

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os compostos mesoiônicos possuem características físico-químicas singulares e tem despertado muito interesse devido ao fato de seus derivados apresentarem atividade biológica. Entre os compostos mesoiônicos, destacam-se os derivados 1,3,4-tiadiazóis por possuírem uma importante atividade antitumoral (GRYNBERG et al., 1997; SENFF-RIBEIRO et al., 2003, 2004a). Entretanto, pouco se conhece sobre seus efeitos sobre a bioenergética mitocondrial. Neste sentido, o cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) é um dos derivados mais estudados. Em estudos utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de rato este derivado foi classificado como um agente desacoplador inibitório, sendo tal efeito relacionado com a interação do composto com a membrana mitocondrial interna (CADENA et al., 1998, 2002). Considerando os importantes efeitos biológicos desta classe de compostos e a pouca disponibilidade de informações na literatura a respeito de sua ação sobre a bioenergética mitocondrial, neste trabalho, foram estudados três derivados 1,3,4-tiadiazólio que possuem estrutura semelhante a do MI-D diferindo apenas nos substituintes do anel cinamoil, sendo eles: cloreto de 4-fenil-5-[4-hidroxicinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-J); cloreto de 4-fenil-5-[4-fluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-F) e cloreto de 4-fenil-5-[2,4-difluorcinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-2,4diF).

Nosso objetivo foi correlacionar a estrutura química dos compostos aos efeitos sobre a bioenergética mitocondrial e a atividade antitumoral previamente demonstrada por SENFF-RIBEIRO e colaboradores (2003, 2004a). Para isto, mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram utilizadas como modelo experimental devido ao seu envolvimento na provisão de energia, nos mecanismos de morte celular e sua ampla utilização em estudos que avaliam a toxicidade e o mecanismo de ação de muitas drogas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mitocôndrias – Aspectos Funcionais, Metabolismo de Xenobióticos e Morte Celular.

As mitocôndrias foram as primeiras organelas isoladas em preparações livres de outras membranas celulares e, por este motivo, têm sido utilizadas como modelo experimental em estudos sobre a biogênese, aspectos estruturais e funcionais das membranas biológicas (TZAGOLOFF, 1982). Por serem responsáveis pela maior parte da energia gerada e utilizada pelas células eucarióticas estas organelas desempenham papel fundamental na sobrevivência celular (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Devido as suas características estruturais e funcionais, as mitocôndrias provêm uma série de alvos primários para xenobióticos indutores do “colapso bioenergético”. Existem muitos compostos naturais, comerciais, farmacêuticos e ambientais que manifestam sua toxicidade por interferirem na bioenergética mitocondrial, sendo importante o esclarecimento destes efeitos para o entendimento de seus mecanismos de ação (WALLACE & STARKOV, 2000).

Vários compostos capazes de promover alterações nas funções mitocondriais têm sido descritos na literatura científica (WALLACE & STARKOV, 2000). Entre estes, os denominados agentes desacopladores aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons comprometendo a formação do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu_{H^+}$) e, conseqüentemente, a produção de ATP (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Muitos xenobióticos como: antiinflamatórios, antipsicóticos, antidepressivos, antimicóticos, inseticidas, herbicidas e drogas antitumorais exercem ação desacopladora (WALLACE & STARKOV, 2000). Em relação aos antiinflamatórios não esteroidais, a atividade desacopladora é considerada uma característica comum, como por exemplo, para a indometacina, ácido mefenâmico, diclofenaco, difenilamina e a aspirina, sendo em alguns casos tal efeito observado tanto em mitocôndrias isoladas quanto em fígado de rato perfundido, em concentrações empregadas na terapêutica (KEMMELMEYER & BRACHT, 1989; PETRESCU & TARBA, 1997; MASUBUCHI et al, 1999; MORENO-SANCHEZ et al., 1999; JACOB et al., 2001).

O efeito desacoplador de um composto pode ser decorrente de sua direta interação com a membrana mitocondrial interna. Neste sentido, sabe-se que muitas drogas apresentam uma alta afinidade por cardiolipinas presentes na membrana mitocondrial interna e preferencialmente se ligam a este lipídeo, concentrando-se nesta membrana (WALLACE & STARKOV, 2000). Quando estes compostos se inserem na membrana mitocondrial e/ou quando interagem com os complexos transportadores de elétrons podem, também, alterar o fluxo de elétrons diminuindo sua velocidade (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Neste caso, os compostos em questão atuam como inibidores do transporte de elétrons, dentre os quais se incluem alguns fungicidas como fenfuram, neurolépticos, anti-histamínicos, drogas antiangina, anti-sépticos, antibióticos e inseticidas (WALLACE & STARKOV, 2000).

Mais recentemente, as mitocôndrias vêm sendo consideradas como um novo alvo para a quimioterapia do câncer. Isto porque muitos agentes quimioterápicos alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial em células neoplásicas, levando a liberação de proteínas mitocondriais apoptogênicas (HAIL, 2005). A apoptose, ou morte celular programada, é uma forma fisiológica de morte celular que tem papel crítico no desenvolvimento e manutenção de organismos multicelulares (LOO & RILLEMA, 1998). Constitui um mecanismo utilizado para regular a homeostase de tecidos através da eliminação controlada de células desnecessárias ou potencialmente deletérias (HAIL, 2005). Muitas doenças humanas podem ser diretamente ligadas a regulação deficiente da apoptose. Por exemplo, a apoptose excessiva pode levar a doença de Alzheimer ou síndrome de imunodeficiência. Por outro lado, a falta ou a insuficiência do processo apoptótico pode levar a desordens autoimunes ou câncer (KROEMER et al., 1998; MIGNOTTE & VAYSSIERE, 1998).

Muitos compostos utilizados como agentes quimiopreventivos do câncer possuem a habilidade de induzir a apoptose em células malignas *in vitro* devido a sua ação sobre a bioenergética mitocondrial (HAIL, 2005). A morte celular por apoptose mediada 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).

Um exemplo de composto que induz a apoptose através da sua ação sobre a bioenergética mitocondrial é o antiestrogênio tamoxifeno, utilizado na prevenção do câncer de mama. O tamoxifeno é um agente antiestrogênico não-esteroidal sintético amplamente utilizado no tratamento de neoplasias estrógeno-dependente, incluindo câncer de mama (CUSTODIO et al., 1998). Seu mecanismo de ação ainda não está definido, porém aceita-se a hipótese de seu efeito ser dependente de receptores de estrógeno (RE). O estrógeno tem papel crucial na proliferação de células em organismos reprodutivos tais como mama e útero e este crescimento é dependente da presença de RE nestas células. Muitos portadores de câncer de mama apresentam alta expressão de RE. No tratamento desta neoplasia o tamoxifeno se liga a estes RE mimetizando o estrógeno e, como consequência a indução da proliferação celular não ocorre (IKEDA & INOUE, 2004). Entretanto, muitos portadores de câncer de mama não dependentes de RE respondem ao tratamento com tamoxifeno. Muitos trabalhos atribuem esta resposta aos efeitos causados pelo tamoxifeno 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).

Ainda neste contexto, DALEY et al., (2005) demonstraram a habilidade do antidepressivo clorimipramina em induzir a morte de células de glioma humano *in vitro* por um mecanismo resultante do aumento da atividade da caspase 3 seguida da inibição do consumo de oxigênio. Em mitocôndria isolada a droga se liga ao complexo III inibindo-o e, desta forma, aumentando a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, diminuindo o potencial de membrana e causando o inchamento da organela, com ou sem a formação do poro de transição de permeabilidade.

A mitocôndria também está envolvida no processo de morte celular por necrose. A necrose é o processo de morte celular “acidental ou desregulada”. Disfunções

mitocondriais como colapso do potencial transmembrana, desacoplamento da fosforilação oxidativa e hiperprodução de espécies reativas de oxigênio impõem uma “catástrofe” bioenergética que culmina na ruptura da membrana plasmática, característica da necrose. Muitos modelos de necrose *in vitro* mostram que a dissipação do $\Delta\Psi_m$ ocorre antes do rompimento da membrana plasmática e da célula manifestar danos tais como vacuolização ou *swelling* citoplasmático (KROEMER et al., 1998). O equilíbrio entre apoptose e necrose pode ser influenciado pelos níveis de ATP intracelular. Em contraste com a necrose, o processo de morte celular por apoptose necessita de alta concentração de ATP para ocorrer. Desta forma, os níveis de ATP intracelular decidem o tipo de sistema de morte celular. Altas concentrações de ATP favorecem a apoptose e baixas concentrações a necrose (LEIST et al., 1997).

2.2 Compostos Meso-iônicos

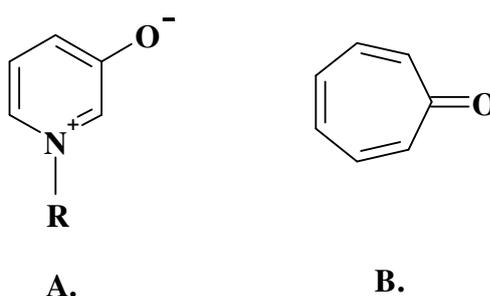
Na natureza, todos os processos biológicos, desde os menos complexos, como a provisão de energia, até os mais complexos como transferência e armazenamento de informação genética, são químicos e envolvem a participação de muitos compostos heterocíclicos. Centenas de compostos farmacologicamente importantes são estruturalmente derivados de heterocíclicos como, por exemplo, os alcalóides. Dentre estes, a quinina usada no tratamento da malária e vários outros alcalóides como a morfina e cafeína estão presentes na medicina e no cotidiano de muitas pessoas. (POZHARSKÜ et al., 1997). A síntese de compostos heterocíclicos medicinais levou a diminuição da mortalidade causada por várias doenças sendo, portanto, de suma importância o estudo destes compostos.

Neste contexto, uma classe de compostos heterocíclicos que têm recebido muita atenção é a dos compostos meso-iônicos. Em 1882, Ficher e Besthorn foram os primeiros a descrever a síntese de um composto meso-iônico (NEWTON & RAMSDEN, 1982). Seguindo esta linha de pesquisa, Max Busch, durante o período de 1895-1905, descreveu a preparação e as propriedades químicas de vários meso-iônicos heterocíclicos. Porém, somente em 1946 Simpson utilizou o termo “meso-iônico” para

descrever um tipo de molécula que não poderia ser representada por uma estrutura covalente (KIER & ROCHE, 1967).

BAKER & OLLIS, em 1955 sugeriram que um composto pode ser chamado de mesoiônico se apresentar uma estrutura heterocíclica com cinco ou seis membros, que não pode ser satisfatoriamente representada por uma estrutura polar ou covalente. Deve possuir também, um sexteto de elétrons π em associação com todos os átomos que constituem o anel. Este deve apresentar ainda, carga positiva ou negativa e um átomo ou grupo de átomos ligados ao anel deve ter carga oposta. Atualmente recomenda-se que o termo mesoiônico seja restrito a anéis heterocíclicos de cinco membros, considerando as propriedades físico-químicas descritas por BAKER & OLLIS para classificar estes compostos (NEWTON & RAMSDEN, 1982). Desta forma, estruturas que apresentam localização de cargas em átomos específicos como, por exemplo, as betaínas (figura 1A) ou que possam ser representadas por estruturas covalentes como as troponas (figura 1B), não podem ser classificadas como heterocíclicos mesoiônicos (KIER & ROCHE, 1967; OLLIS & RAMSDEN, 1976).

FIGURA 1- ESTRUTURA QUÍMICA DAS BETAÍNAS (A) E DAS TROPONAS (B)



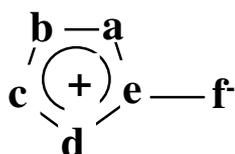
FONTE: KIER & ROCHE, 1967.

Os compostos mesoiônicos podem ser representados pela estrutura genérica mostrada na figura 2, onde as letras de **a** até **f** representam átomos como: carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre seguidos de seus respectivos substituintes, específicos

para cada tipo de composto (OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982).

Com a análise dos possíveis sistemas mesoiônicos observou-se que estes compostos apresentavam distintas propriedades químicas dependendo da natureza dos substituintes do anel, ou seja, da origem dos oito elétrons π que podem ser distribuídos entre o anel mesoiônico (carga positiva) e o átomo ou grupo de átomos ligados ao anel (carga negativa). Desta forma, estes compostos foram separados em duas classes distintas: compostos mesoiônicos do tipo A e B. Na figura 3 estão demonstradas as estruturas genéricas e exemplos de compostos do tipo A e B, onde os números sobrescritos indicam a origem dos oito elétrons π (NEWTON & RAMSDEN, 1982).

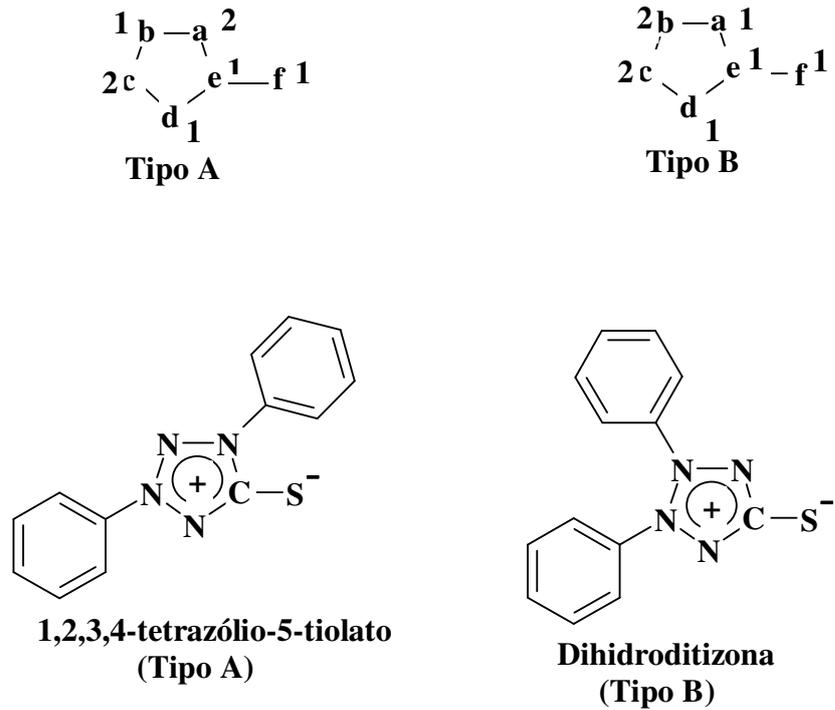
FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO



FONTE: NEWTON & RAMSDEN, 1982; OLLIS & RAMSDEN, 1976.

Até o ano de 1982, foram relatados mais de sessenta compostos mesoiônicos do tipo A e mais de treze do tipo B. A tabela 1 lista os compostos do tipo A, na qual se classifica os diferentes sistemas em: oxazóis, dioxóis, diazóis, tiazóis, ditióis, oxadiazóis, oxatiazóis, triazóis, tiadiazóis, oxatriazóis, tetrazóis, tiatriazóis, oxatióis, selenazóis e ditiadiazóis. Os compostos do tipo B, em menor número, estão listados na tabela 2 e são subdivididos em: oxazóis, diazóis, tiazóis, ditióis, tiadiazóis e tetrazóis (OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982).

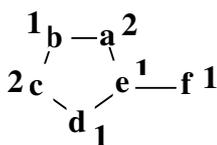
FIGURA 3- REPRESENTAÇÃO E EXEMPLOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS DOS TIPOS A E B.



O 1,2,3,4-tetrazólio-5-tiolato é um exemplo de composto mesoiônico do tipo A e seu isômero dihidroditizona, do tipo B.

FONTE: NEWTON & RAMSDEN, 1982; OLLIS & RAMSDEN, 1976.

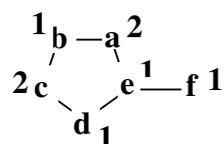
TABELA 1 – HETEROCÍCLICOS MESOIÔNICOS DO TIPO A



| SISTEMAS | ÁTOMOS ou GRUPOS | | | | | |
|---|------------------|----|----|----|---|------------------|
| | a | b | c | d | E | f |
| Oxazóis | | | | | | |
| 1,3-Oxazol-4-olatos | NR | CR | O | CR | C | O |
| 1,3-Oxazol-5-olatos | O | CR | NR | CR | C | O |
| 1,3-Oxazol-5-aminidas | O | CR | NR | CR | C | NR |
| 1,3-Oxazol-4-aminidas | NR | CR | O | CR | C | NR |
| Dioxóis | | | | | | |
| 1,3-Dioxol-4-olatos | O | CR | O | CR | C | O |
| Diazóis | | | | | | |
| 1,3-Diazol-4-olatos | NR | CR | NR | CR | C | O |
| 1,3-Diazol-4-aminidas | NR | CR | NR | CR | C | NR |
| 1,3-Diazol-4-tiolatos | NR | CR | NR | CR | C | S |
| 1,3-Diazol-metilidas | NR | CR | NR | CR | C | CXY _b |
| Tiazóis | | | | | | |
| 1,3-Tiazol-5-olatos | S | CR | NR | CR | C | O |
| 1,3-Tiazol-4-olatos | NR | CR | S | CR | C | O |
| 1,3-Tiazol-5-aminidas | S | CR | NR | CR | C | NR |
| 1,3-Tiazol-5-tionas | S | CR | NR | CR | C | S |
| 1,3-Tiazol-4-aminidas | NR | CR | S | CR | C | NS |
| Ditióis | | | | | | |
| 1,3-Ditiol-4-olatos | S | CR | S | CR | C | O |
| 1,3-Ditiol-4-aminidas | S | CR | S | CR | C | NR |
| Oxadiazóis | | | | | | |
| 1,3,4-Oxadiazol-2-olatos | O | CR | NR | N | C | O |
| 1,3,4-Oxadiazol-2-aminidas | O | CR | NR | N | C | NR |
| 1,3,4-Oxadiazol-2-tiolatos | O | CR | NR | N | C | S |
| 1,3,4-Oxadiazol-metilidas | O | CR | NR | N | C | CXY _b |
| 1,2,3-Oxadiazol-5-olatos (sidnonas) | O | N | NR | CR | C | O |
| 1,2,3-Oxadiazol-5-aminidas (sidnoniminas) | O | N | NR | CR | C | NR |
| 1,2,3-Oxadiazol-5-tiolatos | O | N | NR | CR | C | S |
| Oxatiazóis | | | | | | |
| 1,3,2-Oxatiazol-5-olatos | O | N | S | CR | C | O |
| Triazóis | | | | | | |
| 1,2,3-Triazol-4-olatos | NR | N | NR | CR | C | O |
| 1,2,3-Triazol-4-aminidas | NR | N | NR | CR | C | NR |
| 1,2,3-Triazol-4-tiolatos | NR | N | NR | CR | C | S |
| 1,2,4-Triazol-3-olatos | NR | CR | NR | N | C | O |
| 1,2,4-Triazol-3-aminidas | NR | CR | NR | N | C | NR |
| 1,2,4-Triazol-3-tiolatos | NR | CR | NR | N | C | S |
| 1,2,4-Triazol-3-metilidas | NR | CR | NR | N | C | CXY _b |

Continua

TABELA 1 – HETEROCÍCLICOS MESOIÔNICOS DO TIPO A



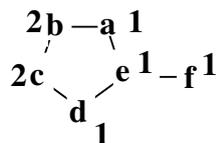
continuação

| SISTEMAS | ÁTOMOS ou GRUPOS | | | | | |
|--------------------------------|------------------|----|----|----|---|------------------|
| | a | b | c | d | e | f |
| Tiadiazóis | | | | | | |
| 1,3,4-Tiadiazol-2-olatos | S | CR | NR | N | C | O |
| 1,3,4-Tiadiazol-2-aminidas | S | CR | NR | N | C | NR |
| 1,3,4-Tiadiazol-2-tiolatos | S | CR | NR | N | C | S |
| 1,3,4-Tiadiazol-2-metilidas | S | CR | NR | N | C | CXY _b |
| 1,2,3-Tiadiazol-4-olatos | NR | N | S | CR | C | O |
| 1,2,3-Tiadiazol-5-olatos | S | N | NR | CR | C | O |
| 1,2,3-Tiadiazol-5-aminidas | S | N | NR | CR | C | NR |
| 1,2,3-Tiadiazol-5-tiolatos | S | N | NR | CR | C | S |
| 1,2,3-Tiadiazol-5-metilidas | S | N | NR | CR | C | CXY _b |
| 1,2,4-Tiadiazol-3-olatos | NR | CR | S | N | C | O |
| 1,2,4-Tiadiazol-3-aminidas | NR | CR | S | N | C | NR |
| Oxatriazóis | | | | | | |
| 1,2,3,4-Oxatriazol-5-olatos | O | N | NR | N | C | O |
| 1,2,3,4-Oxatriazol-5-aminidas | O | N | NR | N | C | NR |
| 1,2,3,4-Oxatriazol-5-tiolatos | O | N | NR | N | C | S |
| Tetrazóis | | | | | | |
| 1,2,3,4-Tetrazol-5-olatos | NR | N | NR | N | C | O |
| 1,2,3,4-Tetrazol-5-aminidas | NR | N | NR | N | C | NR |
| 1,2,3,4-Tetrazol-5-tiolatos | NR | N | NR | N | C | S |
| 1,2,3,4-Tetrazol-5-metilidas | NR | N | NR | N | C | CXY _b |
| 1,2,3,4-Tetrazol-5-selenolatos | NR | N | NR | N | C | Se |
| Tiatriazóis | | | | | | |
| 1,2,3,4-Tiatriazol-5-olatos | S | N | NR | N | C | O |
| 1,2,3,4-Tiatriazol-5-aminidas | S | N | NR | N | C | NR |
| 1,2,3,4-Tiatriazol-5-tiolatos | S | N | NR | N | C | S |
| 1,2,3,4-Tiatriazol-5-metilidas | S | N | NR | N | C | CXY _b |
| Oxatióis | | | | | | |
| 1,3-Oxatiol-4-olatos | S | CR | O | CR | C | O |
| 1,3-Oxatiol-5-olatos | O | CR | S | CR | C | O |
| Selenazóis | | | | | | |
| 1,3-Selenazol-4-olatos | NR | CR | Se | CR | C | O |
| Ditiadiazóis | | | | | | |
| 1,3,2,4-ditiadiazol-5-olato | S | N | S | N | C | O |
| 1,3,2,4-ditiadiazol-5-aminidas | S | N | S | N | C | NR |

b Resíduo carbânion estável, onde os substituintes X e Y incluem CO₂ Et, CN ou um resíduo de fluorenilida.

FONTE: NEWTON & RAMSDEN, 1982; OLLIS & RAMSDEN, 1976.

TABELA 2 – HETEROCÍCLICOS MESOIÔNICOS DO TIPO B



| SISTEMA | ÁTOMOS ou GRUPOS | | | | | |
|------------------------------|------------------|----|----|----|---|------------------|
| | a | b | c | d | e | f |
| Oxazóis | | | | | | |
| 1,2-Oxazol-4-olatos | CR | O | NR | CR | C | O |
| 1,2-Oxazol-4-aminidas | CR | O | NR | CR | C | NR |
| Diazóis | | | | | | |
| 1,2-Diazol-4-olatos | CR | NR | NR | CR | C | O |
| 1,2-Diazol-4-aminidas | CR | NR | NR | CR | C | NR |
| Tiazóis | | | | | | |
| 1,3-Tiazol-4-olatos | CR | S | NR | CR | C | O |
| 1,3-Tiazol-4-aminidas | CR | S | NR | CR | C | NR |
| Ditióis | | | | | | |
| 1,2-Ditiol-4-olatos | CR | S | S | CR | C | O |
| 1,2-Ditiol-4-tiolatos | CR | S | S | CR | C | S |
| Tiadiazóis | | | | | | |
| 1,2,5-Tiadiazol-3-olatos | N | S | NR | CR | C | O |
| Tetrazóis | | | | | | |
| 1,2,3,4-Tetrazol-5-olatos | N | NR | NR | N | C | O |
| 1,2,3,4-Tetrazol-5-aminidas | N | NR | NR | N | C | NR |
| 1,2,3,4-Tetrazol-5-tiolatos | N | NR | NR | N | C | S |
| 1,2,3,4-Tetrazol-5-metilidas | N | NR | NR | N | C | CXY _b |

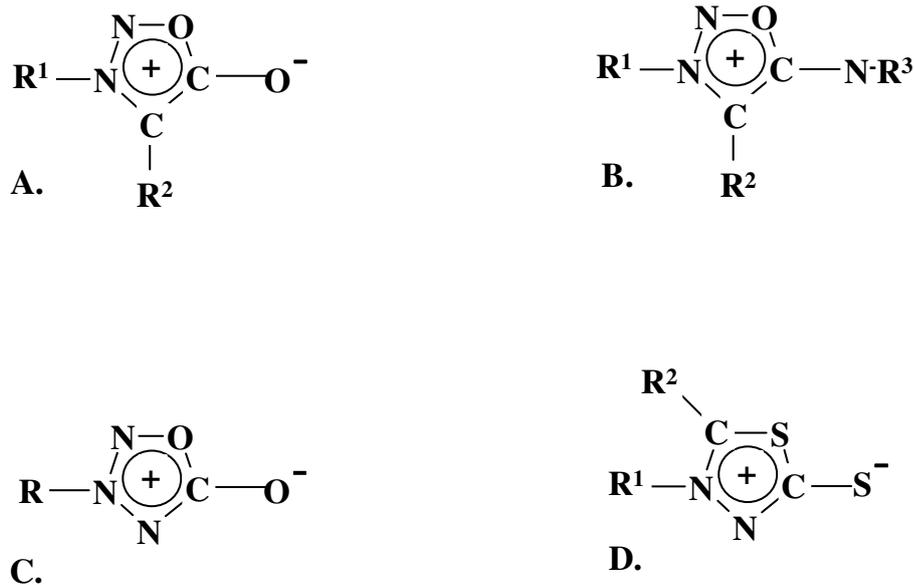
b Resíduo carbânion estável, onde os substituintes X e Y incluem CO₂ Et, CN ou um resíduo de fluorenilida.

FONTE: NEWTON & RAMSDEN, 1982; OLLIS & RAMSDEN, 1976.

Vários compostos mesoiônicos citados nas tabelas 1 e 2 foram sintetizados e, dentre estes, também muitos apresentaram atividade biológica comprovada, o que levou, em alguns casos, ao registro de patente (OLLIS & RAMSDEN, 1976). Em relação à atividade biológica, quatro classes de compostos mesoiônicos têm sido destacadas na literatura: sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olatos), sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminidas), os oxatriazóis e os 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, cuja estruturas estão representadas na figura 4 (KIER & ROCHE, 1967). Estes compostos apresentam características em comum que podem justificar sua aplicação terapêutica, como uma estrutura relativamente pequena e caráter aromático planar que permitem melhor interação do sistema π com macromoléculas biológicas. A variação da

densidade eletrônica em torno do anel e a presença de regiões distintamente carregadas, as quais conferem à estrutura um alto momento de dipolo, possibilitam interações eletrostáticas com biomoléculas como o DNA e proteínas. Outro aspecto físico-químico importante para sua função é o caráter global neutro destas estruturas o que permite que estes compostos atravessem membranas biológicas *in vivo* (KIER & ROCHE, 1967; OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982).

FIGURA 4- 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 Mesoiónicos

2.3.1 Sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olatos)

As sidnonas (figura 4 A), primeira classe de compostos mesoiônicos sintetizada, também é a mais estudada até a atualidade (EARL & MACKNEY, 1935). A sua atividade biológica é comprovada por vasta literatura. O primeiro relato de atividade biológica data de 1959 quando, DAVIS et al., demonstraram que a 3-fenilsidnona foi capaz de inibir, *in vivo*, o estabelecimento infeccioso da *Puccinia rubigo-vera* e *Uromyces phaseoli* causadores da ferrugem do trigo e feijão, respectivamente. Este composto, quando testado *in vitro*, mostrou-se pouco ativo contra o fungo causador da doença, desta forma, os autores sugeriram que a 3-fenilsidnona aumenta a resistência da planta à doença pela alteração do metabolismo do hospedeiro impedindo a proliferação do fungo.

Em 1962, GRECO et al. testaram vários derivados de sidnonas e mostraram que o 3-(p-metoxibenzil)-sidnona possuía atividade contra carcinoma 755 em camundongos, entretanto este composto mostrou-se inativo contra sarcoma-180 e células leucêmicas L1210. Tendo conhecimento da atividade antitumoral apresentada pelo 3-(p-metoxibenzil)-sidnona, NYBERG & CHENG (1965), sintetizaram o análogo a esta 3-piperonilsidnona e o testaram frente ao agente causador da malária, o *Plasmodium berghei*, em camundongos. Este composto mostrou-se ativo quando administrado oral ou subcutaneamente a uma dose de 10 mg/kg, sendo que nenhuma toxicidade foi observada até a dose de 500 mg/kg. O seu mecanismo de ação não foi esclarecido, porém os compostos gerados pela hidrólise ácida ou básica, piperonilhidrizina e N-nitroso-N-piperonilglicina, respectivamente, não apresentaram atividade antimalarial, sugerindo que a integridade do anel mesoiônico era essencial para seu efeito.

Em estudos sobre a atividade biológica de derivados 3-aminoalquil-sidnona BRUZZESE et al. (1965 a) também evidenciaram a importância da integridade do anel mesoiônico destes compostos ao avaliar os efeitos biológicos dos derivados e seus respectivos produtos de hidrólise em ratos. Os autores sintetizaram quatorze derivados

e dentre estes alguns compostos apresentaram ação analgésica, antiinflamatória e hipoglicemiante, além de agirem sobre o sistema nervoso central de forma excitante ou depressiva (BRUZZESE et al., 1965 b).

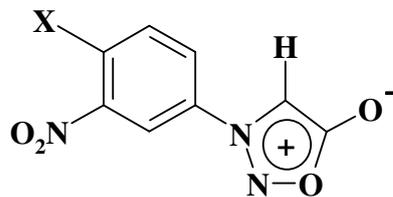
Posteriormente, em 1992, MOUSTAFA & EISA determinaram a sensibilidade dos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* a doze derivados de N-(3 ou 4-acetilfenil)-sidnona através da técnica de difusão em ágar. Todos os compostos testados exibiram alta atividade contra *S. aureus*. Somente os compostos com substituintes nitro e bromo mostraram baixa atividade contra *E. coli* e nenhum composto mostrou inibição significativa para a *C. albicans*. Entretanto, nenhum dos compostos testados mostrou atividade superior à estreptomicina, utilizada como referência.

Neste mesmo ano, GRYNBERG et al. (1992) avaliaram a atividade antitumoral de aril-sidnonas contra sarcoma-180, carcinoma de Ehrlich, histiocitoma fibroso (induzido por 20-metil-clorantreno em camundongos B10A (B10MCII)) e células leucêmicas L1210. Foram testados quatro compostos 3-[4-X-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olatos (figura 5), onde X foi substituído por Cl, anel pirrolidino, piperidino e morfolino. O efeito inibitório do crescimento de células tumorais *in vitro* foi mais evidente para o composto com Cl como substituinte. Este composto também mostrou uma pronunciada atividade antitumoral *in vivo* contra sarcoma-180, carcinoma de Ehrlich e histiocitoma fibroso. O composto substituído por anel pirrolidino foi eficaz para todos os tumores testados, sendo que os outros dois compostos não apresentaram atividade antitumoral significativa. Nenhuma mudança hematológica digna de nota foi encontrada para os camundongos tratados em relação aos controles (não tratados).

Seguindo esta linha de pesquisa, DUNKLEY & THOMAN (2003) sintetizaram e avaliaram a atividade antitumoral de seis compostos para-substituídos, análogos às moléculas sintetizadas por GRYNBERG et al. (1992) (figura 5), em três linhagens de células: MCF7 (mama), NCI-H460 (pulmão) e SF-268 (sistema nervoso central). Dos compostos testados, somente aqueles onde X foi substituído por flúor ou cloro apresentaram atividade antitumoral significativa, sendo que o composto fluorado

apresentou-se mais efetivo. De conhecimento que o flúor provoca um efeito indutivo mais acentuado que o cloro na molécula, os autores sugeriram que este aspecto físico-químico seja responsável pelo pronunciado efeito antitumoral do composto fluorado em relação ao clorado. Entretanto, ambos os compostos apresentaram redução do crescimento de, pelo menos, uma linhagem celular em no mínimo 32%.

FIGURA 5- ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-[4-X-3-NITROFENIL]-1,2,3-OXADIAZÓLIO-5-OLATO



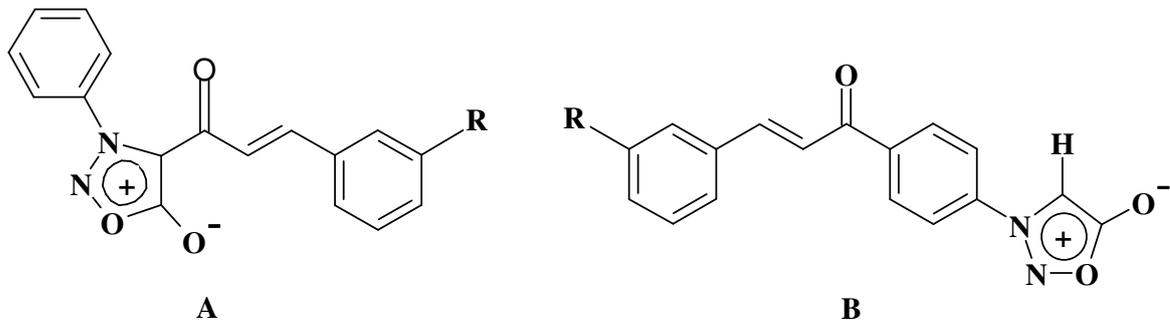
FONTE: GRYNBERG et al., 1992.

Recentemente, HALILA (2005) avaliou os efeitos do SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato (figura 5, onde X = Cl) sobre o metabolismo energético mitocondrial. O composto foi capaz de reduzir a eficiência da fosforilação oxidativa ao diminuir a velocidade do estado 3 e ao aumentar a velocidade do estado 4. Análises dos complexos da cadeia respiratória sugeriram que o alvo de inibição do composto situa-se além do complexo I da cadeia respiratória, incluindo os complexos III e IV. O SYD-1 também foi capaz de estimular a atividade do complexo F_1F_0 ATPase em mitocôndrias intactas e inibir a formação do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$). Segundo resultados de ensaios de inchamento mitocondrial, a permeabilidade da membrana mitocondrial foi afetada pelo SYD-1. Segundo o autor, o efeito principal desta sidnona é a inibição que causa sobre o transporte de elétrons na cadeia respiratória, sendo considerado como secundário o efeito desacoplador. O autor sugere ainda que tais efeitos sobre a bioenergética mitocondrial podem estar relacionados a atividade antitumoral descrita anteriormente por GRYNBERG et al. (1992).

Em 1995, SATYANARAYANA & RAO demonstraram que as sidnonas apresentam atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética. Os autores

sintetizaram e avaliaram duas séries de compostos, sendo que a série I compreende compostos 4-[1-oxo-3-(aril substituído)-2-profenil]-3-fenilsidnonas (figura 6 A) e a série II compostos 3-[4-[3-(aril substituído)-1-oxo-2-profenil]fenil] sidnonas (figura 6 B). Com a administração de uma dose de 100 mg/kg, os compostos foram capazes de inibir a formação de edema induzido por carragenana em ratos mostrando, desta forma, sua atividade antiinflamatória. Na mesma dose, estes compostos foram capazes de diminuir o número de contorções induzidas por ácido acético e confirmar, portanto, sua atividade analgésica. Nenhum dos compostos apresentou atividade antipirética.

FIGURA 6- ESTRUTURA QUÍMICA DE SIDNONAS DAS SÉRIES I E II



- A. SÉRIE I: 4-[1-oxo-3-(arilsubstituído)-2-profenil]-3-fenilsidnonas;
 B. SÉRIE II: 3-[4-[3-(aril substituído)-1-oxo-2-profenil]fenil] sidnonas

FONTE: SATYANARAYANA & RAO, 1995.

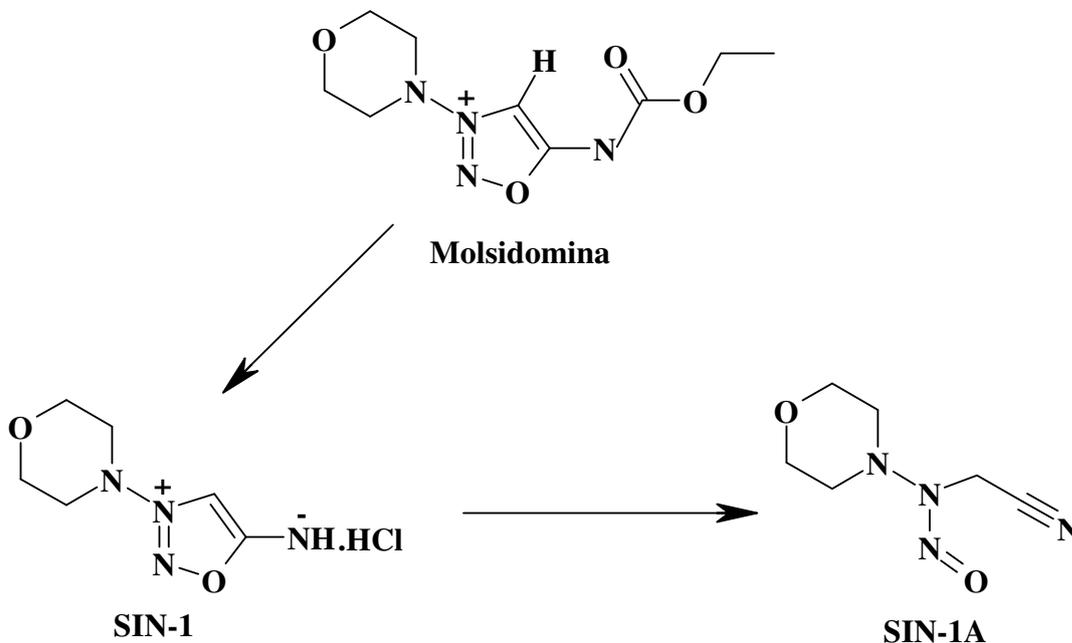
2.3.2 Sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminidas)

A classe das sidnoniminas (figura 4 B), embora menos estudada que a das sidnonas, incluem derivados que exercem efeitos biológicos importantes. Um derivado desta classe com destacada atividade biológica é o molsidomina (N-etoxicarbonil)-3-morfolinosidnonimina (figura 7), utilizada no tratamento de pacientes com Angina de Peito (MAJID et al., 1980). Seu efeito antianginal se deve aos seus dois metabólitos: SIN-1 (3-morfolinosidnonimima) e SIN-1A (N-nitroso-N-morfolino-acetonitrilo), ambos representados na figura 7. O efeito vascular da molsidomina é similar ao da

nitroglicerina, porém, o composto farmacologicamente ativo resulta de sua metabolização, promovendo um efeito mais lento, entretanto, prolongado.

Em 1993, REHSE et al. demonstraram o efeito antitrombótico e vasodilatador da classe 3-arylalquil-N-X-5-sidnoniminas (figura 8). O composto onde X correspondia ao grupamento N-NO e R₁, R₂, R₃ e R₄ ao átomo de hidrogênio, apresentou o melhor resultado, sendo este capaz de inibir a agregação de plaquetas humanas, induzida por colágeno, com CI₅₀ de 0,7 µmol.L⁻¹. Segundo os autores, este efeito *in vitro* era mediado pela liberação de um metabólito ativo resultante de uma reação fotoquímica no agregômetro pertencente as denominadas “espécies ligadas ao NO”. A atividade antitrombótica em ratos foi quantificada com uma dose de 60 mg/kg do composto via oral. A formação de trombos, induzida por laser, foi inibida em 28% em vênulas e 48% em arteríolas, sugerindo que o metabólito ativo também é formado *in vivo* (REHSE et al., 1993 a).

FIGURA 7- ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLSIDOMINA, SIN-1 E SIN-1A



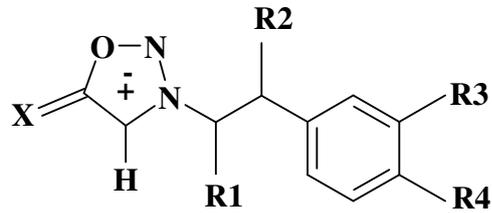
Molsidomina = n-etoxicarbonil-3-morfo-linosidnonimina; SIN-1 = 3-morfolinosidnonimima e SIN-1A = n-nitroso-n-morfolino-acetonitrilo

FONTE: KANKAANRANTA et al., 1996.

Seguindo esta linha de pesquisa, REHSE et al. (1993 b) avaliaram a atividade antitrombótica e vasodilatadora para derivados 3-alkuil-N-X-5-sidnoniminas (figura 9). Os melhores resultados na inibição da agregação de plaquetas, induzida por colágeno, foram mostrados por derivados com grupos lipofílicos como hexil e ciclohexil na posição R e N-NO substituindo X. Segundo os autores estes grupos lipofílicos são capazes de interagir com a membrana plaquetária e, desta forma, se acumulam podendo atravessar a membrana e/ou facilitar a liberação de óxido nítrico de sua estrutura. O óxido nítrico (NO[•]) liberado, devido a fácil clivagem da ligação que o prende a estrutura (=N-NO), promove o relaxamento da musculatura vascular pela ação estimuladora da enzima guanilato ciclase que é responsável pela catálise da síntese de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (MONCADA et al., 1991). Em trabalhos posteriores, REHSE et al. (1993 c e 1995) avaliaram vários outros compostos, modificando seus substituintes, confirmando que a atividade demonstrada por estes compostos está relacionada a capacidade de ligação com a membrana plaquetária e liberação de NO[•] da estrutura.

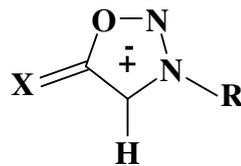
Recentemente, CAI et al. (2005), com o objetivo de aumentar a estabilidade do composto SIN-1 em solução aquosa, adicionaram através de reações específicas, uma molécula de carboidrato a estrutura da sidnonimina. Ao SIN-1 (figura 7) foi covalentemente ligado a glucose ou galactose gerando compostos (figura 10) relativamente estáveis sob condições fisiológicas, sem a presença das respectivas glicosidases. Desta forma, o radical NO[•], responsável pelos efeitos terapêuticos do SIN-1, somente seria liberado na presença da enzima responsável pela degradação do glicosídeo. Assim, segundo os autores, todos os compostos sintetizados ligados a carboidratos apresentaram maior estabilidade em condições fisiológicas do que o SIN-1 isoladamente.

FIGURA 8- ESTRUTURA QUÍMICA DAS 3-ARILALQUIL-N-X-5-SIDNONIMINAS



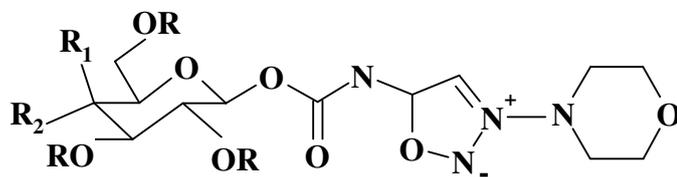
FONTE: REHSE et al., 1993 a.

FIGURA 9- ESTRUTURA QUÍMICA DAS 3-ALQUIL-N-X-5-SIDNONIMINAS



FONTE: REHSE et al., 1993 b.

FIGURA 10- ESTRUTURA DO SIN-1 LIGADO A GLUCOSE OU GALACTOSE

Glucose ($R_1 = H$, $R_2 = OH$ e $R = H$) e Galactose ($R_1 = OH$, $R_2 = H$ e $R = H$)

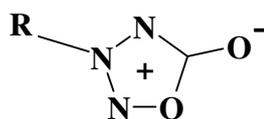
FONTE: CAI et al., 2005.

2.3.3 Oxatriazóis Mesoioônicos

Um dos primeiros relatos sobre a atividade biológica destes compostos foi publicado na década de 60, no qual KIER et al. (1966) sintetizaram e avaliaram a atividade biológica de derivados ψ -oxatriazóis (figura 11). Os compostos foram substituídos em R por radicais hidrocarbonetos e todos produziram efeito hipotensivo quando administrado via intravenosa, em cães anestesiados, a uma dose de 5 mg/kg. Os autores sugeriram que alguns efeitos hipotensivos observados para estes compostos sejam devido a competição com a norepinefrina por receptores adrenérgicos.

A atividade biológica dos oxatriazóis mesoioônicos (figura 4C), assim como para as sidnoniminas, está diretamente relacionada com a habilidade em liberar NO de sua estrutura. Desta forma, muitos efeitos observados para as sidnoniminas também são observados para os derivados oxatriazóis. Derivados oxatriazóis denominados compostos GEA (derivados 3-aryl substituídos oxatriazóis-5-imina) (CORELL et al., 1994) mostraram-se como potentes agentes anti agregantes plaquetários, fibrinolíticos, trombolíticos e broncolíticos, *in vivo* e *in vitro*. Os autores classificaram estes compostos como “doadores de NO” devido à liberação desta substância a partir de suas estruturas em solução aquosa, cuja velocidade dependia da concentração, temperatura, pH e, principalmente, da estrutura química do composto. Para os derivados amida, sulfonamida e urea foram observados os melhores resultados, sendo que nenhum deles apresentou reações adversas.

FIGURA 11- ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS Ψ -OXATRIAZÓIS.

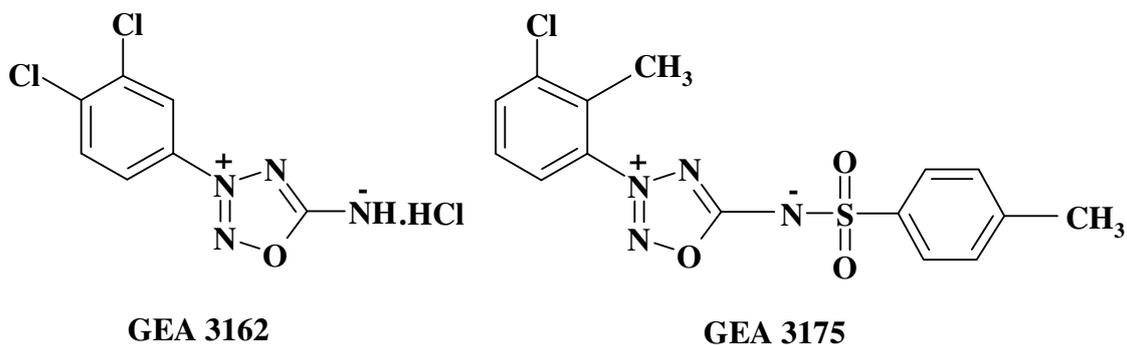


FONTE: KIER et al., 1966.

Com esta mesma subclasse de derivados oxatriazóis, KANKAARANTA et al. (1996) realizaram um estudo comparativo entre dois outros derivados 3-aryl substituídos oxatriazóis-5-imina: GEA 3162 e GEA 3175 (figura 12) e um conhecido composto doador de NO[•]: o 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1) (figura 7). O GEA 3162 e GEA 3175 apresentaram um efeito de inibição da agregação de plaquetas humanas, induzida por adenosina difosfato, maior que o observado para o SIN-1. Todos os compostos induziram, de forma dose-dependente, a produção de GMPc em plaquetas com aumento maior que 4 vezes e, também, a conversão de oxihemoglobina em metahemoglobina formando um complexo entre o NO[•] e a hemoglobina. Tanto GEA 3162 e SIN-1 liberaram nitrato e nitrito em tampão fosfato, sendo o nitrito em maior quantidade, entretanto GEA 3175 não liberou quantidades mensuráveis destas substâncias. Na presença de plasma humano a liberação de NO[•] e NO₂ por GEA 3175 e GEA 3162 foi consideravelmente aumentada, sugerindo a necessidade da degradação enzimática ou a presença de tióis para liberação de NO[•]. Os autores sugeriram, também, que GEA 3175 e GEA 3162, tão bem como SIN-1, liberam NO[•] o qual explicaria sua atividade biológica.

Recentemente, ELMEDAL et al. (2005) relataram a atividade vaso e bronquiodilatadora do GEA 3175 (figura 12) em estudo sobre o mecanismo de ação deste composto em segmentos de artérias pulmonares e bronquíolos humanos isolados. O composto testado induziu dilatação de forma dose-dependente tanto em bronquíolos quanto em artérias pulmonares, sendo neste último observado um efeito mais pronunciado. O efeito dilatador produzido pelo GEA 3175, em ambos os seguimentos, foi reduzido na presença de 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one (ODQ) e iberiotoxina, um bloqueador da enzima guanilil ciclase e dos canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio, respectivamente, sendo que a combinação de ambos não produziu inibição adicional. Segundo os autores, a lenta liberação de NO[•] da estrutura do GEA 3175 induz a uma potente dilatação das artérias pulmonares e bronquíolos, sendo este efeito mediado por um mecanismo dependente de GMPc seguida pela ativação dos canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio.

FIGURA 12- ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS 3-ARIL SUBSTITUÍDOS OXATRIAZÓIS-5-IMINA: GEA 3162 E GEA 3175



FONTE: KANKAANRANTA et al., 1996.

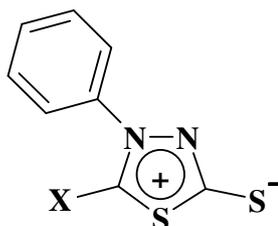
2.3.4 Compostos 1,3,4-Tiadiazóis Meso-iônicos

Os derivados mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis, representados na figura 4D, também possuem importante atividade biológica. O primeiro relato data de 1965, quanto STEWART e KIER descreveram a síntese e avaliaram a atividade *in vitro* da série de derivados do 4-fenil-5-X-1,3,4-tiadiazólio mesoiônico (figura 13) contra *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. A sensibilidade destes microorganismos frente aos compostos mesoiônicos foi medida através da zona de inibição de crescimento em torno do disco de ágar. Os compostos que apresentavam em X substituintes alquil de cadeia curta como o metil, etil e isopropil, foram os que apresentaram maior atividade bactericida. Por outro lado, derivados com substituintes alquil de cadeias longas e volumosas eram inativos.

Sob outro enfoque, GLENNON et al (1981) relataram a atividade inibitória de derivados mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis [3,2-a] pirimidinas (figura 14) sobre a enzima adenosina 3',5'-monofosfato fosfodiesterase em comparação à inibidores conhecidos desta enzima como a teofilina e 1-metil-3-isobutilxantina. Os autores observaram que a presença de substituintes maiores e mais hidrofóbicos como o fenil e o benzil na posição R₆ aumentavam a ação inibitória dos compostos. Por outro lado, compostos onde a posição R₆ foi substituída por grupos alquil pequenos e menos hidrofóbicos não

apresentaram a inibição. Segundo os autores, este efeito foi devido a similaridade estrutural dos compostos mesoiônicos testados com as xantinas naturais como a teofilina.

FIGURA 13- ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS 4-FENIL-5-X-1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS



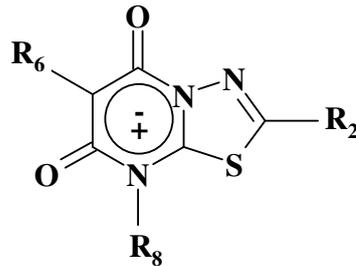
FONTE: STEWART & KIER, 1965.

Posteriormente, GLENNON et al (1984) estudaram a ação de derivados mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis[3,2-a] pirimidinas (figura 14) como antagonistas dos receptores de adenosina A_1 e A_2 . Neste estudo foi testado, *in vitro*, a ação inibidora (receptor de adenosina A_1) e/ou ativadora (receptor de adenosina A_2), da enzima adenilato ciclase por compostos mesoiônicos semelhantes as xantinas. Muitos tiadiazóis mesoiônicos foram mais seletivos ao receptor de adenosina A_1 e não mostraram atividade frente ao receptor A_2 . Porém, a maioria dos compostos mesoiônicos testados foram menos potentes que a teofilina como antagonistas de receptores de adenosina.

LIMA et al. (1986) descreveram a atividade biológica para o 4,5-difenil-2-tiolato-1,3,4-tiadiazólio (figura 15). Demonstraram sua atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* contra as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus* e os seguintes fungos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula sp.*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium sp.*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*. Os ensaios foram realizados em meio líquido e

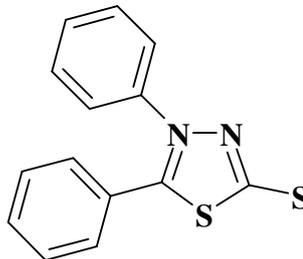
sólido, indicando que a dose ideal para inibição do crescimento de todos os microorganismos testados foi de 400 µg/mL.

FIGURA 14. ESTRUTURA QUÍMICA DO 1,3,4-TIADIAZÓIS[3,2,-a]PIRIMIDINA.



FONTE: GLENNON et al., 1981.

FIGURA 15- ESTRUTURA QUÍMICA DO 4,5-DIFENIL-2-TIOLATO-1,3,4-TIADIAZÓLIO

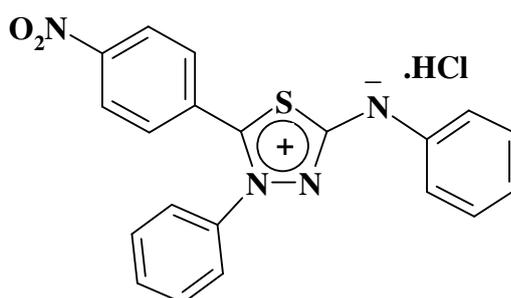


FONTE: LIMA et al, 1986.

Posteriormente em 1992, MONTANARI et al., testaram a sensibilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente a compostos mesoiônicos do tipo 1,3,4-tiadiazólio utilizando a técnica de microcalorimetria. Neste estudo foi observado uma pequena atividade antifúngica quando o grupo metóxido (OCH₃) ou nitro (NO₂) foram usados como substituínte em X, porém somente o 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida (figura 16) apresentou atividade antifúngica significativa com valor de aproximadamente 17%. Os autores sugeriram que estes compostos agem como fungistáticos. Em estudos posteriores MONTANARI et al. (1997) relataram a síntese e a atividade

antimicrobiana de alguns derivados 1,3,4-tiadiazóis-2-aminida contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*, que foram avaliados tanto a forma de ácidos conjugados como de bases livres (figura 17), sendo que os ácidos conjugados apresentaram maior atividade que as bases livres. Entre os ácidos conjugados avaliados, aqueles em que X foi substituído por Br, Cl ou NO₂ apresentaram maior atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Neste mesmo ano, HOWE descreveu a síntese e a atividade antibacteriana do cloreto de (2,3-difenil-1,3,4-tiadiazólio-5-tiolato-S_{exo}) de ouro (I). Entre os microorganismos testados o composto apresentou razoável atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, sendo pouco ativo contra bactérias Gram negativas e fungos.

FIGURA 16- ESTRUTURA DO COMPOSTO MESOIÔNICO 1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-AMINIDA ATIVO CONTRA *Saccharomyces cerevisiae*



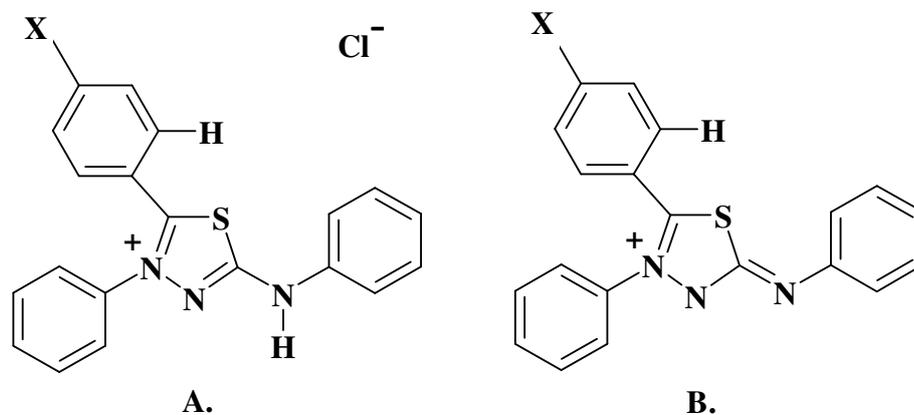
FONTE: MONTANARI et al., 1992.

No sentido de avaliar a 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 (MI-D) e OH (MI-J) (figura 18 A e B), 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. O MI-D (figura 18 B) apresentou a melhor atividade antitumoral para ambos os tumores testados. A toxicidade

hematológica também foi avaliada e não foram observadas mudanças significativas entre os animais tratados e controles em comparação com os valores normais para dados hematológicos obtidos na literatura.

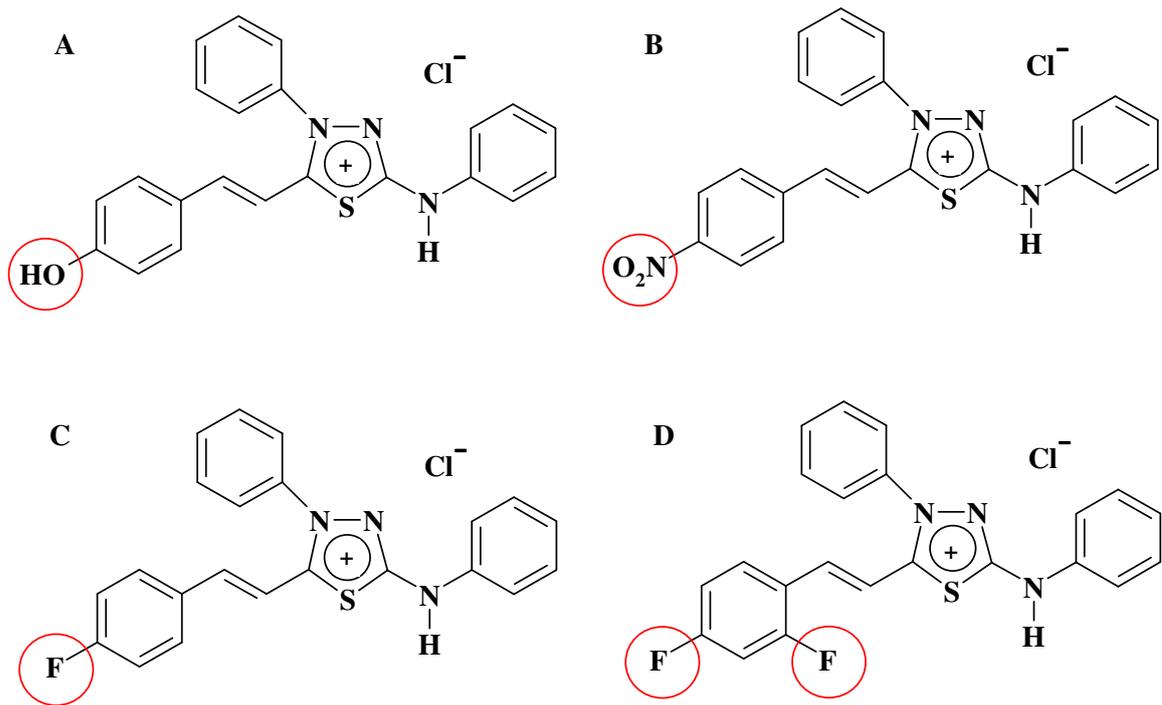
A importante atividade antitumoral do MI-D motivou a realização de uma série de estudos subsequentes, nos quais os diferentes efeitos do composto foram investigados. CADENA et al. (1998, 2002) avaliaram os efeitos do MI-D sob o metabolismo energético mitocondrial e observaram que este reduziu a eficiência da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de fígado de rato causando uma acentuada diminuição do coeficiente de controle respiratório e razão ADP/O. As análises dos complexos da cadeia respiratória sugeriram que os sítios de inibição do MI-D situam-se após o complexo I e entre os complexos II e III. Também de forma dose dependente o MI-D colapsou o potencial elétrico transmembrana ($\Delta\psi_m$). A atividade da ATPase foi drasticamente aumentada em mitocôndrias intactas, mas inibida em mitocôndrias desacopladas por carbonil cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). De acordo com estes resultados, os autores classificaram o MI-D como um agente desacoplador inibitório (CADENA et al., 1998).

FIGURA 17- ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS-2-AMINIDA:
A. COMO ÁCIDOS CONJUGADOS E B. COMO BASES LIVRES



FONTE: MONTANARI et al., 1997.

FIGURA 18- 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.

Em estudos posteriores, CADENA et al. (2002) verificaram que o MI-D alterou a fluidez e a elasticidade da membrana mitocondrial através de estudos de inchamento mitocondrial induzido por valinomicina mais K^+ e nigericina mais K^+ e polarização de fluorescência das sondas DPH e DPH-PA em vesículas multilamelares sintéticas (DMPC) e mitocondriais. Os autores sugeriram, ainda que os efeitos provocados na membrana mitocondrial e na transdução de energia poderiam estar envolvidos no mecanismo pelo qual o MI-D induz a morte em células tumorais como relatado anteriormente por GRYNBERG et al. (1997).

Os efeitos do MI-D também foram avaliados sobre células HeLa e células leucêmicas da linhagem L1210. Em ambos os modelos, o MI-D estimulou o consumo de oxigênio do estado 4 induzido por oligomicina, e em células L1210, o composto mesoiônico estimulou a produção de lactato. O tratamento de monocamadas de células HeLa com MI-D provocou 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 sendo que, segundo o autor, tal mecanismo poderia ser responsável pelo efeito antitumoral deste composto (CADENA, 1999).

Sob outro enfoque, DA SILVA et al. (2002) demonstraram que o MI-D foi ativo contra *Leishmania amazonensis* ao avaliar a atividade de vários derivados da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida contra este parasita em seus dois estágios evolutivos: promastigotas e amastigotas. O MI-D apresentou atividade contra as duas formas evolutivas, sendo que a forma promastigota apresentou maior sensibilidade que a amastigota com DL_{50} de $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $52,92 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Os autores sugerem que a diferença de sensibilidade entre as formas evolutivas se deve ao pH da solução, sendo que no meio de cultura da forma promastigota (pH 7,0) os derivados mesoiônicos se encontram na forma desprotonada, enquanto para a forma amastigota (pH 5,5) estes compostos se mantêm em sua forma hidrocloreada como cátions heterocíclicos.

CARDOSO et al. (2004) demonstraram ainda que o MI-D afeta o metabolismo hepático estimulando a glicogenólise em 95% e inibindo o consumo de oxigênio em 37% em fígado de rato perfundido. O composto foi também capaz de reduzir em até 95% a produção de ânion superóxido (O_2^-) por macrófagos estimulados por 12-meristato 13-acetato forbol éster (PMA) da cavidade peritoneal de camundongos. O MI-D apresentou, também, ação analgésica, antipirética e antiinflamatória *in vivo*, nas doses de 8mg/Kg, 1mg/Kg e 8mg/Kg, respectivamente. Segundo os autores, estes efeitos foram decorrentes da diminuição dos níveis de prostaglandina E_2 (PGE_2) indicando a inibição da ciclooxigenase 2 (COX-2).

Em adição aos estudos de GRYNBERG et al. (1997) o efeito antitumoral do MI-D foi também demonstrado contra células de melanoma murino B16-F10 *in vivo* e *in vitro* (SENFF-RIBEIRO 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 dose $18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D foi capaz de promover um efeito citotóxico com redução de 50% da viabilidade das células em 24 horas, mostrando-se mais eficaz que a fotemustina ($257 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Já em 72 horas, a dose $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi capaz de inibir completamente a proliferação de células de melanoma. A atividade antitumoral do MI-D foi avaliada também *in vivo* em camundongos C57BL/6 portadores de melanoma subcutâneo (B16-F10). Os animais foram tratados com MI-D por via intraperitoneal (i.p.) utilizando uma única dose de $57 \mu\text{mol.kg}^{-1}$, 24 h após a inoculação das células. Nestas condições 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 et al (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. A morfologia e a organização do citoesqueleto das células MEL-85, também foram modificadas pelo tratamento com MI-D. Com base nos resultados obtidos nos estudos anteriores SENFF-RIBEIRO et al. (2004 b) apontaram o MI-D como uma droga bastante promissora contra o melanoma, o que motivou o registro de patente desta atividade (PI0402854-6).

Com o objetivo de estabelecer a relação entre estrutura química e atividade antitumoral, 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 18). 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 análise *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 μ mol.kg⁻¹.

OBJETIVOS

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Segundo os estudos de SENFF-RIBEIRO et al. (2004b) os efeitos dos derivados 1,3,4-tiadiazóis sobre melanoma claramente indicam que o MI-D é o mais efetivo contra este tumor. Em adição, os estudos realizados em mitocôndrias isoladas (CADENA et al., 1998, 2002) evidenciaram significativos efeitos deste composto sobre as funções desta organela, que sabidamente está envolvida na manutenção da vida e/ou morte celular. Portanto, é importante esclarecer os efeitos dos demais compostos 1,3,4-tiadiazóis (MI-J, MI-F e MI-2,4diF – Figura 18 A, C e D) sobre a bioenergética mitocondrial. As informações obtidas permitirão estabelecer uma possível correlação entre os efeitos sobre a bioenergética mitocondrial e atividade antimelanoma já observada e, ainda, estimar qual a contribuição desta organela nesta atividade. Comparando os efeitos dos demais substituintes 1,3,4-tiadiazóis aos já demonstrados para o MI-D sobre as funções mitocondriais, será ainda possível estabelecer a importância do anel mesoiônico e de seus substituintes na ação destes compostos. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência dos substituintes do anel cinamoil de derivados 1,3,4 – tiadiazóis sobre a bioenergética mitocondrial. Para tanto foram utilizados os seguintes derivados 4-fenil-5-[2'-Y, 4'-X ou 4'-X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina: *MI-J*, X = OH; *MI-4F*, X = F; *MI-2,4diF*, X = Y = F - Figura 18 A, C, D) e foram avaliados seus efeitos em mitocôndrias isoladas de fígado de rato sobre:

- a) o consumo de oxigênio durante os estados 3 e 4 da respiração, sendo determinados os valores de Coeficiente de Controle Respiratório (CCR) e razão ADP/O;
- b) a atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória e ATPase;
- c) o inchamento mitocondrial na presença de valinomicina mais K⁺.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os reagentes DMSO, D-manitol, Hepes, EGTA, EDTA, BSA, rotenona, ácido glutâmico, ADP, ATP, NADH, citocromo *c* (tipo IV – coração de boi), fosfoenolpiruvato, piruvato quinase (tipo I – 100 U.mg⁻¹ de proteína), lactato desidrogenase (tipo I – 60 U.mg⁻¹ de proteína), FCCP, sulfato de magnésio, valinomicina, oligomicina, antimicina A foram obtidos do laboratório Sigma Chemical Co.

Os seguintes reagentes foram adquiridos dos laboratórios indicados: ferricianeto de potássio – Riedel; cianeto de sódio – Baker; DCPIP – Eastman; fosfato de potássio monobásico - Synth e ácido succínico - Aldrich Chemical. O cloreto de potássio, sacarose, Tris e TCA, juntamente com os demais reagentes com alto grau de pureza, foram adquiridos do laboratório Merck.

Os derivados 4-fenil-5-[2'-Y, 4'-X ou 4'-X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina: *MI-J*, X = OH; *MI-4F*, X = F; *MI-2,4diF*, X = Y = F - Figura 18 A, C e D) foram sintetizados e gentilmente doados pela Prof^a. Dr^a. Áurea Echevarria do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As estruturas dos compostos foram anteriormente confirmadas por RMN ¹H e ¹³C e espectroscopia de massas (DOS SANTOS & ECHEVARRIA, 2001). Os valores de pKa dos derivados variam de 3 a 4 (ECHEVARRIA, comunicação pessoal).

4.2 Preparo das soluções dos derivados mesoiônicos

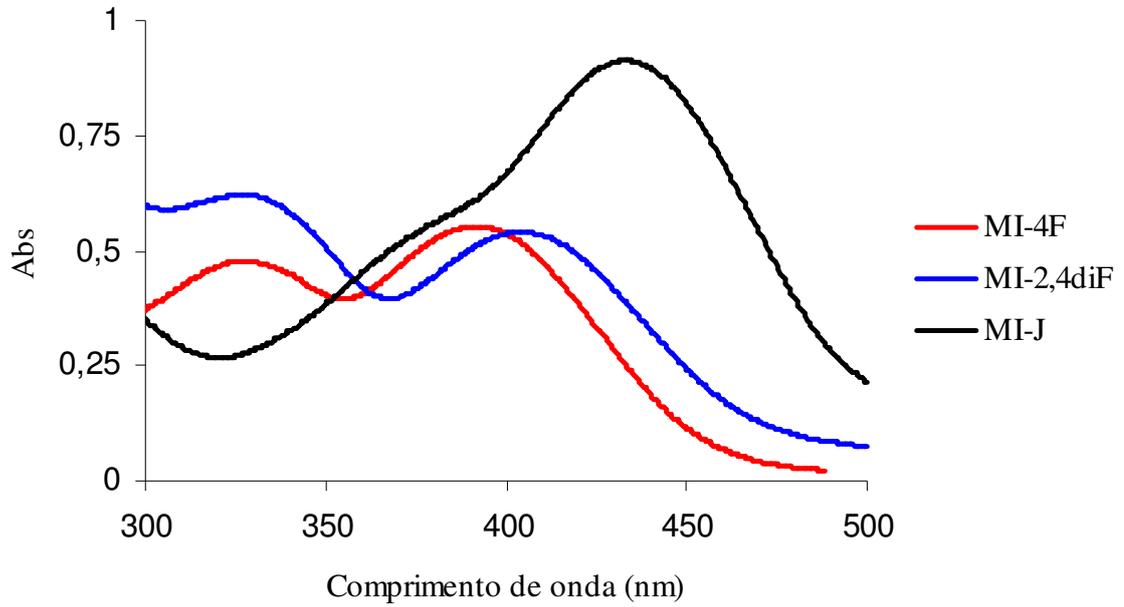
Foram preparadas soluções estoque em DMSO dos três derivados em estudo, sendo que para o *MI-J* e *MI-2,4diF* a concentração final desta solução foi de 6,5 mmol.L⁻¹ e para o *MI-4F* de 5,2 mmol.L⁻¹. Estas soluções estoque foram mantidas congeladas a -18°C e utilizadas por, no máximo, um mês após o preparo. Segundo Echevarria (comunicação pessoal), as análises de RMN de ¹H e ¹³C e espectroscopia

de massa confirmam que estes derivados mantêm suas características estruturais se armazenados nestas condições. Para a utilização nos ensaios, as soluções estoque foram diluídas em meio de reação para obter a concentração final desejada em cada situação experimental, sendo utilizadas quatro diferentes concentrações dos derivados mesoiônicos: 6,5; 32,5; 65 e 130 nmol.mg⁻¹ de proteína mitocondrial. Em todos os ensaios os derivados foram previamente incubados durante 2 minutos com as preparações mitocondriais. Para cada experimento realizado foi feito também um ensaio controle contendo a mesma quantidade do solvente (DMSO) nas mesmas condições experimentais. Em nenhum dos ensaios executados foram observados efeitos significativos do DMSO sobre as preparações mitocondriais.

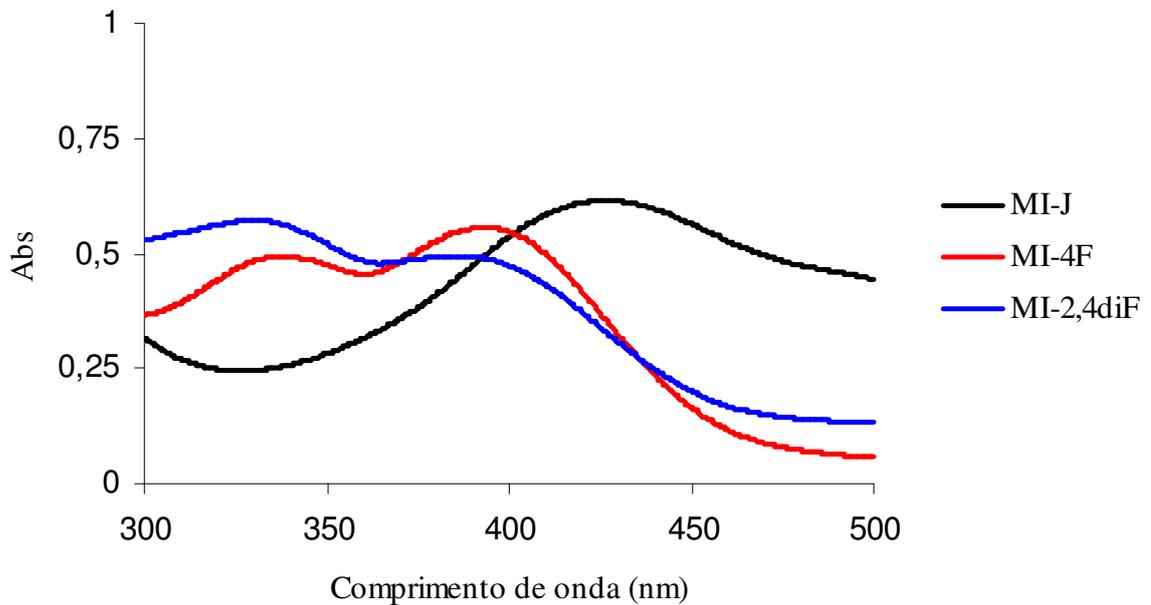
Para avaliar se a mudança de solvente poderia causar alteração estrutural dos derivados, foram realizados espectros de absorção UV-visível. Os três derivados foram dissolvidos em DMSO ou em tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, ambos na concentração de 22 µmol.L⁻¹. Estas soluções foram analisadas em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV - 2450 UV/VIS equipado com impressora HP Deskjet D1360 e banho termostaticado EYELA, no intervalo de comprimento de onda de 300 nm a 500 nm. Os espectros de absorção dos derivados dissolvidos em DMSO e tampão fosfato, estão representados nas figuras 19 A e 19 B, respectivamente. Observa-se um pequeno deslocamento hipsocrômico para todos os derivados quando dissolvidos em solução aquosa tamponada em comparação a dissolução em DMSO, um solvente orgânico. Como os valores de pKa para os derivados variam de 3 a 4, em solução aquosa com pH 7,4, estes estão em sua forma desprotonada (figura 25), o que justifica o aumento de energia observado nos espectros (deslocamento hipsocrômico). Entretanto, não se observa variações que indiquem mudança de estrutura.

FIGURA 19. ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DOS DERIVADOS MESOIÔNICOS

A.



B.



A. Espectro de absorção UV-VIS dos derivados mesoiônicos na concentração de $22 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em DMSO. B. E Espectro de absorção UV-VIS dos derivados mesoiônicos na concentração de $22 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato 50mmol.L^{-1} , pH 7,4.

4.3. Animais

Para o isolamento de mitocôndrias de fígado de rato, foram utilizados ratos machos albinos Wistar, com peso variando entre 180 - 220 g, mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com dieta balanceada Purina® e água a vontade e, para o isolamento das mitocôndrias, foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas permitindo-se água a vontade. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

4.4 Efeitos dos derivados mesoiônicos sobre o metabolismo energético mitocondrial

Os efeitos dos derivados mesoiônicos sobre o metabolismo energético mitocondrial foram determinados avaliando os seguintes parâmetros: consumo de oxigênio durante os estados 3 e 4 da respiração, atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória, atividade ATPásica e inchamento mitocondrial (*swelling*).

4.4.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

4.4.1.1 Isolamento de mitocôndrias para determinação do consumo de oxigênio e atividade ATPásica .

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por VOSS et al. (1961), com algumas modificações, utilizando-se como meio de extração: D-Manitol 250 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, EGTA 1mmol.L⁻¹ e BSA 0,1 g%. 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 com tesoura e homogeneizado em homogeneizador van Potter Elvehjen, usando-se sucessivamente pistilo frouxo e normal. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 3200 x g a 4°C em centrífuga Hitachi, modelo himac CR-21E, 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 ressuspenso, 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 ressuspenso em meio de extração à concentração aproximada de 50 mg.mL⁻¹.

4.4.1.2 Isolamento de mitocôndrias para determinação do grau de inchamento mitocondrial.

Para os experimentos de inchamento mitocondrial, a técnica de isolamento foi a mesma descrita no item anterior, utilizando-se, porém, o meio de extração constituído de: sacarose 330 mmol.L⁻¹, Tris-HCl 1,0 mmol.L⁻¹, pH 7,5 e EDTA 1,0 mmol.L⁻¹ (MUSTAFA et al. 1966). Na última lavagem foi omitido o EDTA. A concentração final de proteína mitocondrial foi ajustada para 50 mg.mL⁻¹, utilizando-se meio de extração sem EDTA.

4.4.1.3 Obtenção de mitocôndrias rompidas para avaliação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória

Mitocôndrias de fígado de rato, isoladas como descrito no item 4.4.1.1, foram congeladas em nitrogênio líquido até sua utilização, quando foram rompidas por 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Os fragmentos de membrana obtidos, cujos componentes da cadeia respiratória apresentaram atividade satisfatória, foram utilizados para a avaliação da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória e ATPásica.

4.5 Métodos analíticos envolvendo as preparações mitocondriais

4.5.1 Determinação do consumo de O₂, cálculo do coeficiente de controle respiratório (CCR) e razão ADP/O.

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 termostatzada, 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, ou com glutamato de sódio 5 mmol.L⁻¹ e malato de sódio 0,5 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 2,0 mmol.L⁻¹ e ADP 0,2 mmol.L⁻¹, na ausência de rotenona. A quantidade de mitocôndrias utilizada em cada experimento expressa com relação à concentração de proteínas, foi de 1,0 mg, quando o substrato utilizado foi o succinato de sódio e, de 2,0 mg, quando o glutamato e malato de sódio foram os substratos oxidáveis utilizados.

As velocidades respiratórias foram expressas 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). A razão ADP/O foi determinada como descrito por CHANCE & WILLIAMS (1955), a qual foi obtida da razão entre quantidade de ADP adicionado no sistema em nmol e a quantidade de oxigênio consumido, em nátomos, durante a respiração na presença de ADP (estado 3). 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 (estado 4).

4.5.2 Determinação da atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória

A determinação das atividades das enzimas ligadas à cadeia respiratória foi realizada em preparações de mitocôndrias rompidas como descrito no item 4.4.1.3. Os métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos em espectrofotômetro Hitachi, modelo U - 2001 UV/VIS equipado com impressora Epson Action Printer 2000. Em alguns casos a atividade foi determinada polarograficamente através da determinação do consumo de O₂, com eletrodo específico, em oxígrafo Gilson.

4.5.2.1 NADH oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade do complexo NADH Oxidase foi determinada polarograficamente como recomendado por SINGER (1974). O sistema de reação, à temperatura de 28° C, foi constituído de: tampão fosfato 80 mmol.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 50 µmol.L⁻¹, NADH 0,2 mmol.L⁻¹ e 1 mg de proteína mitocondrial. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,3 mL. A reação foi iniciada pela adição de NADH, e acompanhada pelo consumo de oxigênio. Os resultados foram expressos em nmol de oxigênio consumido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial considerando a solubilidade do O₂ na água, a 28°C e 1 atm é de 235 µmol.L⁻¹ (ESTABROOK, 1967).

4.5.2.2 NADH-Desidrogenase (NADH: Ferricianeto Óxido-Redutase EC 1.6.5.3)

A atividade do complexo NADH-Desidrogenase foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por SINGER (1974). A reação ocorreu a 28°C, em sistema de reação constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol.L⁻¹, NADH 0,2 mmol.L⁻¹, ferricianeto de potássio 0,6 mmol.L⁻¹, rotenona 1 µmol.L⁻¹ e 0,1 mg de proteína mitocondrial. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,0 mL. A reação foi monitorada a 420 nm e os resultados expressos em micromol de ferricianeto reduzido. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína, considerando o coeficiente de extinção molar do ferricianeto de 1.040 mol.L⁻¹. cm⁻¹ (CREUTZ & SUTIN, 1973).

4.5.2.3 NADH citocromo *c* redutase (NADH: Citocromo *c* Óxido Redutase EC 1.6.99.3)

A atividade do NADH citocromo *c* redutase foi avaliada pelo método descrito por SOMLO (1965). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol.L⁻¹, NADH 50 µmol.L⁻¹, citocromo *c* (oxidado) 40 µmol.L⁻¹, NaCN 1mmol.L⁻¹ e 0,1 mg de proteína mitocondrial. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,0 mL. A reação ocorreu a 28° C e foi iniciada

pela adição de NADH. A velocidade de redução do citocromo *c* foi acompanhada a 550 nm e o resultado expresso em nmol de citocromo *c* reduzido. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando-se a diferença no coeficiente de extinção do citocromo *c* (red-ox) a 550 nm de 19.000 mol.L⁻¹. cm⁻¹ (KEYHANI & KEYHANI, 1975).

4.5.2.4 Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade do complexo Succinato Oxidase foi determinada através do registro polarográfico do consumo de O₂ pelo método de SINGER (1974). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 80 mmol.L⁻¹, pH 7,4, succinato de sódio 10 mmol.L⁻¹ e 0,5 mg de proteína mitocondrial. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,3 mL. A reação ocorreu a 28° C e foi iniciada pela adição do substrato. Os resultados foram expressos em nanomol de oxigênio consumido. min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando a solubilidade do O₂ na água, a 28°C e 1 atm é de 235 µmol.L⁻¹ (ESTABROOK, 1967).

4.5.2.5 Desidrogenase succínica (Succinato: Fenazina Metassulfato Óxido Redutase EC 1.3.5.1)

A atividade da desidrogenase succínica foi determinada pelo método de SINGER (1974), utilizando-se 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) e fenazina metassulfato (PMS) como aceptores artificiais de elétrons. O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, succinato de sódio 20 mmol.L⁻¹, NaCN 1 mmol.L⁻¹, EDTA 2 mmol.L⁻¹, rotenona 1 µmol.L⁻¹ e 0,1 mg de proteína mitocondrial. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,0 mL. A mistura foi incubada por 10 minutos a 28°C, sendo iniciada a reação pela adição de DCPIP 60 µmol.L⁻¹ e PMS 1 mmol.L⁻¹. A velocidade de redução do DCPIP foi monitorada a 600 nm e os resultados foram expressos em nanomol de DCPIP reduzidos.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 19.100 mol.L⁻¹.cm⁻¹ para o DCPIP reduzido (SINGER, 1974).

4.5.2.6 Succinato citocromo *c* redutase (Succinato: Ferrocitocromo *c* Óxido-redutase EC 1.3.99.1)

A atividade da succinato citocromo *c* redutase foi determinada pelo método de SOMLO (1965), medindo-se a redução do citocromo *c*. A cadeia respiratória foi bloqueada com NaCN e rotenona. O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol.L⁻¹, NaCN 1 mmol.L⁻¹, succinato de sódio 5 mmol.L⁻¹, rotenona 2 µmol.L⁻¹ e 0,1 mg de proteína mitocondrial. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,0 mL. Os reagentes presentes no sistema foram incubados por 10 minutos a 28° C e a reação iniciada pela adição de 40 µmol.L⁻¹ do citocromo *c*. A redução do citocromo *c* foi acompanhada a 550 nm e a atividade enzimática expressa em nmol de citocromo *c* reduzido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando-se a diferença do coeficiente de extinção do citocromo *c* (red-ox) a 550 nm de 19.000 mol.L⁻¹.cm⁻¹ (KEYHANI & KEYHANI, 1975).

4.5.2.7 Citocromo *c* oxidase (Ferrocitocromo *c*: Oxigênio Óxido-redutase EC 1.9.3.1)

4.5.2.7.1 Obtenção do ferrocitocromo *c*.

Para a obtenção da forma reduzida do citocromo *c* utilizou-se o ditionito de sódio (Na₂S₂O₈) como agente redutor. O ferrocitocromo *c* foi separado do excesso de ditionito por cromatografia em coluna de Sephadex G-25 (YONETANI & RAY, 1965). A concentração de citocromo *c* reduzido foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de 27.700 mol.L⁻¹.cm⁻¹ a 550 nm (MARGOLIASH, 1954). O ferrocitocromo preparado através deste procedimento contém menos de 5% da proteína oxidada e se mantém reduzida durante 24 horas.

4.5.2.7.2 Determinação da atividade do complexo citocromo *c* oxidase

A atividade do complexo citocromo *c* oxidase foi determinada espectrofotometricamente segundo MASON et al. (1973). O sistema de reação foi

constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4, EDTA 2 mmol.L⁻¹, ferrocitocromo *c* 30 μmol.L⁻¹ e 0,1 mg de proteína mitocondrial. Os experimentos foram realizados a 28°C em volume final de 1,0 mL. A atividade foi expressa em nmol de citocromo *c* oxidado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando-se a diferença no coeficiente de extinção molar do citocromo *c* (red-ox) a 550 nm como descrito no item 4.5.2.6.

4.5.2.8 Determinação da atividade da F₁F₀ ATPase

4.5.2.8.1 Determinação da atividade da F₁F₀ ATPase em mitocôndrias rompidas

A atividade da ATPase (ATP fosfohidrolase) foi determinada medindo-se a liberação de fosfato inorgânico decorrente da hidrólise do ATP, na presença de um sistema regenerador de ATP, de acordo com o descrito por PULMANN et al. (1960), com algumas modificações. O ensaio foi realizado a 37°C, em sistema de reação constituído de sacarose 50 mmol.L⁻¹, Tris-acetato 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, acetato de magnésio 3 mmol.L⁻¹, acetato de potássio 30 mmol.L⁻¹, fosfoenolpiruvato (PEP) 1 mmol.L⁻¹, piruvato quinase 4 unidades, lactato desidrogenase 3 unidades, NADH 0,2 mmol.L⁻¹, ATP 3 mmol.L⁻¹ e 0,1 mg de proteína mitocondrial. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada com a adição de ATP e os resultados expressos em nmol de fosfato liberado min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando que 1 nmol de NADH oxidado corresponde a 1 nmol de fosfato liberado.

4.5.2.8.2 Determinação da atividade da F₁F₀ ATPase em mitocôndrias intactas

A atividade da F₁F₀ ATPase em mitocôndrias intactas foi determinada através do método de PULLMAN et al. (1960), com algumas modificações. O sistema de reação foi constituído de: sacarose 50 mmol.L⁻¹, tampão Tris - HCl 12 mmol.L⁻¹, pH 7,4, KCl 50 mmol.L⁻¹ e 2 mg de proteína mitocondrial. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,0 mL mantendo a temperatura de reação em 30° C.

A reação foi iniciada com a adição de ATP 3 mmol.L⁻¹ e mantida sob agitação constante. Após 10 minutos foi adicionado TCA, em concentração final de 5% (m/v), com o objetivo de finalizar a reação. Em seguida, o material foi centrifugado a 7.800 x g por 1 min, sendo o fosfato inorgânico presente no sobrenadante dosado segundo o método de SUMNER (1944). Os resultados foram expressos em nanomol de fosfato liberado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial.

4.5.3 Determinação do inchamento (*Swelling*) em mitocôndrias desenergizadas na presença de valinomicina e K⁺

Os experimentos de inchamento mitocondrial foram desenvolvidos em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV - 2450 UV/VIS equipado com impressora HP Deskjet D1360 e banho termostaticado EYELA, no comprimento de onda de 546 nm.

O inchamento mitocondrial decorrente da entrada de K⁺ na matriz, mediada pelo ionóforo valinomicina, foi determinado como descrito por MORENO & MADEIRA (1990). O meio de reação, mantido a 28°C, foi constituído de KNO₃ 135 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 5 mmol.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,1 mmol.L⁻¹, rotenona 1 µmol.L⁻¹, antimicina A 2 µg, valinomicina 4 µg e 0,3 mg de proteína mitocondrial por mililitro de solução. E os experimentos foram realizados em volume final de 3,0 mL.

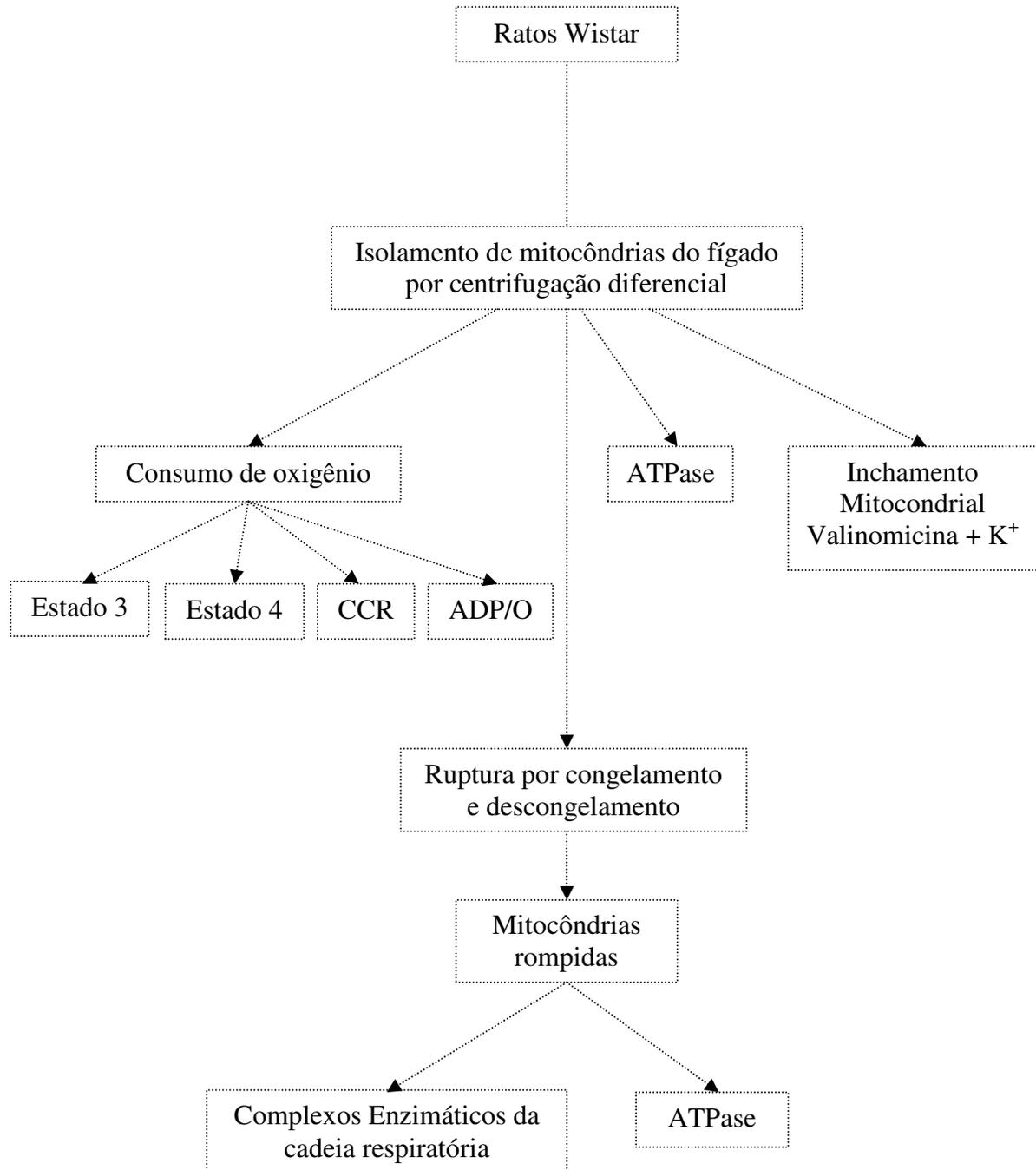
4.6 Determinação da concentração de proteínas

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 Action Printer 2000.

4.7 Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (média \pm dp), e foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, para a comparação das médias. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $P < 0,05$.

4.8 Estratégia Experimental



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeitos dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre o consumo de oxigênio e parâmetros relacionados.

No sentido de avaliar os efeitos dos compostos MI-J, MI-4F e MI-2,4 diF (figura 18 A, C e D) sobre a bioenergética mitocondrial, optou-se pelo uso de mitocôndrias isoladas de fígado de rato como modelo experimental. Os experimentos de consumo de oxigênio foram desenvolvidos utilizando-se como substratos oxidáveis o glutamato e malato de sódio ou succinato de sódio, sendo analisados os seguintes parâmetros: velocidade do consumo de oxigênio durante os estados 3 e 4 da respiração; coeficiente de controle respiratório (CCR) e a razão ADP/O.

Os resultados obtidos nestes experimentos quando os substratos oxidáveis foram glutamato e malato de sódio estão mostrados nas tabelas 3 – 5. Na tabela 3 observa-se que o MI-J promoveu um decréscimo na velocidade respiratória mitocondrial durante o estado 3 (em presença de ADP). Uma inibição de aproximadamente 18% ocorreu já em presença da menor concentração do composto ($6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína). Na concentração seguinte de $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína (cinco vezes maior) não foi observada alteração no valor da inibição que permaneceu em cerca de 20%. Porém, para as duas últimas concentrações referentes a dez (65 nmol.mg^{-1} de proteína) e vinte vezes (130 nmol.mg^{-1} de proteína) a concentração inicial ($6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína) a inibição foi mais acentuada, alcançando um valor de aproximadamente 37% e 59%, respectivamente. Já o composto mono fluorado, MI-4F (tabela 4), promoveu um efeito mais pronunciado que o MI-J. Mesmo causando uma diminuição da velocidade do estado 3 de apenas ~ 10% na menor concentração ($6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína), na maior dose observou-se inibição total do consumo de oxigênio. Nas concentrações intermediárias a inibição foi dose dependente de ~14% ($32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína) e ~ 33 % (65 nmol.mg^{-1} de proteína).

TABELA 3- EFEITOS DO MI-J SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS GLUTAMATO E MALATO

| MI-J (nmol.mg ⁻¹ prot.) | % Controle | | | |
|---------------------------------------|--------------|---------------|--------------|-------------|
| | Estado 3 | Estado 4 | CCR | ADP/O |
| 0 (controle) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6,5 | 82,6 ± 7,8* | 123,1 ± 16,9* | 59,1 ± 12,6* | 91,3 ± 7,7* |
| 32,5 | 80,6 ± 10,8* | – | – | – |
| 65 | 63,7 ± 5,9* | – | – | – |
| 130 | 40,8 ± 9,3* | – | – | – |

As condições experimentais estão descritas no item 4.5.1 de materiais e métodos. Sistema de reação: D-Manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%, pH 7,2, foi suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L⁻¹ e malato de sódio 0,5 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 2,0 mmol.L⁻¹ e ADP 0,2 mmol.L⁻¹ e 2,0 mg de proteína mitocondrial. Estado 3- 100% corresponde a 79,73 ± 10,96 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Estado 4- 100% corresponde a 9,33 ± 1,95 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Coeficiente de controle respiratório (CCR)- 100% corresponde a 8,76 ± 2,69. ADP/O (nmol ADP/nátomos de oxigênio consumidos)- 100% correspondem a 2,70 ± 0,59. Os resultados representam a média ± desvio padrão (dp) de 6 experimentos independentes. * Valores estatisticamente diferentes do controle (P < 0,05).

TABELA 4- EFEITOS DO MI-4F SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS GLUTAMATO E MALATO.

| MI-4F (nmol.mg ⁻¹ prot.) | % Controle | | | |
|--|-------------|---------------|-------------|-------------|
| | Estado 3 | Estado 4 | CCR | ADP/O |
| 0 (controle) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6,5 | 90,9 ± 3,7* | 240,1 ± 21,5* | 37,1 ± 3,2* | 80,8 ± 6,6* |
| 32,5 | 86,8 ± 5,6* | – | – | – |
| 65 | 67,0 ± 9,1* | – | – | – |
| 130 | – | – | – | – |

As condições experimentais estão descritas no item 4.5.1 de materiais e métodos. Sistema de reação: D-Manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%, pH 7,2, foi suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L⁻¹ e malato de sódio 0,5 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 2,0 mmol.L⁻¹ e ADP 0,2 mmol.L⁻¹ e 2,0 mg de proteína mitocondrial. Estado 3- 100% corresponde a 67,10 ± 6,72 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Estado 4- 100% corresponde a 7,19 ± 2,09 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Coeficiente de controle respiratório (CCR)- 100% corresponde a 9,95 ± 2,73. ADP/O (nmol ADP/nátomos de oxigênio consumidos)- 100% correspondem a 2,70 ± 0,40. Os resultados representam a média ± dp de 6 experimentos independentes. * Valores estatisticamente diferentes do controle (P < 0,05).

Comportamento semelhante também foi observado para o MI-2,4 diF (tabela 5), sendo ainda mais drástico que o observado para o MI-4F e MI-J nas maiores concentrações, com inibição de ~74% para a concentração de 65 nmol.mg⁻¹ de proteína, sendo que na maior concentração a inibição foi total. Estes resultados podem ser comparados aos obtidos por CADENA et al. (1998) para o MI-D, outro derivado 1,3,4-tiadiazólio mesoiônico cujo substituinte do anel cinamoil é o NO₂ (figura 18 B). Na concentração de 65 nmol.mg⁻¹ de proteína aquele composto diminuiu a velocidade respiratória do estado 3 em ~ 22%, ou seja, uma inibição comparável a exercida pelo MI-4F (~ 33 %) e MI-J (~ 37%), mas inferior a observada para o MI-2,4 diF (~ 74%). Entretanto, é importante ressaltar que o substrato utilizado pelos autores para gerar NADH foi o glutamato e neste estudo utilizamos com a mesma finalidade, glutamato e malato. Portanto, no presente estudo os efeitos dos derivados sobre o consumo de oxigênio podem estar relacionados à ação dos compostos sobre duas desidrogenases, glutamato e malato desidrogenases, bem como sobre os mecanismos de transporte para os dois substratos.

TABELA 5- EFEITOS DO MI-2,4DIF SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS GLUTAMATO E MALATO.

| MI-2,4diF (nmol.mg ⁻¹ prot.) | % Controle | | | |
|--|-------------|---------------|-------------|-------------|
| | Estado 3 | Estado 4 | CCR | ADP/O |
| 0 (controle) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6,5 | 91,8 ± 6,2* | 172,2 ± 17,5* | 51,7 ± 2,4* | 92,0 ± 2,4* |
| 32,5 | 94,5 ± 4,0* | – | – | – |
| 65 | 26,0 ± 8,9* | – | – | – |
| 130 | – | – | – | – |

As condições experimentais estão descritas no item 4.5.1 de materiais e métodos. Sistema de reação: D-Manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%, pH 7,2, foi suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L⁻¹ e malato de sódio 0,5 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 2,0 mmol.L⁻¹ e ADP 0,2 mmol.L⁻¹ e 2,0 mg de proteína mitocondrial. Estado 3- 100% corresponde a 61,69 ± 6,02 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Estado 4- 100% corresponde a 9,01 ± 1,72 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Coeficiente de controle respiratório (CCR)- 100% corresponde a 7,04 ± 1,30. ADP/O (nmol ADP/nátomos de oxigênio consumidos)- 100% correspondem a 2,62 ± 0,41. Os resultados representam a média ± dp de 6 experimentos independentes. * Valores estatisticamente diferentes do controle (P < 0,05).

Neste sentido, sabe-se que o transporte de metabólitos através da membrana mitocondrial interna é predominantemente aniônico e varia de tecido para tecido. Em mitocôndrias de fígado dois caminhos de transporte do glutamato citosólico para a matriz mitocondrial podem ser encontrados. O primeiro ocorre através do antiporter glutamato/ OH^- e o segundo pela troca com o aspartato intramitocondrial com a participação do carreador glutamato-aspartato, sendo ambos dependentes do ΔpH . Já no caso do malato existem três tipos de transporte: antiporte malato/fosfato e malato/ α -cetoglutarato através de carreadores de dicarboxilatos e malato/citrato pelo carreador de tricarboxilatos. Quando malato e glutamato estão presentes na preparação mitocondrial a entrada destes compostos na matriz pode ocorrer através da lançadeira malato aspartato, que inclui o transporte acoplado destes substratos pelos carreadores glutamato/aspartato e malato/ α -cetoglutarato (TZAGOLOFF, 1982; NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Desta forma não pode ser descartada a interferência dos derivados sobre os carreadores dos substratos para a matriz mitocondrial, o que poderia justificar, ao menos em parte, a pronunciada diminuição da velocidade de consumo de oxigênio observada (tabelas 3 – 5).

Em relação ao estado 4, caracterizado pela ausência de ADP devido a sua fosforilação à ATP, observa-se na tabela 3 que o MI-J em menor concentração ($6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína) promoveu um pequeno aumento de $\sim 23\%$ na velocidade do consumo de oxigênio. Porém, nas maiores concentrações o estímulo foi tamanho que a velocidade do consumo de oxigênio se igualou ao do estado 3, caracterizando o efeito desacoplador do composto. Por sua vez, os efeitos dos derivados MI-4F e MI-2,4diF foram mais pronunciados. Já na menor concentração ($6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína) o estímulo foi de 140% e 72% para MI-4F e MI-2,4 diF, respectivamente (tabelas 4 e 5). Estímulo no estado 4 e efeito desacoplador foram também evidenciados por CADENA et al. (1998) para o MI-D. Para a concentração de 65 nmol.mg^{-1} de proteína o derivado nitro estimulou em 175% este estado da respiração em comparação ao total desacoplamento observado para os derivados deste estudo nesta mesma concentração.

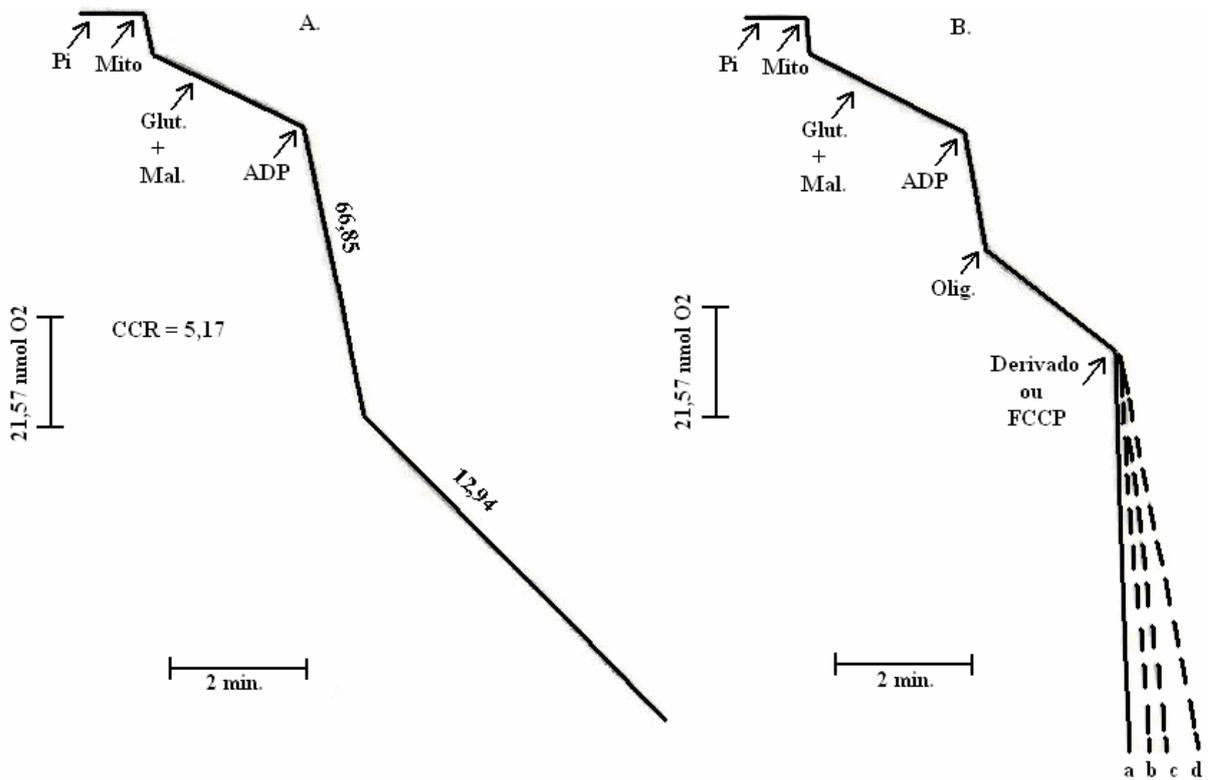
Em virtude do acentuado estímulo do estado 4, os valores de CCR e razão ADP/O puderam ser determinados apenas para a menor concentração dos derivados (6,5 nmol.mg⁻¹ de proteína). Nesta concentração os valores destes parâmetros foram diminuídos pelos três compostos. A inibição observada sobre o estado 3 (tabelas 3-5) também se refletiu nos valores do CCR que sofreram um decréscimo de aproximadamente 41% e 49% para o MI-J e MI-2,4diF, respectivamente, sendo ainda mais pronunciado para o MI-4F com valor de ~ 63%. Em relação à razão ADP/O, o MI-J e o MI-2,4diF promoveram uma discreta diminuição (~ 9%), já para o composto monofluorado (MI-4F) esta diminuição foi maior, cerca de 20% em relação ao controle. Segundo CADENA et al. (1998), o MI-D promoveu uma diminuição de aproximadamente 65% no coeficiente de controle respiratório e de ~ 45% para a razão ADP/O na concentração de 65 nmol.mg⁻¹ de proteína. Como descrito anteriormente nesta mesma concentração, estes parâmetros não puderam ser calculados para os três compostos em estudo devido ao pronunciado estímulo do estado 4.

Os três derivados mesoiônicos estudados promoveram um acentuado estímulo do estado 4 (tabelas 3 – 5), uma característica de agentes desacopladores da fosforilação oxidativa. No sentido de comprovar este efeito, foram realizados experimentos de consumo de oxigênio na presença de oligomicina (figura 20). A oligomicina é um antibiótico que se liga à subunidade F_o (componente sensível a oligomicina) do complexo F₁F_o ATPsintase (ATPase). É considerado um inibidor da fosforilação oxidativa, pois bloqueia a condutância de prótons pela F_o impedindo a utilização da energia para síntese de ATP (TZAGOLOFF, 1982). Quando adicionada a mitocôndrias em presença de substrato oxidável e ADP (estado 3 da respiração) ela impede o retorno de prótons à matriz mitocondrial, simulando o estado 4 da respiração. Compostos que alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial interna, de forma a permitir a entrada de prótons na matriz mitocondrial, são capazes de restabelecer o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória e conseqüentemente, aumentar o consumo de oxigênio (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

A figura 20 mostra os efeitos provocados pela adição dos derivados mesoiônicos em comparação ao FCCP, um agente desacoplador clássico (HEYTLER & PRICHARD, 1962; SKULACHEV, 1998) sobre o consumo de oxigênio durante o estado 4 induzido por oligomicina. O FCCP, um translocador de prótons muito utilizado experimentalmente, apresenta em sua estrutura prótons dissociáveis e permeia a membrana mitocondrial interna tanto em sua forma de ácido protonado quanto de base conjugada. Esta permeabilidade se deve a sua estrutura possuir um extenso sistema de orbitais- π , o qual deslocaliza a carga de forma a manter sua solubilidade na bicamada lipídica. Quando estabelecida uma força próton-motriz (Δp) o FCCP catalisa, por meio de um processo de ciclização, o uniporter de prótons para a matriz mitocondrial que é mais alcalina. Este aumento da condutância de prótons através da membrana pode extinguir o $\Delta\Psi_m$ e o ΔpH (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

Nos resultados mostrados na figura 20 observa-se que os três compostos, na concentração de $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial, promoveram o aumento do consumo de oxigênio de forma semelhante ao FCCP, porém, com intensidades diferentes. O composto MI-2,4diF apresentou um efeito mais pronunciado, seguido do MI-4F e MI-J. O composto difluorado apresentou aproximadamente 88% da velocidade de consumo de oxigênio em relação ao consumo de oxigênio na presença de FCCP. Já os compostos MI-4F e MI-J, foram menos efetivos, apresentando 55% e 40% de consumo de oxigênio, respectivamente, em relação à adição de FCCP. Este efeito sugere que os derivados mesoiônicos interferem na permeabilidade da membrana mitocondrial interna aumentando sua condutância à prótons, efeito característico de agentes desacopladores (TZAGOLOFF, 1982).

FIGURA 20. EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO POR MITOCÔNDRIAS EM PRESENÇA DE OLIGOMICINA.



As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos no item 4.5.1.

A. Experimento representativo do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato e os valores representam as velocidades de consumo de oxigênio por minuto por miligrama de proteína mitocondrial. CCR – coeficiente de controle respiratório.

B. Experimento representativo do consumo de oxigênio em presença de oligomicina ($3,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$): **a.** FCCP $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($86,26 \text{ nmol de O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial); **b.** MI-2,4diF $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial ($75,48 \text{ nmol O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial); **c.** MI-4F $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial ($47,44 \text{ nmol O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial) e **d.** MI-J $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial ($34,50 \text{ nmol O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial). Adições: **Pi** – fosfato inorgânico ($2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$); **Mito.** – $2,0 \text{ mg}$ de proteína mitocondrial; **Glu.** – glutamato de sódio ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$); **Mal.** – malato de sódio ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$); **ADP** – adenosina difosfato ($0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$); **Olig.** – oligomicina ($3,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Os traçados são representativos triplicatas de quatro experimentos independentes.

Neste estudo também foram avaliados os efeitos dos derivados mesoiônicos sobre o consumo de oxigênio resultante do transporte de elétrons gerados pela oxidação do succinato no complexo II da cadeia respiratória. Os efeitos foram mais discretos em relação aos observados quando utilizados glutamato e malato de sódio. Estes resultados estão mostrados nas tabelas 6 - 8. Na tabela 6 observa-se que o MI-J promoveu um decréscimo de ~33% na velocidade respiratória durante o estado 3, somente na maior concentração (130 nmol.mg^{-1} de proteína). Embora não significativo, foi observado um pequeno estímulo (~20%) deste estado para a concentração de $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína.

A velocidade de consumo de oxigênio durante o estado 4 da respiração mitocondrial aumentou na presença do composto MI-J. Na tabela 6 observa-se um estímulo do estado 4 da respiração de ~30% para a menor concentração ($6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína). Como consequência deste efeito, foi observada a diminuição do valor do coeficiente de controle respiratório e razão ADP/O em 27% e 12%, respectivamente, para esta concentração. É importante destacar que, como observado quando o substrato era o glutamato e malato, devido ao acentuado estímulo, foi possível determinar a velocidade do estado 4 apenas na menor concentração dos compostos ($6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína).

Nas tabelas 7 e 8, pode-se notar que os compostos fluorados exercem seu efeito sobre o consumo de oxigênio de forma semelhante. Para ambos os compostos o estado 3 da respiração foi inibido de forma dose dependente, comportamento diferente ao observado para o composto MI-J, uma vez que este último promoveu a inibição do estado 3 apenas na maior concentração. Diferentemente do observado quando o substrato oxidável era glutamato e malato (tabelas 3-5), na última concentração (130 nmol.mg^{-1} de proteína) ainda foi possível observar as velocidades do consumo de oxigênio durante o estado 3 para os compostos fluorados, com inibição de aproximadamente 72% em relação aos controles (ensaios de consumo de oxigênio na ausência dos compostos mesoiônicos). Entretanto, apesar dos valores de inibição do estado 3 encontrados para os compostos MI-4F e MI-2,4diF (tabelas 7 e 8) serem

semelhantes, o composto difluorado mostrou-se mais efetivo em concentrações menores (6,5 e 32,5 nmol.mg⁻¹ de proteína) em comparação ao composto monofluorado.

Em relação ao estado 4 da respiração, o comportamento dos derivados MI-4F e MI-2,4diF parece, também, ser semelhante quando o substrato usado é o succinato. Ambos os compostos causaram um estímulo de aproximadamente 42% para o estado 4 da respiração, 50% de diminuição do coeficiente de controle respiratório (CCR) e 13% de diminuição do valor da razão ADP/O para a concentração de 6,5 nmol.mg⁻¹ de proteína. Para as concentrações de 32,5, 65 e 130 nmol.mg⁻¹ de proteína a velocidade de consumo de oxigênio durante o estado 4 (na ausência de ADP) igualou-se a velocidade observada para o estado 3 (na presença de ADP), caracterizando o efeito desacoplador destes compostos. Desta forma, não foi possível o cálculo do coeficiente de controle respiratório e razão ADP/O para estas concentrações.

TABELA 6- EFEITOS DO MI-J SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATO SUCCINATO

| MI-J (nmol.mg ⁻¹ prot.) | % Controle | | | |
|---------------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| | Estado 3 | Estado 4 | CCR | ADP/O |
| 0 (controle) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6,5 | 96,0 ± 6,4 | 129,7 ± 6,3* | 72,9 ± 4,4* | 88,0 ± 7,5* |
| 32,5 | 121,5 ± 18,5 | – | – | – |
| 65 | 96,0 ± 10,2 | – | – | – |
| 130 | 67,1 ± 9,2* | – | – | – |

As condições experimentais estão descritas no item 4.5.1 de materiais e métodos. Sistema de reação: D-Manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%, pH 7,2, foi suplementado com succinato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, rotenona 1 μmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 1,0 mmol.L⁻¹, ADP 0,1 mmol.L⁻¹ e 1,0 mg de proteína mitocondrial. Estado 3- 100% corresponde a 55,63 ± 5,90 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Estado 4- 100% corresponde a 12,83 ± 1,90 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Coeficiente de controle respiratório (CCR)- 100% corresponde a 4,36 ± 0,34. ADP/O (nmol ADP/nátomos de oxigênio consumidos)- 100% correspondem a 1,41 ± 0,11. Os resultados representam a média ± dp de 6 experimentos independentes. * Valores estatisticamente diferentes do controle (P < 0,05).

TABELA 7- EFEITOS DO MI-4F SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATO SUCCINATO

| MI-4F (nmol.mg ⁻¹ prot.) | % Controle | | | |
|--|--------------|---------------|-------------|-------------|
| | Estado 3 | Estado 4 | CCR | ADP/O |
| 0 (controle) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6,5 | 83,5 ± 11,2* | 142,1 ± 12,2* | 55,4 ± 6,0* | 86,4 ± 3,7* |
| 32,5 | 73,2 ± 10,8* | – | – | – |
| 65 | 46,7 ± 5,7* | – | – | – |
| 130 | 28,3 ± 1,9* | – | – | – |

As condições experimentais estão descritas no item 4.5.1 de materiais e métodos. Sistema de reação: D-Manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%, pH 7,2, foi suplementado com succinato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, rotenona 1 µmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 1,0 mmol.L⁻¹, ADP 0,1 mmol.L⁻¹ e 1,0 mg de proteína mitocondrial. Estado 3- 100% corresponde a 48,84 ± 5,56 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Estado 4- 100% corresponde a 11,21 ± 1,50 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Coeficiente de controle respiratório (CCR)- 100% corresponde a 4,38 ± 0,43. ADP/O (nmol ADP/nátomos de oxigênio consumidos)- 100% correspondem a 1,44 ± 0,11. Os resultados representam a média ± dp de 6 experimentos independentes. * Valores estatisticamente diferentes do controle (P < 0,05).

TABELA 8- EFEITOS DO MI-2,4DiF SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO – UTILIZANDO COMO SUBSTRATO SUCCINATO

| MI-2,4diF (nmol.mg ⁻¹ prot.) | % Controle | | | |
|--|-------------|---------------|-------------|-------------|
| | Estado 3 | Estado 4 | CCR | ADP/O |
| 0 (controle) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6,5 | 72,0 ± 5,6* | 141,5 ± 12,6* | 50,6 ± 3,7* | 87,1 ± 4,1* |
| 32,5 | 48,8 ± 1,9* | – | – | – |
| 65 | 47,0 ± 3,1* | – | – | – |
| 130 | 27,3 ± 2,8* | – | – | – |

As condições experimentais estão descritas no item 4.5.1 de materiais e métodos. Sistema de reação: D-Manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%, pH 7,2, foi suplementado com succinato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, rotenona 1 µmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 1,0 mmol.L⁻¹, ADP 0,1 mmol.L⁻¹ e 1,0 mg de proteína mitocondrial. Estado 3- 100% corresponde a 54,12 ± 5,17 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Estado 4- 100% corresponde a 12,89 ± 1,99 nmol O₂ consumidos.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Coeficiente de controle respiratório (CCR)- 100% corresponde a 4,25 ± 0,54. ADP/O (nmol ADP/nátomos de oxigênio consumidos)- 100% correspondem a 1,40 ± 0,11. Os resultados representam a média ± dp de 6 experimentos independentes. * Valores estatisticamente diferentes do controle (P < 0,05).

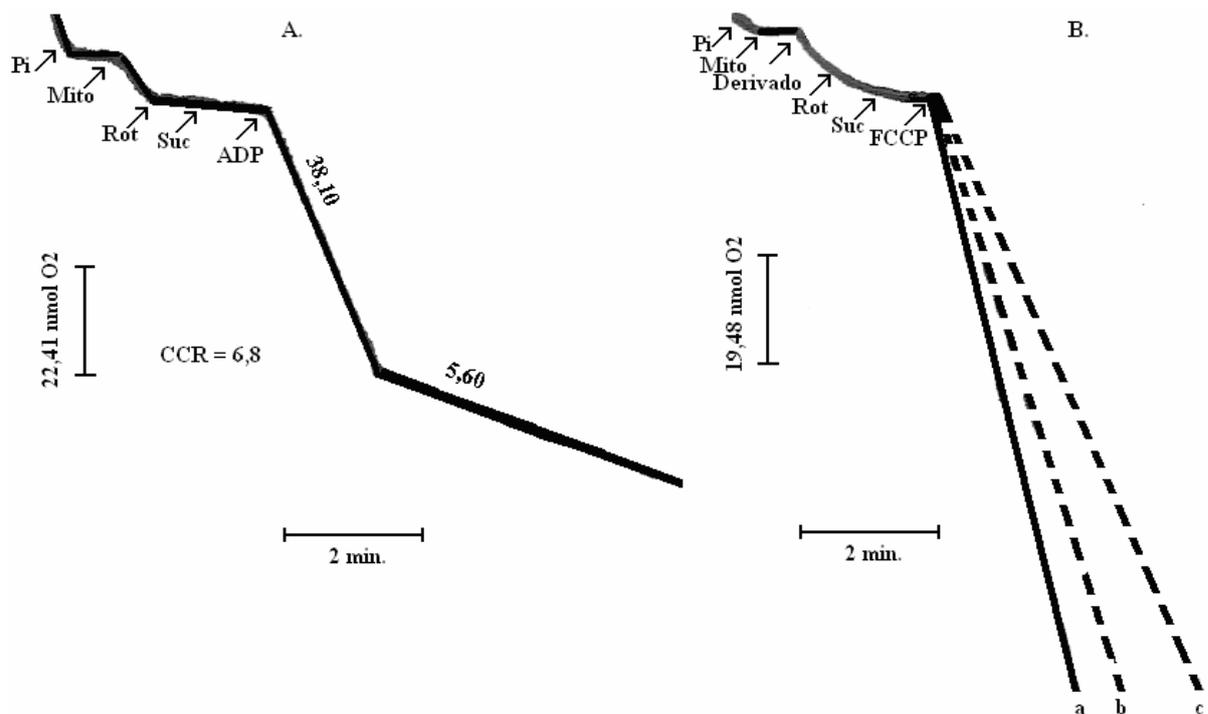
Segundo CADENA et al. (1998), o MI-D apresentou para este substrato oxidável, na concentração de 65 nmol.mg^{-1} de proteína, aproximadamente 36% de inibição sobre o estado 3 da respiração, sendo este valor inferior ao observado para os dois compostos fluorados (~53%). O MI-D também estimulou em ~160% o estado 4, diminuiu em ~ 72% e ~ 50% o coeficiente de controle respiratório e razão ADP/O, respectivamente, sendo que, como já mencionado estes parâmetros não puderam ser mensurados neste estudo devido ao acentuado estímulo do estado 4, observado desde a segunda concentração ($32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína) dos compostos.

Como demonstrado nas tabelas 6 – 8, os três derivados testados inibiram de forma pronunciada o estado 3 da respiração. No sentido de esclarecer esse efeito, foram realizados ensaios de consumo de oxigênio em presença de FCCP. Devido ao efeito desacoplador do FCCP, nestes ensaios o transporte de elétrons ocorre em velocidade máxima, portanto, pode-se observar a ação dos derivados sobre o transporte de elétrons descartando a interferência de eventos relacionados à síntese de ATP. A figura 21 mostra um traçado representativo destes experimentos. Observa-se que todos os compostos, na concentração de 65 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial, causaram uma diminuição da velocidade respiratória, sendo o MI-J o menos efetivo diminuindo a velocidade de consumo de oxigênio em 26%, resultados compatíveis aos observados nos experimentos de consumo de oxigênio (tabela 6). Entretanto, a inibição do estado 3 da respiração pelo MI-J em mitocôndrias acopladas (tabela 6) foi significativa somente para a concentração de 130 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial, enquanto que em mitocôndrias desacopladas por FCCP foi observada já na concentração de 65 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial. Como igualmente observado para os experimentos de consumo de oxigênio em mitocôndrias na ausência de FCCP utilizando succinato como substrato (tabela 7 e 8), os compostos fluorados parecem ter efeitos semelhantes sobre o transporte de elétrons também em mitocôndrias desacopladas. O MI-4F diminuiu o consumo de oxigênio em 47% e o MI-2,4diF em 45% em relação ao ensaio controle (na ausência dos derivados). Ambos os resultados são próximos ao valor encontrado para a velocidade de consumo de oxigênio durante o estado 3 para os compostos fluorados que foi de aproximadamente 53% (tabelas 7 e 8).

Estes resultados sugerem que os derivados testados neste estudo comprometem o transporte de elétrons através da cadeia respiratória sendo este efeito mais pronunciado para os compostos fluorados.

Segundo CADENA (1999), o MI-D foi capaz de diminuir a velocidade de consumo de oxigênio em mitocôndrias desacopladas com FCCP de forma dose dependente. Na concentração de 50 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial o MI-D foi capaz de inibir em 62% a velocidade de consumo de oxigênio em relação ao controle.

FIGURA 21. EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO POR MITOCÔNDRIAS DESACOPLADAS COM FCCP



As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos no item 4.5.1.

A. Experimento representativo do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato e os valores representam as velocidades de consumo de oxigênio por minuto por miligrama de proteína mitocondrial. CCR – coeficiente de controle respiratório. **B.** Experimento representativo do consumo de oxigênio em presença de FCCP ($1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$): **a.** FCCP $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($48,72 \text{ nmol O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial); **b.** MI-J 65 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial ($36,05 \text{ nmol O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial); **c.** MI-4F e MI-2,4diF 65 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial ($22,9$ e $21,94 \text{ nmol O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial, respectivamente). Adições: **Pi** – fosfato inorgânico ($1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$); **Mito.** – 1 mg de proteína mitocondrial; **Suc.** – succinato de sódio ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$); **Rot.** – rotenona ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); **ADP** – ($0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$); **Derivado** – MI-J, MI-4F ou MI-2,4diF. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

5.2 Efeitos dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre a atividade dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória

Com a finalidade de determinar possíveis sítios de inibição que justificassem as significativas diminuições nas velocidades respiratórias do estado 3, foram avaliados os efeitos dos derivados 1,3,4-tiadiazóis sobre os complexos enzimáticos da cadeia respiratória. Para estes experimentos foram utilizadas preparações de mitocôndrias rompidas, que possibilitam avaliar o efeito dos derivados diretamente sobre os complexos da cadeia respiratória, minimizando a interferência da membrana mitocondrial. Nestes ensaios avaliaram-se as atividades dos complexos: NADH desidrogenase (I), succinato desidrogenase (II) e citocromo *c* oxidase (IV); e dos segmentos: NADH oxidase (I – IV), NADH citocromo *c* redutase (I – III), succinato oxidase (II – IV) e succinato citocromo *c* redutase (II – III).

Na tabela 9 estão mostrados os resultados referentes aos efeitos do MI-J sobre os complexos da cadeia respiratória. Pode-se observar que o composto causou inibição do segmento NADH oxidase que compreende o trajeto de transferência dos elétrons do NADH até o oxigênio. Esta inibição dose dependente foi observada desde a primeira concentração utilizada ($6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial) chegando a um valor máximo de 56% em relação ao controle na maior concentração (130 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial). Este valor é semelhante ao encontrado para a oxidação do NADH proveniente da desidrogenação dos substratos glutamato e malato (59% - tabela 3) durante o estado 3 da respiração, descartando assim possíveis efeitos do MI-J sobre as desidrogenases e/ou mecanismos de transporte dos substratos.

O MI-J também promoveu uma discreta inibição do complexo NADH desidrogenase em 12% na maior concentração (130 nmol.mg^{-1} de proteína), mostrando que parte da inibição observada no segmento da NADH oxidase está localizado no complexo I da cadeia respiratória. O segmento NADH citocromo *c* redutase, que compreende o trajeto de transferência de elétrons do NADH até o citocromo *c*, foi inibido em 18% na maior concentração. Este valor (~18%) embora não significativo estatisticamente, parece resultar da inibição do complexo I (~12%).

TABELA 9. EFEITOS DO MI-J SOBRE OS COMPLEXOS E SEGMENTOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA

Todavia, a inibição que o MI-J promove no segmento NADH oxidase (~56%) é superior ao efeito observado para a NADH desidrogenase (~12%), sugerindo que outro complexo da cadeia respiratória, o citocromo *c* oxidase (complexo IV), também possa ser alvo de inibição deste derivado. Esta hipótese foi confirmada pelos resultados mostrados na tabela 9. O complexo citocromo *c* oxidase foi inibido já na menor concentração (6,5 nmol.mg⁻¹ de proteína) em aproximadamente 20%, alcançando esta inibição um valor de 25% na maior concentração (130 nmol.mg⁻¹ de proteína).

O trajeto dos elétrons provenientes da oxidação do succinato até oxigênio, ou seja, o segmento succinato oxidase também foi significativamente inibido pelo MI-J. Este efeito mostrou-se significativo a partir da concentração de 32,5 nmol.mg⁻¹ de proteína mitocondrial com valor de 16% e chegando a 40% para a concentração de 130 nmol.mg⁻¹ de proteína mitocondrial. Este valor está de acordo com a inibição observada para a velocidade de consumo de oxigênio durante o estado 3 da respiração quando o doador de elétrons foi succinato (33% - tabela 6). O MI-J não exerceu efeito significativo sobre o complexo succinato desidrogenase (complexo II) e o segmento succinato citocromo *c* redutase (compreende os complexos II e III). Portanto, estes resultados sugerem que os sítos de inibição do MI-J estão localizados nos complexos I e IV da cadeia respiratória.

Os efeitos do MI-4F sobre os complexos da cadeia respiratória estão mostrados na tabela 10. O MI-4F inibiu significativamente o segmento NADH oxidase de forma dose dependente desde a menor concentração até um valor máximo de ~83% na maior concentração. Nos experimentos de consumo de oxigênio em mitocôndrias intactas utilizando glutamato e malato como substratos a inibição do estado 3 da respiração foi máxima (100% - tabela 4) para a concentração de 130 nmol.mg⁻¹ de proteína, valor superior ao observado para o segmento NADH oxidase (~83%). Esta diferença nos valores de inibição pode resultar da interação do composto com a membrana mitocondrial interna no sentido de dificultar o transporte de elétrons.

TABELA 10. EFEITOS DO MI-4F SOBRE OS COMPLEXOS E SEGMENTOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA

Outra possibilidade que não pode ser descartada é a de sua ação sobre os mecanismos de transporte dos substratos glutamato e malato e/ou de seu efeito direto sobre desidrogenases destes substratos. No entanto, considerando a magnitude desta diferença de apenas ~16%, é possível afirmar que o efeito principal do derivado é sobre o transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória.

O MI-4F inibiu o complexo NADH desidrogenase assim como o segmento NADH citocromo *c* redutase somente na maior concentração com valores de ~9% e 26%, respectivamente. O segmento citocromo *c* oxidase também foi significativamente inibido desde a primeira concentração de forma dose dependente. O valor máximo de inibição para este segmento foi de 56% para a última concentração.

Para o segmento succinato oxidase o MI-4F promoveu inibição significativa a partir da concentração $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína e, de forma dose dependente, inibiu cerca de 70% na maior dose (130 nmol.mg^{-1} de proteína). Este valor de inibição é muito próximo ao observado para a velocidade do estado 3 da respiração nos ensaios de consumo de oxigênio utilizando succinato como substrato (72% - tabela 7). Entretanto, o complexo succinato desidrogenase e o segmento succinato citocromo *c* redutase não sofreram inibição significativa. Neste caso, o efeito observado para o segmento NADH citocromo *c* redutase se deve apenas a inibição do complexo I, caso contrário este efeito também seria observado para o segmento succinato citocromo *c* redutase, assim, os resultados destes experimentos sugerem que os sítios de inibição do MI-4F incluem os complexos I e IV, sendo o efeito inibitório sobre o complexo IV o mais pronunciado.

Na tabela 11 estão mostrados os resultados referentes à análise dos efeitos do MI-2,4diF sobre as enzimas da cadeia respiratória. Observa-se que os valores são similares aos apresentados na tabela anterior (tabelas 10) para o composto monofluorado. O primeiro segmento analisado, o NADH oxidase, foi inibido de forma dose dependente desde a menor concentração (~26% - $6,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína) até alcançar o valor de 86% na maior concentração (130 nmol.mg^{-1} de proteína).

TABELA 11. EFEITOS DO MI-2,4diF SOBRE OS COMPLEXOS E SEGMENTOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA

Este valor foi inferior ao observado para a oxidação do glutamato mais malato durante o estado 3 da respiração (100% - tabela 5) como também observado para o derivado monofluorado. Como no caso do MI-4F esta diferença pode ser decorrente da interação do composto com a membrana mitocondrial interna contribuindo para a ineficiência do transporte de elétrons ou da ação do composto sobre o transporte e/ou as desidrogenases dos substratos. Porém, esta diferença (~14%) é pequena se consideradas as diferenças metodológicas. Sendo assim, o efeito principal do derivado é sobre o transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória.

O complexo NADH desidrogenase e o segmento NADH citocromo *c* redutase foram significativamente inibidos nas maiores concentrações, com valores de ~10% e ~22% para a concentração de 130 nmol.mg⁻¹ de proteína. Como, nesta mesma concentração, o segmento NADH oxidase foi inibido em ~86% e somente 22% se deve ao trajeto do complexo I até o III, a maior contribuição para este efeito deve-se a inibição promovida pelo composto sobre o complexo IV. De fato, o complexo citocromo *c* oxidase foi significativamente inibido desde a menor concentração empregada (6,5 nmol.mg⁻¹ de proteína mitocondrial), obtendo-se um valor de inibição de aproximadamente 46% para a maior concentração (130 nmol.mg⁻¹ de proteína mitocondrial).

O segmento succinato oxidase também foi inibido de forma dose dependente, porém, somente a partir da concentração de 32,5 nmol.mg⁻¹ de proteína. O valor máximo de inibição para este segmento foi de 62% para a maior concentração (130 nmol.mg⁻¹ de proteína) e foi próximo ao valor encontrado para a diminuição da velocidade de consumo de oxigênio durante o estado 3 da respiração (73%) quando utilizado succinato como substrato (tabela 8). O complexo succinato desidrogenase e o segmento succinato citocromo *c* redutase não apresentaram inibições significativas. Assim como para o MI-4F, o efeito observado para o segmento NADH citocromo *c* redutase se deve apenas a inibição do complexo I, pois não se observa inibição do segmento succinato citocromo *c* redutase. Portanto, estes resultados sugerem que os sítios de inibição do MI-2,4diF estão localizados nos complexos I e IV, sendo este último mais susceptível a ação do composto.

Para o MI-D (CADENA, et al.,1998), na concentração de 65 nmol.mg^{-1} de proteína, a inibição do segmento NADH oxidase foi de $\sim 26\%$ em relação ao controle, valor significativamente menor que o observado para os outros derivados testados neste estudo, nesta mesma concentração. Ao contrário do observado para o MI-J, MI-4F e MI-2,4diF, o complexo NADH desidrogenase e citocromo *c* oxidase não foram inibidos e o segmento NADH citocromo *c* redutase sofreu inibição de 12% nesta concentração. Diferente do observado nos ensaios do presente estudo, o MI-D promoveu uma maior inibição quando o substrato utilizado foi o succinato, com inibição de 42% para o segmento succinato citocromo *c* redutase. O complexo succinato desidrogenase não foi inibido. Os resultados descritos pelos autores situam os sítios de inibição do composto após o complexo I e entre os complexos II e III da cadeia respiratória. Desta forma, o MI-D atua sobre os complexos da cadeia respiratória de forma diferente da observada para os outros derivados estudados neste trabalho, sugerindo que em função dos substituintes presentes na estrutura, diferentes mecanismos de ação estão envolvidos nos efeitos promovidos pelos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre a bioenergética mitocondrial.

5.3 Efeitos dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre a atividade do Complexo Enzimático F_1F_0 ATPase

Visto que os derivados em estudo apresentaram efeito desacoplador, caracterizado pelo acentuado estímulo do estado 4 (tabelas 3-8) foi avaliado o efeito destes compostos sobre a atividade do complexo F_1F_0 ATPase (ATPsintase).

A ATPsintase mitocondrial é uma ATPase do tipo F responsável pela síntese do ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (P_i) a favor de um gradiente eletroquímico. Este complexo enzimático é constituído de dois componentes: F_1 , uma proteína periférica de membrana solúvel e F_0 , uma proteína integral de membrana de caráter hidrofóbico. O componente F_1 , responsável pela síntese de ATP, apresenta cinco diferentes polipeptídios em sua estrutura denominados α , β , γ , δ e ϵ , na estequiometria

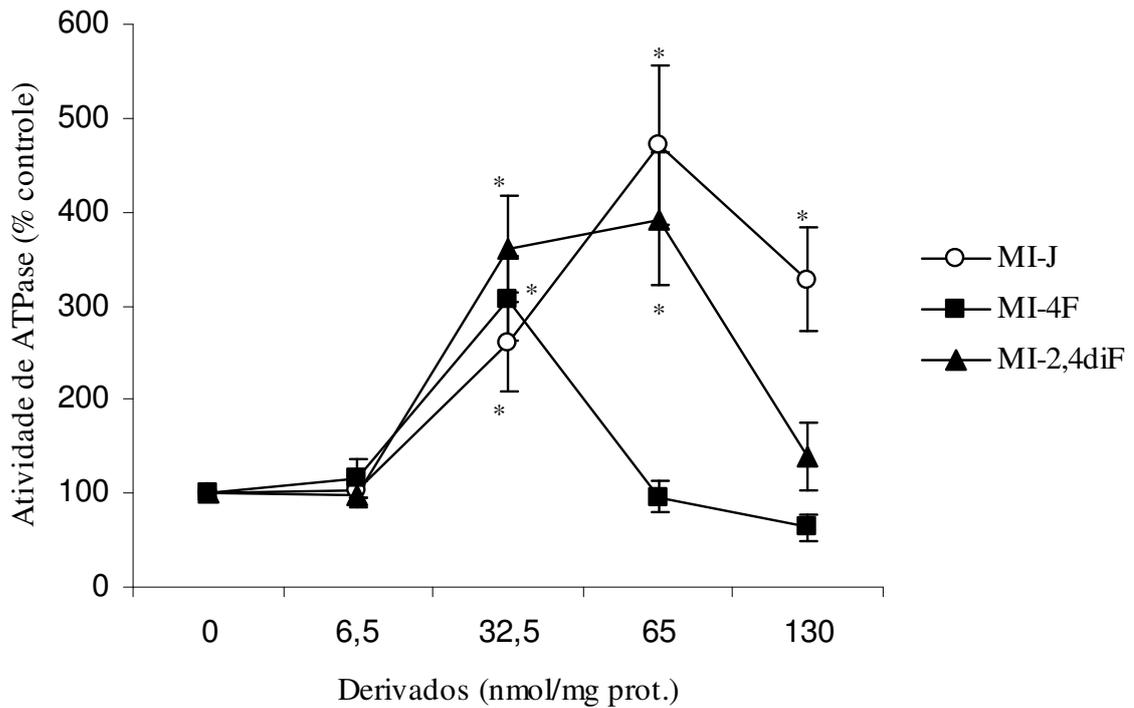
$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. O componente F_o é constituído de três diferentes polipeptídios hidrofóbicos denominados *a* (também chamado de F_6), *b* e *c* (também chamado de F_9) na seguinte estequiometria ab_2c_{10-12} . F_o se encontra inserido na membrana mitocondrial interna e constitui o canal de passagem de prótons. Estes dois componentes, F_1 e F_o , estão ligados através de uma proteína que confere sensibilidade a oligomocina (OSCP, equivalente a δ bacterial) (TZAGOLOFF, 1982). Segundo a teoria quimiosmótica de MITCHELL (1961), durante o processo de oxidação de um substrato, os prótons da matriz mitocondrial são bombeados para o espaço intermembranas com a concomitante transferência de elétrons através da cadeia respiratória e a redução do oxigênio a água. A diferença de concentração de prótons entre o espaço intermembranas e a matriz gera a força próton-motriz (Δp) e esta promove o retorno dos prótons para a matriz mitocondrial através do canal formado pelo fator F_o impulsionando a síntese de ATP por F_1 (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Compostos desacopladores que dissipam a força próton-motriz ao promoverem a entrada de prótons na matriz mitocondrial, fazem com que o componente F_1 passe a hidrolisar o ATP com a extrusão de prótons para o espaço intermembranas, na tentativa de restabelecer o gradiente eletroquímico de H^+ ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$). Desta forma a atividade ATPásica é muito baixa em mitocôndrias acopladas e aumenta na presença de desacopladores clássicos como o FCCP.

Os resultados dos efeitos dos derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF sobre o complexo F_1F_o ATPase em mitocôndrias intactas e rompidas estão mostrados nas figuras 22 e 23, respectivamente. Os compostos estudados apresentaram comportamentos semelhantes, porém com importantes diferenças quanto à concentração e ao efeito. Os três estimularam a atividade do complexo a partir da concentração de $32,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína quando foram utilizadas mitocôndrias intactas (figura 22). Nesta concentração, o MI-J, MI-4F e o MI-2,4diF promoveram um estímulo de aproximadamente 160%, 207% e 261%, respectivamente. Para o MI-2,4diF este efeito estimulatório também foi observado na concentração de 65 nmol.mg^{-1} de proteína ($\sim 292\%$) e diminuído na concentração seguinte ($\sim 38\%$ na concentração de 130 nmol.mg^{-1} de proteína). Já o MI-4F, nas concentrações de 65 e

130 nmol.mg⁻¹ de proteína não estimulou de forma significativa a enzima em relação ao controle. O MI-J apresentou comportamento similar ao MI-2,4diF, com um estímulo máximo na concentração de 65 nmol.mg⁻¹ de proteína de aproximadamente 370% que foi diminuído (~227%) para a concentração seguinte (130 nmol.mg⁻¹ de proteína). O perfil observado para os três derivados avaliados mostram um pronunciado estímulo na atividade hidrolítica da ATPase em baixas concentrações (32,5 nmol.mg⁻¹ de proteína). Porém, chama a atenção o fato de que na maior concentração (130 nmol.mg⁻¹ de proteína) ocorre uma diminuição deste estímulo para o MI-J, uma ausência de estímulo para o MI-2,4diF e MI-4F, sendo que para o último observa-se uma tendência à inibição do complexo enzimático. Como se observou em todas as tabelas de 3 a 8, o MI-4F parece exercer efeito desacoplador mais pronunciado que o MI-J e MI-2,4diF já que na menor concentração de 6,5 nmol.mg⁻¹ de proteína apresentou um estímulo do estado 4 maior que os outros dois derivados. Neste sentido, sabe-se que agentes desacopladores clássicos como o FCCP quando em concentrações superiores àquelas capazes de provocar o efeito desacoplador inibem a atividade ATPásica (VAN DAM, 1967). Sendo assim, este estímulo do estado 4 (tabelas 4 e 7), sugerem que o MI-4F exerce efeito desacoplador mais pronunciado em relação aos demais derivados analisados.

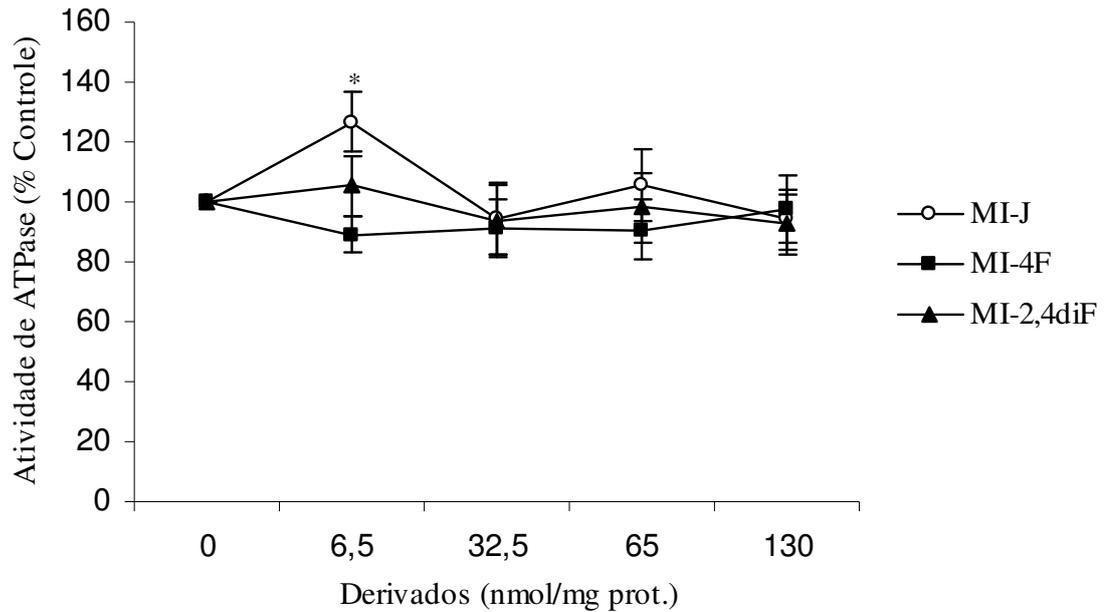
No sentido de avaliar o efeito dos derivados mesoiônicos diretamente sobre o complexo enzimático F₁F₀ ATPase foram utilizadas mitocôndrias rompidas. Estes resultados estão mostrados na figura 23. Pode-se observar que, com exceção do composto MI-J que promoveu um pequeno estímulo de aproximadamente 20% (6,5 nmol.mg⁻¹ de proteína mitocondrial) na atividade da ATPase, os derivados não exerceram efeito sobre este complexo. Este resultado também exclui que a inibição do estado 3 (tabelas 3 -8) seja decorrente da ação inibitória dos derivados sobre esta enzima.

FIGURA 22. EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE A ATIVIDADE DA F_1F_0 ATPase – MITOCÔNDRIAS INTACTAS



Sistema de reação: sacarose 50 mmol.L^{-1} , tampão Tris - HCl 12 mmol.L^{-1} , pH 7,4, KCl 50 mmol.L^{-1} , foi suplementado com 3 mg de proteína mitocondrial, ATP 3 mmol.L^{-1} e TCA 5%. 100 % correspondem a $20,10 \pm 2,61 \text{ nmol de fosfato inorgânico (Pi).min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. Os dados representam a média \pm dp de 10 experimentos independentes. * Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

FIGURA 23. EFEITOS DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE A ATIVIDADE DA F_1F_0 ATPase – MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS



Sistema de reação: Sacarose 50 mmol.L^{-1} , Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} , pH 7,4, acetato de magnésio 3 mmol.L^{-1} , acetato de potássio 30 mmol.L^{-1} , fosfoenolpiruvato (PEP) 1 mmol.L^{-1} , piruvato quinase (PK) 4 unidades, lactato desidrogenase (LD) 3 unidades, NADH $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ e ATP 3 mmol.L^{-1} , 0,1 mg de proteína mitocondrial.

100% correspondem a $1,96 \pm 0,14 \mu\text{mol de Pi liberado.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. Os dados representam a média \pm dp de 4 experimentos independentes. * Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Em resultados mostrados por CADENA et al. (1998) para ensaios de atividade enzimática com mitocôndrias intactas, na concentração de 65 nmol.mg^{-1} de proteína, o MI-D apresentou um estímulo de 60% na atividade do complexo F_1F_0 ATPase, muito inferior ao observado para os derivados deste estudo (figura 22). Na concentração de 160 nmol.mg^{-1} de proteína o MI-D estimulou em 300% a atividade ATPásica, porém, numa concentração maior de 240 nmol.mg^{-1} de proteína o composto promoveu a inibição do complexo F_1F_0 ATPase. Desta forma, observa-se que o perfil é similar aos demais derivados, entretanto, as concentrações são diferentes, o que reflete também em diferença na intensidade do efeito desacoplador, que parece ser menor para o MI-D. Os autores verificaram também que o MI-D, como os derivados aqui estudados, não exerceu qualquer efeito sobre a F_1F_0 ATPase em mitocôndrias rompidas, excluindo a possibilidade de ação inibitória sobre a enzima.

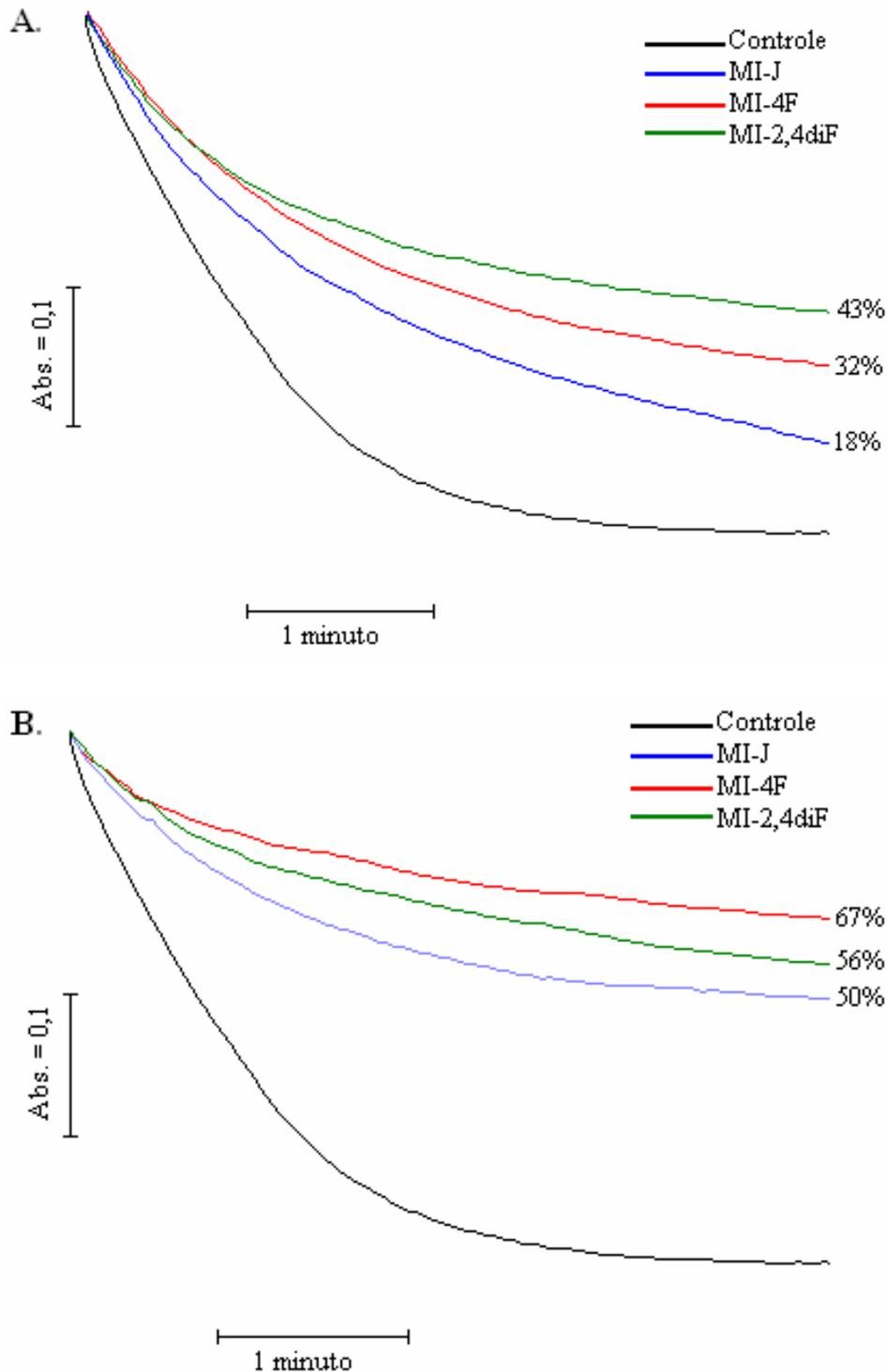
5.4 Efeitos dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre o inchamento mitocondrial

Suspensões mitocondriais dispersam a luz devido a diferença do índice de refração entre a matriz e o meio e, qualquer processo que diminua esta diferença reduzirá o espalhamento de luz. Quando a membrana mitocondrial interna é danificada ou um ionóforo se insere nesta estrutura, ocorre o aumento da permeabilidade a íons e, como consequência deste efeito, ocorre a entrada de água na matriz promovendo um aumento do volume da organela. Neste processo o acúmulo de água na matriz diminui a concentração dos compostos que refratam a luz e, conseqüentemente, ocorre a diminuição da dispersão de luz, ou seja, diminuição da absorbância da preparação mitocondrial. Este efeito só é possível devido ao desdobramento das cristas da membrana mitocondrial interna que confere elasticidade a esta estrutura. Experimentos de inchamento mitocondrial também chamado de “swelling” mitocondrial, analisam o movimento de íons através da membrana mitocondrial interna e, de forma indireta, a interação de compostos com a mesma, pois ambos os efeitos podem interferir na integridade da membrana mitocondrial interna (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

Os efeitos promovidos pelos derivados mesoiônicos sobre o transporte de elétrons na cadeia respiratória e síntese de ATP sugerem que estes compostos interajam com a membrana mitocondrial. Para avaliar esta possibilidade foram realizados ensaios de inchamento mitocondrial na presença de valinomicina e nitrato de potássio em mitocôndrias desenergizadas, ou seja, na ausência de substrato oxidável. Estes ensaios possibilitam observar de forma indireta a interação do composto com a membrana mitocondrial descartando seus efeitos sobre alvos enzimáticos da cadeia respiratória, o que poderia restringir o inchamento. A membrana mitocondrial é pouco permeável a íons e para promover o *swelling* foi utilizado o ionóforo valinomicina. A valinomicina é um carreador móvel de cargas que catalisa o uniporter de íons monovalentes, porém apresenta especificidade pelo íon potássio (K^+) (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Sua neutralidade possibilita a sua passagem através da membrana mitocondrial e, desta forma, transporta íons K^+ a favor do gradiente de concentração. A membrana mitocondrial é permeável ao íon nitrato (NO_3^-), porém é pouco permeável ao K^+ . Quando ocorre a entrada de nitrato e de potássio mediado pela valinomicina na matriz o sal formado é hidratado e, assim, aumenta o volume de água na matriz diminuindo o espalhamento de luz. Desta forma, a velocidade e a amplitude deste inchamento indicam a velocidade de transporte do íon potássio através da membrana mitocondrial interna. Para eliminar uma eventual interferência de $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, gerado pela oxidação de substrato endógeno, foram incluídos neste experimento os inibidores do transporte de elétrons na cadeia respiratória, rotenona e antimicina A.

Na figura 24 estão mostrados os efeitos dos derivados mesoiônicos nas concentrações 65 e 130 $nmol.mg^{-1}$ de proteína mitocondrial, respectivamente sobre o *swelling* mitocondrial. Observa-se que todos os derivados avaliados foram capazes de diminuir a amplitude do *swelling* de forma dose dependente. O composto MI-J, na concentração de 65 $nmol.mg^{-1}$ de proteína mitocondrial (figura 24 A) foi o menos efetivo provocando uma diminuição de 18% em relação ao controle (experimento realizado na ausência do derivado).

FIGURA 24. EFEITO DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DESENERGIZADAS



As condições experimentais estão descritas no item 4.5.3 da seção de Materiais e Métodos.

A. Derivados mesoiônicos estão presentes na concentração de 65 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial.

B. Derivados mesoiônicos estão presentes na concentração de 130 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial.

Ensaio controle – ausência dos derivados. Traçado representativo da média de triplicatas de quatro experimentos independentes.

Nesta mesma concentração (65 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial – figura 24 A) os compostos fluorados, MI-4F e MI-2,4diF, promoveram uma diminuição mais acentuada na amplitude do inchamento de aproximadamente 32% e 43%, respectivamente. Para a maior concentração (130 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial) observa-se na figura 24 B um efeito semelhante dos derivados sobre o inchamento mitocondrial, sendo que o composto MI-J promoveu uma diminuição menos pronunciada (~50%) em comparação aos derivados fluorados. Porém, o composto monofluorado, nesta concentração, parece comprometer mais a integridade da membrana mitocondrial interna em relação ao difluorado, uma vez que o MI-4F diminui a amplitude do *swelling* em 67% em comparação ao composto MI-2,4diF que reduziu o inchamento em 56%.

A fluidez da membrana mitocondrial tem papel fundamental no trânsito da valinomicina e, portanto, na entrada de K^+ na matriz mitocondrial. Todos os derivados avaliados diminuíram a amplitude do *swelling* de forma dose dependente. Desta forma, os resultados sugerem que os derivados mesoiônicos afetam a fluidez da membrana mitocondrial devido a sua inserção ou interação com a mesma, sendo este efeito dependente da concentração. A partir destes resultados é possível ainda sugerir que os compostos fluorados comprometem de forma mais pronunciada a integridade da membrana mitocondrial interna. Sendo o monofluorado mais efetivo na maior concentração (130 nmol.mg^{-1} de proteína mitocondrial).

Segundo CADENA et al. (2002), o MI-D causou uma redução de 30% na amplitude do *swelling* em mitocôndrias desenergizadas, porém este efeito foi independente da concentração empregada ($15 - 80 \text{ nmol.mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial). Os autores sugeriram que o composto interfere no trânsito do ionóforo através da membrana, impossibilitando o acesso dos íons K^+ à matriz mitocondrial. Esta possível inserção do MI-D na membrana mitocondrial foi comprovada através de experimentos de polarização de fluorescência utilizando as sondas DPH e DPH-PA (CADENA et al., 2002). Nestes experimentos foi observado que o MI-D aumentou em $1,5^\circ\text{C}$ a temperatura média de transição de fase em lipossomas multilamelares de

dimiristoil-fosfatidilcolina na concentração de $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$, aumentando o valor da polarização de fluorescência para ambas as sondas. Em membranas naturais, preparadas a partir de mitocôndrias isoladas, o MI-D também apresentou um efeito condensante da bicamada, porém na concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Desta forma, os autores concluíram que aquele composto poderia interagir tanto com as regiões mais hidrofóbicas quanto com as mais hidrofílicas da membrana mitocondrial interna.

Em comparação aos derivados estudados neste trabalho, o MI-D apresenta um comportamento similar por diminuir a amplitude do *swelling* mitocondrial, porém seu efeito sobre o inchamento não foi dose dependente como observado para os demais derivados aqui estudados, sugerindo que os substituintes no anel cinamoil podem determinar diferentes modelos de interação com a membrana mitocondrial.

Notavelmente a hidrofobicidade dos substituintes dos derivados estudados apresentam uma ordem muito semelhante à ordem de atividade em que os derivados provocaram a diminuição do inchamento mitocondrial. Este efeito pode ser devido à facilidade com que permeiam a membrana mitocondrial e se alojam na região de hidrofobicidade compatível, dificultando o trânsito da valinomicina. É importante ressaltar que neste experimento, quanto mais hidrofóbico for o derivado maior será a sua interação com a membrana e, conseqüentemente, menor será o inchamento mitocondrial.

DISCUSSÃO FINAL

6. Discussão Final

Os derivados mesoiônicos mostraram importantes efeitos sobre a bioenergética mitocondrial. Todos os derivados estudados promoveram o desacoplamento da fosforilação oxidativa, inibição do transporte de elétrons e alteraram a permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Entretanto, estes efeitos tiveram intensidades diferentes para cada derivado. O MI-4F provocou um efeito desacoplador da cadeia respiratória mais intenso que o MI-2,4diF e MI-J. Entretanto, a inibição do transporte de elétrons foi mais pronunciada quando as preparações mitocondriais foram tratadas com MI-2,4diF. Em altas concentrações o MI-4F promoveu uma diminuição do inchamento mitocondrial mais acentuada que o MI-2,4diF, que se mostrou mais efetivo para impedir o inchamento mitocondrial em concentrações intermediárias. O composto MI-J foi o derivado menos efetivo em todos os ensaios de forma independente da concentração empregada.

Considerando os resultados obtidos torna-se evidente a importância dos substituintes na intensidade dos efeitos promovidos pelos derivados 1,3,4-tiadiazóis sobre a bioenergética mitocondrial. Em estudo anterior, SENFF-RIBEIRO et al. (2004 a) também buscaram estabelecer uma relação entre a estrutura química e efeitos biológicos, avaliando a atividade antimelanoma destes mesmos derivados. Os autores estabeleceram a seguinte ordem de atividade antitumoral: MI-D>MI-2,4diF>MI-4F, sendo que o MI-J não apresentou efeito significativo. No entanto, o presente estudo mostrou uma ordem diferente da descrita por SENFF-RIBEIRO et al.(2004 a) para os efeitos destes derivados sobre a bioenergética mitocondrial. Os compostos MI-4F e MI-2,4diF promoveram efeitos mais pronunciados em relação aos já descritos para o MI-D (CADENA et al., 1998). Apenas um aspecto foi coincidente nos dois estudos, o MI-J foi o composto menos efetivo.

Quando se pretende estabelecer uma relação entre estrutura química e atividade biológica para um determinado composto, vários aspectos físico-químicos devem ser considerados. Dentre estes, destacam-se a hidrofobicidade e os efeitos eletrônicos e estéricos decorrentes de características estruturais. Alterações na hidrofobicidade de

um composto devido a presença de diferentes substituintes na estrutura podem ser expressas qualitativamente através da constante de Hansh (π) a qual compara a hidrofobicidade do anel benzênico substituído em comparação ao benzeno (PATRICK, 1995). Valores positivos desta constante indicam que o anel benzênico substituído é mais hidrofóbico que o benzeno e valores negativos o contrário. De forma semelhante, pode-se expressar os efeitos eletrônicos de diferentes substituintes no anel benzênico através da constante de Hammet (σ). Quanto maior for seu valor mais elétron-atrator é o substituinte e quanto menor, mais elétron-doador é o substituinte (PATRICK, 1995).

Os valores destas constantes foram determinados para os substituintes dos derivados neste estudo (SENFF-RIBEIRO et al., 2004c) e a seguinte ordem foi observada:

Hidrofobicidade (constante de Hansh - π)

MI-2,4diF ($\pi = 0,28$) > MI-4F ($\pi = 0,14$) > MI-D ($\pi = -0,28$) > MI-J ($\pi = -0,67$)

Efeitos Eletrônicos (constante de Hammet - σ)

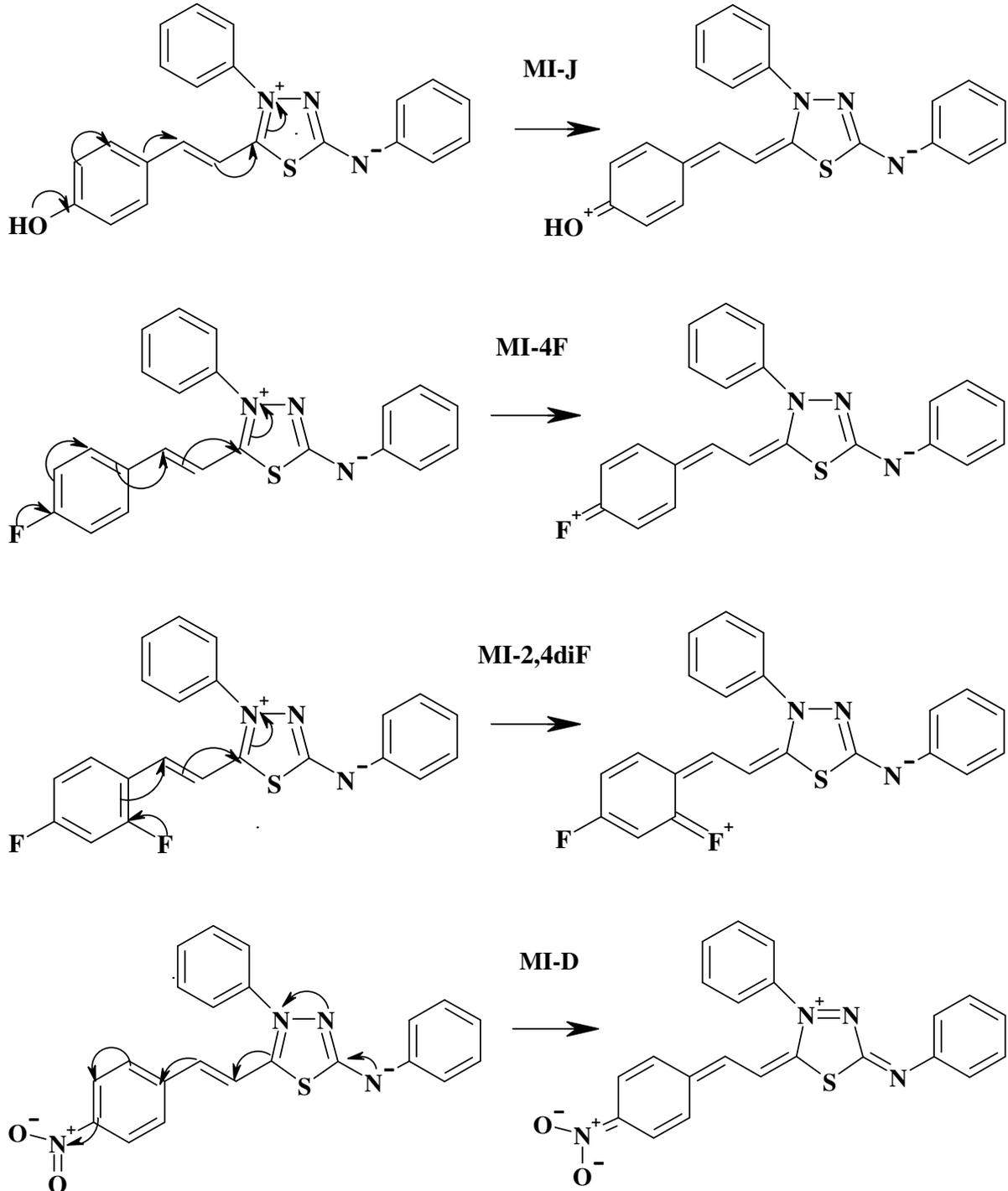
MI-D ($\sigma = 0,78$) > MI-2,4diF ($\sigma = 0,40$) > MI-4F ($\sigma = 0,10$) > MI-J ($\sigma = -0,37$)

Nota-se que a ordem de hidrofobicidade difere da ordem das constantes de efeito eletrônico. Nota-se, ainda, que a ordem das constantes de hidrofobicidade é muito semelhante a ordem de atividade, dos derivados estudados, sobre a bioenergética mitocondrial. Esta correlação é significativa, uma vez que parte dos efeitos dos derivados possivelmente resulta de sua interação com a membrana mitocondrial interna, sendo a hidrofobicidade uma característica determinante desta interação (PATRICK, 1995). Por outro lado, a mesma correlação não pode ser feita para as constantes que refletem os efeitos eletrônicos, o que sugere que a hidrofobicidade é a característica mais importante quando se trata da ação dos derivados sobre as funções mitocondriais. Já para a atividade antimelanoma os efeitos eletrônicos parecem ser mais importantes do que a hidrofobicidade, uma vez que as constantes de Hammet (σ) se relacionam a ordem de atividade antitumoral descrita por

SEFFF-RIBEIRO et al. (2004a). Neste sentido, a presença de substituintes mais elétron-atratores ligados ao anel cinamoil intensifica a carga positiva do anel mesoiônico devido a retirada de elétrons, o que supostamente facilitaria a interação com biomoléculas. De fato, o MI-D, que apresenta NO_2 como grupo ligado ao anel cinamoil, é o composto com o efeito mais pronunciado no estudo SENFF-RIBEIRO et al. (2004 a) e é o que tem o grupo mais elétron-atrator ($\sigma = 0,78$). Os compostos MI-2,4diF e MI-4F apresentam o fluoreto como grupo ligado ao anel cinamoil, e este é um grupo atrator de elétrons de menor intensidade que o nitro (NO_2) devido ao seu tamanho. O MI-2,4diF ($\sigma = 0,40$), com dois substituintes fluoreto, um em *orto* e outro em *para*, permite que ocorra a ressonância dos elétrons do anel mesoiônico entre os dois átomos, aumentando o efeito eletrônico promovido na estrutura em relação ao monofluorado ($\sigma = 0,10$) (figura 25). Entretanto, devido a instabilidade das estruturas de ressonância, o efeito eletrônico predominante para os derivados fluorados é o indutivo, no sentido de deslocar a nuvem eletrônica em direção aos substituintes do anel cinamoil.

Os efeitos promovidos pelo MI-J em comparação aos do MI-D (CADENA et al., 1998) também são indicativos de que a hidrofobicidade e os efeitos eletrônicos são mais significativos quando se trata da ação dos derivados 1,3,4 tiadiazóis mesoiônicos sobre as funções mitocondriais e a atividade antimelanoma, respectivamente. Os substituintes dos dois derivados (MI-J – OH e MI-D – NO_2) possuem hidrofobicidade semelhante e de fato promovem efeitos de intensidade similar sobre a bioenergética mitocondrial. No entanto, quanto ao efeito eletrônico, os dois compostos têm valores muito distintos. O substituinte do MI-J ($\sigma = -0,37$) promove um efeito injetor de elétrons na estrutura de forma a neutralizar a carga positiva do anel mesoiônico, enquanto que o substituinte do MI-D ($\sigma = 0,87$) promove um pronunciado efeito elétron-atrator retirando elétrons da estrutura e ativando com mais eficiência o anel mesoiônico (figura 25). Desta forma, estes valores relacionam a importante atividade antimelanoma do MI-D em comparação a ineficácia do MI-J.

FIGURA 25. ESTRUTURA DE RESSONÂNCIA PROPOSTA DOS DERIVADOS 1,3,4-TIADIAZÓIS



Dentre os diferentes aspectos físico-químicos que devem ser considerados quando se busca justificar a atividade biológica de um composto, o efeito estérico é o mais difícil de ser mensurado. Para os derivados deste estudo supõe-se que este efeito seja mínimo devido aos pequenos e aproximados tamanhos dos substituintes. Entretanto, deve-se considerar a hipótese de que a ação antitumoral possa estar relacionada com a interação dos derivados com receptores celulares e/ou enzimas que regulam o ciclo celular, sendo que para estas possibilidades o efeito estérico é importante. O tamoxifeno, uma droga anti-estrogeno, é um exemplo de composto que atua através deste mecanismo. Como descrito anteriormente o mecanismo de ação do tamoxifeno não está totalmente definido, porém, sua ação antitumoral inclui efeitos sobre a bioenergética mitocondrial (CUSTODIO et al., 1998; TUQUET et al., 2000; CARDOSO et al., 2001) e também sua função anti-estrogeno (IKEDA & INOUE, 2004). Em tumores dependentes de receptores de estrógeno o tamoxifeno mimetiza o hormônio estrógeno e, desta forma, se liga aos receptores provocando a perda da sua função.

Desta forma, considerando todos os aspectos discutidos, conclui-se que não é possível estabelecer uma correlação absoluta entre os efeitos promovidos sobre a bioenergética mitocondrial, evidenciados no presente estudo, e a atividade antimelanoma destes derivados descrita por SENFF-RIBEIRO et al. (2004a). No entanto, é possível sugerir que a atividade antitumoral destes compostos seja decorrente de diferentes mecanismos nos quais disfunções mitocondriais não sejam o fator determinante da morte celular. Em relação ao MI-D, CARDOSO et al. (2004) demonstraram que as ações analgésica, antipirética e antiinflamatória *in vivo* do MI-D, resultam da diminuição dos níveis de PGE₂, sugerindo que o composto possa exercer uma ação inibitória sobre a ciclooxigenase-2. Sabe-se que esta enzima é expressa constitutivamente em melanomas humanos e que tal expressão parece estar envolvida na regulação da invasividade do melanoma (DENKERT et al., 2001, KAKIUCHI et al., 2002). Portanto a possibilidade de que o efeito antimelanoma deste derivado envolva a inibição desta enzima, não pode ser descartada.

Assim como a inibição da COX-2, outros diferentes mecanismos de ação são conhecidos para os agentes antitumorais. Muitas destas drogas atuam interferindo na angiogênese, por exemplo, essencial para o crescimento e metástase do tumor. O termo angiogênese se refere ao desenvolvimento de novos vasos a partir de um pré-existente. Este processo é comum durante a gravidez e cicatrização. Entretanto, em condições patológicas tais como inflamação, crescimento e metástase tumoral, frequentemente ocorre uma crônica angiogênese desregulada de forma a intensificar a condição patológica (BISACCHI et al., 2003). A inibição da vascularização do tumor significa diminuir suas possibilidades de crescimento devido a falta de nutrientes e oxigênio para as células. Esta é a estratégia de ação da genisteína, um flavonóide natural encontrado na soja. Além de outros efeitos supressores, este composto reduz os níveis tumorais do fator de crescimento endotelial (VEGF) e do fator de crescimento e transformação $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) necessários para o crescimento de novos vasos (SHAO et al., 1998). Algumas drogas antitumorais exercem também sua toxicidade interferindo em mecanismos que controlam o processo de replicação do DNA. Durante este processo qualquer erro como deleções ou trocas podem causar importantes modificações para a célula gerada, dentre elas a imortalização (SHAY et al., 1991). Vários eventos ambientais ou endógenos podem danificar o DNA de forma a contribuir significativamente para a imortalização celular. Compostos alquilantes são mutagênicos e genotóxicos e, devido a estas características, são utilizados como drogas citostáticas. Estas drogas alquilantes são em sua maioria agentes metilantes ou cloroetilantes como a fotemustina (DRABLØS et al., 2004). Este composto é utilizado no tratamento de melanoma (AVRIL et al., 2004) e seu mecanismo antitumoral inclui a reação cruzada entre guanina e citosina mediada por uma cloroetilação no átomo de oxigênio 6 do nucleotídeo guanina, causando modificações irreparáveis nos nucleotídeos do DNA de forma a provocar a apoptose nestas células (DRABLØS et al., 2004).

Além destas, existem muitas outras vias pelas quais um composto pode exercer um efeito antitumoral. Portanto, a continuidade deste estudo com certeza incluirá

etapas que busquem esclarecer os mecanismos envolvidos na ação antitumoral destes derivados.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

1) Os três derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, MI-J, MI-4F e MI-2,4diF diminuíram de forma significativa a velocidade do transporte de elétrons através da cadeia respiratória mitocondrial, tendo como principal alvo de inibição o complexo Citocromo *c* oxidase (Complexo IV) podendo afetar o complexo NADH desidrogenase (complexo I) dependendo da dose utilizada. Dentre os três derivados, os compostos fluorados exerceram efeito mais acentuado, sendo o MI-2,4diF o mais efetivo;

2) MI-J, MI-4F e MI-2,4diF possuem importante efeito desacoplador, comprometendo a eficiência da fosforilação oxidativa. O composto monofluorado (MI-4F) exerceu tal efeito de forma mais intensa do que os outros dois derivados;

3) Os efeitos dos derivados MI-J, MI-4F e MI-2,4diF sobre a bioenergética mitocondrial parecem estar relacionados à interação destes compostos com a membrana mitocondrial interna;

4) Comparações dos resultados obtidos neste estudo aos já descritos para o derivado 1,3,4-tiadiazólio MI-D (substituinte $-\text{NO}_2$), indicam que os compostos fluorados comprometem de forma mais significativa as funções mitocondriais ligadas a provisão de energia e, ainda, que os efeitos produzidos pelo composto MI-J (substituinte $-\text{OH}$) são os que mais se assemelham aos descritos para o MI-D. Desta forma, as características químicas dos substituintes do anel cinamoil parecem ser mais importantes do que o anel mesoiônico como determinantes da ação destes derivados sobre a bioenergética mitocondrial.

Portanto, é possível sugerir que a atividade antimelanoma descrita anteriormente para estes compostos apontando o MI-D como derivado mais efetivo, em comparação aos derivados fluorados MI-4F e MI-2,4diF, não decorre exclusivamente dos efeitos destes compostos sobre as funções mitocondriais relacionados a provisão de energia, mas envolvem outros mecanismos que exigem futuras investigações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVRIL, M.F; AAMDAL, S; GROB, J.J; HAUSCHILD, A; MOHR, P; BONERANDI, J.J; WEICHENTHAL, M; NEUBER, K; BIEBER, T; GILDE, K; GUILLEM PORTA, V; FRA, J; BONNETERRE, J; SAÏAG, P; KAMANABROU, D; PEHAMBERGER, H; SUFLIARSKY, J; GONZALEZ LARRIBA, J.L; SCHERRER, A; MENU, Y. Fotemustine Compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. **J. Clin. Oncol.**, Baltimore, v. 22, n. 6, p. 1118-1125, 2004.

BAKER, W; OLLIS, W.D. Meso-ionic Compounds. **Chemistry and Industry.**, London, p. 910-911, 1955.

BISACCHI, D; BENELLI, R; VANZETTO, C; FERRARI, N; TOSETTI, F; ALBINI, A. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanism, problems and perspectives. **Cancer Detect. Prev.**, Malden, v. 27, p. 229-238, 2003.

BRUZZESE, T; CASADIO, S; MARAZZI-EBERT, E; TURBA, C. Synthesis and pharmacological screening of 3-aminoalkyl-sydnonones. **J. Pharm. Sci.**, Whashington DC, v. 54, n. 7, p. 1041-1044, 1965 a.

BRUZZESE, T; CASADIO, S; MARAZZI-EBERT, E; COPPI, G. Synthesis and pharmacological screening of aminoalkyl-hydrazines. **J. Pharm. Sci.**, Whashington DC, v. 54, n. 7, p. 1056-1057, 1965 b.

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

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.

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.**, Chichester, v. 20, p. 31-37, 2002.

CAI, T.B; LU, D; TANG, X; ZHANG, Y; LANDERHOLM, M; WANG, P.G. New glycosidase activated Nitric Oxide Donor: glucose and 3-morfolinosydnonimine conjugates. **J. Org. Chem.**, Washington, v. 70, p. 3518-3524, 2005.

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 (MID) on acute inflammatory response. **Drug Develop. Res.**, Hoboken, v.61, n. 4, p. 207-217, 2004.

CHANCE, B; WILLIAMS, G.R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 217, n.1, p. 383-393, 1955.

CORELL, T; PEDERSEN, S.B; LISSAU, B; MOILANEN, E; METSÄ-KETELÄ, T; KANKAANRANTA, H; VUORINEN, P; VAPAATALO, H; RYDELL, E; ANDERSSON, R; MARCINKIEWICZ, E; KORBUT, R; GRYGLEWSKI, R.J. Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. **Pol. J. Pharm.**, Cracow, v. 46, p. 553-566, 1994.

CREUTZ, C; SUTIN, N. Reduction of ferricytochrome *c* by dithionite ion: electron transfer by parallel adjacent and remote pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington DC, v. 70, n. 6, p. 1701-1703, 1973.

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.

DALEY, E; WILKIE, D; LOESCH, I.P; HARGREAVES, I.P; KENDALL, D.A; PILKINGTON, G.J; BATES, T.E. Chlorimipramine: a novel anticancer agent with a mitochondrial target. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, Orlando, v. 328, p. 623-632, 2005.

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

DAVIS, D; BECHER, H.J; ROGERS, E.F. The chemotherapy of wheat and bean rust diseases with sydnonones. **Phytopathology**, St.Paul, v. 49, p. 821-823, 1959.

DENKERT, C.; KOBEL, M.; BERGER, S.; SIEGERT, A.; LECLERE, A.; TREFZER, U.; HAUPTMANN, S. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 61, n. 1, p. 303-308, 2001.

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

DRABLØS, F; FEYZI, E; AAS, P.A; VAAGBØ, C.B; KAVLI, B; BRATLIE, M.S; PEÑA-DIAZ, J; OTTERLEI, M; SLUPPHAUG, G; KROKAN, H.E. Alkylation damage in DNA and RNA – repair mechanisms and mediocl significance. **DNA Repair**, v. 3, p. 1389-1407, 2004.

DUNKLEY, C.S; THOMAN, C.J. Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone rings series as potential antitumor agents. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, Kindlington, v. 13, p. 2899-2901, 2003.

EARL, J.C; MACKNEY, A.W. The action of acetic anhydride on N-Nitrosophenylglycine and some of its derivates. **J. Chem. Soc. (LOND)**, London, p. 899 - 900, 1935.

ELMEDAL, B; MULVANY, M.J; SIMONSEN, U. Dual impact of a nitric oxide donor, GEA 3175, in human pulmonary smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 516, p. 78-84, 2005.

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.

GLENNON, R.A; ROGERS, M.E; SMITH, J.D; EL-SAID, M.K. Mesoionic xanthine analogues: phosphodiesterase inhibitory and hypotensive activity. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v. 24, n.6, p. 658-661, 1981.

GLENNON, R.A; TEJANI-BUTT, S.M; PADGETT, W; DALY, J.W. Mesoionic xanthine analogues: antagonists of adenosine receptors. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v. 27, n. 10, p. 1364-1367, 1984.

GRECO, C.V; NYBERG, W.H; CHENG, C.C. Synthesis of sydnone and sydnone imines. **J. Med. Pharm. Chem.**, Washington DC, v. 5, p. 861-865, 1962.

GRYNBERG, N; GOMES, R; SHINZATO, T; ECHEVARRIA, A; MILLER, J. Some new aryl-sydnonones: effects on murine tumours. **Anticancer Res.**, Attiki, v 12, n. 3, p. 1025-1028, 1992.

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.

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

HALILA, G.C. **Efeitos dos compostos mesoiônicos representados pela sidnona SYD-1 sobre o metabolismo energético mitocondrial.** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

HEYTLER, P.G; PRICHARD, W.W. A new class of uncoupling agents – carbonyl cyanide phenylhydrazones. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 7, n. 4, 272-275, 1962.

HOWE, B.P. Considerations in platinum and gold drug design and the synthesis of chloro(2,3-diphenyl-1,3,4-thiadiazolium-5-thiolato-S_{exo})gold(I): the first gold mesoionic complex of its kind. **Metal Based Drugs.**, London, v. 4, n. 5, p. 273-277, 1997.

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

JACOB, M; BJARNASON, I; RAFI, S; WRIGGLESWORTH, J; SIMPSON, R.J. A study of the effects of indomethacin on liver mitochondria from rats, mice and humans. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 15, p. 1837-1842, 2001.

KAKIUCHI, Y.; TSUJI, S.; TSUJI, M.; MURATA, H.; KAWAI, N.; YASUMARU, M.; KIMURA, A.; KOMORI, M.; IRIE, T.; MIYOSHI, E.; SASAKI, Y.; HAYASHI, N.; KAWANO, S.; HORI, M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 62, n. 5, p. 1567-1572, 2002.

KANKAANRANTA, H; RYDELL, E; PETERSSON, A. S; HOLM, P; MOILANEN, E; CORELL, T; KARUP, G; VUORINEN, P; PEDERSEN, S. B; WENNMALM, A; METSÄ-KETELÄ, T. Nitric oxide-donating properties of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives. **Br. J. Pharm.**, Basingstoke, v. 117, p. 401-406, 1996.

KEMMELMEYER, F.S; BRACHT, A. 1989. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug mefenamic acid on energy metabolism in the perfused rat liver. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 38,p. 823-830, 1989.

KEYHANI, J; KEYHANI, E. Cytochrome *c* oxidase biosynthesis and assembly in *Candida utilis* yeast cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 167, p. 588-595, 1975.

KIER, L.B; AL-SHAMMA, A; CAMPBELL, D; PATIL, P.N; TYE, A. A new class of hypotensive agents. **Nature**, London, v. 742, 1966.

KIER, L.B; ROCHE, E.B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v. 56, n. 2, p. 149-168, 1967.

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

KROEMER, G; DALLAPORTA, B; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v. 60, p. 619-642, 1998.

LEIST, M; SINGLE, B; CASTOLDI, A.F, KÜHNLE, S. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **J. Exp. Med.**, New York, v. 185, No 8, p. 1481-1486, 1997.

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.

LOO, D.T; RILLEMA, J.R. Measurement of cell death **Methods in Cell Biol.**, San Diego, v. 57, p. 251-263, 1998.

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.

MAJID, P.A; DEFYTER, P.J.F; VAN DER WALL, E.E; WARDEH, R; ROOS, J.P. Molsidomine in the treatment of patients with angina pectoris. **N Engl. J. Med.**, Boston, v. 302, n. 1, p. 1-6, 1980.

MARGOLIASH, E. The chromatographic behaviour of cytochrome *c* on cation exchangers. **Biochem. J.**, London, v. 56, p. 535 – 543, 1954.

MASON, T.L; POYTON, R.O; WHARTON, D.C; SCHATZ, G. Cytochrome *c* oxidase from bakers' yeast. Isolation and properties. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 248, n. 4, p. 1346-1354, 1973.

MASUBUCHI Y; YAMADA S; HORIE, T. Diphenylamine as an important structure of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 58, p.861-865, 1999.

MIGNOTTE, B; VAYSSICRE, J-L. Mitochondria and apoptosis. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 252, p. 1-15, 1998.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type mechanism. **Nature**, London, v. 191, p. 144-148, 1961

MONCADA, S; PALMER, R.M.J; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharm.Rev.**, Baltimore, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

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.

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.

MORENO-SANCHEZ, R.; BRAVO, C.; VASQUEZ, C.; AYALA, G.; SILVEIRA, L. H.; MARTINEZ-LAVIN, M. Inhibition and uncoupling of phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 57, p. 743-752, 1999.

MORENO, A.J.M; MADEIRA, V.M.C. Interference of parathion with mitochondrial bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1015, p. 361-367, 1990.

MOUSTAFA, M.A.A; EISA, H.M. Synthesis and antimicrobial activity of 3 - (substituted-phenyl) - sydnones. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 325, p. 397-401, 1992.

MUSTAFA, M.G.; UTSUMI, K; PACKER, L. Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 24, n. 3, p. 381-385, 1966.

NEWTON, C.G; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic heterocycles. **Tetrahedron**, Kidlington, v. 38, n. 20, p. 2965-3011, 1982.

NICHOLLS, D. G; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 3**. San Diego: Academic Press, 2002.

NYBERG, W.H; CHENG, C.C. 3-Piperonylsydnone. A new type of antimalarial agent. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v. 8, p. 531-533, 1965.

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

PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 1995.

PETRESCU, I; TARBA, C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1318, p. 385-394, 1997.

POZHARSKÜ, A.F; SOLDATENKOV, A.T; KATRITZKY, A.R. **Heterocycles in life and society**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. 301 p.

PULLMAN, M.E; PENEFSKY, H.S.; DATTA, A; RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 235, n. 11, p. 3322-3329, 1960.

REHSE, K; KÄMPFE, M; SCHLEIFER, K. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, I: 3-arylalkyl-*N*-nitroso-5-sydnone imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 326, p. 483-487, 1993 a.

REHSE, K; SCHLEIFER, K; CIBORSKI, T; BOHN, H. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, II: 3-alkyl-*N*-nitroso-5-sydnone imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 326, p. 791-797, 1993 b.

REHSE, K; SCHLEIFER, K. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, III: 3,4 disubstituted *N*-nitroso-5-sydnone imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 326, p. 929-939, 1993 c.

REHSE, K; CIBORSKI, T; MÜLLER, B. Platelet aggregation inhibiting and anticoagulant effects of oligoamines, XXVII: Inhibition of leucocyte adherence to endothelium by oligoamine RE 1492C and the NO-donor RE 2047. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 328, p. 125-126, 1995.

SATYANARAYANA, K; RAO, M.N.A. Synthesis and antiinflammatory, analgesic and antipyretic testing of 4-[1-oxo-(3-substituted aryl) - 2 - propenyl] - 3 - phenylsydnones and 3 - [4 - (3 - (substituted aryl)) - 1 - oxo - 2 - propenyl] phenyl] sydnones. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v 84, n. 2, p 263-266, 1995.

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, n. 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, n. 3, p. 269-275, 2004a.

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. **Estudo da atividade antimelanoma de compostos 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos.**, 2004c. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SHAO, Z-M; WU, J; SHEN, Z-Z; BARSKY, S.H. Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 58, p. 4851-4857, 1998.

SHAY, J.W; WRIGHT, W.E; WERBIN, H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1072, p. 1-7, 1991.

SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenases. **Methods Biochem. Anal.**, Weinheim, v. 22, p. 123-175, 1974.

SKULACHEV, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1363, p. 100-124. 1998.

SOMLO, M. Induction des lactico-cytochrome *c* reductases (D - ET L -) de la levure aerobie par les lactates (D - ET- L). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 97, p. 183-201, 1965.

STEWART, TG.; KIER, LB. Synthesis of several mesoionic 1,3,4-Tiadiazoles. **J. Pharma. Sci.**, Washington DC, v. 54, n.5, p. 731-734, 1965.

SUMNER, J. B. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. **Science**, Washington, v. 100, p. 413-414, 1944.

TZAGOLOFF, A. **Mitochondria**. New York: Plenum Press, 1982.

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.

VAN DAM, K. The inhibitory effect of uncouplers of oxidative phosphorylation on mitochondrial respiration. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 131, p. 405-407, 1967.

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.

WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 40, p. 353-388, 2000.

YOETANI, T.; RAY, G.S. Studies on cytochrome oxidase. VI. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome *c* by cytochrome oxidase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.240, n.8, p. 3392-3398, 1965.

