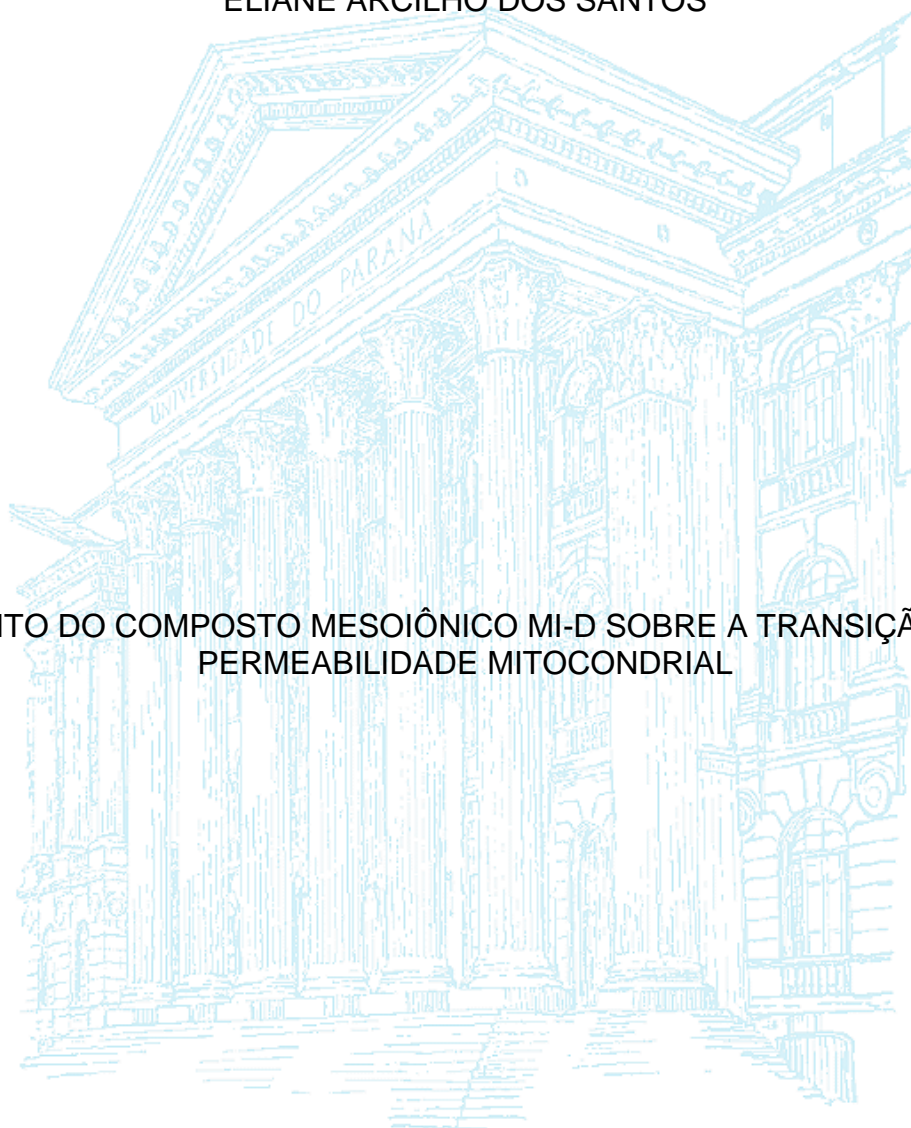


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELIANE ARCILHO DOS SANTOS

EFEITO DO COMPOSTO MESOIÔNICO MI-D SOBRE A TRANSIÇÃO DE
PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL



CURITIBA
2009

ELIANE ARCILHO DOS SANTOS

EFEITO DO COMPOSTO MESOIÔNICO MI-D SOBRE A TRANSIÇÃO DE
PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Maria Suter Correia Cadena – Depto de Bioquímica e Biologia Molecular (UFPR)

CURITIBA
2009

À minha mãe Maria de Lourdes Arcilho
dos Santos pelo apoio e incentivo

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena pela oportunidade de estágio no Laboratório de Oxidações Biológicas e de Cultivo Celular, pelo acompanhamento, paciência e ensinamentos.

Às professoras do Laboratório de Oxidações Biológicas e de Cultivo Celular pela disponibilidade e apoio.

À Prof^a Dra. Áurea Echevarria da UFRRJ pela doação do composto MI-D.

À Stelia Carolina pelo auxílio durante os experimentos e ensinamentos sobre a dinâmica do Laboratório, uso dos equipamentos e demais atividades .

À Rosane Martins, secretária da Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, por sua dedicação, orientação e socorros prestados durante os ajustes de matrículas, quase sempre necessários.

Aos colegas de Laboratório, colegas do Curso de Ciências Biológicas, e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus agradecimentos.

RESUMO

Os compostos mesoiônicos constituem uma classe especial de compostos heterocíclicos com potencial aplicação terapêutica. Possuindo regiões separadas de cargas positiva e negativa são capazes de interagir com biomoléculas. Além disso, seu caráter global neutro possibilita que atravessem membranas biológicas. Estudos anteriores mostraram que o composto cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) possui uma importante ação antitumoral e promove o desacoplamento da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. O MI-D tem sido apontado também como um potencial fármaco para o tratamento do melanoma. Alterações morfológicas em células HeLa tratadas com o composto foram sugestivas de morte celular por apoptose. Embora existam evidências de que a ação antitumoral do MI-D esteja relacionada aos efeitos do composto sobre a bioenergética mitocondrial, os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente esclarecidos. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do MI-D sobre os parâmetros relacionados à morte celular desencadeada por mecanismos envolvendo funções mitocondriais, particularmente sobre a transição de permeabilidade em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Neste estudo, o MI-D promoveu inibição no inchamento mitocondrial dependente da formação/abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), induzida por fostato, como determinado pelo registro da absorvância a 540nm. Esta inibição foi dose dependente, chegando a ~42% na maior concentração (80 nmol.mg⁻¹ prot.). O composto, na concentração de 80 nmol.mg⁻¹ prot. também inibiu o inchamento mitocondrial dependente de PTPM induzida por H₂O₂ (~66%), diamida ou mersalil (~100% para ambos indutores). Estes resultados sugerem que a ação antitumoral do MI-D não se deve a liberação de fatores proapoptóticos como conseqüência da formação/abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, uma vez que o composto inibiu este processo.

Palavras-chave: Compostos mesoiônicos. MI-D. Transição de permeabilidade mitocondrial. Apoptose.

ABSTRACT

Mesoionic compounds constitute a distinctive group of heterocyclic substances with potential therapeutic activity. They have well separated regions of positive and negative charge on their structure and are able to interact with biomolecules. In addition, their overall neutral nature enables them to cross biological membranes. Previous studies have shown that the mesoionic compound MI-D (4-phenyl-5-(4-nitro-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride) possesses an important antitumoral activity and is able to uncouple oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. The MI-D has also been pointed as a potential drug for treatment of melanoma. Morphological alterations in HeLa cells treated with MI-D were suggestive of cell death by apoptosis. Although there are evidences that antitumoral activity of MI-D may be a consequence of its effects on mitochondrial bioenergetics, its mechanism of action is not fully known. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of MI-D on some parameters related to cell death mediated by mitochondrial pathways, particularly on permeability transition in rat liver mitochondria. The mesoionic compound was able to inhibit the formation/opening of the permeability transition pore (PTPM), induced by phosphate, as determined by recording of absorbance at 540 nm. The inhibition promoted by MI-D was dose-dependent, reaching ~ 42% at the highest concentration (80 nmol.mg⁻¹ prot). The compound also inhibited the formation/opening of PTPM induced by H₂O₂ (~66%), diamide or mersalyl (~100% for both inducers). These results suggest that the antitumoral activity of MI-D does not involve the release of pro apoptotic factors as a consequence of formation/opening of the PTPM, since the compound inhibited this process.

Keywords: Mesoionic compounds. MI-D. Mitochondrial permeability transition. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação genérica da estrutura de um composto mesoiônico.....	12
FIGURA 2	Representação de compostos mesoiônicos com destacada atividade biológica.....	13
FIGURA 3	Estruturas químicas de derivados 1,3,4-Tiadiazóis.....	14
FIGURA 4	Representação genérica do poro de transição de permeabilidade mitocondrial.....	17
FIGURA 5	Efeito do MI-D sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por fosfato.....	24
FIGURA 6	Efeito do MI-D sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por peróxido de hidrogênio – Gráfico 1.....	26
FIGURA 7	Efeito do MI-D sobre a transição de permeabilidade induzida por peróxido de hidrogênio - Gráfico 2.....	26
FIGURA 8	Efeito do MI-D sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por diamida.....	27
FIGURA 9	Efeito do MI-D sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Mersalil.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina bovina sérica
COX-2	Ciclooxigenase 2
CsA	Ciclosporina A
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EGTA	Ácido etilenoglicolbis(eter2-aminoetil)-N, N, N', N' tetracético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HeLa	Células de carcinoma de cervix uterino humano
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
MI-D	Cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4- tiadiazólio-2- Fenilamina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotideo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
PGE2	Prostaglandina E2
PMA	Ester de forbol 12-meristato 13-acetato
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
RE	Receptor de estrógeno

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Mitocôndrias – Metabolismo de Xenobióticos e Morte Celular	11
2.2 Compostos Meso-iônicos	12
2.3 Atividade Biológica dos Compostos 1,3,4-Tiadiazóis Meso-iônicos	13
2.4 Transição de Permeabilidade Mitocondrial.....	16
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	18
3.1 Objetivos Específicos	18
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Compostos Meso-iônicos	20
5.2 Animais	20
5.3 Isolamento de mitocôndrias.....	21
5.4 Determinação do consumo de O ₂	21
5.5 Transição de Permeabilidade Mitocondrial	22
5.6 Determinação da Concentração de Proteínas	22
5.7 Análise Estatística	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6.1 Efeitos do MI-D sobre a Transição de Permeabilidade Mitocondrial.....	24
7. CONCLUSÕES.....	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1.INTRODUÇÃO

Compostos mesoiônicos formam uma classe de compostos heterocíclicos com potencial aplicação terapêutica. Devido suas características estruturais, apresentando regiões separadas de cargas positiva e negativa e caráter global neutro, os compostos heterocíclicos mesoiônicos são capazes de interagir com biomoléculas e atravessar membranas biológicas, e isso tem despertado interesse de pesquisadores de diferentes áreas. Os estudos com os compostos mesoiônicos realizados no Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR iniciaram-se com um derivado da classe 1,3,4-tiadiazólio, o cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) ao qual já se atribuía a ação antitumoral contra sarcoma 180 e tumor de Ehrlich (GRYNBERG *et al.*, 1997). Seguindo essa primeira evidência de ação antitumoral do MI-D, foi demonstrado que o cloreto de 4-fenil-5-(4-nitrocinaoíl)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) é um composto mais efetivo em relação a outros derivados 1,3,4 tiadiazóis mesoiônicos no combate ao melanoma, um tumor muito resistente à quimioterapia (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003; 2004a,b). A importância destes estudos levou a solicitação de registro de patente da atividade antimelanoma do MI-D.

Também considerando o papel da mitocôndria nos mecanismos de morte celular, foram testados os efeitos do MI-D em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, e os resultados obtidos indicaram que o composto reduz a eficiência da fosforilação oxidativa, atuando como um desacoplador inibitório (CADENA *et al.* 1998, 2002).

Em adição a estes, estudos posteriores também realizados neste núcleo de pesquisa, em modelo murino, levaram a resultados que indicam que o composto MI-D possui ação analgésica, antipirética e antiinflamatória *in vivo*. Efeitos estes associados à diminuição dos níveis de PGE2 indicam uma possível inibição da COX-2 (CARDOSO *et al.*, 2004).

Os efeitos do MI-D sobre a bioenergética mitocondrial foram parcialmente esclarecidos por Cadena *et al.* (1998, 2002), porém, faltam dados experimentais relativos à possível ação do composto sobre a transição de permeabilidade

mitocondrial, evento relacionado aos mecanismos de morte celular. Portanto, neste trabalho foram avaliados os efeitos do MI-D sobre atividades relacionadas à morte celular, desencadeada por funções mitocondriais, particularmente sobre a transição de permeabilidade, visando contribuir para o esclarecimento do mecanismo da importante ação antimelanoma do composto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mitocôndrias – Metabolismo de Xenobióticos e Morte Celular

A morte celular por apoptose desencadeada pela mitocôndria pode ocorrer como consequência da dissipação do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) e do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que juntos comprometem o processo de fosforilação oxidativa (KROEMER *et al.*, 1995). A mitocôndria também está envolvida no processo de morte celular por necrose, processo de morte celular “desregulada”, resultante do “colapso” bioenergético que culmina na ruptura da membrana plasmática, característica da necrose. Muitos compostos utilizados como agentes quimioterápicos do câncer possuem a habilidade de induzir a apoptose em células malignas *in vitro* devido a sua ação sobre a bioenergética mitocondrial (HAIL, 2005). Um exemplo é o antiestrógeno tamoxifeno, um agente antiestrogênico não-esteroidal sintético, utilizado comumente no tratamento de neoplasias estrógeno-dependentes, incluindo o câncer de mama (CUSTODIO *et al.*, 1998). Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, porém considera-se que seu efeito seja dependente de receptores de estrógeno (RE). Segundo essa hipótese, o tamoxifeno ao se ligar ao receptor, impede a indução da proliferação celular, que seria induzida pelo estrógeno natural (IKEDA & INOUE, 2004). Entretanto, muitos pacientes com câncer de mama não dependente de RE respondem ao tratamento com tamoxifeno, sendo esta resposta atribuída aos efeitos do composto sobre a bioenergética mitocondrial. Dentre outros efeitos, ao tamoxifeno são atribuídos os seguintes: a) inibição da transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca^{+2} e fosfato inorgânico (CUSTODIO *et al.*, 1998); b) inibição da transferência de elétrons na cadeia respiratória ao nível do complexo III e IV e, conseqüentemente, inibição da respiração mitocondrial (TUQUET *et al.*, 2000); c) dissipação do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) e diminuição da eficiência da fosforilação oxidativa (CARDOSO *et al.*, 2001) e d) indução de stress oxidativo (FERLINI *et al.*, 1999).

2.2 Compostos Meso-iônicos

Em 1976 OLLIS & RAMSDEN propuseram a atual definição do termo meso-iônico: “*um composto pode ser apropriadamente classificado como meso-iônico quando for constituído por um anel heterocíclico de cinco membros, o qual não pode ser representado satisfatoriamente por uma estrutura covalente ou polar, e que possua um sexteto de elétrons π associados aos cinco átomos que formam o anel*” (Figura 1). O valor dos compostos meso-iônicos como substâncias biologicamente ativas está em seu caráter aromático planar, seu tamanho relativamente pequeno e a variação da densidade eletrônica ao redor do anel. Embora as moléculas sejam carregadas internamente e possuam alto momento dipolar, são globalmente neutras, o que lhes confere a capacidade de atravessar barreiras lipídicas e interagir com macromoléculas (OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982).

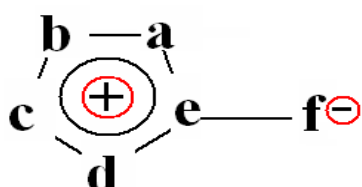


FIGURA 1. Representação genérica da estrutura de um composto meso-iônico.
 FONTE: OLLIS & RAMSDEN (1976); NEWTON & RAMSDEN (1982).

Com relação à composição do anel meso-iônico, os que apresentam destacada atividade biológica, pertencem às seguintes classes: sidnonas, sidnoniminas, oxatriazóis e 1,3,4-tiadiazóis meso-iônicos (Figura 2) (OLLIS & RAMSDEN, 1976). A seguir esta revisão tratará apenas da classe dos 1,3,4-tiadiazóis meso-iônicos que constituem o objeto deste estudo.

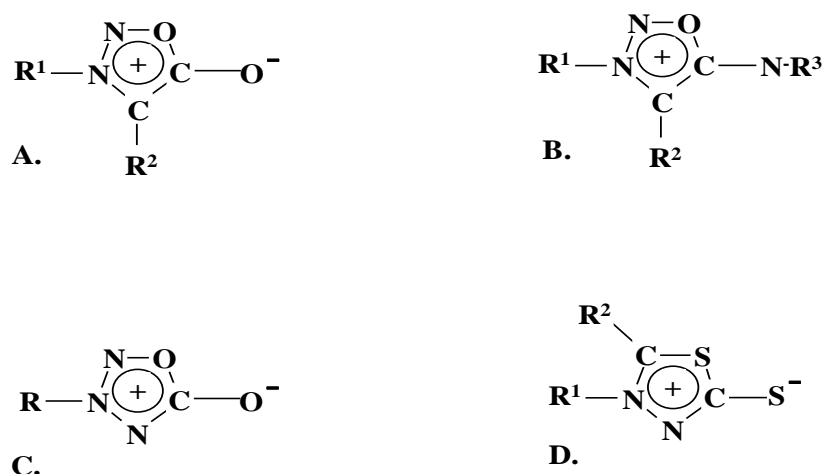


FIGURA 2 -Estruturas representativas de compostos mesoiônicos com destacada atividade biológica. **A.** sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olato); **B.** sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminida); **C.** oxatriazóis (1,2,3,4 oxatriazólio-5-olato) e **D.** 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos (1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato). FONTE: KIER & ROCHE, 1967.

2.3 Atividade Biológica dos Compostos 1,3,4-Tiadiazóis Meso-iônicos

Diversas atividades biológicas são atribuídas a estes derivados, dentre as quais destacam-se: antibacteriana e antifúngica (LIMA *et al.*, 1986; MONTANARI *et al.*, 1992, 1997), leishmanicida (DA SILVA *et al.*, 2002) e atividade antitumoral (GRYNBERG *et al.*, 1997, SENFFRIBEIRO *et al.*, 2003, 2004 a,b).

Com relação à atividade antitumoral, GRYNBERG *et al.* (1997) sintetizaram quatro derivados do cloreto de 4-fenil-5-(4-X-cinamoil)-1,3,4-tiadiazolio-2-fenilamina e testaram estes compostos contra Sarcoma 180 (S180) e carcinoma de Ehrlich em camundongos. Os autores observaram que quando o anel cinamoil era substituído por grupos mais polares, como NO₂ (MID) e OH (MI-J) (Figura 3), estes apresentavam atividade contra carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180, e por outro lado com substituintes menos polares como X=H (MI-A) e X=OCH₃ (MI-C) não apresentavam atividade antitumoral significativa.

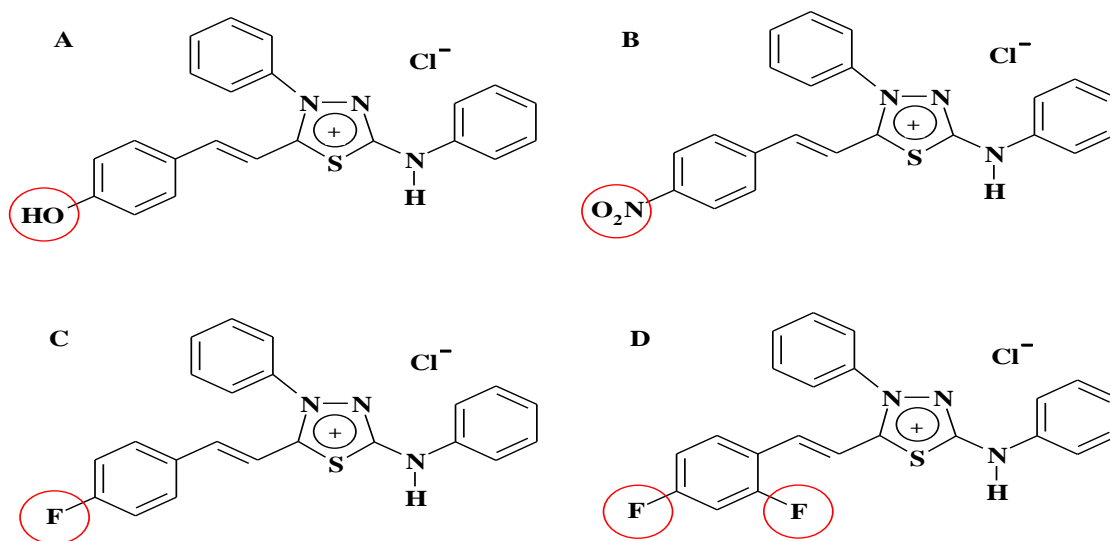


FIGURA 3- ESTRUTURAS QUÍMICAS DE DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS

A. cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxi-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-J); B. cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D); C. cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorcinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio 2-fenilamina (MI-4F) e D. cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-2,4diF).

*Os círculos destacam os substituintes do anel cinamoil

FONTE: GRYNBERG *et al.* 1997; DOS SANTOS & ECHEVARRIA, 2001.

A importante atividade antitumoral do MI-D (Figura 3B), motivou a realização de uma série de estudos subsequentes. Cadena e colaboradores (1998) avaliaram os efeitos do MI-D sob o metabolismo energético mitocondrial e observaram que este reduziu a eficiência da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Em estudos posteriores (2002) os mesmos autores verificaram que o MI-D alterou a fluidez e a elasticidade da membrana mitocondrial e sugeriram que os efeitos observados poderiam estar envolvidos no mecanismo pelo qual o MI-D induz a morte em células tumorais como relatado anteriormente por GRYNBERG *et al.* (1997). O tratamento de monocamadas de células HeLa com MI-D promoveu alterações morfológicas como: formação de “blebs” na membrana plasmática, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, características do processo de morte celular por apoptose. Ensaio utilizando o método TUNEL indicaram também o MI-D como indutor da morte celular por apoptose (CADENA, 1999).

Cardoso e colaboradores (2004) demonstraram ainda que o MI-D afeta o metabolismo hepático estimulando a glicogenólise e inibindo o consumo de oxigênio em fígado de rato perfundido. O composto foi também capaz de reduzir a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por macrófagos estimulados por 12-meristato 13-acetato forbol éster (PMA) da cavidade peritoneal de camundongos. O MI-D também apresentou ação analgésica na dose de 8mg/Kg, antipirética e antiinflamatória *in vivo*. Segundo os autores, estes efeitos foram decorrentes da diminuição dos níveis de prostaglandina E2 (PGE2) indicando a inibição da ciclooxigenase 2 (COX-2).

Em adição aos estudos de Grynberg e colaboradores (1997) o efeito antitumoral do MI-D foi também demonstrado contra células de melanoma murino B16-F10 *in vivo* e *in vitro* (SENFFRIBEIRO *et al.*, 2003). Utilizando a dacarbazina e fotemustina, agentes antineoplásicos de uso corrente, como parâmetros de eficiência, os autores demonstraram que o MI-D exerce efeito citotóxico contra células de melanoma murino de forma dose e tempo dependente. A atividade antitumoral do MI-D foi avaliada também *in vivo* em camundongos C57BL/6 portadores de melanoma subcutâneo (B16-F10). O MI-D inibiu o crescimento tumoral em 85%, um efeito antitumoral mais eficaz do que o observado para a fotemustina (50%) e dacarbazina (27%). Em tumores já desenvolvidos (8 dias) o MI-D também foi capaz de inibir o crescimento em aproximadamente 64%.

Em estudos posteriores Senff-Ribeiro e colaboradores (2004 b) avaliaram os efeitos do composto MI-D em diferentes linhagens de melanoma humano. Para uma dose de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D, em 48 horas de incubação, a viabilidade celular para as linhagens MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO foi reduzida em, aproximadamente 20, 30, 20 e 13%, respectivamente. O MI-D também diminuiu a proliferação destas células, mostrando uma elevada atividade citotóxica. A adesão das células MEL-85 a laminina, fibronectina e matrigel, componentes da matriz extracelular, foi reduzida pelo MI-D. Com base nos resultados obtidos os autores apontaram o MI-D como uma droga bastante promissora contra o melanoma, o que motivou o pedido de registro de patente desta atividade (PI0402854-6). Com o objetivo de estabelecer a relação entre estrutura química e atividade antitumoral, os mesmos autores (SENFF-RIBEIRO *et al.* 2004 a) avaliaram os efeitos dos derivados mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina em células de melanoma murino B16-F10 *in vitro* e em tumores resultantes da implantação

subcutânea das células B16-F10 em camundongos C57BL/6. Os compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina testados diferiam apenas no substituinte do anel cinamoil, sendo as substituições na posição 4' por: OH = MI-J; F = MI-4F; NO₂ = MI-D e substituições em 2' e 4' por F = MI-2,4diF (Figura 3). Nas análises *in vitro* e *in vivo*, o MI-D foi o derivado que apresentou maior eficiência. *In vitro* o composto monofluorado foi mais efetivo contra as células B16-F10 que o MI-2,4diF, entretanto, nas análises *in vivo* o MI-4F apresentou valor estatisticamente não significativo. O composto MI-J não apresentou efeito significativo para as análises *in vitro* e *in vivo*. O MI-2,4diF e o MI-D foram capazes de inibir o crescimento tumoral em 55 e 77%, respectivamente, na concentração de 57 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$.

2.4 Transição de Permeabilidade Mitocondrial

O poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) é um poro inespecífico localizado na membrana mitocondrial interna (Figura 4), e é constituído por proteínas que estão distribuídas nas membranas interna e externa da mitocôndria, como a translocase de nucleotídeos de adenina (ANT) na membrana interna, a ciclofilina D, na matriz, e a porina ou canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), na membrana externa, (HAIL, 2005). Vários fatores podem desencadear a formação do poro de transição de permeabilidade, como a formação de ERO, o aumento na concentração de cálcio da matriz, dentre outras alterações metabólicas (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001).

A formação do poro de transição permite a passagem de moléculas menores do que 1,5 kDa e de água para o interior da mitocôndria, levando ao inchamento mitocondrial e conseqüente rompimento da membrana mitocondrial externa, liberando fatores proapoptóticos no citosol e induzindo a morte celular por apoptose (BERNARDI, 1996). A entrada dessas moléculas na matriz mitocondrial através do poro de transição de permeabilidade altera o funcionamento normal da organela, afetando sua habilidade de sintetizar ATP, e levando ao bloqueio da cadeia respiratória, favorecendo assim a produção de espécies reativas de oxigênio,

originadas, em sua maioria, pela transferência direta de elétrons para o oxigênio molecular (GRIMM, 2007).

Para a abertura do PTPM é necessária a presença do íon cálcio, sendo que após a abertura do poro o efluxo do íon é favorecido em decorrência do colapso do potencial de membrana, o que por sua vez aumenta a concentração de cálcio citosólico (BERNARDI, 1992). Isso evidencia a importância do íon cálcio no processo de transição de permeabilidade e na apoptose por via mitocondrial.

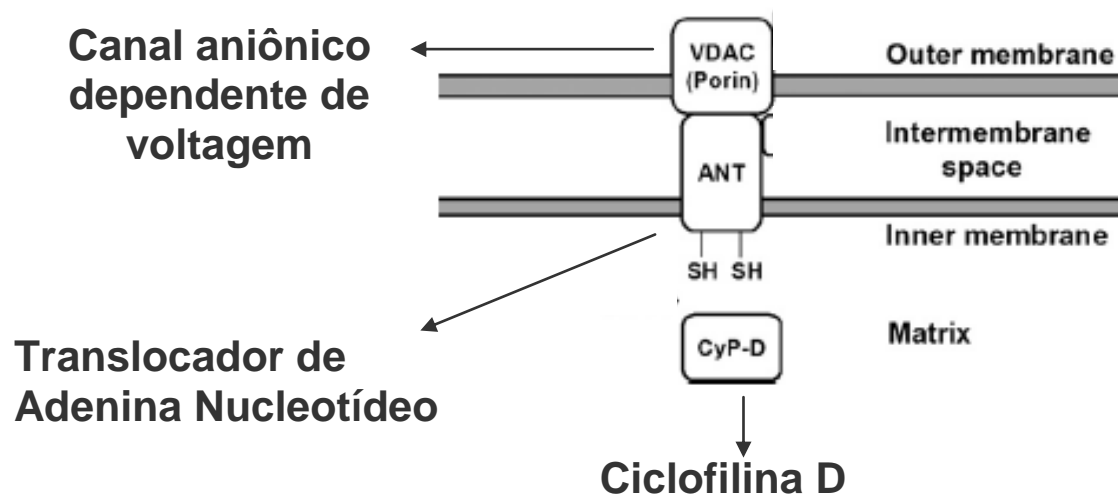


FIGURA 4. Representação genérica do poro de transição de permeabilidade mitocondrial
 FONTE: DUCHEN, *et al.*, 2008

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Estudos realizados no Laboratório de Oxidações Biológicas e de Cultivo Celular, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, apontam o composto mesoiônico MI-D como um potencial fármaco para o tratamento do melanoma. Estudos morfológicos também sugeriram que a morte celular ocorre por apoptose. Contudo, o mecanismo pelo qual ocorreria este tipo de morte ainda não foi esclarecido.

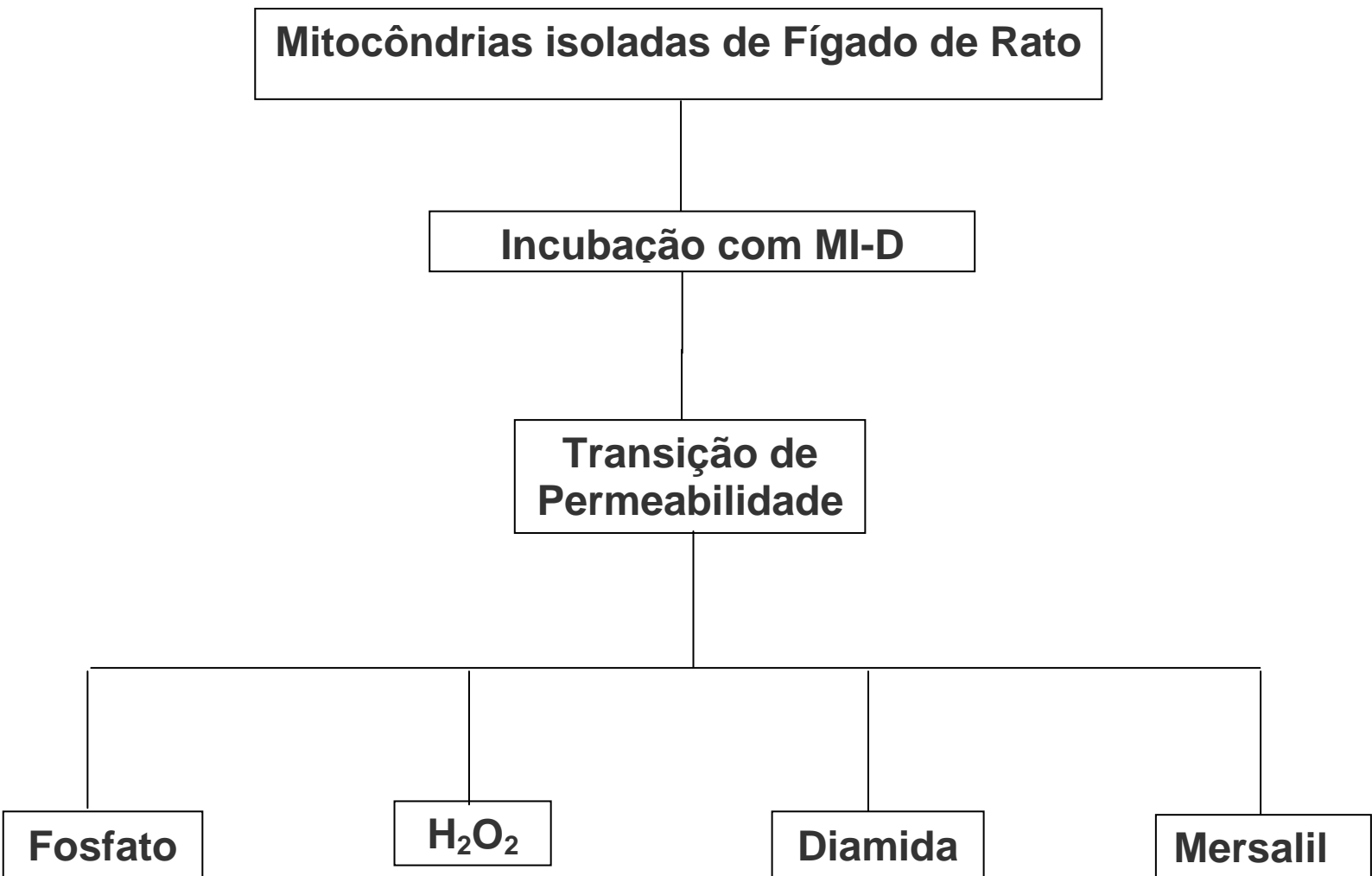
Em adição a ação antitumoral, o MI-D também exerce um importante efeito sobre a bioenergética mitocondrial, comprometendo de forma significativa os eventos relacionados à fosforilação oxidativa, incluindo a permeabilidade das membranas mitocondriais. Uma vez que alterações nesta permeabilidade podem desencadear a morte celular, e possível que o composto esteja causando a morte das células tumorais por eventos relacionados à via mitocondrial. Portanto, neste trabalho foram avaliados os efeitos do MI-D sobre atividades relacionadas à morte celular, desencadeada por funções mitocondriais, particularmente sobre a formação do poro de transição de permeabilidade, visando contribuir para o esclarecimento do mecanismo da importante ação antitumoral do composto.

3.1 Objetivos Específicos

Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, avaliar os efeitos do MI-D sobre a formação do poro de transição de permeabilidade utilizando diferentes indutores de PTPM em presença de Cálcio, nomeadamente:

- Fosfato
- H₂O₂
- Diamida
- Mersalil

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Compostos Mesoiónicos

O cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) foi sintetizado e gentilmente doados pela Prof^a. Dra. Áurea Echevarria do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ (DOS SANTOS & ECHEVARRIA, 2001). O composto teve sua estrutura confirmada por RMN ¹H e ¹³C e espectroscopia de massas (GRYNBERG *et al.*, 1997). A solução preparada em DMSO, à concentração final desejada, foi mantida congelada a -18°C, e utilizada no prazo máximo de 1 mês, após o preparo. As concentrações utilizadas nos ensaios foram estabelecidas experimentalmente, considerando também as informações da literatura prévia (CADENA *et al.*, 1998, 2002; SENFF-RIBEIRO 2003, 2004 a,b; HALILA *et al.*, 2007).

5.2 Animais

Para o isolamento de mitocôndrias de fígado de rato, foram utilizados ratos machos albinos Wistar, com peso variando entre 220-330 g, mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com dieta balanceada Purina e água à vontade, e para o isolamento das mitocôndrias, foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas, permitindo-se água à vontade. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, (Certificado número 242).

5.3 Isolamento de Mitocôndrias

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por VOSS *et al.* (1961), com algumas modificações, utilizando como meio de isolamento: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, EGTA 1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%. Para a obtenção das mitocôndrias, os animais foram sacrificados por decapitação. O fígado foi imediatamente retirado e imerso em meio de extração gelado. Após lavado, o órgão foi picado e homogeneizado em homogenizador van Potter Elvehjen, usando-se sucessivamente pistilo frouxo (3 vezes) e normal (2 vezes). O homogeneizado obtido foi centrifugado a 320 x g a 4°C em centrífuga Hitachi himac CR21E, durante 5 minutos, para eliminação de restos de células intactas, membranas e núcleos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 12.600 x g, durante 10 minutos a 4°C. O precipitado obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspensão, lavado duas vezes em meio de extração por centrifugação a 8.100 x g, durante 10 minutos a 4°C. As mitocôndrias assim obtidas foram ressuspensas em meio de extração e mantidas a 4°C até a sua utilização.

5.4 Determinação do consumo de O₂ e cálculo do coeficiente de controle respiratório (CCR)

O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas foi monitorado polarograficamente com eletrodo de oxigênio tipo Clark, em oxígrafo Gilson. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,3 mL, sob agitação, em câmara fechada termostaticada, a temperatura de 28°C (VOSS *et al.*, 1963).

O sistema de reação, constituído de: D-Manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%, foi suplementado com succinato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, rotenona 1 µmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 1,0 mmol.L⁻¹ e ADP 0,1 mmol.L⁻¹ e 1,0 mg de suspensão mitocondrial.

As velocidades respiratórias foram calculadas em nmol de O₂ consumidos min⁻¹.mg⁻¹ de proteína, considerando-se que a solubilidade do O₂ na água, a 28°C e 1 atm é de 235 μmol.L⁻¹ (ESTABROOK, 1967). O coeficiente de controle respiratório (CCR) foi obtido da razão entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado 3) e a velocidade após o consumo de ADP. Somente preparações com CCR igual ou superior a 4 foram utilizadas nos experimentos subseqüentes.

5.5 Transição de Permeabilidade Mitocondrial

Os experimentos de transição de permeabilidade mitocondrial foram realizados acompanhando-se o decréscimo da absorbância em 540nm relativa ao inchamento da organela conforme descrito anteriormente (GUNTER & PFEIFER, 1990. BERNARDI, 1992). O meio de reação foi constituído de D-manitol 250 mmol.L⁻¹, tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,2), fosfato de potássio 0,3 mmol.L⁻¹ glutamato 0,4 mmol.L⁻¹, proteína mitocondrial (mitocôndrias acopladas) 0,5 mg. mL⁻¹ e concentração de CaCl₂ adequada. Foram feitas adições individuais de ditioneitol (DTT) 1 mmol.L⁻¹, EGTA 1 mmol.L⁻¹, ciclosporina A (CsA) 0,5 μmol.L⁻¹, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 μmol.L⁻¹, diamida 1 mmol.L⁻¹ e mersalil 50 μmol.L⁻¹, de acordo com a situação experimental.

5.6 Determinação da Concentração de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As leituras foram realizadas a 700 nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U - 2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300.

5.7 Análise Estatística

Os resultados dos experimentos com H_2O_2 foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas e teste de Tukey para identificar as diferenças obtidas na ANOVA. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeitos do MI-D sobre a Transição de Permeabilidade Mitocondrial

Neste estudo foram utilizados três conhecidos inibidores do PTPM para comprovar que o inchamento observado era decorrente da formação do poro. Foram estes: EGTA, quelante de cálcio; DTT, agente redutor de pontes dissulfeto e ciclosporina A (CsA), inibidor de ciclofilina D (KOWALTOWSKI *et al.*, 1996). Observa-se na Figura 4 a completa inibição do inchamento mitocondrial em presença destes inibidores, em contraste ao inchamento observado para o experimento controle, realizado na ausência dos mesmos. Estes resultados confirmaram que o inchamento mitocondrial foi decorrente da formação do poro. Ainda na figura 4 observa-se que o MI-D (5-80 n.mol.mg⁻¹ prot) inibiu de forma dose-dependente o PTPM induzido por cálcio e fosfato.

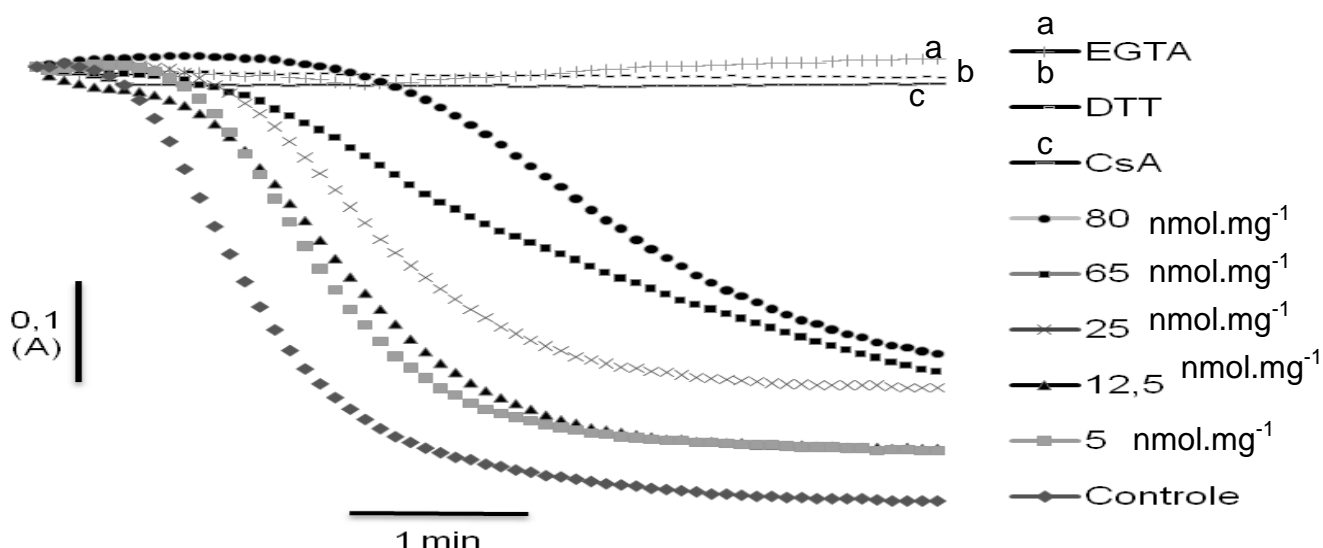


FIGURA 5. Efeito do MI-D sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por fosfato. NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, K₂HPO₄ 0,3 mmol.L⁻¹ CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹ na ausência de MI-D (controle) ou na presença de EGTA 1 mmol.L⁻¹, DTT 1 mmol.L⁻¹, CsA 0,5 μmol.L⁻¹ ou MI-D nas concentrações indicadas (nmol.mg⁻¹ prot.). Os traçados são representativos de 5 experimentos independentes.

Os efeitos do MI-D sobre a transição de permeabilidade mitocondrial em sistema induzido por fosfato (Figura 4) poderiam ser justificados pelos efeitos que o composto promove sobre a bioenergética mitocondrial, uma vez que o composto ao desacoplar o processo de fosforilação oxidativa (CADENA et al., 1998) poderia impedir a entrada no cálcio. No entanto, experimentos de captação de cálcio (MENDEZ-SANCHEZ, 2009), demonstraram que o composto interfere de maneira discreta na captação do íon. De posse desta informação, e também do conhecimento de que o MI-D é capaz de inibir a lipoperoxidação ferro induzida em mitocôndrias isoladas e de sequestrar O_2 em sistema livre de células (MENDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2009), foram realizados experimentos nos quais a formação do PTPM foi induzida por H_2O_2 em presença de cálcio e substrato oxidável.

Os resultados destes experimentos estão representados nas figuras 5 e 6. Observa-se que na ausência de cálcio não ocorreu o inchamento como era esperado, enquanto que na presença de cálcio (controle) ocorreu inchamento. A amplitude do inchamento foi maior na presença do indutor (H_2O_2), mas menor quando comparada àquela observada na figura 4, quando o indutor do PTPM foi o fosfato. Este resultado reflete a diferença entre os mecanismos envolvidos na formação do PTPM pelos indutores. O MI-D ($80 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ prot.}$) inibiu o inchamento mitocondrial induzido por H_2O_2 na presença de cálcio em $\sim 66\%$ (Figura 6), no entanto, o perfil observado foi diferente daquele quando o indutor utilizado foi o fosfato (Figura 4). O composto mesoiônico, durante os primeiros dois minutos de reação, promoveu completa inibição seguida de um gradativo, mas pequeno, aumento do inchamento mitocondrial.

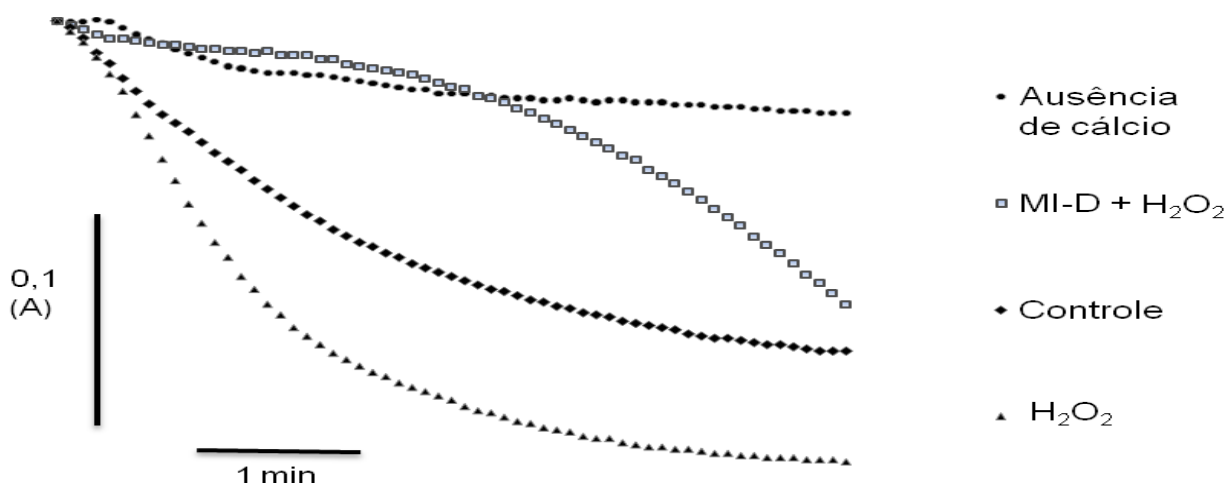


FIGURA 6. Efeito do MI-D sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por peróxido de hidrogênio.

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹. Todos os experimentos, com exceção do indicado na legenda, foram realizados na presença de cálcio e: na presença de MI-D (80 nmol.mg⁻¹ prot.) mais H₂O₂ (10 μmol.L⁻¹) – MI-D+H₂O₂; na ausência de H₂O₂ e MI-D – controle; na presença de H₂O₂ (10 μmol.L⁻¹) - H₂O₂. Os traçados são representativos de 6 experimentos independentes.

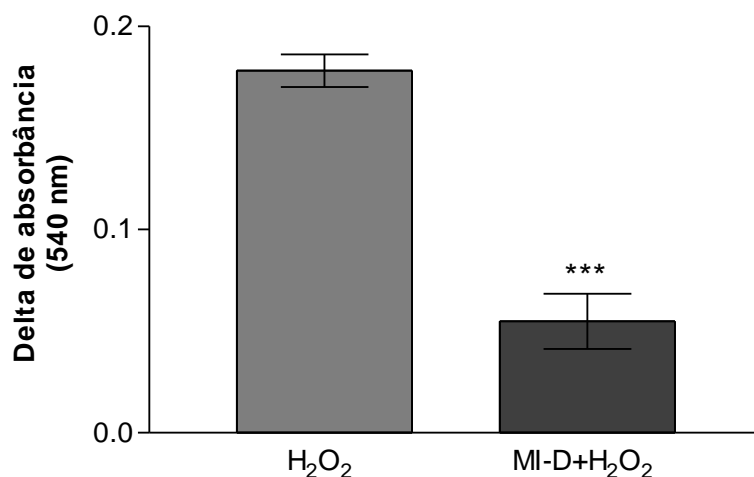


FIGURA 7. Efeito do MI-D sobre a transição de permeabilidade induzida por peróxido de hidrogênio.

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, CaCl₂ 45 μmol.L⁻¹ e 0,5 mg prot.mL⁻¹, a 28°C. O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L⁻¹, na presença de H₂O₂ (10 μmol.L⁻¹) ou na presença de MI-D (80 nmol.mg⁻¹ prot.) mais H₂O₂ (10 μmol.L⁻¹). Os valores representam a média ± dp do delta de absorbância (absorbância inicial menos absorbância final em 5 minutos), de 6 experimentos independentes.

*** Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,001$.

Para melhor entender os mecanismos pelos quais o MI-D inibe a formação do PTPM, optou-se então por utilizar um outro agente indutor, a diamida, um agente oxidante de grupamentos tióis. Os resultados obtidos estão representados na figura 7, onde se observa que na ausência do MI-D, e em presença de diamida e cálcio o inchamento mitocondrial foi maior, em relação àquele observado em presença do composto mesoiônico MI-D ($80 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ prot.}$). Além disso, observa-se ainda na figura 7 que em presença de MI-D ocorreu a contração da organela decorridos aproximadamente 180 segundos do ensaio.

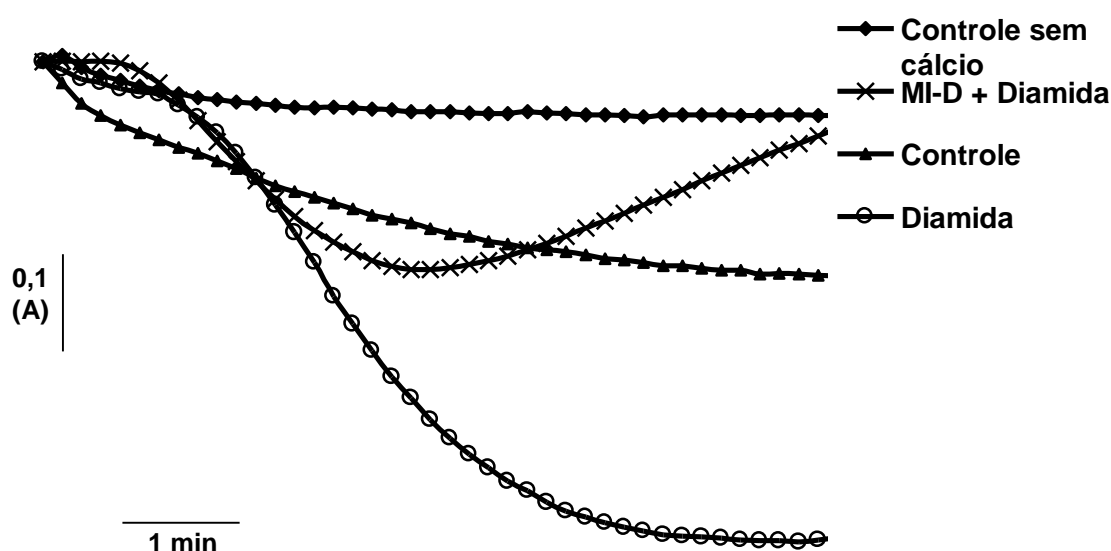


FIGURA 8. Efeito do MI-D sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por diamida. NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L^{-1} , HEPES 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2, CaCl_2 $45 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg prot.mL}^{-1}$, a 28°C . O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L^{-1} . Todos os experimentos, com exceção do indicado na legenda, foram realizados na presença de cálcio e: na presença de MI-D ($80 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ prot.}$) mais diamida (1 mmol.L^{-1}) – MI-D+diamida; na ausência de diamida e MI-D – controle; na presença de diamida (1 mmol.L^{-1}) - diamida. Os traçados são representativos de 5 experimentos independentes .

Ainda visando um melhor esclarecimento dos mecanismos de ação do MI-D sobre a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, também foram realizados experimentos com o agente indutor mersalil, que como a diamida, induz a redução dos grupamentos tióis da membrana. Os resultados estão representados na figura 8, onde se observa que na ausência de MI-D, e em presença de mersalil e cálcio, ocorre um acentuado inchamento, enquanto que na

presença de MI-D ($80 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ prot.}$), mersalil e cálcio, o inchamento mitocondrial foi totalmente inibido.

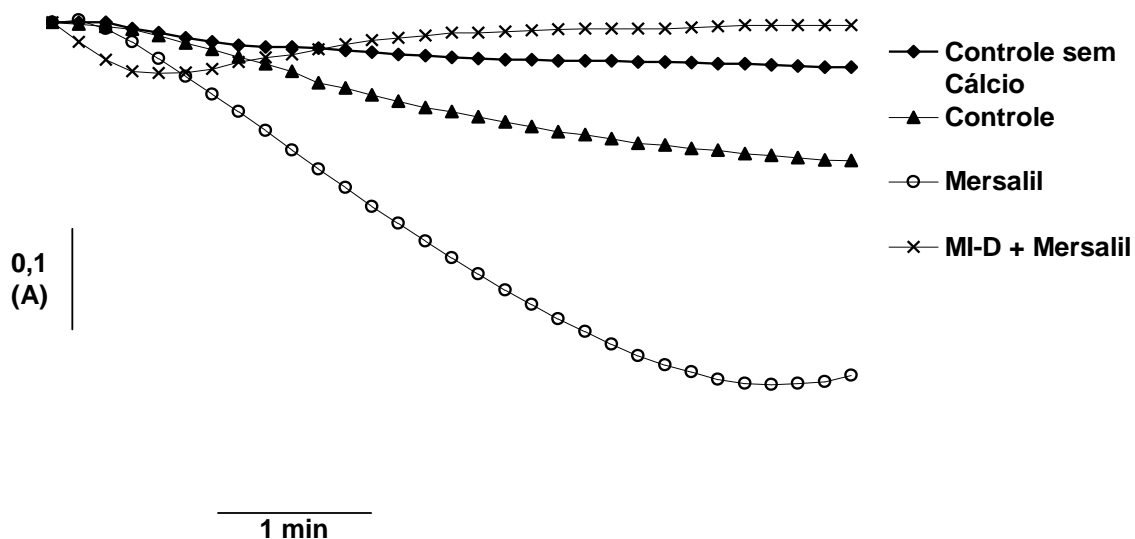


FIGURA 9. Efeito do MI-D sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por mersalil. NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L^{-1} , HEPES 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2, CaCl_2 $45 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg prot.mL}^{-1}$, a 28°C . O inchamento foi iniciado pela adição de glutamato de potássio 4 mmol.L^{-1} . Todos os experimentos, com exceção do indicado na legenda, foram realizados na presença de cálcio e: na presença de MI-D ($80 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ prot.}$) mais mersalil ($50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) – MI-D+mersalil; na ausência de mersalil e MI-D – controle; na presença de mersalil ($50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) - mersalil. Os traçados são representativos de 6 experimentos independentes .

Os resultados obtidos neste estudo confirmam os significativos efeitos do MI-D sobre o metabolismo energético mitocondrial (CADENA et al., 1998) e avançam no sentido do conhecimento do mecanismo envolvendo estes efeitos. Os efeitos do MI-D sobre o PTPM foram avaliados utilizando diferentes indutores. O PTPM permite a passagem de solutos de até 1500 Da , o que leva ao inchamento mitocondrial e ao rompimento da membrana mitocondrial externa, ocorrendo assim, a liberação de fatores proapoptóticos contidos no espaço intermembranas, entre eles o citocromo c. A formação do poro é dependente de vários fatores, como o aumento da concentração citosólica de cálcio, a diminuição da relação NADPH/NADP^+ e NADH/NAD^+ , a oxidação dos lipídeos de membrana e o aumento da concentração de fosfato, entre outros (GRIMM & BRDICZKA, 2007;

KOWALTOWSKI et al., 2001). Embora o MI-D tenha inibido o inchamento com os diferentes indutores, o perfil de inibição foi diferente (Figuras 4-8). Enquanto a inibição do inchamento promovida pelo MI-D em presença de fosfato persistia em função do tempo, observou-se um inchamento após 2 minutos na presença de peróxido. No caso da diamida, o inchamento passou a ser observado após 1 mim de reação, e persistiu durante aproximadamente 3 mim (180 s), quando houve uma recuperação da mitocôndria, com a diminuição do inchamento mitocondrial. Por sua vez, o inchamento promovido pelo indutor mersalil, na presença de MI-D (80 nmol.mg⁻¹ prot.), foi completamente inibido. Esta diferença nos efeitos promovidos pelo MI-D deve-se também à diferença de mecanismos dos indutores. O fosfato promove a entrada do cálcio, amplificando os seus efeitos sobre a mitocôndria, além disso, foi comprovado que o fosfato induz a lipoperoxidação por levar a formação de dienos conjugados (KOWALTOWSKI et al., 2001). O H₂O₂ atravessa a membrana mitocondrial, reage com proteínas ferro-enxofre da cadeia respiratória, induzindo a liberação de ferro e a reação de Fenton, o que por sua vez, pode levar a geração de radical hidroxila, a indução da lipoperoxidação e a formação do PTPM (OTT *et al.*, 2007). Tanto a diamida quanto o mersalil promovem a formação do PTPM ao oxidar grupos tióis, porém estes indutores possuem diferenças quanto a sua solubilidade, sendo a diamida lipossolúvel, agindo no interior da bicamada lipídica, e o mersalil hidrossolúvel, com ação nas regiões hidrofílicas da membrana (CASTILHO et al., 1995; ZORATTI & SZABÒ, 1995). Isso indica que a ação do MI-D na inibição da formação do poro de transição, sob efeito dos agentes indutores que oxidam grupos tióis, é mais efetiva quando esta formação do poro não envolve regiões lipossolúveis da membrana mitocondrial. O fato do MI-D possuir capacidade de sequestrar radicais superóxido (MENDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2009), também poderia participar da inibição observada, uma vez que as ERO estão envolvidas no mecanismo de ação destes indutores, no entanto, experimentos futuros devem ser realizados para esclarecer este mecanismo.

7 – CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

1) O MI-D inibe formação/abertura do poro de transição de permeabilidade em mitocôndrias isoladas, na presença de diferentes indutores, porém com diferentes perfis para cada indutor;

2) Em relação a interação do MI-D com a membrana mitocondrial e as consequências desta interação na formação/abertura do poro de transição de permeabilidade, as regiões hidrofílicas da membrana são mais protegidas pelo composto do que as hidrofóbicas, como mostrado pelos experimentos em presença dos indutores diamida e mersalil;

3) A ação antitumoral do MI-D não se deve a liberação de fatores apoptóticos como consequência da formação/abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporine-a-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient - evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 267, n. 13, p. 8834-8839, 1992.

BERNARDI, P. The permeability transition pore. Controle points of a cyclosporine A sensitive mitochondrial channel involved in cell death. **Biochim. Biophys. Acta.** Amsterdam, v. 1275, p. 5-9, 1996.

CADENA, S. M. S. C. **Contribuição ao conhecimento ao mecanismo de ação dos compostos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos.**, 169f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

CADENA, S. M. S. C.; CARNIERI, E. G.; ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M. B. M. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. **Cell Biochem. Funct.**, Curitiba, v. 20, p. 31-37, 2002.

CADENA, S. M. S. C.; CARNIERI, E. G.; ESCHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 440, n. 1-2, p. 46-50, 1998.

CARDOSO, C.M.P; CUSTODIO, J.B.A; ALMEIDA, L.M; MORENO, A.J.M. Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. **Toxicol. appl. Pharmacol.**, Orlando, v. 176, p. 145-152, 2001.

CARDOSO, J.C.; CADENA, S.M.S.C.; ZAMPRONIO, A.; ARRUDA, A.M.S.; CARNIERI, E.G.S.; ECHEVARRIA, A.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A. OLIVEIRA, M.B.O. Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on acute inflammatory response. **Drug Develop. Res.**, Hoboken, v.61, n. 4, p. 207-217, 2004.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; MEINICKE, A. R.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A. R. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.18, p. 479-486, 1995.

CUSTODIO, J.B.A; MORENO, A.J.M; WALLACE, K.B. Tamoxifen inhibits induction of mitochondrial permeability transition by Ca^{2+} and inorganic phosphate. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Orlando, v. 152, p. 10-17, 1998.

DA SILVA, E.F; CANTO-CAVALHEIRO, M.M; BRAZ, V.R; CYSNE-FINKELSTEIN, L; LEON, L.L; ECHEVARRIA, A. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. **Eur. J. Med. Chem.**, Paris, v. 37, p. 979-984, 2002

DOS SANTOS, A.C.S.; ECHEVARRIA, A. Eletronic effects on ^{13}C NMR chemical shifts of substituted 1,3,4-thiadiazolium salts. **Magn. Reson. Chem.**, Chichester, v. 39, p. 182-186, 2001.

ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. **Methods. Enzymol.**, New York, v. 10, p. 41-47, 1967.

FERLINI, C; SCAMBIA, G; MARONE, M. Tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis in oestrogen receptor-negative human cancer cell lines. **Br. J. Cancer.**, London, v. 79, p. 257-263, 1999.

GRIMM, S.; BRDICZKA, D. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis*. Dordrecht, v. 12, p. 841-855, 2007.

GRYNBERG, N.; SANTOS, A. C.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium - 2- aminide class. **Anti-Cancer Drugs**, Oxford, v. 8, p. 88-91, 1997.

GUNTER, T.E.; PFEIFFER, D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.258, p. 755-786, 1990.

HAIL Jr, N. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. **Apoptosis**, Dordrecht, v. 10, p. 687 – 705, 2005.

IKEDA, K; INOUE, S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. **Arch. Histol. Cytol.**, Niigata, v. 67, n. 5, p. 435-442, 2004.

KIER, L. B.; ROCHE, E. B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v 56, p 148-169, 1967.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R.F.; GRIJALBA, M.; BECHARA, E. J.H. VERCESI, A. E. Effect of Inorganic Phosphate Concentration on the Nature of Inner Mitochondrial Membrane Alterations Mediated by Ca²⁺ Ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol. Chem.** Bethesda, v. 271, p. 2929-2934, 1996.

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

KROEMER, G; PETIT, P; ZAMZAMI, N; VAYSSICRE, J-L. The biochemistry of programmed cell death. **FASEB J.**, Bethesda, v. 9, p. 1277-1287, 1995.

LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; FILHO, J. M. B.; FILHO, L. X. Atividades antibacteriana e antifúngica de derivados mesoiônicos. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 132-136, 1986.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. C.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MENDEZ-SANCHEZ, S. C. **Efeitos do Composto Meso-iônico MI-D e da Imida Cíclica S2.2 sobre Mecanismos Relacionados à Indução de Morte Celular por Via Mitocondrial.** 150f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MENDEZ-SANCHEZ, S.C.; MARTINEZ, G. R.; ROMÃO, S.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E., ROCHA, M.E.M.; NOLETO, G.R.; CARNIERI, E.G.S.; CADENA, S.M.S.C.; OLIVEIRA, M.B.M. The inhibition of lipoperoxidation by mesoionic compound MI-D: A relationship with its uncoupling effect and scavenging activity. **Chem. Biol. Interact.**, Curitiba, v. 179, p.125-130, 2009.

MONTANARI, C.A; AMARAL, A.T; GIESBRECHT, A.M. Synthesis and antibacterial activity of some new 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives. **Pharm. Sci.**, Wallingford, v. 3, p. 565-568, 1997.

MONTANARI, C.A; BEEZER, A.E; SANDALL, J.P.B; MONTANARI, M.L.C; MILLER, J; GIESBRECHT, A.M. On the interaction of some mesoionic compounds with *Saccharomyces-cerevisiae* by biological microcalorimetry. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 274-278, 1992.

NEWTON,C.G.; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic heterocycles. **Tetrahedron.** Oxford, v.38, p. 2965-3011, 1982.

OLLIS, W.D.; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic compounds. **Adv. Heterocycl. Chem.**, San Diego, v.19, n. 1, p. 1-121, 1976.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**. Dordrecht, v. 12, p. 913-922, 2007.

SENFF-RIBEIRO,A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; FRANCO, C.R.C.; VEIGA, S.S.; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic Effect of a new 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Compound (MI-D) on Cell Lines of Human Melanoma. **Brit. J. Cancer**, London, v.91, p. 297-304, 2004b.

SENFF-RIBEIRO,A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; VEIGA, S.S.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of a New 1,3,4-thiadiazolium Mesoionic Compound (MI-D) on B16-F10 Murine Melanoma. **Melanoma Res.**, London, v. 13(5), p. 465-472, 2003.

SENFF-RIBEIRO,A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; VEIGA, S.S.; OLIVEIRA, M.B.M. Antimelanoma Activity of 1,3,4-thiadiazolium Mesoionics: a Structure-Activity Relationship Study. **Anti-Cancer Drugs**, London, v.15(3), p. 269-275, 2004a.

TUQUET, C; DUPONT, J; MESNEAU, A; ROUSSAUX, J. Effects of tamoxifen on electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. **Cell Biol. Toxicol.**, Dordrecht, v. 16, p. 207-219, 2000.

VOSS, D O.; CAMPELO, A. P.; BACILA, M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** , Orlando, v. 4, n. 1, p. 48 - 51, 1961.

VOSS, D.O; COWLES, J.C; BACILA, M. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 6, p.211-222, 1963.

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