

**A Deus... por guiar nossos passos, nos proteger e ter permitido
concluir mais esta etapa de minha vida.**

Sou muito grata por tudo.

**A minha amada Mãe Maria de Fátima pelo apoio, incentivo e
amor incondicional, obrigada por todo o sacrifício
pela minha felicidade.**

Espero ter valido a pena...

**Ao meu amado esposo Celsi... Obrigada pela compreensão,
incentivo e pelo seu amor que me fortalece e
me completa todos os dias.**

Te amo muito!

**Aos meus irmãos Fabiano e Rafaela, ao meu pai
Manoel e minha tia Elizabeth...
pelo apoio, incentivo e carinho. Amo muito vocês!**

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a. Silvia Maria Suter Correia Cadena pela orientação e dedicação durante a execução deste trabalho. É com muito carinho e respeito que agradeço pela sua gentileza, compreensão e dedicação. Obrigada por acreditar em mim!

A toda a minha família que sempre me apoiou e incentivou em todos os momentos.

As minhas queridas amigas Michele, Fabiana e Nelissa, pelos passeios, os desabafos e as muitas risadas...

À Professora Dr^a. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, pela co-orientação e pelo exemplo de profissional.

À Professora Dr^a. Maria Eliane Merlin Rocha pelo auxílio durante a realização dos experimentos e correção do relatório e do projeto de pesquisa.

Às Professoras do Laboratório de Oxidações Biológicas Dr^a. Gláucia Martinez e Dr^a. Guilhermina Noletto pelo auxílio com os equipamentos e resolução dos problemas no laboratório e à Professora Dr^a. Eva Carnieri pelas correções dos textos.

Ao Professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Professor Dr. Philip Gorin pela correção do abstracto.

À Professora Dr^a. Áurea Echevarria pela gentil doação dos compostos estudados neste trabalho.

À Viviane e a Caroline pelas conversas animadas, conselhos e pela agradável companhia.

À Tatiana Herrerias pelo auxílio com os protocolos e equipamentos. E aos colegas de laboratório Rosilene, Tatiana, Fabiana, Camila, Danilo, Eduardo, Paulo, Gláucio, Carolina e Silvia pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

À Silvana Bueno pelo suporte técnico.

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação e professores do departamento de Bioquímica da UFPR.

À Sr^a. Marilza Lamour pelo auxílio prestado.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

**Entrega o teu caminho ao Senhor,
confia nele e ele tudo fará
Salmo 37:5**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 MITOCÔNDRIAS – ASPECTOS FUNCIONAIS, METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS E MORTE CELULAR.....	4
2.2 COMPOSTOS MESOIÔNICOS.....	7
2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS.....	15
2.3.1 Sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olatos).....	15
2.3.2 Sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminidas).....	18
2.3.3 Oxatriazóis Mesoioônicos.....	22
2.3.4 Compostos 1,3,4-Tiadiazóis Mesoioônicos.....	24
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 REAGENTES.....	36
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS..	36
4.3 ANIMAIS.....	39
4.4 EFEITOS DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL.....	39
4.4.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	39

4.4.1.1	Isolamento de mitocôndrias para determinação do consumo de oxigênio e atividade ATPásica.....	39
4.4.1.2	Isolamento de mitocôndrias para determinação do grau de inchamento mitocondrial.....	40
4.4.1.3	Obtenção de mitocôndrias rompidas para avaliação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória.....	40
4.5	MÉTODOS ANALÍTICOS ENVOLVENDO AS PREPARAÇÕES MITOCONDRIAIS.....	40
4.5.1	Determinação do consumo de O ₂ , cálculo do coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O.....	40
4.5.2	Determinação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória.....	41
4.5.2.1	NADH oxidase (NADH; Oxigênio Óxido Redutase).....	42
4.5.2.2	NADH-Desidrogenase (NADH: Ferricianeto Óxido Redutase EC 1.6.5.3).....	42
4.5.2.3	NADH citocromo <i>c</i> redutase (NADH: Citocromo <i>c</i> Óxido Redutase EC 1.6.99.3).....	42
4.5.2.4	Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase).....	43
4.5.2.5	Desidrogenase succínica (Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido Redutase EC 1.3.5.1).....	43
4.5.2.6	Succinato citocromo <i>c</i> redutase (Succinato: Ferrocitocromo <i>c</i> Óxido Redutase EC 1.3.99.1).....	44
4.5.2.7	Citocromo <i>c</i> oxidase (Ferrocitocromo <i>c</i> : Oxigênio Óxido Redutase EC 1.9.3.1).....	44
4.5.2.7.1	Obtenção do ferrocitocromo <i>c</i>	44
4.5.2.7.2	Determinação da atividade do complexo citocromo <i>c</i> oxidase.....	44
4.5.2.8	Determinação da atividade da F ₁ F ₀ ATPase.....	45
4.5.2.8.1	Determinação da atividade da F ₁ F ₀ ATPase em mitocôndrias rompidas.....	45
4.5.2.8.2	Determinação da atividade da F ₁ F ₀ ATPase em mitocôndrias intactas..	45

4.5.3	Determinação do inchamento (swelling) em mitocôndrias desenergizadas na presença de valinomicina e K^+	46
4.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	46
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4.8	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO E PARÂMETROS RELACIONADOS	50
5.2	EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A ATIVIDADE DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA.....	62
5.3	EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE A ATIVIDADE DO COMPLEXO ENZIMÁTICO F_1F_0 ATPase.....	69
5.4	EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS SOBRE O INCHAMENTO MITOCONDRIAL.....	74
6	DISCUSSÃO FINAL.....	80
7	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
	ANEXO.....	101

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESTRUTURA QUÍMICA DAS BETAÍNAS (A) E DAS TROPONAS (B).....	8
FIGURA 2	REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO.....	9
FIGURA 3	REPRESENTAÇÃO E EXEMPLOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS DOS TIPOS A E B.....	10
FIGURA 4	ESTRUTURAS REPRESENTATIVAS DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS COM DESTACADA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	14
FIGURA 5	ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-[4-X-3-NITROFENIL]-1,2,3-OXADIAZÓLIO-5-OLATO.....	17
FIGURA 6	ESTRUTURA QUÍMICA DE SIDNONAS DAS SÉRIES I E II.....	18
FIGURA 7	ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLSIDOMINA, SIN-1 E SIN-1A.....	19
FIGURA 8	ESTRUTURA QUÍMICA DAS 3-ARILALQUIL-N-X-5-SIDNONIMINAS.....	21
FIGURA 9	ESTRUTURA QUÍMICA DAS 3-ALQUIL-N-X-5-SIDNONIMINAS.....	21
FIGURA 10	ESTRUTURA DO SIN-1 LIGADO A GLUCOSE OU GALACTOSE....	21
FIGURA 11	ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS Ψ-OXATRIAZÓIS.....	22
FIGURA 12	ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS 3-ARIL SUBSTITUÍDOS OXATRIAZÓIS-5-IMINA: GEA 3162 E GEA 3175.....	24
FIGURA 13	ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS 4-FENIL-5-X-1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS.....	25
FIGURA 14	ESTRUTURA QUÍMICA DO 1,3,4-TIADIAZÓIS[3,2,A] PIRIMIDINA.....	26
FIGURA 15	ESTRUTURA QUÍMICA DO 4,5-DIFENIL-2-TIOLATO-1,3,4-TIADIAZÓLIO.....	26

FIGURA 16	ESTRUTURA DO COMPOSTO MESOIÔNICO 1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-AMINIDA ATIVO CONTRA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
FIGURA 17	ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS-2-AMINIDA: A. COMO ÁCIDOS CONJUGADOS E B. COMO BASES LIVRES.....	28
FIGURA 18	ESTRUTURAS QUÍMICAS DE DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS.....	29
FIGURA 19	ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS.....	38
FIGURA 20	EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO POR MITOCÔNDRIAS EM PRESENÇA DE OLIGOMICINA.....	56
FIGURA 21	EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO POR MITOCÔNDRIAS DESACOPLADAS COM FCCP.....	61
FIGURA 22	EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE A ATIVIDADE DE F ₁ F ₀ ATPase – MITOCÔNDRIAS INTACTAS..	72
FIGURA 23	EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE A ATIVIDADE DE F ₁ F ₀ ATPase – MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS.	73
FIGURA 24	EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DESENERGIZADAS.....	76
FIGURA 25	ESTRUTURA DE RESSONÂNCIA PROPOSTA DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	HETEROCÍCLICOS MESOIÔNICOS DO TIPO A.....	11
TABELA 2	HETEROCÍCLICOS MESOIÔNICOS DO TIPO B.....	13
TABELA 3	EFEITOS DO MI-J SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS GLUTAMATO E MALATO.....	51
TABELA 4	EFEITOS DO MI-4F SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS GLUTAMATO E MALATO.....	51
TABELA 5	EFEITOS DO MI-2,4DIF SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS GLUTAMATO E MALATO.....	52
TABELA 6	EFEITOS DO MI-J SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATO SUCCINATO.....	58
TABELA 7	EFEITOS DO MI-4F SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATO SUCCINATO.....	59
TABELA 8	EFEITOS DO MI-2,4DIF SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATO SUCCINATO.....	59
TABELA 9	EFEITOS DO MI-J SOBRE OS COMPLEXOS E SEGMENTOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA	63
TABELA 10	EFEITOS DO MI-4F SOBRE OS COMPLEXOS E SEGMENTOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA	65
TABELA 11	EFEITOS DO MI-2,4DIF SOBRE OS COMPLEXOS E SEGMENTOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
ADP/O	Quociente entre nanomol de ADP e nanoátomos de oxigênio consumidos durante o estado 3
ANT	Translocador Nucleotídeo Adenina
BSA	Albumina de soro bovino
CCR	Coefficiente de controle respiratório
COX-2	Ciclooxigenase 2
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DMPC	Dimiristoil-fosfatidilcolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPH-PA	3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenil-ácido propiônico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol bis (éter 2-amino-etil) N, N, N', N' tetracético
FCCP	Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
Hepes	N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
DL ₅₀	Dose que causa morte em 50%
OSCP	Oligomycin-sensitivity conferring protein
P	Polarização
PEP	Fosfoenolpiruvato
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
Pi	Fosfato inorgânico
PMA	12-meristato 13-acetato forbol éster
PMS	Fenazina metassulfato
PTP	Poros de transição de permeabilidade
RE	Receptor de Estrógeno
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de próton
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil) amino metano
TUNEL	TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling
UV-VIS	Ultra-violeta e visível
Δp	Força próton-motriz
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana
$\Delta\mu_{\text{H}^+}$	Gradiente eletroquímico de prótons

RESUMO

Os compostos mesoiônicos têm potencial aplicação terapêutica devido a sua estrutura e características físico-químicas. Possuem baixo peso molecular, caráter aromático e um grande momento de dipolo, o qual favorece fortes interações eletrostáticas com biomoléculas como o DNA e proteínas. Embora sejam moléculas internamente carregadas, possuem caráter global neutro e, portanto, podem atravessar membranas biológicas. Neste estudo foram avaliados os efeitos de quatro derivados, nomeadamente: cloretos de 4-fenil-5-(2'-Y, 4'-X ou 4'-X-cinamoil)-1,3,4 – tiadiazólio fenilamina, sobre a bioenergética mitocondrial. Os compostos diferiram um do outro apenas no substituinte do anel cinamoil: MI-J, X=OH; MI-F, X=F; MI-2,4diF X=Y=F. Os resultados foram comparados aos anteriormente descritos para outro derivado mesoiônico desta mesma classe, o MI-D (X=NO₂). Utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de rato, procuramos correlacionar estes efeitos a atividade antimelanoma previamente descrita para estes derivados por Senff-Ribeiro et al. (2004a). A velocidade respiratória do estado 3 foi fortemente diminuída pelos três derivados, chegando a 100% para o MI-4F e MI-2,4diF (130 nmol.mg⁻¹ de proteína mitocondrial) quando utilizados glutamato e malato como substratos oxidáveis. Com o succinato a inibição do estado 3 foi menos pronunciada. A análise da atividade enzimática dos segmentos da cadeia respiratória indicou como alvos de inibição dos derivados os complexos I e IV. O estado 4 da respiração foi fortemente estimulado pelos três derivados, sugerindo um efeito desacoplador, sendo este mais acentuado para o MI-4F. O estímulo do estado 4 foi tão acentuado que somente para a menor concentração (6,5 nmol⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial) foi possível determinar os valores de CCR e razão ADP/O, que foram diminuídos. A atividade ATPásica em mitocôndrias intactas foi estimulada pelos compostos, em cerca de 120%, 207% e 261% para MI-J, MI-4F e MI-2,4diF (32,5 nmol.mg⁻¹ proteína mitocondrial), respectivamente. Entretanto na maior concentração (130 nmol.mg⁻¹ proteína mitocondrial) o complexo enzimático não foi afetado. A amplitude do inchamento induzido por valinomicina e K⁺ de mitocôndrias desenergizadas foi diminuída em cerca de 50%, 67% e 56%, respectivamente para o MI-J, MI-4-F e MI-2,4diF na concentração de 130 nmol.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, sugerindo que os derivados afetam a permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Os resultados obtidos neste estudo, ao contrário do observado para o modelo de melanoma, no qual o MI-D foi o mais efetivo, demonstraram que os efeitos dos derivados MI-4F e MI-2,4diF sobre a bioenergética mitocondrial parecem ser mais pronunciados quando comparados aos promovidos pelo MI-J e MI-D (Cadena et al, 1998) e, ainda, sugerem que a atividade antimelanoma anteriormente descrita não resulta exclusivamente dos efeitos dos derivados sobre as funções mitocondriais, mas envolvem outros mecanismos.

ABSTRACT

Mesoionic compounds possess potential therapeutic applications due to their structure and physical-chemistry characteristics. They have a low molecular weight, aromatic character, and a high dipole moment, that favors strong electrostatic interactions with macromolecules such as DNA and proteins. Although the molecules are internally charged, they are neutral overall and, therefore, can cross biological membranes. In this study, we evaluated the effects of three derivatives, namely chlorides of 4-phenyl-5-(2'-Y, 4'-X or 4'-X cinnamoyl) - 1,3,4 - thiadiazolium phenylamine, on mitochondrial bioenergetics. They differed from each other only, as the cinnamoyl ring substituent: MI-J, X=OH; MI-F, X=F; MI-2,4diF X=Y=F. The results were compared to those previously described for another mesoionic derivative of this same class, MI-D (X=NO₂). Using isolated rat liver mitochondria, we attempted to correlate the effects caused on the mitochondrial bioenergetics to chemical structure and the antimelanoma activity previously described for these derivatives by Senff-Ribeiro et al. (2004a). The respiratory rate of state 3 was strongly decreased by all derivatives, reaching inhibition of state 3 to 100% for MI-4F and MI-2,4diF (130 nmol.mg⁻¹ protein), when glutamate plus malate were used as the oxidizable substrate. With succinate, the inhibition of state 3 was less accentuated. Analysis of segments of the respiratory chain indicated that inhibition sites of the derivatives are complexes I and IV. State 4 of the respiration was strongly stimulated by the three derivatives, being characterized as an uncoupler effect, which was more intense for MI-4F. This stimulus was so intense that it was only possible to determine the values of CCR and ADP/O ratio for the lowest concentration (6.5 nmol.mg⁻¹ protein), which were decreased. The ATPase activity was dramatically increased in intact mitochondria by ~120%, ~207% and ~261% for MI-J, MI-4F and MI-2,4diF (32.5 nmol.mg⁻¹ protein), respectively. However, at the highest concentration (130 nmol.mg⁻¹ protein), the enzymatic complex was not affected. The swelling amplitude of de-energized mitochondria induced by K⁺ and valinomycin was decreased by ~50%, ~67% and ~56% respectively for MI-J, MI-4-F and MI-2,4diF at 130 nmol.mg⁻¹ protein, suggesting that they interfere with the inner mitochondrial membrane permeability. Therefore, in contrast to that observed with the melanoma model, where the MI-D was the most effective, the effects on the mitochondrial function promoted by MI-4F and MI-2,4diF seem to be more pronounced, when compared to those caused by MI-J, as well as MI-D (Cadena et al, 1998), and suggest that previously described antimelanoma activity for these derivatives is not exclusively result of their effect on the mitochondrial functions, but involves other mechanisms.