trabalho, obrigada pelos ensinamentos.

Ao meu colega Diones pela parceria de sempre, pelas trocas de conhecimento tanto teórico quanto prático que foram importantes para realizar este trabalho.

As minhas colegas Veridiana e Suzana pelos conhecimentos que foram trocados e pela ajuda diária na rotina do laboratório.

Gostaria também de agradecer aos meus amigos Diones, Leticia, Wellington, Mariana, Luiza, Túlio, Flávia, Luiza Carolina por toda ajuda, força, apoio e trocas de conhecimento os quais foram de extrema importância para que eu conseguisse finalizar este trabalho.

Aos técnicos do LAMEB III em especial a Bibiana e a Flávia pela disponibilidade e auxílio na utilização dos equipamentos além das trocas de conhecimento que possibilitaram melhorar os ensaios realizados.

Aos professores do PPG em Bioquímica responsáveis pela minha formação acadêmica.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

A oxitose/ferroptose é um tipo de morte celular oxidativa dependente de ferro. Seu papel vem sendo descrito em várias patologias que incluem doenças renais, cardiovasculares e neurodegenerativas. A oxitose/ferroptose pode ser induzida experimentalmente por diferentes agentes como o glutamato (Glu), butionina sulfoxamina (BSO) e RSL3, que atuam em diferentes alvos levando ao aumento de espécies reativas (ER), principalmente as ER lipídicas. Compostos como a ferrostatina -1 (Fer-1) e o quelante de ferro deferoxamina (DFO) apresentam efeitos benéficos contra a oxitose/ferroptose *in vitro*; porém, não são adequados para uso *in vivo*. O probucol (PB) é um composto fenólico com atividade antioxidante principalmente relacionada a sua capacidade de aumentar diretamente a atividade da enzima glutathione peroxidase 1 (GPx1), apresentando efeitos protetores em vários modelos oxidativos *in vitro* e *in vivo*. Recentemente seus derivados RC363 e RC574 apresentaram efeitos protetores frente aos agentes pró-ferroptose Glu e RSL3. Neste contexto, a fim de propor a utilização dos compostos derivados do PB succinobucol (SUC), RC363 e RC574 como possíveis agentes anti-ferroptóticos, o presente estudo compara o efeito protetor desses compostos com a Fer-1, em um modelo de oxitose/ferroptose em células HT22 induzido por 3 diferentes agentes pró-ferroptose (Glu, BSO, RSL3). Este estudo também compara o efeito protetor de diferentes quelantes de ferro DFO, deferoxamina cafeína (DFCAF), deferiprona (DFP) e o salicilaldeído isonicotinoil hidrazina (SIH) com o objetivo de indicar um quelante de ferro mais adequado para combater a oxitose/ferroptose, sem efeitos colaterais. As células HT22 foram expostas a concentrações crescentes dos agentes pró-ferroptose durante 24h e foram realizados ensaios de viabilidade e morte celular. Foram avaliados a concentração de glutathione (GSH) após 6h e a peroxidação lipídica após 6 e 12h de exposição ao Glu (5 mM), ao BSO (25 μ M) ou ao RSL-3 (50 nM). Em outros experimentos, as células foram expostas ao Glu (5 mM), ao BSO (25 μ M) ou ao RSL-3 (50 nM) durante 6h e, em seguida, tratadas com os compostos PB e seus derivados (0,5 e 3 μ M) ou com os quelantes de ferro DFO, DFCAF, DFP e SIH (0,5 e 3 μ M), por 18 horas. Os indutores de ferroptose causaram diminuição da viabilidade celular e morte celular. Além disso, o Glu e o BSO depletaram a GSH e causaram peroxidação lipídica tardia. O composto RSL3 não causou depleção da GSH, porém induziu aumento na peroxidação lipídica de maneira precoce. Os compostos derivados do probucol RC363 e RC574 protegeram da redução na viabilidade celular e da morte induzida pelos três indutores. Esses compostos apresentam efeito anti-ferroptótico superior ao do probucol e semelhante ao da Fer-1, porém esse efeito é perdido quando o excesso de geração de ER lipídicas é estabelecido nas células. Esses resultados sugerem que a peroxidação lipídica é um evento limitante para a proteção contra a oxitose/ferroptose. A ação protetora dos compostos RC363 e RC574 não está relacionada com a síntese de GSH, mas em parte pela sua atividade antioxidante direta. Em relação aos quelantes de ferro, o SIH, composto que apresenta uma boa lipossolubilidade, foi o único quelante com efeito protetor frente ao modelo de oxitose/ferroptose em células HT22. O quelante de ferro SIH reverteu a depleção de GSH induzida pelo Glu além de reduzir a geração de ER citosólicas induzida pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3, sem apresentar efeito antioxidante direto. Portanto, nossos resultados corroboram a literatura, na qual quelantes lipofílicos apresentam maior potência anti-ferroptótica possivelmente relacionada a sua maior capacidade em bloquear a geração de ER intracelulares dependentes de ferro. Esse trabalho apresenta dois novos derivados do PB com notáveis propriedades protetoras contra três diferentes agentes ferroptóticos além de um quelante de ferro mais eficaz como agente anti-ferroptose.

Palavras-chave: Oxitose/ferroptose; Probuco; RC363; RC574; Quelantes de ferro

ABSTRACT

Oxytosis/ferroptosis is a type of iron-dependent oxidative cell death. Its role has been described in several pathologies include renal, cardiovascular, and neurodegenerative diseases. Oxytosis/ferroptosis can be induced experimentally by different agents such as glutamate (Glu), butionine sulfoxamine (BSO) and RSL3, which act on different targets leading to an increase in reactive species (RE), mainly lipid RE. Compounds such as ferrostatin -1 (Fer-1) and the iron chelator deferoxamine (DFO) have beneficial effects against oxytosis/ferroptosis *in vitro*; however, they are not suitable for *in vivo* use. Probucol (PB) is a phenolic compound with antioxidant activity mainly related to its ability to directly increase the activity of the enzyme glutathione peroxidase 1 (GPx1), showing protective effects in several oxidative models *in vitro* and *in vivo*. Recently, its derivatives RC363 and RC574 showed protective effects against the pro-ferroptosis agents Glu and RSL3. To propose the use of compounds derived from PB succinobucol (SUC), RC363 and RC574 as possible anti-ferroptotic agents, the present study compares the protective effect of these compounds with Fer-1, in an oxytosis/ferroptosis model induced by 3 different pro-ferroptosis agents (Glu, BSO, RSL3) in HT22 cells. This study also compares the protective effect of different iron chelators DFO, deferoxamine caffeine (DFCAF), deferiprone (DFP) and salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazine (SIH) to indicate a more suitable iron chelator to combat oxytosis/ferroptosis without side effects. HT22 cells were exposed to increasing concentrations of pro-ferroptosis agents for 24h and cell viability and cell death assays were performed. Glutathione (GSH) concentration after 6h and lipid peroxidation after 6 and 12h of exposure to Glu (5 mM), BSO (25 μ M) or RSL-3 (50 nM) were evaluated. Also, cells were exposed to Glu (5 mM), BSO (25 μ M) or RSL-3 (50 nM) for 6h and then treated with PB compounds and their derivatives (0.5 and 3 μ M) or with the iron chelators DFO, DFCAF, DFP and SIH (0.5 and 3 μ M), for 18 hours. Ferroptosis inducers caused decrease cell viability and cell death. In addition, Glu and BSO depleted GSH and caused delayed lipid peroxidation. The RSL3 compound did not cause GSH depletion but induced an early increase in lipid peroxidation. Probucol-derived compounds RC363 and RC574 protected from the reduction in cell viability and death induced by the three inducers. These compounds have an anti-ferroptotic effect superior to probucol and like Fer-1, but this effect is lost when the excess generation of lipid RE is established in the cells. These results suggest that lipid peroxidation is a limiting event for protection against oxytosis/ferroptosis. The protective action of the compounds RC363 and RC574 is not related to the synthesis of GSH, but in part due to their direct antioxidant activity. Regarding iron chelators, SIH, a compound that has good lipid solubility, was the only chelator with protective effects against the oxytosis/ferroptosis model in HT22 cells. The iron chelator SIH reversed the depletion of GSH induced by Glu in addition to reducing the generation of cytosolic RE induced by the ferroptotic agents Glu, BSO and RSL3, without having a direct antioxidant effect. Therefore, it corroborates the literature, in which lipophilic chelators have greater anti-ferroptotic potency, possibly related to their greater ability to block the generation of intracellular RE. These results suggest that lipid peroxidation is a limiting event for protection against oxytosis/ferroptosis. This work also presents two new PB derivatives with remarkable protective properties against three different ferroptotic agents in addition to a more effective iron chelator as an anti-ferroptosis agent.

Keywords: Oxytosis/ferroptosis; Probucol; RC363; RC574; Iron chelators

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Doenças humanas nas quais os inibidores/ativadores de ferroptose podem modular a progressão da doença.....	23
Figura 2 – Mecanismo envolvido na oxitose/ferroptose.	26
Figura 3 – Inibidores da oxitose/ferroptose.....	29
Figura 4 – Mecanismo proposto para a Fer-1.....	30
Figura 5 – Estrutura dos quelantes de ferro.....	34
Figura 6 – Estrutura do probucol e seus derivados.....	37
Figura 7 – Eixo sistema x_c^- /GSH/GPx4 envolvido na oxitose/ferroptose e seus principais inibidores.....	39
Figura 8 – Toxicidade dos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO e RSL3 em células HT22.....	52
Figura 9 – Toxicidade temporal dos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO e RSL3 em células HT22.....	54
Figura 10 – Efeito dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a concentração de GSH em células HT22.....	57
Figura 11 – Efeito dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a peroxidação lipídica em células HT22.....	60
Figura 12 – Toxicidade do composto PB e seus derivados em células HT22.....	63
Figura 13 – Efeito do composto PB e seus derivados frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO e RSL3 em células HT22.....	65
Figura 14 – Toxicidade do anti-ferroptótico clássico Fer-1 em células HT22.....	67
Figura 15 – Efeito do composto Fer-1 frente à toxicidade induzida pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 em células HT22.....	69
Figura 16 – Comparação entre o efeito protetor dos compostos RC363 e RC574 com o anti-ferroptótico clássico Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22.....	71
Figura 17 – Efeito do tratamento tardio com os compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu e BSO em células HT22.....	73
Figura 18 – Efeito do tratamento precoce com os compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo RSL3 em células HT22.....	75

Figura 19 – Efeito dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à redução da concentração de GSH induzida pelos agentes ferroptóticos Glu e BSO em células HT22	77
Figura 20 – Efeito da GSHEE frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22.....	80
Figura 21 – Avaliação da atividade antioxidante direta dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 em condições livres de células.....	82
Figura 22 – Efeito do Trolox frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22.....	84
Figura 23 – Correlação entre a atividade antioxidante direta dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 com sua ação anti-ferroptótica.....	88
Figura 24 – Toxicidade dos compostos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP em células HT22.....	93
Figura 25 – Efeito protetor da DFO frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.....	96
Figura 26 – Efeito protetor da DFCAF frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.....	98
Figura 27 – Efeito protetor do DFP frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22	100
Figura 28 – Efeito protetor do SIH frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.	102
Figura 29 – Efeito temporal dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a concentração de GSH em célula HT22.....	108
Figura 30 – Efeito temporal dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a geração de ER em célula HT22.....	110
Figura 31 – Efeito do quelante de ferro SIH frente à redução da concentração de GSH induzida pelos compostos pró-ferroptose Glu e BSO.....	114
Figura 32 – Efeito do quelante de ferro SIH frente ao aumento das ER induzido pelos compostos pró-ferroptose Glu, BSO ou RSL3.....	116
Figura 33 – Efeito antioxidante direto dos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores da IC ₅₀ do efeito protetor dos agentes anti-ferroptóticos Fer-1, RC363 e RC574 e do agente antioxidante Trolox contra a citotoxicidade induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 após 6 horas de exposição á estes agentes ferroptóticos.....	85
Tabela 2 – Valores da IC ₅₀ para eficácia antioxidante dos agentes anti-ferroptóticos Fer-1, RC363 e RC574 e do agente antioxidante Trolox.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSO	Butionina sulfoximina
DFCAF	Deferoxamina-cafeína
DFO	Deforoxamina
DFP	Deferiprona
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil
ER	Espécies Reativas
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
Fer-1	Ferrostatina-1
GCL	Glutamato Cisteína Ligase
Glu	Glutamato
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
IP	Iodeto de Propídeo
Lip-1	Liprostatina-1
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
NPSH	<i>Non Protein Thiol</i> (Tióis Não Proteicos)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NPSH	<i>Non Protein Thiol</i> (Tióis Não Proteicos)
Nrf2	Fator Nuclear (Derivado de Eritroide 2) 2
PB	Probucol
PUFAS	Ácidos graxos poliinsaturados
SIH	Salicilaldeído isonicotinoil hidrazina
SF	Sobrecarga de Ferro
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TrxR	Tiorredoxina Redutase

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{2+}	Cálcio
CuOOH	Cumeno hidroperóxido
Fe^{2+}	Íon Ferroso
Fe^{3+}	Íon Férrico
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
tBuOOH	Terc-butil hidroperóxido
O_2	Oxigênio Molecular
$\text{O}_2^{\bullet -}$	Ânion Superóxido
$\text{OH}^{\bullet -}$	Radical Hidroxila
L^{\bullet}	Radicais Lipídicos
LOO^{\bullet}	Radicais Peroxil Lipídicos
LOOH	Hidroperóxido Lipídicos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OXITOSE/FERROPTOSE	18
1.1.1	Considerações Gerais.....	18
1.1.2	Mecanismo de oxitose/ferroptose	23
1.1.3	Oxitose/ferroptose e doenças relacionadas	26
1.1.4	Estratégias Protetoras.....	28
1.2	NOVOS QUELANTES DE FERRO	31
1.3	PROBUCOL (PB) E DERIVADOS	35
1.4	MODELO DE OXITOSE/FERROPTOSE EM CÉLULAS HT22	38
2	JUSTIFICATIVA	40
3	OBJETIVO.....	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3.2.1	Objetivos específicos do capítulo I.....	40
3.2.2	Objetivos específicos do capítulo II	41
4	MATERIAS E MÉTODOS.....	41
4.1	REAGENTES	41
4.2	CULTIVO CELULAR	42
4.3	TRATAMENTOS.....	43
4.4	ENSAIOS <i>in vitro</i>	44
4.4.1	Ensaio para determinação da viabilidade celular pela redução do MTT	44
4.4.2	Ensaio para determinação da morte celular pela incorporação do iodeto de propídeo (IP).....	44
4.4.3	Ensaio para determinação de tióis não-proteicos (NPSH).....	45
4.4.4	Ensaio para determinação das ER intracelulares com a sonda 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA).....	46

4.4.5	Ensaio para determinação de peróxidos lipídicos com a sonda C11-BODIPY ^{581/591}	47
4.4.6	Ensaio para a determinação da atividade antioxidante com o 2,2-difenil 1-picrilhidrazil (DPPH).....	48
4.4.7	Ensaio anti-lipoperoxidativo com a sonda C11-BODIPY581/591.....	48
4.4.8	Ensaio para a determinação da concentração de proteínas.....	49
4.4.9	Análises estatísticas	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	RESULTADOS CAPÍTULO I – COMPARAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO PROBUCOL COM O EFEITO PROTETOR DA FER-1 FRENTE À OXITOSE/FERROPTOSE INDUZIDA PELO GLU, BSO E RSL3 EM CÉLULAS HT22.....	50
5.1.1	Toxicidade dos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO e RSL3 em células HT22.....	50
5.1.2	Toxicidade temporal dos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO E RSL3 em células HT22.....	53
5.1.3	Efeito dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a concentração de GSH em célula HT22.....	55
5.1.4	Efeito dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a peroxidação lipídica em célula HT22.....	59
5.1.5	Toxicidade do composto PB e seus derivados em células HT22	62
5.1.6	Efeito do composto PB e seus derivados frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO e RSL3 em células HT22	64
5.1.7	Toxicidade do anti-ferroptótico clássico Fer-1 em células HT22	66
5.1.8	Efeito do composto Fer-1 frente à toxicidade induzida pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 em células HT22	68
5.1.9	Comparação entre o efeito protetor dos compostos RC363 e RC574 com o anti-ferroptótico clássico Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22.....	70

5.1.10	Efeito do tratamento tardio com os compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu e BSO em células HT22.....	72
5.1.11	Efeito do tratamento precoce com os compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo RSL3 em células HT22.....	74
5.1.12	Efeito dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à redução da concentração de GSH induzida pelos agentes ferroptóticos Glu e BSO em células HT22.....	76
5.1.13	Efeito da GSHEE frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22.....	79
5.1.14	Avaliação da atividade antioxidante direta dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 em condições livres de células.....	81
5.1.15	Efeito do Trolox frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22.....	83
5.1.16	Correlação entre a atividade antioxidante direta dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 com sua ação anti-ferroptótica.....	87
5.2	CONCLUSÃO CAPÍTULO I.....	91
5.3	PERSPECTIVAS CAPÍTULO I.....	91
5.4	RESULTADOS CAPÍTULO II – INVESTIGAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE QUELANTES DE FERRO FRENTE A OXITOSE/ FERROPTOSE INDUZIDA PELO GLU, BSO E RSL3 EM CÉLULAS HT22.	92
5.4.1	Toxicidade dos compostos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP em células HT22.....	92
5.4.2	Efeito protetor da DFO frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.....	94
5.4.3	Efeito protetor da DFCAF frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.....	97
5.4.4	Avaliação do efeito protetor do DFP frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.....	99
5.4.5	Avaliação do efeito protetor do SIH frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.....	101

5.4.6	Efeito temporal dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a concentração de GSH em célula HT22	107
5.4.7	Efeito temporal dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a geração de ER em célula HT22	109
5.4.8	Efeito do quelante de ferro SIH frente à redução da concentração de GSH induzida pelos compostos pró-ferroptose Glu e BSO	113
5.4.9	Efeito do quelante de ferro SIH frente ao aumento das ER induzido pelos compostos pró-ferroptose Glu, BSO ou RSL3	114
5.4.10	Efeito antioxidante direto dos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP.....	119
5.5	CONCLUSÃO CAPÍTULO II	121
5.6	PERSPECTIVAS CAPÍTULO II	121

REFERÊNCIAS

ANEXO 1 – Artigo publicado do capítulo I

1 INTRODUÇÃO

1.1 OXITOSE/FERROPTOSE

1.1.1 Considerações Gerais

Em 1989, Murphy e colaboradores relataram em células N18-RE-105 (linhagem celular híbrida de neuroblastoma de camundongo e células embrionárias da retina de rato) que a exposição ao glutamato (Glu) causava uma diminuição nos níveis de glutathione (GSH) e um acúmulo de oxidantes intracelulares levando a perda da homeostasia redox e morte celular. Essa morte era exacerbada quando as células N18-RE-105 eram expostas a baixas concentrações de cistina (precursor da GSH). Uma citotoxicidade semelhante a do Glu observada nas células N18-RE-105 também foi relatada em neurônios hipocâmpais e não nas células da glia quando uma cultura primária do hipocampo de rato foi exposta a concentrações reduzidas de cistina (MURPHY *et al.*, 1989).

Posteriormente, Murphy e colaboradores (1990) também demonstraram em culturas primárias de córtex de rato que baixas concentrações de cistina foram citotóxicas somente para os neurônios corticais, e não para as células da glia. Além disso, os autores observaram que a exposição ao Glu inibiu a captação de cistina neuronal e o co-tratamento com antioxidantes lipofílicos como a idebenona e o α -tocoferol protegeu totalmente da neurotoxicidade induzida pela exposição ao Glu.

Assim, foi descrita uma nova neurotoxicidade induzida pelo Glu denominada toxicidade oxidativa do Glu (TOG) que resulta da sua capacidade em inibir a captação de cistina por meio do antiporter cistina/glutamato (sistema x_c^-). A consequência dessa inibição é a depleção de GSH devido a falta de cistina, que é a forma dimerizada oxidada da cisteína, um dos três aminoácidos que compõem a GSH, resultando em distresse oxidativo, o qual envolve o aumento de ER, causando danos celulares e morte. Nota-se que a TOG foi observada em neurônios imaturos que apresentam baixa expressão dos receptores ionotrópicos de Glu (iGluRs) e, portanto, exclui-se a sua capacidade de causar excitotoxicidade (MURPHY *et al.*, 1989; MURPHY *et al.*, 1990). Desse modo não ficou claro se a TOG seria uma nova forma de morte celular ou apenas uma consequência da excitotoxicidade glutamatérgica.

Nesse contexto, em 2001 Schubert e Piasecki utilizando uma cultura primária de neurônios corticais de camundongos com 8 dias *in vitro*, período no qual os neurônios

expressam os receptores ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs) de Glu, propuseram inicialmente que a TOG é uma consequência tardia da neurotoxicidade induzida pelo Glu, porém apresentando características diferentes da sua excitotoxicidade, já que é independente da ativação dos receptores NMDA (iGluRs) e é inibida especificamente por antioxidantes lipofílicos, como o α -tocoferol (SCHUBERT e PIASECKI, 2001). Neste cenário, ressalta-se o fato da excitotoxicidade induzida pelo Glu, que representa uma forma aguda de morte celular, não poderia por si só explicar a progressão da neurodegeneração observada em neuropatologias nas quais o Glu está envolvido (MURPHY *et al.*, 1989; MURPHY *et al.*, 1990; SCHUBERT e PIASECKI, 2001). Sendo assim, o estudo a respeito dos mecanismos envolvidos na TOG tornou-se relevante, pois poderia indicar alvos moleculares para futuros tratamentos que impediriam a progressão de maneira mais eficiente da neurodegeneração tardia observada em várias doenças do sistema nervoso central (SNC).

Nesse contexto em 2001 Tan, Schubert e Maher ao descreverem uma nova via de morte celular regulada induzida por distresse oxidativo, que denominaram de oxitose, destacando a TOG como um caso especial de oxitose, uma vez que, apesar de compartilharem as mesmas características, essa nova via de morte celular pode ser causada por outros agentes (como a exposição a peróxidos, a privação de cistina, a exposição ao composto butionina sulfoximina - BSO) (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001). Esses pesquisadores começaram a caracterizar e identificar os eventos por trás da oxitose a partir de estudos em células HT22, bem como em cultivos primários de neurônios hipocâmpais e corticais (LI, SCHUBERT E MAHER, 1997; TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001). Diante disso, previamente foi descrito como principais eventos bioquímicos envolvidos na oxitose a depleção de GSH intracelular, que então desencadeia a ativação da enzima 12/15-lipoxigenase (12/15-LOX) levando a um aumento da produção de espécies reativas (ER) lipídicas e também de ER geradas pelo complexo-I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, e finalmente causando um aumento da concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}) e morte celular (LI, SCHUBERT e MAHER, 1997; TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001).

Esse autores também descreveram a falta dos principais marcadores moleculares associados a via de morte celular apoptótica, como o aumento da expressão do gene pró-apoptótico Bax, liberação de citocromo c da mitocôndria, ativação da pro-caspase 3 e fragmentação do DNA na oxitose (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001). Indicando que a oxitose é uma via de morte celular que diferente da apoptose é independente da ativação de caspases. Por fim, foram descritas características morfológicas da oxitose, que incluíram graves

danos ao retículo endoplasmático (RE), aparelho de Golgi e mitocôndrias (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001). Sendo que, os danos mitocondriais mostraram-se bastante relevantes, ocorrendo edema das membranas internas e externas com perda das suas cristas. Por outro lado, diferente da apoptose o núcleo permanece intacto, com mínimo de edema ou condensação da cromatina (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001).

Em 2003, o grupo de pesquisa de Stockwell, utilizando cultura primária de fibroblastos humanos com mutações específicas, a fim de investigar novas terapias anticâncer genótipo-seletivas, identificou um novo composto, o qual denominaram de erastina. A erastina induziu um tipo de morte celular não apoptótica, na qual não foi observado núcleos apoptóticos, fragmentação de DNA, marcação para anexina e ativação de pro-caspase 3, especificamente nas células de fibroblastos humanos HRAS mutantes (BJeLR) (DOLMA *et al.*, 2003), características semelhantes às observadas na oxitose induzida pelo Glu (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001).

Em 2007 o mesmo grupo de pesquisa utilizando as células BjeLR e outras linhagens (que continham a mutação no gene RAS) demonstrou que a erastina também induziu uma morte celular oxidativa não-apoptótica. Esta morte celular estava associada à perda da integridade mitocondrial (danos a sua função e morfologia) com geração de ER, na ausência de características morfológicas ou bioquímicas de apoptose (YAGODA *et al.*, 2007), mais uma vez corroborando os achados de Tan e colaboradores (2001) em relação as características da oxitose. Além disso, a morte celular causada pela erastina foi bloqueada por antioxidantes lipofílicos, como o α -tocoferol e também o antioxidante fenólico hidroxiltolueno butilado (BHT) (YAGODA *et al.*, 2007). Essa proteção por antioxidantes lipofílicos também já havia sido observada por Murphy e colaboradores (1990) frente à oxitose induzida pelo Glu.

Em outro estudo de Yang e Stockwell (2008), foi identificado o composto RSL3 (pequena molécula letal seletiva para oncogene RAS - RSL), que induziu um tipo morte celular semelhante ao da erastina, porém dependente de ferro. Entretanto, inibidores de caspases não bloquearam a morte celular induzida pelo RSL3, por outro lado, um quelante de ferro, a desferoxamina (DFO) e um antioxidante, a vitamina E, foram capazes de inibir essa morte.

Em 2012 Stockwell e colaboradores propuseram o nome ferroptose para esse tipo de morte celular oxidativa não-apoptótica induzida por compostos como a erastina e o RSL3, uma vez que, essa morte foi descrita como dependente especificamente do íon de ferro e ser bloqueada pelo tratamento com quelantes de ferro. Importante notar que esse tipo especial de

morte celular envolve características morfológicas, bioquímicas e genéticas, distintas da apoptose, necrose e autofagia (DIXON *et al.*, 2012).

Dixon e colaboradores (2012) também identificaram um inibidor específico da ferroptose, a ferrostatina-1 (Fer-1) que preveniu a ferroptose induzida pela erastina em células tumorais humanas (fibrossarcoma humano NRAS mutantes - HT-1080), bem como da morte celular induzida pelo Glu em fatias organotípicas do hipocampo pós-natal de ratos, sugerindo semelhanças entre estes dois processos de morte celular. Além disso, demonstrou-se que assim como o Glu (MURPHY *et al.*, 1989; MURPHY *et al.*, 1990), a erastina também inibe a captação de cistina pelo sistema antiportador cistina/glutamato (sistema x_c^-) causando a depleção de GSH e provavelmente causando um desequilíbrio nas defesas antioxidantes da célula, levando ao acúmulo de ER, principalmente lipídicas, dependente de ferro e por fim à morte celular (DIXON *et al.*, 2012).

Neste contexto, Yang e colaboradores (2014) mostram que tanto a erastina quanto o BSO levaram a depleção de GSH e conseqüentemente inibição da atividade das enzimas glutaciona peroxidases (GPx) causando um acúmulo de ER, principalmente ER lipídicas. Diferente da erastina e do BSO o composto RSL3 não causou depleção da GSH, porém gerou um aumento das ER lipídicas similar ao observado pela exposição a esses compostos (YANG *et al.*, 2014). Demonstrando, mais uma vez, a importância da oxidação lipídica na ferroptose, já observada nos estudos de Li e colaboradores (1997) e Tan e colaboradores (2001) com a oxitose induzida pelo Glu, sendo um evento em comum para todos esses indutores.

Além disso, a enzima glutaciona peroxidase 4 (GPx4) foi identificada como alvo molecular do composto RSL3, visto que o RSL3 inibiu especificamente a atividade dessa enzima. Assim a inibição da GPx4 provavelmente está envolvida no acúmulo de ER lipídicas induzido tanto pelo RSL3, quanto pela erastina, Glu ou pelo BSO (YANG, *et al.*, 2014). Dessa maneira os compostos indutores de ferroptose (INF) foram categorizados em duas classes com base no modo de inibição da GPx4. Uma classe (INF - classe I) incluiu a erastina, Glu e o BSO que inibem GPx4 por meio da depleção de GSH. E a segunda classe (INF - classe II) que inibem a GPx4 sem depletar a GSH, como RSL3 (YANG *et al.*, 2014). Essas evidências indicam que a oxitose induzida pelo Glu e a ferroptose induzida pela erastina e RSL3 na verdade são nomes diferentes para o mesmo tipo de morte celular na qual a GPx4 parece ser o regulador central (TAN, SCHUBERT e MAHER, 2001; YANG *et al.*, 2014; LEWERENZ *et al.*, 2018).

A falta da enzima GPx4 resultou em morte ferroptótica em duas linhagens de carcinomas de células renais (CCRs) que foram também as mais sensíveis a erastina. Além

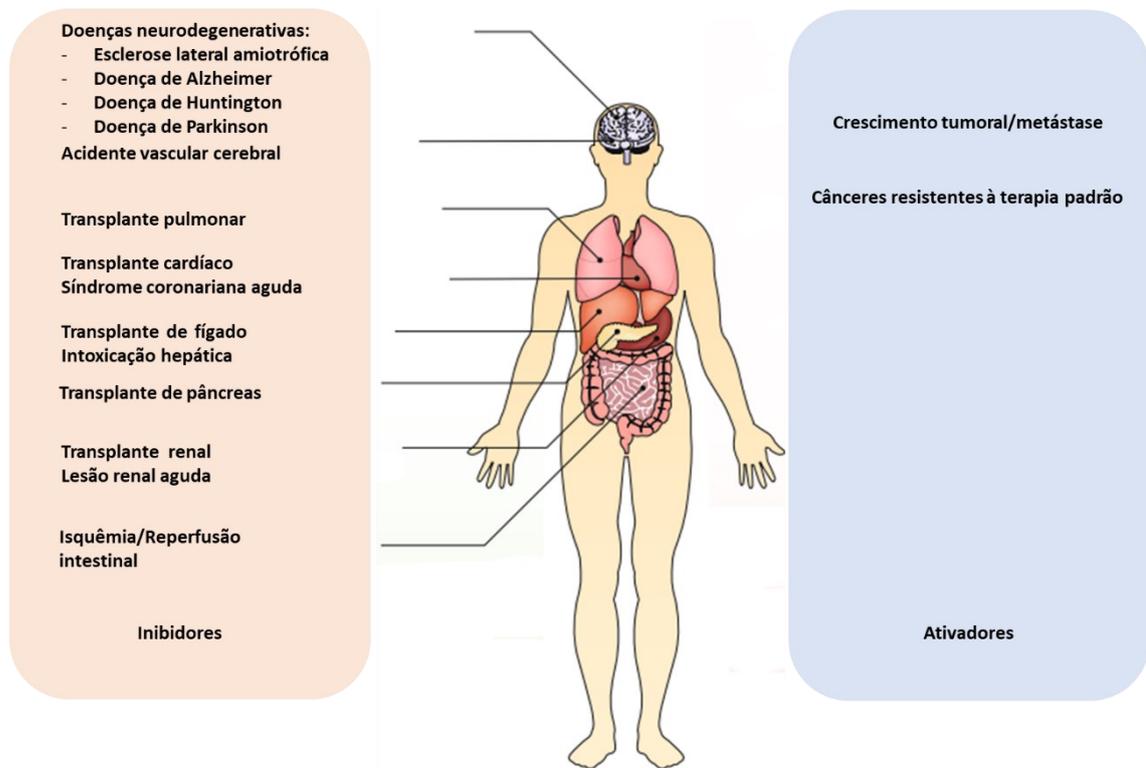
disso a erastina induziu ferroptose em várias linhagens de células tumorais de diferentes tecidos, como tecido hematopoiético e linfóide, intestino grosso, rim, pulmão, ovário e pele. Destacando assim a importância da inibição da GPx4 para a indução de ferroptose em células tumorais (YANG *et al.*, 2014). Sugerindo a GPx4 como alvo terapêutico para auxiliar o tratamento do câncer, no qual compostos capazes de inibir a GPx4 teriam o efeito de bloquear o crescimento de células tumorais. Neste contexto Dixon e Stockwell (2019) descreveram várias possíveis abordagens antitumorais tendo como alvo a redução da expressão e/ou da atividade da GPx4 de maneira direta ou indireta a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*.

Por outro lado, demonstrou-se que a depleção da GPx4 também foi relevante para indução de oxitose/ferroptose, porém de maneira patogênica. Neste caso, a falta da enzima GPx4 ou de sua atividade seria responsável pela morte de células saudáveis levando a diversas doenças (FRIEDMANN ANGELI *et al.*, 2014). Neste cenário, Friedmann Angeli e colaboradores (2014) descobriram um composto a lipostatina-1 (Lip-1) que preveniu a morte celular especificamente de indutores de oxitose/ferroptose, sendo portando um novo agente anti-ferroptótico, com boas propriedades para uso *in vivo*. A Lip-1 protegeu da morte causada pela perda total induzível da GPx4 de maneira semelhante a Fer-1 *in vitro*. A Lip-1 também prolongou a vida de animais que apresentaram insuficiência renal aguda (IRA) causada pela depleção da GPx4 (FRIEDMANN ANGELI *et al.*, 2014).

Em um modelo pré-clínico de lesão hepática por isquemia/reperfusão a Lip-1 mitigou a lesão tecidual. Em vista disso, a oxitose/ferroptose pode contribuir para dano tecidual induzido por isquemia/reperfusão nos demais tecidos (FRIEDMANN ANGELI *et al.*, 2014; CONRADO e PRATT, 2019). Algumas evidências vem indicando o envolvimento da oxitose/ferroptose também em doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (DEVOS *et al.*, 2014; Do VAN *et al.*, 2016; DIONÍSIO, AMARAL e RODRIGUES, 2021, FANG *et al.*, 2019; MAHER, CURRAIS, SCHUBERT, 2020; WU *et al.*, 2021).

Portanto, dependendo da manifestação patológica a ativação ou o bloqueio da via de morte ferroptótica pode fornecer uma estratégia terapêutica promissora para aliviar a progressão de várias doenças (Figura 1) (CONRAD E PRATT, 2019). Dessa maneira, o estudo dos mecanismos desse tipo de morte celular torna-se importante afim de contribuir para a caracterização de compostos com ação anti-ferroptótica que possam ser utilizados como estratégias terapêuticas para auxiliar no tratamento de doenças nas quais a oxitose/ferroptose está envolvida.

Figura 1 - Doenças humanas nas quais os inibidores/ativadores de ferroptose podem modular a progressão da doença.



A esquerda doenças e situações nas quais a oxitose/ferroptose está relacionada e a utilização de inibidores poderia reduzir os danos e a progressão dessas doenças. A direita doenças e situações nas quais a indução de oxitose/ferroptose através da utilização de ativadores poderia reduzir os danos e a progressão dessas situações (Adaptado de CONRAD E PRATT, 2019).

1.1.2 Mecanismo de oxitose/ferroptose

Apesar do mecanismo da via de morte celular por oxitose/ferroptose não estar totalmente esclarecido, o envolvimento do eixo sistema x_c^- /GSH/GPx4 é incontestável e considerado o ponto inicial dessa via de morte celular (Figura 2) (TAN, SCHUBERT e MAHER, 2001; DIXON *et al.*, 2012; YANG e STOCKWELL, 2016). O sistema antiportador de cistina/glutamato (sistema x_c^-) é responsável por captar de forma específica a cistina (Cys-S-S-Cys) (a forma dimera oxidada da cisteína - Cys-SH) extracelular juntamente com o efluxo intracelular de Glu (CONRAD e SATO, 2011; LEWERENZ *et al.*, 2013). Uma vez absorvida pelo sistema x_c^- , a cistina (Cys-S-S-Cys) é rapidamente reduzida a cisteína (Cys-SH) pela GSH e/ou tioredoxina redutase 1 (citossólica) (MANDAL *et al.*, 2010). Assim o aminoácido cisteína (Cys-SH) é usado para a biossíntese da GSH ou para a síntese de proteínas (CONRAD e SATO, 2011).

Na maioria dos tecidos, o aminoácido não essencial cisteína é o substrato que limita a síntese de GSH (LEWERENZ *et al.*, 2013). Portanto, a inibição do sistema x_c^- , seja pelo excesso extracelular de Glu (MURPHY *et al.*, 1989; MURPHY *et al.*, 1990, YANG e STOCKWELL, 2016; LEWERENZ *et al.*, 2018) ou pelos inibidores diretos como a erastina, a sulfassalazina (SAS) e o sorafenibe (DOLMA *et al.*, 2003; YAGODA *et al.*, 2007; DIXON, *et al.*, 2012, YANG e STOCKWELL, 2016), leva a uma drástica redução de GSH intracelular induzindo a oxitose/ferroptose.

A síntese da GSH ocorre pela ação da enzima glutamato cisteína ligase (GCL) que catalisa a condensação da cisteína e do glutamato para formar o dipeptídeo γ -glutamilcisteína (γ GluCys). Em seguida, em outra reação catalisada pela enzima glutationa sintetase (GS) a glicina é adicionada para formar o tripéptido γ -glutamilcisteínilglicina (γ GluCysGly - GSH) (ESPINOSA-DIEZ *et al.*, 2015, FARINA e ASCHNER, 2019). A enzima GCL é responsável pela etapa limitante da síntese da GSH, portanto, sua inibição direta, por exemplo pela BSO, um conhecido inibidor específico e irreversível da GCL, também causa uma importante depleção de GSH e induz oxitose/ferroptose de maneira similar ao Glu (LI, SCHUBERT e MAHER, 1997; SCHUBERT e PIASECKI, 2001; YANG, *et al.*, 2014; YANG e STOCKWELL, 2016; LEWERENZ *et al.*, 2018).

A GSH serve como um cofator redutor das enzimas GPx. Estas são responsáveis por catalisar a redução de peróxidos (por exemplo, R-OOH) em seus álcoois correspondentes (R-OH) as custas da oxidação de duas moléculas de GSH formando a glutationa oxidada (GSSG) e água (H_2O) (BRIGELIUS-FLOHÉ e MAIORINO, 2013). A GSSG é reduzida a duas moléculas de GSH novamente pela enzima glutationa redutase (GR) através da utilização de moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como agentes redutores e assim é mantida a ação das enzimas GPxs. O NADPH pode ser regenerado pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e fosfogluconato desidrogenase (PGD) da via das pentoses-fosfato e pela enzima málica (ME) (ESPINOSA-DIEZ *et al.*, 2015).

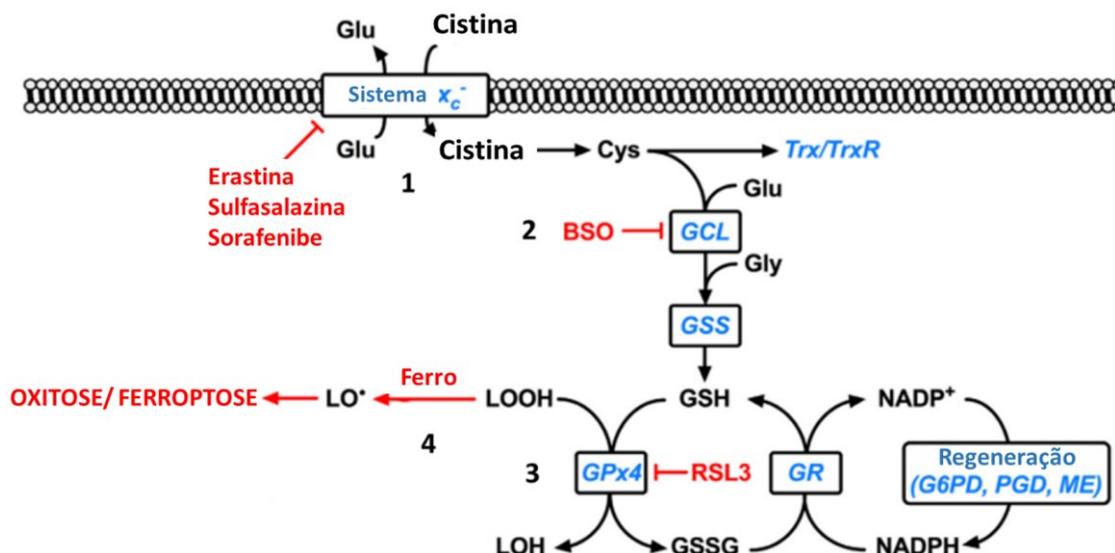
A principal consequência da depleção de GSH na oxitose/ferroptose é a inibição da enzima GPx4, essa inibição também pode ser realizada com inibidores diretos da enzima como o composto RSL3. O RSL3 inibe especificadamente a atividade da GPx4 através da ligação covalente entre sua porção eletrofílica cloroacetamida com a selenocisteína da enzima (YANG *et al.*, 2014; JELINEK *et al.*, 2018). A GPx4 é a única enzima da família das GPx que reduz os hidroperóxidos de lipídios complexos, como fosfolipídios, colesterol e ésteres de colesterol mesmo quando estão inseridos em biomembranas ou lipoproteínas. Esses lipídios complexos

que compõem as membranas das células de mamíferos podem sofrer reações de auto-oxidação que caso não sejam controladas se propagam em uma reação em cadeia denominada de peroxidação lipídica acarretando em danos as biomembranas (FORCINA E DIXON, 2019).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS), que constituem os fosfolípidios de membranas, ao reagirem com ER geram radicais lipídicos (L^{\bullet}) que por sua vez reagem com o oxigênio (O_2) formando os radicais peroxil lipídicos (LOO^{\bullet}) ou os hidroperóxido lipídicos (LOOH). Os radicais peroxil lipídicos (LOO^{\bullet}) propagam uma reação em cadeia abstraindo átomos de H de espécies lipídicas adjacentes, um novo PUFA. Essa reação em cadeia termina quando são gerados radicais suficientes de tal forma que reagem espontaneamente para produzir produtos de degradação lipídica não reativos (FORCINA E DIXON, 2019). Portanto, a consequência da inibição da enzima GPx4 é o acúmulo dessas ER lipídicas que sinalizam para a morte ferroptótica (YANG *et al.*, 2014; JELINEK *et al.*, 2018).

O ferro normalmente não é reativo quando está ligado à sua proteína de transporte, a transferrina e de armazenamento, a ferritina. Entretanto, com a depleção de GSH ocorre prejuízo nas defesas antioxidantes causando o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (YANG *et al.*, 2014), que por sua vez podem oxidar a ferritina citoplasmática liberando o ferro ferroso (Fe^{2+}) (SIMUNEK *et al.*, 2005). O Fe^{2+} pode reagir, através da reação de Fenton, com os hidroperóxidos lipídicos (LOOH), gerados pela inibição da enzima GPx4, produzindo o radical alcóxil lipídico (LO^{\bullet}) e assim potencializar a peroxidação lipídica e os danos às membranas biológicas acarretando a oxitose/ferroptose (FORCINA E DIXON, 2019).

Figura 2 - Mecanismo envolvido na oxitose/ferroptose.



O sistema antiportador de cistina/glutamato (sistema x_c^-) capta a cistina (a forma dimera oxidada da cisteína - Cys) extracelular juntamente com o efluxo intracelular de Glu. Uma vez absorvida pelo sistema x_c^- , a cistina é rapidamente reduzida a cisteína (Cys) pela GSH e/ou tioredoxina redutase 1 (TrxR 1 citosólica). Assim a cisteína (Cys) é usada para a biossíntese da GSH, que ocorre em duas etapas: a primeira pela ação da enzima glutamato cisteína ligase (GCL) que catalisa a condensação da cisteína e do glutamato para formar o dipeptídeo γ -glutamilcisteína (γ GluCys). Em seguida, a segunda etapa é catalisada pela enzima glutationa sintetase (GS) a glicina é adicionada para formar o tripéptido γ -glutamilcisteínilglicina (γ GluCysGly - GSH). A inibição do sistema x_c^- pelo excesso extracelular de glutamato (Glu) e pelos inibidores diretos erastina, sulfasalazina e o sorafenibe (1), assim como a inibição direta da enzima glutamato cisteína ligase (GCL) pela butionina sulfoximina (BSO) (2) levam a drástica redução de glutationa (GSH) intracelular. A GSH serve como um cofator redutor das enzimas glutationa peroxidases (GPx). Estas são responsáveis por catalisar a redução de peróxidos (por exemplo, R-OOH) em seus álcoois correspondentes (R-OH) as custas da oxidação de duas moléculas de GSH formando a glutationa oxidada (GSSG) e água (H_2O). A GSSG é reduzida a duas moléculas de GSH novamente pela enzima glutationa redutase (GR) através da utilização de moléculas de NADPH que pode ser regenerado pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e fosfogluconato desidrogenase (PGD) da via das pentoses-fosfato e pela enzima málica (ME). A depleção de GSH e o composto RSL3 (3) causam a inibição da enzima glutationa peroxidase 4 (GPx4) levando ao acúmulo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH). O Fe^{2+} livre (4) pode reagir com os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) gerados pela inibição da enzima GPx4, produzindo o radical alcóxil lipídico (LO^\bullet) levando a uma reação em cadeia denominada de peroxidação lipídica danificando os lipídios das membranas biológicas, acarretando a morte ferroptótica (Adaptado de ABDALKADER *et al.*, 2018).

1.1.3 Oxitose/ferroptose e doenças relacionadas

A oxitose/ferroptose foi descrita como um tipo de morte celular regulada oxidativa não apoptótica dependente de ferro, que apesar do seu mecanismo não estar totalmente esclarecido, apresenta como principais características bioquímicas a depleção de GSH, acúmulo de ferro, inibição da GPx4 e aumento de ER, principalmente as ER lipídicas (DIXON *et al.*,

2012; YANG E STOCKWELL, 2016; STOCKWELL *et al.*, 2017). O papel da oxitose/ferroptose vem sendo descrito em várias patologias, que incluem doenças renais, hepáticas, cardiovasculares e neurodegenerativas, devido as suas características bioquímicas particulares, bem como a ação protetora de inibidores específicos desse tipo de morte celular (FRIEDMANN ANGELI *et al.*; 2014; DEVOS *et al.*, 2014; DO VAN *et al.*, 2016; CONRAD E PRATT, 2019; DIONÍSIO, AMARAL E RODRIGUES, 2021, FANG *et al.*, 2019; MAHER, CURRAIS, SCHUBERT, 2020; WU *et al.*, 2021).

No modelo *in vivo* de insuficiência renal aguda (IRA) causada pela depleção induzível da GPx4 tendo a morte como desfecho, o tratamento com a Lip-1 prolongou a vida dos animais. Em um modelo pré-clínico de lesão hepática induzida por isquemia/reperfusão o tratamento com a Lip-1 reduziu a área de necrose hepática e a concentração plasmática das enzimas hepáticas aspartato e alanina aminotransferase (AST e ALT). A Lip-1 impediu a peroxidação lipídica e a morte celular induzida pelo RSL3 em um cultivo primário de células epiteliais do túbulo proximal renal humano (HRPTEpiCs) indicando que a Lip-1 previne a morte celular ferroptótica também nas doenças renais em humanos (FRIEDMANN ANGELI *et al.*; 2014).

De acordo com os resultados apresentados por Fang e colaboradores (2019) em modelo *in vivo* de cardiomiopatia induzida por isquemia/reperfusão (I/R) os camundongos que receberam o pré-tratamento tanto com a Fer-1 quanto com o quelante de ferro dexrazoxano (DXZ) apresentam uma redução significativa no tamanho do infarto do miocárdio, redução dos marcadores de hipertrofia cardíaca e da concentração plasmática de enzimas do miocárdio como a lactato desidrogenase - (LDH) e a creatina quinase-MB (CK-MB). De maneira semelhante, animais pré-tratados com a Fer-1 ou com o DXZ apresentaram redução do dano cardíaco e melhora na função cardíaca, no modelo *in vivo* de cardiomiopatia induzida pela antraciclina doxorubicina (DOX), comumente usada para tratar vários tipos de câncer. O tratamento com a Fer-1 e com o DXZ previniu o acúmulo de ferro, a peroxidação lipídica, a disfunção mitocondrial e as alterações morfológicas das mitocôndrias dos cardiomiócitos de camundongos induzidas pela DOX (FANG *et al.*, 2019).

Além das doenças renais e cardiovasculares, a ferroptose tem sido também descrita nas doenças neurodegenerativas, como na doença de Parkinson (DP). A DP é caracterizada por uma perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc) acarretando em danos ao sistema motor. Há um acúmulo maior de ferro na SNpc, em relação a outras regiões do cérebro de pacientes com a DP. A gravidade da doença, com piora nos danos motores, se correlaciona com o aumento do teor total de ferro nesta reação da

substância negra (CRICHTON *et al.*, 2019), o que indica que a ferroptose parece estar envolvida na perda de neurônios dopaminérgicos nesta região do cérebro (DIONÍSIO, AMARAL E RODRIGUES, 2021).

Estudos realizados com células Lund do mesencéfalo humano diferenciadas (LUHMES) as quais constituem um excelente modelo *in vitro* da DP foram mais sensíveis a oxitose/ferroptose provocada pela erastina em comparação com insultos que induzem morte apoptótica ou autofágica. Tanto a Fer-1 quanto o quelante de ferro deferiprona (DFP) inibiram a oxitose/ferroptose induzida pela erastina enquanto que os inibidores de apoptose e autofagia foram ineficazes (DEVOS *et al.*, 2014; DO VAN *et al.*, 2016). Além disso, a Fer-1 e o quelante de ferro DFP protegeram as células LUHMES contra neurotoxinas comumente usadas em modelos de DP, como por exemplo o 1-metil-4- fenilpiridínio (MPP+) e o Paraquat (PQ) (DO VAN *et al.*, 2016). Em modelos *in vivo* da DP tanto a Fer-1 (DO VAN *et al.*, 2016) quanto o quelante de ferro DFP (DEVOS *et al.*, 2014) reduziram a neurodegeneração dopaminérgica e os danos locomotores. Em pacientes com a DP o tratamento com a DPF apresentou uma redução no acúmulo de ferro da SN e melhora da função motora (DEVOS *et al.*, 2014).

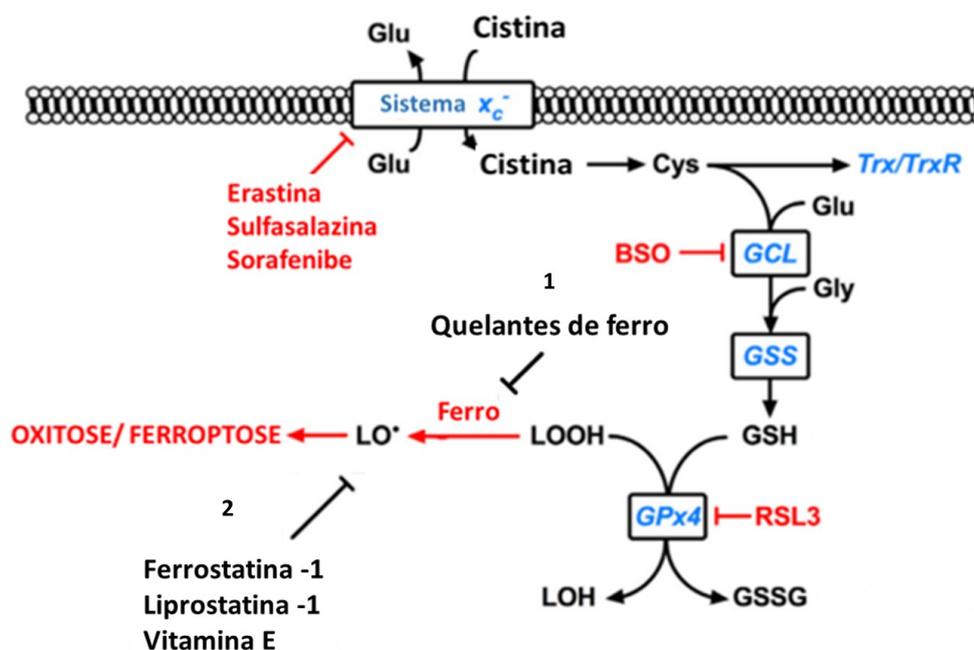
A ferroptose também tem sido descrita na patogênese da doença de Alzheimer (DA) (MAHER, CURRAIS, SCHUBERT, 2020). A DA é uma doença neurodegenerativa fatal relacionada ao envelhecimento que resulta em declínio cognitivo, perda de memória e psicose. Clinicamente, a DA é caracterizada por demência progressiva com sintomas iniciais de perda de memória de curto prazo por consequência da extensa perda neuronal no hipocampo e área cortical e sub-cortical. Há evidências consideráveis de que há perda da homeostase do ferro no cérebro de pacientes com a DA, com aumento do teor de ferro em regiões específicas do cérebro que se correlacionou com o diagnóstico clínico de DA (CRICHTON *et al.*, 2019). Um estudo com pacientes com a DA mostrou através de imagens por ressonância magnética que os danos ao hipocampo ocorrem em conjunto com o acúmulo de ferro (RAVEN *et al.*, 2013).

1.1.4 Estratégias Protetoras

Abordagens citoprotetoras que visam inibir a oxitose/ferroptose têm se concentrado principalmente em suprimir a formação das ER, principalmente as ER de lipídios. E assim fornecer estratégias terapêuticas que podem auxiliar no tratamento de diversas doenças nas quais a oxitose/ferroptose está presente. Neste contexto, destaca-se o efeito anti-ferroptótico de

compostos antioxidantes lipofílicos como a Fer-1 e compostos quelantes de ferro como a DFO (Figura 3) (DIXON *et al.*, 2012; SKOUTA *et al.*, 2014; FRIEDMANN ANGELI *et al.*, 2014).

Figura 3 - Inibidores da oxitose/ferroptose.



Quelantes de ferro (1) e antioxidantes lipofílicos, como a ferrostatina-1, a liproxstatina-1 e a vitamina E (2), protegem da oxitose/ferroptose por bloquearem o acúmulo das espécies reativas lipídicas (Adaptado de ABDALKADER *et al.*, 2018).

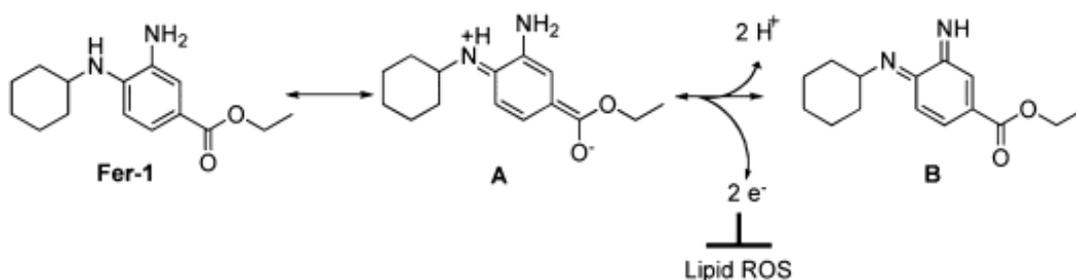
A Fer-1 foi identificada como um inibidor específico da ferroptose, por Dixon e colaboradores (2012). Esse composto inibiu de maneira específica a morte induzida pela erastina e pelo RSL3 (indutores de oxitose/ferroptose) sem apresentar efeito protetor frente à morte necrótica induzida pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a morte apoptótica causada pela estaurosporina em células de fibrosarcoma humano (HT-1080). Além disso, apresentou proteção frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu em fatias organotípicas de cérebro de ratos pós-natal (DIXON *et al.*, 2012).

A Fer-1, além de proteger as células HT-1080 da morte celular, preveniu tanto o acúmulo de ER citosólicas quanto as ER lipídicas induzidos pela erastina. O efeito anti-ferroptótico da Fer-1 foi atribuído a sua atividade antioxidante dependente de ambas as amins aromáticas (porção N-ciclohexil e amina aromática primária) (DIXON *et al.*, 2012). Esses pesquisadores sugeriram, as ER lipídicas, como cruciais para a ferroptose, e propuseram que a porção N-ciclohexil da Fer-1 poderia servir como uma âncora lipofílica dentro das membranas biológicas, promovendo a interação da Fer-1 com as membranas lipídicas, auxiliando assim na

sua atividade antioxidante sobre as ER lipídicas e, portanto, prevenindo a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, a morte ferroptótica (DIXON *et al.*, 2012).

Skouta e colaboradores (2014) propuseram o mecanismo de ação da Fer-1 baseado na sua estrutura, na qual por meio da transferência de dois prótons (átomos de hidrogênio) e dois elétrons a Fer-1 pode atuar reduzindo um peróxido lipídico ($R\text{-OOH} \rightarrow R\text{-OH}$) e também eliminando um radical lipídico ($R\text{-O}\cdot \rightarrow R\text{-OH}$) com a formação do composto etil 4-(ciclo-hexilimino)-3- iminociclohexa-1,5-dienocarboxilato redox-estável (Figura 4). Portanto, a Fer-1 é uma arilalquilamina com propriedades antioxidantes relacionadas com sua atividade de captura de radicais (*radical-trapping antioxidant* - RTA) também conhecida como, scavenger de radicais, ou como agente redutor, capaz de bloquear a peroxidação lipídica inibindo a oxitose/ferroptose (SKOUTA *et al.*, 2014) corroborando o que foi descrito por Dixon e colaboradores (2012).

Figura 4 - Mecanismo proposto para a Fer-1.



A Fer-1 libera dois prótons ($2 H^+$) e dois elétrons formando um composto intermediário A (isômero de função da Fer-1 - tautômero) que resulta na formação de um composto B (etil 4-(ciclo-hexilimino)-3-iminociclohexa-1,5-dienocarboxilato) redox-estável. Os $2 H^+$ e os elétrons podem ser transferidos para as ER lipídicas (SKOUTA *et al.*, 2014).

Apesar de seu papel benéfico incontestável contra oxitose/ferroptose em condições *in vitro* (DIXON *et al.*, 2012; SKOUTA *et al.*, 2014; JELINEK *et al.*, 2018), algumas evidências indicam que Fer-1 não é adequada para uso *in vivo* por causa de sua baixa estabilidade metabólica; a presença de uma porção éster parece limitar sua aplicação *in vivo* devido à rápida hidrólise desse éster em ácido carboxílico inativo (HOFMANS *et al.*, 2016), além de não passar pela barreira hematoencefálica (DO VAN *et al.*, 2016). Neste contexto, torna-se relevante o estudo de novos agentes com propriedades anti-ferroptóticas semelhantes a Fer-1 *in vitro*,

porém com melhores propriedades ADME (Absorção/Distribuição/Metabolismo/Excreção) permitindo sua utilização *in vivo*.

A DFO (Figura 5) foi o primeiro quelante de ferro aprovado pela agência reguladora Food and Drug Administration (FDA), em 1968, para o tratamento de intoxicação aguda de ferro e sobrecarga de ferro (SF) em pacientes com anemias dependentes de transfusão de hemácias. Sintetizada por uma bactéria com a finalidade de roubar ferro do hospedeiro (SHU *et al.*, 2018), a DFO é uma molécula de elevado peso molecular, hexavalente, ou seja, apresenta seis sítios polares de interação e, portanto, quela o ferro (Fe^{3+}) na proporção de 1:1 (CANÇADO, 2007).

A DFO apresenta como características farmacocinéticas pequena absorção gastrointestinal quando administrada por via oral, devendo ser administrada por via subcutânea através de aparelho infusor ou pela via intravenosa. Sua excreção é predominantemente renal e ocorre na forma complexada com o ferro (DFO:ferro) (CANÇADO, 2007).

A DFO é um potente quelante de ferro usado no tratamento de doenças que envolvem a SF (CANÇADO, 2007) e apresentou efeito inibitório sobre a ferroptose causada pela erastina e RSL3 (DIXON *et al.*, 2012; JELINEK *et al.*, 2018). Por outro lado, quelantes de ferro lipofílicos com maior capacidade de permear as membranas celulares foram mais potentes do que a DFO na proteção contra a ferroptose (DIXON *et al.*, 2012).

Além disso, o tratamento com a DFO apresenta muitas limitações. Por ser um quelante hidrofílico, possui uma baixa absorção e rápida depuração apresentando uma meia-vida plasmática curta (20–30 min) inviabilizando sua administração por via oral. Sendo necessária a injeção prolongada (8 a 12 horas) e frequente (pelos menos 5 vezes por semana) em pacientes com SF. Portanto, para pacientes que precisam de tratamento crônico com a DFO ele se torna caro e ineficiente. Além de apresentar efeitos colaterais como reações cutâneas e infecções locais (CANÇADO, 2007; SHU *et al.*, 2018).

1.2 NOVOS QUELANTES DE FERRO

A principal causa do insucesso da terapia com a DFO é a baixa adesão ao tratamento causada pela impossibilidade de a DFO ser administrada por via oral. Dessa forma, para melhorar a adesão pelos pacientes ao tratamento com a DFO, um caminho seria buscar maneiras de aumentar a sua absorção e sua estabilidade metabólica (CANÇADO, 2007).

Neste cenário, o grupo de pesquisa do professor Breno Pannia Espósito desenvolveu a Deferoxamina-cafeína (DFCAF), um conjugado da DFO com a cafeína (Figura 5). A cafeína é um composto natural de baixa toxicidade, sendo uma molécula rapidamente absorvível que pode ser ligada a outros compostos para melhorar a sua permeabilidade celular. De fato a DFCAF apresentou maior permeabilidade celular além de manter a capacidade de eliminação do ferro e as propriedades antioxidantes da DFO (ALTA *et al.*, 2014). Portanto, sugere-se que a DFCAF poderia ser um quelante de ferro mais eficiente que a DFO no tratamento de neuropatologias nas quais a oxitose/ferroptose esteja envolvida. Entretanto, não há estudos comparando o efeito anti-ferroptótico da DFO em relação a DFCAF.

O desenvolvimento de novos quelantes de ferro que possuíssem eficácia e segurança semelhante à DFO, porém de administração oral, evitando o inconveniente das infusões por tempo prolongado fez surgir a DFP (Figura 4) e o deferasirox (DFX). Atualmente a DFP, assim como a DFO e o DFX são os únicos quelantes de ferro fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento de doenças nas quais a SF está envolvida. Os três compostos apresentam registros vigentes na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CANÇADO, 2007).

A DFP (1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridona) é uma molécula de baixo peso molecular, bivalente, razão pela qual três moléculas deste fármaco se ligam a uma molécula de ferro (Fe^{3+}), formando o complexo DFP:ferro na proporção de 3:1. Quanto às propriedades farmacocinéticas, a DFP é administrada por via oral sendo rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal. Aproximadamente 85% da DFP ingerida é metabolizada formando um conjugado glucoronídeo inativo, que é excretado na urina juntamente com os complexos DFP:ferro (CANÇADO, 2007; SHU *et al.*, 2018; CRICHTON *et al.*, 2019).

A terapia com a DFP apresenta inconvenientes como uma meia-vida curta (3 – 4 horas) exigindo administração oral três vezes ao dia para atingir a dose terapêutica. Além dos efeitos colaterais como o aumento das enzimas hepáticas, distúrbios gastrointestinais (náusea, vômito e dor abdominal), sintomas articulares, principalmente artralgia e artrite leve a grave, alterações dermatológicas e deficiência de zinco. A agranulocitose e neutropenia são os efeitos adversos mais graves podendo ser fatal, dessa forma é recomendado o monitoramento por meio do hemograma (CANÇADO, 2007; SHU *et al.*, 2018; CRICHTON *et al.*, 2019).

A DFP é um quelante ferro permeável a barreira hematoencefálica (Devos *et al.*, 2014) mais lipofílico que a DFO e, portanto, possui uma maior capacidade de quelar o ferro intracelular sendo uma estratégia terapêutica mais eficiente para doenças no SNC. De fato,

ensaios clínicos com a DFP para o tratamento de doenças neurodegenerativas estão sendo realizados e vem mostrando resultados promissores (CRICHTON *et al.*, 2019).

Alguns ensaios clínicos evidenciaram a necessidade da administração da DFP por pelo menos 6 a 9 meses para que os efeitos positivos como redução do acúmulo de ferro na substância negra (SN) e melhora dos danos motores pudessem ser identificados em pacientes com DP (DEVOS *et al.*, 2014; MARTIN-BASTIDA *et al.*, 2017; CRICHTON *et al.*, 2019). A maior desvantagem do uso da DFP foi seus já conhecidos efeitos colaterais (agranulocitose e neutropenia) que acometeram 8% dos pacientes (MARTIN-BASTIDA *et al.*, 2017; CRICHTON *et al.*, 2019).

Atualmente está sendo realizado um ensaio clínico com pacientes com a DA utilizando a DFP de liberação controlada como uma tentativa de prevenir os efeitos adversos. O ensaio clínico pretende avaliar a segurança e eficácia da DFP em retardar o declínio cognitivo em pacientes com a DA. O teor de ferro no cérebro durante o período do ensaio será determinado através de imagens por ressonância magnética (IRM) (Neuroscience Trials Austrália - Ensaio Clínico Deferiprona por via oral para retardar a Demência) (CRICHTON *et al.*, 2019).

Os resultados positivos dos ensaios clínicos indicam que a terapia com quelantes de ferro tem potencial para se tornar uma opção terapêutica para o tratamento das doenças neurodegenerativas, mas os estudos ainda são inconclusivos (CRICHTON *et al.*, 2019). Dessa maneira mais estudos são necessários para identificar moléculas quelantes de ferro que apresentem maior eficácia sem os efeitos colaterais graves.

O Salicilaldeído isonicotinoil hidrazina (SIH) é um quelante de ferro experimental trivalente que se liga ao ferro em uma proporção de 2:1 (Figura 5). Devido à sua lipofilicidade, o SIH pode ser administrado por via oral, penetrando facilmente as membranas celulares e quelando firmemente o ferro férrico Fe^{3+} intracelular e, portanto, é capaz de bloquear a produção intracelular de ER dependente de ferro (SIMUNEK *et al.*, 2005, SHU *et al.*, 2018).

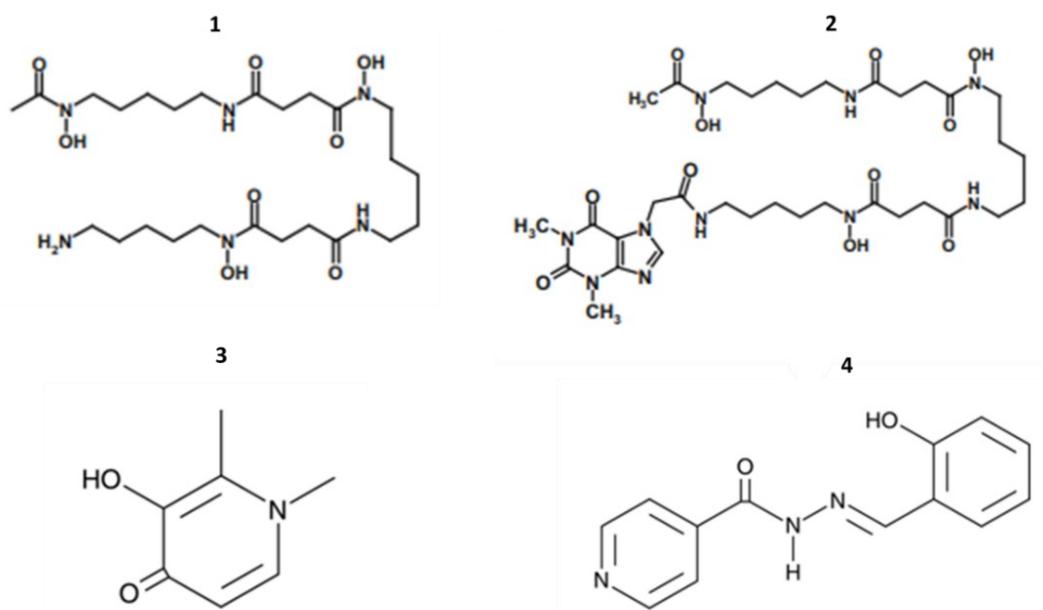
Nesse contexto, o estudo de Simunek e colaboradores (2005) mostrou que o SIH quando co-tratado com o H_2O_2 protegeu as células H9c2 (células derivadas de cardiomioblastos de embrião de rato) da perda do potencial de membrana mitocondrial e da morte celular induzidos pelo H_2O_2 por bloquear o dano oxidativo causado pelas ER geradas pelo ferro (SIMUNEK *et al.*, 2005). Além disso, o quelante de ferro SIH apresentou uma maior proteção contra a morte celular induzida pelo H_2O_2 em células ARPE-19 (linhagem celular humana de células epiteliais pigmentares da retina - RPE) em comparação com o quelante de ferro

hidrofílico DFO, com o quelante de ferro extracelular ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) e também com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) (LUKINOVA *et al.*, 2009).

Em um estudo no qual foi comparado o efeito protetor de quelantes de ferro usados na prática clínica (DFO, DFP e DFX) com agentes experimentais como o SIH, contra um modelo de lesão oxidativa induzida pelo terc-butil hidroperóxido (tBuOOH) em células H9c2, o quelante de ferro SIH teve uma ação protetora mais eficaz. Provavelmente relacionada com a sua lipofilicidade ideal e sua capacidade de gerar complexos de ferro que não possuem atividade redox, ou seja, não são capazes de levar a oxidação de outras moléculas (BENDOVA *et al.*, 2010).

Neste cenário, é provável que os quelantes de ferro mais lipofílicos sejam mais potentes e eficientes na proteção contra a oxitose/ferroptose por bloquearem a geração de ERO e a peroxidação lipídica dependente de ferro. Porém faltam estudos que comparem o efeito protetor de quelantes de ferro em modelos de oxitose/ferroptose.

Figura 5 - Estrutura dos quelantes de ferro.



N-[5-[[4-[5-[acetil(hidroxi)amino]pentilamino]-4-oxobutanoil]-hidroxiamino]pentil]-N'-(5 aminopentil)-N'-hidroxibutanodiamida (Deferoxamina - DFO) (1), Deferoxamina-caféina (DFCAF) (2), 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridona (Deferiprona - DFP) (3), Salicilaldeído isonicotinoil hidrazina (SIH) (4) (ALTA *et al.*, 2014; BENDOVA *et al.*, 2010).

1.3 PROBUCOL (PB) E DERIVADOS

O PB é um composto fenólico que foi utilizado na clínica para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares devido principalmente ao seu efeito hipocolesterolemizante (YAMASHITA e MATSUZAWA, 2009) (Figura 6). Além disso, este composto apresentou efeitos protetores contra o dano oxidativo e foi capaz de modular positivamente algumas defesas antioxidantes endógenas (SINGLA *et al.*, 2007).

Neste contexto um estudo demonstrou que o PB é capaz de modular positivamente a atividade da enzima glutathione peroxidase (isoenzima 1) (GPx-1) em cultura primária de neurônios cerebelares, sendo que este fenômeno foi responsável pela proteção contra o dano oxidativo induzido por metilmercúrio, um agente tóxico que induziu elevada produção de H₂O₂. Nesse trabalho, foi visto que o PB atuou como um ativador direto da atividade da GPx-1 (FARINA *et al.*, 2009).

Mais tarde, vários estudos demonstraram efeitos neuroprotetores do PB em diferentes modelos de doenças neurodegenerativas. Um desses estudos, mostrou que o tratamento por duas semanas com o PB preveniu a perda cognitiva e sináptica, além de alterações bioquímicas hipocámpais como a peroxidação lipídica, sendo estes efeitos atribuídos, ao menos em parte, a sua atividade antioxidante em um modelo experimental *in vivo* da DA induzida pela administração do peptídeo A β (SANTOS *et al.*, 2012).

O tratamento com o PB atenuou as alterações bioquímicas (danos oxidativos) no estriado e comportamentais (danos motores) em um modelo *in vivo* de doença de Huntington (DH) induzido pela administração via intraperitoneal de ácido 3-nitropropiónico (3-NP) em ratos. Foi observado, que o PB aumentou tanto a atividade da GPx quanto os níveis de GSH e isto provavelmente está relacionado com seu efeito protetor neste modelo (COLLE *et al.*, 2013a). Em outro estudo, o PB foi capaz de proteger contra déficits motores, assim como peroxidação lipídica, diminuição dos níveis de tiroxina hidroxilase (TH) e da perda sináptica no estriado de camundongos em um modelo *in vivo* de DP induzido pela injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Em um recente estudo foi demonstrado que a pré-incubação com o PB aumenta a atividade da GPx1 purificada derivada de eritrócitos bovinos. Além disso, o pré-tratamento com PB aumentou a atividade da GPx1 em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) sem alterar a expressão da enzima, além de proteger as células frente à citotoxicidade do cumeno hidroperóxido (CuOOH) e do tBuOOH. Porém, a ação protetora do PB frente à citotoxicidade do

tBuOOH é perdida com o *knockdown* da GPx1, indicando a GPx1 como alvo molecular direto do PB sendo responsável pelos seus efeitos protetores contra agentes oxidantes (SANTOS *et al.*, 2020).

Apesar dos efeitos benéficos do PB, esse está associado com alguns efeitos adversos indesejáveis em seres humanos, como a redução do colesterol HDL e alterações cardíacas (TARDIF *et al.*, 2002; YAMASHITA E MATSUZAWA, 2009). Desta forma, a fim de preservar os efeitos benéficos, bem como minimizar os efeitos colaterais do PB, foi desenvolvido o composto succinobucol (SUC) (Figura 6). O succinobucol (SUC) é um éster monossuccinil do PB que apresenta, além de maior biodisponibilidade, as propriedades hipocolesterolemiantes, antioxidantes e anti-inflamatórias (propriedades benéficas comuns as do PB), sem causar os efeitos adversos induzidos pelo mesmo (TARDIF *et al.*, 2008, KUNSCH *et al.*, 2004; STOCKER, 2009). O grupo de pesquisa do Prof^o. Dr Antônio Luiz Braga (Departamento de Química, CFM/UFSC, SC, BR) têm realizado a síntese de novos compostos derivados do PB, como o SUC.

Um estudo comparou os efeitos do SUC e do PB onde ambos foram efetivos em proteger contra os aumentos de ERO, peroxidação lipídica e depleção de GSH; porém, foi mostrada uma maior eficiência do SUC em atenuar a disfunção mitocondrial causada pelo estresse oxidativo induzido pelo ácido 3-NP em modelo experimental *in vitro* da DH em frações sinaptossomais de encéfalo de ratos (COLLE *et al.*, 2013b). Além disso, outro trabalho mostrou que o efeito protetor do SUC sobre a disfunção mitocondrial induzida pelo ácido 3-NP em um modelo *in vitro* da DH, foi via aumento da atividade e expressão da enzima GCL, a qual catalisa a reação limite da síntese de GSH (COLLE *et al.*, 2016).

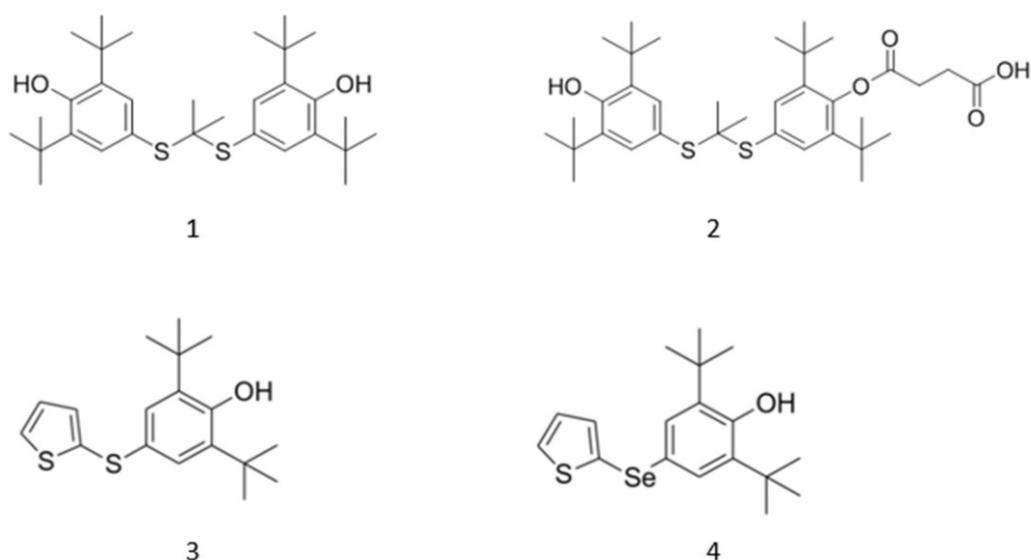
Recentemente, em colaboração com o Prof^o. Dr Antônio Luiz Braga (Departamento de Química, CFM/UFSC, SC, BR), obtivemos mais dois novos compostos derivados de PB, o composto 2,6-di-tert-Butil-4-(Tiofeniltio) Fenol (RC363) e o composto 2,6-di-tert-Butil-4-(Tiofenilselanil) Fenol (RC574) (Figura 6). O desenvolvimento desses compostos ocorreu através da técnica de simplificação molecular, de modo que a estrutura responsável pela ação farmacológica (grupamento contendo dois átomos de enxofre e porção fenólica) foi mantida com as mesmas distâncias interatômicas, porém foi realizada a simplificação (retirada de uma segunda porção fenólica) com enrijecimento da cadeia lateral (PINACHO CRISÓSTOMO *et al.*, 2006). Além disso, foi sintetizado um derivado de selênio, prevendo um possível bioisosterismo em relação ao análogo de enxofre e possibilitando a avaliação de compostos com diferentes graus de lipossolubilidade, já que o uso de compostos orgânicos contendo

selênio são conhecidos por apresentarem maior potência farmacológica quando comparados com os seus análogos de enxofre (NOGUEIRA *et al.*, 2004).

O estudo de Bueno e colaboradores (2020) demonstrou que diferente do PB, os seus análogos RC363 e RC574 tiveram efeito protetor contra a morte celular oxidativa induzida pelo Glu, também conhecida como oxitose/ferroptose, em um modelo utilizando as células derivadas do hipocampo de camundongos (HT22) e em cultivo primário de neurônios corticais (BUENO *et al.*, 2020). Nesse estudo as células HT22 receberam pré-tratamento com o PB e seus derivados RC363 e RC574 e, posteriormente, foram expostas ao Glu. Neste modelo os compostos RC363 e RC574, apesar de não reverterem a depleção de GSH, inibiram a disfunção mitocondrial induzida pelo glutamato (geração de superóxido mitocondrial e a hiperpolarização mitocondrial). Esses efeitos foram em parte associados ao aumento dos níveis e da atividade da GPx1 induzidos pelos compostos RC363 e RC574. Observou-se também que o co-tratamento com os compostos RC363 e RC574 demonstrou proteção contra o RSL3, um inibidor específico da GPx4 (BUENO *et al.*, 2020).

Apesar dos derivados do PB terem apresentado efeitos benéficos frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu e RSL3, o mecanismo de proteção, assim como a mitigação dos principais eventos deletérios (depleção de glutathiona e indução de peroxidação lipídica) característicos dessa morte celular não foram totalmente esclarecidos. Portanto são necessários mais estudos a cerca do papel protetor dos compostos derivados do PB afim de propor-los como possíveis agentes anti-ferroptóticos.

Figura 6 - Estrutura do probucol e seus derivados.



2,6-diterc-butil-4-[2-(3,5-diterc-butil-4-hidroxifenil)sulfanilpropan-2-ilsulfanil] fenol (Probucol - PB) (1), ácido 4-[2,6-diterc-butil-4-[2-(3,5-diterc-butil-4-hidroxifenil)sulfanilpropan-2-ilsulfanil]fenoxi]-4-oxobutanóico (Succinobucol - SUC) (2), 2,6-di-terc-butil-4-(tiofeniltiol) fenol (RC363) (3) e 2,6-di-terc-butil-4-(tiofenilselenil) fenol (RC574) (4).

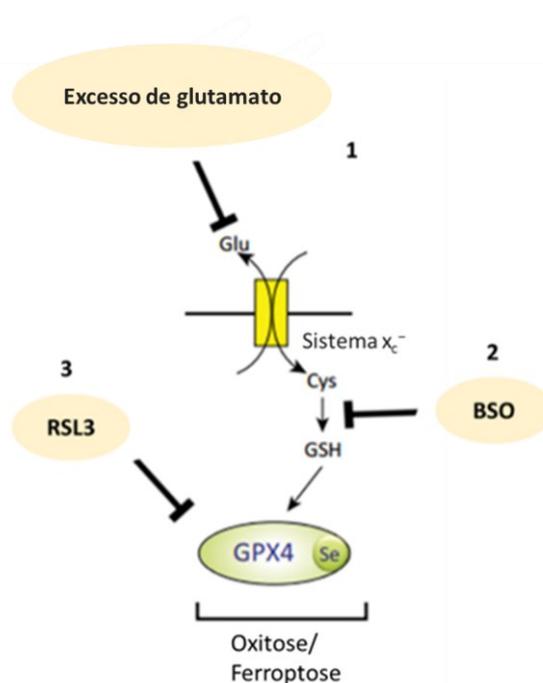
1.4 MODELO DE OXITOSE/FERROPTOSE EM CÉLULAS HT22

Estudos sugerem que a manipulação da oxitose/ferroptose pode ser explorada não somente para eliminar as células tumorais, mas também para preservar células neuronais e dos demais tecidos de condições oxidativas letais. Portanto, a ativação dessa via de morte celular é importante em tumores podendo auxiliar no tratamento do câncer (DIXON e STOCKWELL, 2019) e por outro lado, sua inibição torna-se relevante para retardar a progressão da morte neuronal, observada em várias doenças do SNC nas quais a oxitose/ferroptose está envolvida (DEVOS *et al.*, 2014; YANG E STOCKWELL, 2016; DO VAN *et al.*, 2016).

Neste contexto uma maneira de investigar a ação protetora de novos compostos é utilizar modelos que mimetizem esse tipo de morte celular. Os estudos iniciais sobre a oxitose induzida pelo Glu foram realizados utilizando as células HT22 (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001). Tendo em vista que as células HT22 são uma sub-linhagem derivada das células HT4, que foram originalmente imortalizadas a partir de uma cultura primária de neurônios hipocâmpais de camundongos (FREDERIKSEN *et al.*, 1988) com características colinérgicas (expressam marcadores colinérgicos como colina acetiltransferase - ChAT, transportador de alta afinidade pela colina - TAC, transportador vesicular de acetilcolina - VACHT e receptores muscarínicos - M1 e M2) (LIU *et al.*, 2009). Mas, por outro lado, destaca-se a falta de expressão dos receptores ionotrópicos de Glu, tornando essas células resistentes à excitotoxicidade glutamatérgica (DAVIS E MAHER, 1994).

Dessa forma, atualmente essa linhagem celular tem sido muito utilizada como modelo para os estudos sobre oxitose/ferroptose e para triagem de compostos potencialmente neuroprotetores. Além disso, as vantagens desse modelo são principalmente sua reprodutibilidade e a relevância para doenças do SNC (MAHER, CURRAIS, SCHUBERT, 2020). Neste cenário pretende-se investigar a proteção de compostos derivados do PB, assim como de compostos quelantes de ferro frente à oxitose/ferroptose induzida por três indutores (Glu, BSO e RSL3) que atuam sobre diferentes pontos do eixo sistema x_c^- /GSH/GPx4 (Figura 7) utilizando as células HT22.

Figura 7 - Eixo sistema x_c^- /GSH/GPx4 envolvido na oxitose/ferroptose e seus principais inibidores.



Excesso de glutamato (Glu) inibi o sistema x_c^- (1) causando a depleção de glutathiona (GSH) esse efeito também ocorre através da inibição da enzima glutamato cistina ligase (GCL) pelo composto butionina sulfoximina (BSO) (2). Como consequência acontece a inibição da enzima glutathiona peroxidase 4 (GPx4), a qual também pode ser inibida diretamente pelo composto RSL3 (3) acarretando a morte por oxitose/ferroptose (Adaptada de YANG E STOCKWELL, 2016).

Com este modelo de oxitose/ferroptose o presente estudo pretende comparar o efeito dos compostos derivados do PB com o anti-ferroptótico clássico Fer-1. Nossa hipótese é que os compostos derivados do PB apresentam efeitos anti-ferroptóticos maiores que o seu composto de origem e semelhantes ao da Fer-1 em mitigar a depleção de GSH e a peroxidação lipídica induzidos pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 em células HT22.

Nosso estudo também pretende investigar e comparar o efeito protetor dos quelantes de ferro DFO, DFCAF, DFP e SIH frente ao modelo de oxitose/ferroptose em células HT22. Neste caso, nossa hipótese é que quelantes de ferro mais lipofílicos apresentariam um efeito protetor mais potente frente a morte ferroptótica e assim seriam os mais indicados para auxiliar no tratamento de doenças nas quais a oxitose/ferroptose esteja envolvida. Acreditamos que estes quelantes teriam uma capacidade maior em bloquear a peroxidação lipídica, uma vez que seriam capazes de inibir a geração de ER intracelulares depende de ferro.

2 JUSTIFICATIVA

A oxitose/ferroptose é um tipo de morte celular que apresenta um papel determinante no desenvolvimento de muitas condições patológicas, entre elas as doenças neurodegenerativas. Assim, o estudo e o desenvolvimento de compostos com ação protetora frente a oxitose/ferroptose torna-se relevante uma vez que essas estratégias protetoras poderiam auxiliar no tratamento de diversas doenças, incluindo as neurodegenerativas. O modelo de oxitose/ferroptose utilizando as células HT22 tem sido muito utilizado para triagem de compostos potencialmente neuroprotetores, principalmente devido a sua relevância direta para doenças do SNC. Portanto, utilizando esse modelo esperamos propor a utilização de compostos derivados do PB como possíveis agentes anti-ferroptóticos. Além disso, pretende-se indicar quelantes de ferro mais apropriados em combater a oxitose/ferroptose. E dessa forma fornecer uma base para que sejam desenvolvidos melhores quelantes de ferro com menores ou até mesmo sem os efeitos colaterais.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral investigar o efeito protetor do composto probucol e seus derivados (SUC, RC363 e RC574), bem como de quelantes de ferro (DFO, DFCAF, DFP e SIH) frente a três diferentes indutores de oxitose/ferroptose (Glu, BSO e RSL3) utilizando as células HT22.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Objetivos específicos do capítulo I

- i. Avaliar a toxicidade dos compostos pró-ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 através de ensaios de viabilidade e morte celular;
- ii. Avaliar o efeito dos compostos pró-ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 sobre mudanças na concentração de GSH intracelular e na peroxidação lipídica;

- iii. Avaliar a toxicidade do PB e dos seus derivados, assim como do agente anti-ferroptótico clássico Fer-1, através dos ensaios de viabilidade e morte celular;
- iv. Avaliar o efeito protetor do PB e dos seus derivados frente à toxicidade dos compostos pró-ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 e comparar esse efeito com o agente anti-ferroptótico clássico Fer-1;
- v. Investigar se o PB e seus derivados são capazes de mitigar os efeitos deletérios (depleção de GSH e peroxidação lipídica) induzidos pelos agentes pró-ferroptose e comparar este efeito com o agente anti-ferroptótico clássico Fer-1.
- vi. Avaliar e comparar o efeito antioxidante do PB e dos seus derivados com o efeito antioxidante da Fer-1;
- vii. Avaliar a correlação do efeito antioxidante com efeito protetor do PB e dos seus derivados e da Fer-1.

3.2.2 Objetivos específicos do capítulo II

- i. Avaliar a toxicidade dos quelantes de ferro (DFO, DFCAF, SIH e DFP) através dos ensaios de viabilidade e morte celular;
- ii. Avaliar o efeito protetor dos quelantes de ferro (DFO, DFCAF, SIH e DFP) frente à citotoxicidade dos indutores de oxitose/ferroptose (Glu, BSO e RSL3);
- iii. Avaliar o efeito protetor dos quelantes de ferro (DFO, DFCAF, SIH e DFP) sobre eventos deletérios (depleção de GSH e concentração de ER) induzidos pelos compostos pró-ferroptóticos Glu, BSO e RSL3;
- iv. Avaliar o efeito antioxidante direto dos quelantes de ferro (DFO, DFCAF, SIH e DFP).

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os compostos probucol (PB), ferrostatina – 1 (Fer-1) e a glutathiona-etil ester (GSHEE), sal monossódico de ácido L-glutâmico monohidratado (Glutamato - Glu), sulfoximina bunionina (BSO), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- ácido carboxílico (Trolox), (1S, 3R)-2-(2-Cloroacetil)-2,3,4,9-tetrahidro-1-[4-(metoxicarbonil)fenil]-1H-pirido[3,4-b]indol-3-

ácido carboxílico metil ester (RSL3), dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT), 3,8-Diamino-5-[3-(dietilmetilamonio)propil]-6 fenilfenantridínio diiodeto (Iodeto de Propídeo - IP), 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O meio *dubecco's modified eagle medium* (DMEM) e o soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da empresa Gibco Life Technologies.

A síntese dos compostos derivados do PB, o succinobucol (SUC) bem como os compostos 2,6-di-tert-Butil-4-(Tiofeniltio) Fenol (RC363) e 2,6-di-tert-Butil-4-(Tiofenilselanil) Fenol (RC574) foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Dr. Antônio Luiz Braga (Departamento de Química, CFM/UFSC) e encontra-se descrita na literatura (Weingarten, 2004; Colle et al., 2013, Bueno et al., 2020).

O composto deferoxamina-caféina (DFCAF), derivado da DFO, foi sintetizado pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Dr. Breno Pannia Espósito (Instituto de Química, USP). A síntese da DFCAF foi previamente descrita na literatura (Alta et al., 2014). Os compostos quelantes de ferro, sal mesilato de deferoxamina (DFO), a deferiprona (DFP) e o composto saliciloil isonicotinoil hidrazona (SIH) foram gentilmente cedidos pelo referido professor. Esses compostos foram adquiridos comercialmente e apresentavam pureza superior a 99%.

4.2 CULTIVO CELULAR

Neste trabalho foi utilizada a linhagem celular derivada de neurônios hipocampais de camundongos (HT22), que foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Dave Schubert do Instituto Salk (Instituto Salk La Jolla, CA, EUA) por intermédio do Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré (Departamento de Bioquímica, CCB/UFSC, SC, BR). As células HT22 foram cultivadas em meio DMEM, pH entre 7,2-7,3, suplementado com 5% de SFB (previamente inativado quando necessário através do calor, temperatura de no máximo 57°C, por 40 minutos), 2 mM de glutamina, penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e mantidas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, a 37°C.

O meio de cultivo era trocado a cada 2 dias e, ao atingirem uma confluência de 80-90%, as células eram repicadas utilizando tripsina-EDTA a 0,05%. Os experimentos foram realizados utilizando células entre a 5ª e a 15ª passagem, apresentando uma confluência de aproximadamente 85%. O número de células foi padronizado por meio de contagem em câmara

de Neubauer e as células eram cultivadas em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, de acordo com a necessidade experimental.

4.3 TRATAMENTOS

O composto PB e os seus derivados SUC, RC363, RC574, assim como os quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH, DFP e o composto RSL3 foram preparados em DMSO cuja concentração final nas células não ultrapassou 0,05%. O Glu e o BSO foram dissolvidos em água ultrapura previamente esterilizada e as soluções foram filtradas em ambiente estéril. Todas as diluições para obtenção das diferentes concentrações dos compostos aqui utilizadas foram realizadas em tampão fosfato salina 0,01 M (PBS 0,01 M) previamente esterilizado.

As células HT22 receberam o tratamento por 24 horas com o veículo (DMSO 0,05 %), com concentrações crescentes de 0; 0,3; 0,5; 1 e 3 μM dos compostos PB, SUC, RC363 ou RC574, com concentrações crescentes 0; 0,5; 1; 3; 5; 10 e 20 μM dos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH, DFP e com a Fer-1 (0; 0,5; 1, 3, 4,5, 9,5 μM). As células HT22 foram também expostas, durante 24 horas, ao veículo (DMSO 0,05% ou PBS 0,01 M) ou a três diferentes indutores de oxitose/ferroptose: Glu nas concentrações de 0, 3, 5, 7,5 e 10 mM, BSO nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 500 μM e RSL3 nas concentrações de 1, 5, 10, 30, 50 e 100 nM.

Em outro protocolo experimental as células HT22 foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 % ou PBS 0,01M), Glu (5 mM), BSO (25 μM) ou ao RSL3 (50 nM) nos tempos 1, 3, 6, 12 e 24 horas. Posteriormente as células HT22 foram expostas durante 6 horas ao veículo (DMSO 0,05 % ou PBS 0,01 M), Glu (5 mM), BSO (25 μM) ou ao RSL3 (50 nM) e após este período as células HT22 foram tratadas com os compostos PB, SUC, RC363 ou RC574 (0,5 e 3 μM), DFO, DFCAF, SIH, DFP (0,5 e 3 μM), Fer-1 (3,0 e 9,5 μM), GSHEE (3,0 e 5,0 mM) ou Trolox (0,05; 0,250; 1,250; 5 e 20 μM) por mais 18 horas. As células também foram tratadas por 6 ou 12 horas com os indutores de ferroptose (Glu 5 mM, BSO 25 μM , RSL3 50 nM) e após receberam o tratamento com Fer-1, RC363, RC574 (0,002; 0,01; 0,05; 0,250; 1,250 μM), ou co-tratadas com o indutor RLS3 (50 nM) e os compostos Fer-1, RC363, RC574 (0,5 e 3 μM).

4.4 ENSAIOS *IN VITRO*

4.4.1 Ensaio para determinação da viabilidade celular pela redução do MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Este composto é reduzido por células metabolicamente ativas através da ação das enzimas desidrogenases, portanto a utilização deste ensaio serve como uma maneira de avaliar a viabilidade celular. As desidrogenases clivam os anéis de tetrazólio do MTT de coloração amarela gerando cristais de formazan ((4, 5-dimetiltiazol-2-il)-3, 5-difenilformazan) de cor violeta, que podem ser solubilizados por DMSO e quantificados por meios espectrofotométricos. Desta forma, a quantidade de cristais de formazan formada é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Esta técnica foi realizada em células HT22 cultivadas em placas de 96 poços na densidade de $4,5 \times 10^3$ células por poço (45.000 células/mL) e, após 24 horas de cultivo, as células HT22 receberam os tratamentos com os compostos protetores e/ou com os indutores de oxitose/ferroptose, conforme descrito detalhadamente no item anterior. Após o término de cada tratamento, o meio de cultivo foi removido por inversão e, em seguida, foi adicionado 100 μ L de MTT (0,5 mg/mL em solução tampão *Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS) previamente mantido à 37°C. As células permaneceram sob incubação à 37°C na presença da solução de MTT por uma hora.

Após este período, a solução de MTT foi removida e 100 μ L de DMSO puro foi adicionado para solubilização dos cristais de formazan. Após a completa solubilização dos cristais foi realizada a leitura pontual da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm por meio do equipamento Multileitora Infinite M200 Tecan, Mannedorf, Suíça. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%).

4.4.2 Ensaio para determinação da morte celular pela incorporação do iodeto de propídeo (IP)

A morte celular foi avaliada utilizando o ensaio de incorporação do IP. O IP não é incorporado por células viáveis, porém, pode entrar rapidamente quando ocorre um dano na membrana celular, sendo, portanto, utilizado como um marcador para morte celular. Ao penetrar nas células o IP intercala-se ao DNA permanecendo no interior delas. O IP é um

fluoróforo ou fluorocromo, composto que ao ser excitado por um comprimento de onda específico emite fluorescência. Esta fluorescência pode ser medida e corresponde, de forma direta, a quantidade de IP presente no interior das células não viáveis (NIEMINEN *et al.*, 1992; BUENO *et al.*, 2020).

Para este ensaio as células HT22 foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de $4,5 \times 10^3$ células por poço (45.000 células/mL) e, após 24 horas de cultivo, as células HT22 receberam os tratamentos com os compostos protetores e/ou com os indutores de oxitose/ferroptose, conforme descrito no item anterior. Após o término de cada tratamento, primeiramente, foi adicionado 10 μ L de uma solução de Triton X-100 a 2% (concentração final no poço de 0,2%) em poços utilizados como controles para morte celular (100% de morte). Em seguida, as células foram incubadas com uma solução de 147 μ g/mL de IP por 20 a 30 minutos a 37 °C, no escuro.

Após o período de incubação, foi realizada a leitura da fluorescência em 535 nm de excitação e 617 nm de emissão em leitor de microplacas (Multileitora Infinite M200 – TECAN, Mannedorf, Suíça). A incorporação do IP foi expressa pela percentagem do controle positivo (células tratadas com Triton X-100, 100 %).

4.4.3 Ensaio para determinação de tióis não-proteicos (NPSH)

A avaliação da concentração de GSH foi realizada utilizando o método previamente descrito por Ellman, 1959. Neste método, o conteúdo de tióis não-proteicos (NPSH) foi determinado e corresponde principalmente à concentração de GSH, ou seja, cerca de 95% dos tióis não-proteicos (COOPER, 1998). Este método baseia-se na precipitação de proteínas que contém grupos tióis (SH) e após ligação do composto 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) a grupos NPSH, com a liberação do 5,5'tiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (TNB), molécula que absorve luz e transmite em um comprimento de onda específico. Logo, a quantidade de luz transmitida corresponde a quantidade de GSH presente na amostra (ELLMAN, 1959).

Nesse ensaio, as células HT22 foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade de $1,30 \times 10^5$ células por poço (64.500 células/mL) e após 24 horas de cultivo foram expostas durante 6 horas ao veículo (DMSO 0,05 %, PBS 0,01 M), ao Glu (5 mM), BSO (25 μ M) ou ao RSL3 (50 nM) na presença ou ausência dos compostos protetores (RC363, RC574, Fer-1 ou GSHEE). Após o término dos tratamentos as células foram lavadas com PBS 0,01 M e coletadas

por raspagem com 200 μ L de uma solução de PBS 0,01 M contendo 0,5% de Triton X-100, utilizada para romper a membrana das células e liberar o conteúdo intracelular. Dois poços foram utilizados para cada tratamento. Após a coleta, 20 μ L de amostra foi reservado para a dosagem de proteínas e o restante foi precipitado com 180 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 10% gelado, seguido de centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos a 4°C. Desta forma, o conteúdo proteico era precipitado e no sobrenadante era medido o NPSH. Para isto, o sobrenadante foi incubado com DTNB 10 mM em Tampão Fosfato de Potássio – TFK, 1M pH 7,0.

Por fim, as absorvâncias foram mensuradas em 412 nm através da utilização do espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 – TECAN, Mannedorf, Suíça) e uma curva de GSH foi utilizada para calcular o conteúdo de NPSH (nmol de NPSH/mg de proteína). Os dados foram expressos como percentual do controle (células não-tratadas).

4.4.4 Ensaio para determinação das ER intracelulares com a sonda 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA)

A produção de espécies reativas (ER) citosólicas foi avaliada por meio da sonda 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA). A sonda DCFH-DA ao ser internalizada pelas células sobre uma reação de desacetilação (remoção dos grupos acetato) formando o composto 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH) que permanece no interior das células. A sonda DCFH por sua vez é reduzida pelas ER gerando o composto fluorescente 2',7'-dicloro-fluoresceína (DCF). A DCF emite uma fluorescência que pode ser medida e corresponde, de forma direta, à quantidade de ER geradas no interior das células (KALYANARAMAN *et al.*, 2012).

Esta técnica foi realizada com células HT22 cultivadas em placas de 24 poços na densidade de $2,6 \times 10^4$ células por poço (52600 células/mL) e após 24 horas de cultivo as células recebiam o tratamento. Em um experimento as células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %, PBS 0,01 M), ao Glu (5 mM), BSO (25 μ M) ou ao RSL3 (50 nM) juntamente com 10 μ L de uma solução de 500 μ M da sonda DCFH-DA em HBSS (10 μ M concentração final da sonda DCFH-DA por poço), com exceção do branco que recebeu somente 10 μ L de HBSS sem a sonda. Logo, após o tratamento foi realizada a leitura da absorvância em 518 nm em um leitor de microplacas (Tecan, Mannedorf, Suíça) por 8 horas. Registrou-se a geração de ER intracelulares no período de 1, 3, 6 e 8 horas após o tratamento como os indutores de

oxitose/ferroptose. Os resultados eram expressos pela percentagem da absorbância em relação ao controle (só células).

Em outro experimento as células HT22 foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %, PBS 0,01 M), ao Glu (5 mM), BSO (25 μ M) ou ao RSL3 (50 nM) por 6 horas. Após 6 horas as células receberam o tratamento com o quelante de ferro SIH (3 μ M) e a sonda DCFH-DA (10 μ M, concentração final no poço) e foi realizada a leitura da absorbância em 518 nm em um leitor de microplacas (Tecan, Mannedorf, Suíça) por 2 horas. Registrou-se a geração de ER citosólicas durante 2 horas após o tratamento com o quelante de ferro SIH. Os resultados eram expressos pela percentagem da absorbância em relação ao controle (só células).

4.4.5 Ensaio para determinação de peróxidos lipídicos com a sonda C11-BODIPY^{581/591}

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi determinada utilizando a sonda fluorescente borodipirrometenos Bodipy 581/591 C11 (C11-BODIPY^{581/591}). O reagente BODIPY® 581/591 C11 é uma sonda fluorescente lipofílica sensível à peroxidação lipídica. Esta sonda apresenta uma estrutura anfipática, na qual um substituinte de ácidos graxos de cadeia média de 11 carbonos fornece o caráter não polar e facilita a incorporação da sonda na membrana plasmática. E a porção polar possui o segmento fenilbutadieno onde apresenta ligações duplas suscetíveis à oxidação por radicais peroxil. A oxidação do fluoróforo leva a mudança de sua fluorescência do vermelho para o verde fornecendo uma indicação de peroxidação de lipídios da membrana, que pode ser medida através da citometria de fluxo (NAGUIB, 1998).

Para este ensaio as células HT22 foram semeadas em placas 24 poços na densidade de $2,6 \times 10^4$ células por poço (52.600 células/mL) e, após 24 horas de cultivo, foram expostas durante 6 horas ou 12 horas ao veículo (DMSO 0,05 %, PBS 0,01 M), ao Glu (5 mM), BSO (25 μ M) ou ao RSL3 (50 nM). Após os tratamentos as células foram lavadas com 500 μ L HBSS e posteriormente incubadas com a sonda C11-BODIPY^{581/591} na concentração de 10 μ M (veículo: DMSO 0,05 % final) durante 30 minutos a 37°C, no escuro.

Após 30 minutos, a sonda foi retirada e as células foram lavadas com 1 mL de PBS 0,01 M, procedimentos realizados sempre na ausência de luz. Após essa lavagem foi realizada coleta das células por tripsinização, na qual foram adicionados 500 μ L PBS 0,01 M com tripsina 1X em cada poço e as células foram incubadas por 3 minutos à 37°C no escuro. Após a incubação foi adicionado 500 μ L de uma solução de HBSS com 1% SFB para parar a reação da tripsina e as células foram coletadas e centrifugadas a 0,6 g durante 3 minutos à temperatura ambiente

(25°C). Ao término da centrifugação as células foram resuspendidas com 200 µL de HBSS e novamente centrifugadas. Após a segunda centrifugação, as células foram novamente resuspendidas com 200 µL de HBSS e colocadas em tubos de citometria. A intensidade da fluorescência foi analisada em citometria de fluxo nos canais FITC (excitação/emissão de 581/591 nm, sonda reduzida, vermelha) e PE (excitação/emissão de 488/510 nm, sonda oxidada, verde) (FACSCanto II, BD, EUA). Pelo menos 10.000 eventos foram registrados por amostra. Os resultados foram calculados como a razão entre a fluorescência da sonda oxidada (verde) sobre a fluorescência da sonda reduzida (vermelho) e expressos como porcentagem do controle (células não-tratadas, 100%). Como controle positivo foi utilizado o CuOOH na concentração de 100 µM por uma hora de exposição.

4.4.6 Ensaio para a determinação da atividade antioxidante com o 2,2-difenil 1-picrilhidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante direta dos compostos aqui estudados foi investigada utilizando o ensaio do DPPH. Este ensaio colorimétrico detecta a mudança de coloração produzida pelo radical estável 2,2-difenil 1-picrilhidrazil (DPPH•) após sua redução por um antioxidante. A presença de um composto com ação antioxidante reduz a coloração inicial desse radical diminuindo sua absorvância, portanto quanto menor a absorvância maior a capacidade antioxidante do composto (COS *et al.*, 2003). Diferentes concentrações (3, 10 e 30 µM) de Fer-1, RC363, RC574, Trolox, DFO, DFCAF, DFP, SIH ou o veículo (DMSO 0,05 %) foram incubados por 1 hora com o radical estável DPPH (0,15 µM em etanol) à temperatura ambiente (25°C) no escuro. Após 1 hora de incubação a absorvância em 518 nm foi lida em um leitor de microplacas (Tecan, Mannedorf, Suíça).

4.4.7 Ensaio anti-lipoperoxidativo com a sonda C11-BODIPY581/591

A atividade antioxidante direta sobre lipídios de membrana oxidados dos compostos aqui estudados também foi investigada. Este ensaio foi baseado no estudo de Haidasz e colaboradores (2016) o qual envolve a competição de um composto antioxidante (RTA) e uma sonda altamente colorida e oxidável (C11-BODIPY^{581/591}) pelos radicais peróxil os quais propagam a auto-oxidação de um substrato hidrocarboneto (feniletileno) (HAIDASZ *et al.*, 2016). Adaptamos esse ensaio utilizando como substrato auto-oxidativo as membranas de

células HT22 rompidas, para melhor relacionar com o ambiente celular, conforme o estudo descrito por Shah e colaboradores (2019) o qual utilizou lipossomas originários de fosfatidilcolina de ovo para obter um modelo de bicamada lipídica. Assim, adicionando uma pequena quantidade da sonda (C11-BODIPY^{581/591}) a um substrato auto-oxidável, a propagação da reação e sua inibição pelos RTAs pode ser prontamente monitorada por espectrofotometria convencional (HAIDASZ *et al.*, 2016).

Desta forma, para o ensaio anti-lipoperoxidativo as células HT22 foram semeadas em placas de petri (100 mm) a uma densidade de 6×10^6 células/placa. Após 24 horas, as células foram coletadas suavemente com um raspador de células em 10 mL de PBS 0,01 M e rompidas por sonicação (5 minutos a 40 KHz). Aliquotas das células rompidas (100 μ L, aproximadamente 230 μ g de proteína) foram incubadas (60 minutos, 25°C, sob agitação - 50 rpm) em placas de 96 poços na presença do veículo (DMSO 0,05 %) ou de diferentes concentrações (3, 10 e 30 μ M) de Fer-1, RC363, RC574, Trolox (volume total = 130 μ L).

Após 1 hora, foram adicionados 20 μ L de uma solução de C11-BODIPY^{581/591} 112,5 μ M (concentração final de C11-BODIPY^{581/591} = 15 μ M). Após 20 minutos, a intensidade de fluorescência foi medida durante 1 hora em um leitor de placas (Tecan, Mannedorf, Suíça): excitação/emissão de 530/590 nm (sonda reduzida, vermelho) e excitação/emissão de 485/528 nm (sonda oxidada, verde). Os resultados são apresentados como a razão da fluorescência da sonda oxidada (verde) pela sonda reduzida (vermelha) após 20 minutos de leitura.

4.4.8 Ensaio para a determinação da concentração de proteínas

A determinação do conteúdo de proteico foi realizada conforme o método descrito por Lowry e colaboradores (1951). Para este ensaio uma curva padrão de albumina de soro bovino (ASB) foi utilizada para o cálculo da concentração de proteínas celular.

4.4.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Diferenças entre grupos foram avaliadas através do teste t de Student ou pela análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguidos do teste *post hoc* de Tukey. A correlação de Pearson foi realizada para detectar associações entre a eficácia anti-ferroptótica em um contexto celular e os efeitos

antioxidantes em meio livre de células contendo membranas de células rompidas ou no ensaio DPPH. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) e diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS CAPÍTULO I – COMPARAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO PROBUCOL COM O EFEITO PROTETOR DA FER-1 FRENTE À OXITOSE/FERROPTOSE INDUZIDA PELO GLU, BSO E RSL3 EM CÉLULAS HT22.

O objetivo desse capítulo foi investigar o efeito protetor do PB e dos seus derivados SUC, RC363 e RC574 frente à citotoxicidade dos agentes pró-ferroptose Glu, BSO e RSL3 comparando-o com o efeito do agente anti-ferroptótico clássico Fer-1.

5.1.1 Toxicidade dos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO e RSL3 em células HT22

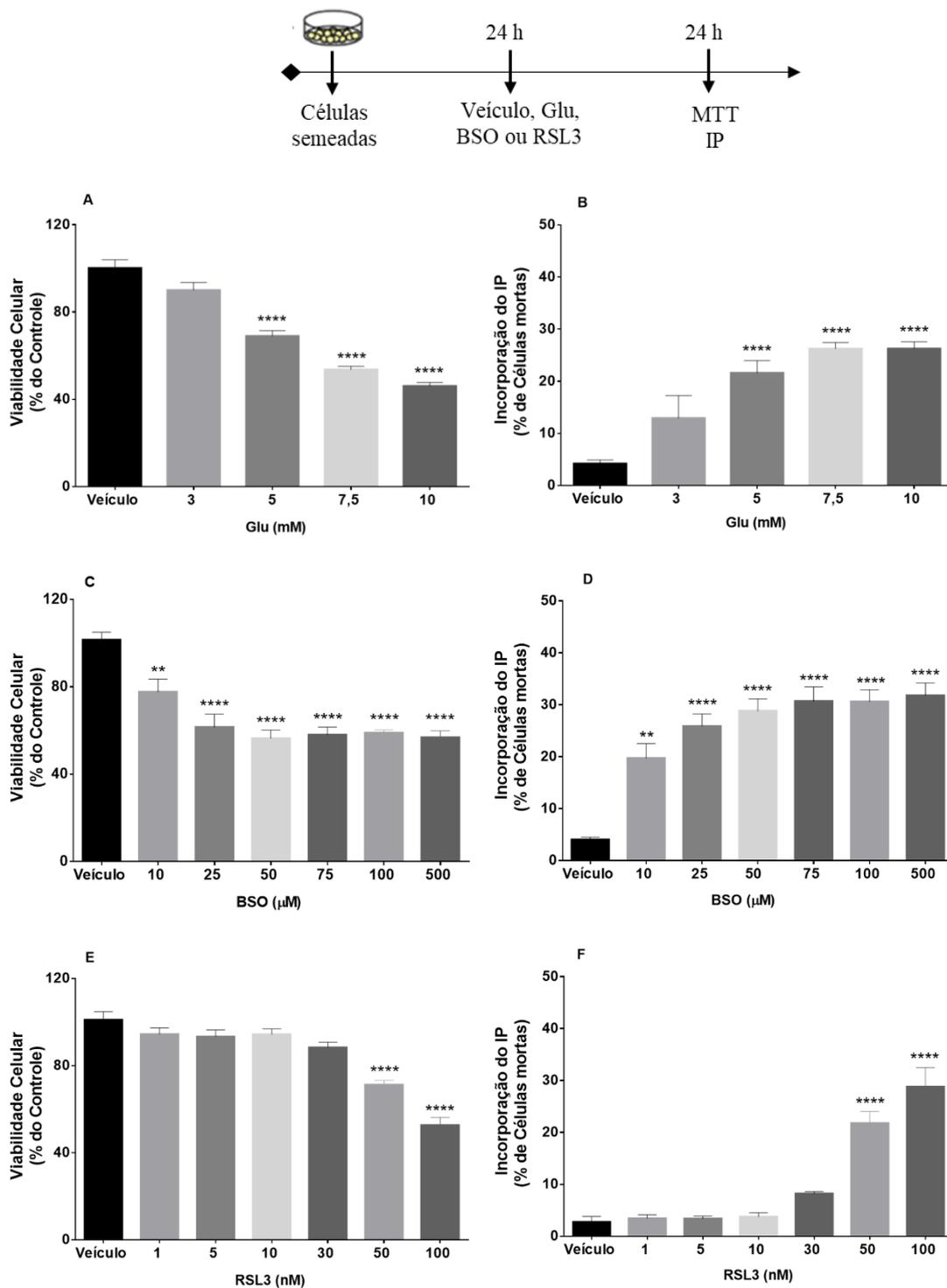
O presente estudo iniciou com a avaliação da toxicidade dos três indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO e RSL3 nas células HT22 através dos ensaios de viabilidade e morte celular. Conforme a figura 8 A, após 24 horas de exposição ao Glu, nas concentrações de 5, 7,5 e 10 mM, observamos uma redução significativa da viabilidade celular de aproximadamente 30, 45 e 54% respectivamente ($p \leq 0,0001$ para 5 - 10 mM). Essa exposição, de acordo com a figura 8 B, também causou um aumento significativo na incorporação do IP de aproximadamente 20, 25 e 27% para as concentrações 5, 7,5 e 10 mM, respectivamente ($p \leq 0,0001$ para 5 - 10 mM). Estes resultados demonstraram que a partir da concentração de 5 mM o Glu exerceu um efeito tóxico bastante significativo sobre as células HT22.

O composto BSO (Figura 8 C) reduziu de forma significativa a viabilidade celular das células HT22 em torno de 26, 42,5, 47, 44, 43 e 44 n% após 24 horas de exposição as concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 500 μ M, respectivamente ($p \leq 0,01$ para 10 μ M e $p \leq 0,0001$ para 25 - 500 μ M). A exposição ao BSO (Figura 8 D) também causou um aumento significativo de 20, 27, 28, 29, 29 e 31% na incorporação do IP nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 500 μ M, respectivamente após 24 horas ($p \leq 0,01$ para 10 μ M, e $p \leq 0,0001$ para

25-500 μM). Portanto, estes resultados mostraram que a partir de 25 μM a toxicidade do BSO foi máxima para as células HT22, uma vez que não diferiu das concentrações maiores.

O composto RSL3 (Figura 8 E) reduziu significativamente a viabilidade celular das células HT22 após a exposição às concentrações de 50 e 100 nM (33 e 55%, respectivamente, $p \leq 0,0001$). Além disso, a exposição ao RSL3 (50 e 100 nM) também causou de maneira significativa o aumento da incorporação do IP (de aproximadamente 21 e 25%, respectivamente, $p \leq 0,0001$; figura 8 F). Logo, estes resultados indicaram que o composto RSL3, a partir da concentração de 50 nM, apresentou uma significativa toxicidade para as células HT22.

Figura 8 - Toxicidade dos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO e RSL3 em células HT22.



As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 % ou PBS 0,01 M), (A e B) Glu (0, 3 - 10 mM), (C e D) BSO (10 - 500 µM) ou (E e F) ao RSL3 (1 - 100 nM). Após 24 horas de exposição os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Os dados representam a média \pm EPM (n = 4). ** $p \leq 0,01$ e **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

Os nossos resultados mostraram que a toxicidade induzida por 5 mM de Glu, 25 μ M de BSO e 50 nM de RSL3 foi semelhante e com base em estudos da literatura (BUENO *et al.*, 2020; DIXON *et al.*, 2012; JELINEK *et al.*, 2018) optamos por trabalhar com essas concentrações, afim, de investigar o período que antecede a morte celular induzida por esses agentes ferroptóticos.

5.1.2 Toxicidade temporal dos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO E RSL3 em células HT22

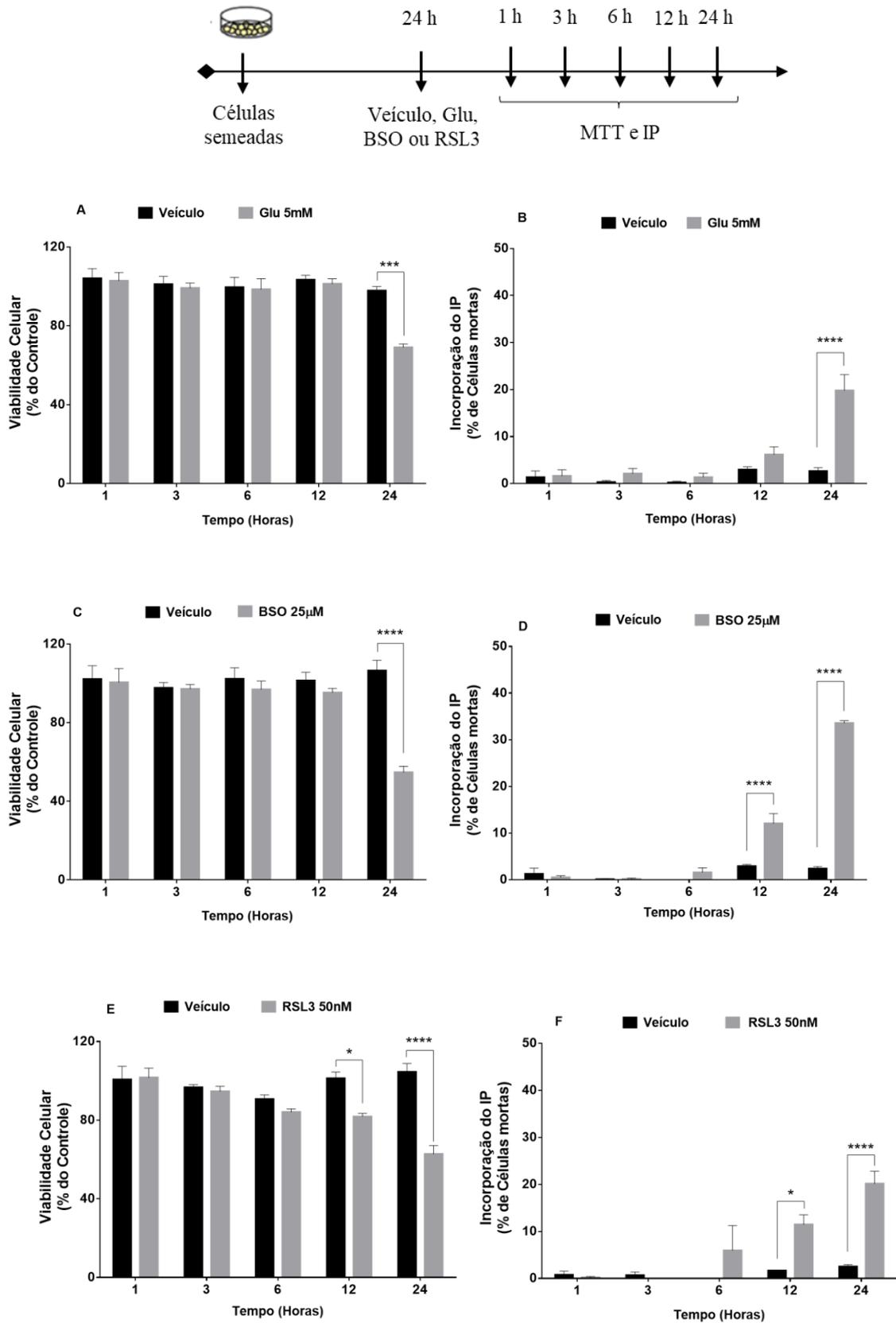
Numa segunda etapa o estudo seguiu com a avaliação da toxicidade tempo dependente dos indutores de oxitose/ferroptose (Glu, BSO e RSL3) para as células HT22, por meio dos ensaios de viabilidade e morte celular. As células HT22, portanto, foram expostas ao Glu (5 mM), BSO (25 μ M) ou RSL3 (50 nM) por 1, 3, 6, 12 e 24 horas e após cada tempo de exposição os ensaios do MTT e do IP eram realizados.

Conforme a figura 9 A, somente após 24 horas de exposição ao Glu foi observado uma redução significativa na viabilidade celular das células HT22 (30%, $p \leq 0,001$). Esta redução foi acompanhada pelo aumento significativo na incorporação do IP (20%, $p < 0,0001$; figura 9 B). Dessa forma, é provável que o Glu induza efeitos tóxicos para as células HT22 em períodos anteriores a exposição por 24 horas.

Na figura 9 C é possível observar que o composto BSO, causou uma diminuição significativa na viabilidade celular somente após 24 horas de exposição (45%, $p < 0,0001$). Esse composto também causou um aumento significativo na incorporação do IP após a exposição tanto por 12 horas quanto por 24 horas (12%, $p \leq 0,0001$ e 34%, $p \leq 0,0001$, respectivamente, figura 9 D). Esses resultados indicam que efeitos tóxicos causados pelo BSO provavelmente acontecem em períodos anteriores as 12 horas de exposição.

E por fim, o composto RSL3 após 12 e 24 horas de exposição, reduziu de forma significativa a viabilidade das células HT22 (20%, $p \leq 0,05$ e 38%, $p \leq 0,0001$, respectivamente, figura 9 E). A exposição ao RSL3 nos períodos de 12 e 24 horas aumentou a incorporação do IP de maneira significativa (12%, $p \leq 0,05$, e 20%, $p \leq 0,0001$ respectivamente, figura 9 F). Assim, sugere-se que o RLS3 induza efeitos tóxicos para as células HT22 em períodos inferiores as 12 horas de exposição.

Figura 9 - Toxicidade temporal dos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO E RSL3 em células HT22.



As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 % ou PBS 0,01 M), (A e B) 5 mM de Glu, (C e D) 25 μ M de BSO ou (E e F) 50 nM de RSL3 por 1, 3, 6 12 ou 24 horas. Após cada período de exposição os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Os dados representam a média \pm EPM (n = 4). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença significativa quando comparados a seu respectivo controle (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

Portanto, de maneira geral os resultados da toxicidade tempo dependente dos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 mostraram que o período de 6 horas antecede a morte celular induzida por todos esses agentes. Assim, foi escolhido o tempo de 6 horas para investigar se os efeitos deletérios como a depleção de GSH e a indução de peroxidação lipídica estariam envolvidos na toxicidade destes indutores de oxitose/ferroptose para as células HT22.

5.1.3 Efeito dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a concentração de GSH em célula HT22

O evento inicial da oxitose/ferroptose é a drástica redução da GSH das células. Quando a concentração de GSH é reduzida em mais de 80%, seja pelo Glu ou por outras condições, as células morrem por essa forma de morte celular regulada (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001; MAHER, CURRAIS, SCHUBERT, 2020). A GSH é essencial para manter a homeostase redox celular evitando a ocorrência do distresse oxidativo que por sua vez leva a morte celular. O papel da GSH neste contexto envolve principalmente sua ação como um cofator para as enzimas GPx (SEILER *et al.*, 2008; SIES, 2017).

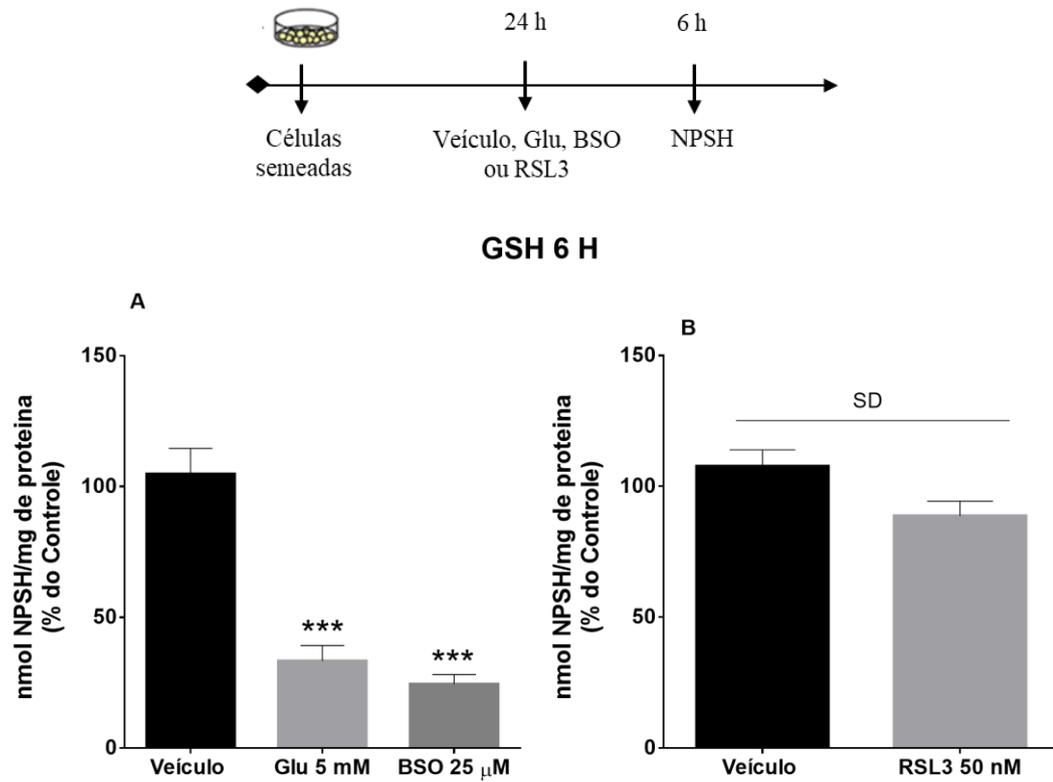
As GPx são responsáveis pela redução de peróxidos a custas da oxidação da GSH, porém ressalta-se que, as concentrações de GSH *in vivo* são da ordem de 1–10 mM e as concentrações de peróxidos geralmente não atingem a faixa do micromolar (1–100 nM), portanto, a enzima é quase completamente reduzida a uma velocidade independente da concentração de GSH. Isso significa que pequenas mudanças nas concentrações de GSH frequentemente relacionadas como defesa antioxidante prejudicada não influenciará na velocidade de remoção do hidroperóxido, ou seja, não acarretaria na inibição enzimática. Portanto, para afetar a atividade das GPx essas mudanças devem ser mais substanciais e alterar em pelo menos uma ordem de magnitude (BRIGELIUS-FLOHÉ E MAIORINO, 2013).

Neste contexto, tendo em vista a importância da GSH assim como a inibição especificadamente da enzima GPx4 para a oxitose/ferroptose (CONRAD E FRIEDMANN ANGELI, 2015; FRIEDMANN ANGELI *et al.*, 2014; SEIBT *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2014), foi avaliado se exposição ao Glu, BSO ou RSL3 altera a concentração intracelular de GSH e se

essa alteração é relevante para inibição da enzima GPx4. Desse modo, primeiramente realizamos o ensaio do NPSH após 6 horas de exposição das células HT22 aos agentes ferroptóticos Glu (5 mM), BSO (25 μ M) e RSL3 (50 nM).

Foi observado que a concentração de GSH das células HT22 foi significativamente reduzida em torno de 70% ($p \leq 0,001$; figura 10 A) após a exposição por 6 horas ao Glu. Resultado semelhante à exposição por 6 horas ao BSO que também causou uma redução significativa de 80% na concentração de GSH ($p \leq 0,001$; figura 10 A). Por outro lado, o composto RSL3 após 6 horas de exposição, não alterou a concentração de GSH das células HT22 (Figura 10 B). Esses resultados indicam que a depleção de GSH é um evento importante envolvido na toxicidade dos agentes ferroptóticos Glu e BSO que antecede a morte celular induzida por esses agentes. Porém não está relacionado com o efeito citotóxico do composto RSL3.

Figura 10 - Efeito dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a concentração de GSH em célula HT22.



As células foram expostas ao (A) veículo (PBS 0,01 M), 5 mM de Glu, 25 μM de BSO, (B) ao veículo (DMSO 0,05 %) ou 50 nM de RSL3 por 6 horas. Após 6 horas de exposição o ensaio do NPSH foi realizado e expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100 %). Os dados representam a média ± EPM (n = 4). *** p ≤ 0,001 indicam diferença quando comparados ao grupo veículo (PBS 0,01 M) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* Tukey). Não foi encontrada diferença significativa (NS) entre os grupos veículo (DMSO 0,05 %) e RSL3 após o teste t não paramétrico.

A síntese de GSH depende da concentração de cisteína e da atividade da enzima GCL. A principal forma de obter cisteína pelas células de mamíferos é o sistema x_c^- esse é um transportador heterodimérico, formado por duas subunidades proteicas distintas: uma cadeia leve xCT (SLC7A11) que confere especificidade pelo substrato, realiza atividade de cotransporte e está sujeita a uma regulação transcricional complexa, e uma cadeia pesada 4F2hc (SLC3A2), conservada em outros transportadores de aminoácidos, necessária para localização na membrana. As duas subunidades estão ligadas por uma ponte dissulfeto (CONRAD E SATO, 2011; LEWERENZ *et al.*, 2013). Este sistema x_c^- é responsável por captar de forma específica a cistina (CySSCy) (a forma oxidada da cisteína - CyS) extracelular juntamente com o efluxo intracelular de Glu na proporção de 1:1 M. Sendo assim, a inibição do sistema x_c^-

ocasiona uma drástica redução das concentrações intracelulares de cistina e, conseqüentemente, de cisteína, comprometendo a síntese de GSH e por fim, desencadeando a morte ferroptótica (CONRAD E SATO, 2011; LEWERENZ *et al.*, 2013; MANDAL *et al.*, 2010; SEIBT *et al.*, 2018).

Dessa forma e tendo em vista que o sistema x_c^- é inibido por altas concentrações de Glu (LEWERENZ *et al.*, 2018) sugere-se que a exposição à 5 mM de Glu provavelmente foi suficiente para inibir o sistema x_c^- e causar em 6 horas a drástica redução na concentração de GSH das células HT22, conforme demonstrado no presente estudo (Figura 10A). Os resultados também sugerem que a exposição ao BSO inibiu a enzima GCL ocasionando após 6 horas a redução da concentração de GSH (Figura 10A).

Além disso, é provável que a depleção de GSH gerada pela exposição tanto ao Glu quanto ao BSO no presente estudo (70% e 80%, respectivamente, figura 10 A) foi suficiente para causar um efeito inibitório sobre a atividade das enzimas GPx, conforme exposto por Brigelius-Flohé e Maiorino (2013). Neste cenário, o estudo de Yang e colaboradores (2014) o qual demonstrou que não somente a erastina, assim como o Glu inibem o sistema x_c^- , como também o BSO, levaram a depleção de GSH e conseqüentemente inibição da atividade das enzimas GPx causando um acúmulo de ER lipídicas e citosólicas (YANG *et al.*, 2014), colabora a hipótese que nosso modelo de citotoxicidade do Glu e do BSO em células HT22 provavelmente iniba a enzima GPx4 levando ao aumento das ER lipídicas.

Os resultados também mostraram que o RSL3 após 6 horas de exposição não causou depleção da GSH (Figura 10B) corroborando estudos da literatura. Yang e colaboradores (2014) demonstraram que o composto RSL3 não altera a concentração intracelular de GSH, mas apresenta como mecanismo de ação a inibição específica da enzima GPx4. Jelinek e colaboradores (2018) mostraram que a concentração de GSH das células HT22 não foi alterada após 2, 4, 6 e 8 horas de exposição ao RSL3, porém após 10 horas de exposição o composto RSL3 reduziu o imunoconteúdo da enzima GPx4, sugerindo sua degradação após inibição (JELINEK *et al.*, 2018). Ressalta-se que como consequência da inibição da GPx4 foi observado o aumento das ER lipídicas (YANG *et al.*, 2014, JELINEK *et al.*, 2018) o qual foi similar ao observado pela exposição a erastina e ao BSO (YANG *et al.*, 2014).

A GPx4, uma selenoproteína da família das GPx, que catalisa a redução de hidroperóxidos a álcoois mediada pela GSH, é a única enzima que age diretamente sobre os hidroperóxidos de fosfolipídios de membranas, portanto, sua inibição ocasiona o aumento de ER lipídicas que é exacerbado em decorrência da ativação da LOX e da presença de ferro

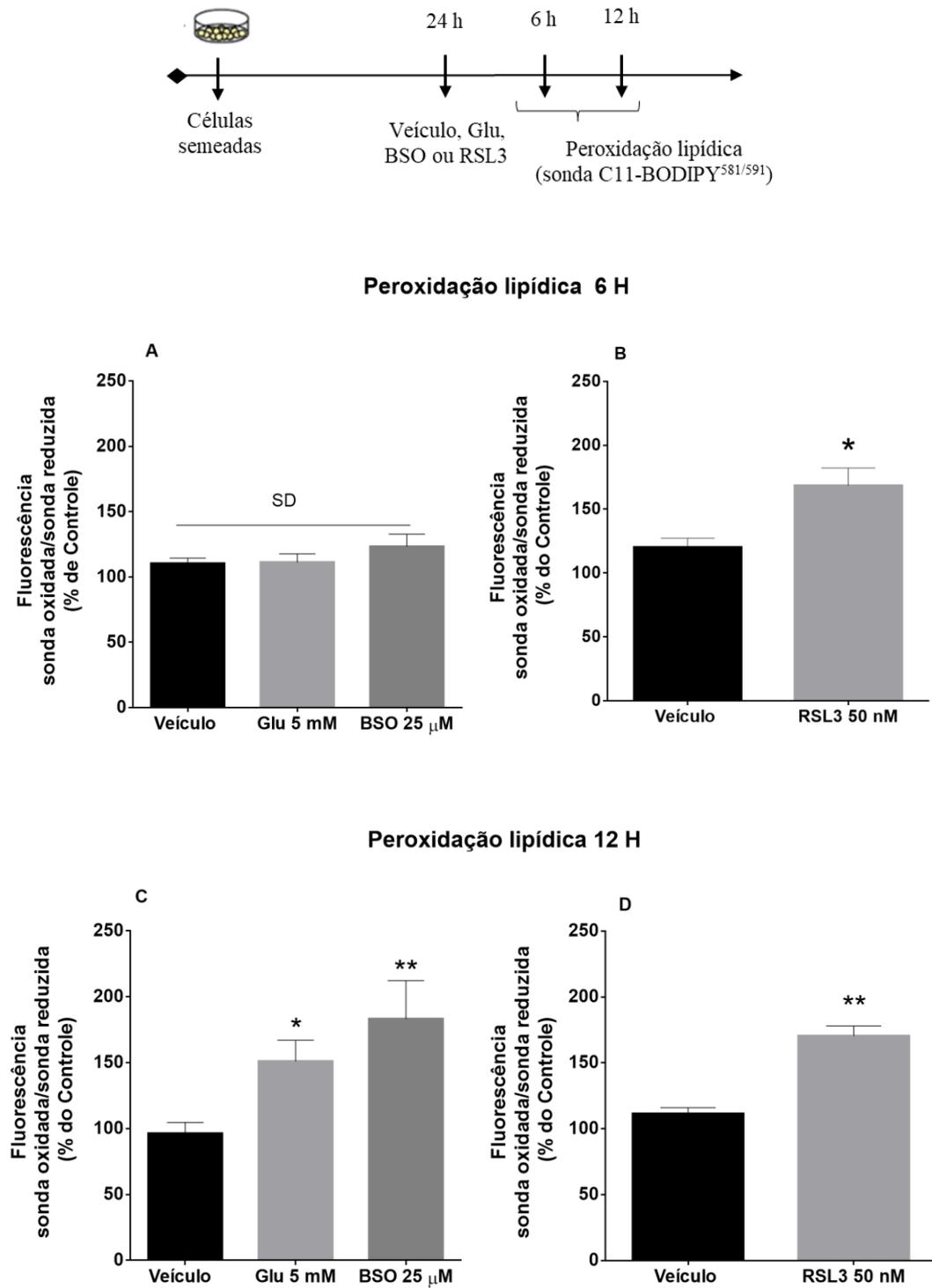
levando a morte celular por oxitose/ferroptose (CONRAD E FRIEDMANN ANGELI, 2015; FRIEDMANN ANGELI *et al.*, 2014; SEIBT *et al.*, 2018; SEILER *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2014). Neste contexto, fomos investigar se a depleção de GSH induzida pelo Glu e pelo BSO observada no presente estudo poderia levar ao aumento de ER lipídicas, com uma consequência da inibição indireta da GPx4 e também se o composto RSL3, o qual inibi diretamente a GPx4, desencadeia a peroxidação lipídica em nosso modelo.

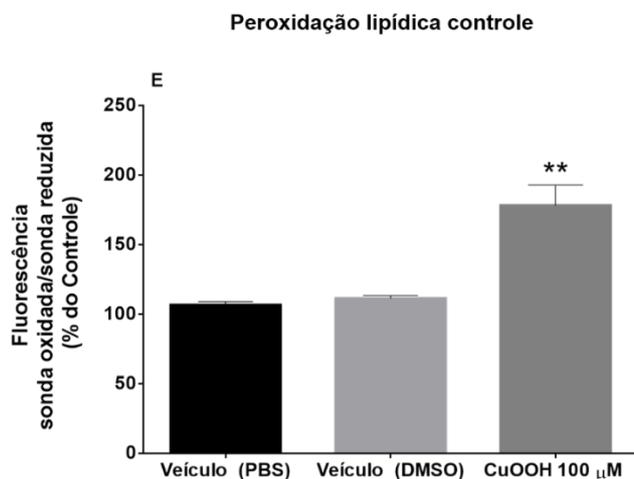
5.1.4 Efeito dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a peroxidação lipídica em célula HT22

Sabendo que a geração de ER lipídicas ocorre posteriormente a depleção de GSH e inibição da enzima GPx4 foi avaliado através da sonda C11-BODIPY^{581/591} a geração de peróxidos lipídicos após a exposição das células HT22 ao Glu (5 mM), BSO (25 µM) ou RSL3 (50 nM) por 6 horas e 12 horas. Foi observado que a exposição tanto ao Glu quanto ao BSO por 6 horas não alterou a concentração de peróxidos lipídicos das células HT22 (Figura 11 A). Por outro lado, o indutor de oxitose/ferroptose RSL3 após 6 horas de exposição aumentou de forma significativa a concentração de peróxidos lipídios das células HT22 (aumento de 70%, $p \leq 0,05$; figura 11 B).

Porém, quando as células HT22 foram expostas por 12 horas ao Glu e ao BSO observamos um aumento significativo da peroxidação lipídica em torno de 50 e 80% respectivamente ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$, respectivamente, figura 11 C). Resultados semelhantes forma obtidos após à exposição por 12 horas ao RSL3 que também causou um aumento significativo da peroxidação lipídica em torno de 70% ($p \leq 0,01$; figura 11 D). Utilizando o CuOOH (100 µM) como controle positivo para o ensaio do C11-BODIPY^{581/591} foi observado que este composto aumentou significativamente a concentração de peróxidos lipídicos das células HT22 (aumento de 80%, $p \leq 0,01$; figura 11 E), confirmando a efetividade da sonda.

Figura 11 - Efeito dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a peroxidação lipídica em célula HT22.





As células HT22 foram expostas ao veículo PBS 0,01 M, 5 mM de Glu, 25 μ M de BSO por 6 horas (A) e 12 horas (C), ao veículo DMSO 0,05 % ou 50 nM de RSL3 por 6 horas (B) ou 12 horas (E). O CuOOH (100 μ M) por 1 hora foi utilizado como controle positivo. Os dados representam a média \pm EPM (n = 3). Na figura A após a análise ANOVA de uma via seguido pelo teste de post hoc Tukey nenhuma diferença significativa foi observada. Nas figuras C e E * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* Tukey). Nas figuras B e D * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ indicam diferença entre os grupos veículo (DMSO 0,05%) e RSL3 após o teste t não paramétrico.

O estudo de Jelinek e colaboradores (2018) utilizando a sonda C11-BODIPY^{581/591} demonstrou que o composto RSL3 a partir de 2 horas de exposição aumentou a peroxidação lipídica com um pico em 6 horas onde o aumento foi de 80% (JELINEK *et al.*, 2018), semelhante aos nossos resultados (aumento de 70% da peroxidação lipídica em 6 horas, figura 11 B). Foi descrito que o Glu após 7 horas ou mais de exposição causa um aumento exponencial de ER (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001; MAHER, CURRAIS, SCHUBERT, 2020) corroborando nosso resultado no qual o aumento de ER lipídicas pode ser observado somente após 12 horas de exposição ao Glu (Figura 11 C).

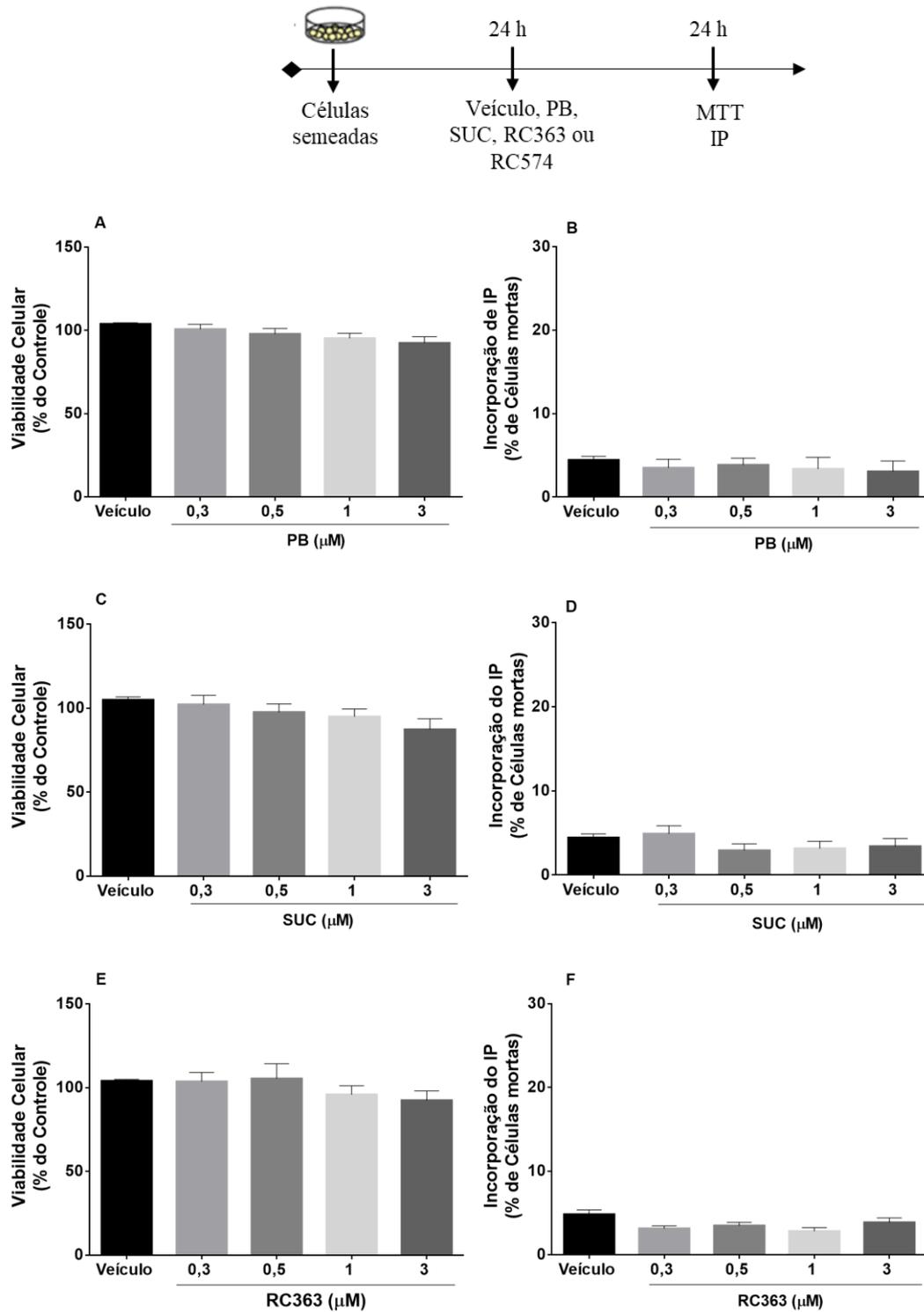
Portanto, os resultados indicam que a peroxidação lipídica induzida após 12 horas de exposição ao Glu e ao BSO é uma possível consequência tardia da depleção de GSH observada em 6 horas de exposição a esses agentes ferroptóticos, sendo provavelmente associada a inibição indireta da enzima GPx4. Já o composto RSL3 por inibir diretamente a GPx4 causou peroxidação lipídica de maneira mais precoce (após 6 horas) indicando que esse evento é importante para a sua citotoxicidade e independente da depleção de GSH. Sendo assim, após caracterizar a toxicidade dos compostos Glu, BSO e RSL3 para as células HT22 em nosso modelo, investigamos o efeito protetor do composto PB e seus derivados SUC, RC363 e

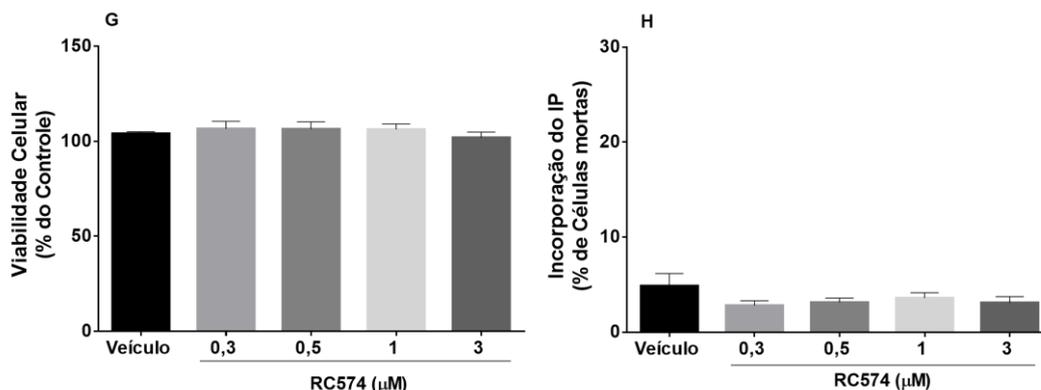
RC574, assim como do composto anti-ferroptótico clássico Fer-1 frente a oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO e RSL3.

5.1.5 Toxicidade do composto PB e seus derivados em células HT22

Inicialmente foi avaliada a toxicidade do PB e seus derivados SUC, RC363 e RC574 para células HT22. Para tal finalidade, as células HT22 foram tratadas por 24 horas com concentrações crescentes (0,3 – 3 μ M) dos compostos e, após as 24 horas de tratamento, os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Os resultados obtidos indicam que o tratamento com os compostos PB, SUC, RC363 ou RC574 por 24 horas não alterou a viabilidade celular das células HT22, conforme o ensaio do MTT (Figuras 12 A, C, E e G). Da mesma forma, o tratamento com o PB, SUC, RC363 ou com o RC574 não modificou a incorporação do IP, indicando que esses compostos não induziram morte celular (Figuras 12 B, D, F e H). Portanto, nas condições aqui testadas, nenhum composto foi considerado tóxico para as células HT22.

Figura 12 - Toxicidade do composto PB e seus derivados em células HT22.





As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %) ou a concentrações crescentes (0,3 - 3,0 μM) de PB (A e B), SUC (C e D), RC363 (E e F) ou RC574 (G e H). Após 24 horas de exposição aos compostos os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Os dados representam a média ± EPM (n = 5). Não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos após ANOVA de uma via seguido pelo teste de post hoc Tukey.

Baseado nos resultados obtidos sobre a toxicidade do PB, SUC, RC363 ou RC574 juntamente com os achados do estudo de Bueno e colaboradores (2020), no qual o pré-tratamento das células HT22 com os compostos RC363 e RC574 a partir da concentração de 0,5 μM apresentou proteção total frente ao Glu, foram escolhidas as concentrações de 0,5 e 3,0 μM para testar a proteção dos compostos frente aos indutores de oxitose/ferroptose.

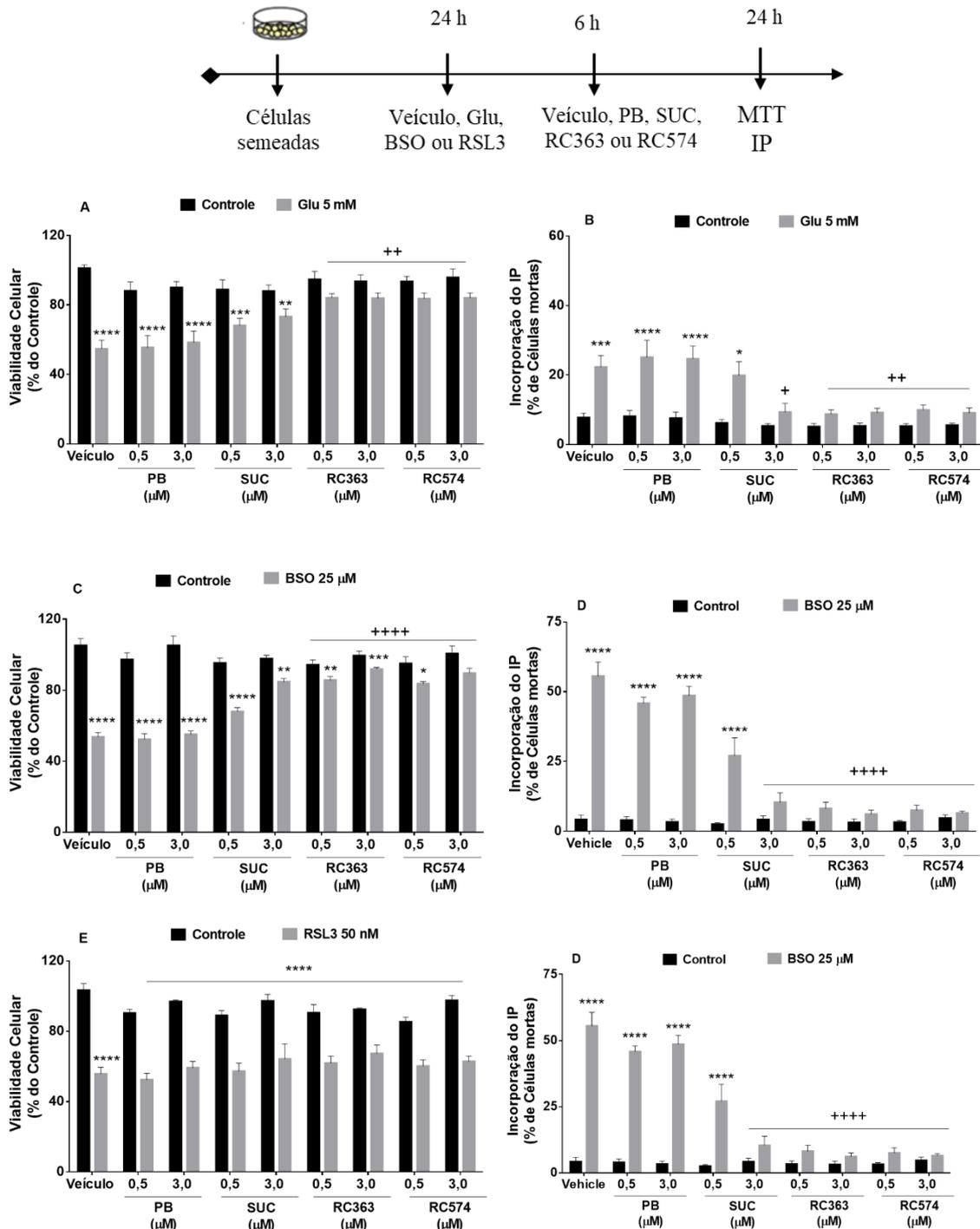
5.1.6 Efeito do composto PB e seus derivados frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO e RSL3 em células HT22

Com o intuito de investigar e comparar o efeito protetor do PB, SUC, RC363 e RC574, as células HT22 foram primeiramente expostas durante 6 horas aos indutores de oxitose/ferroptose Glu (5 mM), BSO (25 μM), RSL3 (50 nM), período que antecede a morte celular induzida por esses agentes pró-ferroptose. Posteriormente as células foram tratadas com os compostos nas concentrações de 0,5 e 3 μM. Depois de 24 horas de exposição aos indutores, os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados.

Os resultados obtidos demonstraram que somente o tratamento com o RC363 e RC574 em ambas as concentrações (0,5 e 3 μM) protegeu totalmente as células HT22 tanto da redução da viabilidade celular quanto da morte celular induzidos pelo Glu, conforme as figuras 13 A e B, respectivamente. Apenas o tratamento com o RC363 e RC574 na concentração de 0,5 μM reverteu parcialmente a redução da viabilidade celular e demonstrou proteção total da morte celular induzidos pela exposição ao BSO (Figuras 13 C-D). Por fim, nenhum tratamento foi capaz de proteger totalmente as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo RSL3 (Figuras

13 E-F) indicando que a exposição por 6 horas a esse indutor de oxitose/ferroptose causa um efeito irreversível sobre as células HT22.

Figura 13 - Efeito do composto PB e seus derivados frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO e RSL3 em células HT22.



As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %), à (A e B) 5 mM de Glu, (C e D) 25 μ M de BSO ou (E e F) 50 nM de RSL3 por 6 horas e após esta exposição as células foram tratadas com PB e seus derivados (0,5 e 3,0 μ M). Após 24 horas de exposição aos indutores os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Cada barra representa a média \pm EPM (n = 3 – 5). * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001 e **** p \leq 0,0001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo), + p \leq 0,05; ++ p \leq 0,01 indica diferença quando comparado ao grupo Glu 5 mM, ++++ p \leq 0,0001 indica diferença quando comparado ao grupo BSO 25 μ M (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

Contudo, os resultados sugerem um efeito protetor superior dos compostos RC363 e RC574 em comparação ao efeito do PB e SUC frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu e BSO, uma vez que somente esses compostos apresentaram proteção na menor concentração aqui testada (Figuras 13 A – D). De fato, esses resultados corroboram o estudo de Bueno e colaboradores (2020) no qual foi demonstrado que o pré-tratamento com os compostos RC363 (3 μ M) e RC574 (3 μ M) protege as células HT22 frente a toxicidade do Glu (5 mM e 10 mM). Tal efeito não foi observado pelo tratamento com o PB (3 μ M). Além disso, quando um cultivo primário de neurônios corticais foi co-tratado com o Glu (5 mM) e RC363 (3 μ M), RC574 (3 μ M) ou PB (3 μ M), a proteção frente ao Glu também foi observada somente com os compostos RC363 e RC574 (BUENO *et al.*, 2020).

Os compostos RC363 e RC574 são análogos simplificados do PB, ou seja, na estrutura desses compostos foi mantido o grupo molecular contendo dois átomos de enxofre e a porção fenólica responsáveis pela ação farmacológica, porém a cadeia lateral foi simplificada com a retirada de uma segunda porção fenólica e enrijecida (PINACHO CRISÓSTOMO *et al.*, 2006). A diferença entre esses dois compostos está na presença de um átomo de enxofre (RC363) ou de um selênio (RC574) (NOGUEIRA *et al.*, 2004). Os resultados do presente estudo juntamente com o estudo de Bueno e colaboradores (2020) indicam que essas modificações estruturais geraram análogos do PB mais potentes que o próprio PB como também ao derivado SUC frente ao modelo de oxitose/ferroptose.

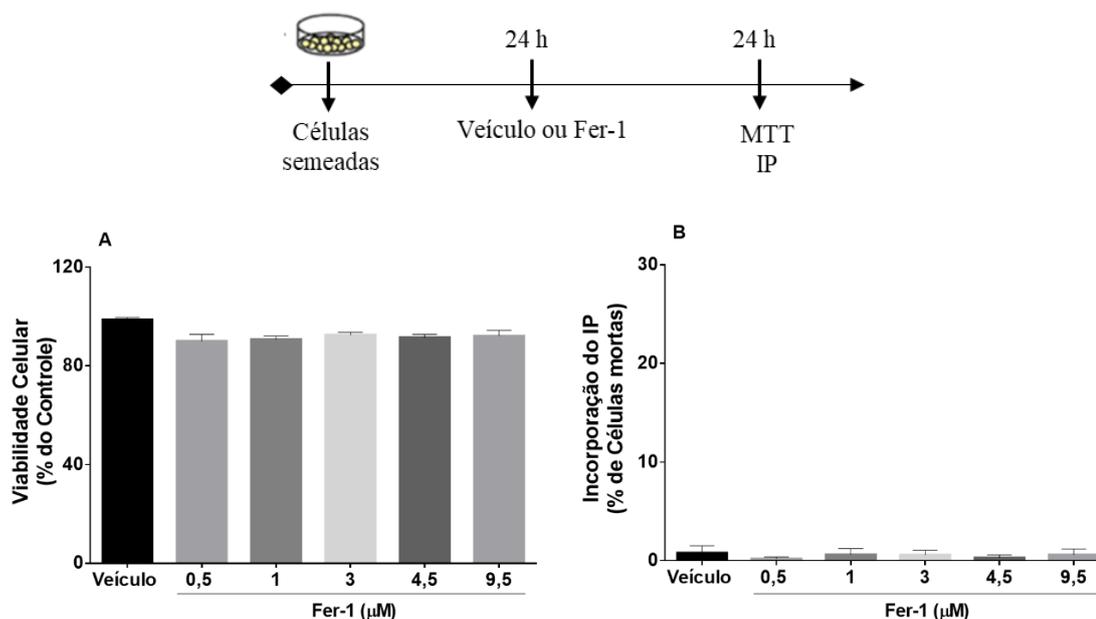
Deste modo, foi enfatizado o estudo com os compostos RC363 e RC574 e foi questionado se esses compostos apresentariam uma proteção semelhante a Fer-1, um agente anti-ferroptótico clássico que atua como um scavenger de radicais livres, bloqueando a peroxidação lipídica (DIXON *et al.*, 2012; SKOUTA *et al.*, 2014; ZILKA *et al.*, 2017).

5.1.7 Toxicidade do anti-ferroptótico clássico Fer-1 em células HT22

Antes de comparar o efeito dos compostos RC363 e RC574 com a Fer-1, foi avaliada primeiramente a citotoxicidade da Fer-1 para as células HT22. Dessa maneira, as células HT22

foram tratadas por 24 horas com concentrações crescentes (0,5 – 9,5 μM) da Fer-1 e após realizados os ensaios de viabilidade e morte celular. Foi observado que o tratamento com todas as concentrações de Fer-1 aqui testadas não alterou de forma significativa a viabilidade celular nem causou morte celular das células HT22, conforme o ensaio do MTT (Figura 14 A) e do IP (Figura 14 B), respectivamente.

Figura 14 - Toxicidade do anti-ferroptótico clássico Fer-1 em células HT22.



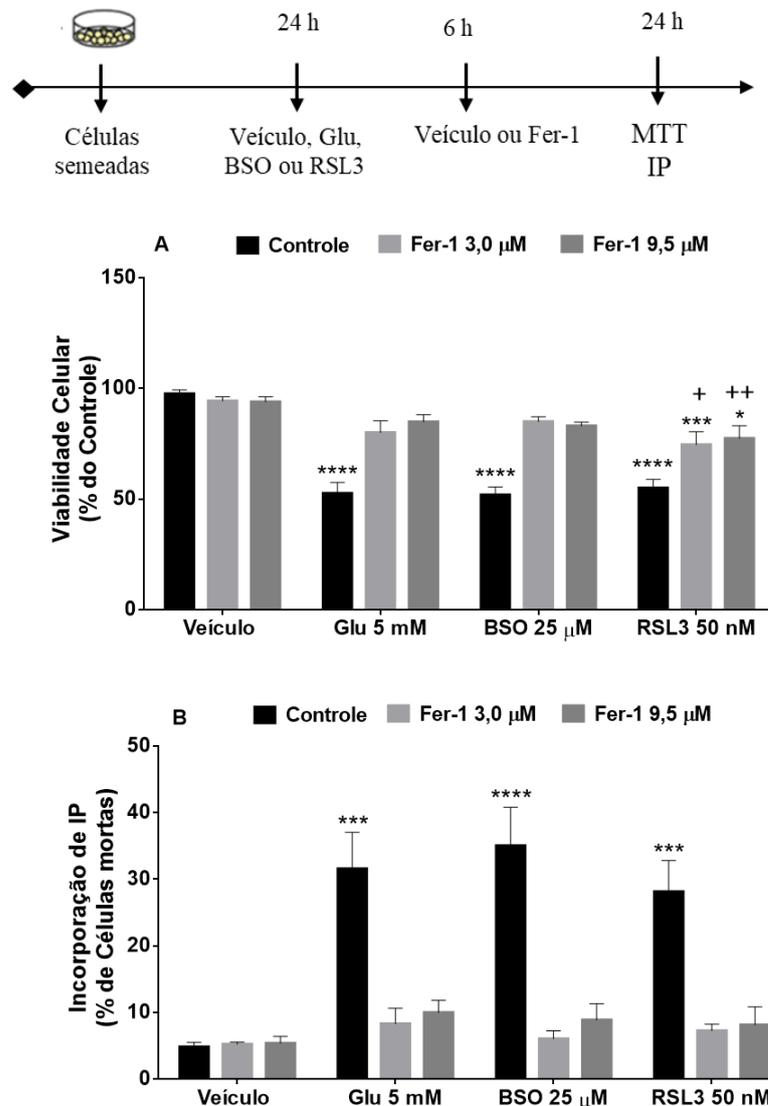
As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %) ou a concentrações crescentes (0,5 – 9,5 μM) de Fer-1. Após 24 horas de exposição aos compostos os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. (A) A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT e expressa pela percentagem do controle (células não tratadas, 100%). (B) A incorporação do iodeto de propídeo (IP) foi expressa pela percentagem do controle positivo (células tratadas com 2 % de triton, 100%). Os dados representam a média \pm EPM ($n = 4$). Não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos após ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* Tukey.

Esses resultados indicaram que nessas condições a Fer-1 não foi tóxica para as células HT22. Jelinek e colaboradores (2018) demonstraram que o pós-tratamento até 6 horas com 10 μM de Fer-1 foi protetor frente a citotoxicidade induzida pelo RSL3 em células HT22 (JELINEK *et al.*, 2018). Portanto, foram escolhidas as concentrações de 3,0 e 9,5 μM para avaliar o efeito protetor da Fer-1 frente aos diferentes indutores de oxitose/ferroptose conforme o nosso modelo.

5.1.8 Efeito do composto Fer-1 frente à toxicidade induzida pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 em células HT22

As células HT22 foram primeiramente expostas durante 6 horas a 5 mM de Glu, 25 μ M de BSO ou 50 nM de RSL3. Posteriormente as células foram tratadas com o composto Fer-1 nas concentrações de 3 e 9,5 μ M e, após 24 horas de exposição aos indutores, os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Foi observado que o tratamento com a Fer-1 em ambas as concentrações reverteu totalmente o efeito do Glu e do BSO sobre a viabilidade e morte celular (Figura 15 A-B, respectivamente). Porém reverteu parcialmente a redução da viabilidade celular induzida pelo RSL3, apesar de proteger da morte celular (Figura 15 A-B, respectivamente).

Figura 15 - Efeito do composto Fer-1 frente à toxicidade induzida pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 em células HT22.



As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %) ou à 5 mM de Glu, 25 μM de BSO ou 50 nM de RSL3 por 6 horas e após esta exposição as células foram tratadas com Fer-1 (3,0 e 9,5 μM). Após 24 horas de exposição aos indutores os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. (A) A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT e expressa pela percentagem do controle (células não tratadas, 100%). (B) A incorporação do iodeto de propídeo (IP) foi expressa pela percentagem do controle positivo (células tratadas com 2 % de triton, 100%). Os dados representam a média ± EPM (n = 3 - 4) *** p ≤ 0,001 e **** p ≤ 0,0001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle veículo, + p ≤ 0,05; ++ p ≤ 0,01, indicam diferença quando comparado ao grupo controle RSL3 50 nM (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

Esses resultados demonstraram que a Fer-1 (3 μM) foi efetiva no papel protetor frente aos indutores de oxitose/ferroptose Glu e BSO, resultado semelhante ao observado pelos compostos RC363 e RC574 (Figuras 13 A – D). Por outro lado, o tratamento com a Fer-1 (3 μM) apresentou uma proteção parcial frente a toxicidade do composto RSL3 sendo que essa

proteção não foi obtida pelo tratamento com os compostos RC363 e RC574 (Figura 13 E). A Fer-1, na concentração de 0,5 μM , teve efeito protetor para as células HT-1080 frente à citotoxicidade induzida tanto pela erastina (1 μM até 100 μM) quanto pelo RSL3 (1 nM até 10 μM) quando os compostos eram co-tratados (DIXON *et al.*, 2012). Sabendo que os compostos RC363 e RC547 também demonstraram proteção na concentração de 0,5 μM frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu e pelo BSO (Figuras 13 A – D), a fim de melhor comparar o efeito protetor desses análogos do PB com a Fer-1 frente ao nosso modelo de oxitose/ferroptose, optamos por utilizar concentrações entre 0,5 μM .

5.1.9 Comparação entre o efeito protetor dos compostos RC363 e RC574 com o anti-ferroptótico clássico Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22

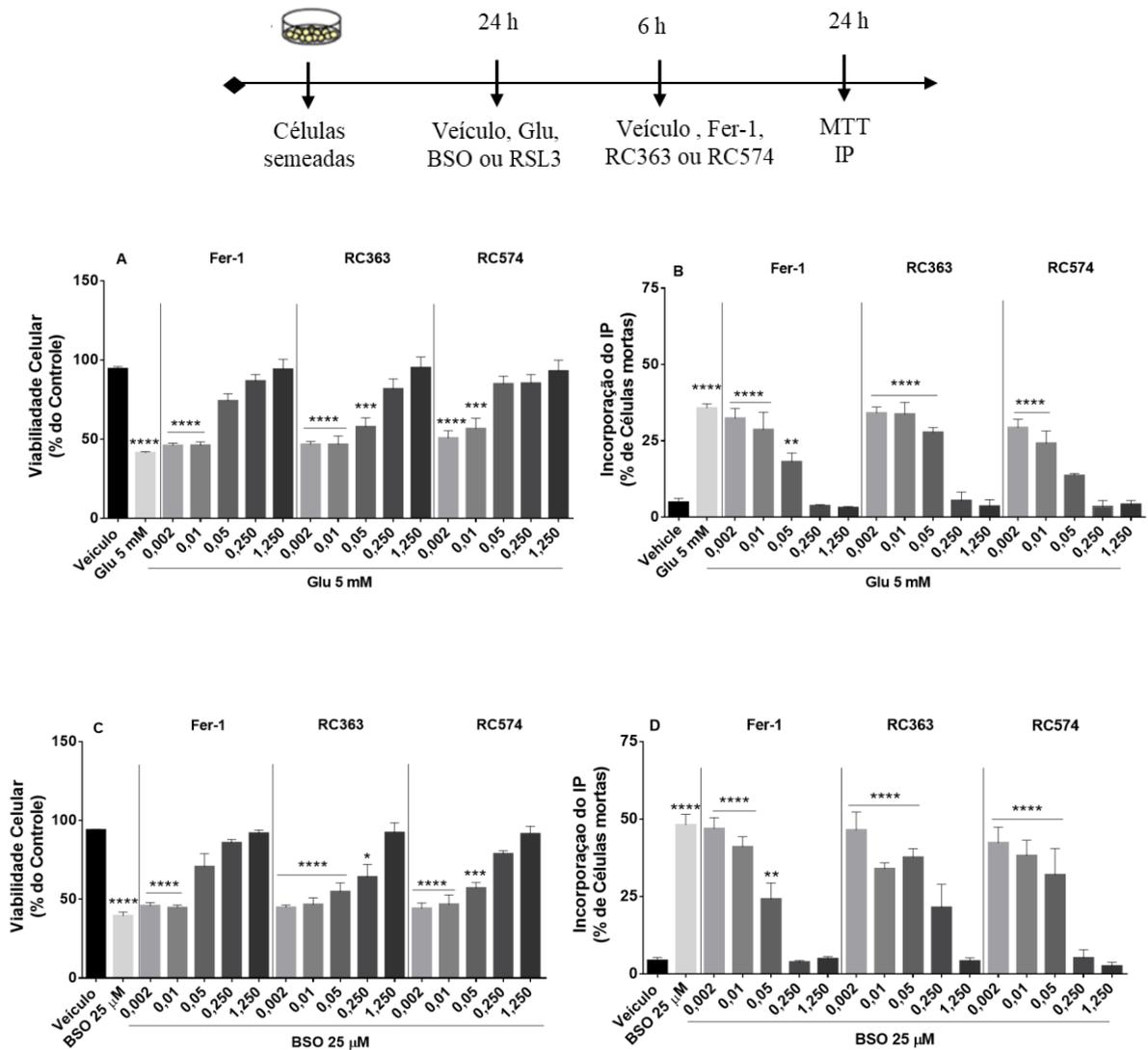
Sendo assim, as células HT22 foram expostas ao Glu (5 mM), ao BSO (25 μM) ou ao RSL3 (50 nM) e, após 6 horas, as células foram tratadas com concentrações crescentes de 0,002 até 1,250 μM da Fer-1, RC363 ou do RC547. Depois de 24 horas de exposição os indutores de oxitose/ferroptose os ensaios de viabilidade celular e morte celular foram realizados.

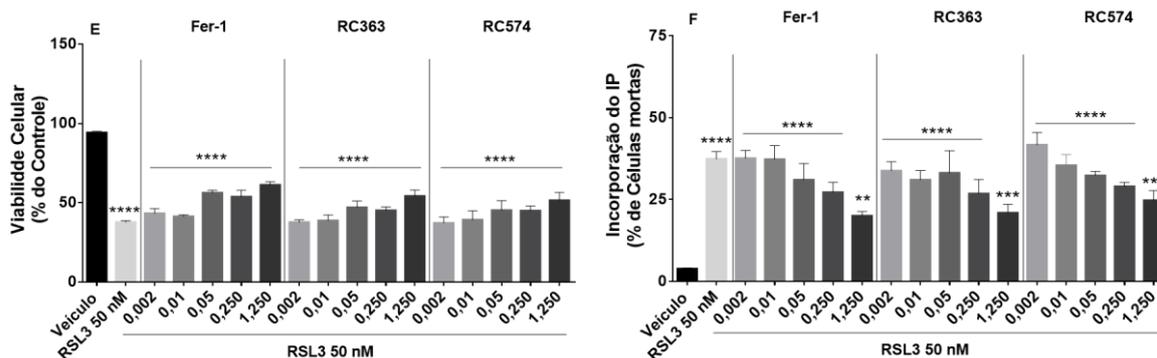
Os resultados obtidos demonstraram que a Fer-1 apresentou proteção total tanto sobre a redução da viabilidade celular quanto sobre a morte induzida pelo Glu a partir da concentração de 0,250 μM (Figuras 16 A-B). O RC363 também protegeu totalmente as células HT22 da toxicidade causada pelo Glu a partir da concentração de 0,250 μM (Figuras 16 A-B respectivamente). E o RC574, a partir da concentração de 0,05 μM , demonstrou proteção total frente ao efeito tóxico do Glu sobre as células HT22 (Figuras 16 A e B respectivamente). Ressalta-se que a proteção da Fer-1, do RC363 e do RC574 frente ao Glu não se difere a partir da concentração de 0,250 μM .

A Fer-1 também demonstrou efeito protetor total a partir da concentração de 0,250 μM frente à redução da viabilidade e da morte celular induzidas pelo BSO, conforme as figuras 15 C e D. A proteção total do RC574 contra a toxicidade do BSO também foi observada a partir da concentração de 0,250 μM (Figuras 16 C-D). Já o RC363 somente protegeu totalmente as células HT22 do efeito tóxico do BSO na maior concentração (1,250 μM) (Figuras 16 C-D). Assim, para a toxicidade do BSO foi observado que a proteção do composto RC574 não diferiu do efeito protetor da Fer-1 a partir da concentração de 0,250 μM e o RC363 e a Fer-1 na maior concentração tiveram o mesmo efeito protetor.

Nenhum composto nas concentrações testadas apresentou efeito protetor frente à toxicidade induzida pela exposição ao RSL3 (Figuras 16 E - F). Esse resultado sugere novamente que o RSL3, após 6 horas de exposição, induz um efeito irreversível sobre as células HT22 que possivelmente limita a ação protetora dos compostos.

Figura 16 - Comparação entre o efeito protetor dos compostos RC363 e RC574 com o anti-ferroptótico clássico Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22.





As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %) ou à (A e B) 5 mM de Glu, (C e D) 25 μ M de BSO ou (E e F) 50 nM de RSL3 por 6 horas e após esta exposição as células foram tratadas com Fer-1, RC363 ou RC574 (0,002; 0,01; 0,05; 0,250; 1,250 μ M). Após 24 horas de exposição aos indutores os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Os dados representam a média \pm EPM (n = 3). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

Nesse estudo foi demonstrado que o RSL3 causou peroxidação lipídica após 6 horas de exposição (Figura 11 B) e, somente após 12 horas de exposição ao Glu e ao BSO, esse evento foi observado (Figura 11 C). A proteção de Fer-1, RC363 e RC574 só foi observada após a exposição por 6 horas ao Glu e ao BSO (Figuras 16 A – D), período no qual esses indutores de oxitose/ferroptose não causaram peroxidação lipídica. Portanto, sugere-se que a recuperação celular se torna irreversível após a geração maciça de ER lipídicas.

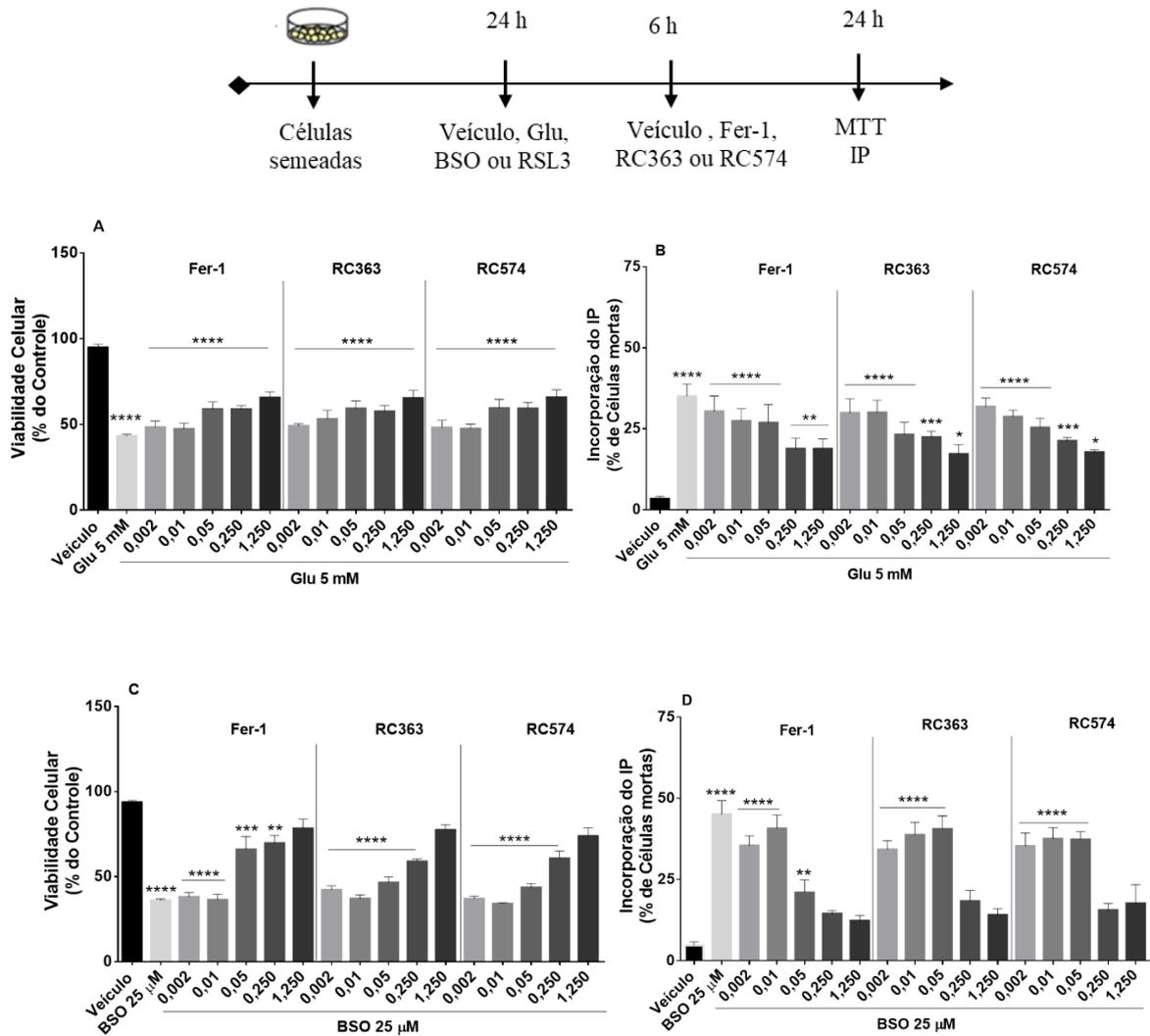
Para testar a hipótese de que a peroxidação lipídica é o evento que uma vez estabelecido a proteção torna-se ineficiente, foi avaliado se os compostos Fer-1, RC363 e RC574 protegem as células HT22 após a exposição por 12 horas ao Glu (5 mM) e ao BSO (25 μ M), período no qual esses agentes ferroptóticos induzem peroxidação lipídica (Figura 10 C). Assim como, foi avaliado se o co-tratamento dos compostos Fer-1, RC363 e RC574 com o RSL3 protege as células HT22 da toxicidade induzida por esse agente pró-ferroptótico.

5.1.10 Efeito do tratamento tardio com os compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu e BSO em células HT22

As células HT22 foram expostas ao Glu (5 mM) ou ao BSO (25 μ M) por 12 horas. Após esse período receberam o tratamento com Fer-1, RC363 ou RC574 em concentrações crescentes de 0,002 até 1,250 μ M. Depois de 24 horas de exposição aos indutores de oxitose/ferroptose os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Nenhum composto (Fer-1, RC363 ou RC574) protegeu as células HT22 da redução da viabilidade e morte celulares induzidos por 12

horas de exposição ao Glu, conforme as figuras 17 A e B respectivamente. Somente o tratamento com a maior concentração (1,250 μM) dos compostos protegeu as células HT22 da toxicidade causa pela exposição por 12 horas ao BSO (Figuras 17 C e D).

Figura 17 - Efeito do tratamento tardio com os compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu e BSO em células HT22.



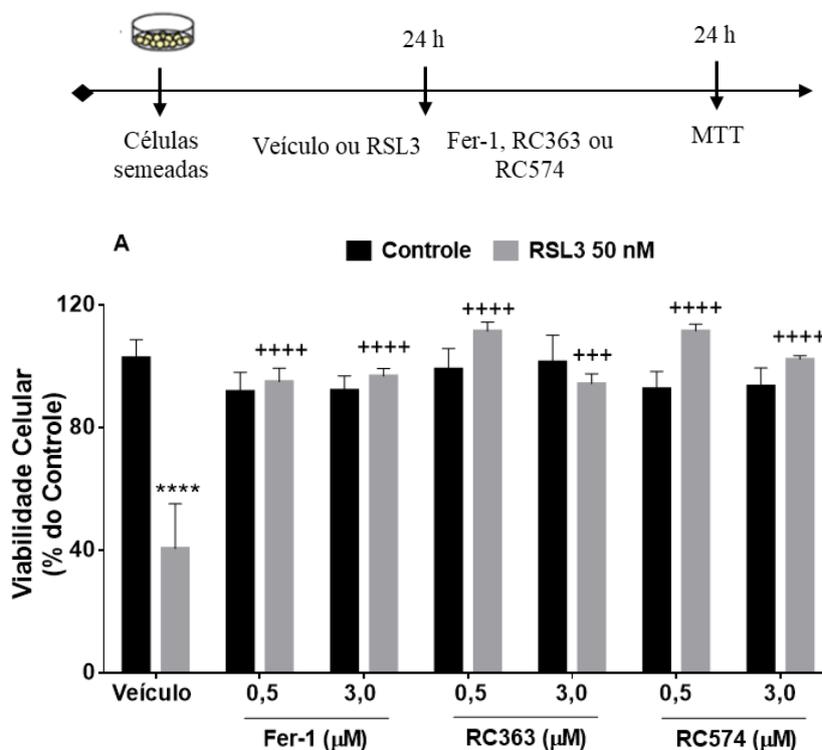
As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %) ou à (A e B) 5 mM de Glu, (C e D) ou 25 μM de BSO por 12 horas e após esta exposição as células foram tratadas com Fer-1, RC363 ou RC574 (0,002; 0,01; 0,05; 0,250; 1,250 μM). Após 24 horas de exposição aos indutores os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Os dados representam a média \pm EPM (n = 4). ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001 e **** p \leq 0,0001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

5.1.11 Efeito do tratamento precoce com os compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo RSL3 em células HT22

Além disso, também para testar essa hipótese de que a peroxidação lipídica seria um evento limitante para a proteção dos compostos Fer-1, RC363 ou RC574, as células HT22 foram co-tratadas com RSL3 (50 nM) e Fer-1, RC363 ou RC574 nas concentrações de 0,5 e 3 μ M por 24 horas. Depois das 24 horas de tratamento o ensaio de viabilidade celular foi realizado. Conforme a figura 18 A observamos que o co-tratamento com ambas as concentrações da Fer-1, RC363 ou RC574 com o RSL3 protegeu totalmente as células HT22 da redução da viabilidade induzida pelo RSL3.

Nossos resultados corroboram os achados de Bueno e colaboradores, 2020, nos quais o co-tratamento dos compostos RC363 (a partir da concentração de 0,250 μ M) e RC574 (a partir da concentração de 0,0625 μ M) com o RSL3 apresentou proteção total frente a citotoxicidade induzida por esse agente ferroptótico em células HT22 (BUENO *et al.*, 2020). Assim como, a Fer-1 (0,5 μ M) protegeu totalmente as células HT-1080 frente a redução da viabilidade induzida pelo RSL3 quando esses compostos eram co-tratados (DIXON *et al.*, 2012).

Figura 18 - Efeito do tratamento precoce com os compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente a oxitose/ferroptose induzida pelo RSL3 em células HT22.



As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %) ou co-tratadas com RSL3 (50 nM) e Fer-1, RC363 ou RC574 (0,5 e 3,0 μM). Após 24 horas de exposição os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 3$). **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle veículo, **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle RSL3 (50 nM) (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

Além disso, o co-tratamento da Fer-1 (10 μM) com o RSL3 (50 nM) preveniu da peroxidação lipídica induzida por 8 horas de exposição a esse agente ferroptótico em células HT22. Porém, a oxitose/ferroptose induzida pelo RSL3 foi minimizada pelos conhecidos inibidores da ferroptose a Lip-1, Fer-1 e DFO com uma janela de pós-tratamento de até 6 horas (JELINEK *et al.*, 2018). Corroborando os resultados obtidos no presente estudo onde após 6 horas de exposição ao RSL3 foi observado peroxidação lipídica (Figura 11 B) e os compostos Fer-1, RC363 e RC574 foram ineficientes em proteger as células HT22 frente à oxitose/ferroptose induzida por esse agente ferroptótico (Figuras 16 E-F). Entretanto, a proteção somente foi observada quando os compostos Fer-1, RC363 e RC574 eram co-tratados com o RSL3 (Figura 18 A).

O presente estudo também demonstrou que até 6 horas de exposição ao Glu e ao BSO, período que antecedeu a peroxidação lipídica induzida por esses agentes ferroptóticos (Figura 11 A), os compostos Fer-1, RC363 e RC574 protegeram as células HT22 (Figuras 16 A – D),

porém após 12 horas de exposição ao Glu e ao BSO, período no qual ocorre uma maciça geração de ER lipídicas (Figura 11 C), essa proteção é perdida (Figura 17 A – D). Esses resultados reforçam que após 7 horas ou mais de exposição ao Glu é observado um aumento exponencial de ER, e a oxitose/feroptose é irreversível, contudo, em exposições ao Glu por períodos mais curtos a recuperação celular torna-se viável (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001; MAHER, CURRAIS, SCHUBERT, 2020).

Portanto, os resultados obtidos indicam que a peroxidação lipídica é um evento presente na citotoxicidade induzida pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3, que limita a ação protetora dos compostos Fer-1, RC363 e RC574. É possível que após a geração maciça de lipídios oxidados, principalmente dos fosfolipídios de membrana, a recuperação celular seja inviável e a morte por oxitose/feroptose torna-se irreversível.

O presente estudo também demonstrou que o efeito protetor dos compostos RC363 e RC574 frente à citotoxicidade do Glu e do BSO foi semelhante ao da Fer-1 (Figuras 16 A- D). Dessa maneira foi questionado se esse efeito protetor envolveria a mitigação da redução da concentração de GSH causada pelo Glu e BSO, além disso para entender como esses compostos poderiam estar agindo resolvemos comparar este efeito com o composto GSHEE, um precursor direto de GSH.

5.1.12 Efeito dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à redução da concentração de GSH induzida pelos agentes ferroptóticos Glu e BSO em células HT22

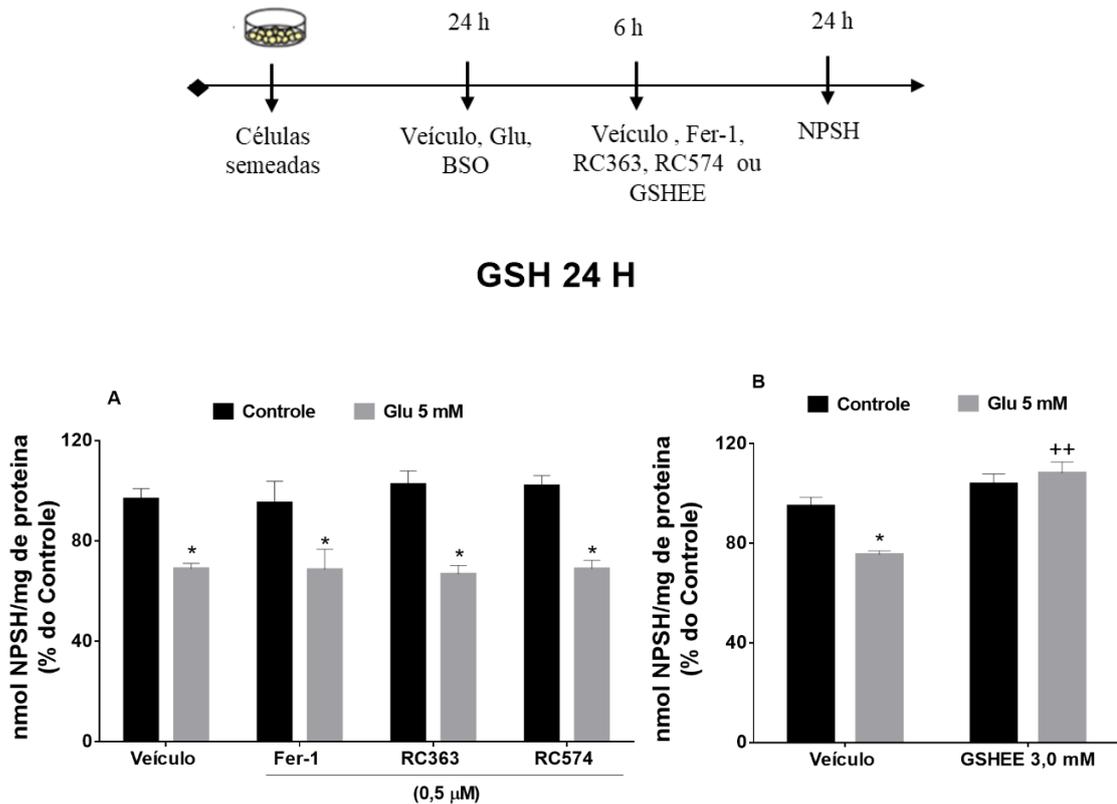
As células HT22 foram expostas ao Glu (5 mM) ou ao BSO (25 μ M) e após 6 horas foram tratadas com Fer-1, RC363 ou RC547 na concentração de 0,5 μ M ou com GSHEE na concentração de 3 mM. Depois de 24 horas de exposição ao Glu ou ao BSO o ensaio do NPSH foi realizado. Foi observado que Fer-1, RC363 e RC574 não reverteram a depleção de GSH induzida pelo Glu e pelo BSO (Figuras 19 A e C). Além disso, os compostos por si não aumentaram a concentração basal de GSH conforme as figuras 19 A e C.

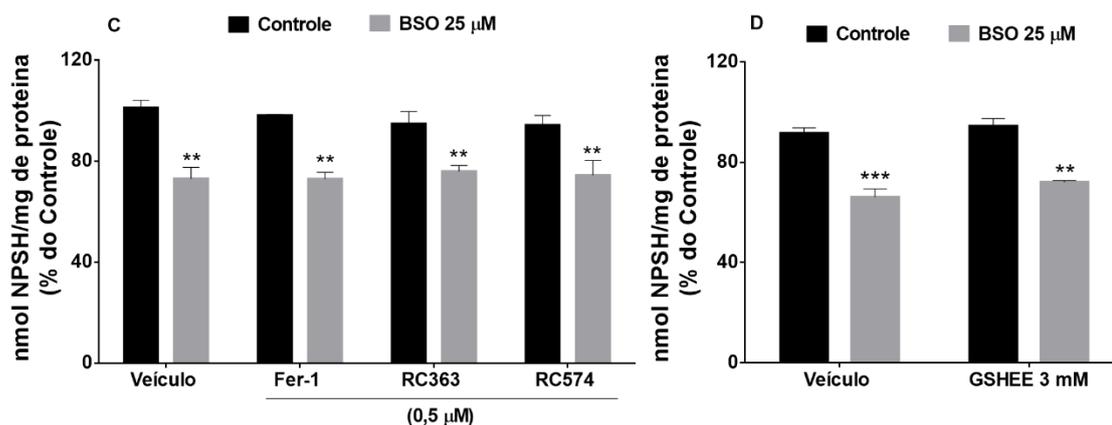
Portanto, esses resultados indicam que o efeito protetor dos compostos Fer-1, RC363 e RC574 frente a oxitose/feroptose causada pelo Glu e BSO não envolve a síntese de GSH. Mas provavelmente a ação protetora da Fer-1, RC363 e RC574 esteja prevenindo efeitos posteriores a depleção da GSH. De fato, Bueno e colaboradores (2020) demonstraram que os compostos RC363 e RC574 não foram capazes de prevenir a depleção de GSH induzida tanto pelo Glu

quanto pelo BSO. Porém esses compostos aumentaram o imunconteúdo e a atividade da enzima GPx1 (BUENO *et al.*, 2020).

As GPx são enzimas altamente conservadas evolutivamente que atuam limitando a formação de radicais tóxicos através da redução de peróxidos em seus álcoois correspondentes utilizando para isto a GSH como cofator (BRIGELIUS-FLOHÉ E MAIORINO, 2013, ESPINOSA-DIEZ *et al.*, 2015, FORCINA E DIXON, 2019). Sendo assim, é possível que o aumento da atividade da GPx1 induzido pelos compostos RC363 e RC574 (BUENO *et al.*, 2020) consuma a GSH de maneira que não seja possível reverter a depleção causada pelo Glu e pelo BSO, ao menos durante o período aqui testado.

Figura 19 - Efeito dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 frente à redução da concentração de GSH induzida pelos agentes ferroptóticos Glu e BSO em células HT22.





As células HT22 foram expostas à 5 mM do Glu (A e B) ou à 25 Mm de BSO (C e D) por 6 horas. Após 6 horas as células foram tratadas com o veículo (DMSO 0,05 %), RC363, RC574, FER-1 (ambos na concentração de 0,5 μM) (A e D), com o veículo (PBS 0,01 M) ou com 3 mM de GSHEE (B e D).

Após 24 horas de exposição ao Glu ou ao BSO o ensaio do NPSH foi realizado e expresso pela percentagem do controle (células não tratadas, 100%). Os dados representam a média ± EPM (n = 3 – 4) (A e B) * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01 indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo), ++ p ≤ 0,01 indicam diferença quando comparados ao grupo Glu (5 mM) (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de post hoc Tukey). (C e D) ** p ≤ 0,01; ***p < 0,001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

Observou-se que o tratamento com a GSHEE foi capaz de recuperar a redução da GSH induzida somente pelo Glu (Figuras 19 B e D). A síntese da GSH ocorre pela ação da GCL que é uma enzima heterodimérica formada por duas subunidades, uma subunidade pesada a GCLc (~73 kDa) que possui o sítio catalítico e outra subunidade leve a GCLm (~33 kDa), que tem o papel modulador da subunidade catalítica. Esta enzima é responsável pela etapa que controla a síntese de GSH. A síntese de GSH envolve duas reações que necessitam de energia (ATP) e ambas ocorrem no citosol. Inicialmente a enzima GCL catalisa a condensação de cisteína e glutamato para formar o dipeptídeo γ -glutamilcisteína (γ GluCys), em seguida, em outra reação catalisada pela enzima glutatona sintetase (GS), a glicina é adicionada para formar o tripéptido γ -glutamilcisteínilglicina (γ GluCysGly). A primeira reação é considerada a etapa que limita a síntese da GSH, a qual necessita do aminoácido cisteína (ESPINOSA-DIEZ *et al.*, 2015, FARINA E ASCHNER, 2019).

A cisteína apesar de ser absorvida primariamente pelo sistema x_c^- (MANDAL *et al.*, 2010; SEIBT *et al.*, 2018), pode ser adquirida pelas células através de outros transportadores, como o sistema alanina-serina-cisteína (ASC), o LAT-2 (grande transportador de aminoácidos 2), assim como pelo transportador de aminoácidos excitatórios 1 (EAAC-1) (CONRAD E SATO, 2011; LEWERENZ *et al.*, 2013). Portanto, nossos resultados indicam que é possível que as células HT22 consigam obter a cisteína por esses outros transportadores e dessa forma,

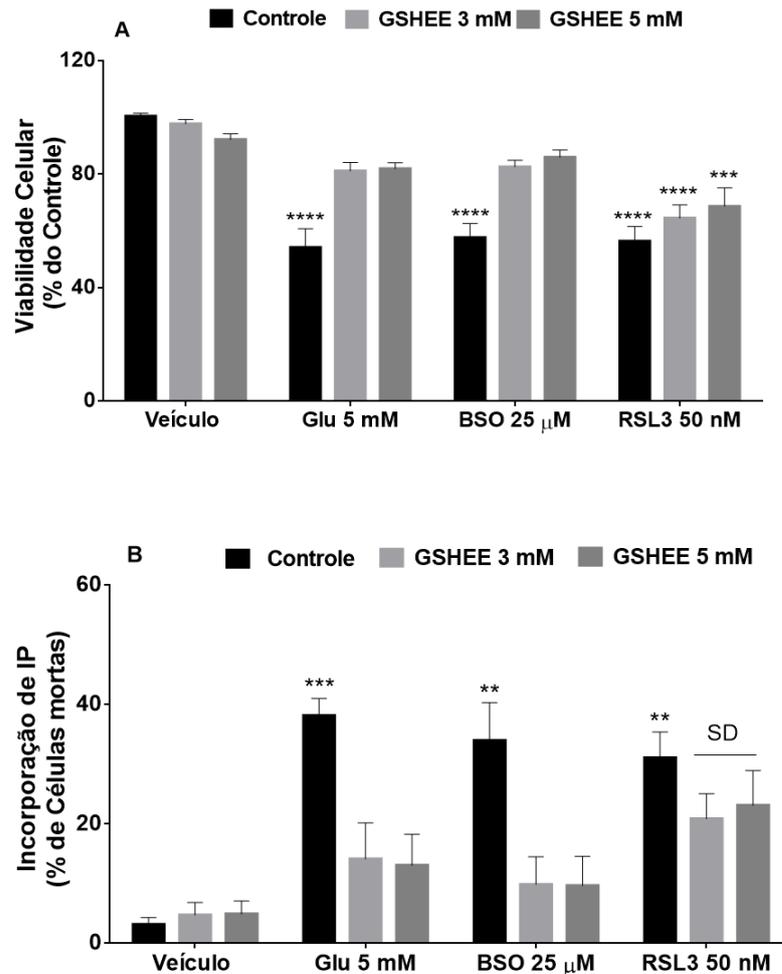
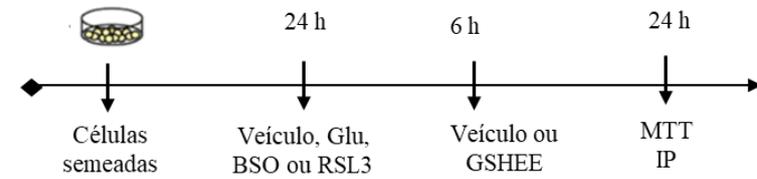
mesmo com o bloqueio do sistema x_c^- pelo Glu as células HT22 ainda são capazes de sintetizar a GSH. Porém, uma vez que a enzima GCL é irreversivelmente inibida pelo BSO a síntese de GSH é totalmente prejudicada.

5.1.13 Efeito da GSHEE frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22

Para saber se a reposição de GSH é um fator importante para a proteção contra a oxitose/ferroptose avaliamos a possível proteção do tratamento com a GSHEE frente aos diferentes indutores de oxitose/ferroptose. Para isso, as células HT22 foram expostas durante 6 horas a 5 mM de Glu, 25 μ M de BSO ou 50 nM de RSL3. Após as 6 horas de exposição aos indutores, as células foram tratadas com a GSHEE nas concentrações de 3 e 5 mM e, após 24 horas de exposição aos indutores, os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados.

O tratamento com GSHEE (3 e 5 mM) apenas protegeu totalmente as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo Glu e pelo BSO (Figuras 20 A-B). Dessa maneira, nossos resultados mostraram que a administração de GSH apresenta efeito protetor contra a oxitose/ferroptose, mesmo sem repor a depleção de GSH induzida pelo BSO (Figura 18 D), indicando que a proteção envolve eventos posteriores a depleção de GSH. Porém, mais uma vez observamos que o efeito protetor é perdido após a indução maciça de peroxidação lipídica, visto que o pós-tratamento com a GSHEE não evitou a morte ferroptótica induzida pelo RSL3 em células HT22 (Figura 20 A-B).

Figura 20 - Efeito da GSHEE frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22.



As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %), à 5 mM de GLU, 25 μ M de BSO ou 50 nM de RSL3 por 6 horas e após esta exposição as células foram tratadas com GSHEE (3 mM e 5 mM). Após 24 horas de exposição aos indutores os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Cada barra representa a média \pm EPM (n = 4). ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001 e **** p \leq 0,0001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle veículo e NS indica que não houve diferença significativa entre o grupo RSL3 50 nM com os grupos GSHEE 3 mM + RSL3 50 nM e GSHEE 5 mM + RSL3 (50 nM) (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

Neste estudo, até o momento foi observado que o tratamento com os compostos Fer-1, RC363 e RC574 assim como a GSHEE apresenta proteção contra a oxitose/ferroptose induzida pelo Glu e pelo BSO, bem como o co-tratamento com os compostos Fer-1, RC363 e RC574

com o RSL3 apresentou efeito protetor para as células HT22. Porém, quando a peroxidação lipídica exacerbada é estabelecida nas células a proteção de todos os compostos é perdida. Indicando que a peroxidação lipídica além de ser o principal marcador da morte por oxitose/ferroptose (DIXON E STOCKWELL, 2019) é um evento limitante para proteção de todos os compostos em nosso modelo.

Também foi demonstrado que, apesar da importância da GSH na proteção contra a oxitose/ferroptose o efeito protetor dos compostos Fer-1, RC363 e RC574 não está relacionado com a síntese de GSH. Neste contexto, decidiu-se investigar e comparar o efeito antioxidante direto dos compostos RC363 e RC574 com a Fer-1. Além de avaliar se a ação anti-ferroptótica dos compostos Fer-1, RC363 e RC574 estaria relacionada com seu efeito antioxidante direto.

5.1.14 Avaliação da atividade antioxidante direta dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 em condições livres de células

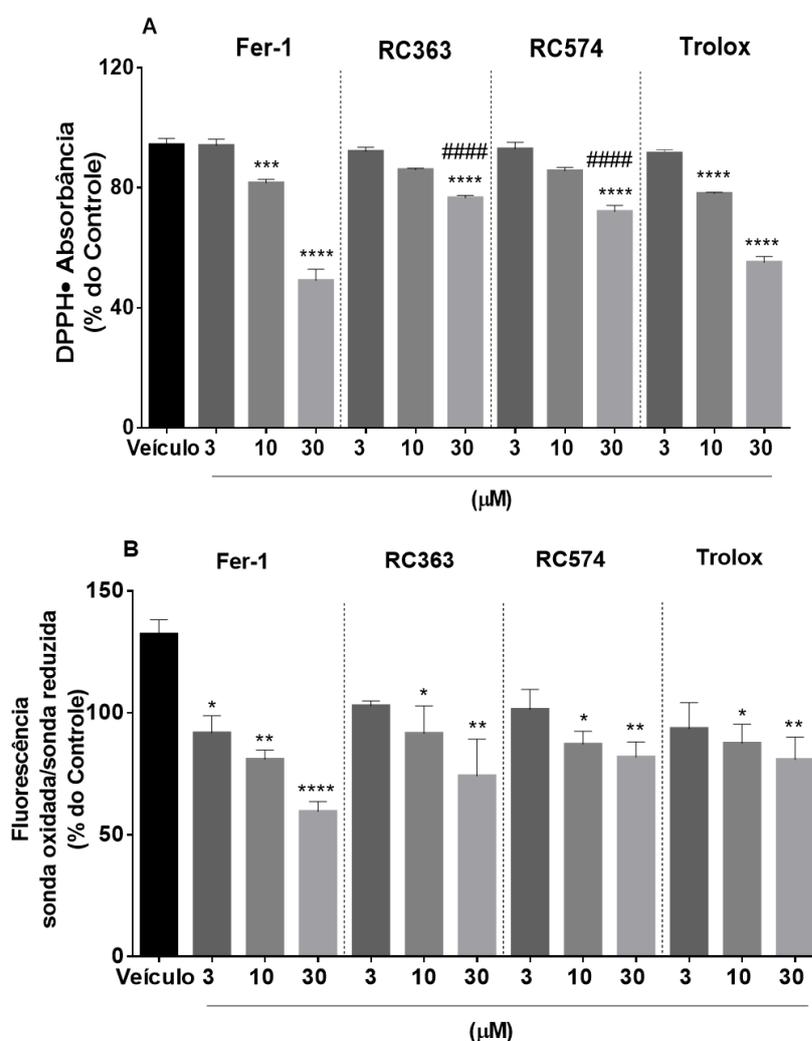
Para investigar a capacidade dos compostos Fer-1, RC363 e RC574 em reduzir o radical estável 2,2-difenil 1-picrilhidrazil (DPPH•) assim como, de prevenir a peroxidação lipídica em um meio livre de células contendo apenas membranas rompidas das células HT22 foi utilizado o Trolox um antioxidante fenólico análogo mais hidrossolúvel da vitamina E para comparar sua atividade antioxidante direta com os compostos Fer-1, RC363 e RC574.

Compostos fenólicos, como no caso do Trolox, RC363 e RC574, bem como as difenilaminas, alquilaminas, as aminas secundárias, em particular as diarilaminas, semelhante a Fer-1 (uma arilamina) são compostos que possuem uma importante atividade antioxidante. As diarilaminas parecem ser mais eficientes em prevenir a propagação das reações em cadeia de radicais livres, como as que ocorrem durante a auto-oxidação de fosfolípidios de membrana, uma vez que agem como antioxidantes com ação de *radical-trapping antioxidant* (RTA) reduzindo diretamente os peróxidos fosfolipídicos (SKOUTA *et al.*, 2014).

Conforme o ensaio do DPPH a Fer-1 na concentração de 30 μ M reduziu de maneira significativa o radical DPPH• (51%, $p \leq 0,0001$; figura 21 A) e essa redução foi semelhante a observada pelo Trolox (45%, $p \leq 0,0001$; figura 21 A), porém diferente dos compostos RC363 e RC574 (24%, $p \leq 0,0001$ e 28%, $p \leq 0,0001$ respectivamente; figura 21 A). Portanto, a Fer-1, uma arilaquilamina, apesar de apresentar uma ação de *radical-trapping antioxidant* (RTA) maior que os compostos fenólicos RC363 e RC574, essa ação foi semelhante ao Trolox outro composto fenólico.

Entretanto, segundo o ensaio anti-lipoperoxidativo, a Fer-1 demonstrou maior eficácia antioxidante (41%, $p \leq 0,0001$; figura 21 B), porém esse efeito não foi diferente dos demais compostos fenólicos Trolox, RC363 e RC574 nas maiores concentrações (Figura 21 B). Neste contexto, nos questionamos se a atividade antioxidante dos compostos RC363 e RC574 assim como da Fer-1 e do Trolox observada nos ensaios do DPPH e do ensaio anti-lipoperoxidativo estaria relacionada com o efeito protetor desses compostos frente ao modelo de oxitose/ferroptose do presente estudo.

Figura 21 - Avaliação da atividade antioxidante direta dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 em condições livres de células.



(A) Após 1 hora de incubação do radical DPPH• com Fer-1, RC363, RC574, Trolox (3, 10 e 30 μM) ou com o veículo (DMSO 0,05 %) foi realizada a leitura da absorbância em 518 nm e os dados foram expressos como a percentagem do controle (somente DPPH, 100 %). Cada barra representa a média ±

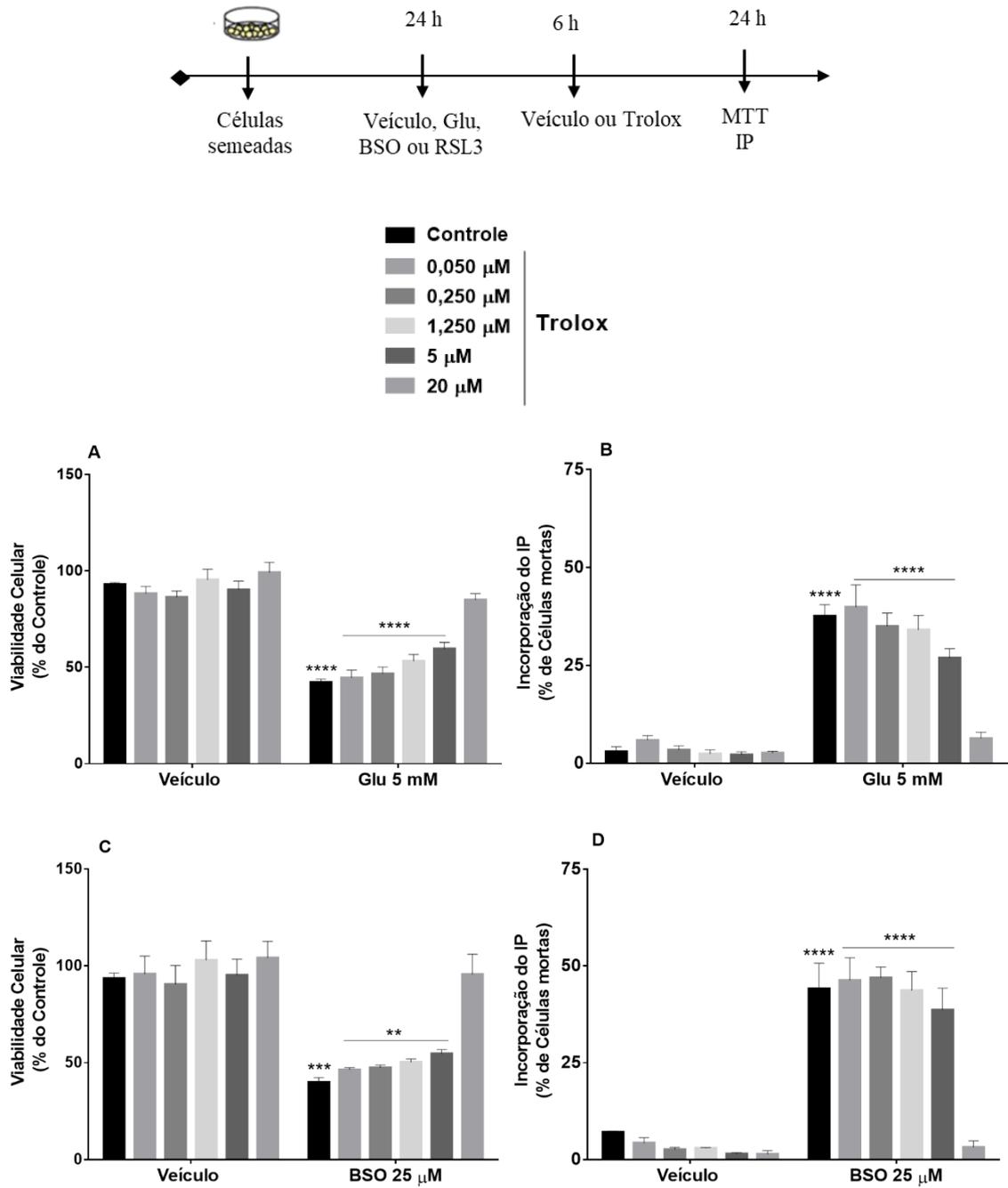
EPM (n = 4). *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle veículo, ##### $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo Fer-1 30 μM (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de post hoc Tukey). (B) Células rompidas foram incubadas com o veículo (DMSO 0,05 %) Fer-1, RC363, RC574 (3, 10 e 30 μM). Após 1 hora, foi adicionada a sonda BODIPY C11 (15 μM) e a intensidade de fluorescência (excitação/emissão de 530/590 nm – sonda oxidada e excitação/emissão de 485/528 – sonda reduzida) foi medida durante 20 minutos. Os resultados são apresentados como a razão da fluorescência da sonda oxidada pela sonda reduzida e expressos como a percentagem do controle (células com a sonda BODIPY, 100 %). Cada barra representa a média \pm EPM (n = 3). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ e **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

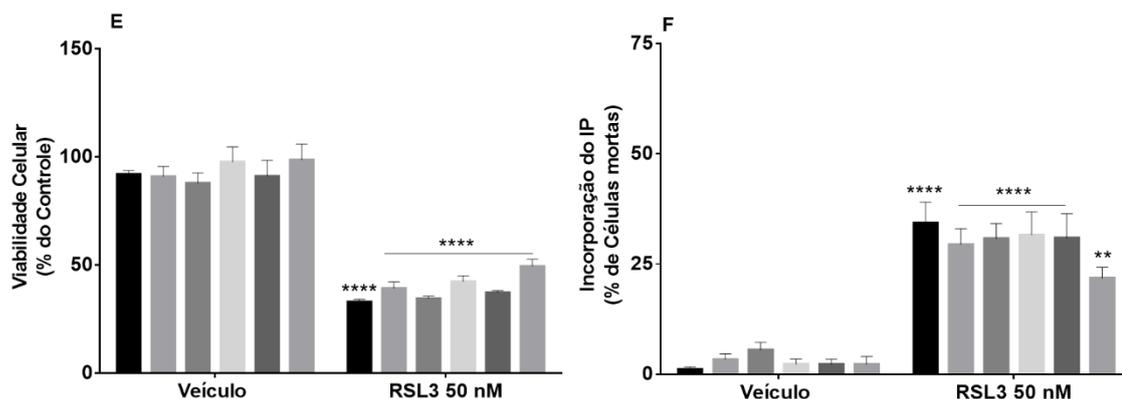
5.1.15 Efeito do Trolox frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22

Dessa maneira, foi avaliado o possível efeito protetor do Trolox frente a citotoxicidade induzida pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3. Para isso, as células HT22 foram expostas durante 6 horas a 5 mM de Glu, 25 μM de BSO ou 50 nM de RSL3. Após as 6 horas de exposição aos indutores, as células foram tratadas com o Trolox nas concentrações de (0,050; 0,250; 1,250; 5,0; 20 μM), depois das 24 horas de exposição aos indutores, os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados.

Conforme demonstrado nas figuras 22 A-D o composto Trolox só apresentou efeito protetor frente à citotoxicidade induzida pelo Glu e pelo BSO com o tratamento na concentração de 20 μM . Além disso, o Trolox não foi efetivo em proteger as células HT22 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo RSL3 (Figuras 22 E-F). Esses resultados demonstram que o Trolox, apesar de apresentar uma atividade antioxidante semelhante à Fer-1 (Figura 21 A), possui um efeito anti-ferroptótico muito inferior não somente à Fer-1 como também aos compostos RC363, RC574 (Figura 16 A-D).

Figura 22 - Efeito do Trolox frente à oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 em células HT22.





As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05 %) ou à (A e B) 5 mM de Glu, (C-D) 25 µM de BSO ou (E-F) 50 nM de RSL3 por 6 horas e após esta exposição as células foram tratadas com Trolox (0,050; 0,250; 1,250; 5,0; 20 µM). Após 24 horas de exposição aos indutores os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Os dados representam a média ± EPM (n = 3). ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 e **** p ≤ 0,0001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

A fim de melhor correlacionar o efeito antioxidante com o efeito protetor dos compostos Fer-1, RC363, RC574 e Trolox, foi determinada a concentração inibitória de 50 % (IC₅₀) de cada composto a partir dos resultados do efeito protetor dos compostos (Figura 16) e do Trolox (Figura 22). Os dados estão apresentados na tabela 1. Assim como, por meio dos resultados do efeito antioxidante pelos ensaios do DPPH (Figura 21 A) e anti-lipoperoxidativo (Figura 21 B) foi calculada a concentração inibitória de 50 % (IC₅₀) de cada composto para ambos os ensaios. Os dados obtidos encontram-se na tabela 2.

Tabela 1 - Valores da IC₅₀ do efeito protetor dos agentes anti-ferroptóticos Fer-1, RC363 e RC574 e do agente antioxidante Trolox contra a citotoxicidade induzida pelo Glu, BSO ou RSL3 após 6 horas de exposição a estes agentes ferroptóticos.

Agente Ferroptótico → Agente Protetor ↓	Glu (5 mM)	BSO (25 µM)	RSL3 (50 nM)
Fer-1	5.04 x 10 ⁻⁸	6.37 x 10 ⁻⁸	1.73 x 10 ⁻⁸
RC363	1.08 x 10 ⁻⁷	2.54 x 10 ⁻⁷	5.25 x 10 ⁻⁸
RC574	2.49 x 10 ⁻⁸	1.33 x 10 ⁻⁷	1.10 x 10 ⁻⁷
Trolox	7.55 x 10 ⁻⁶	7.71 x 10 ⁻⁶	1.62 x 10 ⁻⁵

Os valores da IC₅₀ relacionados ao efeito protetor foram obtidos a partir de curvas não-lineares (Figura 15 e Figura 21). Os dados estão apresentados como IC₅₀ absoluta [M].

Tabela 2 - Valores da IC₅₀ para eficácia antioxidante dos agentes anti-ferroptóticos Fer-1, RC363 e RC574 e do agente antioxidante Trolox.

Eficácia Antioxidante → Agente Protetor ↓	Peroxidação Lipídica em células rompidas	Ensaio do DPPH
Fer-1	2.96 x 10 ⁻⁵	1.12 x 10 ⁻⁵
RC363	1.06 x 10 ⁻⁵	4.56 x 10 ⁻⁵
RC574	4.21 x 10 ⁻⁶	2.60 x 10 ⁻⁵
Trolox	3.16 x 10 ⁻⁶	1.02 x 10 ⁻⁵

Os valores da IC₅₀ relacionados a eficácia antioxidante foram obtidos a partir de curvas não-lineares (Figura 20 A - DPPH e Figura 20 B – peroxidação lipídica em células rompidas). Os dados estão apresentados como IC₅₀ absoluta [M].

Apesar da Fer-1 e dos compostos RC363 e RC574 terem bons efeitos anti-ferroptóticos e superiores ao Trolox independentemente do agente ferroptótico (Tabela 1), todos exibiram baixos efeitos anti-lipoperoxidativos em meio livre de células (Figura 21 B e Tabela 2). Curiosamente, a Fer-1 e Trolox que apresentaram efeitos anti-ferroptóticos muito diferentes (Figura 16 e Figura 22) exibiram eficácia antioxidante semelhante no ensaio DPPH (Figura 21 A e Tabela 2).

Nossos resultados corroboram o estudo de Dixon e colaboradores (2012) no qual a Fer-1 que apresentou similar lipofilicidade aos compostos fenólicos antioxidantes Trolox e hidroxiltolueno butilado (BHT), possuiu uma potência muito maior do que os dois compostos em suprimir o efeito citotóxico do agente ferroptótico erastina. Entretanto, a atividade antioxidante intrínseca da Fer-1 foi semelhante ao antioxidante fenólico Trolox, observada pelo ensaio do DPPH sob condições livres de células (Dixon et al., 2012).

Além disso, vão de encontro aos resultados do estudo de Bueno e colaboradores (2020) no qual o Trolox (25 µM) protegeu completamente a citotoxicidade induzida pelo Glu (5 mM), porém em uma concentração muito superior a dos compostos RC363 e RC574 (3 µM). Por outro lado, a capacidade antioxidante do Trolox foi superior a dos compostos RC363 e RC574, onde pelo ensaio do DPPH o Trolox (25 µM) reduziu 80% do radical DPPH• enquanto que os compostos RC363 e RC574 (25 µM) reduziram apenas 40% (BUENO *et al.*, 2020).

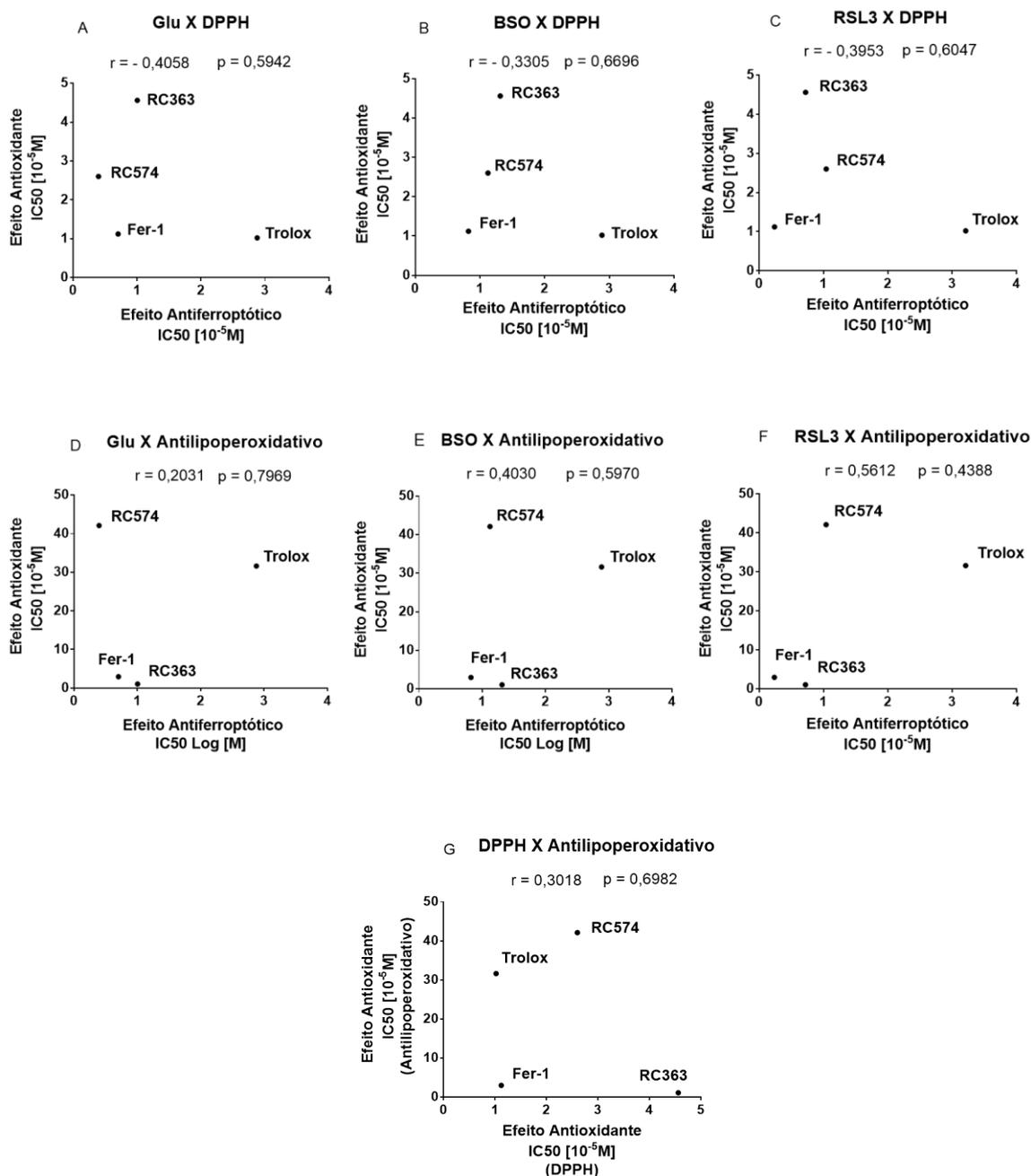
Dessa forma, os dados aqui presentes indicam que, apesar da atividade antioxidante dos compostos RC363 e RC574, observada pelos ensaios do DPPH e anti-lipoperoxidativo, seu

efeito protetor sobre a oxitose/ferroptose envolve mecanismos além da sua ação antioxidante intrínseca.

5.1.16 Correlação entre a atividade antioxidante direta dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 com sua ação anti-ferroptótica

Quando correlacionamos o efeito protetor de cada composto Fer-1, RC363, RC574 e Trolox nenhuma correlação significativa foi encontrada entre os efeitos anti-ferroptóticos e antioxidantes (ensaios anti-lipoperoxidativo e ensaio do DPPH) (coeficientes de Pearson variando de -0,33 a 0,56; valores de p variando de 0,4 a 0,8; Figuras 23 A-F). Nenhuma correlação significativa (coeficiente de Pearson = 0,30; p = 0,698; ; Figura 23 G) foi encontrada entre as eficácias antioxidantes derivadas do ensaio DPPH versus aquelas do ensaio anti-lipoperoxidativo, o que está de acordo com os estudos de Shah e colaboradores (2019).

Figura 23 - Correlação entre a atividade antioxidante direta dos compostos RC363, RC574 e Fer-1 com sua ação anti-ferroptótica.



Gráficos da correlação entre a IC₅₀ do efeito anti-ferroptótico (retirado da tabela 1) com a IC₅₀ do efeito antioxidante (retirado da tabela 2). Correlação do efeito anti-ferroptótico dos compostos Fer-1, RC363, RC574 e Trolox contra o Glu (A), BSO (B) ou RSL3 (C) com o efeito antioxidante a partir do ensaio do DPPH. Correlação do efeito anti-ferroptótico dos compostos Fer-1, RC363, RC574 e Trolox contra o Glu (D), BSO (E) ou RSL3 (F) com o efeito antioxidante a partir do ensaio da peroxidação lipídica em células rompidas. (G) Correlação entre o efeito antioxidante dos compostos Fer-1, RC363, RC574 e Trolox no ensaio do DPPH com o efeito antioxidante no ensaio da peroxidação lipídica em células rompidas. r corresponde ao coeficiente de Pearson ($r < 1$), $p > 0,05$ indicam que não há correlação significativa entre os efeitos.

A característica crucial de antioxidantes eficazes em suprimir a oxitose/ferroptose é a capacidade de tais compostos de competir com os lipídios das membranas na reação com os radicais peroxil já formados em ambientes de bicamada lipídica. Portanto, o ensaio do DPPH neste contexto não seria o mais apropriado, além disso, o ensaio do DPPH tem baixa correlação com a potência dos compostos inibidores da ferroptose (STOCKWELL, 2019), corroborando nossos resultados (Figura 21 A e Figuras 23 A, B e C). Além disso, de fato os resultados obtidos pelo ensaio do DPPH foram diferentes dos resultados com o ensaio anti-lipoperoxidativo, sendo que, este último representa um ensaio mais próximo das condições fisiológicas (Figura 21 A e B).

O ensaio anti-lipoperoxidativo realizado que mediu a capacidade antioxidante dos compostos em inibir a auto-oxidação dos fosfolipídios de membrana revelou que a Fer-1 apresentou uma maior capacidade em impedir a formação dos radicais peroxil em relação aos compostos fenólicos RC363, RC574 e o Trolox, os quais apresentaram uma ação anti-lipoperoxidativa semelhante (Figura 21 B). Porém não foi encontrada uma correlação significativa entre o efeito anti-lipoperoxidativo com a potência anti-ferroptótica desses compostos (Figuras 23 D, E e F).

Neste cenário Shah e colaboradores (2019) desenvolveram um ensaio *in vitro* que utiliza uma sistema de bicamada fosfolipídica mimetizando as membranas celulares para avaliar a atividade anti-lipoperoxidativa (antioxidante) de compostos com ação RTA. Este ensaio proporcionou uma melhor correlação entre a potência anti-ferroptótica dos compostos com ação RTA, como no caso da Fer-1, com a sua atividade anti-lipoperoxidativa (SHAH *et al.*, 2019). Dessa forma, foi demonstrado aqui juntamente com dados da literatura a importância de se buscar e realizar ensaios que mimetizem condições fisiologicamente relevantes que sejam capazes de melhor identificar e correlacionar o mecanismo de ação com a ação protetora, principalmente no cenário de compostos com potencial ação antioxidante e que apresentam efeito anti-ferroptótico (como no caso dos compostos fenólicos - RC363 e RC574 e aminas aromáticas - Fer-1).

Contudo, as análises de correlação, que foram realizadas neste estudo, a fim de detectar possíveis associações entre as eficácias anti-ferroptóticas em um contexto celular (IC_{50} derivado da Tabela 1) e os efeitos antioxidantes no meio livre de células (IC_{50} derivado da Tabela 2), apoiam a ideia que os efeitos anti-ferroptóticos observados pelos compostos RC363 e RC574 (Figura 16) estão relacionados a outros mecanismos além da ação antioxidante direta. A este respeito Bueno e colaboradores (2020) demonstraram a capacidade dos compostos

RC363 e RC574 em aumentar direta e indiretamente a atividade da enzima GPx1. Sendo assim, acreditamos que esses compostos possam também modular a atividade da GPx4 a selenoproteína mais importante no cenário da oxitose/ferroptose. A GPx4 assim como outras importantes proteínas envolvidas na oxitose/ferroptose como GCLm, GCLc, SLC7A11 e proteínas do metabolismo do ferro são reguladas pelo fator de transcrição Nrf2. Desta forma, o envolvimento do Nrf2 na morte ferroptótica vem ganhado destaque como um alvo para terapias anti-ferroptóticas (ABDALKADER *et al.*, 2018; ANANDHAN *et al.*; 2020). Portanto, sugere-se que o efeito protetor dos compostos RC363 e RC574 contra a oxitose/ferroptose poderia envolver a ativação do fator de transcrição Nrf2.

O presente estudo também demonstrou que os compostos RC363 e RC574 podem ser fortes candidatos a agentes anti-ferroptóticos, uma vez que apresentaram efeitos muito semelhante ao anti-ferroptótico clássico Fer-1, no modelo com células HT22 expostas aos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO e RSL3. A Fer-1, um dos primeiros inibidores de ferroptose relatados (DIXON *et al.*, 2012) exibe atividade de captura de radicais e assim inibe a peroxidação lipídica (SKOUTA *et al.*, 2014; MIOTTO *et al.*, 2020). Apesar de seus efeitos anti-ferroptóticos benéficos em modelos *in vitro*, a Fer-1 não é adequada para uso *in vivo* devido à sua baixa estabilidade metabólica (HOFMANS *et al.*, 2016). A este respeito, agentes anti-ferroptóticos adicionais, como a Lip-1, a qual possui atividade de captura de radicais semelhante a Fer-1 *in vitro* (ZILKA *et al.*, 2017) com boas propriedades ADME (Absorção/Distribuição/Metabolismo/Excreção) (FRIEDMANN ANGELI *et al.*, 2014), bem como análogos da Fer-1 foram estudados e propostos como melhores estratégias para neutralizar a oxitose/ferroptose *in vivo* (FRIEDMANN ANGELI *et al.*, 2014; HOFMANS *et al.*, 2016).

Neste cenário, considerando que o PB apresentou efeitos benéficos em modelos oxidativos *in vivo* (SANTOS *et al.*, 2012; COLLE *et al.*, 2013a; RIBEIRO *et al.*, 2012) e o seu derivado SUC apresenta boas propriedades de ADME *in vivo* já sendo utilizado em humanos (TARDIF *et al.*, 2008), acreditamos que nossos resultados são relevantes do ponto de vista farmacológico, pois trazem à tona dois novos compostos anti-ferroptóticos (igualmente eficientes em comparação com Fer-1 *in vitro*) com possíveis propriedades ADME melhores que a do PB. Nesse sentido estudos adicionais *in vivo* com modelos de oxitose/ferroptose seriam necessários afim de investigar o efeito anti-ferroptótico dos compostos RC363 e RC574 além de comprovar suas melhores propriedades ADME em relação ao PB e ao SUC. Parte dos

resultados apresentados no capítulo I foram publicados na revista Free Radical Research (ANEXO I)

5.2 CONCLUSÃO CAPÍTULO I

Este estudo demonstra que quando um nível significativo de peroxidação lipídica é estabelecido nas células a prevenção completa da oxitose/ferroptose não é viável, ao menos em um cenário *in vitro*. O presente estudo também apresenta dois novos derivados do probucol com notáveis propriedades protetoras contra três diferentes agentes ferroptóticos, introduzindo uma nova classe de compostos com potencial promissor para o desenvolvimento de novos fármacos candidatos ao tratamento das condições patológicas relacionadas à oxitose/ferroptose, como as doenças neurodegenerativas.

5.3 PERSPECTIVAS CAPÍTULO I

Os resultados do presente estudo indicam que além da atividade antioxidante direta dos compostos RC363 e RC574 o seu efeito anti-ferroptótico esteja relacionado a outros mecanismos de ação. Portanto, acreditamos que estes compostos possam modular direta e indiretamente a atividade da enzima GPx4. Dessa forma, visando um trabalho futuro, algumas análises podem ser realizadas a fim de investigar essa hipótese, tais como:

1. Avaliar a modulação direta da atividade da GPx4 pelos compostos RC363 e RC574 medindo a atividade da enzima GPx4 purificada e nas células HT22 na presença e ausência dos compostos.
2. Avaliar a possível ativação do fator de transcrição Nrf2 pelos compostos RC363 e RC574, através da imunocitoquímica na qual avalia-se a translocação do Nrf2 do citoplasma para o núcleo.
3. Avaliar a modulação indireta da atividade da GPx4 pelos compostos RC363 e RC574 através da análise do imunocontéudo da enzima GPx4 em células HT22 tratada com estes compostos, pela técnica de Western Blotting;

5.4 RESULTADOS CAPÍTULO II – INVESTIGAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE QUELANTES DE FERRO FRENTE A OXITOSE/ FERROPTOSE INDUZIDA PELO GLU, BSO E RSL3 EM CÉLULAS HT22.

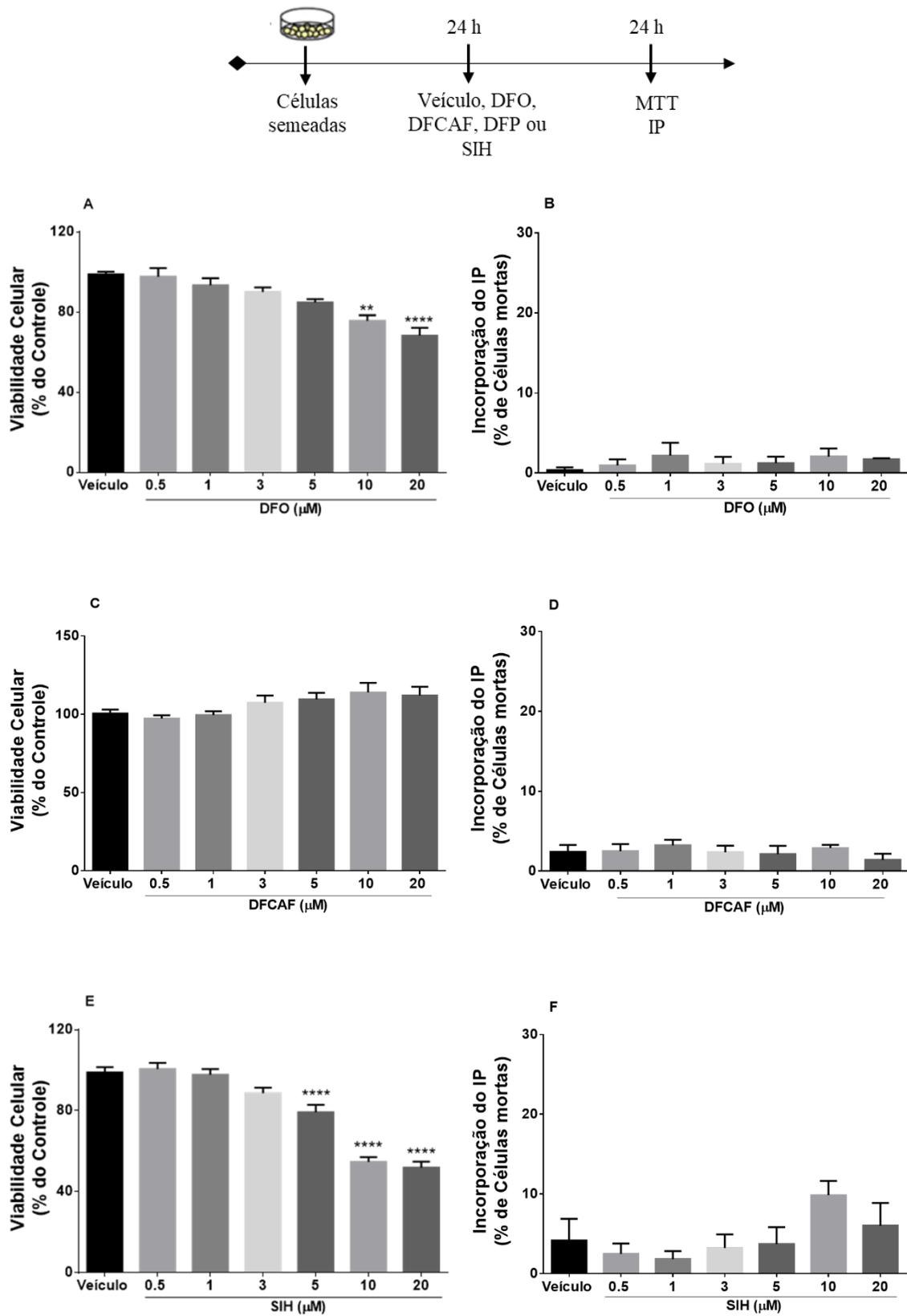
O objetivo desse capítulo foi investigar o efeito protetor de diferentes quelantes de ferro a DFO, DFCAF, SIH e DFP frente à citotoxicidade induzida pelos agentes pró-ferroptose Glu, BSO e RSL3. E investigar a mitigação pelos quelantes de ferro dos eventos deletérios como a depleção de GSH e produção de ER causados por esses agentes pró-ferroptose.

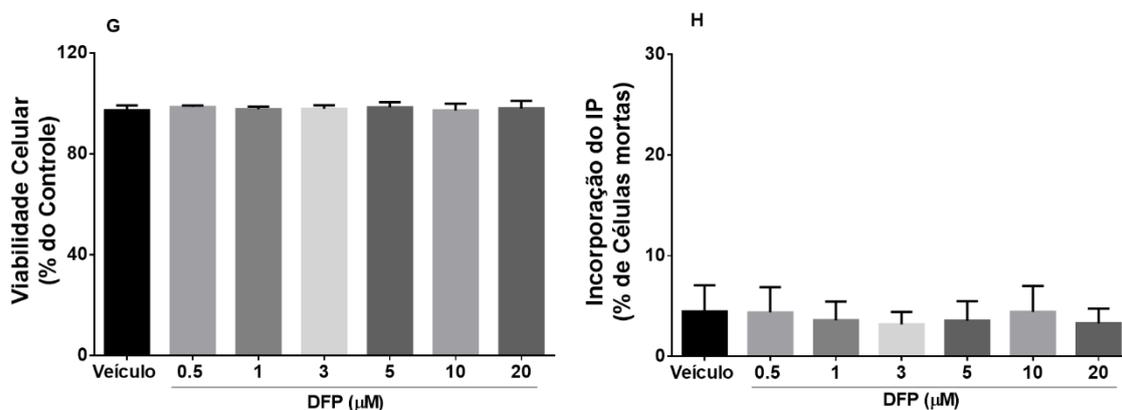
5.4.1 Toxicidade dos compostos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP em células HT22

Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade dos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP para as células HT22. Assim, as células foram expostas por 24 horas a concentrações crescentes (0,5 - 20 μ M) dos quelantes de ferro e, após 24 horas desta exposição, os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados.

Foi observado que após 24 horas de exposição, o quelante de ferro DFO reduziu significativamente a viabilidade celular a partir da concentração de 10 μ M (25%, $p \leq 0,01$; figura 24 A) e o quelante de ferro SIH a partir da concentração de 5 μ M (21%, $p \leq 0,01$; figura 24 E). Já os quelantes de ferro DFCAF e DFP não apresentaram efeitos tóxicos para as células nas concentrações aqui testadas (Figuras 24 C-D, G-H, respectivamente).

Figura 24 - Toxicidade dos compostos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP em células HT22.





As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05%) ou a concentrações crescentes (0,5 - 20 μM) de (A e B) DFO, (C e D) DFCAF (E e F) SIH ou (G e H) DFP. Após 24 horas de exposição os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Cada barra representa a média ± EPM de 3 - 4 experimentos independentes. ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

A partir dos resultados desses ensaios de citotoxicidade, foi observado que o tratamento com cada um dos quelantes de ferro nas concentrações de 0,5 e 3,0 μM não foi tóxico para as células. Portanto, a fim de avaliar uma possível ação protetora dos compostos DFO, DFCAF, SIH e DFP frente aos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO e RSL3 realizamos o tratamento das células HT22 com essas concentrações não tóxicas.

Dessa forma, as células foram expostas ao Glu (5 mM), ao BSO (25 μM) ou ao RSL3 (50 nM) durante 6 horas. Após as 6 horas de exposição aos agentes pró-ferroptose, as células foram tratadas com DFO, DFCAF, DFP ou SIH nas concentrações de 0,5 ou 3 μM e, depois de 24 horas de exposição aos agentes ferroptóticos, os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados.

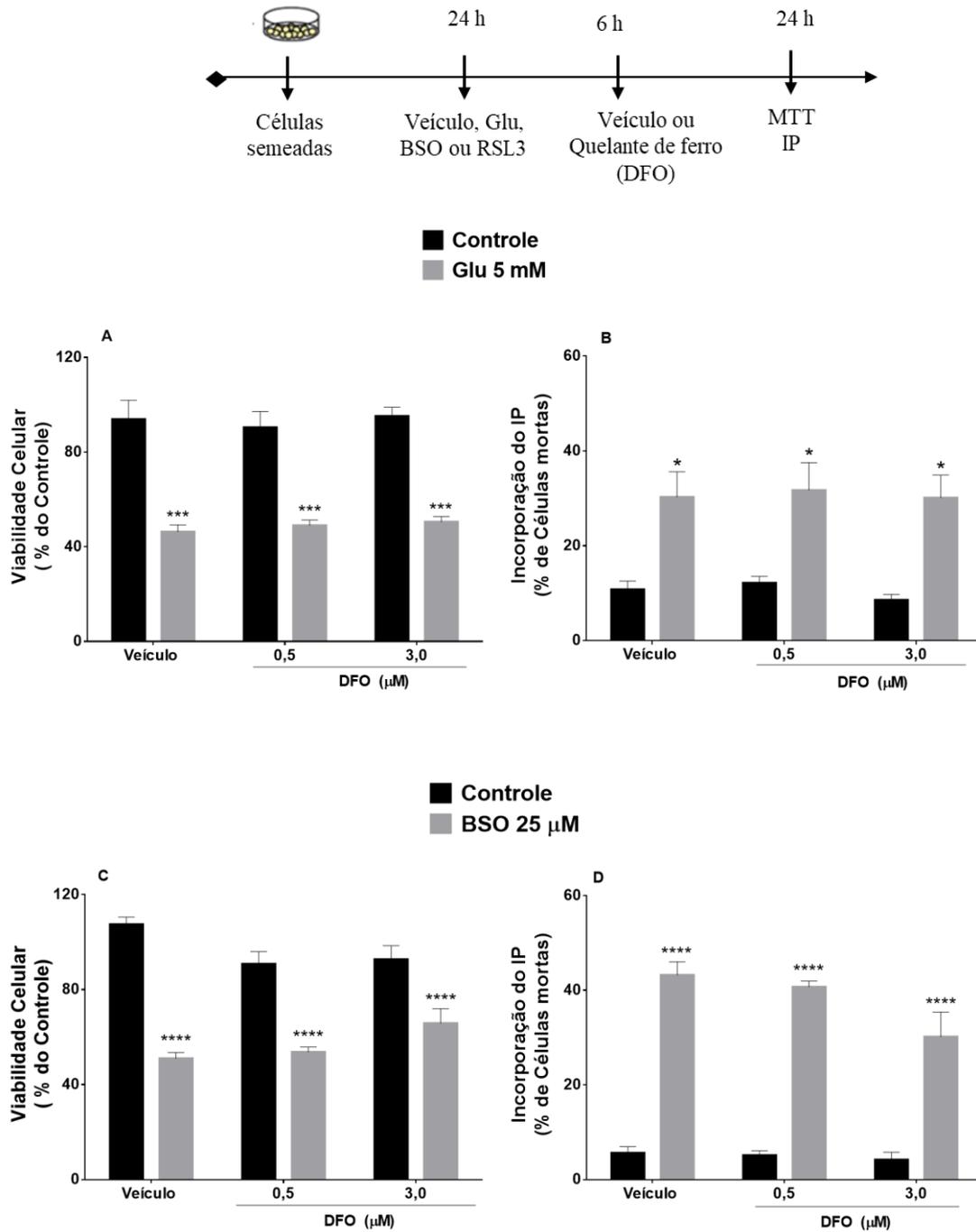
5.4.2 Efeito protetor da DFO frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22

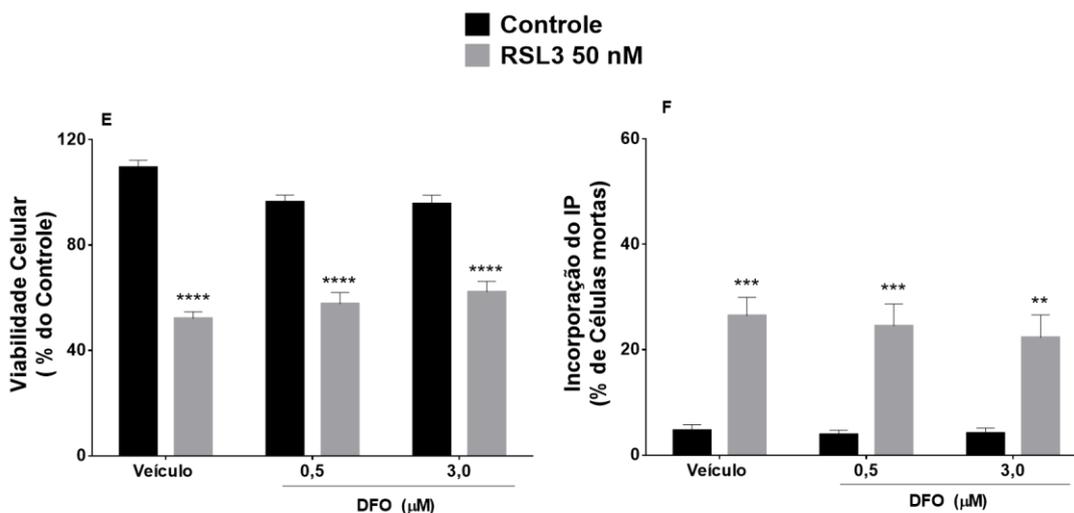
Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com ambas as concentrações de 0,5 e 3 μM do quelante de ferro DFO não protegeu as células HT22 da redução da viabilidade celular (54%; $p \leq 0,001$; figura 25 A) e da morte celular (30%; $p < 0,05$; figura 25 B) induzidos pela exposição ao Glu (Figuras 25 A - B, respectivamente). O tratamento com o quelante de ferro DFO (0,5 e 3 μM) também não apresentou efeito protetor frente a diminuição significativa

da viabilidade celular (49%, $p \leq 0,0001$; figura 25 C) e frente ao aumento significativo na incorporação do IP (43% $p \leq 0,0001$; figura 25 D) causados pelo BSO.

Por fim, o quelante de ferro DFO não reverteu a diminuição significativa da viabilidade celular (48% $p \leq 0,0001$; figura 25 E) e da morte celular (27%, $p \leq 0,001$; figura 25 F) induzidos pelo agente pró-ferroptose RSL3. Portanto, o quelante de ferro DFO não foi eficaz em proteger as células HT22 frente ao nosso modelo de oxitose/ferroptose induzido pelos diferentes agentes ferroptóticos.

Figura 25 - Efeito protetor da DFO frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.





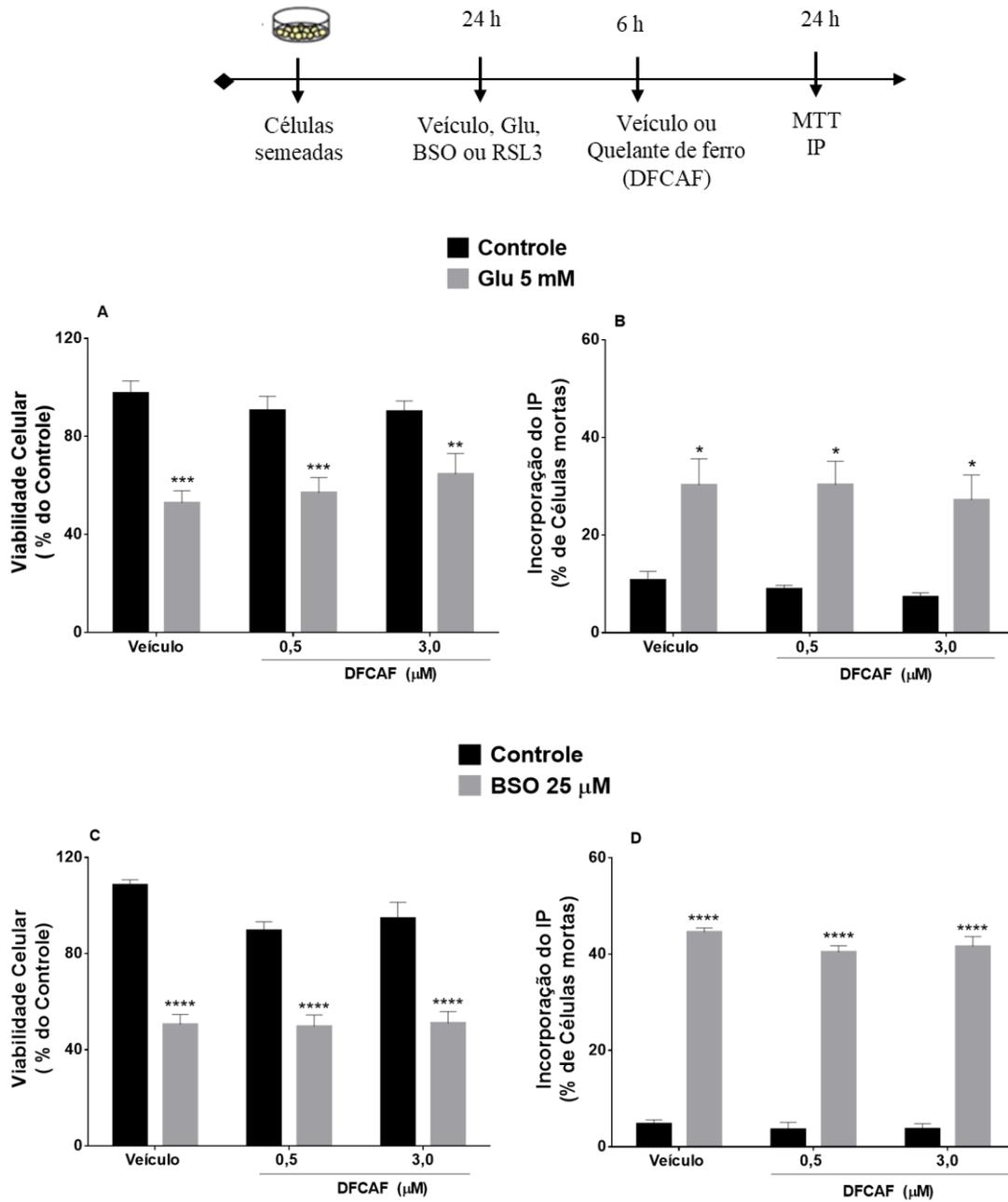
As células foram expostas ao veículo (PBS 0,01 M), à (A e B) 5 mM de Glu, (C-D) 25 μM de BSO e (E-F) veículo (DMSO 0,05 %) ou 50 nM de RSL3 por 6 horas e após esta exposição as células foram tratadas com DFO (0,5 e 3,0 μM). Após 24 horas de exposição aos indutores os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Cada barra representa a média ± EPM (n = 3 – 5). *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 e ****p ≤ 0,0001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

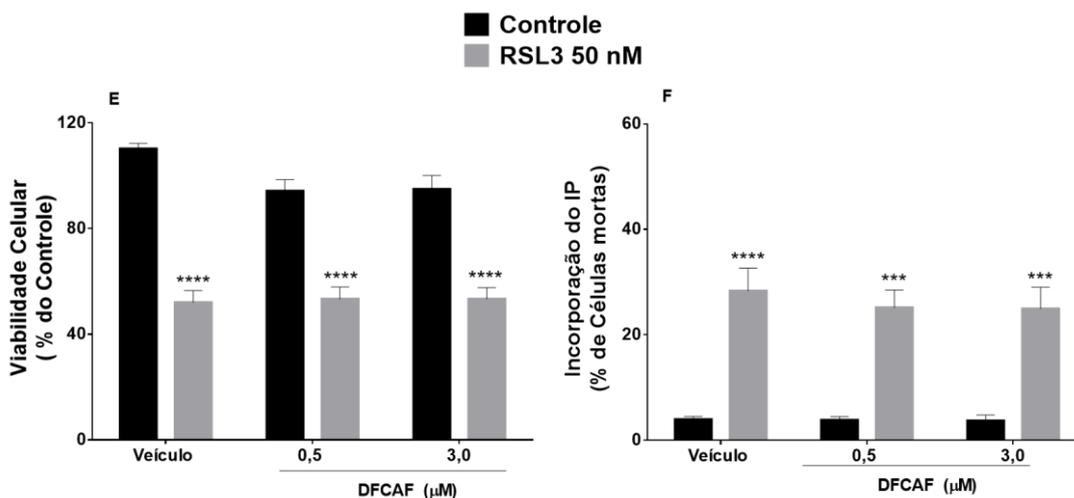
5.4.3 Efeito protetor da DFCAF frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22

O quelante de ferro DFCAF (0,5 e 3 μM) não protegeu as células HT22 da redução significativa da viabilidade celular (47%, p ≤ 0,001; figura 26 A), assim como, não reverteu o aumento significativo na incorporação do IP (30%, p ≤ 0,05; figura 26 B), causados pela exposição ao Glu. Também foi observado ausência de proteção pelo quelante de ferro DFCAF (0,5 e 3 μM) frente à diminuição significativa da viabilidade (49%, p ≤ 0,0001; figura 26 C) e a morte celular (45%, p ≤ 0,0001; figura 26 D) induzidos pelo agente pró-ferroptótico BSO (Figuras 26 C e D respectivamente).

E por fim, o tratamento com o quelante de ferro DFCAF (0,5 e 3 μM) não reverteu a redução significativa da viabilidade celular (48%, p ≤ 0,0001; figura 26 E) e o aumento significativo da incorporação do IP (28%, p ≤ 0,0001; figura 26 F) causados pelo indutor de oxitose/ferroptose RSL3. Sendo assim, o quelante de ferro DFCAF também não apresentou eficácia em proteger as células HT22 frente ao nosso modelo de oxitose/ferroptose induzido pelos diferentes agentes ferroptóticos.

Figura 26 - Efeito protetor da DFCAF frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.





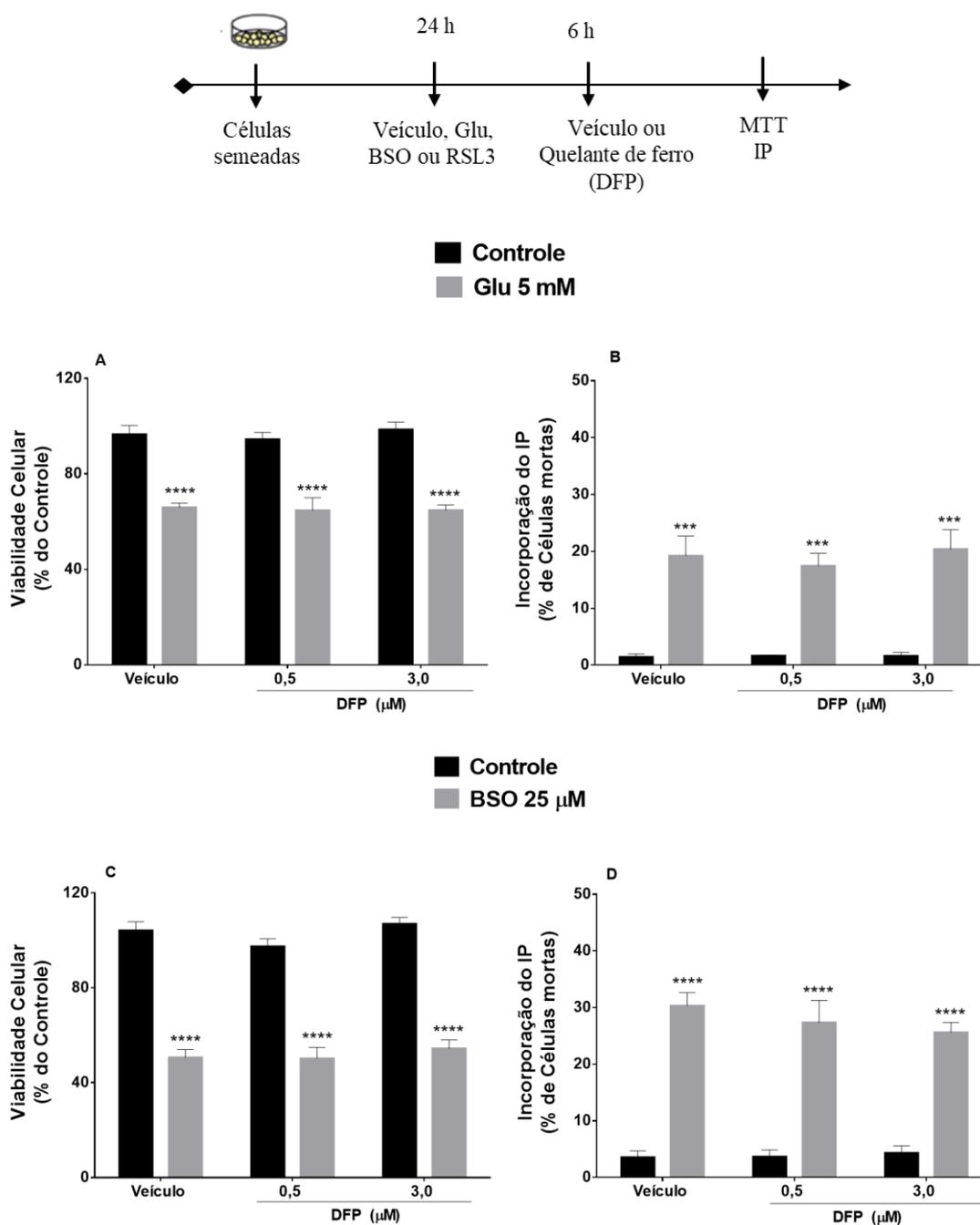
As células foram expostas ao veículo (PBS 0,01 M), à (A e B) 5 mM de Glu, (C-D) 25 μM de BSO e (E-F) veículo (DMSO 0,05 %) ou 50 nM de RSL3 por 6 horas e após esta exposição as células foram tratadas com DFCAF (0,5 e 3,0 μM). Após 24 horas de exposição aos indutores os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Cada barra representa a média ± EPM (n = 3 – 5). *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 e ****p ≤ 0,0001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

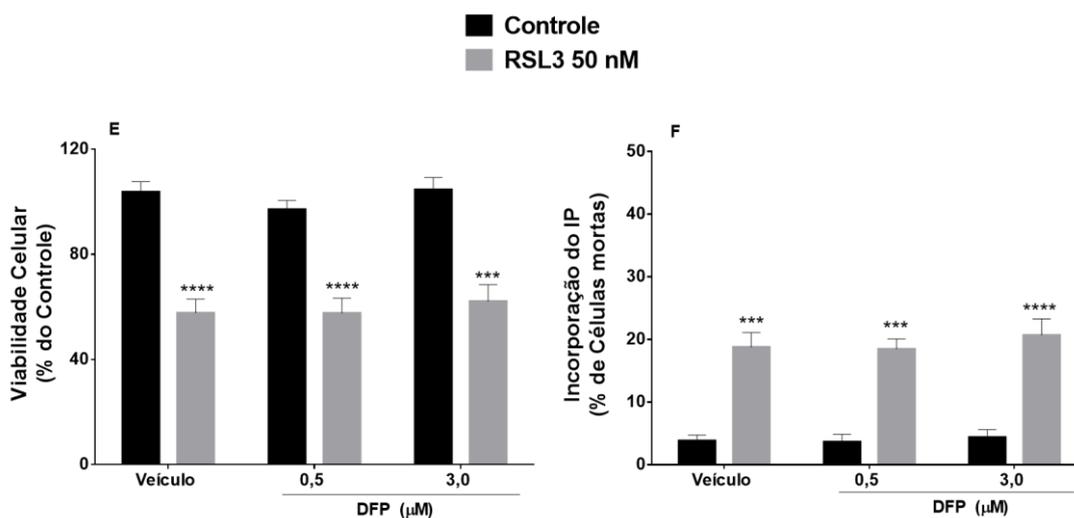
5.4.4 Avaliação do efeito protetor do DFP frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22

Com relação ao efeito protetor do quelante de ferro DFP nota-se a falta de reversão tanto da redução significativa da viabilidade celular (34% $p \leq 0,0001$; figura 27 A) quanto do aumento significativo da incorporação do IP (19%; $p \leq 0,001$; figura 27 B) induzidos pelo agente pró-ferroptose Glu. O quelante de ferro DFP também não protegeu as células frente a significativa diminuição da viabilidade celular (50%, $p \leq 0,0001$; figura 27 C) e do aumento significativo da incorporação do IP induzidos pela exposição ao BSO (30%, $p \leq 0,0001$; figura 27 D).

Da mesma forma, o composto DFP não teve efeito protetor frente a diminuição significativa da viabilidade celular (43%, $p \leq 0,0001$; figura 27 E) nem frente ao aumento significativo da incorporação do IP causados pelo RSL3 (18%, $p \leq 0,001$; figura 27 F). Portanto, o quelante de ferro DFP, como os demais quelantes DFO e DFCAF, não foi efetivo em proteger as células HT22 frente ao nosso modelo de oxitose/ferroptose induzido pelos diferentes agentes ferroptóticos.

Figura 27 - Avaliação do efeito protetor do DFP frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.





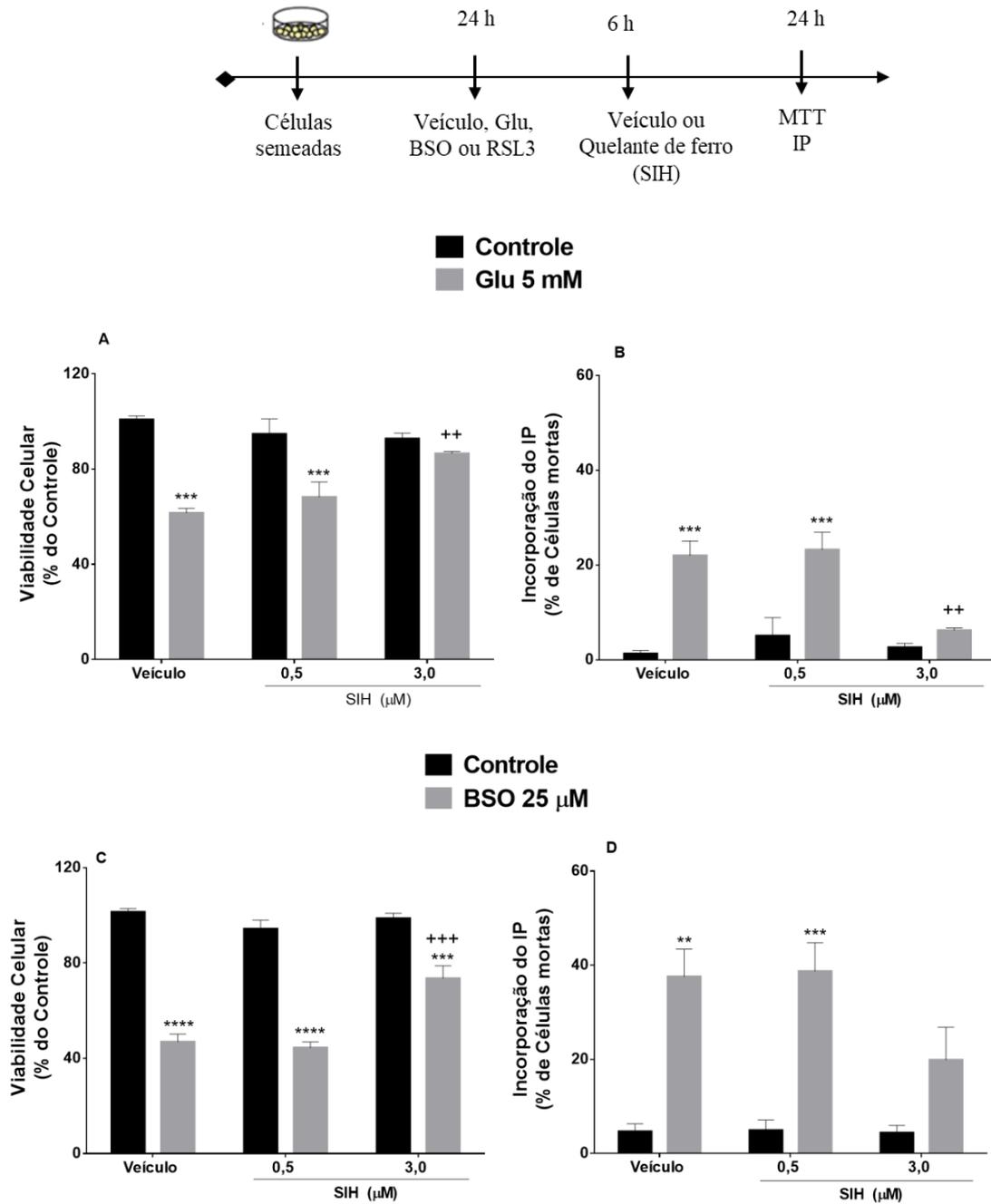
As células foram expostas ao veículo (PBS 0,01 M), à (A e B) 5 mM de Glu, (C-D) 25 μM de BSO e (E-F) veículo (DMSO 0,05 %) ou 50 nM de RSL3 por 6 horas e após esta exposição as células foram tratadas com DFP (0,5 e 3,0 μM). Após 24 horas de exposição aos indutores os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Cada barra representa a média \pm EPM ($n = 3 - 4$). *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

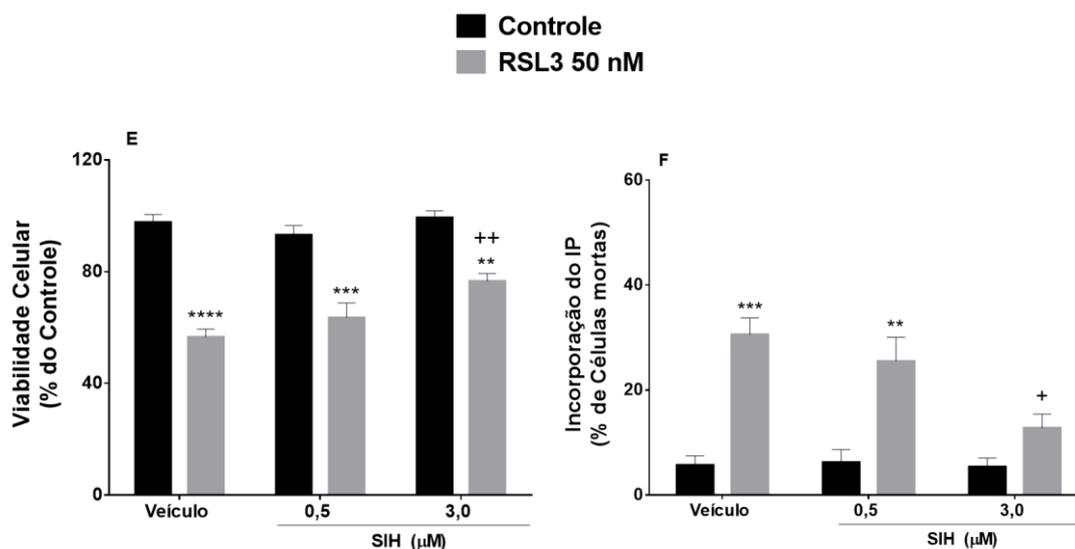
5.4.5 Avaliação do efeito protetor do SIH frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22

Por fim, ao avaliar o efeito protetor do quelante de ferro SIH foi observado que o tratamento com a concentração de 3 μM desse quelante reverteu totalmente tanto a diminuição significativa da viabilidade celular (38%, $p \leq 0,01$; figura 28 A) quanto o aumento significativo da incorporação do IP (22%; $p \leq 0,0001$; figura 28 B) induzidos pelo Glu (Figuras 28 A - B, respectivamente). Além disso, o tratamento com 3 μM do SIH reverteu parcialmente a redução da viabilidade (49%, $p \leq 0,0001$; figura 28 C) e a morte celular (37%, $p \leq 0,01$; figura 28 D) causados pela exposição ao BSO (Figuras 28 C - D respectivamente).

Também foi observado que o tratamento com o SIH na concentração de 3 μM , apesar de reverter parcialmente a redução da viabilidade celular (43%, $p \leq 0,001$; figura 28 E) protegeu da morte celular (30%, $p \leq 0,001$; figura 28 F) causada pela exposição ao RSL3 (Figuras 28 E - F, respectivamente). Dessa maneira, o quelante de ferro SIH foi de forma geral, mesmo que de maneira parcial, efetivo na proteção das células HT22 frente aos diferentes indutores de oxitose/ferroptose.

Figura 28 - Avaliação do efeito protetor do SIH frente aos indutores de oxitose/ferroptose em células HT22.





As células foram expostas ao veículo (PBS 0,01 M), à (A e B) Glu 5 mM, (C-D) BSO 25 μM e (E-F) veículo (DMSO 0,05 %) RSL3 50 nM por 6 horas e após esta exposição as células foram tratadas com SIH (0,5 e 3,0 μM). Após 24 horas de exposição aos indutores os ensaios de viabilidade e morte celular foram realizados. Cada barra representa a média ± EPM (n = 3 – 4). **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 e ****p ≤ 0,0001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey). ++ p ≤ 0,01 indicam diferença quando comparados ao grupo Glu 5 mM (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey). +++ p ≤ 0,001 indicam diferença quando comparados ao grupo BSO 25 μM (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey) + p ≤ 0,05; ++ p ≤ 0,01 indicam diferença quando comparados ao grupo RSL3 50 nM (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

De maneira geral o íon ferro é um elemento fundamental para a vida do ser humano, sendo essencial no metabolismo energético celular e no transporte de oxigênio. Entretanto, é altamente reativo e danoso ao organismo quando se encontra na forma livre. Portanto, muitos mecanismos contribuem para manter a homeostase do ferro, com várias proteínas envolvidas na absorção, armazenamento e reciclagem de ferro. Porém, até agora, não há descrição dos mecanismos fisiológicos de excreção de ferro (CANÇADO, 2007; CRICHTON *et al.*, 2019). Ou seja, o organismo humano fisiologicamente, não é capaz de aumentar a eliminação de ferro, mesmo em condições de sobrecarga deste metal. Sendo assim, o aumento progressivo do aporte de ferro, que ocorre seja pela absorção intestinal ou por via parenteral (proveniente de transfusão de hemácias, por exemplo) leva à condição patológica de SF (CANÇADO, 2007).

A SF é uma importante consequência que acomete pacientes que necessitam de transfusão de hemácias decorrente de patologias hematológicas como os casos de talassemias, anemia falciforme, síndrome mielodisplásica, entre outras doenças. O acúmulo de ferro no músculo cardíaco é a principal causa de morte em pacientes com SF (CANÇADO, 2007). Considerando que quanto maior o acúmulo de ferro maiores são os riscos de morbidade e

mortalidade, a quelação de ferro torna-se indispensável para a sobrevivência de pacientes dependentes de transfusão de hemácias. E a terapia com quelantes de ferro apresentou uma nítida correlação favorável com a qualidade de vida e sobrevivência desses pacientes (CANÇADO, 2007).

Devido à estreita ligação entre a anemia com o metabolismo do ferro esse último sempre foi de interesse principalmente em relação às patologias hematológicas. Entretanto, recentemente com a descrição da oxitose/ferroptose, como uma morte celular caracterizada pela peroxidação lipídica dependente de ferro, a importância do ferro em distúrbios não hematológicos tem ganhado destaque (DIXON *et al.*, 2012). Assim tem-se proposto o ferro como um alvo terapêutico para várias condições patológicas (DEVOS *et al.*, 2014; DO VAN *et al.*, 2016; NÚÑEZ E CHANA-CUEVAS, 2018; CRICHTON *et al.*, 2019).

Atualmente vem sendo evidenciado o papel crítico do acúmulo de ferro e consequentemente da oxitose/ferroptose em doenças cardiovasculares (DCVs) como cardiomiopatia, infarto do miocárdio (IM), lesão por isquemia/reperfusão (LIR) e insuficiência cardíaca (IC) (FANG *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2021). Além disso, o envelhecimento leva ao aumento do teor de ferro no cérebro e o seu acúmulo já foi demonstrado como sendo uma característica comum de uma série de doenças neurodegenerativas que inclui a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, ataxia de Friedreich, neuroferritinopatia e esclerose lateral amiotrófica (NÚÑEZ *et al.*, 2012; CRICHTON *et al.*, 2019).

Sabe-se que o ferro está ligado a proteínas de transporte de ferro, a transferrina e de armazenamento de ferro, a ferritina e, portanto, normalmente não é reativo. Porém sob certas condições não fisiológicas, tais como durante as lesões por isquemia/reperfusão, são geradas ERO como superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e H_2O_2 que liberam o ferro dessas proteínas (SIMUNEK *et al.*, 2005). A liberação do íon ferroso (Fe^{2+}) das moléculas de ferritina no citoplasma celular leva à conversão citosólica deste íon em ferro férrico (Fe^{3+}) através da reação de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO^{\cdot}$) com a formação do radical hidroxila (OH^{\cdot}) tóxico e assim propagando e aumentando os danos celulares pelas ERO (SIMUNEK *et al.*, 2005).

A depleção de GSH leva ao prejuízo das defesas antioxidantes causando o aumento de ERO (YANG *et al.*, 2014), que por sua vez, podem oxidar a ferritina citoplasmática liberando o ferro ferroso (Fe^{2+}) (SIMUNEK *et al.*, 2005). Além disso, com a depleção da GSH a GPx4 é inibida causando um aumento das ER lipídicas. O Fe^{2+} pode reagir com os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) gerados pela inibição da enzima GPx4, produzindo o radical

alcoxil lipídico (LO•) levando a peroxidação lipídica que causa danos aos lipídios das membranas biológicas, acarretando morte celular ferroptótica (FORCINA E DIXON, 2019). A proteção por quelantes de ferro contra a oxitose/ferroptose destacou o importante envolvimento do ferro neste tipo de morte celular (YANG E STOCKWELL, 2008; DIXON et al., 2012).

Dixon e colaboradores (2012) demonstraram que o co-tratamento com o quelante de ferro DFO (100 μM) bloqueou a morte ferroptótica e o aumento tempo dependente das ER citosólicas e lipídicas induzido pela erastina em células de fibrosarcoma humano (HT-1080) (DIXON et al., 2012). Jelinek e colaboradores (2018) mostraram que o pós-tratamento com a DFO (10 μM) protegeu as células HT22 e as células MEF (fibroblastos embrionários de camundongos) da ferroptose induzida pelo RSL3. Além disso, o co-tratamento com a DFO (10 μM) preveniu o aumento das ER lipídicas induzido pelo RSL3 nessas duas linhagens celulares (JELINEK *et al.*, 2018).

Entretanto, no presente estudo a DFO além de não proteger as células HT22 frente ao nosso modelo de oxitose/ferroptose induzido pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 (Figuras 25 A-F) também foi citotóxica para as células HT22 em concentrações mais elevadas (Figura 24 A-B). Além disso, a DFO apesar de ser um efetivo quelante de ferro usado no tratamento de doenças que envolvem a SF, por ser um quelante de ferro hidrossolúvel apresenta uma limitada permeabilidade celular e, portanto, sua utilização para o tratamento de SF em tecidos como o cérebro não é viável (CANÇADO, 2007, ALTA *et al.*, 2014).

Neste cenário foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa do professor Breno Pannia Espósito a DFCAF, um derivado da DFO, que apresentou capacidade de quelar o ferro assim como propriedades antioxidantes semelhantes a da DFO, além de uma maior permeabilidade celular em um modelo com as células de tumor cervical (HeLa) (ALTA *et al.*, 2014). Porém, nossos resultados com o quelante de ferro DFCAF demonstraram que, apesar da falta de citotoxicidade (Figuras 24 C-D), ele não foi efetivo em proteger as células HT22 do nosso modelo de oxitose/ferroptose causada pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 (Figuras 26 A-F), mesmo possuindo maior permeabilidade celular que a DFO (ALTA *et al.*, 2014).

Contudo, sugere-se que moléculas lipofílicas de menor peso molecular como a DFP apresentam uma maior capacidade de penetrar no interior das células e assim mobilizar o ferro livre intracelular de modo mais eficiente que a DFO. Uma vez que, por ser uma molécula hidrofílica e de alto peso molecular a capacidade de quelação de ferro da DFO se limita ao espaço extracelular (CANÇADO, 2007).

Em um estudo com as células LUHMES, a oxitose/ferroptose induzida pela erastina e pelo Glu foi protegida pelo pré-tratamento com a DFP (100 μM). O co-tratamento com a DFP também reduziu a geração de ER citosólicas e a peroxidação lipídica induzidos pela erastina (DO VAN *et al.*, 2016). Porém, nosso estudo demonstrou que o quelante de ferro DFP apesar de não apresentar citotoxicidade para as células HT22 (Figuras 24 G-H) também não protegeu essas células frente a oxitose/ferroptose induzida pelo Glu, BSO e RSL3 (Figuras 27 A-F), assim como a DFO (Figuras 25 A-F) e a DFCAF (Figuras 25 A-F). Por outro lado, nosso estudo mostrou que o SIH, apesar de apresentar maior citotoxicidade para as células HT22 em relação aos demais quelantes (DFO, DFCAF e DFP) (Figuras 24 E-F), foi o único que possuiu efeito protetor frente aos indutores de oxitose/ferroptose Glu, BSO e RSL3 (Figuras 28 A-F).

O presente estudo corrobora o estudo de Simunek e colaboradores (2005), no qual tanto o SIH quanto a DFO impediram a perda do potencial de membrana induzida pelo H_2O_2 em células H9c2, porém o SIH apresentou uma potência muito maior do que a DFO (EC50: 0,8 μM para o SIH e EC50: 1300 μM para a DFO). Além disso, ao contrário do SIH, a pré-incubação por 1 hora com o quelante DFO antes da exposição ao H_2O_2 foi necessária para sua ação citoprotetora (SIMUNEK *et al.*, 2005).

Nossos resultados também reforçam o que foi demonstrado no estudo de Bendova e colaboradores, 2010, no qual o quelante de ferro SIH também apresentou maior citotoxicidade em relação aos demais quelantes de ferro (DFO e DPF) porém, a proteção do co-tratamento com o SIH (100 μM) frente à citotoxicidade induzida pelo tBuOOH em células H9c2 foi superior a dos quelantes de ferro lipofílicos, DPF (100 μM) e DFX (100 μM), enquanto que o quelante de ferro DFO (100 μM), mais hidrossolúvel, não teve efeito protetor (BENDOVA *et al.*, 2010).

Também no estudo de Dixon e colaboradores (2012) o quelante de ferro ciclopiroxolamina (CPX, 5 μM) permeável a membrana protegeu as células HT-1080 da ferroptose induzida pela erastina e pelo RSL3 sendo mais potente que o quelante de ferro DFO (100 μM) (DIXON *et al.*, 2012). Dessa forma, nosso estudo, juntamente com os dados da literatura, demonstram a relevância da permeabilidade celular para a potência da ação protetora dos quelantes de ferro em relação a sua afinidade pelo ferro.

Além disso Dixon e colaboradores (2012) usando um modelo de cultura com fatias organotípicas do hipocampo de ratos, que se assemelha ao hipocampo *in vivo*, uma vez que preserva a integridade dos neurônios, as conexões tanto inibitórias quanto excitatórias, e seus suportes celulares, incluindo astrócitos e microglia, a coincubação dessas fatias com Glu (5

mM) a Fer-1 (2 μ M) ou o quelante de ferro CPX (5 μ M) atenuaram a morte celular induzida pelo Glu (DIXON *et al.*, 2012). Dessa forma, demonstrando que tanto a ação de antioxidantes como a Fer-1 como a quelação de ferro são igualmente relevantes para a proteção contra a oxitose/ferroptose.

No presente trabalho o quelante de ferro lipofílico SIH foi efetivo em proteger a célula HT22 frente à oxitose/ferroptose induzida pelos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 após 6 horas do insulto com esses agentes (Figuras 27 A, B, C, D, E e F). Dixon e colaboradores também demonstraram que o quelante de ferro permeável à membrana 2,2-bipiridil e o Trolox foram adicionados às células HT-1080 até 6 horas após a erastina e ainda conferiram proteção contra a morte ferroptótica (DIXON *et al.*, 2012). Portanto, o efeito protetor dos quelantes de ferro provavelmente está relacionado com sua capacidade de impedir a propagação da geração de ER dependentes do ferro que deve ser mais intensa após 6 horas do insulto.

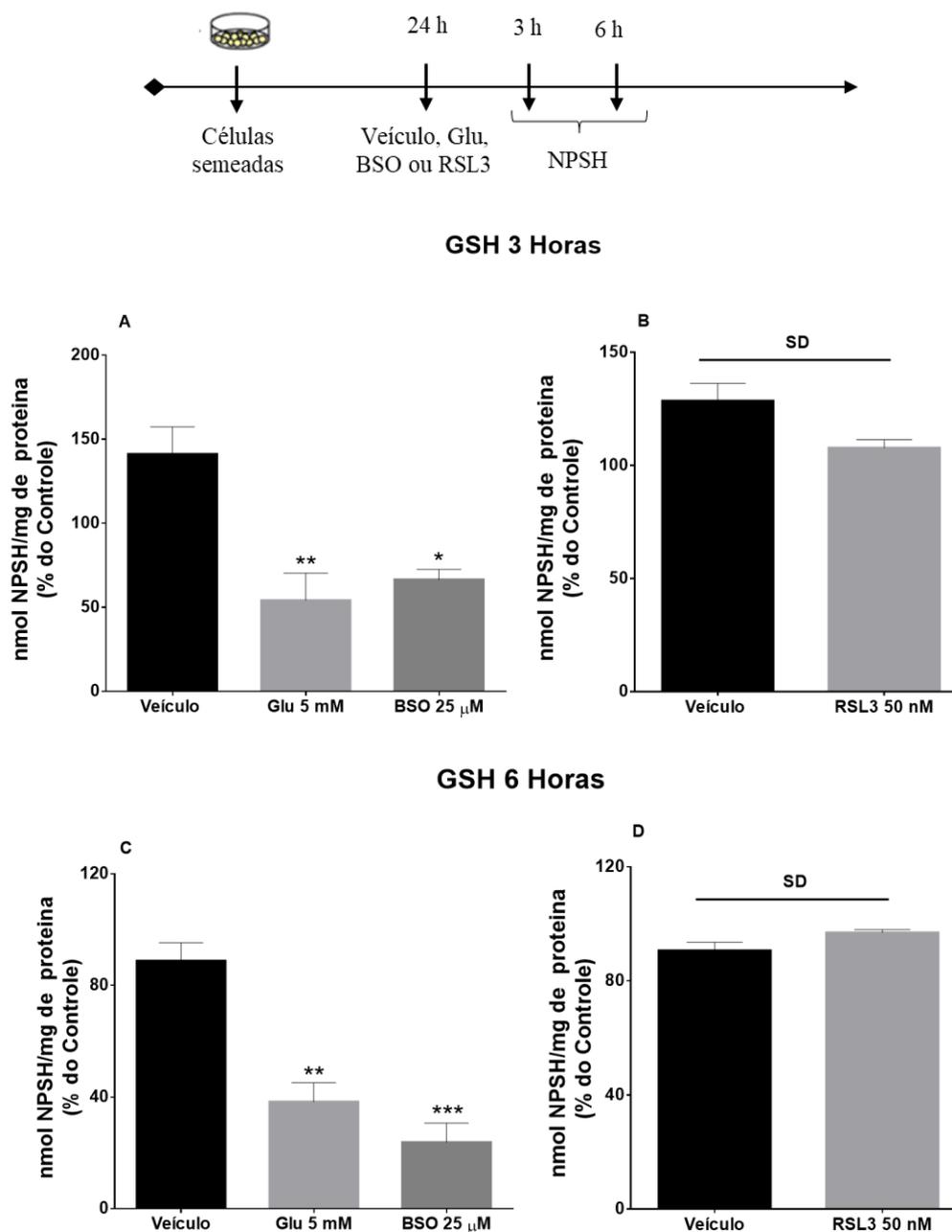
De maneira geral nossos resultados assim como algumas evidências da literatura indicam que quelantes de ferro lipofílicos possuem uma ação protetora mais eficaz e eficiente em relação aos quelantes mais polares frente a morte ferroptótica. Sugerindo que esses quelantes lipofílicos, por apresentarem uma maior capacidade de penetrar as células, poderiam agir bloqueando a geração de ER intracelulares dependentes de ferro que desencadeia a morte ferroptótica. Nesse contexto, foi avaliado primeiramente se os compostos pró-ferroptose Glu, BSO e RSL3 induzem a depleção de GSH e aumento das ER. Após foi investigado se o quelante de ferro SIH mitigaria esses eventos, procurando entender se a reversão desses eventos pelo SIH estaria envolvida no seu efeito protetor.

5.4.6 Efeito temporal dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a concentração de GSH em célula HT22

O efeito temporal dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a concentração de GSH das células HT22 foi avaliado. As células foram expostas por 3 e 6 horas ao Glu (5 mM) ao BSO (25 μ M) ou ao RSL3 (50 nM) e após cada período foi realizado o ensaio do NPSH. A exposição ao Glu por 3 horas causou uma redução significativa de 46% na concentração de GSH (Figura 29 A) e de 70% após 6 horas de exposição (Figura 29 C). O BSO reduziu de maneira significativa em torno de 34% a GSH intracelular após 3 horas de exposição (Figura 29 A). Após 6 horas de exposição, o BSO reduziu significativamente a concentração de GSH em 80% (Figura 29 D).

A exposição por 3 e 6 horas ao RSL3 não alterou a concentração de GSH das células HT22 (Figuras 29 B e D).

Figura 29 - Efeito temporal dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a concentração de GSH em célula HT22.

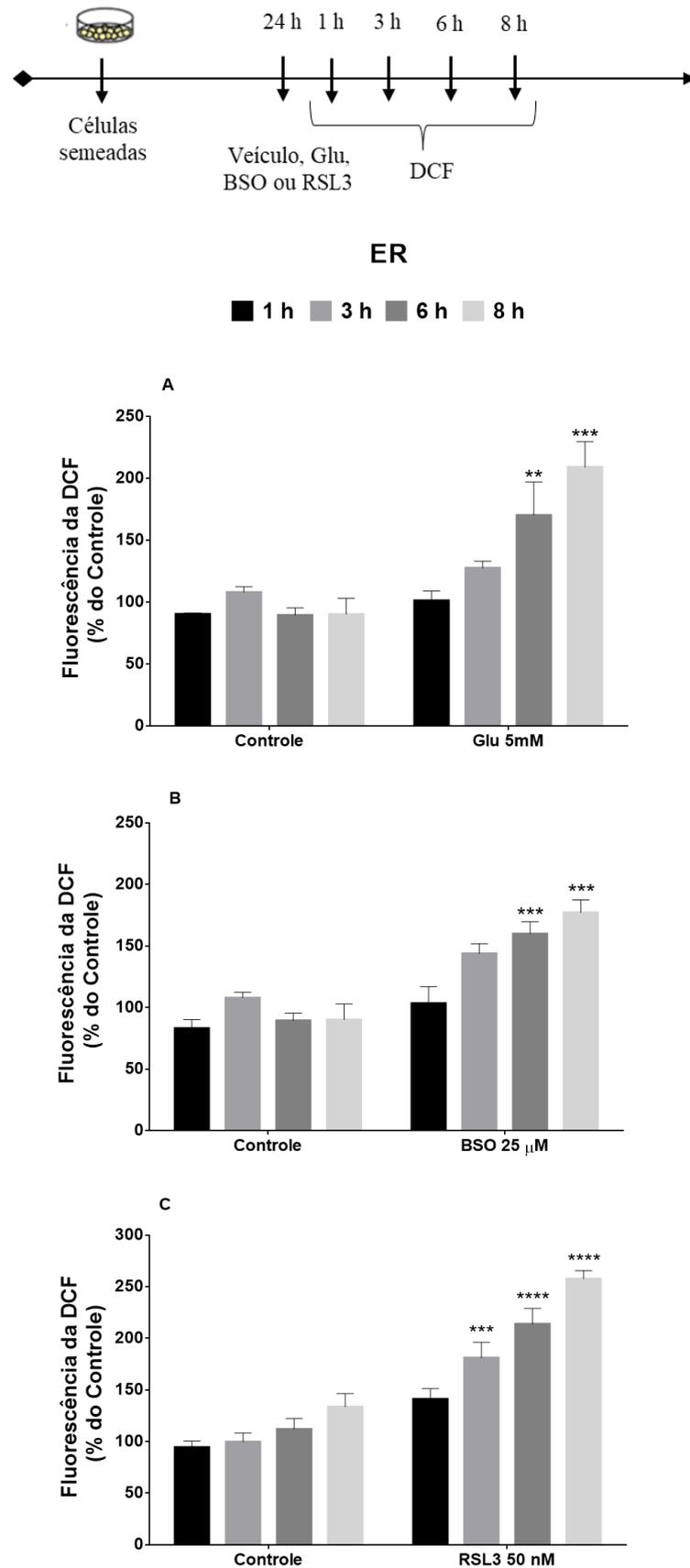


As células foram expostas (A e C) ao veículo PBS 0,01 M), ao Glu (5 mM) ou ao BSO (25 µM) e (B e D) ao veículo DMSO 0,05 % ou ao RSL3 (50 nM) por 3 ou 6 horas. Após os períodos de exposição aos indutores, o ensaio do NPSH foi realizado e expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100 %). Os dados representam a média ± EPM (n = 3 - 4). (A e C) * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ indicam diferença quando comparados ao grupo veículo (PBS 0,01 M) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* Tukey). (B e D) Não foi encontrada diferença significativa (SD) entres os grupos veículo (DMSO 0,05 %) e RSL3 após o teste t não paramétrico.

5.4.7 Efeito temporal dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a geração de ER em célula HT22

Em seguida o efeito temporal dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a geração de ER foi avaliado. As células HT22 foram expostas por 1, 3, 6 e 8 horas ao Glu (5 mM) ao BSO (25 μ M) ou ao RSL3 (50 nM) e após cada período foi realizado o ensaio da DCF. A exposição ao Glu, a partir de 6 horas, causou um aumento significativo de 70% na geração de ER e de 100% após 8 horas de exposição (Figura 30 A). O BSO aumentou significativamente as ER em torno de 60 e 80 % após a exposição por 6 e 8 horas, respectivamente (Figura 30 B). A exposição por 3, 6 e 8 horas ao RSL3 levou ao aumento significativo das ER em torno de 80, 113 e 160%, respectivamente (Figura 30 C).

Figura 30 - Efeito temporal dos indutores de oxitose/ferroptose sobre a geração de ER em célula HT22.



As células foram expostas (A e B) ao veículo PBS 0,01 M, ao (A) Glu (5 mM) ou ao (B) BSO (25 μ M) e (C) ao veículo DMSO 0,05 % ou ao RSL3 (50 nM) por 1, 3, 6 e 8 horas. Após os períodos de exposição aos indutores o ensaio da DCF foi realizado e expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100 %). Os dados representam a média \pm EPM (n = 3 - 4). ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo veículo do respectivo tempo (ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

O ferro é um cofator necessário em muitos processos metabólicos no sistema nervoso central (SNC), incluindo a fosforilação oxidativa, síntese de mielina, produção de neurotransmissores e o transporte de oxigênio. Portanto, é essencial que o fluxo e armazenamento de ferro no cérebro sejam controlados a fim de manter os suprimentos adequados de ferro para esses processos metabólicos, evitando o seu acúmulo que pode levar a danos oxidativos via reação química de Fenton (CRICHTON, DEXTER E WARD, 2011).

Estudos através de imagens por ressonância magnética foram capazes de detectar o acúmulo de ferro em pacientes com doenças neurodegenerativas, demonstrando que há uma desregulação na homeostase do ferro nessas doenças (RAVEN *et al.*, 2013; DEVOS *et al.*, 2014; CRICHTON *et al.*, 2019). Além disso, os primeiros estudos post-mortem revelaram níveis reduzidos de GSH no cérebro de pacientes com a DP (NÚÑEZ *et al.*, 2012). Esses achados indicaram que assim como o acúmulo de ferro, a depleção de GSH pode desempenhar um importante papel no processo neurodegenerativo. Mas ainda não se sabia qual poderia ser a relação entre a depleção de GSH e a presença do ferro na morte dos neurônios acometidos pelas doenças neurodegenerativas.

Contudo no estudo de Pamela Maher (2018) foi observado que o ferro em concentrações baixas (2,5 – 10 μ M) e não tóxicas potencializou somente a citotoxicidade de compostos que depletam a GSH das células, como o Glu, a sulfosalazina e a erastina que bloqueiam o sistema x_c^- , bem como BSO, que bloqueia a síntese de GSH por inibir a GCL em células HT22. Assim, essas observações sugerem que o ferro pode aumentar especificamente a morte celular em condições em que as concentrações de GSH são reduzidas (MAHER, 2018). Corroborando os eventos relacionados com a oxitose/ferroptose, na qual também é evidenciado que a depleção de GSH leva ao aumento de ERO, as quais podem mobilizar o ferro intracelular. A presença do ferro livre, por sua vez potencializa a geração das ERO, bem como as ER lipídicas acarretando na morte celular (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001; SIMUNEK *et al.*, 2005, DIXON *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014, FORCINA E DIXON, 2019; MAHER, CURRAIS, SCHUBERT, 2020).

O presente estudo demonstrou que os compostos ferroptóticos Glu e BSO, em 3 horas, depletaram a GSH tendo um efeito mais significativo após 6 horas de exposição (Figuras 29 A e C) e como consequência aumentaram as ER citosólicas das células HT22 de maneira tempo dependente a partir de 6 horas (Figuras 30 A e B). Corroborando Tan, Schubert e Maher, 2001 os quais descreveram que o Glu em 6 horas depleta 80% da GSH e a partir das 6 horas de exposição ao Glu ocorre um aumento exponencial de ER (TAN, SCHUBERT E MAHER, 2001; MAHER, CURRAIS, SCHUBERT, 2020). O agente ferroptótico RSL3 não alterou a concentração de GSH das células HT22 (Figuras 29 B e D), corroborando o estudo de Yang e colaboradores (2014) o qual mostrou que o composto RSL3 não altera a concentração intracelular de GSH, porém sua ação envolve a inibição específica da enzima GPx4. Pelo fato do composto RSL3 inibir diretamente a enzima GPx4 sem a necessidade de depletar a GSH, diferente dos demais compostos Glu e BSO, 3 horas de exposição ao RSL3 já leva ao aumento das ER (Figuras 30 C).

A GSH é um tripeptídeo formado pelos resíduos dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, sendo conhecida como o antioxidante de baixo peso molecular mais importante e abundante presente no interior das células. Este tripeptídeo encontra-se não somente no citosol, mas também no núcleo e nas mitocôndrias, em concentrações de milimolares (1 a 10 mM), onde desempenha suas funções, principalmente como um agente antioxidante (ESPINOSA-DIEZ *et al.*, 2015; MAZZETTI *et al.*, 2015; FARINA E ASCHNER, 2019). No cérebro a concentração de glutatona é de aproximadamente 1 a 2 mM, sendo encontrada principalmente na sua forma reduzida (GSH) e, apenas em torno de 1 %, na forma oxidada (GSSG) (COOPER *et al.*, 1980, MAZZETTI *et al.*, 2015).

A concentração intracelular de GSH é responsiva a fatores ambientais (externos) como, estímulos físicos (temperatura, radiações), metais pesados, glicose, xenobióticos assim como a estímulos produzidos no interior das células como, aumento de ER (MAZZETTI *et al.*, 2015). Estes fatores podem alterar as concentrações intracelulares de GSH e, dessa forma, prejudicar a homeostase redox celular que é essencial para a manutenção de importantes funções celulares como a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência (SIES, 2017). Em vista disso, a GSH tem papel de destaque na manutenção do estado redox celular e consequentemente para a sobrevivência celular. Neste contexto, durante o metabolismo celular o processo de respiração aeróbica que ocorre nas mitocôndrias permite a geração de ATP, mas também resulta na produção de ERO. Dentre estas ERO o H₂O₂ se destaca devido ao seu papel na sinalização redox que envolve o eustresse e o distresse oxidativo (SIES, 2017).

O eustresse oxidativo compreende as respostas fisiológicas (proliferação, diferenciação e sobrevivência) ou adaptativas (ativação das vias Keap1/Nrf2 ou NF- κ B) desencadeadas por concentrações intracelulares baixas do H₂O₂ (1–10 nM) ou mais altas (até 100 nM), respectivamente. Por outro lado, concentrações supra-fisiológicas de H₂O₂ (> 100 nM) levam ao distresse oxidativo, o qual é responsável por danos em biomoléculas, respostas inflamatórias, interrupção do crescimento celular e morte celular por vários mecanismos (SIES, 2017). Ou seja, as ERO por um lado são necessárias para uma variedade de processos biológicos normais (eustresse); contudo, seu excesso têm sido associado a degeneração de tecidos e morte celular (distresse) (SIES, 2017).

Portanto, para manter o equilíbrio redox celular evitando o distresse oxidativo as células possuem sistemas de defesas antioxidantes altamente complexos, entre os quais o sistema dependente da GSH prevalece (SEILER et al., 2008). Este sistema envolve a atividade das GPx as quais são enzimas altamente conservadas evolutivamente que usam GSH como cofator para reduzir peróxidos (por exemplo, R-OOH) em seus álcoois correspondentes (R-OH), limitando assim a formação de radicais tóxicos (por exemplo, R-O•) dependente de metal de transição (por exemplo, F²⁺) e assim evitando a morte por oxitose/ferroptose (BRIGELIUS-FLOHÉ E MAIORINO, 2013, ESPINOSA-DIEZ *et al.*, 2015, FORCINA E DIXON, 2019).

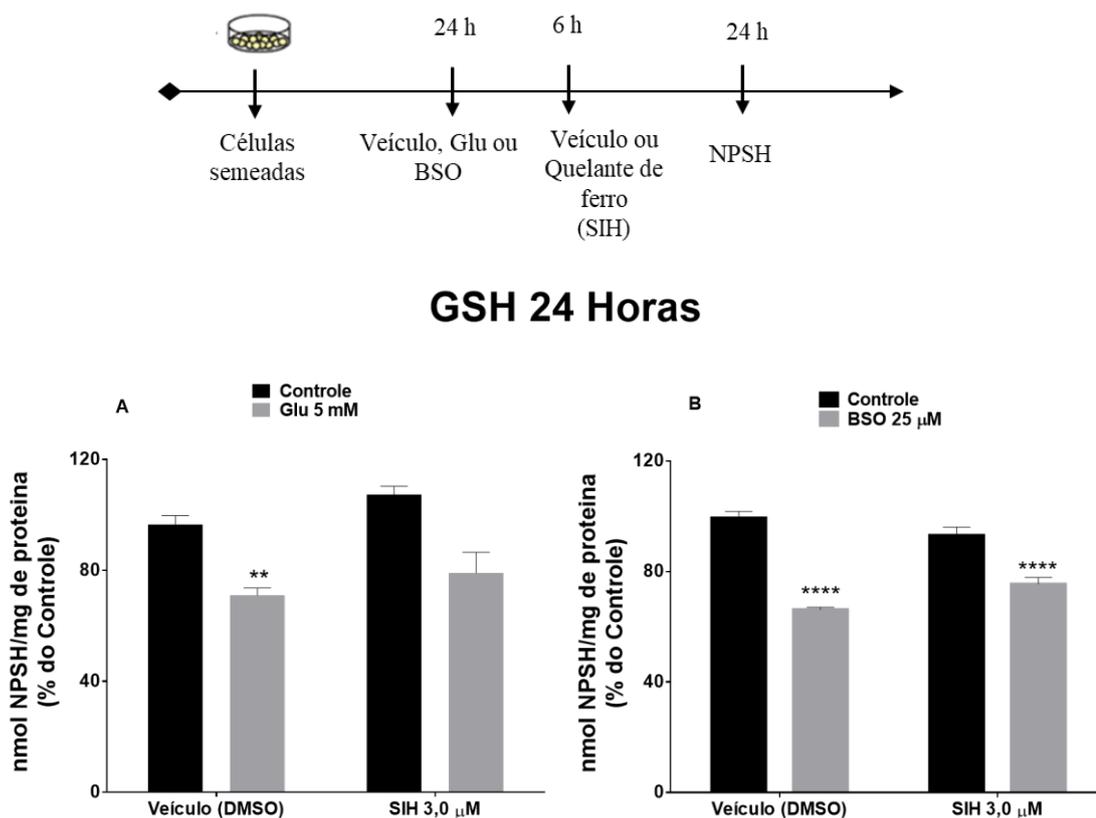
Neste contexto, fica claro a importância da GSH na manutenção das concentrações fisiológicas das ER geradas pelas células, preservando a homeostase redox celular e assim prevenindo a oxitose/ferroptose. Além disso, nossos resultados reforçaram que a geração de ER é um evento que ocorre após a depleção substancial de GSH e que provavelmente é capaz de levar ao aumento do ferro livre, potencializando a geração de ER e também gerando ER lipídicas características da morte celular ferroptótica. Dessa maneira foi avaliado se a proteção do composto SIH frente a oxitose/ferroptose em nosso modelo com as célula HT22 envolveria a mitigação da redução da concentração da GSH causada pela exposição ao Glu e ao BSO. Assim como o aumento das ER induzido pelos agentes pró-ferroptose Glu, BSO e RSL3.

5.4.8 Efeito do quelante de ferro SIH frente à redução da concentração de GSH induzida pelos compostos pró-ferroptose Glu e BSO

As células HT22 foram expostas ao Glu (5 mM) ou ao BSO (25 μ M) durante 6 horas. Após as 6 horas de exposição aos indutores, as células HT22 foram tratadas com SIH (3 μ M) e, depois de 24 horas, de exposição ao Glu ou ao BSO, o ensaio do NPSH foi realizado. O

tratamento com o quelante de ferro SIH reverteu parcialmente a redução da concentração de GSH induzida pelo Glu, porém não teve efeito sobre a depleção de GSH causada pela exposição ao BSO (Figuras 31 A e B respectivamente).

Figura 31 - Efeito do quelante de ferro SIH frente à redução da concentração de GSH induzida pelos compostos pró-ferroptose Glu, BSO.



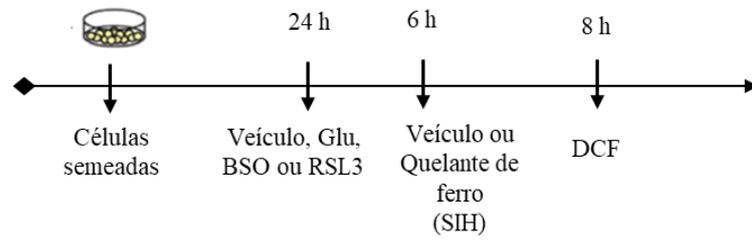
As células foram expostas ao (A) Glu 5 mM ou (B) BSO 25 µM por 6 horas. Após 6 horas as células foram tratadas com o SIH (3,0 µM) e após 24 horas da exposição o ensaio do NPSH foi realizado. Cada barra representa a média ± EPM (n = 4). *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ indica diferença quando comparado ao grupo controle (veículo-PBS 0,01 M) segundo a ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey.

5.4.9 Efeito do quelante de ferro SIH frente ao aumento das ER induzido pelos compostos pró-ferroptose Glu, BSO ou RSL3

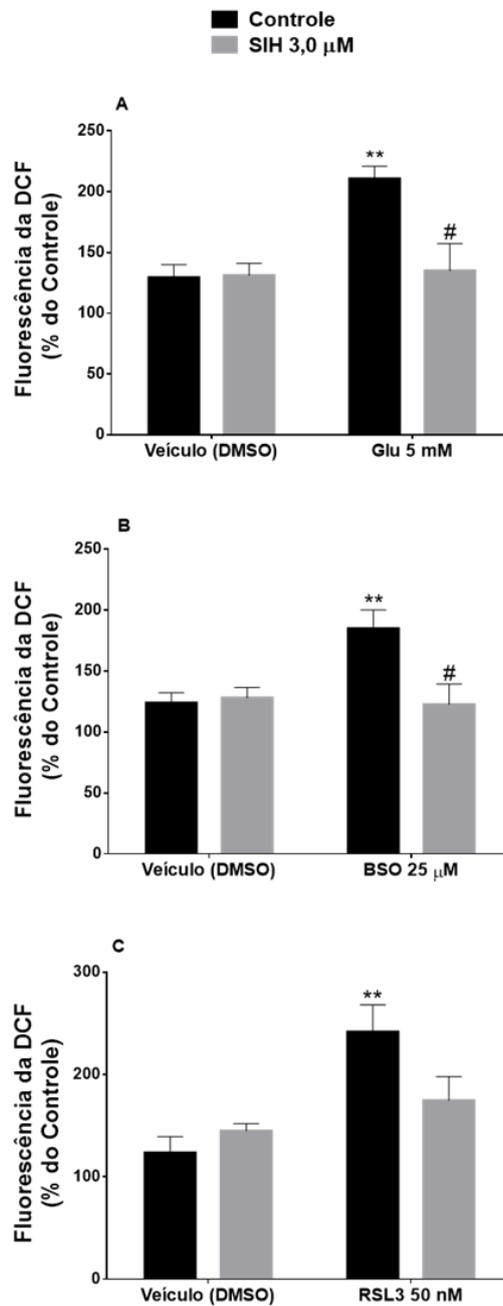
Além disso, as células HT22 foram expostas ao Glu (5 mM), ao BSO (25 µM) ou ao RSL3 (50 nM) durante 6 horas. Após as 6 horas de exposição aos indutores, as células HT22 foram tratadas com SIH (3 µM) e durante 2 horas foi avaliada a geração de ER citosólicas pela sonda DCF. O tratamento com o quelante de ferro SIH reverteu totalmente a geração de ER

tanto induzida pelo Glu quanto pelo BSO (Figuras 32 A e B, respectivamente) e reverteu parcialmente o aumento das ER induzido pelo RSL3 (Figura 32 C).

Figura 32 - Efeito do quelante de ferro SIH frente ao aumento das ER induzido pelos compostos pró-ferroptose Glu, BSO ou RSL3.



ER



As células foram expostas ao (A) Glu 5 mM, (B) BSO 25 μ M ou (C) RSL3 50 nM por 6 horas e após 6 horas as células foram tratadas com o SIH (3,0 μ M) e a fluorescência da DCF foi medida durante 2 horas. Cada barra representa a média \pm EPM (n = 4). ** $p \leq 0,01$ indica diferença quando comparado ao grupo controle (veículo) e # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Glu 5Mm (A) ou ao grupo BSO 25 μ M (B) segundo a ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey.

Nesse estudo foi demonstrado que o composto SIH protegeu totalmente as células HT22 frente a citotoxicidade do Glu (Figura 28 A-B) revertendo apenas parcialmente a depleção de GSH induzida pelo Glu (Figura 31 A). Além disso, o composto SIH protegeu de maneira parcial a citotoxicidade induzida pelo BSO (Figura 28 C-D) sem reverter a redução da GSH causada pelo BSO (Figura 31 B).

Um estudo com células de hepatoma derivadas de humanos (HepG2) mostrou que o tratamento com SIH ou com HAPI (análogo do SIH com maior estabilidade à hidrólise) (10 μ M) após 24 horas aumentou a concentração de ERO sem causar morte celular. Os quelantes SIH e HAPI (50 μ M; após 24 horas) aumentaram a concentração de GSH e a expressão da enzima GCL via ativação do Nrf2 dependente das ERO (CARO et al., 2015).

Dessa forma, é possível que o tempo de tratamento das células HT22 com o composto SIH em nosso modelo não foi suficiente para reverter completamente o efeito do Glu e do BSO sobre a concentração intracelular de GSH. Sugerindo que o co-tratamento do quelante de ferro SIH com os indutores de oxitose/ferroptose Glu e BSO poderia mitigar a depleção de GSH causada por esses agentes ferroptóticos.

Apesar do quelante de ferro SIH em nosso modelo de oxitose/ferroptose não ter revertido totalmente a depleção de GSH induzida pelo BSO e pelo Glu (Figuras 31 A-B) esse quelante de ferro reverteu totalmente o aumento de ER induzido por esses agentes ferroptóticos (Figuras 32 A e B, respectivamente) e bloqueou parcialmente a geração de ER induzida pelo RSL3 (Figura 32 C). Em um modelo de oxitose induzido pelo Glu em células HT22 a exposição após 7 horas ao Glu causou a depleção de GSH, aumento das ER citosólicas e peroxidação lipídica e todos esses efeitos foram potencializados na presença do ferro (MAHER, 2018). Porém, o ferro sozinho não teve efeito tóxico para as células HT22 além de não depletar a GSH intracelular, mas aumentou as ER citosólicas. Dessa forma é possível que o aumento da citotoxicidade do Glu induzido pelo ferro esteja relacionado à sua capacidade em aumentar a concentração de ER (MAHER, 2018).

Portanto, esses dados indicam que o bloqueio da geração ER dependente de ferro teria um efeito protetor frente à oxitose/ferroptose. De fato, os resultados aqui obtidos mostraram que os agentes ferroptóticos Glu e BSO aumentaram as ER das células HT22 a partir de 6 horas

de exposição (Figuras 30 A-B) e o quelante de ferro SIH reverteu totalmente esse aumento (Figuras 32 A-B) além de proteger total e parcialmente a citotoxicidade induzida pelo Glu e pelo BSO, respectivamente (Figuras 28 A-D). O RSL3 a partir 3 horas de exposição levou ao aumento das ER (Figura 30 C) e o quelante de ferro SIH bloqueou parcialmente esse aumento (Figura 32 C) além de proteger parcialmente as células HT22 frente à oxitose/ferroptose induzida pelo RSL3 (Figuras 28 E-F).

Um estudo mostrou que o ferro livre intracelular é essencial para mediar os efeitos tóxicos do H₂O₂. Uma vez que a quelação do ferro pelo SIH permitiu a sobrevivência das células H9c2 em um ambiente letal induzido pelo H₂O₂ (100 μM), porém com a reintrodução do ferro o efeito protetor é perdido, assim como, quando o quelante SIH é adicionado 1 hora após o H₂O₂ (SIMUNEK *et al.*, 2005). Outro estudo demonstrou que o pré-tratamento por 4 horas com o SIH também protegeu as células ARPE-19 de concentrações letais de H₂O₂ (LUKINOVA *et al.*, 2009). Além de proteger da citotoxicidade causada pela exposição a estaurosporina (200 nM) de maneira concentração dependente. Bem como o co-tratamento com o quelante de ferro SIH (3 μM) impediu o aumento da geração de ER citosólicas e mitocondriais induzido pela estaurosporina (200 nM) (LUKINOVA *et al.*, 2009).

No estudo de Bendova e colaboradores (2010) foi mostrado que o composto SIH apresentou uma maior capacidade em quelar o ferro intracelular em relação a DFO e a DPF em células H9c2, provavelmente devido a sua melhor permeabilidade celular. O co-tratamento com os quelantes de ferro lipofílicos SIH e DFP apresentaram uma eficácia semelhante e maior que a DFO em bloquear o aumento das ER induzida pela exposição ao tBuOOH, porém o quelante de ferro SIH foi o que apresentou maior proteção frente a citotoxicidade do tBuOOH (BENDOVA *et al.*, 2010).

Portanto, nossos resultados bem como os da literatura sugerem que a quelação de ferro, principalmente por quelantes lipofílicos, como o SIH exerce um efeito protetor frente à agentes oxidativos, que induzem oxitose/ferroptose, por meio do bloqueio da geração de ER. Os quelantes de ferro, principalmente os lipofílicos, são geralmente classificados como antioxidantes preventivos, pois normalmente ligam-se ao Fe³⁺ intracelular com alta afinidade impedindo a sua redução por redutores celulares, inibindo assim a geração de ERO através da reação de Fenton (SIMUNEK *et al.*, 2005).

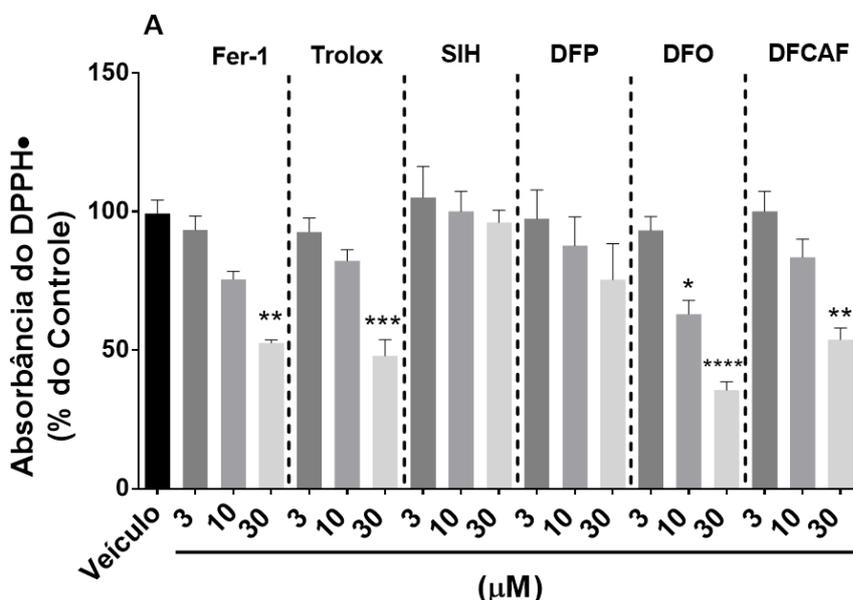
Porém, tendo em vista que compostos com ação antioxidante direta tem efeitos protetores significativos frente a oxitose/ferroptose (DIXON *et al.*, 2012; FRIEDMANN ANGELI *et al.*; 2014; ZILKA *et al.*, 2017) foi investigada a capacidade dos compostos DFO,

DFCAF, SIH e DFP em reduzir o radical estável 2,2-difenil 1-picrilhidrazil (DPPH•) em um meio livre de células. O Trolox, um antioxidante fenólico análogo mais hidrossolúvel da vitamina E, e a Fer-1, que apresenta ação antioxidante direta sobre as ER lipídicas, foram utilizados para comparar suas atividades antioxidantes diretas com os compostos DFO, DFCAF, SIH e DFP.

5.4.10 Efeito antioxidante direto dos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP

De acordo com a figura 33 a Fer-1 assim como o Trolox na concentração de 30 μM reduziram de maneira significativa o radical DPPH• ambos em torno de 50% (47%, $p \leq 0,01$ e 53, % $p \leq 0,001$, respectivamente, figura 33). A DFCAF também reduziu significativamente o radical DPPH•, em torno de 50% (47%, $p \leq 0,01$, figura 33), na concentração de 30 μM . Já a DFO reduziu significativamente o radical DPPH• tanto na concentração de 10 μM quanto na de 30 μM (37%, $p \leq 0,05$ e 64%, $p \leq 0,0001$, respectivamente, figura 33). Enquanto que os quelante SIH e DFP não tiveram a capacidade de reduzir o radical DPPH• (Figura 33).

Figura 33 - Efeito antioxidante direto dos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP.



Após 1 hora de incubação do radical DPPH• com Fer-1, Trolox, e os quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP (3, 10 e 30 μM) ou com o veículo (DMSO 0,05 %) foi realizada a leitura da absorbância em 518 nm e os dados foram expressos como a porcentagem do controle (somente DPPH, 100 %). Cada barra representa a média \pm EPM ($n = 4$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle veículo, (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* Tukey).

No estudo de Alta e colaboradores (2014) a DFCAF e a DFO, em concentrações entre 2 e 3 μM , bloquearam cerca de 70% a oxidação da sonda diidrorodamina (DHR) induzida pelo ferro e ascorbato, já a DFP na mesma concentração bloqueou aproximadamente 50%. A DFP é um quelante de ferro bivalente e, portanto, três moléculas são necessárias para quelar um íon de ferro e assim prevenir a oxidação da sonda catalisada pelo ferro, enquanto que é apenas necessária uma molécula da DFO e da DFCAF (ALTA *et al.*, 2014).

Além disso, Alta e colaboradores (2014) também demonstraram a capacidade dos ácidos hidroxâmicos presentes na DFO e na DFCAF em doarem prótons para o radical DPPH•. A DFO e a DFCAF na concentração aproximada de 10 μM reduziram o radical DPPH• em torno de 60 e 40 % respectivamente. Já na concentração aproximada de 30 μM de DFO e de DFCAF a redução do radical DPPH• foi cerca de 80% para ambas (ALTA *et al.*, 2014). Os resultados aqui obtidos com os quelantes de ferro DFO e DFCAF foram semelhantes porém, na concentração de 30 μM a redução do radical DPPH• foi de aproximadamente 60 e 50% respectivamente (Figura 33 A).

De maneira geral, os resultados do presente estudo demonstraram que os quelantes SIH e DFP, os mais lipofílicos, não apresentaram atividade antioxidante direta através do ensaio do DPPH. Por outro lado, os quelantes de ferro DFO e DFCAF tiveram uma atividade antioxidante semelhante aos compostos antioxidantes Trolox e Fer-1 na maior concentração (Figura 32 A). Entretanto, diferente do composto SIH, os quelantes de ferro DFO, DFCAF e DFP não apresentaram ação protetora frente ao nosso modelo de oxitose/ferroptose (Figuras 24, 25 e 26 respectivamente), assim o efeito antioxidante direto não parece ser importante para a sua proteção. Entretanto, tendo em vista que o ensaio aqui utilizado não mimetiza condições fisiológicas, mais estudos utilizando outras técnicas que avaliam efeitos antioxidantes diretos devem ser realizadas para melhor compreender a relação entre o efeito antioxidante e a proteção frente à oxitose/ferroptose.

Um estudo mostrou que o composto SIH por meio da quelação do ferro intracelular reduziu a geração das ERO e aumentou a expressão do mRNA para o receptor 1 da transferrina (TfR1) que é uma proteína de membrana que se liga ao complexo transferrina-ferro e é internalizado para liberar ferro dentro do citoplasma (LUKINOVA *et al.*, 2009). Outro estudo demonstrou, em células HepG2 que, além da propriedade antioxidante indireta determinada pela capacidade dos quelantes de ferro SIH e HAPI (análogo do SIH com maior estabilidade a hidrólise) de prevenir a redução do Fe^{3+} , esses quelantes de ferro também apresentaram ação antioxidante através de um efeito de hormese oxidativa mediado pela ativação do fator de

transcrição Nrf2. A hormese oxidativa é definida como um processo no qual a exposição a uma baixa concentração de um oxidante induz uma resposta protetora antioxidante adaptativa (CARO *et al.*, 2015).

Portanto, sugere-se que o SIH além da quelação de ferro, bloqueando a geração de ER, pode desempenhar um papel protetor através da ativação do fator de transcrição Nrf2 (CARO *et al.*, 2015). O Nrf2 é um fator de transcrição chave responsável pela manutenção do equilíbrio redox da célula, que regula a expressão de genes antioxidantes, como as subunidades catalítica e regulatória da enzima GCL (GCLC/GCLM) e a enzima GPx4, bem como de genes do metabolismo do ferro como a cadeia leve e pesada da ferritina (FTL/FTH1) (ABDALKADER *et al.*, 2018; ANANDHAN *et al.*; 2020).

Contudo, mais estudos são necessários para saber se o efeito protetor do SIH frente à citotoxicidade dos agentes ferroptóticos Glu, BSO e RSL3 envolve a ativação do Nrf2. Além disso, seria interessante investigar o efeito desse quelante de ferro em modelos *in vivo* de oxitose/ferroptose para testar sua toxicidade bem como seu efeito protetor. Dessa maneira, seria possível indicar moléculas semelhantes ao SIH para auxiliar no tratamento de doenças nas quais a oxitose/ferroptose esteja envolvida, como no caso das doenças neurodegenerativas. Com os resultados, obtidos no capítulo II desse trabalho, um segundo artigo está sendo elaborado.

5.5 CONCLUSÃO CAPÍTULO II

Este estudo mostrou que o quelante de ferro lipofílico SIH apresentou efeito protetor contra três diferentes indutores de oxitose/ferroptose. Esse efeito possivelmente envolve o bloqueio da geração de ER dependentes de ferro. Portanto, sugerindo ser uma molécula quelante de ferro mais promissora para o desenvolvimento de fármacos que auxiliem no tratamento de doenças nas quais a oxitose/ferroptose esteja envolvida.

5.6 PERSPECTIVAS CAPÍTULO II

Visando um trabalho futuro, além de quelar o ferro é possível que o composto SIH esteja exercendo um efeito protetor pela ativação do fator de transcrição Nrf2 e assim modulando importante proteínas envolvidas na oxitose/ferroptose, como as enzimas GCL (GCLC/GCLM)

e GPx4 e a proteína ferritina (FTL/FTH1). Dessa forma, algumas análises podem ser realizadas a fim de investigar essa hipótese, tais como:

1. Avaliar a possível ativação do fator de transcrição Nrf2 pelo composto SIH através da imunocitoquímica, na qual avalia-se a translocação do Nrf2 do citoplasma para o núcleo em células HT22;
2. Avaliar a possível ativação do fator de transcrição Nrf2 pelo composto SIH através da análise do imunoconteúdo de proteínas como a GLC (GCLC/GCLM), GPx4 e FTL/FTH1 em células HT22 tratada com esse composto, pela técnica de Western Blotting.

REFERÊNCIAS

- ABDALKADER, M., LAMPINEN, R., KANNINEN, K. M., MALM, T. M., and LIDDELL, J. R. Targeting Nrf2 to Suppress Ferroptosis and Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 1-9, 2018.
- ALTA E. C. P.; GOSWAMI, D.; MACHINI, M. T.; SILVESTRE, D. M.; NOMURA, C. S.; ESPÓSITO, B. P. Desferrioxamine-caffeine (DFCAF) as a cell permeant moderator of the oxidative stress caused by iron overload. **BioMetals**, v. 27, n. 6, p. 1351–1360, 2014.
- ANANDHAN, A., DODSON, M., SCHMIDLIN, C. J., LIU, P., and ZHANG, D. D. Breakdown of an Ironclad Defense System: The Critical Role of NRF2 in Mediating Ferroptosis. **Cell Chemical Biology**, v. 27, p. 1 – 12, 2020.
- ANVISA. Consulta de Produtos e Medicamentos. Disponível on-line em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp> Acesso em 14/01/2021
- BENDOVA, P.; MACKOVA, E.; HASKOVA, P.; VAVROVA, A.; JIRKOVSKY, E.; STERBA, M.; POPELOVA, O.; KALINOWSKI, D. S.; KOVARIKOVA, P.; VAVROVA, K.; RICHARDSON, Des R.; SIMUNEK, T. Comparison of Clinically Used and Experimental Iron Chelators for Protection against Oxidative Stress-Induced Cellular Injury. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 1105–1114, 2010.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R., MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3289–3303, 2013.
- BUENO, D. C., CANTO R. F. S., de SOUZA V., ANDREGUETTI, R. R., BARBOSA, F. A. R. NAIME, A. A., Dey P. N., WÜLLNER V., LOPES, M. W., BRAGA, A. L., METHNER, A., FARINA, M. New Probucol Analogues Inhibit Ferroptosis, Improve Mitochondrial Parameters, and Induce Glutathione Peroxidase in HT22 Cells. **Molecular Neurobiology**, v. 57, p.3273-3290, 2020.
- CANÇADO R. D. Iron overload and iron chelation in sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, 316-326, 2007.
- CARO, A.A.; COMMISSARIAT, A.; DUNN, C.; KIM, H.; GARCIA, S.L.; SMITH, A.; STRANG, H.; STUPPY, J.; DESROCHERS, L.P.; GOODWIN, T.E. Prooxidant and antioxidant properties of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone iron chelators in hepg2 cells. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1850, p. 2256–2264, 2015.
- COLLE, D., SANTOS, D.B., MOREIRA, E.L.G., HARTWING, J.M., dos SANTOS, A.A., ZIMMERMANN, L.T., HORT, M.A., FARINA, M. Probucol Increases Striatal Glutathione Peroxidase Activity and Protects against 3-Nitropropionic Acid-Induced Pro-Oxidative Damage in Rats. **PLOS ONE**.v. 8, p. 1-15 2013a.
- COLLE, D., SANTOS, D.B., HARTWIG, J.M., GODOI, M., BRAGA, A.L., FARINA, M. Succinobucol versus probucol: Higher efficiency of succinobucol in mitigating 3-NP-induced

brain mitochondrial dysfunction and oxidative stress in vitro. **Mitochondrion**. v. 13, p. 125–133, 2013b.

COLLE, D., SANTOS, D.B., HARTWING, J.M., GODOI, M., ENGEL, D.F., de BEM, A.F., BRAGA, A.L., FARINA, M. Succinobucol, a Lipid-Lowering Drug, Protects Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells via Upregulation of Glutathione Levels and Glutamate Cysteine Ligase Activity. **Molecular Neurobiology**. v. 53, n. 2, p. 1280-95, 2016.

CONRAD, M., SATO, H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system xc⁻: cystine supplier and beyond. **Amino Acids**, v. 42, p. 231–246, 2011.

CONRAD, M., & FRIEDMANN Angeli, J. P. Glutathione peroxidase 4 (GPX4) and ferroptosis: what's so special about it? **Molecular & Cellular Oncology**, v. 2, ed. 3, p. 1 – 6, 2015.

CONRAD, M., & PRATT, D. A. The chemical basis of ferroptosis. **Nature Chemical Biology**, v. 15, p. 1137 – 1147, 2019.

COOPER, A. J. L.; TA, F. Role of astrocytes in maintaining cerebral glutathione homeostasis and in protecting the brain against xenobiotics and oxidative stress. The role of glutathione in the nervous system, Washington, p. 91-115, 1998.

COS P., HERMANS N., CALOMME M., MAES L., De BRUYNE T., PIETERS L., VLIETINCK A. J., VANDEN BERGHE D. Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants. **J Pharm Pharmacol**. V. 55, p. 1291-1297, 2003.

CRICHTON, R.R.; WARD, R.J.; HIDER, R.C. The Efficacy of Iron Chelators for Removing Iron from Specific Brain Regions and the Pituitary-Ironing out the Brain. **Pharmaceuticals**, v. 12, p.10 – 22, 2019.

CRICHTON, R. R., DEXTER, D. T., WARD, R. J. Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, p. 301–314, 2011.

DAVIS, J. B.; MAHER, P. Protein kinase C activation inhibits glutamate induced cytotoxicity in a neuronal cell line. **Brain Research**, v. 652, n. 1, p. 169-173, 1994.

DIONÍSIO, P. A., AMARAL, J. D., & RODRIGUES, C. M. P. Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 67, p. 1 - 18, 2021.

DIXON, S.J., LEMBERG, K.M., LAMPRECHT, M.R., SKOUTA, R., ZAITSEV, E.M., GLEASON, C.E., PATEL, D.N., BAUER, A.J., CANTLEY, A.M., YANG, W.S., MORRISON, B., and Stockwell B.R., Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, p.1060–1072, 2012.

DIXON, S. J. and STOCKWELL B. R., The Hallmarks of Ferroptosis. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 3, p. 35-54, 2019.

DEVOS, D.; MOREAU, C.; DEVEDJIAN, J.C.; KLUZA, J.; PETRAULT, M.; LALOUX, C.; JONNEAUX, A.; RYCKEWAERT, G.; GARÇON, G.; ROUAIX, N.; et al. Targeting

chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. **Antioxidants Redox Signaling**, v. 21, p. 195–210, 2014.

DOLMA, S., LESSNICK, S. L., HALN, W. C., and STOCKWELL, B. R. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. **Cancer Cell**, v.3, p. 285–296, 2003.

Do VAN, B., GOUEL, F., JONNEAUX, A., TIMMERMAN, K., GELÉ, P., PÉTRAULT, M., et al. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. **Neurobiology of Disease**, v. 94, p. 169–178, 2016.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

ESPINOSA-DIEZ C. E., MIGUELA V., MENNERICH B. D., KIETZMANN T., PÉREZ P. S., CADDENASC S., LAMAS S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 6, p. 183–197, 2015.

FANG, X., WANG, H., HAN, D., XIE, E., YANG, X., WEI, J., et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. **PNAS Latest Articles**, v. 116, p. 2672-80, 2019

FARINA, M., CAMPOS, F., VENDRELL, I., BERENQUER, J., BARZI, M., PONS, S., SUÑOL, C. Probulcol Increases Glutathione Peroxidase-1 Activity and Displays Long-Lasting Protection against Methylmercury Toxicity in Cerebellar Granule Cells. **Toxicological Sciences**. v. 2, p. 416–426, 2009.

FARINA, M., ASCHNER, M. Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced neurotoxicity: An intriguing interplay. **BBA - General Subjects** 2019.

FORCINA, G. C., DIXON, S. J. GPX4 at the Crossroads of Lipid Homeostasis and Ferroptosis. **Proteomics**, v. 19, p. 1-11, 2019.

FREDERIKSEN, K., JAT, P.S., VALTZ, N., et al. Immortalization of precursor cells from mammalian CNS. **Neuron**, v. 6, p. 439–448, 1988.

FRIEDMANN ANGELI, J. P., SCHNEIDER, M., PRONETH, B., TYURINA, Y. Y., TYURIN, V. A., HAMMOND, V. J., et al. Inactivation of the ferroptosis regulator GPX4 triggers acute renal failure in mice. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 12, p. 1180–1191, 2014.

HIDASZ, E. A., Van KESSEL, A. T. M., e PRATT, D. A. A Continuous Visible Light Spectrophotometric Approach To Accurately Determine the Reactivity of Radical-Trapping Antioxidants. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 737–744, 2016.

HOFMANS, S., VANDEN BERGHE, T., DEVISSCHER, L., HASSANNIA, B., LYSSSENS, S., JOOSSENS, J., Van Der VEHEN, P., VANDENABEELE, P., AUGUSTYNS, K. Novel Ferroptosis Inhibitors with Improved Potency and ADME Properties. **J Med Chem**, v.59, n. 5, p. 2041-2053, 2016

JELINEK, A., HEYDER, L., DAUDE, M., PLESSNER, M., KRIPPNER, S., GROSSE, R., et al. Mitochondrial rescue prevents glutathione peroxidase-dependent ferroptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 117, p. 45–57, 2018.

JIANG, L., KON, N., LI, T., WANG, S.-J., SU, T., HIBSHOOSH, H., et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. **Nature**, v. 520, p. 57–62, 2015.

KALYANARAMAN, B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1-6, 2012.

KUNSCH, C., LUCHOOMUN, J., GREY, J. Y., OLLIFF, L. K., SAINT, L.B., ARRENDALE, R. F., WASSERMAN, M. A., SAXENA, U., MEDFORD, R. M. Selective inhibition of endothelial and monocyte redox-sensitive genes by AGI-1067: a novel antioxidant and anti-inflammatory agent. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 308, p. 820–829, 2004.

LEWERENZ, J., HEWETT, S. J., HUANG, Y., LAMBROS, M., GOUT, P. W., KALIVAS, P. W., et al. The Cystine/Glutamate Antiporter System xc⁻ in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 522–555, 2013.

LEWERENZ, J., ATES, G., METHNER, A., CONRAD, M., MAHER, P., Oxytosis/Ferroptosis—(Re-) Emerging Roles for Oxidative Stress-Dependent Non-apoptotic Cell Death in Diseases of the Central Nervous System. **Frontiers in Neuroscience**, v.12, p. 1 – 23, 2018.

LI, Y., MAHER P., SCHUBERT D. A Role for 12-lipoxygenase in Nerve Cell Death Caused by Glutathione Depletion. **Neuron**, v. 19, p. 453–463, 1997.

LIU, J.; LI, L.; SUO, W. Z. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. **Life Sciences**, v. 84, n. 9, p. 267-271, 2009

LOWRY, O. H. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUKINOVA, N.; IACOVELLI, J.; DENTCHEV, T.; WOLKOW, N.; et al. Iron Chelation Protects the Retinal Pigment Epithelial Cell Line ARPE-19 against Cell Death Triggered by Diverse Stimuli. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 3, p. 1440–1447, 2009.

MAHER P. Potentiation of glutathione loss and nerve cell death by the transition metals iron and copper: Implications for age-related neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 115, p. 92–104, 2018.

MAHER, P.; CURRAIS, A.; SCHUBERT, D. Using the Oxytosis/Ferroptosis Pathway to Understand and Treat Age-Associated Neurodegenerative Diseases. **Cell Chemical Biology**, 27, n. 12, p. 1456-1471, 2020.

MANDAL, P. K., SEILER, A., PERISIC, T., KÖLLE, P., BANJAC CANAK, A., FÖRSTER, H., et al. System xc⁻ and Thioredoxin Reductase 1 Cooperatively Rescue Glutathione Deficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 22244–22253, 2010.

MARTIN-BASTIDA, A.; WARD, R. J.; NEWBOULD, R.; PICCINI, P.; SHARP, D.; KABBAa, C.; PATEL, M. C.; SPINO, M.; CONNELLY, J.; TRICTA, F.; CRICHTON, R. R.; DEXTER, D. T. Brain iron chelation by deferiprone in a phase 2 randomised double-blinded placebo controlled clinical trial in Parkinson's disease. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1 – 9, 2017.

MAZZETTI A. P., FIORILE M. C., PRIMAVERA A., Lo BELLO M. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 82, p. 10–18, 2015.

MIOTTO, G., ROSSETTO, M., Di PAOLO, M. L., ORIAN, L., VENERANDO, R., ROVERI, A., et al. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1. **Redox Biology**, v. 28, p. 1 – 2, 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MURPHY, T. H. et al. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. **Neuron**, v. 2, n. 6, p. 1547-1558, 1989.

MURPHY, T. H., SCHNAAR, R. L. and COYLE, J. T. Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. **FASEB J.** v. 4, p. 1624–1633, 1990.

NAGUIB, Y. M. A. A Fluorometric Method for Measurement of Peroxyl Radical Scavenging Activities of Lipophilic Antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 265, n. 2, p. 290-298, 1998.

NIEMINEN, A.L., GORES, G. J., BOND, J. M., IMBERTI, R., HERMAN, B., & LEMASTERS, J. J. A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 115, n. 2, p. 147–155, 1992.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and Organotellurium Compounds: Toxicology and Pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6255-6286, 2004.

NÚÑEZ, M. T., URRUTIA, P., MENA, N., AGUIRRE, P., TAPIA, V. e SALAZAR, J. Iron toxicity in neurodegeneration. **BioMetals**, v. 25, n. 4, p. 761–776, 2012.

NÚÑEZ, M. e CHANA-CUEVAS, P. New Perspectives in Iron Chelation Therapy for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 4, p. 2 – 22, 2018.

PINACHO CRISÓSTOMO, F. R. et al. Molecular Simplification in Bioactive Molecules: Formal Synthesis of (+)-Muconin. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 2339-2345, 2006.

RAVEN, E. P., LU, P. H., TISHLER, T. A., HEYDARI, P., BARTZOKIS, G. Increased Iron Levels and Decreased Tissue Integrity in Hippocampus of Alzheimer's Disease Detected in vivo with Magnetic Resonance Imaging. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 37, p. 127–136, 2013.

RIBEIRO, R.P., MOREIRA, E.L.G., SANTOS, D.B., COLLE, D., dos SANTOS, A.A PERES, K.C., FIGUEIREDO, C.P., FARINA, M. Probucol Affords Neuroprotection in a 6-OHDA Mouse Model of Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**. v. 38, p. 660–668, 2013.

SANTOS, D. B., PERES, K. C., RIBEIRO, R. P., COLLE, D., dos SANTOS, A. A., MOREIRA, E. L. G., SOUZA, D. O. G., FIGUEIREDO, C.P., FARINA, M. Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. **Experimental Neurology**. v. 233, p. 767-775, 2012.

SANTOS, D. B., COLLE, D., MOREIRA, E. L. G., SANTOS, A. A., HORT, M. A., SANTOS, K, OSES, J. P., RAZZERA, G., FARINA, M. Probucol Protects Neuronal Cells Against Peroxide-Induced Damage and Directly Activates Glutathione Peroxidase-1. *Molecular Neurobiology*, 2020.

SEIBT, T. M., PRONETH, B., and CONRAD, M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. **Free Radical Biology and Medicine**, p. 1 – 9, 2018.

SEILER, A., SCHNEIDER, M., FÖRSTER, H., ROTH, S., WIRTH, E.K., CULMSEE, C., PLESNILA, N., KREMMER, E., RADMARK, O., WURST, W., et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. **Cell Metabolism**. v. 8, p. 237–248, 2008.

SHAH, R., FARMER, L. A., ZILKA, O., VAN KESSEL, A. T. M., PRATT, D. A. Beyond DPPH: Use of Fluorescence-Enabled Inhibited Autoxidation to Predict Oxidative Cell Death Rescue. **Cell Chemical Biology**, 2019.

SHU, W. and DUNAIEF, J.L. Potential Treatment of Retinal Diseases with Iron Chelators. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 112, p. 1 – 14, 2018.

SINGLA, D.K., KAUR, K., SHARMA, A. K., DHINGRA, S., SINGAL, P. K. Probucol promotes endogenous antioxidant reserve and confers protection against reperfusion injury. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 85, p. 439–443, 2007.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, p. 613–619, 2017.

SIMUNEK, T., BOER, C., BOUWMAN, R., VLASBLOM, R., VERSTEILEN, A., STERBA, M., et al. SIH—a novel lipophilic iron chelator—protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 39, n. 2, p.345–354, 2005.

SKOUTA, R., DIXON, S. J., WANG, J., DUNN, D. E, ORMAN, M., SHIMADA, K., ROSENBERG, P. A., LO D. C., WEINBERG, J. M., LINKERMANN, A., STOCKWELL, B. R. Ferrostatis inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. **J Am Chem Soc**, v. 136, p.4551–4556, 2014.

STOCKER, R. Molecular mechanisms underlying the antiatherosclerotic and antidiabetic effects of probucol, succinobuol, and other probucol analogues. **Current Opinion Lipidology**. v. 20, p. 227–235, 2009

STOCWELL, B. R., FRIEDMANN Angeli, J. P., BAYIR, H., BUSH, A. I., CONRAD, M., DIXON, S. J., et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. **Cell**, v. 171, p. 273–285, 2017.

STOCKWELL, B. R. Dawn of a New Era of Targeted Antioxidant Therapies. **Cell Chemical Biology**, v. 26, n. 11, p. 1483–1485, 2019.

SCHUBERT, D., PIASECKI, D. Oxidative Glutamate Toxicity Can Be a Component of the Excitotoxicity Cascade. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 19, p. 7455–7462, 2001.

TAN S., SCHUBERT D., MAHER P. Oxytosis: A Novel Form of Programmed Cell Death. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.1, p. 497-506, 2001.

TARDIF, J.C., GREGOIRE, J., L'ALLIER, P. L. Prevention of restenosis with antioxidants: mechanisms and implications. **American Journal Cardiovascular Drugs**. v. 2, p. 323–334, 2002.

TARDIF, J. C., McMURRAY, J. J., KLUG, E., SMALL, R., SCHUMI, J., CHOI, J., COOPER, J., SCOTT, R., LEWIS, E. F., L'ALLIER, P. L., PFEFFER, M. A. Aggressive Reduction of Inflammation Stops Events (ARISE) Trial Investigators. Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 371, p. 1761-8, 2008.

WEINGARTEN, D. M., 2004. Process of preparing esters and ethers of probucol and derivatives thereof. Patent WO2004062622.

WU X., LI Y., ZHANG S., XIANG Z. Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease. **Theranostics**, v. 11, ed. 7, p. 3052 – 3059, 2021.

YAGODA, N., von RECHENBERG, M., ZAGANJOR, E., BAUER, A. J., YANG, W. S., FRIDMAN, D. J., et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. **Nature**, v. 447, p. 864–868, 2007.

YAMASHITA, S. MATSUZAWA, Y. Where are we with probucol: a new life for an old drug?. **Atherosclerosis**.v. 207, p. 16–23, 2009.

YANG, W. S., STOCKWELL, B. R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. **Chem. Biol.**, v.15, p. 234–245, 2008.

YANG, W. S., SriRAMARATNAM, R., WELSCH, M. E., SHIMADA, K., SKOUTA, R., VISWANATHAN, V. S., CHEAH, J. H., CLEMONS P. A., SHAMJI, A. F., CLISH, C. B., BROWN L. M., GIROTTI, A. W. CORNISH, V. W., SCHREIBER S. L., STOCKWELL B. R. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. **Cell**, v. 156, p. 317–331, 2014.

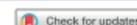
YANG W.S., STOCKWELL B.R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. **Trends Cell Biol**, v. 26, p. 165-176, 2016.

ZILKA, O., SHAH, R., LI, B., FRIEDMANN Angeli, J. P., GRIESSER, M., CONRAD, M., & PRATT, D. A. On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. **ACS Central Science**, v. 3, n. 3, p. 232–243, 2017.

ANEXO 1 – Artigo do capítulo I

Artigo publicado na revista Free Radical Research referente aos resultados obtidos no capítulo I.

FREE RADICAL RESEARCH
<https://doi.org/10.1080/10715762.2021.2017912>



ORIGINAL ARTICLE

Prevention of ferroptosis in acute scenarios: an *in vitro* study with classic and novel anti-ferroptotic compounds

Aline Aita Naime^a, Flavio Augusto Rocha Barbosa^b, Diones Caeran Bueno^a , Rozangela Curi Pedrosa^a , Rômulo Faria Santos Canto^c, Dirleise Colle^d, Antônio Luiz Braga^b and Marcelo Farina^a 

^aDepartment of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ^bDepartment of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ^cGraduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; ^dDepartment of Clinical Analyses, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ABSTRACT

Ferroptosis, an iron-dependent form of cell death, has critical roles in diverse pathologies. Data on the temporal events mediating the prevention of ferroptosis are lacking. Focused on temporal aspects of cytotoxicity/protection, we investigated the effects of classic (Fer-1) and novel [2,6-di-*tert*-butyl-4-(2-thienylthio)phenol (**C1**) and 2,6-di-*tert*-butyl-4-(2-thienylselano)phenol (**C2**)] anti-ferroptotic agents against RSL3-, BSO- or glutamate-induced ferroptosis in cultured HT22 neuronal cell line, comparing their effects with those of the antioxidants trolox, ebselen and probucol. Glutamate (5 mM), BSO (25 μ M) and RSL3 (50 nM) decreased approximately 40% of cell viability at 24 h. At these concentrations, none of these agents changed cell viability at 6 h after treatments; RSL3 increased lipoperoxidation from 6 h, although BSO and glutamate only did so at 12 h after treatments. At similar conditions, BSO and glutamate (but not RSL3) decreased GSH levels at 6 h after treatments. Fer-1, **C1** and **C2** exhibited similar protective effects against glutamate-, BSO- and RSL3-cytotoxicity, but this protection was limited when the protective agents were delivered to cells at time-points characterized by increased lipoperoxidation (but not glutathione depletion). Compared to Fer-1, **C1** and **C2**, the anti-ferroptotic effects of trolox, ebselen and probucol were minor. Cytoprotective effects were not associated with direct antioxidant efficacies. These results indicate that the temporal window is central in affecting the efficacies of anti-ferroptotic drugs in acute scenarios; ferroptosis prevention is improbable when significant rates of lipoperoxidation were already achieved. **C1** and **C2** displayed remarkable cytoprotective effects, representing a promising new class of compounds to treat ferroptosis-related pathologies.

ARTICLE HISTORY

Received 10 June 2021
 Revised 30 November 2021
 Accepted 8 December 2021

KEYWORDS

Ferroptosis; treatment; acute conditions; lipid peroxidation; probucol analogues