

GERUSA CLAZER HALILA

**EFEITOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS,
REPRESENTADOS PELA SIDNONA SYD-1, SOBRE O
METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Maria Suter Correia Cadena

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira

CURITIBA
2005

RESUMO

Os compostos mesoiônicos, devido às suas propriedades químicas, constituem uma classe especial de compostos heterocíclicos com potencial aplicação terapêutica. Possuindo regiões bem separadas de cargas positiva e negativa, em adição ao seu caráter globalmente neutro, são capazes de interagir com biomoléculas e atravessar membranas biológicas. Os primeiros compostos mesoiônicos sintetizados foram as sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olato) para as quais têm sido descritas importantes atividades biológicas. Para a sidnona SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato) foi demonstrado um importante efeito antitumoral em camundongos portadores de carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180 (GRYNBERG et al., 1992). O SYD-1 foi capaz de promover o aumento da sobrevivência dos animais, impedindo o crescimento do tumor. Considerando a escassez de informações na literatura sobre os mecanismos de ação das sidnonas e a importante atividade antitumoral descrita para o SYD-1, neste estudo são investigados os efeitos deste composto sobre o metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. De maneira dose-dependente, o SYD-1 ($1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) inibiu a velocidade respiratória do estado 3 em 65% e 42% quando utilizados como substratos glutamato e succinato de sódio, respectivamente. Verificou-se que SYD-1 reduziu a eficiência da fosforilação oxidativa, como evidenciado pelo estímulo do estado 4 da respiração, o qual foi mais acentuado para o glutamato (190%) em relação ao succinato (43%), na presença de $1,5 \mu\text{mol}$ de SYD-1. mg^{-1} de proteína. Como consequência dos efeitos sobre os estados 3 e 4 da respiração, os valores do coeficiente de controle respiratório (CCR) e a razão ADP/O foram diminuídos em presença de SYD-1, para ambos os substratos, sendo tal efeito mais pronunciado para o glutamato. Análises dos segmentos da cadeia respiratória sugerem que o alvo de inibição do composto situa-se além do complexo I da cadeia respiratória, incluindo os complexos III e IV. Em ensaios de atividade da enzima glutamato desidrogenase observou-se que o SYD-1 ($1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) inibe a enzima em 20%. A atividade do complexo F_1F_0 ATPase em mitocôndrias intactas foi acentuadamente estimulada (474%) em presença do SYD-1 ($1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína). O composto ($1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) inibiu a formação do potencial de membrana (48%) e promoveu o colapso do potencial formado na concentração de $0,75 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína. A permeabilidade da membrana é afetada pelo SYD-1, como observado nos ensaios de inchamento mitocondrial em presença de acetato de sódio e de K^+ mais valinomicina. Mitocôndrias energizadas com glutamato, em presença de acetato de sódio, tiveram seu inchamento completamente inibido com a utilização da concentração máxima do composto ($1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), sendo esta mesma concentração responsável pela inibição de 90% em mitocôndrias energizadas com succinato. O inchamento de mitocôndrias desenergizadas induzido por K^+ e valinomicina foi inibido em 20%, para todas as concentrações testadas. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o SYD-1 ($0,25$ - $1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) reduz a eficiência do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa e sugerem, ainda, que estes efeitos podem estar relacionados com sua ação antitumoral.

ABSTRACT

Mesoionic compounds, due to their chemical properties, are a special class of heterocyclic compounds with potential therapeutic application. Having well separated regions of positive and negative charge, in addition to their overall neutral character, they are able to interact with biomolecules and cross biological membranes. Sydnones (1,2,3-oxadiazolium-5-olate) were the first class of mesoionic compounds synthesized for which important biological activities have been described. The sydnone SYD-1 (3-[4-chloro-3-nitrophenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate) has been shown to have an important antitumoral effect against Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180 tumor-bearing mice. SYD-1 was able to enhance the animals' survival, preventing tumor growth (GRYNBERG et al., 1992). Considering the insufficient information in the literature about the mechanism of action of sydnones and the very important antitumoral activity described for SYD-1, we now evaluate the effects of this compound on some energy-linked functions in rat liver mitochondria. In a dose-dependent manner, SYD-1 (1.5 $\mu\text{mol. mg}^{-1}$ protein) inhibited 65% and 42% the respiratory rate of state 3 when the substrates were sodium glutamate and succinate, respectively. SYD-1 depressed phosphorylation efficiency, as evidenced by stimulation of the state 4 respiratory rate, which was more accentuated for glutamate (190%) than for succinate (43%), with 1.5 $\mu\text{mol. mg}^{-1}$ protein of SYD-1. As a consequence of the effects on States 3 and 4, the RCC and ADP/O ratio values were lowered by SYD-1, with both substrates, the effect being stronger with glutamate. Analysis of the segments of the respiratory chain suggested that the SYD-1 inhibition site is further on than complex I and includes complexes III and IV. Glutamate dehydrogenase was inhibited in 20% by SYD-1 (1.5 $\mu\text{mol. mg}^{-1}$ protein). The activity of the complex $F_1F_0\text{ATPase}$ in intact mitochondria was greatly increased (474%) in the presence of SYD-1 (1.5 $\mu\text{mol. mg}^{-1}$ protein). This inhibited the formation of membrane electrical potential (48%) and promoted the collapse of the resulting membrane potential (0.75 $\mu\text{mol SYD-1. mg}^{-1}$ protein). SYD-1 interfered with the inner mitochondrial membrane permeability, as demonstrated by assays of mitochondrial swelling in the presence of sodium acetate and valinomycin + K^+ . Mitochondrial swelling in preparations energized by glutamate, in the presence of sodium acetate, was completely inhibited by SYD-1 (1.5 $\mu\text{mol. mg}^{-1}$ protein). At the same concentration it inhibited by 90% swelling in succinate energized mitochondria. Swelling of de-energized mitochondria induced by K^+ and valinomycin was inhibited by 20%, with all concentrations of SYD-1 (0.25-1.5 $\mu\text{mol. mg}^{-1}$ protein). Our results show that SYD-1 depressed the efficiency of electron transport and oxidative phosphorylation, and suggest that these effects can be involved in its anti-tumoral effect.

1. INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são importantes organelas intracelulares, pois nelas é gerada a maior parte da energia utilizada pelas células eucarióticas. Estas organelas possuem duas membranas: a membrana externa, onde se encontram proteínas denominadas porinas - que atuam como poros não específicos, permitindo a passagem de moléculas de peso molecular de até 10kDa - e a interna que é impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, incluindo prótons (H^+). Estas características são de fundamental importância para a integridade morfológica e funcional da organela. (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

A membrana interna contém enzimas e cofatores que participam do transporte de elétrons e geração de energia. Os transportadores de elétrons estão organizados, seqüencialmente, em quatro complexos supramoleculares inseridos na membrana: complexo I: NADH – ubiquinona oxidoredutase; complexo II: succinato desidrogenase; complexo III: ubiquinona – citocromo c oxidoredutase e complexo IV: citocromo c oxidase (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

A transferência de elétrons, provenientes da oxidação de um substrato até o oxigênio, ocorre através dos complexos constituintes da cadeia transportadora de elétrons - também denominada cadeia respiratória - e está acoplada ao bombeamento de H^+ para o espaço intermembranas. Este processo gera a força próton motriz (Δp), formada por dois componentes: o ΔpH , resultante da diferença de concentração de prótons através da membrana mitocondrial e o $\Delta \Psi$ (potencial de membrana), decorrente da diferença do potencial elétrico entre as duas fases aquosas separadas pela membrana. Nas mitocôndrias, a força próton motriz (Δp) direciona a síntese de ATP, a partir de ADP e fosfato inorgânico, através da ATP sintase. Assim, com a utilização do substrato, o oxigênio é consumido na medida em que é reduzido a H_2O e, de forma acoplada, o ATP é sintetizado (MORELAND, 1994; NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

Diversos compostos presentes em nosso cotidiano podem afetar a bioenergética mitocondrial, o que significa um grande risco para a sobrevivência

celular. Tais substâncias podem provocar alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna e/ou na velocidade do transporte de elétrons através da cadeia respiratória (MORELAND, 1994).

Os compostos conhecidos como desacopladores promovem o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons. Desta forma, ocorre a transferência de elétrons, mas não há formação do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu_{H^+}$) e, conseqüentemente, não ocorre síntese de ATP (TZAGOLOFF, 1982; MORELAND, 1994). Entre os compostos que agem como desacopladores estão alguns antiinflamatórios com grupos ionizáveis, incluindo os agentes não esteroidais: diclofenaco, piroxicam, meloxicam, aspirina, indometacina e nimesulide (MAHMUD et al., 1996). A ação desacopladora destes compostos foi observada em mitocôndrias isoladas e em fígado de rato perfundido, em concentrações que correspondem às doses utilizadas na terapêutica (PETRESCU & TARBA, 1997; MORENO-SANCHEZ et al., 1999). Outros compostos que também tiveram seu efeito desacoplador demonstrado foram alguns antipsicóticos, antidepressivos, drogas antitumorais, antimicóticos, anti-helmínticos, herbicidas e inseticidas (WALLACE & STARKOV, 2000).

Por sua vez, os inibidores do transporte de elétrons são caracterizados por interferirem no fluxo de elétrons, sendo tal efeito resultante da inserção na membrana interna e/ou da interação direta destes compostos com transportadores de elétrons da cadeia respiratória (MORELAND, 1994). Experimentalmente, a ação inibitória de um composto sobre o transporte de elétrons é sugerida pela diminuição do consumo de oxigênio em presença de ADP (estado 3 da respiração) por mitocôndrias acopladas. Os inibidores do transporte de elétrons incluem, entre outros: alguns fungicidas como fenfuram, neurolépticos, antihistamínicos, drogas antiangina, anti-sépticos, antibióticos, inseticidas, etc (WALLACE & STARKOV, 2000).

Sob outro aspecto, têm-se atribuído às mitocôndrias um papel decisivo no processo da apoptose (SKULACHEV, 1996; SUSIN et al., 1998), fenômeno definido como um sistema suicida da célula, observado durante a morfogênese normal dos organismos ou em resposta a infecções patológicas ou ainda a outros danos irreparáveis à célula (RAFF, 1992; PARONE et al., 2002; REGULA et al., 2003).

Portanto, as mitocôndrias possuem um duplo papel, atuando tanto no metabolismo energético quanto na morte celular (REGULA et al., 2003). Os mecanismos envolvidos na apoptose estão sujeitos a uma rigorosa regulação, envolvendo diversas vias sinalizadoras. Neste sentido, as mitocôndrias desempenham um papel central, sendo conhecidas por controlar a apoptose através da liberação de proteínas apoptogênicas (PARONE et al., 2002). Uma variedade de fatores que estimulam a morte celular é transmitida para a mitocôndria, por meio de proteínas translocadoras, resultando numa resposta mitocondrial apoptótica. Esta resposta ocorre por meio da liberação de proteínas como: citocromo c, que promove a ativação de caspases no citosol; Smac/Diablo que impedem a ação de inibidores da apoptose (IAPs); fatores indutores da apoptose (AIF) e endonuclease G que induzem a fragmentação do DNA e pró-caspases inativas que são ativadas após a liberação no citosol (PARONE et al., 2002).

Considerando a participação das mitocôndrias na apoptose, os eventos ocorridos durante este processo podem ser agrupados em três fases distintas: 1) fase pré-mitocondrial – fase de indução, em que diversos estímulos ativariam o processo apoptótico; 2) fase mitocondrial – em que a integridade da membrana mitocondrial é perdida e 3) fase pós-mitocondrial – ocorre a liberação de fatores solúveis pela mitocôndria envolvidos na ativação de caspases e endonucleases (SUSIN et al., 1998).

Sabe-se que alguns xenobióticos são capazes de induzir a apoptose, por inibirem o transporte de elétrons, atuando, desta forma, como fator desencadeante do processo na fase pré-mitocondrial. Tal inibição favoreceria a produção de espécies reativas de oxigênio que parecem estar envolvidas na abertura de megacanaís na membrana mitocondrial, denominados poros de transição de permeabilidade (PTP) (SKULACHEV, 1996; SUSIN et al., 1998). Foi proposto que a abertura destes poros provocaria, por sua vez, máxima estimulação no consumo de oxigênio e completa dissipação do potencial de membrana com a conseqüente eliminação das espécies reativas de oxigênio. Neste caso, ocorreria o fechamento do poro e a respiração normal da mitocôndria seria restabelecida (SKULACHEV, 1996). No entanto, se as espécies reativas de oxigênio continuassem se acumulando, a permanência do poro

comprometeria a integridade da membrana interna (fase mitocondrial da apoptose) assim como provocaria a ruptura da membrana externa, acarretando na liberação de proteínas como citocromo c e outros fatores relacionados à apoptose (HALESTRAP et al., 2004), constituindo a fase pós-mitocondrial da apoptose (SUSIN et al., 1998).

Ainda neste contexto, sabe-se que agentes desacopladores, responsáveis pela dissipação do potencial de membrana (desacoplamento da fosforilação oxidativa) são usados na terapia do câncer e outras doenças degenerativas (NEWELL & TANNOCK, 1989; DECAUDIN et al., 1997). Desta forma, a ação desacopladora de algumas substâncias pode explicar seu efeito terapêutico (SKULACHEV, 1998), sugerindo que a mitocôndria possa ser um potencial alvo intracelular para o tratamento de diferentes doenças (DALEY et al., 2005).

Neste aspecto, DALEY et al., 2005 demonstraram o envolvimento das mitocôndrias nos efeitos promovidos pela cloroimipramina, a qual pertence à classe dos antidepressivos tricíclicos. Embora esta droga seja utilizada como antidepressivo, os autores sugerem que a mesma exerça efeitos antitumorais por atuar em nível mitocondrial, desencadeando a morte celular por apoptose. Em adição, a cloroimipramina também apresenta uma alta seletividade para células tumorais. Utilizando mitocôndrias isoladas de fígado, coração, cérebro e rins de rato, os autores verificaram que a droga inibe especificamente a atividade enzimática do complexo III da cadeia respiratória, o que ocasiona o decréscimo do potencial elétrico de membrana e aumento da produção de ânion superóxido. Inchamento e vacuolização da mitocôndria também foram observados com a utilização da droga, a qual provocou também a liberação de substâncias pró-apoptóticas que levaram as células tumorais à morte por apoptose.

Portanto, o papel central das mitocôndrias na provisão de energia e seu envolvimento na apoptose, tornam esta organela um excelente modelo experimental para avaliar a toxicidade de um composto ou até mesmo esclarecer seu mecanismo de ação. Na verdade, mitocôndrias isoladas dos mais diferentes tecidos têm sido vastamente utilizadas com tal objetivo. Neste estudo, mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram utilizadas como modelo experimental para avaliar os efeitos do

composto mesoiônico SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato), pertencente à classe das sidnonas, sobre o metabolismo energético. A escolha do SYD-1 como objeto deste estudo foi motivada por sua importante atividade antitumoral contra carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180 em camundongos, como demonstrado por GRYNBERG et al (1992).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Compostos mesoiônicos

Os compostos heterocíclicos estão envolvidos em diversos tipos de reações químicas. Sua importância está relacionada à possibilidade da introdução de heteroátomos no anel, o que lhes confere diferentes propriedades químicas e biológicas. Algumas das reações envolvendo compostos heterocíclicos referem-se às fundamentais à manutenção da vida, como a provisão de energia, a transmissão de impulsos nervosos, metabolismo e transferência de informação hereditária (POZHARKÜ et al, 1997).

Dentre os compostos heterocíclicos, destacam-se por sua possível aplicação terapêutica, os chamados compostos mesoiônicos. O termo mesoiônico foi sugerido pela primeira vez por SIMPSON em 1946 para descrever moléculas cuja representação por estrutura covalente ou polar não é possível.

O potencial valor dos compostos mesoiônicos como substâncias biologicamente ativas é encontrado no seu caráter aromático planar, seu tamanho relativamente pequeno e a variação da densidade eletrônica ao redor do anel. Embora as moléculas sejam carregadas internamente e possuam alto momento dipolar, elas são globalmente neutras, o que lhes confere *in vivo* a capacidade de atravessar barreiras lipídicas e interagir com macromoléculas (KIER & ROCHE, 1967).

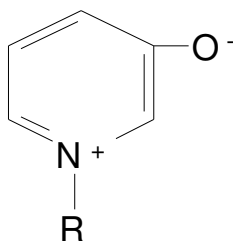
BAKER & OLLIS em 1955 definiram como mesoiônicos os compostos que apresentassem, em sua estrutura, as seguintes características:

- a) um anel aromático heterocíclico com cinco ou seis elementos, incapaz de ser representado por estrutura covalente;
- b) todos os átomos compartilhando um sexteto de elétrons π , apresentando considerável energia de ressonância;
- c) carga positiva no anel heterocíclico, balanceada por uma carga negativa em átomo ou grupo exocíclico;
- d) estrutura planar, ou próxima a isto.

Em 1976 foi proposta por OLLIS & RAMSDEN uma modificação nesta definição. O termo “mesoiônico” ficaria restrito a anéis heterocíclicos com cinco membros: *“um composto pode ser apropriadamente classificado como mesoiônico quando for constituído por um anel heterocíclico de cinco membros, o qual não pode ser representado satisfatoriamente por uma estrutura covalente ou polar, e que possua um sexteto de elétrons π associados aos cinco átomos que formam o anel”*.

Assim, de acordo com esta definição, moléculas que exibem um alto grau de fixação de cargas positiva e negativa sobre átomos específicos, como as betaínas (figura 1), não podem ser classificadas como mesoiônicas.

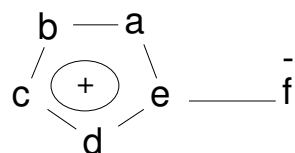
FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DAS BETAÍNAS.



FONTE: KIER & ROCHE, 1967.

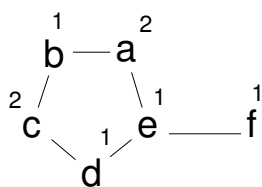
Na figura 2, está representada a estrutura química genérica de um composto mesoiônico onde **a, b, c, d, e, f** podem ser: carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre com seus respectivos substituintes (OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982). Estes anéis podem ser classificados em A e B, de acordo com o tipo de átomos que compõem o anel e com a origem dos elétrons π . Na figura 3, estão demonstradas as fórmulas genéricas e exemplos das duas classes (A e B), onde os números sobrescritos indicam a origem dos elétrons π . As tabelas 1 e 2 apresentam a relação dos compostos que fazem parte destas classes.

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DE UM COMPOSTO MESOIÔNICO.

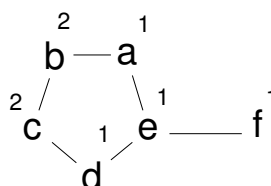


FONTE: OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982.

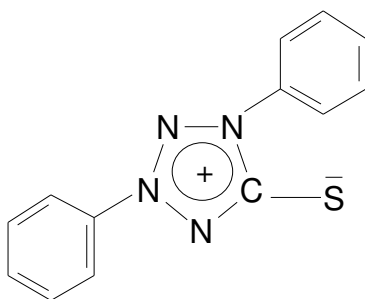
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO E EXEMPLOS DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS DOS TIPOS A E B.



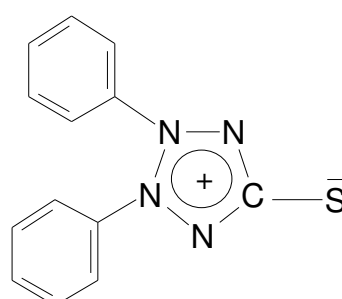
Tipo A



Tipo B



1,2,3,4-tetrazólio-5-tiolato
(Tipo A)

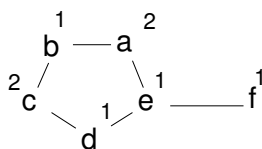


Dihidroditizona
(Tipo B)

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

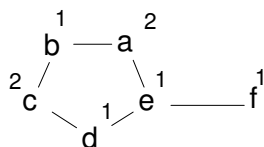
FONTE: OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982.

TABELA 1 - HETEROCÍCLICOS MESOIÔNICOS DO TIPO A



<i>SISTEMAS</i>	<i>ÁTOMOS ou GRUPOS</i>					
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
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	NR
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

TABELA 1 - HETEROCÍCLICOS MESOIÔNICOS DO TIPO A



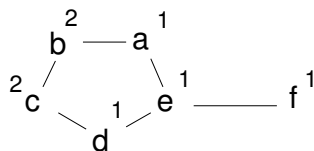
continuação

<i>SISTEMAS</i>	<i>ÁTOMOS ou GRUPOS</i>					
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
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

_bNestes compostos o grupo f estabilizado é um resíduo carbânion estável. Os substituintes X e Y incluem CO₂ Et, CN ou um resíduo fluorenilida.

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

TABELA 2 – HETEROCÍCLICOS MESOIÔNICOS DO TIPO B



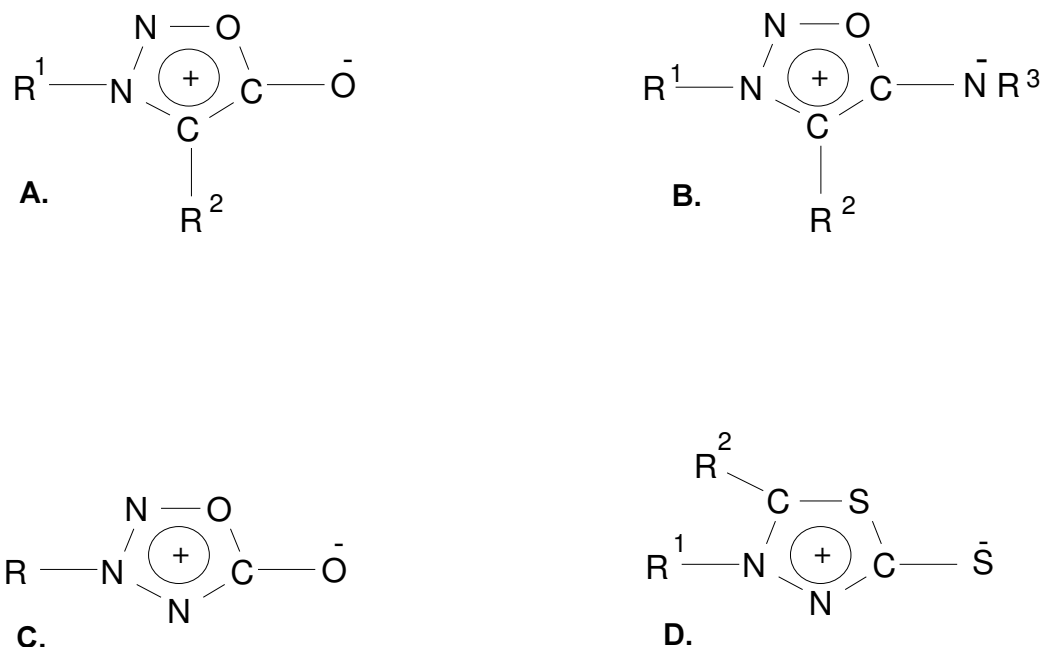
<i>SISTEMAS</i>	<i>ÁTOMOS ou GRUPOS</i>					
	a	b	c	d	e	f
Oxazóis						
1,2-Oxazol-4-olatos	CR	O	NR	CR	C	O
1,2-Oxazol-4-aminidas	CR	O	NR	CR	C	NR
Diazóis						
1,2-Diazol-4-olatos	CR	NR	NR	CR	C	O
1,2-Diazol-4-aminidas	CR	NR	NR	CR	C	NR
Tiazóis						
1,3-Tiazol-4-olatos	CR	S	NR	CR	C	O
1,3-Tiazol-4-aminidas	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 Nestes compostos o grupo **f** estabilizado é um resíduo carbânion estável. Os substituintes X e Y incluem CO₂ Et, CN ou um resíduo fluorenilida.

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

A atividade biológica de alguns compostos mesoiônicos das classes A e B é comprovada por uma vasta literatura, sendo muitos destes compostos patenteados (OLLIS & RAMSDEN, 1976). Entretanto, com relação à composição do anel mesoiônico, os que apresentam destacada atividade biológica, pertencem as seguintes classes: sidnonas, sidnoniminas, oxatriazóis e 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos (figura 4) (KIER & ROCHE, 1967).

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.

2.2. Atividades Biológicas dos Compostos Mesoioônicos

2.2.1. Sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olatos)

As primeiras sidnonas foram sintetizadas em 1935 por EARL & MACKNEY, sendo que o método original de síntese não sofreu modificação significativa até os dias atuais. Representadas na figura 4 A, as sidnonas constituem uma classe bem definida de compostos anidro, obtidos pela adição de certos agentes desidratantes como anidrido acético, a derivados N-nitroso de α aminoácidos N-substituídos (STEWART, 1964).

Por sua vez, as primeiras considerações sobre uma possível atividade biológica das sidnonas foram feitas por BROOKES & WALKER em 1957 quando estes autores sintetizaram derivados 3-metil-4-alkil sidnonas. Estes compostos tiveram seu efeito avaliado contra microorganismos incluindo *Streptococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Leuconostoc mesenteroides*, porém não foi observada nenhuma atividade.

Em 1962, GRECO et al. confirmaram a atividade do composto 3-(p-metoxibenzil)-sidnona contra carcinoma 755 em camundongos, sendo, por outro lado, inativo contra sarcoma-180 e L1210. A partir deste mesmo composto, NYBERG & CHENG (1965) sintetizaram um análogo estrutural, denominado 3-piperonilsidnona, que por sua vez, teve sua atividade testada contra o agente causador da malária, *Plasmodium berghei*, em ratos. A droga demonstrou-se ativa tanto quando administrada por via oral ou subcutânea, na dose de 10 mg/kg, não sendo observada toxicidade mesmo com a dose de 500 mg/kg. Embora os autores não tivessem determinado o mecanismo de ação desta sidnona, sugeriram que o mesmo é dependente da integridade do anel mesoioônico, uma vez que derivados obtidos a partir de hidrólises ácida e básica, respectivamente a piperonilhidrazina e N-Nitroso-N-piperonilglicina, não apresentaram atividade antimalária.

Ainda no ano de 1965, BRUZZESE et al., (1965 a), sintetizaram quatorze derivados de 3-aminoalkil-sidnonas os quais foram submetidos a ensaios para

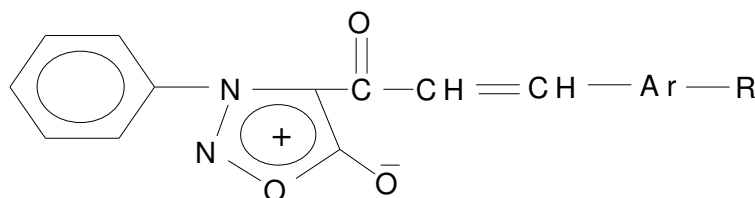
determinação de atividade biológica em ratos. Alguns destes compostos apresentaram as atividades analgésica, hipoglicemiante e antiinflamatória. Com relação à ação sobre o sistema nervoso central, alguns demonstraram efeitos depressivos e outros excitantes. É importante ressaltar, que também neste caso, a integridade do anel foi essencial para a atividade dos compostos, uma vez que após serem submetidos a reações de hidrólise ácida os mesmos perderam a atividade observada anteriormente (BRUZZESE et al., 1965 b).

Posteriormente, BADACHIKAR et al. (1986) sintetizaram os compostos 3-[p-(N-metil/etil-N-fenilcarbamoil)]fenilsidnonas, bem como seus derivados pirazóis, que foram testados contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocynea* e *Proteus vulgaris*. Todos os compostos, utilizados nas doses de 25 a 100µg, foram efetivos contra estes microorganismos.

MOUSTAFA & EISA, em 1992, também avaliando a atividade antimicrobiana, testaram os efeitos de doze derivados de sidnonas 3-fenil substituídas; os microorganismos eram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Todos os compostos testados exibiram atividade contra *S. aureus*. Compostos com substituintes nitro e bromo foram fracamente ativos contra bactérias gram negativas (*E. coli*), enquanto que não foi observada atividade contra *C. albicans*.

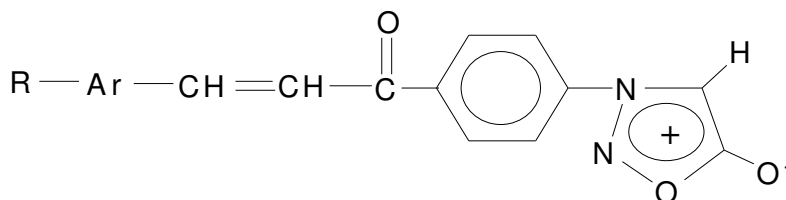
Derivados fenil-sidnonas também foram avaliados quanto às atividades antiinflamatória e analgésica. SATYANARAYANA & RAO, 1995, testaram os efeitos de duas séries de compostos derivados de 3-fenil-sidnonas: os da série I eram 4-[1-oxo-3-(aril substituído)-2 propenil]-3-fenilsidnonas e os da série II eram 3-[4-[3-(aril substituído)-1-oxo-2-propenil]fenil]sidnonas (figuras 5 A e B). Os compostos da série I foram mais eficazes, tanto em sua atividade antiinflamatória - como evidenciado pela inibição da formação do edema induzido por carragenina - quanto em sua ação analgésica, como demonstrado pela diminuição do número de contorções induzidas por ácido acético. A dose utilizada foi de 100mg/kg.

FIGURA 5 A. ESTRUTURA QUÍMICA DO 4-[1-OXO-3-(ARIL SUBSTITUÍDO)-2-PROPENIL]-3-FENILSIDNONAS (SÉRIE I).



FONTE: SATYANARAYANA & RAO, 1995.

FIGURA 5 B. ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-[4-[3-(ARIL SUBSTITUÍDO)-1-OXO-2-PROPENIL]FENIL] SIDNONAS (SÉRIE II) .

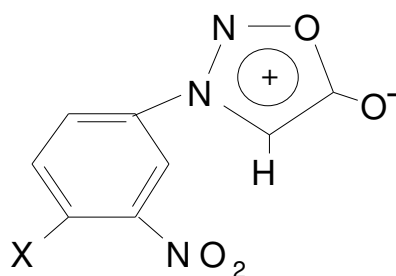


FONTE: SATYANARYANA & RAO, 1995.

A atividade antineoplásica das sidnonas, já demonstrada por GRECO et al. (1962), foi posteriormente evidenciada por GRYNBERG et al. (1992) para aril sidnonas contra sarcoma 180, carcinoma de Ehrlich, histiocitoma fibroso – induzido por 20 metil clorantreno em camundongos B10A (B10MCII) e células leucêmicas L1210. Os compostos testados foram 3-(4-**X**-3-nitrofenil)-1,2,3-oxadiazólio-5-olatos (figura 6), onde **X** correspondia aos substituintes Cl (SYD-1), anel pirrolidino (SYD-2), piperidino (SYD-3) ou morfolino (SYD-4). De acordo com os resultados obtidos, os compostos que apresentavam o Cl (SYD-1) ou o anel pirrolidino (SYD-2) como substituintes, exerciam uma importante atividade antitumoral, aumentando o tempo de

sobrevida de animais com sarcoma 180, carcinoma de Ehrlich e de B10MCII. Os compostos em que os substituintes eram o anel piperidino ou morfolino não apresentaram atividade antitumoral. É importante ressaltar que o composto SYD-1 (figura 6, onde X= Cl) foi o mais citotóxico contra todas as células tumorais testadas *in vivo*.

FIGURA 6. ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-(4-X-3-NITROFENIL)-1,2,3-OXADIAZÓLIO-5-OLATO.



FONTE: GRYNBERG et al., 1992.

Mais recentemente, DUNKLEY & THOMAN (2003) sintetizaram e demonstraram a atividade biológica de seis compostos *para*-substituídos, análogos às moléculas sintetizados por GRYNBERG et al. (1992). Em tais compostos, (figura 6) X correspondia aos substituintes: Cl (3 a), F (3 b), dietilamino (4 a), azetidino (4 b), indolino (4 c) e isoindolino (4 d). Os compostos foram testados em três linhagens celulares: MCF7 (mama), NCI-H460 (pulmão) e SF-268 (SNC). Os resultados foram expressos em porcentagem de crescimento de células tratadas em relação às células não tratadas. Como demonstrado anteriormente por GRYNBERG et al. (1992), o composto apresentando o átomo de Cl como substituinte exerceu uma importante ação antitumoral. Desta forma, DUNKLEY & THOMAN (2003), em seu estudo, testaram novamente o mesmo composto de Grynberg, em comparação àquele contendo F como substituinte visando esclarecer qual seria o fator responsável pela atividade antitumoral, se o efeito indutivo ou o tamanho do substituinte. Os compostos 3a (Cl) e

3b (F) inibiram o crescimento de pelo menos uma das linhagens (aproximadamente 32%). No entanto, o derivado 4'-fluorsidnona (composto 3b com substituição em 4') provou ser mais ativo contra as células testadas, sugerindo portanto, que o efeito indutivo seria o responsável pela importante atividade biológica. Entretanto, os compostos 4 a-d não apresentaram atividade.

2.2.2. Sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminidas)

BROOKES & WALKER, em 1957, relataram a síntese das sidnoniminas (figura 4B) através de uma reação entre um N-metil-N-nitroso- α -amino nitrilo com ácido nítrico, neste caso com a formação de uma nitrato de sidnonimina.

Importantes estudos sobre as sidnoniminas tiveram início na década de 80, principalmente com relação à capacidade de atuarem como doadores de óxido nítrico (NO), uma molécula efetora comumente envolvida na regulação de múltiplas funções celulares, como a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC). Esta enzima catalisa a síntese de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), que por sua vez, tem seus níveis aumentados (MONCADA et al., 1991). Como resultado, ocorre o relaxamento da musculatura vascular, o que justifica a importante ação das sidnoniminas no sistema cardiovascular (MAJID et al., 1980).

No final da década de 70, foi sintetizada a sidnonimina N-etoxicarbonil-3-morfolinosidnonimina, denominada de molsidomina que passou a ser utilizada para o tratamento da angina de peito. MAJID et al. (1980) realizaram estudos com molsidomina buscando avaliar sua efetividade terapêutica em comparação com nitratos de uso corrente. Os resultados destes estudos sugeriram que a molsidomina atuaria de maneira similar à nitroglicerina, sendo efetiva na prevenção da angina de peito, contribuindo, desta forma, para a atenuação do processo doloroso (MAJID et al., 1980; RUDOLPH & DIRSHINGER, 1991). Entretanto, algumas diferenças importantes entre molsidomina e nitratos foram observadas, como por exemplo, com relação ao tempo necessário para a observação dos efeitos após a administração, bem como a duração dos mesmos. Os nitratos atuam rapidamente após a administração e

causam efeitos de curta duração. Os efeitos da molsidomina demoram mais para serem observados, mas, por outro lado, são mais duradouros. Tais diferenças entre estes dois compostos justificam-se porque a molsidomina, para ser farmacologicamente ativa, precisa ser metabolizada no fígado pela ação de esterases, originando o metabólito 3-morfolinosidnonimina (SIN-1) que, por sua vez, é metabolizado no sangue a N-nitroso-N-morfolino-acetonotrito (SIN-1 A), sendo este último processo não enzimático (figura 7).

SIN-1 lentamente decompõe-se para liberar NO e ânion superóxido (O_2^-), que reagem para formar espécies potencialmente tóxicas de peroxinitrito ($ONOO^-$). Este último é um poderoso agente oxidante ao qual têm-se atribuído as ações tóxicas causadas pelo NO (BLOUGH & ZAFIRIOU, 1985; FEELISCH et al., 1989). A ação deletéria do ânion superóxido, produzido pela metabolização do SIN-1, pode ser amenizada pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Esta enzima é capaz de dismutar O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Embora SOD possa proteger as células de possíveis lesões ou danos oxidativos causados pelo O_2^- , a formação de H_2O_2 pode originar outra espécie reativa de oxigênio, os radicais hidroxil (OH^\bullet) que também podem promover danos celulares. Por sua vez, o peróxido de hidrogênio pode ser decomposto pela ação da enzima catalase, em água e oxigênio molecular.

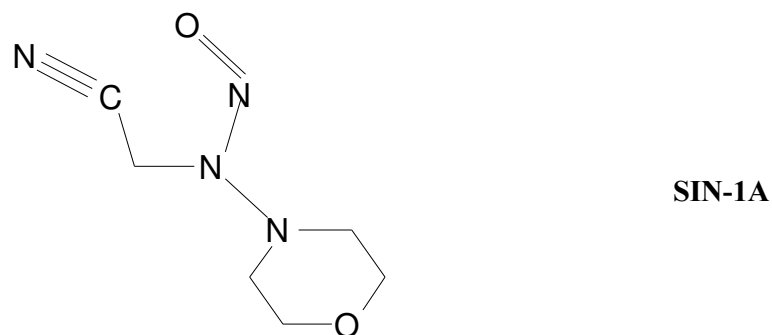
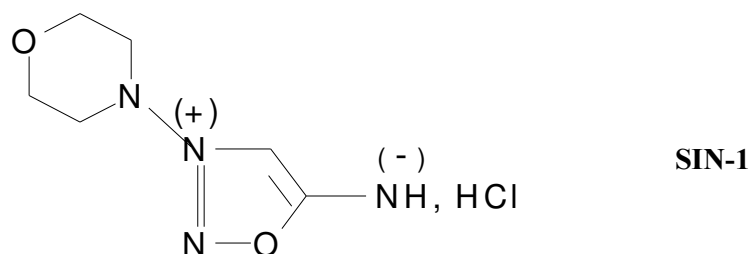
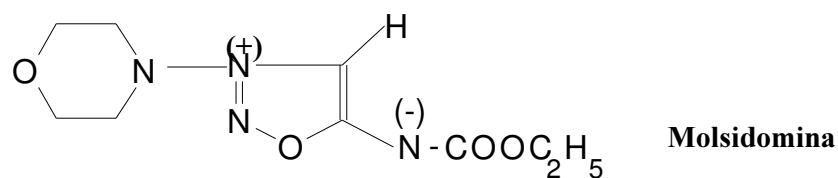
Neste contexto, MORO et al, 1998, estudaram o papel da SOD e ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-one, inibidor da sGC) na morte celular induzida por SIN-1 em cultura primária de neurônios de ratos. Os resultados do estudo sugeriram que a enzima SOD potencializaria a morte neuronal induzida por SIN-1, devido à geração de H_2O_2 a partir do O_2^- proveniente da sidnonimina. Por outro lado, o NO também gerado a partir de SIN-1, promoveria a elevação nos níveis de GMPc, o qual, por sua vez, exerceria um efeito protetor contra a morte neuronal por estar envolvido na regulação dos níveis de cálcio intracelulares. (BARGER et al, 1995; WANG & ROBINSON, 1997). Portanto, os autores concluíram que o H_2O_2 gerado a partir de SIN-1 era o agente responsável pela morte celular e, ainda, que a presença de ODQ, por inibir a sGC e anular o estímulo promovido pelo NO também gerado a partir

do SIN-1, aumentaria a neurotoxicidade causada pela sidnonimina em presença de SOD.

Outra importante sidnonimina utilizada na prática clínica é o Sydnocarb, [3-(β -fenilisopropil)-N-fenilcarbamoilsidnonimina]. Sendo utilizado como um psicoestimulante na terapia de distúrbios psiquiátricos, incluindo esquizofrenia e depressão, o Sydnocarb parece não causar efeitos tóxicos significativos nem mesmo dependência comportamental ou física (ANDERZHANOVA et al. 2001). Os pesquisadores estudaram os efeitos do Sydnocarb sobre os níveis extracelulares de glutamato e de outros aminoácidos neuroativos em comparação com aqueles provocados pela D-anfetamina, um clássico estimulante psicomotor. A administração das drogas em ratos, via intraperitoneal, foi feita de maneira aguda e subcrônica (quatro vezes com intervalos de 2 horas). De acordo com os resultados obtidos, a administração de 5 mg/kg de anfetamina produziu acúmulo extracelular moderado dos níveis dos aminoácidos glutamato e aspartato, enquanto que uma dose equimolar de Sydnocarb (23,8 mg/kg) provocou aumento extracelular de glutamato e alanina. Por sua vez, a administração subcrônica de D-anfetamina causou um aumento gradual de cinco vezes nos níveis de glutamato e aumento moderado do aspartato e alanina. O composto mesoiônico provocou um marcado aumento nos níveis de aspartato e pequeno aumento nos níveis de glutamato. A partir destes dados, os autores concluíram que o modo de ação das duas drogas é diferente e que o Sydnocarb parece ser menos neurotóxico do que a D-anfetamina, uma vez que provoca menos alterações nos níveis extracelulares de glutamato (ANDERZHANOVA et al. 2001).

Este mesmo composto teve seus efeitos psicoestimulantes avaliados também em comparação com a metanfetamina (WITKIN et al., 1999). Sydnocarb foi capaz de bloquear os efeitos depressivos do haloperidol sobre o sistema locomotor. Os efeitos convulsivos da cocaína foram significativamente aumentados pela co-administração de doses não tóxicas de metanfetamina, mas não de Sydnocarb. Este mesoiônico aumentou a atividade locomotora em ratos, mas com potência e eficácia reduzidas em comparação com a metanfetamina.

FIGURA 7. ESTRUTURA QUÍMICA DO N-ETOXICARBONIL-3-MORFOLINOSIDNONIMINA (MOLSIDOMINA), MORFOLINOSIDNONIMINA (SIN-1) E N-NITROSO-N-MORFOLINO-ACETONITRITO (SIN-1A).



FONTE: RHESE et al., 1995; KANTANRANTA et al., 1996.

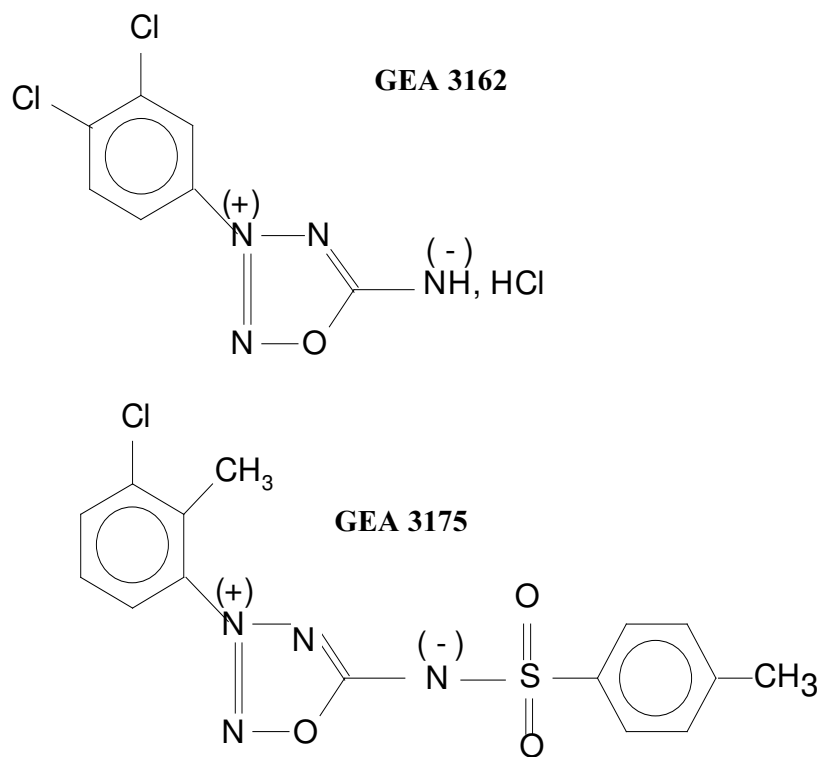
2.2.3. Oxatriazóis Meso-iônicos

Assim como demonstrado para as sidnoniminas, a atividade biológica dos oxatriazóis meso-iônicos (figura 4C), relaciona-se à liberação de óxido nítrico. Neste sentido, KARUP et al. (1994) realizaram estudos com o objetivo de desenvolver um novo grupo de compostos doadores de óxido nítrico, que atuariam como possíveis drogas para o tratamento de isquemia, desordens trombóticas e asmáticas. Estes pesquisadores procuravam também eliminar alguns efeitos indesejáveis observados quando utilizados outros doadores de NO, como por exemplo, o desenvolvimento de tolerância. Assim, foram sintetizados os derivados 3-aryl-1,2,3,4-oxatriazóis-5-imina, os quais eram estruturalmente relacionados com as sidnoniminas e com os compostos 3-aryl-1,2,3,4-oxatriazóis-5-óxidos, para os quais havia sido relatada a atividade hipotensiva (KIER et al., 1966; MASUDA et al., 1970). Estes compostos meso-iônicos foram denominados GEA. Os resultados mostraram que eles eram todos, em maior ou menor grau, doadores de NO.

Em 1996, KANKAANRANTA et al., avaliaram a liberação de NO de dois outros compostos derivados GEA, nomeadamente, GEA 3162 e GEA 3175 (figura 8), em comparação com doadores de NO conhecidos: 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1) e S-nitroso-N-acetil penicilamina (SNAP). Os resultados evidenciaram que estes derivados GEA liberavam NO a partir do anel meso-iônico.

Também neste contexto, REHSE & KÖNIG (1995) sintetizaram e testaram as atividades antiplaquetária e antitrombótica dos compostos meso-iônicos 1,2,3,4-oxatriazoliminas e os correspondentes oxatriazolonas. O composto cloreto de 5-amino-3-fenil-1,2,3,4-oxatriazolimina, na concentração de 50 nmol/L, promoveu inibição de agregação plaquetária em 50%, em experimentos realizados *in vitro*. Já o derivado N-etoxicarbonil inibiu em 48% a formação de trombo em arteríolas de ratos. Os autores sugeriram que tais efeitos estariam relacionados à formação imediata de derivados nitroso hidrazinas.

FIGURA 8. ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS 3-ARIL SUBSTITUÍDOS OXATRIAZÓIS-5-IMINAS, GEA 3162, GEA 3175



FONTE: KANKAANRANTA et al., 1996.

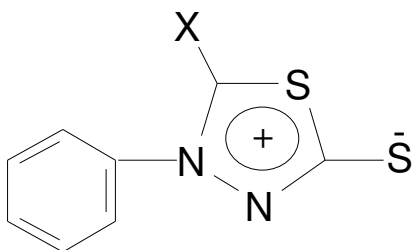
2.2.4. Compostos 1,3,4- Tiadiazóis Meso-iônicos

Os 1,3,4-tiadiazóis meso-iônicos (figura 4D), representam uma outra classe de compostos meso-iônicos com importante atividade biológica. Seus efeitos foram avaliados pela primeira vez por STEWART & KIER em 1965. Derivados 4-fenil-5-X-tiadiazólio meso-iônicos (figura 9) foram testados contra *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. A atividade foi observada para os compostos onde X correspondia aos radicais metil, etil, propil e isopropil. Derivados com substituintes volumosos ou de cadeias longas foram menos ativos.

Sob outro aspecto, GLENNON et al. (1981 a e b), testaram os efeitos dos compostos 1,3,4-tiadiazóis [3,2-a] pirimidinas (figura 10) frente à enzima adenosina 3',5'-monofosfato fosfodiesterase. Foi demonstrada a inibição da enzima, dependente da presença de certos substituintes na estrutura meso-iônica (R_2 , R_6 e R_8). Radicais alquila de cadeia curta não tinham efeito inibitório, enquanto que os substituintes hidrofóbicos fenil e benzil aumentavam a inibição observada. Os autores sugeriram que esta ação inibitória é decorrente da analogia estrutural dos compostos com xantinas naturais, como a teofilina que é um inibidor conhecido da fosfodiesterase (GLENNON et al., 1981 b).

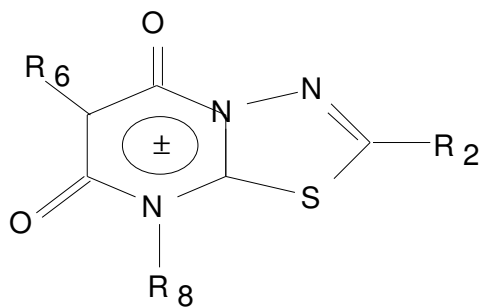
Em continuidade ao trabalho anterior, GLENNON et al. (1984) analisaram uma variedade de compostos meso-iônicos análogos às xantinas - incluindo tiazóis [3,2-a] pirimidinas, benzotiazóis pirimidinas e 1,3,4-tiadiazóis [3,2-a] pirimidinas - quanto a atividade sobre receptores de adenosina A_1 e A_2 , respectivamente relacionados com a inibição e ativação da adenilato ciclase. Os compostos 1,3,4-tiadiazóis [3,2-a] pirimidinas (figura 10) foram antagonistas somente aos receptores A_1 , embora tal efeito tenha sido menos pronunciado do que o observado para teofilina. A presença do substituinte fenil no anel meso-iônico não aumentou a intensidade do efeito, ao contrário do que era observado para teofilina. Na verdade, os diferentes substituintes pareciam não influenciar na intensidade dos efeitos dos compostos meso-iônicos.

FIGURA 9. ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS 4-FENIL-5-X-1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS



FONTE: STEWART & KIER, 1965.

FIGURA 10. ESTRUTURA QUÍMICA DO 1,3,4-TIADIAZÓLIO-[3,2-A]-PIRIMIDINA.



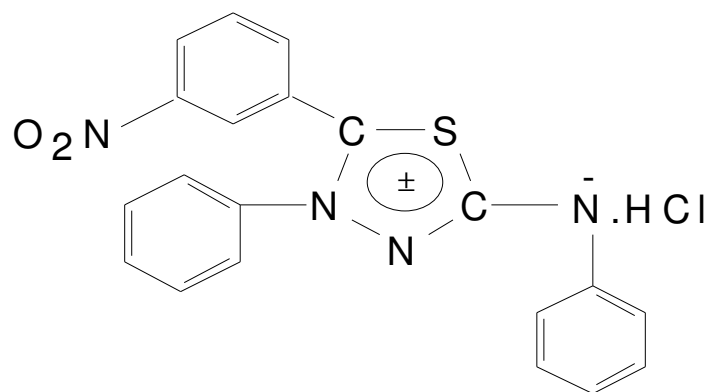
FONTE: GLENNON et al., 1981 b.

LIMA et al. (1986) sintetizaram e testaram o derivado mesoiônico 4,5-difenil-2-tiolato-1,3,4-tiadiazólio em ensaios microbiológicos realizados *in vitro* frente as bactérias *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus*, e os fungos *Candida Albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula sp.*, *Penicillium sp.*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*. Os resultados evidenciaram a ação antibacteriana do composto, sendo a concentração de 400 µg/mL efetiva para a inibição do crescimento dos microorganismos testados.

A sensibilidade de *Saccharomyces cerevisiae* frente aos compostos mesoiônicos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida e 1,3,4-triazólio-2-tiolato foi determinada *in vitro*, através de técnicas microcalorimetria (MONTANARI et al., 1992). Os resultados foram comparados com os obtidos através do método de difusão em ágar. Apenas o composto 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida (figura 11), em que X representa o grupamento NO₂, apresentou atividade antifúngica significativa.

Em 1999, ATHAYDE-FILHO et al., descreveram a síntese e a caracterização de dez compostos mesoiônicos, avaliando também, sua atividade antimicrobiana. Três destes compostos eram derivados 1,3,4-tiadiazólio-2-tiolatos e sete derivavam dos 1,3,4-triazólio-2-tiolatos hidroclorados. Os compostos foram dissolvidos em DMSO a uma concentração de 15 mg/mL para a realização dos experimentos. Os resultados obtidos sugeriram que os compostos eram ativos contra bactérias Gram-positivas e álcool-ácido resistentes; apresentavam atividade moderada contra leveduras e pouca atividade contra outros fungos e foram inativos contra as bactérias Gram-negativas estudadas.

FIGURA 11. ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO MESOIÔNICO 1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-AMINIDA ATIVO CONTRA *SACCHAROMYCES CEREVISAE*.



FONTE: MONTANARI et al., 1992.

Os compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazóis, também foram testados quanto a atividade contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis* (DA SILVA et al., 2002). O objetivo dos autores era testar diferentes derivados destes compostos (cloreto de 4-fenil-5-(4'-X- ou 3'-Y-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) a fim de obter um composto com alta atividade e baixa toxicidade. Os resultados demonstraram que os compostos mais ativos foram o 4'- e 3'-metoxi derivados contra as formas promastigotas, enquanto que a maior atividade contra as formas amastigotas foi obtida com os derivados 4'-flúor e 3'-bromo.

Quanto à atividade antitumoral, GRYNBERG et al. (1997) demonstraram a atividade do cloreto de 4-fenil-5-(4-nitrocinaoíl)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D - figura 12), contra carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180. O composto, sintetizado pelos autores, preveniu o crescimento destas linhagens tumorais sem provocar alterações significativas nos parâmetros hematológicos dos animais testados. SENFF-RIBEIRO et al. (2003) avaliaram a atividade do MI-D contra melanoma B16-F10 em

camundongos. Ensaios *in vitro* demonstraram que o MI-D interfere na viabilidade e na proliferação destas células. A viabilidade celular foi reduzida em 80%, após 24 horas, com a utilização de 25 μM de MI-D. A taxa de proliferação foi avaliada num período de 72 horas utilizando diversas concentrações (2,5 – 25 μM) e sofreu em decréscimo de maneira dose dependente. *In vivo*, o MI-D, na concentração de 57 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$, inibiu o crescimento do tumor subcutâneo – estabelecido após 24 horas da inoculação das células tumorais B16-F10 – em 85%. Neste contexto, os efeitos do MI-D foram comparados com os dos antineoplásicos fotemustina e dacarbazina, cuja ação anti melanoma é reconhecida. O MI-D foi mais citotóxico para as células B16-F10 do que a fotemustina, *in vitro*, nas mesmas condições experimentais (SENEFF-RIBEIRO et al., 2003).

Os mesmos autores, em estudo posterior (SENEFF-RIBEIRO et al., 2004 a), compararam a atividade observada para o MI-D com a de outros compostos que diferiam apenas no substituinte do anel cinamoil (cloretos de 4-fenil-5-[2'-Y, 4'-X ou 4'-X-cinamoil]-1,3,4 tiadiazólio-2-fenilamina), onde MI-J, X= OH; MI-2,4diF, X=Y=F; MI-4F, X=F. Os autores observaram maior efetividade do MI-D em relação aos outros compostos, provavelmente devido ao seu grupo atrator de elétrons (NO_2), que intensifica a carga positiva do anel mesoiônico e permite uma extensiva conjugação da cadeia lateral com a porção exocíclica. Isto parece ser importante para a atividade antitumoral destes compostos contra o melanoma. Complementando estes estudos, SENEFF-RIBEIRO et al. (2004 b) avaliaram os efeitos do composto MI-D em diferentes linhagens de melanoma humano. O MI-D diminuiu, *in vitro*, a viabilidade e a proliferação das células MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO, demonstrando uma elevada atividade citotóxica. Ainda neste estudo, a adesão das células MEL-85 a diferentes componentes da matriz extracelular foi avaliada em presença do MI-D, sendo que o composto reduziu a adesão a laminina, fibronectina e matrigel. Da mesma forma, a morfologia e a organização dos filamentos de actina do citoesqueleto foram alteradas pelo tratamento com o composto mesoiônico.

Sob outro enfoque, CADENA et al. (1998) avaliaram os efeitos do MI-D sobre o metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. O MI-D

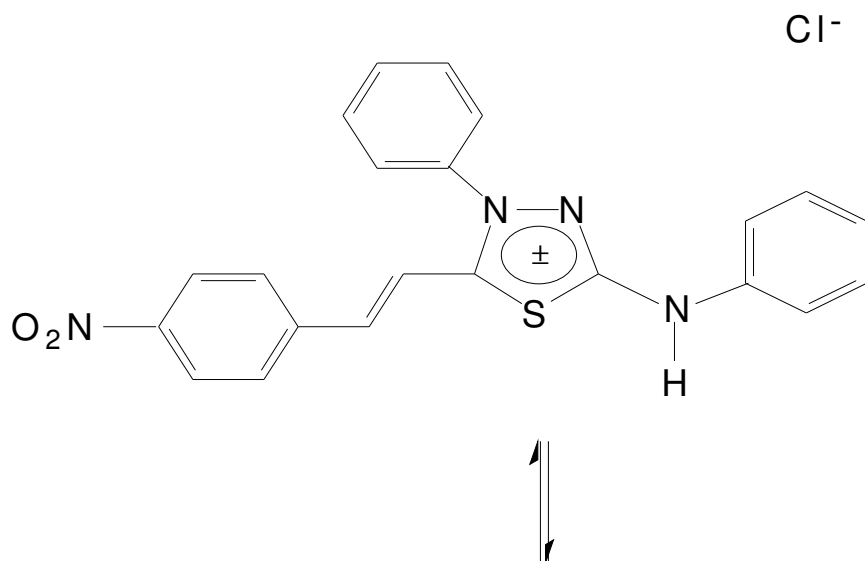
promoveu inibição do transporte de elétrons além do complexo I, entre os complexos II e III da cadeia respiratória. O composto também foi capaz de colapsar o potencial de membrana ($\Delta\psi$) e estimular a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas. Estes resultados levaram os autores a classificar o MI-D como um agente desacoplador inibitório (MORELAND, 1994).

Em trabalho subsequente, CADENA et al. (2002) demonstraram que o MI-D altera a fluidez e a elasticidade da membrana mitocondrial interna, conforme observado em experimentos de inchamento mitocondrial na presença de acetato de sódio, de K^+ mais valinomicina e K^+ mais nigericina. Ensaio de polarização de fluorescência, em vesículas multilamelares sintéticas e naturais, indicaram que o MI-D se instala na membrana mitocondrial, afetando tanto os centros hidrofóbicos quanto hidrofílicos, diminuindo a fluidez da membrana. Os autores sugerem ainda que os efeitos do MI-D sobre o metabolismo energético mitocondrial podem estar relacionados a sua importante atividade antitumoral.

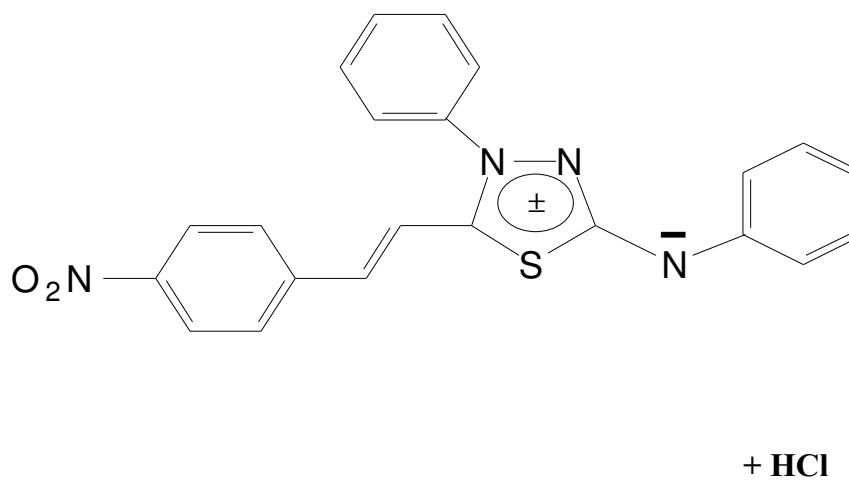
Em adição a atividade antitumoral, CARDOSO et al. (2004), demonstraram que o MI-D também exerce ações antiinflamatória, analgésica e antipirética. O composto (8 mg.kg^{-1}) inibiu de forma significativa a formação do edema induzido por carragenina em ratos, sugerindo sua atividade antiinflamatória. Seu efeito analgésico (2 mg.kg^{-1}) foi evidenciado pela diminuição do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Em ratos, o pré-tratamento com 1 mg.kg^{-1} de MI-D inibiu a resposta febril induzida por LPS. O composto também foi efetivo nos casos em que o quadro febril já estava instalado. Ainda neste estudo, os autores demonstraram que o MI-D estimulou a glicogenólise e inibiu o consumo de oxigênio em fígado de rato perfundido. De acordo com os resultados obtidos, os autores sugeriram que o MI-D é um agente antiinflamatório em potencial.

FIGURA 12. ESTRUTURA QUÍMICA DO CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MI-D) EM A. E DE SEU DERIVADO MESOIÔNICO 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINIDA EM B.

A.



B.



3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os estudos envolvendo os compostos mesoiônicos são direcionados, em sua maioria, apenas no sentido de determinar suas possíveis atividades biológicas. Dentre os trabalhos que buscam esclarecer os prováveis mecanismos envolvidos nos efeitos destes compostos em mitocôndrias, os realizados por CADENA et al. (1998, 2002) sugerem que a atividade antitumoral do composto mesoiônico MI-D (GRYNBERG et al., 1997), estaria relacionada aos seus efeitos sobre o metabolismo energético mitocondrial e, ainda, que a apoptose seria o processo envolvido na morte celular promovida pelo mesmo (CADENA et al., 1998).

Para um outro composto mesoiônico, o 3-[4-cloro-3-nitrofenil]- 1,2,3-oxadiazólio-5-olato - SYD-1 (figura 6, onde X=Cl), pertencente a classe da sidonas, foi demonstrada importante atividade antitumoral contra carcinoma de Erlich e Sarcoma 180 (GRYNBERG et al., 1992).

Portanto, considerando a importante ação antitumoral descrita para o SYD-1, a inexistência de informações na literatura que auxiliem no esclarecimento do mecanismo relacionado a esta atividade e ainda, ao importante papel da mitocôndria na sobrevivência celular – quer no tocante à provisão de energia como no envolvimento da organela nos processos de morte celular – o presente estudo tem como objetivo determinar os efeitos do SYD-1 sobre o metabolismo energético mitocondrial visando contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação envolvido na atividade antitumoral deste composto.

Para cumprir este objetivo foram determinados, em mitocôndrias isoladas de fígado rato, os efeitos do SYD-1 sobre:

- o consumo de oxigênio durante os estados 3 e 4 da respiração;
- a atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória;
- a atividade do complexo F_1F_0 ATPase;
- o potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$);
- o inchamento (“swelling”) mitocondrial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

D-manitol, Hepes, EGTA, EDTA, ácido glutâmico, rotenona, ADP, ATP, NADH, NAD⁺, citocromo c (Tipo IV - coração de boi), fosfoenolpiruvato, piruvato quinase (tipo I, 100U/mg de proteína), FCCP, sulfato de magnésio, safranina *O*, valinomicina, oligomicina, antimicina A, L-glutamato desidrogenase (42 U.mg⁻¹ de proteína) foram obtidos da Sigma Chemical Co.

Os reagentes listados a seguir foram obtidos dos laboratórios: ferricianeto de potássio (Riedel), cianeto de sódio (Baker), DPIP (Eastman), fosfato de potássio monobásico (Synth), ácido succínico (Aldrich Chemical). Albumina de soro bovino (BSA), cloreto de potássio, sacarose, DMSO, Tris e os demais reagentes, também com alto grau de pureza, foram adquiridos da Merck.

O composto mesoiônico SYD-1 (3-[4-cloro-3-nitrofenil]-1, 2,3-oxadiazólio-5-olato) foi sintetizado e gentilmente doado pela Prof^a. Dra. Áurea Echevarria do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O composto teve sua estrutura confirmada por RMN ¹H e ¹³C e espectroscopia de massas (GRYNBERG et al., 1992).

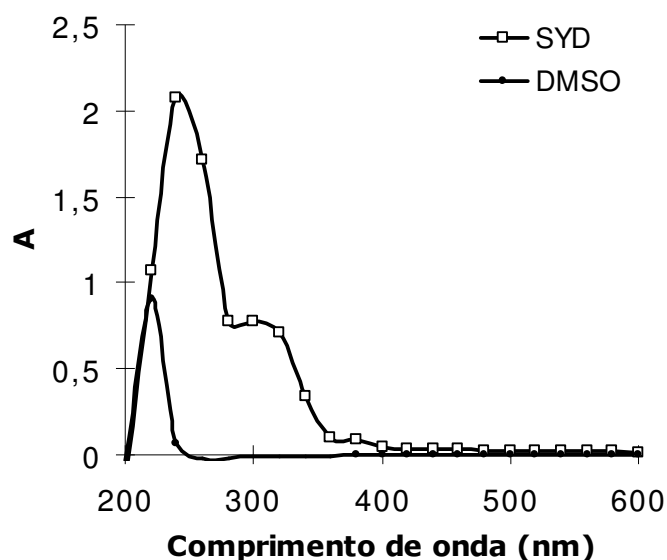
4.2 Preparo da Solução de SYD-1

A solução de SYD-1 foi preparada em DMSO à concentração final de 100mmol.L⁻¹.

A solução estoque foi mantida congelada a -18°C e utilizada no prazo máximo de 1 mês. Como verificado através de RMN ¹H e ¹³C e espectroscopia de massas, a solução estoque armazenada nestas condições, por dois meses, mantém suas características estruturais (ECHEVARRIA, Comunicação pessoal). Para a utilização nos ensaios, a solução estoque foi diluída em meio de reação, a fim de obter-se a

concentração final desejada para cada situação experimental. O espectro de absorção do SYD-1 em DMSO está representado na figura 13.

FIGURA 13. ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO SYD-1 EM DMSO.



4.3 Animais

Foram utilizados ratos machos albinos Wistar, com peso variando entre 220-330g, mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com dieta balanceada Purina® e água *ad libitum* e, para o isolamento das mitocôndrias, foram submetidos a jejum prévio de 12 horas permitindo-se água *ad libitum*.

4.4 Efeitos do SYD-1 Sobre o Metabolismo Mitocondrial

Com o objetivo de avaliar os efeitos do SYD-1 sobre o metabolismo energético mitocondrial foram determinados os efeitos do composto sobre os seguintes

parâmetros: consumo de oxigênio durante os estados 3 e 4 da respiração, atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória e ATPsintase (ATPase), potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) e inchamento mitocondrial (*swelling*). Para tanto, foram utilizadas as concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 μmol de SYD-1. mg^{-1} de proteína mitocondrial. Em todas as situações experimentais o SYD-1 foi incubado previamente por 2 minutos com as preparações mitocondriais. Foram realizados, também, experimentos controle apenas com DMSO, solvente do SYD-1, nas concentrações correspondentes àquelas utilizadas nos ensaios, demonstrando que o DMSO não exerce efeito nos experimentos realizados.

4.4.1 Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato

4.4.1.1 Isolamento de Mitocôndrias para Determinação do Consumo de Oxigênio, Potencial de Membrana 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 210 mmol.L^{-1} , sacarose 70 mmol.L^{-1} , EGTA 0,5 mmol.L^{-1} , Tris-HCl 10 mmol.L^{-1} pH 7,4 e BSA 0,05 g%. Após o animal ter sido decapitado, o fígado foi retirado imediatamente e imerso em meio de extração a 4°C. Depois de lavado, o órgão foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador van Potter Elvehjen, usando-se sucessivamente pistilos frouxo e normal. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 320 x g a 4°C em centrífuga Hitachi, modelo himac CR21E, durante 5 minutos, para eliminação de restos de células intactas, membranas e núcleos. Desprezando-se o sedimento, o sobrenadante foi centrifugado a 12.600 x g, durante 10 minutos. O precipitado obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspensão, lavado duas vezes em meio de extração por centrifugação a 8.100 x g, durante 10 minutos, 4°C. As mitocôndrias obtidas foram ressuspensas em meio de extração, à concentração de aproximadamente 40 mg.mL^{-1} .

4.4.1.2 Isolamento de Mitocôndrias para Determinação do Grau de Inchamento Mitocondrial.

A técnica de isolamento de mitocôndrias para os experimentos de inchamento mitocondrial foi a mesma descrita no item anterior, porém, o meio de extração era constituído de: sacarose 330 mmol.L⁻¹, Tris-HCl 1 mmol.L⁻¹, pH 7,5 e EDTA 1 mmol.L⁻¹ (MUSTAFA et al. 1966). Na última centrifugação não foi colocado EDTA. A concentração final de proteína mitocondrial foi ajustada para 40 mg.mL⁻¹, utilizando-se meio de extração sem EDTA.

4.4.1.3 Obtenção de Mitocôndrias Rompidas, para Avaliação da Atividade Enzimática dos Complexos da Cadeia Respiratória.

Mitocôndrias de fígado de rato, isoladas como descrito no item 4.4.1.1, foram congeladas em nitrogênio líquido, até o momento de sua utilização. As organelas foram rompidas por 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Os fragmentos de membrana assim obtidos foram utilizados para a avaliação da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória e da ATP sintase (ATPase).

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 termostatizada, 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, EGTA 0,1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1g%, foi

suplementado com succinato de sódio $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, rotenona $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, K_2HPO_4 $0,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e ADP $0,08 \text{ mmol.L}^{-1}$, ou com glutamato de sódio 5 mmol.L^{-1} , K_2HPO_4 $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ e ADP $0,16 \text{ mmol.L}^{-1}$, na ausência de rotenona. A quantidade de mitocôndrias utilizada em cada experimento, expressa com relação à concentração de proteínas, foi de 0,5 mg, quando o substrato utilizado foi o succinato de sódio e de 2,0 mg, quando o glutamato de sódio foi o substrato oxidável.

As velocidades respiratórias foram expressas em $\text{nmol de O}_2 \text{ consumido.min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, considerando-se que a solubilidade do O_2 na água, a 28°C e 1 atm é de $250 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (ESTABROOK, 1967). A relação ADP: O foi determinada como descrito por CHANCE & WILLIAMS (1955), considerando a concentração de ADP utilizada no sistema e os átomos-grama de oxigênio consumidos 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 Enzimática dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória

Para determinar a atividade das enzimas ligadas à cadeia respiratória foram utilizadas preparações de mitocôndrias rompidas como descrito no item 4.4.1.3. Para tais experimentos foi utilizado espectrofotômetro Hitachi, modelo U – 2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300. Em alguns casos, a atividade enzimática foi determinada polarograficamente através do consumo de oxigênio, como descrito no item anterior.

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, em volume final de 1,3 mL, era constituído de: tampão fosfato 80 mmol.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 50 µmol.L⁻¹, NADH 0,17 mmol.L⁻¹ e 0,5 mg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de NADH, acompanhando-se a velocidade do consumo de oxigênio. Os resultados foram expressos em nmol de oxigênio consumido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial.

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

A atividade do complexo NADH-desidrogenase foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por SINGER (1974), que recomenda o uso do ferricianeto como aceptor artificial de elétrons. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1,0 mL, em sistema de reação constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmol.L⁻¹, NADH 0,17 mmol.L⁻¹, ferricianeto de potássio 0,6 mmol.L⁻¹, rotenona 1 µmol.L⁻¹ e 100 µg de proteína mitocondrial. A reação, iniciada pela adição de NADH, foi monitorada a 420 nm e os resultados expressos em micromol de ferricianeto reduzido. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína, considerando-se 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)

A atividade do complexo NADH: citocromo c redutase foi avaliada pelo método descrito por SOMLO (1965), em sistema de reação 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 1 mmol.L⁻¹ e 100 µg proteína mitocondrial. A reação ocorreu a 28° C, em volume final de 1 mL 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 O_2 segundo método descrito por SINGER (1974). O sistema de reação, em volume final de 1,3 mL, foi constituído de tampão fosfato 80 $mmol.L^{-1}$, pH 7,4, rotenona 10 $\mu mol.L^{-1}$, succinato de sódio 10 $mmol.L^{-1}$ e 1 mg de proteína mitocondrial. A reação ocorreu a 28° C e foi iniciada pela adição do substrato oxidável. Os resultados foram expressos em $nmol$ de oxigênio consumido. $min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína mitocondrial, considerando-se a solubilidade do O_2 em água e 1 atm de 250 $\mu mol.L^{-1}$ a 28°C (ESTABROOK, 1967).

4.5.2.5 Desidrogenase Succínica (Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido Redutase)

A atividade da desidrogenase succínica foi determinada pelo método de Singer (1974), utilizando-se DPIP e PMS como aceptores artificiais de elétrons. O sistema de reação em volume final de 1 mL continha 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 $mmol.L^{-1}$ e 100 μg de proteína mitocondrial. A mistura foi incubada por 10 minutos a 28°C, iniciando a reação pela adição de DPIP 300 $\mu mol.L^{-1}$ e PMS 1 $mmol.L^{-1}$. A velocidade de redução do DPIP foi monitorada a 600 nm e os resultados foram expressos em $nmol$ de DPIP reduzido. $min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína mitocondrial, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 19.100 $mol.L^{-1}.cm^{-1}$ para o DPIP reduzido (SINGER, 1974).

4.5.2.6 Succinato Citocromo c Redutase (Succinato: Ferrocitocromo c Óxido-redutase)

A atividade da succinato citocromo c redutase foi determinada pelo método de SOMLO (1965), determinando-se a redução do citocromo c. A condição experimental incluiu o bloqueio da cadeia respiratória com NaCN e rotenona.

O sistema de reação em volume final de 1 mL 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 100 µg de proteína mitocondrial. 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 foi 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)

4.5.2.7.1 Obtenção do Ferrocitocromo c

Para a obtenção da forma reduzida do citocromo c foi utilizado 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, então, determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 27.700 mol.L⁻¹.cm⁻¹ a 550nm (MARGOLIASH, 1954). O ferrocitocromo preparado através deste procedimento contém menos de 5% da proteína na forma oxidada e se mantém reduzido 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 era constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4, EDTA 2 mmol.L⁻¹, ferrocitocromo c 30 µmol.L⁻¹ e 100 µg proteína mitocondrial. 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 anterior.

4.5.2.8 Determinação da Atividade da F_1F_0 ATPase

4.5.2.8.1 Determinação da Atividade da F_1F_0 ATPase em Mitocôndrias Rompida

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 28°C, em sistema de reação constituído de Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 8,4, sulfato de magnésio 3 mmol.L⁻¹, PEP 2,5 mmol.L⁻¹, piruvato quinase 10 unidades, ATP 4 mmol.L⁻¹ e 100 µg de proteína mitocondrial. A reação em volume final de 1,0 mL foi iniciada com a adição de ATP e mantida sob agitação constante. Após 10 minutos foi adicionado TCA 5%, para finalizar a reação. A seguir, foi feita a centrifugação do material a 7.800 x g por 1 min, sendo o fosfato inorgânico presente no sobrenadante dosado segundo o método de SUMNER (1944), a partir de uma solução ácida contendo principalmente heptamolibdato de amônio e sulfato férrico. Os resultados foram expressos em nmol de fosfato liberado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial.

4.5.2.8.2 Determinação da Atividade da F_1F_0 ATPase em Mitocôndrias Intactas

A atividade da F_1F_0 ATPase em mitocôndrias intactas foi determinada na ausência ou presença de 1µmol.L⁻¹ de FCCP, através do método de PULLMAN et al. (1960), com algumas modificações. O sistema de reação era constituído de: sacarose 50 mmol.L⁻¹, tampão Tris - HCl 12 mmol.L⁻¹, pH 7,4, KCl 50 mmol.L⁻¹ e 3 mg de proteína mitocondrial. O volume de reação foi de 1mL e a temperatura de 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%, com o

objetivo de finalizar a reação. Em seguida, foi feita a centrifugação do material 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 nmol de fosfato liberado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial.

4.5.3. Determinação da Atividade da Glutamato Desidrogenase

A atividade da L-glutamato desidrogenase foi determinada de acordo com STRECKER, 1955. O sistema de reação, ajustado para o volume final de 0,2 mL, era constituído de: tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹, α -cetoglutarato 30 mmol.L⁻¹, sulfato de amônio 60 mmol.L⁻¹, NADH 0,15 mmol.L⁻¹ e 1,84 U de enzima (42U. mg⁻¹ de proteína). A reação, iniciada pela adição de α -cetoglutarato, foi acompanhada em 340 nm e os resultados foram expressos em nmoles de NADH oxidado .min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial. O aparelho utilizado para este experimento foi leitor de microplaca Benchmark, Bio-Rad.

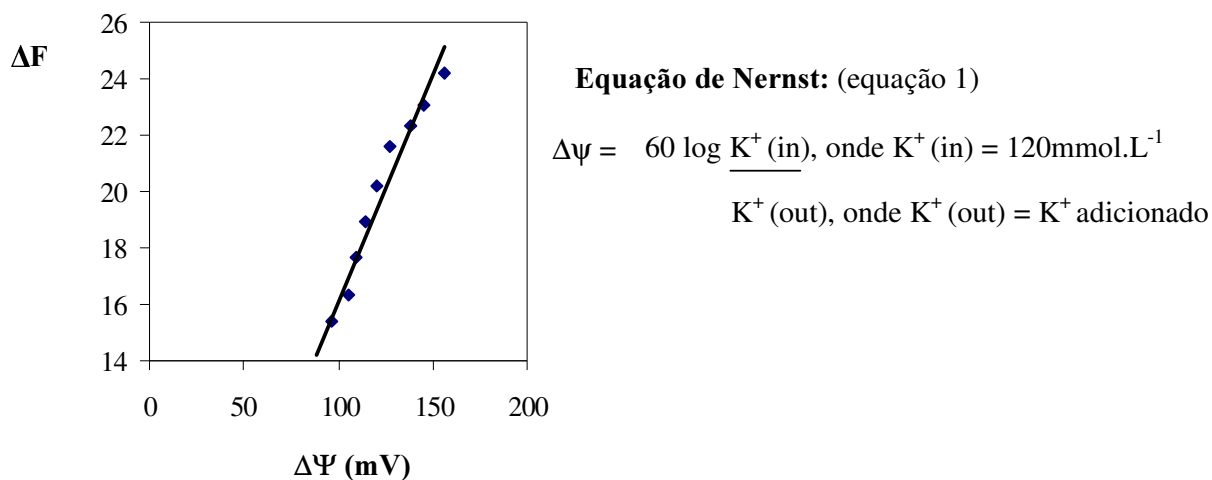
4.5.4 Determinação do Potencial de Membrana ($\Delta\Psi$).

O potencial elétrico de membrana foi estimado em espectrofluorímetro RF-5031PC (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.) através da variação da fluorescência emitida pela safranina O em mitocôndrias energizadas com succinato de sódio. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 495 e 586 nm, respectivamente (WEICKOWSKI & WOJTCZAK, 1998). As fendas (slit) de excitação e emissão foram selecionadas em 3 nm. O sistema de incubação, em volume final de 2 mL, mantido a 28°C era constituído de: sacarose 250 mmol.L⁻¹, MOPS 20 mmol.L⁻¹, pH 7,2, NaH₂PO₄ 1mmol.L⁻¹, safranina O 5 μ mol.L⁻¹, succinato de sódio 2 mmol.L⁻¹, rotenona 5 μ mol.L⁻¹ e 1 mg de proteína mitocondrial.

Para determinar o $\Delta\Psi$ em cada caso experimental, foram previamente elaboradas curvas de calibração, conforme ilustrado na figura 14, onde foi medido o potencial de membrana desenvolvido pela difusão de K⁺ na presença de valinomicina

(0,1 mmol.L⁻¹), de acordo com a metodologia descrita por AKERMAN & WIKSTRON (1976). O potencial foi calculado utilizando-se a equação de Nernst (equação 1), considerando a concentração de K⁺ intra-mitochondrial (K⁺(in)) como sendo de 120 mmol.L⁻¹, conforme ROSSI & AZZONE (1969).

FIGURA 14. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA CÁLCULO DO POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\Psi$)



Substrato: Succinato de sódio. As variações de fluorescência da Safranina *O*, expressas como ΔF , estão relacionadas ao potencial de difusão de K⁺ (mV).
Coeficiente de correlação da curva de 0,96.

4.5.5 Determinação do Inchamento Mitochondrial (Swelling)

Os experimentos visando determinar o inchamento mitochondrial foram realizados em espectrofotômetro Hitachi, modelo U - 2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300, no comprimento de onda de 546 nm.

4.5.5.1 Determinação do Inchamento em Mitocôndrias Energizadas

O inchamento mitocondrial, decorrente da entrada de íons sódio na matriz, foi monitorado pelo método descrito por SEPPALA et al. (1973). O meio de reação em volume final de 3mL, mantido a 28°C, foi constituído de sacarose 100 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 30 mmol.L⁻¹, pH 7,5, EDTA 0,5 mmol.L⁻¹, acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ e 1 mg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de glutamato de sódio na concentração de 15 mmol.L⁻¹. Depois de atingido o novo ponto de equilíbrio, o meio de reação foi suplementado com 4 µmol.L⁻¹ de rotenona para observação da contração da organela.

Também foram realizados experimentos utilizando succinato de sódio 5 mmol.L⁻¹ como substrato oxidável. Neste caso o sistema de reação foi o mesmo descrito anteriormente para o glutamato de sódio, acrescentando-se apenas rotenona na concentração de 4 µmol. L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de succinato de sódio e, atingido o equilíbrio a contração da organela foi observada após adição de 6 µg de antimicina A.

4.5.5.2 Determinação do Inchamento em Mitocôndria Desenergizadas na Presença de Valinomicina

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, em volume final de 3,0 mL, continha KNO₃ 135 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 5 mmol.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,1 mmol.L⁻¹, rotenona 4 µmol.L⁻¹, antimicina A 2 µg, valinomicina 4 µg e 1 mg de proteína mitocondrial.

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 700nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U - 2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300.

4.7 Análise Estatística

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeitos do SYD-1 sobre o consumo de oxigênio e parâmetros relacionados

Com o objetivo de determinar os efeitos do composto mesoiônico SYD-1 sobre o metabolismo energético foram realizados experimentos utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de rato como modelo experimental, sendo avaliados, os seguintes parâmetros: consumo de oxigênio em presença de ADP (estado 3 da respiração), consumo de oxigênio após a exaustão de ADP (estado 4 da respiração), coeficiente de controle respiratório (CCR) e a razão ADP/O. Estes parâmetros foram determinados em resposta à presença de glutamato ou succinato de sódio como substratos oxidáveis.

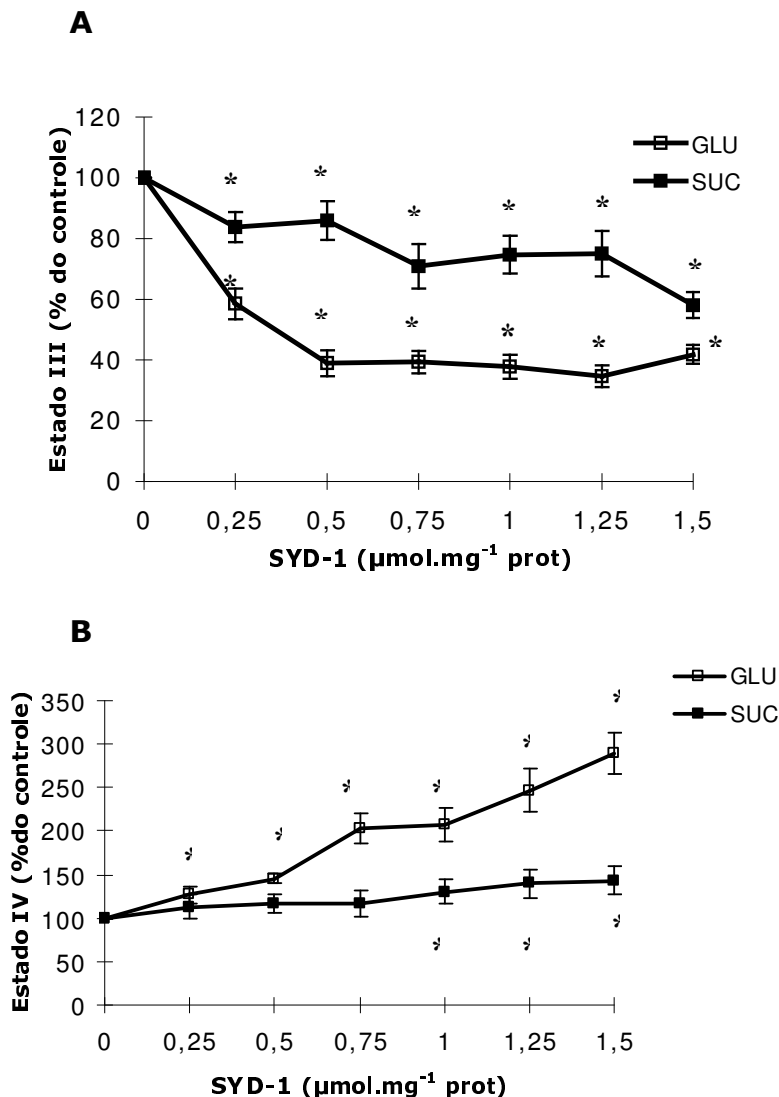
Na figura 15 A estão representados os efeitos do SYD-1 sobre o consumo de oxigênio durante o estado 3 da respiração. Pode-se observar que o composto mesoiônico, já em baixa concentração ($0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), promoveu uma inibição de 60% na velocidade respiratória quando utilizado como substrato oxidável o glutamato de sódio. Tal efeito foi dependente da concentração até essa dose, porém não houve diferença estatística entre os valores das inibições observadas nas maiores concentrações de SYD-1, permanecendo a inibição em torno de 65%. Diferentemente do observado para o glutamato, quando utilizado o succinato de sódio como substrato, o composto provocou efeitos discretos sobre a velocidade respiratória do estado 3. Em baixas concentrações ($0,25$ e $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) o SYD-1 promoveu uma inibição de 16%, chegando a aproximadamente 25% nas concentrações intermediárias ($0,75$ - $1,25 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína). Quando a maior concentração ($1,5 \mu\text{mol}$ de SYD-1 $\cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) foi utilizada, observa-se na figura 15A uma inibição de 42% na velocidade respiratória do estado 3. Com base nestes resultados é possível concluir que o efeito inibitório provocado pelo SYD-1, sobre a velocidade do estado 3 da respiração, foi mais pronunciado quando o substrato oxidável utilizado era o glutamato de sódio.

A inibição na velocidade respiratória durante o estado 3, promovida pelo SYD-1, pode ser justificada por quaisquer das seguintes possibilidades: a) inibição de um ou mais complexos da cadeia respiratória; b) inibição das desidrogenases dos substratos utilizados; c) inibição do translocador de nucleotídeos de adenina; d) inibição da ATPsintase e e) inibição dos transportadores dos substratos.

Com relação aos efeitos do SYD-1 sobre a velocidade respiratória após a exaustão de ADP (estado 4 da respiração), verifica-se na figura 15B que o composto mesoiônico promoveu um estímulo no consumo de oxigênio de modo dose dependente. Durante a oxidação do glutamato, tal estímulo foi de 27% para a menor concentração de SYD-1 ($0,25 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), chegando a 190% com a maior concentração ($1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína). No entanto, como também observado para o estado 3 da respiração (figura 15 A), quando o succinato foi o substrato oxidável, os efeitos promovidos pelo SYD-1 sobre o estado 4 foram mais discretos. O estímulo da velocidade respiratória foi estatisticamente significativo somente a partir da concentração de $1,0 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína mitocondrial (30% de estímulo), chegando a apenas 43% com a concentração máxima ($1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), em contraste ao estímulo de 190% observado quando o glutamato foi utilizado como substrato, sendo que não houve diferença significativa entre os efeitos promovidos pelas três últimas concentrações. Portanto, é possível concluir, como também demonstrado para o estado 3 da respiração (figura 15 A), que os efeitos do SYD-1 sobre o consumo de oxigênio durante o estado 4 foram mais pronunciados quando o glutamato de sódio era o substrato oxidável. É importante ressaltar, ainda, que os efeitos do SYD-1 sobre o estado 4 sugerem que o composto mesoiônico exerça uma ação desacopladora.

As figuras 16A e B mostram, respectivamente, os valores de CCR e da razão ADP/O. Verifica-se uma drástica diminuição destes parâmetros quando o glutamato foi o substrato, certamente como consequência dos efeitos exercidos pelo SYD-1 sobre a velocidade do consumo de oxigênio (inibição do estado 3 e estímulo do estado 4). Com a oxidação do glutamato, o CCR sofreu uma diminuição de 86% ($1,25 \mu\text{mol}$ de SYD-1 $\cdot \text{mg}^{-1}$ proteína mitocondrial) em relação ao controle, enquanto que a

FIGURA 15. EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.



As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, no item 4.5.1. Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol.L^{-1} , tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2, KCl 65 mmol.L^{-1} , EGTA $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ e BSA $0,1 \text{ g\%}$. Suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L^{-1} , K_2HPO_4 $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ e ADP $0,16 \text{ mmol.L}^{-1}$, ou com succinato de sódio $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, rotenona $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, K_2HPO_4 $0,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e ADP $0,08 \text{ mmol.L}^{-1}$.

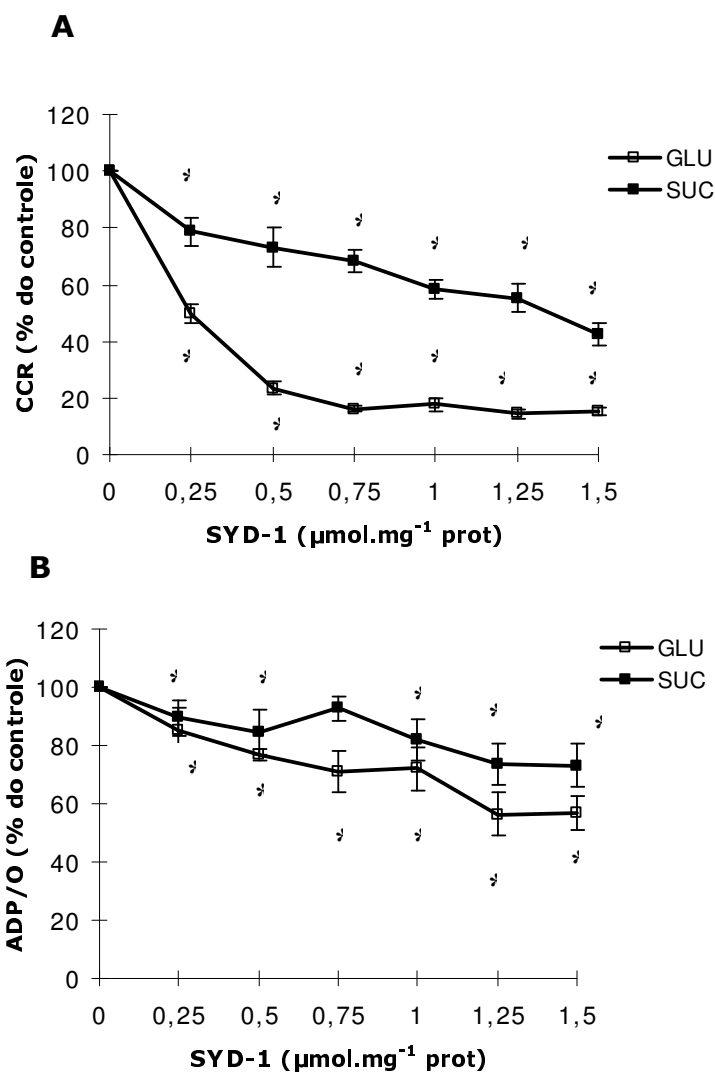
A. Estado 3, consumo de oxigênio na presença de ADP e substrato. 100% corresponde a $31,25 \pm 2,25$ e $61,86 \pm 6,55$ nmol de oxigênio consumido por minuto por miligrama de proteína mitocondrial para o glutamato e succinato de sódio, respectivamente.

B. Estado 4, consumo de oxigênio mitocondrial após a exaustão de ADP. 100% corresponde a $4,59 \pm 0,47$ e $14,02 \pm 0,71$ nmol de oxigênio consumidos por minuto por miligrama de proteína mitocondrial para o glutamato e succinato, respectivamente.

Cada valor representa a média \pm dp de seis experimentos independentes.

*Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

FIGURA 16. EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CCR E RAZÃO ADP/O EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.



As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, no item 4.5.1. Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol.L^{-1} , tampão Hepses 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2, KCl 65 mmol.L^{-1} , EGTA $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ e BSA $0,1 \text{ g\%}$. Suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L^{-1} , K_2HPO_4 $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ e ADP $0,16 \text{ mmol.L}^{-1}$, ou com succinato de sódio $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, rotenona $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, K_2HPO_4 $0,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e ADP $0,08 \text{ mmol.L}^{-1}$.

A. CCR, coeficiente de controle respiratório. 100% corresponde a $7,03 \pm 0,19$ e $4,46 \pm 0,40$ para glutamato e succinato, respectivamente.

B. ADP/O, concentração de ADP/consumo de oxigênio. 100% corresponde a $2,64 \pm 0,25$ e $1,82 \pm 0,21$ para glutamato e succinato, respectivamente.

Cada valor representa a média \pm dp de seis experimentos independentes.

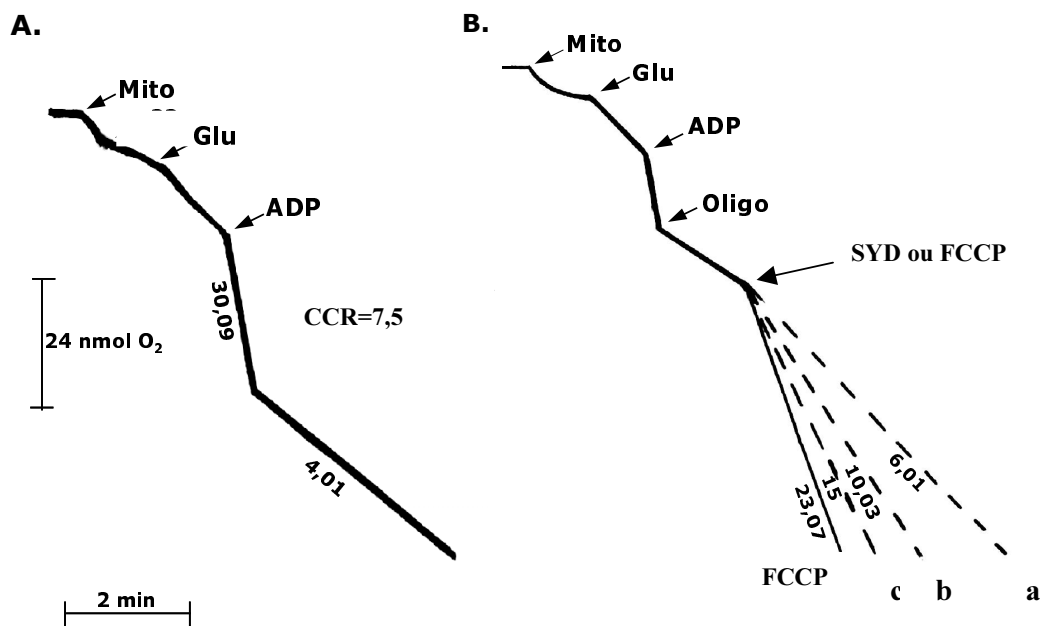
* Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

diminuição da razão ADP/O foi de 44% (1,25 μmol de SYD-1 . mg^{-1} proteína).

Como consequência dos efeitos mais discretos causados pelo SYD-1, quando o succinato foi utilizado como substrato oxidável (figuras 15A e B), menores alterações nos parâmetros CCR e ADP/O foram observadas. A diminuição do CCR (figura 16 A) foi de 57% com a maior concentração de SYD-1 (1,5 $\mu\text{mol}.\text{mg}^{-1}$ proteína), sendo a maior diminuição da ADP/O, de 27%, observada para a concentração de 1,25 μmol de SYD-1 . mg^{-1} proteína mitocondrial (Figura 16 B).

Com o objetivo de comprovar o efeito desacoplador do SYD-1, como sugerido pelo acentuado estímulo da velocidade respiratória do estado 4 (figura 15 B), foram realizados experimentos de consumo de oxigênio em presença oligomicina (figura 17). A oligomicina se liga à subunidade F_0 da F_1F_0 ATPase, impedindo o retorno de prótons à matriz mitocondrial, promovendo conseqüentemente, a diminuição do transporte de elétrons através da cadeia respiratória. Desta forma, a adição de oligomicina durante o estado 3 da respiração, impede a síntese de ATP induzindo um estado 4 da respiração (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Na figura 17 observa-se que a adição de SYD-1 sobre o estado 4, induzido pela oligomicina, promove o aumento na velocidade do consumo de oxigênio como consequência do aumento no fluxo de elétrons através da cadeia respiratória, efeito este independente da ATPsintase. Desta forma, conclui-se que o maior fluxo de elétrons, promovido pelo SYD-1, é decorrente do aumento na condutância a prótons através da membrana mitocondrial, ou seja, o composto mesoiônico é capaz de colapsar o potencial de membrana. Tal efeito, que foi dependente da concentração, é característico dos agentes desacopladores, como FCCP e dinitrofenol (MORELAND, 1994; SKULACHEV, 1998).

FIGURA 17. EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM MITOCÔNDRIAS COM ATP SINTASE INIBIDA POR OLIGOMICINA.



As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, no item 4.5.1. Sistema de Reação: D-manitol 125 mmol.L⁻¹, tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmol.L⁻¹, EGTA 0,1 mmol.L⁻¹ e BSA 0,1 g%. Suplementado com glutamato de sódio 5 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 1,6 mmol.L⁻¹ e ADP 0,16 mmol.L⁻¹, ou com succinato de sódio 2,5 mmol.L⁻¹, rotenona 10 μmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 0,8 mmol.L⁻¹ e ADP 0,08 mmol.L⁻¹.

A. Ensaio controle realizado na ausência de oligomicina, SYD-1 e FCCP; CCR – coeficiente de controle respiratório.

B. Consumo de oxigênio na presença de oligomicina, com a adição de SYD-1 (---) nas concentrações de **a.** 0,125; **b.** 0,5 e **c.** 1,5 μmol.mg⁻¹ de proteína mitocondrial e a adição de FCCP (—) na concentração de **d.** 1,0 μmol.L⁻¹. Adições **Mito.** – mitocôndrias; **Glu** – glutamato de sódio 5 mmol. L⁻¹; **Oligo** – oligomicina 3,4 μmol.L⁻¹. Os traçados são representativos de três experimentos independentes. As velocidades respiratórias estão expressas em nmol de O₂ consumido. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína mitocondrial.

5.2 Efeitos do SYD-1 sobre a Atividade dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória e sobre a Glutamato Desidrogenase

Com base no importante efeito inibitório da sidnona SYD-1 sobre a velocidade respiratória do estado 3 e considerando ainda, que tal efeito poderia resultar da ação direta do composto mesoiônico sobre os complexos da cadeia respiratória, foram realizados experimentos para avaliar esta possibilidade. Para tanto, foram utilizadas preparações de mitocôndrias rompidas (obtidas conforme o item 4.4.1.3) nas quais minimiza-se a barreira representada pela membrana mitocondrial interna e permitem, ainda, avaliar o efeito do composto apenas sobre transporte de elétrons, independentemente da fosforilação oxidativa.

Na tabela 3 estão demonstrados os efeitos do SYD-1 sobre os complexos enzimáticos da cadeia respiratória e sobre a enzima glutamato desidrogenase. Verifica-se que o segmento da NADH oxidase, que inclui o transporte de elétrons do NADH até o oxigênio, é inibido pelo SYD-1. Tal inibição foi significativa para todas as concentrações utilizadas e atinge um valor máximo de 76% em relação à média dos controles realizados na ausência do composto mesoiônico. Este valor de 76% é superior àquele observado quando da oxidação do glutamato durante o estado 3 da respiração (65% - figura 15 A), em presença da mesma concentração de SYD-1 (1,5 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína). Porém, deve-se observar ainda na tabela 3, que o SYD-1 promove a inibição da enzima glutamato desidrogenase chegando a 20% para a maior concentração (1,5 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína). Desta forma, o efeito sobre a glutamato desidrogenase – restringindo parcialmente o fluxo de elétrons para a cadeia respiratória – contribui para a inibição causada pelo SYD-1 sobre o estado 3. Portanto, a diferença na magnitude das inibições observada nos ensaios realizados com mitocôndrias rompidas e intactas chega a 30%, diferença significativa para ser atribuída apenas às características da preparação e/ou à maior exposição e, portanto, a maior susceptibilidade dos complexos enzimáticos aos efeitos do SYD-1. Sendo assim, o envolvimento de outros fatores não pode ser descartado.

O SYD-1 poderia estar retirando elétrons da cadeia respiratória e sofrendo redução, sendo que para esclarecer esta hipótese seriam necessários experimentos de voltametria cíclica, uma técnica capaz de verificar o comportamento redox de um composto sobre uma ampla faixa de potencial (KISSINGER & HEINEMAN, 1983). Através do valor do potencial de redução padrão (E°) do SYD-1, seria possível avaliar a capacidade eletroatrativa da droga, descartando ou não a possibilidade de desvio de elétrons da cadeia respiratória diretamente. Uma outra possibilidade que deve ser considerada é a liberação de NO da própria estrutura do SYD-1, uma vez que vários compostos mesoiônicos são conhecidos como liberadores de NO (KARUP et al., 1994; KANKAANRANTA et al., 1996; MORO et al., 1998). Sabe-se que este, por sua vez, promove inibição no transporte de elétrons, principalmente ao nível do complexo IV (citocromo oxidase) da cadeia respiratória (SARTI et al., 2000; BROOKES et al., 2003), em um efeito competitivo com relação ao oxigênio (KOIVISTO et al., 1997). Desta forma, seria possível sugerir que a maior inibição da NADH oxidase (76%) quando comparada à inibição da velocidade respiratória no estado 3 (45%) - por ocasião da oxidação do glutamato, descartado o efeito sobre a glutamato desidrogenase -, seja decorrente do efeito inibitório do NO, potencializado em preparações de mitocôndrias rompidas utilizadas nos ensaios de atividade enzimática. Porém, a confirmação desta hipótese requer futuras investigações.

Na tentativa de localizar os segmentos nos quais o SYD-1 poderia estar exercendo o efeito inibitório de 76% ($1,5 \mu\text{mol}$ de SYD-1. mg^{-1} proteína) sobre a NADH Oxidase, foram avaliadas as atividades dos seguintes complexos enzimáticos: NADH desidrogenase (NADH: Ferricianeto Óxido-redutase), NADH citocromo c redutase (NADH: Citocromo c Óxido-redutase) e Citocromo c Oxidase (Ferrocitocromo c: Oxigênio Óxido-redutase). Na tabela 3 observa-se que a atividade da NADH desidrogenase não sofreu alteração com a presença de SYD-1, indicando que o efeito inibitório observado não ocorre ao nível do complexo I. Já sobre o trecho da NADH citocromo c redutase, que compreende os complexos I a III da cadeia respiratória, o composto mesoiônico promoveu inibição de 23% ($1,25 \mu\text{mol}.\text{mg}^{-1}$ proteína). Ensaios avaliando o efeito do SYD-1 sobre a atividade da Citocromo c

TABELA 3. EFEITOS DO SYD-1 SOBRE OS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA E SOBRE A GLUTAMATO DESIDROGENASE.

Enzimas	% do controle (média ± dp)					
	SYD-1 (µmol.mg ⁻¹ prot.)					
	0	0,25	0,5	0,75	1,0	1,25
NADH oxidase	100	65±6 *	45±6 *	31±3 *	32±4 *	26±3 *
NADH desidrogenase	100	97±4	94±5	96±5	97±6	95±5
NADH citocromo c redutase	100	99±7	101±6	92±8	85±7 *	77±5 *
Succinato oxidase	100	86±8 *	81±4 *	67±6 *	52±6 *	47±3 *
Citocromo c oxidase	100	93±4	97±9	92±5 *	85±5 *	87±6 *
Succinato desidrogenase	100	100±9	97±5	103±3	96±9	95±6
Succinato citocromo c redutase	100	81±9*	81±6*	77±5*	74±6*	76±3*
Glutamato desidrogenase	100	97±2*	94± 2*	91± 2*	86± 2*	86± 2*

As condições experimentais estão descritas no item 4.5.2 da seção de Materiais e Métodos. 100% corresponde a atividade dos controles: **NADH oxidase** - 43,18 ± 5,82 nmol de oxigênio consumido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. **NADH desidrogenase** - 2,8 ± 0,3 µmol de ferricianeto reduzido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. **NADH citocromo c redutase** - 257 ± 27 nmol de citocromo c reduzido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. **Succinato oxidase** - 59 ± 6,20 nmol de oxigênio consumido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. **Succinato desidrogenase** - 374 nmol de DcPIP reduzido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. **Succinato citocromo c redutase** - 360 nmol de ferricitocromo c reduzido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. **Citocromo c oxidase** - 370 nmol de citocromo c oxidado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. **Glutamato desidrogenase** - 374 nmol de NADH oxidado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína. Cada valor representa a média ± dp de quatro experimentos independentes. * Valores estatisticamente diferentes do controle (p<0,05).

Oxidase demonstraram que o composto promoveu inibição do complexo enzimático, sendo tal efeito significativo a partir da concentração de $1,0 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, atingindo 18% com a concentração máxima de $1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína (tabela 3). Estes resultados são intrigantes no sentido de que a somatória das inibições causadas pelo SYD-1 (em torno de 40% para as concentrações de 1,0; 1,25 e $1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) nos diferentes segmentos avaliados separadamente, não reflete a inibição de 76% observada para a NADH oxidase que envolve, com exceção do complexo II (succinato desidrogenase), todos os demais complexos da cadeia respiratória. Outro fato que chama a atenção é o de que a diferença entre a inibição da NADH oxidase e a somatória dos segmentos NADH desidrogenase, NADH citocromo c redutase e citocromo c oxidase para as concentrações de 1,0; 1,25 e $1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína permanece no valor constante de 38% (tabela 3). Portanto, esta inibição reproduzível (de 38%) que não está representada nos segmentos, constitui, possivelmente, outra ação do SYD-1 que não ocorre ou que não pode ser determinada quando os complexos são avaliados separadamente. Portanto, os resultados dos efeitos do SYD-1, sobre os complexos enzimáticos que envolvem a oxidação do NADH, sugerem que a máxima efetividade do composto mesoiônico, no que concerne à inibição do transporte de elétrons, requer que os elétrons provenientes da oxidação da coenzima percorram todos os complexos da cadeia respiratória de forma seqüencial. A explicação para este fato não foi alcançada neste estudo e pode estar relacionada à provável liberação de NO da estrutura do SYD-1 e/ou a sua possível interferência nas metodologias utilizadas na determinação da atividade dos complexos I e III da cadeia respiratória.

Com relação ao segmento da Succinato oxidase, que abrange os complexos envolvidos no transporte de elétrons desde o succinato até o oxigênio, o SYD-1, em todas as concentrações utilizadas, também promoveu inibição no transporte de elétrons, como demonstrado na tabela 3. Neste caso a inibição de 53% ($1,25 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína mitocondrial) foi 11% maior do que a observada durante a oxidação do succinato em mitocôndrias intactas (42% de inibição do estado 3 - figura 15 A). Portanto, ao contrário do observado para a NADH oxidase, seria pertinente considerar que esta diferença seja decorrente do fato de que para o ensaio enzimático utilizam-se

mitocôndrias rompidas, facilitando o acesso do SYD-1 o que, conseqüentemente, resultaria na maior intensidade de seus efeitos. O que causa surpresa é a ausência de maior inibição para a oxidação do succinato no ensaio enzimático como observado para a NADH oxidase, admitindo-se que no último caso a maior inibição poderia ser justificada pela possível liberação de NO da estrutura do SYD-1 e pela maior intensidade de seus efeitos nestas preparações. Sendo assim, por que isto não estaria ocorrendo também durante a oxidação do succinato, uma vez que as duas metodologias utilizam mitocôndrias rompidas? Neste contexto, BORUTAITÉ & BROWN (1996), em estudos desenvolvidos em mitocôndrias isoladas de coração de rato e partículas submitocondriais, observaram que os efeitos do NO são mais pronunciados quando são utilizados substratos para o complexo I da cadeia respiratória, como o glutamato, em comparação ao succinato, substrato para o complexo II.

Com a finalidade de localizar os segmentos que sofreriam inibição durante o transporte de elétrons provenientes da oxidação do succinato, os efeitos do SYD-1 foram também determinados sobre os trechos: Succinato desidrogenase (Succinato: Fenazina Metassulfato Óxido-redutase) e Succinato citocromo c redutase (Succinato: Ferrocitocromo c Óxido-redutase). O SYD-1 não promoveu inibição do complexo Succinato desidrogenase, sugerindo que a inibição observada na Succinato oxidase não ocorre ao nível do complexo II (tabela 3). A enzima Succinato citocromo c redutase, que abrange os complexos II e III, sofreu inibição de 34% na sua atividade ($1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), a qual foi estatisticamente significativa a partir da menor concentração utilizada de $0,25 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína. Esta inibição de 34% sobre a Succinato citocromo c redutase, quando comparada aos 23% de inibição sobre a NADH citocromo c redutase promovida pelo SYD-1 na concentração de $1,25 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, sugere que o composto exerça um efeito de inibição sobre os centros Ferro-Enxofre constituintes do complexo II. Neste contexto, é sabido que o NO promove inibição dos centros Ferro-Enxofre (NATHAN, 1992) afetando a função mitocondrial, o que reforça a hipótese de que o NO seja liberado da estrutura do SYD-1. Ao contrário do observado para a NADH oxidase, para a Succinato oxidase a somatória

das inibições (em torno de 52%) de todos os complexos envolvidos no transporte de elétrons provenientes da oxidação do succinato (Succinato desidrogenase, Succinato citocromo c redutase e Citocromo c oxidase), para a maior concentração utilizada (1,5 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) foi a mesma daquela observada para todo o segmento (em torno de 53%).

Portanto, os resultados descritos permitem sugerir que dentre as possíveis causas da inibição, promovida pelo SYD-1, sobre a velocidade respiratória do estado 3, nomeadas anteriormente, duas são pertinentes: a) inibição de um ou mais complexos da cadeia respiratória e b) inibição das desidrogenases dos substratos.

O SYD-1 parece inibir o transporte de elétrons além do complexo I da cadeia respiratória, envolvendo os demais complexos. Observou-se também que a inibição da glutamato desidrogenase é responsável por 20% dos 65% correspondentes à inibição da velocidade respiratória do estado 3 durante a oxidação do glutamato, o que também é indicativo de que a inibição do transporte de elétrons durante o estado 3, em mitocôndrias intactas, é da mesma magnitude para os dois substratos (de 45% para o glutamato e 42% para o succinato). Desta forma, exclui-se também a ação direta do SYD-1 sobre os mecanismos de transporte dos substratos à matriz mitocondrial, que embora ocorram de diferentes formas - o transporte do glutamato depende da diferença de pH (ΔpH) através da membrana mitocondrial interna, enquanto que o do succinato depende de carreadores de dicarboxilatos -, não parece ser afetado pelo composto.

5.3 Efeitos do SYD-1 sobre o Complexo F_1F_0 ATPase

Como descrito anteriormente, os efeitos inibitórios do SYD-1 sobre a velocidade respiratória do estado 3 (figura 15 A), podem ser decorrentes da possível ação do composto sobre mecanismos relacionados à síntese de ATP, que poderia envolver desde a inibição direta da enzima responsável pela síntese do nucleotídeo, a ATP sintase, e/ou o translocador de nucleotídeos de adenina. Por sua vez, o efeito desacoplador do SYD-1 sugerido pelo estímulo do estado 4 da respiração (figura 15 B), poderia ser também evidenciado pela maior atividade ATPásica do complexo

enzimático F_1F_0 ATPase (ATPsintase). Desta forma, dando continuidade às investigações quanto às ações do SYD-1 sobre as funções ligadas à energia, foram determinados os efeitos do composto mesoiônico sobre o complexo F_1F_0 ATPase (ATP sintase). A ATP sintase mitocondrial, também chamada de complexo V, é uma ATPase do tipo F, que catalisa a formação e liberação de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico, bem como promove o fluxo de prótons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. Este complexo enzimático é formado por duas regiões distintas: o fator F_1 - solúvel, localizado na matriz - e o fator F_0 , hidrofóbico, que está inserido na membrana mitocondrial interna. O fator F_1 contém os sítios ativos para a reação entre ADP e P_i e é composto por cinco tipos de subunidades: 3α , 3β , 1γ , 1δ e 1ϵ . As três últimas estão envolvidas na interação entre F_1 e F_0 sendo os três sítios ativos formados por aminoácidos pertencentes as subunidades α e β . O fator F_0 constitui o canal para a passagem de prótons e é composto por três tipos de subunidades (a, b e c). O componente F_1 apresenta uma subunidade, OSCP, fundamental para a sensibilidade do complexo F_1F_0 à oligimocina, mais precisamente, a porção F_0 (TZAGOLOFF, 1982; NICHOLLS & FERGUSON, 2002). À medida que os prótons são bombeados para o espaço intermembranas, devido à transferência de elétrons através da cadeia respiratória, é gerada a força próton-motriz (Δp), a qual, por sua vez, promove o retorno destes prótons à matriz mitocondrial por meio do componente F_0 da ATP sintase. Desta forma, à medida que os prótons fluem através do componente F_0 ocorre a síntese e liberação de ATP em F_1 , de tal forma que os processos de transferência de elétrons com o bombeamento dos prótons e a fosforilação oxidativa são acoplados.

Os compostos chamados de desacopladores impedem a utilização da energia química derivada do transporte de elétrons para a síntese de ATP (HEYTLER, 1997; SKULACHEV, 1998). Os protonóforos, como é o caso do FCCP, impedem a fosforilação por promoverem a dissipação da força próton motriz. Neste caso, os prótons bombeados para o espaço intermembranas retornam à matriz mitocondrial, sem passar pelo canal F_0 da ATP sintase, etapa essencial para a fosforilação do ADP e liberação do ATP. Operacionalmente, isto se traduz no decréscimo do número de

moléculas de fosfato inorgânico convertidos para a forma ligada organicamente por átomo de oxigênio consumido, isto é, a razão P/O tende a zero na presença de substrato, enquanto a respiração continua (HEYTLER, 1997). Portanto, em presença de agentes desacopladores, o complexo enzimático atua de maneira contrária no sentido de hidrolisar o ATP, liberando ADP e Pi, promovendo a saída de prótons da matriz mitocondrial, na tentativa de restabelecer a força próton motriz. Embora a ATP sintase possa atuar no sentido de hidrólise do ATP, em condições celulares, o complexo enzimático catalisa a síntese do nucleotídeo, devido à contínua regeneração da força próton-motriz e ao uso de ATP pela célula (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Desta maneira, a atividade ATPásica é muito baixa em mitocôndrias acopladas e aumenta na presença de desacopladores como o FCCP.

Atuando de forma distinta, algumas drogas como a oligomicina, venturicidina e aurovertina, já algum tempo conhecidas como inibidoras da fosforilação oxidativa, podem causar inibição do complexo ATP sintase, impedindo a síntese de ATP (MORELAND, 1994; NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Tal efeito pode ser observado em concentrações extremamente baixas de algumas destas drogas, como evidenciado para a diciclohexilcarbodiimida (DCCD), que se liga especificamente à subunidade c pertencente ao fator F_0 da ATP sintase mitocondrial. Assim como a oligomicina, o DCCD bloqueia a entrada de prótons através da porção F_0 (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

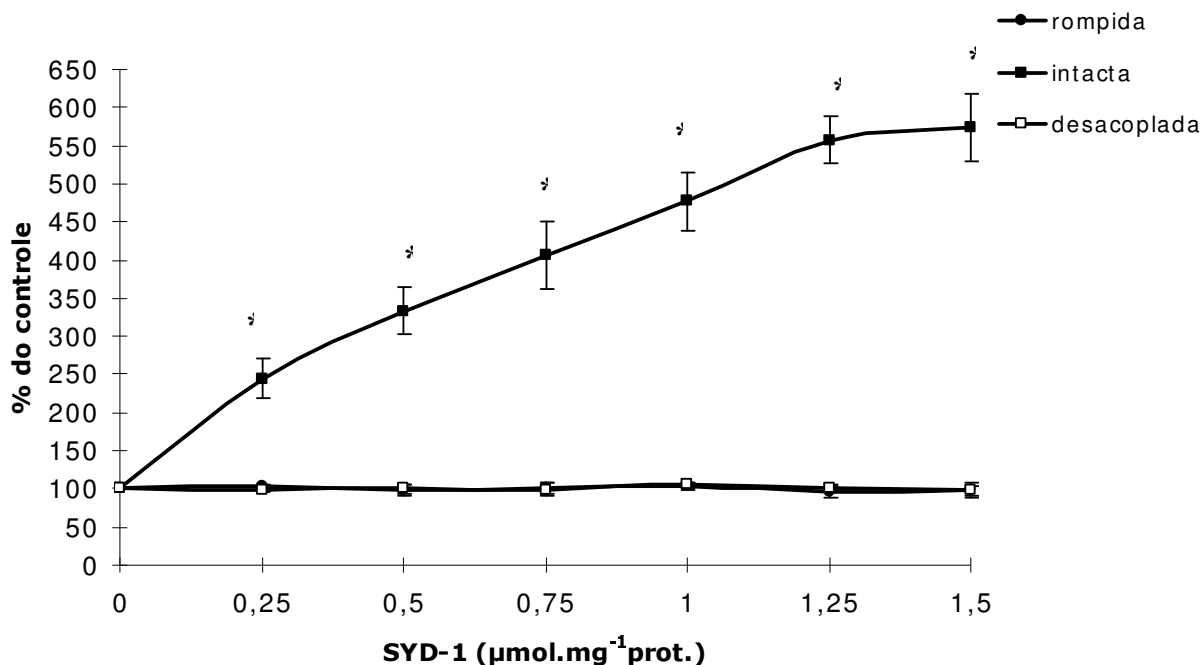
Com o objetivo de avaliar os efeitos do SYD-1 sobre o complexo F_1F_0 ATPase foram utilizados três tipos de preparações: mitocôndrias rompidas, mitocôndrias intactas e, ainda, mitocôndrias intactas desacopladas por FCCP. Na figura 18 verifica-se que o composto mesoiônico não exerceu efeito sobre o complexo F_1F_0 ATPase em mitocôndrias rompidas, não havendo, portanto, efeito direto do SYD-1 sobre o complexo enzimático. Desta maneira, pode-se descartar a possibilidade de que uma possível inibição da ATPsintase estaria envolvida na inibição observada para o estado 3 da respiração mitocondrial (figura 15 A).

Em preparações utilizando mitocôndrias intactas observa-se que o SYD-1 promoveu um estímulo bastante significativo na atividade ATPásica, desde as

concentrações mais baixas (figura 18). Com $0,25 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial, o estímulo verificado foi de 144%, atingindo 474% com a utilização da concentração máxima ($1,5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína). O aumento na atividade hidrolítica da ATPase promovida pelo SYD-1 é semelhante ao efeito provocado por desacopladores clássicos, como o FCCP, que estimulam o complexo F_1F_0 ATPase a hidrolisar ATP liberando ADP e P_i .

Sabe-se que o excesso ou a combinação simultânea de agentes desacopladores pode resultar em velocidades submáximas de alguns parâmetros mitocondriais, como é o caso da velocidade de hidrólise de ATP (KRAAYENHOLF & VAN DAM, 1969). Por este motivo, foram realizados ensaios para avaliar a interferência do composto SYD-1 em mitocôndrias desacopladas por FCCP. Como se pode observar na figura 18, o SYD-1 não exerceu qualquer efeito neste tipo de preparação, indicando a ausência de efeitos aditivos aos do FCCP. Destaca-se que os efeitos desacopladores do SYD-1 ocorrem em concentrações micromolares enquanto que o FCCP atua em concentrações nanomolares (HEYTLER & PRICHARD, 1962). Segundo HEYTLER (1997) a comparação da potência dos diferentes desacopladores é melhor visualizada quando se considera a concentração capaz de promover 50% deste efeito. Estas concentrações são mais convenientemente expressas como pI_{50} ($-\log$ de I_{50} , onde I_{50} é expressa em $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Para o SYD-1, o valor de pI_{50} variou entre 3,12 e 3,24 em função das condições experimentais. Estes valores são inferiores àqueles descritos para os desacopladores clássicos, como por exemplo, 5,1 para o DNP e 7,4 para o FCCP.

FIGURA 18. EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O COMPLEXO F_1F_0 ATPASE DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.



As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, no item 4.5.2.8.

Sistema de Reação: mitocôndrias rompidas – Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} , pH 8,4, sulfato de magnésio 3 mmol.L^{-1} , PEP $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, piruvatoquinase 10 unidades, ATP 4 mmol.L^{-1} e $100 \mu\text{g}$ de proteína mitocondrial. Mitocôndrias intactas – sacarose 50 mmol.L^{-1} , tris-HCl 12 mmol.L^{-1} , pH 7,4, KCl 50 mmol.L^{-1} e 3 mg de proteína mitocondrial.

(●) Mitocôndrias rompidas. 100% corresponde a $1091 \pm 10 \text{ nmol de Pi liberado .min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. (■) Mitocôndrias intactas. 100% corresponde a $31 \pm 2,5 \text{ nmol de Pi liberado.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. (□) Mitocôndrias intactas desacopladas por FCCP. 100% corresponde a $173 \pm 12 \text{ nmol de Pi liberado.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. Os dados representam a média \pm dp de quatro experimentos independentes.

* Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

5.4 Efeitos do SYD-1 sobre o Potencial Elétrico de Membrana ($\Delta\Psi$)

A transferência de elétrons através da cadeia respiratória induz a um fluxo de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, desequilibrando a concentração do íon entre os dois espaços. A energia eletroquímica, inerente à diferença na concentração de prótons e separação de cargas, constitui a chamada força próton-motriz (Δp), que apresenta dois componentes: a energia potencial química decorrente da diferença na concentração de prótons (ΔpH) através da membrana mitocondrial e a energia potencial elétrica ($\Delta\Psi$) resultante da separação de cargas entre as duas fases aquosas separadas pela membrana, sendo este último componente responsável por cerca de 90% da força próton-motriz (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Assim, a energia eletroquímica do gradiente de H^+ , principalmente o $\Delta\Psi$, direciona a síntese de ATP, a partir de ADP e fosfato inorgânico, através da ATP sintase (MORELAND, 1994; NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Desta forma, considerando que o composto mesoiônico SYD-1 promoveu acentuada redução na capacidade da mitocôndria em sintetizar ATP (figura 15 A) tornou-se necessário avaliar o efeito da droga sobre o $\Delta\Psi$.

Os efeitos do SYD-1 sobre o potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) foram avaliados em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, utilizando o corante safranina *O*, de acordo com AKERMAN & WIKSTROM (1976). O valor do potencial foi estimado a partir da distribuição de íons K^+ através da membrana mitocondrial interna na presença do ionóforo valinomicina. Em mitocôndrias não energizadas, a safranina, que possui carga positiva, distribui-se nos dois lados da membrana. Com a formação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$), este corante desloca-se do espaço intermembranas preferencialmente para a matriz mitocondrial, interagindo com sítios aniônicos, formando paliçadas. Este fenômeno pode ser acompanhado pela diminuição da fluorescência emitida pela safranina *O*, permitindo estabelecer uma relação linear entre o valor de $\Delta\Psi$, resultante da energização da membrana, e a variação da fluorescência, resultante da ligação das moléculas de safranina no interior da mitocôndria (ZANOTTI & AZZONE, 1980).

Foram utilizadas duas estratégias experimentais para determinar os efeitos do SYD-1 sobre $\Delta\Psi$: 1) incubação do composto mesoiônico com as preparações mitocondriais, antes da formação do potencial de membrana e 2) adição do SYD-1 às preparações mitocondriais após estabelecido o potencial de membrana.

Na primeira situação, o SYD-1 foi incubado por dois minutos em um sistema contendo meio de reação, mitocôndrias e safranina *O*. Decorrido o tempo de incubação, o potencial elétrico de membrana foi estabelecido pela adição de succinato de sódio como substrato oxidável. Os traçados da figura 19 são representativos dos efeitos do SYD-1 sobre o $\Delta\Psi$. Observa-se que o composto mesoiônico reduziu progressivamente a formação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) em mitocôndrias energizadas com succinato de sódio, em função da concentração de SYD-1. Com 0,5 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ proteína a redução foi de 14%, chegando a 48% com a utilização da dose máxima (1,5 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ proteína).

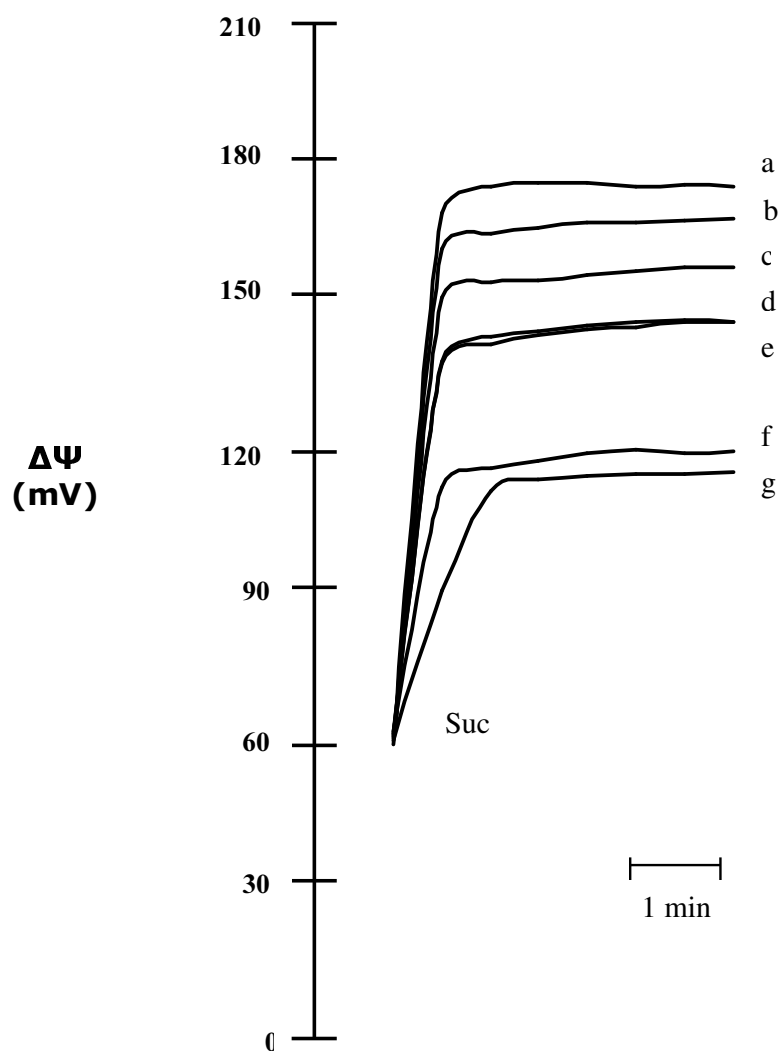
Os traçados da figura 20 são representativos dos efeitos do SYD-1 sobre mitocôndrias em que o potencial elétrico já havia sido formado através da adição de succinato de sódio, em presença de safranina *O*. No ensaio, acompanhado durante dois minutos após a adição de SYD-1 (tempo de incubação do experimento anterior), observa-se que nas doses mais baixas (0,25 e 0,5 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ proteína) o composto mesoiônico não exerceu efeito. Por outro lado, a concentração de 0,75 μmol de SYD-1. mg^{-1} de proteína promoveu o colapso do potencial após um minuto de incubação.

O colapso do $\Delta\Psi$ pode decorrer tanto de uma restrição no fluxo de elétrons, quanto de um efeito desacoplador (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Neste estudo foram utilizadas duas estratégias experimentais com a finalidade de avaliar estas possibilidades. Na primeira situação experimental, em que o SYD-1 foi incubado antes da formação do potencial, seu efeito inibidor sobre o transporte de elétrons na cadeia respiratória (figura 15A) é, provavelmente, mais pronunciado do que o seu efeito desacoplador. Isto parece ser verdadeiro, uma vez que a diminuição do $\Delta\Psi$ em 48% (1,5 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ proteína) é coincidente com os 42% de inibição sobre a velocidade respiratória do estado 3, durante a oxidação do succinato de sódio, observada para a mesma concentração do composto (figura 19). É importante ainda ressaltar que o

SYD-1 possui uma estrutura hidrofóbica, sendo assim, sua inserção e distribuição ao longo da membrana mitocondrial interna é possível. Desta forma, considerando que, antes da adição do substrato, as preparações mitocondriais ficaram dois minutos em contato com o SYD-1, talvez neste intervalo de tempo o composto tenha se alojado na membrana mitocondrial e/ou tenha, até mesmo, alcançado a matriz mitocondrial. Vale destacar, porém, que tanto a inibição do transporte de elétrons quanto o efeito desacoplador ocorrem na mesma faixa de concentração e o potencial não se forma pelas duas razões: restrição parcial do fluxo de elétrons e o ciclo fútil gerado pelo desacoplamento.

Por sua vez, na segunda situação experimental (figura 20), quando o SYD-1 foi adicionado após a formação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$), é possível considerar que o efeito desacoplador seja mais pronunciado, quando comparado à inibição do transporte de elétrons, em relação à situação anterior. Isto porque as possíveis alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, causadas pela adição do SYD-1, poderiam ser mais significativas do que as causadas na situação anterior, uma vez que o $\Delta\Psi$ já estava estabelecido.

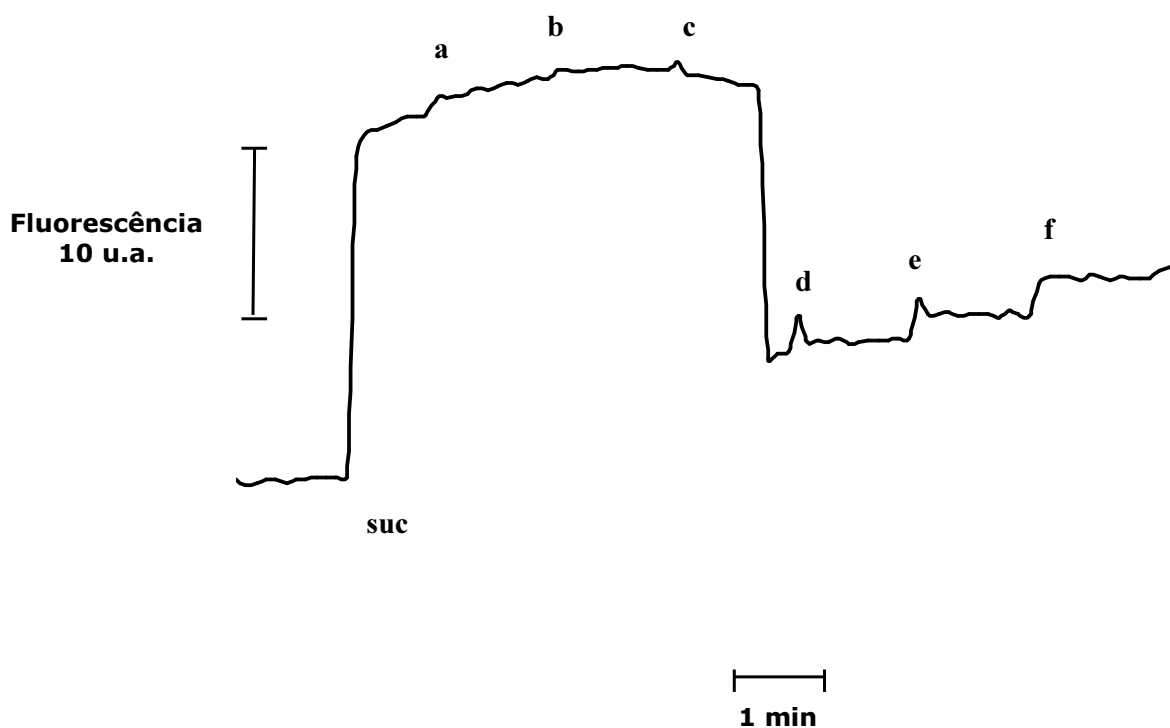
FIGURA 19. EFEITOS DO SYD-1 SOBRE A FORMAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\Psi$) DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO.



As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.5.4. Sistema de Reação: sacarose 250 mmol.L^{-1} , MOPS 20 mmol.L^{-1} , pH 7,2, NaH_2PO_4 1 mmol.L^{-1} , safranina *O* $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, succinato de sódio 2 mmol.L^{-1} , rotenona $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e 1 mg de proteína mitocondrial.

Concentrações de SYD-1 utilizadas: **a.** 0; **b.** 0,25; **c.** 0,5; **d.** 0,75; **e.** 1,0; **f.** 1,25; **g.** 1,5 $\mu\text{mol. mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

FIGURA 20. EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\Psi$) DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO.



As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.5.4. Sistema de Reação: sacarose 250 mmol.L⁻¹, MOPS 20 mmol.L⁻¹, pH 7,2, NaH₂PO₄ 1 mmol.L⁻¹, safranina O 5 μmol.L⁻¹, succinato de sódio 2 mmol.L⁻¹, rotenona 5 μmol.L⁻¹ e 1 mg de proteína mitocondrial.

Adições: **suc** - succinato de sódio; concentrações de SYD-1 **a.** 0,25; **b.** 0,5; **c.** 0,75; **d.** 1,0; **e.** 1,25 μmol.mg⁻¹ de proteína; **f.** FCCP 1 μM. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

Por outro lado, este fato não exclui os efeitos inibitórios do composto sobre o transporte de elétrons, mas sim, sugere que os dois efeitos somados são capazes de promover o colapso total do potencial de membrana, o que também não ocorreu na primeira situação experimental. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que apenas o efeito desacoplador, sugerido pelo estímulo do estado 4 em 43% para o succinato de sódio (figura 15 B), seria insuficiente para promover o colapso total do potencial de membrana, como observado para a concentração de $0,75 \mu\text{mol.mg}^{-1}$ proteína.

5.5 Efeitos do SYD-1 sobre o Inchamento Mitocondrial

Ensaio de inchamento (swelling) mitocondrial têm sido muito utilizados não apenas para a determinação de vias e mecanismos de transporte de íons através da membrana mitocondrial interna, como também para esclarecer a interação de diferentes compostos com a mesma. Para que ocorra o inchamento mitocondrial em meio iônico, tanto o cátion quanto o ânion do principal componente osmótico devem ser permeáveis à membrana interna, sendo que o balanço global das cargas através da membrana deve ser respeitado. O “swelling” somente é possível devido à elasticidade da membrana mitocondrial interna, que permite o desdobramento das cristas à medida que ocorre o aumento do volume da matriz, em geral sem que haja o rompimento da organela. (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

Em mitocôndrias energizadas pela oxidação de substratos, um potencial de membrana ($\Delta\Psi$) correspondente a 150 mV poderia, teoricamente, levar a um acúmulo de íons, como Na^+ e K^+ , resultando numa “explosão osmótica”. Na verdade, isto não ocorre porque existem mecanismos que se opõem a isto. As mitocôndrias possuem transportadores capazes de trocar K^+ ou Na^+ por H^+ , sendo a troca Na^+/H^+ muito mais ativa que a troca K^+/H^+ , o que se reflete na menor permeabilidade do K^+ em relação ao Na^+ (MITCHELL & MOYLE, 1969).

Na verdade, a permeabilidade extremamente pequena das membranas a íons é consequência da alta energia de ativação requerida para inserir uma espécie carregada numa região hidrofóbica. Portanto, para que um íon consiga atravessar a membrana

por outro meio que não por transportadores específicos, sua carga deve ser “protegida” durante seu trajeto através da membrana. Isto é conseguido, utilizando-se uma variedade de substâncias - incluindo alguns antibióticos sintetizados por microorganismos e outros compostos sintéticos - chamadas de ionóforos. Estes possuem grupamentos hidrofóbicos em seu exterior, que os tornam lipossolúveis, e grupos hidrofílicos em seu interior, onde se ligam os íons. Os ionóforos atuam como carreadores móveis ou formadores de canais que têm a capacidade de complexar cátions específicos, facilitando seu transporte (PRESSMAN et al., 1967; PRESSMAN, 1976; NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

As suspensões mitocondriais são turvas e capazes de dispersar luz, devido à diferença no índice de refração entre os conteúdos da matriz e do meio. O aumento no volume da matriz, devido à entrada de solutos permeáveis, resulta em decréscimo na dispersão da luz, uma vez que o índice de refração da matriz se aproxima do índice do meio (TZAGOLOFF, 1982; NICHOLLS & FERGUSON, 2002). A extensão do “swelling” mitocondrial pode ser acompanhada em espectrofotômetro, pela diminuição da absorbância. Esta técnica fornece informações sobre o funcionamento da cadeia respiratória, processos envolvidos na fosforilação oxidativa e também sobre a elasticidade e permeabilidade da membrana mitocondrial interna (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

Considerando que os resultados dos experimentos anteriores sugerem uma provável interação do SYD-1 com a membrana mitocondrial interna e, ainda, a efetividade da técnica de inchamento mitocondrial para evidenciar possíveis modificações na elasticidade e permeabilidade da membrana, decorrentes desta interação, foram realizados experimentos de swelling mitocondrial, utilizando-se mitocôndrias energizadas, por oxidação de substratos e mitocôndrias não energizadas.

5.5.1 Efeitos do SYD-1 sobre o Inchamento Dependente de Respiração de Mitocôndrias Energizadas

O grau de inchamento mitocondrial em presença de acetato de sódio foi determinado segundo MUSTAFA et al. (1966), utilizando como substratos oxidáveis glutamato e succinato de sódio, e foi verificada a influência do SYD-1 neste fenômeno. O potencial eletroquímico de prótons ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) gerado pelo transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória possibilita a entrada de cátions - neste caso o Na^+ - e também é responsável pela redistribuição de ácidos fracos, neste caso o ácido acético. Assim, a concentração do íon acetato nos espaços intra e extra mitocondrial depende da diferença de pH nos dois compartimentos, enquanto que a forma protonada por ser neutra, distribui-se igualmente nos dois espaços (KLINGENBERG & ROTTENBERG, 1977). Devido à forma protonada ser a permeante, o influxo de acetato é sempre acompanhado de um aumento na concentração de prótons no interior da mitocôndria. Desta forma, a presença de íons sódio e acetato na matriz mitocondrial levam a alterações osmóticas e ao conseqüente inchamento da organela (MUSTAFA et al., 1966). A reversão do “swelling” mitocondrial, em que se observa a contração da organela, pode ser alcançada utilizando-se inibidores da transferência de elétrons ou da F_1F_0 ATPase. Com a inibição da cadeia respiratória o inchamento mitocondrial é revertido, uma vez que este processo depende do funcionamento da cadeia.

Na figura 21, observa-se o efeito do composto SYD-1 sobre o inchamento de mitocôndrias energizadas com glutamato de sódio. As mitocôndrias, incubadas em meio contendo acetato de sódio, foram energizadas com o substrato e o inchamento da organela foi acompanhado pela redução na absorbância. A reversão do “swelling” e a conseqüente contração da organela foram evidenciadas pelo aumento da absorbância após a adição de rotenona, responsável pela inibição do complexo NADH desidrogenase (Complexo I). Verifica-se que tanto a amplitude quanto a velocidade do “swelling” foram reduzidos de forma significativa e dose-dependente pelo SYD-1, efeito observado já nas menores concentrações do composto. Com relação a amplitude, para a concentração de $0,25 \mu\text{mol de SYD-1. mg}^{-1}$ de proteína a inibição do

foi de 33%, chegando a 90% com a dose de $1,25 \mu\text{mol}$ de SYD-1. mg^{-1} de proteína. Chama atenção o fato de que a maior concentração do SYD-1 ($1,5 \mu\text{mol}.\text{mg}^{-1}$ de proteína) promoveu a completa inibição do inchamento. Os efeitos sobre a velocidade do “swelling” foram correspondentes aos observados para a amplitude, ocorrendo uma diminuição de 50% até 78% para as concentrações de $0,25 - 0,75 \mu\text{mol}.\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Ainda na figura 21, podemos observar que o SYD-1 também diminui a velocidade da contração da organela, induzida pela adição de rotenona. Esta diminuição pode ser determinada apenas para as concentrações de $0, 25$ e $0,5 \mu\text{mol}$ de SYD-1. mg^{-1} de proteína, uma vez que, como já mencionado, as maiores concentrações inibiram o “swelling” quase completamente.

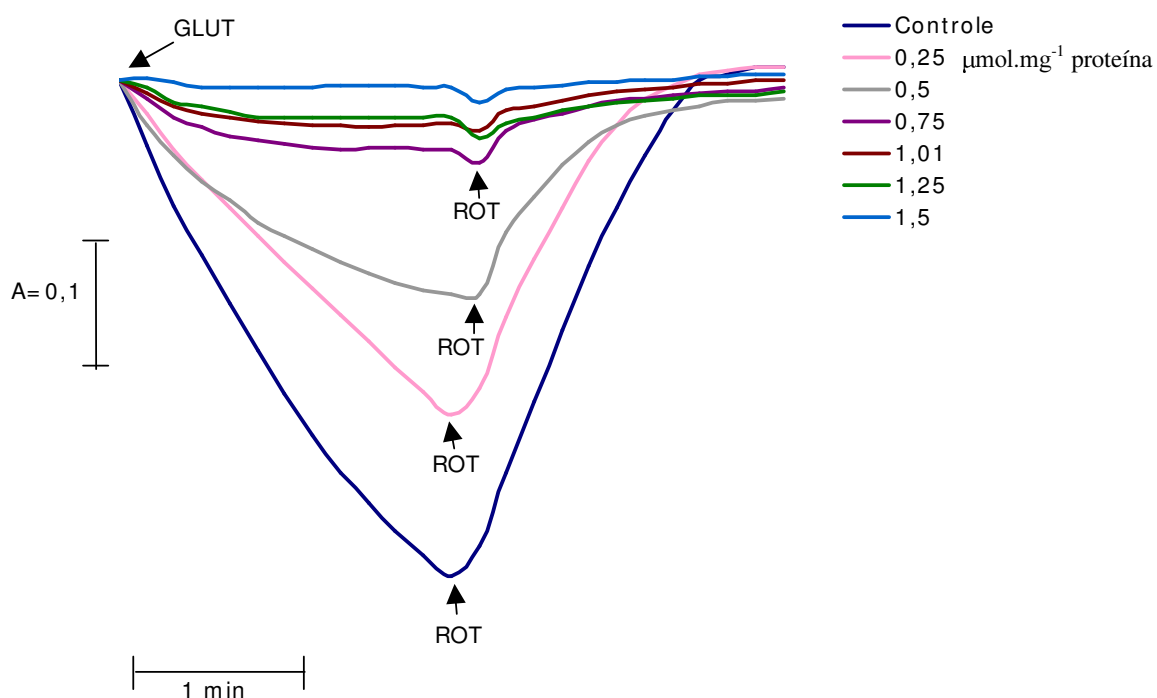
Na figura 22, estão representados os efeitos do composto mesoiônico sobre o inchamento em mitocôndrias energizadas com succinato de sódio, sendo utilizado o mesmo sistema de incubação, neste caso em presença de rotenona. Como observado para o glutamato de sódio, também neste caso o SYD-1 afetou, de forma dose-dependente, a amplitude e a velocidade do inchamento, embora seus efeitos tenham sido menos pronunciados com relação ao primeiro substrato. A concentração de SYD-1 ($0,5 \mu\text{mol}.\text{mg}^{-1}$ de proteína) promoveu uma redução no inchamento mitocondrial, chegando a 90% com a utilização da maior concentração do composto ($1,5 \mu\text{mol}.\text{mg}^{-1}$ de proteína). Neste experimento, a reversão do inchamento mitocondrial foi alcançada pela adição de antimicina A, um conhecido inibidor do complexo III da cadeia respiratória.

Com relação à contração da organela induzida pela adição de antimicina, pode-se observar na figura 22, que o SYD-1 também promove uma diminuição na velocidade, de forma dose-dependente, porém menos pronunciada do que a observada para o glutamato de sódio (figura 21). Neste caso, as inibições foram de aproximadamente 40 % para as concentrações de $0,5$ e $0,75 \mu\text{mol}.\text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente.

Estes resultados sugerem que o composto SYD-1 interfere na permeabilidade da membrana interna, por reduzir a velocidade e a amplitude do inchamento

mitocondrial, comprometendo ainda a velocidade de contração da organela. Considerando que a amplitude do “swelling” é determinada pelo potencial eletroquímico de prótons; que a velocidade do inchamento resulta da permeabilidade da membrana mitocondrial e que a velocidade da contração reflete a velocidade de redução do potencial eletroquímico, é possível concluir que estes resultados são compatíveis com os anteriormente descritos para o SYD-1, principalmente com relação à inibição da velocidade respiratória do estado 3, que estaria refletida na diminuição da amplitude do inchamento observada para os dois substratos. Por sua vez, um possível efeito desacoplador do SYD-1, relacionado a sua interação com a membrana mitocondrial, é sugerido pela diminuição na velocidade do inchamento e contração.

FIGURA 21. EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO, ENERGIZADAS COM GLUTAMATO, EM PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO.

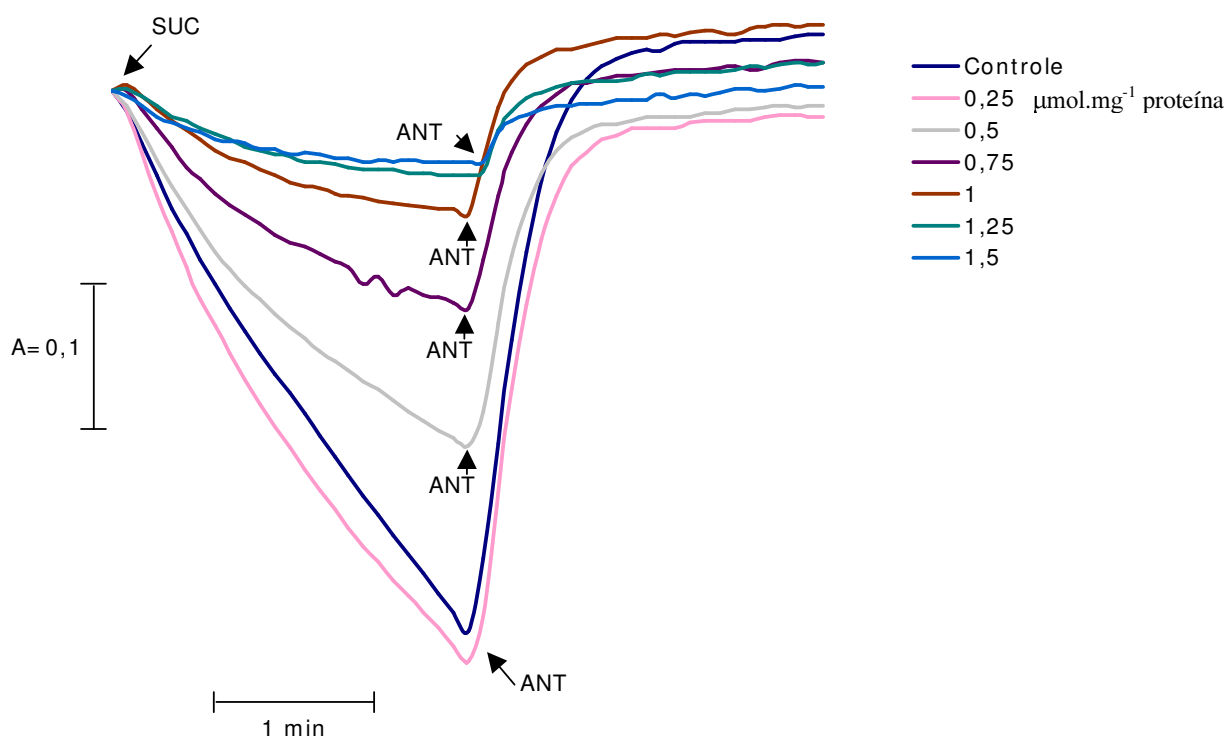


As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.5.5.1. Sistema de Reação: sacarose 100 mmol.L^{-1} , HEPES 30 mmol.L^{-1} , pH 7,5, EDTA $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} e 1 mg de proteína mitocondrial.

SYD-1 estava presente no sistema de incubação nas concentrações indicadas. As setas indicam as adições de **glutamato de sódio** 15 mM, para desencadear o inchamento, e **rotenona** $4 \mu\text{M}$, para promover a contração da organela. Controle - ausência de SYD-1.

Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

FIGURA 22. EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O INCHAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO, ENERGIZADAS COM SUCCINATO, EM PRESENÇA DE ACETATO DE SÓDIO.



As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.5.5.1. Sistema de Reação: sacarose 100 mmol.L^{-1} , HEPES 30 mmol.L^{-1} , pH 7,5, EDTA $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} e 1 mg de proteína mitocondrial.

SYD-1 estava presente no sistema de incubação nas concentrações indicadas. As setas indicam as adições de **succinato de sódio** 5 mM , para desencadear o inchaço, e **antimicina** $6 \mu\text{g}$, para promover a contração da organela. Controle - ausência de SYD-1.

Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

5.5.2 Efeitos do SYD-1 sobre o Inchamento de Mitocôndrias Desenergizadas

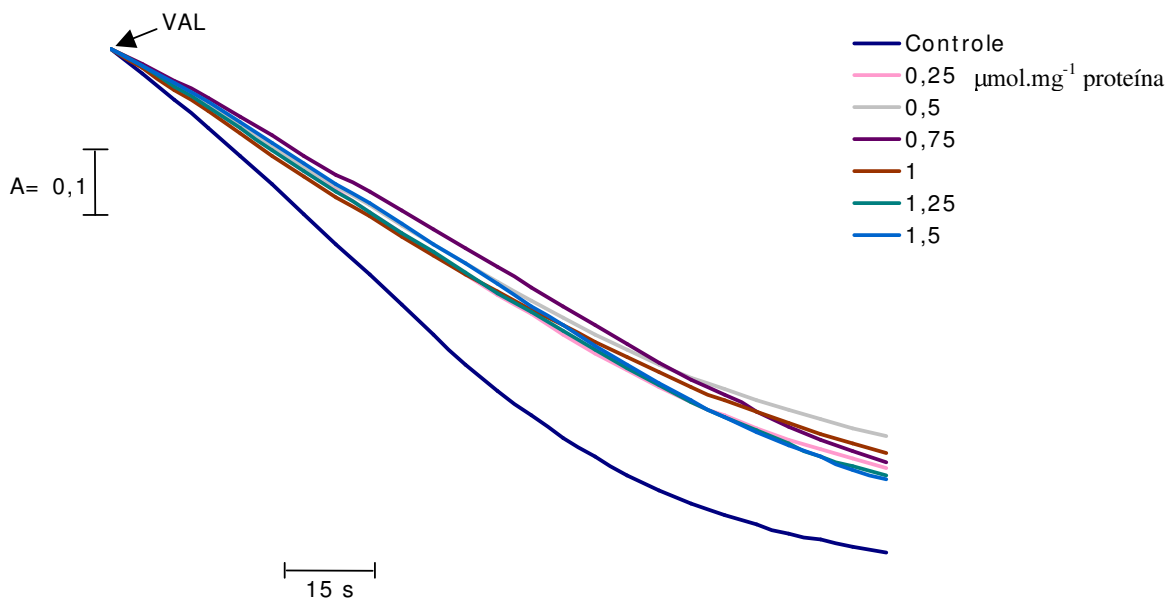
Mitocôndrias intactas, e na ausência de substrato oxidável, são pouco permeáveis ao K^+ . A valinomicina é um ionóforo capaz de aumentar esta permeabilidade. Caracterizada por sua estrutura hidrofóbica e ausência de grupos carregados, a valinomicina é capaz de promover a passagem de determinados cátions através de membranas fosfolipídicas sintéticas e membranas biológicas, uma vez que é capaz de atravessar estas barreiras (TZAGOLOFF, 1982). A porção interna deste peptídeo tem natureza polar, permitindo assim, a ligação de metais alcalinos como K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Na^+ , Li^+ e também NH_4^+ (TZAGOLOFF, 1982; NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Por não ser carregado, este ionóforo adquire a carga do íon complexado, sendo tanto a forma complexada quanto a não complexada capazes de atravessar membranas. Desta forma, a valinomicina é utilizada em mitocôndrias desenergizadas para que o K^+ tenha sua permeabilidade aumentada. Deve-se considerar, ainda, que a passagem da valinomicina depende diretamente da fluidez da membrana, sendo assim, drogas que afetem esta fluidez conseqüentemente interferem na passagem do ionóforo.

Para verificar se os resultados observados anteriormente para o SYD-1 seriam decorrentes de sua inserção ou interação com a membrana mitocondrial interna, foram realizados experimentos de inchamento mitocondrial utilizando mitocôndrias intactas desenergizadas, isto é, na ausência de substrato oxidável. Inibidores da cadeia respiratória, rotenona e antimicina A, foram utilizados para descartar qualquer possível interferência do potencial eletroquímico de prótons, caso houvesse algum substrato endógeno. Para promover o “swelling” mitocondrial, utilizou-se nitrato de potássio juntamente com o valinomicina, garantindo a entrada do cátion e ânion na matriz da organela.

A figura 23 demonstra que o SYD-1 promoveu uma inibição de aproximadamente 20% ($0,25 - 1,5 \mu\text{mol. mg}^{-1}$ de proteína) no inchamento de mitocôndrias desenergizadas, e que este efeito não é dependente da concentração utilizada. Uma vez que a velocidade e a amplitude deste intumescimento refletem a velocidade do transporte de K^+ , este resultado sugere que o composto mesoiônico

afeta a fluidez da membrana mitocondrial por interferir no trânsito da valinomicina e, conseqüentemente, na entrada de K^+ na matriz. Pode-se concluir também que os efeitos anteriormente observados para o SYD-1, sobre os demais parâmetros avaliados, estejam estreitamente relacionados a sua interação com a membrana mitocondrial interna.

FIGURA 23. EFEITOS DO SYD-1 SOBRE O INCHAMENTO INDUZIDO POR VALINOMICINA, NA PRESENÇA DE NITRATO DE POTÁSSIO, EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO DESENERGIZADAS.



As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 4.5.5.2. Sistema de Reação: KNO_3 135 mmol.L^{-1} , HEPES 5 mmol.L^{-1} , pH 7,4, EDTA 0,1 mmol.L^{-1} , rotenona 4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, antimicina A 2 μg , valinomicina 4 μg e 1 mg de proteína mitocondrial. SYD-1 estava presente no sistema de incubação nas concentrações indicadas. A seta indica a adição de valinomicina. Ensaio controle - ausência de SYD-1. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

6. DISCUSSÃO FINAL

Estudos visando determinar os efeitos de compostos mesoiônicos sobre o metabolismo energético mitocondrial foram realizados anteriormente por CADENA et al. (1998; 2002), utilizando o MI-D (cloreto de 4-fenil-5-(4-nitocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina), pertencente à classe dos 1,3,4- tiadiazóis mesoiônicos. Uma vez que os autores utilizaram o mesmo modelo experimental, torna-se interessante estabelecer uma comparação entre os efeitos promovidos pelo MI-D e SYD-1, na tentativa de melhor esclarecer a ação do SYD-1 sobre o metabolismo energético mitocondrial. O MI-D, assim como o SYD-1, foi capaz de inibir – porém, em menor magnitude - a velocidade respiratória do estado 3 e estimular – em maior magnitude - o estado 4 da respiração. Como consequência, os parâmetros CCR e ADP/O sofreram diminuição, sugerindo que o MI-D compromete a eficiência da fosforilação oxidativa, da mesma forma como observado para o SYD-1. Entretanto, os sítios de inibição na cadeia respiratória diferem para os dois compostos. CADENA et al. (1998) sugeriram que o alvo de inibição do MI-D estaria situado entre os complexos II e III, enquanto que neste estudo, os resultados apontam para os complexos III e IV como sendo os principais sítios de inibição do SYD-1, além disso, a sidnona inibe também a enzima glutamato desidrogenase. Embora o MI-D, da mesma forma que o SYD-1, tenha estimulado a atividade hidrolítica da ATPase somente em mitocôndrias intactas, também foi capaz de inibir o complexo enzimático em mitocôndrias desacopladas por FCCP, efeito não observado para o SYD-1. Este resultado é significativo pois indica que os dois compostos atuam de formas distintas. No caso do MI-D, a ação desacopladora parece prevalecer sobre a inibição do transporte de elétrons, já para o SYD-1 observa-se o contrário. Portanto, os resultados dos ensaios da ATPase, em mitocôndrias desacopladas, vêm de encontro a esta sugestão, uma vez que a combinação simultânea de agentes desacopladores – no caso o MI-D mais o FCCP - resulta em velocidades submáximas da hidrólise de ATP (KRAAYENHOF & VAN DAM, 1969). Os efeitos mais pronunciados do MI-D sobre o potencial de membrana ($\Delta\Psi$) (CADENA et al., 1998) também são indicativos da diferença do mecanismo de

ação para os dois compostos. CADENA et al. (2002) demonstraram também que o MI-D altera a fluidez e a elasticidade da membrana mitocondrial interna. Em ensaios de inchamento mitocondrial, em presença de acetato de sódio, o MI-D foi capaz de induzir o “swelling” mesmo na ausência de substrato oxidável, indicando o comprometimento das propriedades da membrana interna. Neste estudo, o SYD-1 utilizado em ensaios de inchamento realizados de acordo com a mesma metodologia, foi capaz de inibir totalmente o “swelling”, efeito estreitamente relacionado à acentuada inibição do estado 3, causada pelo composto mesoiônico.

A elasticidade da membrana mitocondrial interna, avaliada durante a contração da organela também foi muito mais afetada pelo MI-D do que pelo SYD-1. Por fim, a comparação dos resultados demonstrados por CADENA et al. (1998; 2002) para o MI-D, com os obtidos neste estudo para o SYD-1, sugere que embora os dois compostos exerçam ação antitumoral (GRYNBERG et al., 1997; 1992, respectivamente), os mecanismos de ação envolvidos nesta atividade, no que se refere à participação mitocondrial não são necessariamente os mesmos.

Com relação à diferença entre os efeitos promovidos pelo MI-D e SYD-1 sobre o metabolismo energético mitocondrial deve-se considerar que: a) os compostos possuem estrutura química distinta, pertencendo a diferentes classes, o MI-D à dos 1,3,4-tiadiazóis e o SYD-1 à classe das sidnonas; b) o MI-D não é sintetizado em sua forma mesoiônica e passa a apresentar tal forma a partir do pH 4,0, enquanto que o SYD-1 é sintetizado em sua forma mesoiônica; c) o MI-D exerce seus efeitos em diferente faixa de concentração (nmol .mg⁻¹ proteína mitocondrial); d) a liberação de NO a partir da estrutura do SYD-1 é possível o qual, por sua vez, poderia estar envolvido nos efeitos causados pelo composto. Com relação ao último item, seria interessante a realização de ensaios que pudessem esclarecer a provável liberação de NO pelo SYD-1, considerando os intrigantes efeitos do composto sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória e a comprovada liberação de NO para algumas classes de compostos mesoiônicos relacionados às sidnonas, como as sidnoniminas (MORO et al., 1998) e os oxatriazóis (KARUP et al., 1994). Ainda no sentido de esclarecer os efeitos do SYD-1 sobre o metabolismo energético mitocondrial, informações valiosas

seriam obtidas de experimentos de polarização de fluorescência. A realização destes experimentos se justificaria pela provável interação do SYD-1 com a membrana interna, como demonstrado nos experimentos de inchamento mitocondrial. Utilizando sondas fluorescentes de localização definida na membrana, em modelos de vesículas multilamelares sintéticas e membranas naturais, seria possível estabelecer qual região estaria sendo afetada pela presença do composto mesoiônico e quais seriam as conseqüências desta interação sobre a fluidez da membrana.

Sob outro enfoque, seria interessante também avaliar os efeitos do SYD-1 em nível celular, uma vez que o composto compromete as funções energéticas. Neste sentido, SENFF-RIBEIRO et al., 2004, estudaram a atividade antimelanoma de compostos mesoiônicos que diferiam em apenas um substituinte, comparando os resultados obtidos com antineoplásicos clássicos. Neste caso, o composto MI-D, cujos efeitos sobre o metabolismo energético já haviam sido descritos por CADENA et al. (1998, 2002), demonstrou-se o mais efetivo contra as células testadas, apresentando resultados bastante expressivos quanto à potência de seu efeito.

Por fim, embora a realização de experimentos futuros com o SYD-1 seja uma hipótese atrativa, os importantes resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o SYD-1 afeta de maneira significativa o metabolismo energético mitocondrial e ainda sugerir que os efeitos observados podem estar relacionados à ação antitumoral da sidnona, descrita por GRYNBERG et al., 1992.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o SYD-1:

- 1) Inibe o transporte de elétrons através da cadeia respiratória ao nível dos complexos III e IV;
- 2) Inibe a enzima glutamato desidrogenase;
- 3) Reduz a eficiência da fosforilação oxidativa;
- 4) Tem seus efeitos relacionados a sua possível interação com a membrana mitocondrial interna.

Portanto, o SYD-1 afeta de forma significativa o metabolismo mitocondrial, promovendo como efeito principal a inibição do transporte de elétrons e como efeito secundário o desacoplador. Tendo em vista a estrutura hidrofóbica do SYD-1, é possível sugerir também que tais efeitos são resultantes de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna causadas pelo composto mesoiônico.

REFERÊNCIAS

AKERMAN, K. E. O; WIKSTRÖM, M., F., K. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 191-197, 1976.

ANDERZHANOVA, E.; RAYEVSKY, K. S.; SARANSAARI, P.; RIITAMAA, E.; OJA, S. S. Effects of sydnocarb and D-amphetamine on the extracellular levels of amino acids in the rat caudate-putamen. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 428, p. 87-95, 2001.

ATHAYDE-FILHO, P. F.; MILLER, J.; SIMAS, A. M.; SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A.A. Synthesis, characterization and evaluation of the activity of ten mesoiônico compounds against microorganisms. **Acta Farm. Bonaer.**, La Plata, v. 18, n. 1, p. 17-22, 1999.

BADACHIKAR, S. V.; TIKARE, R. K.; PURANIK, G. S. Synthesis, reactions & biological activity of 3-[*p*-(N-methyl/ethyl-N-phenylcarbomoyl)] phenylsydones. **Indian J. Chem.**, New Delhi, v. 25B, p. 1079-1080, 1986.

BAKER, W.; OLLIS, W. D. Meso-ionic compounds. **Chem. Ind.**, Belgrade, v. 16, p. 910-911, 1955.

BARGER, S. W.; FISCUS, R. R.; RUTH, P.; HOFMANN, F.; MATTSON, M. P. Role of cyclic GMP in the regulation of neuronal calcium and survival by secreted forms of beta-amyloid precursor. **J. Neurochem.**, v. 64, p. 2087-2096, 1995.

BLOUGH, N. V.; ZAFIRIOU, O. C. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. **Inorg. Chem.**, v. 24, p. 3502-3504, 1985.

BORUTAITÉ, V.; BROWN, G. C. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by oxide nitric. **Biochem. J.**, London, v. 315, p. 295-299, 1996.

BROOKES, P.; WALKER, J. Formation and properties of sydnone imines, a new class of mesoionic compound, and some sydnones related to natural α - amino-acids. **J. Chem. Soc. (LOND)**, London, p. 4409-4416, 1957.

BROOKES, P. S.; KRAUS, D. W.; SHIVA, S.; DOELLER, J. E.; BARONE, M. C.; PATEL, R. P.; LANCASTER JR, J. R.; DARLEY-USMAR, V. Control of mitochondrial respiration by NO, effects of low oxygen and respiratory state. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 278, p. 31603-31609, 2003.

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

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

CADENA, S. M. S. C.; CARNIERI, E. G. S.; ECHEVARRIA, 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. S.; 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

CARDOSO, J. C.; CADENA, S. M. S. C.; ZAMPROIO, A.; ARRUDA, A. M. S.; CARNIERI, E. G. S.; ECHEVARRIA, A.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A.; OLIVEIRA, M. B. M. Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound, MI-D, on the acute inflammatory response. **Drug. Dev. Res.**, New York, 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.

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.

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.

DALEY, E.; WILKIE, D.; LOESCH, A.; HARGREAVES, I. P.; KENDALL, D. A.; PILKINGTON, G. J.; BATES, T. E. Chlorimipramine: A novel anticancer agent with a mitochondrial target. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, Orlando, *In Press*, 2005.

DEUCAUDIN, D.; GELEY, S.; HIRSCH, T.; CASTEDO, M.; MARCHETTI, P.; MACHO, A.; KOFLER, R.; KROEMER, G. Bcl-2 and Bcl-X_L antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 57, p. 62-67, 1997.

DUNKLEY, C. S.; THOMAN, C. J. Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone 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 derivatives. **J. Chem. Soc.**, London, p.899-900, 1935.

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

FEELISCH, M.; NOACK, E. On the mechanism of NO release from sidnonimines. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 14, S13-S22, 1989.

GLENNON, R. A.; GAINES, J. J.; ROGERS, M. E. Benz-fused mesoionic xanthine analogues as inhibitors of cyclic-AMP phosphodiesterase. **J. Med. Chem.**, Washington DC, 24, 766-769, 1981 a.

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 b.

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-sydones: 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.

HALESTRAP, A. P.; CLARKE, S. J.; JAVADOV, S. A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. **Cardiovasc. Res.**, Amsterdam, v. 61, p. 372-385, 2004.

HEYTLER, P. G. Uncouplers of oxidative phosphorylation. In: PACKER, L.; FLEISCHER, S. **Select methods in enzymology – Biomembranes**, San Diego: Academic Press, p. 613-623, 1997.

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

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.

KARUP, G.; PREIKSCHAT, H.; WILHELMSSEN, E. S.; PEDERSEN, S. B.; MARCINKIEWICZ, E.; CIESLIK, K.; GRYGLEWSKI, R. J. Mesoionic oxatriazole derivatives – a new group of NO- donors. **Pol. J. Pharmacol.**, Cracow, v. 46, n. 6, p. 541-552, 1994.

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.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. Cyclic Voltametry. **J. Chem. Edu.**, v. 60, n. 9, p. 702-706, 1983.

KLINGENBERG, M.; ROTTENBERG, H. Relation between the gradient of ATP/ADP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 73, p. 125-130, 1977.

KOIVISTO, A.; MATTHIAS, A.; BRONNIKOV, G.; NEDERGAARD, J. Kinetics of the inhibition of mitochondrial respiration by NO. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 417, p.75-80, 1997.

KRAAYENHOF, R.; VAN DAM, K. Interaction between uncouplers and substrates in rat liver mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 172, p. 189-197, 1969.

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

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

MAHMUD, T.; RAFI, S. S.; SCOTT, D. L.; WRIGGLESWORTH, J. M.; BJARNASON, I. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. **Arthritis Rheum.**, Hagerstown, v. 39, p. 1998-2003, 1996.

MAJID, P.A.; DEFEYTER, 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.

MASUDA, K.; IMASHIRO, Y.; KANEKO, T. Mesoionic compounds. I. Synthesis of 3-dialkylaminosydnonimines. **Chem. Pharm. Bull**, Tokyo, v. 18, p. 128-32, 1970.

MITCHELL, P.; MOYLE, T. Translocation of some anions, cations and acids in rat liver mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 9, p.149-155, 1969.

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.

MORELAND, D. E. Effects of toxicants on oxidative photophosphorylation. In: HODGSON, E; LEVI, P.E. **Introduction to biochemical toxicology**. Norwalk: Appleton and Lange, p. 345-366, 1994.

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

MORENO-SANCHEZ, R.; BRAVO, C.; VASQUEZ, C.; AYALA, G.; SILVEIRA, L. H.; MARTINEZ-LAVIN, M. Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells and hole heart. **Biochem. Pharmacol.**, Kidlington, v. 57, p. 753-752, 1999.

MORO, M. A.; FERNÁNDEZ-THOMÉ, P.; LEZA, J. C.; LORENZO, P.; LIZASOAIN, I. Neuronal death induced by SIN-1 in the presence of superoxide dismutase: protection by cyclic GMP. **Neuropharmacology.**, Kidlington, v. 37, p. 1071-1079, 1998.

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.

NATHAN, C. **FASEB J.**, Bethesda, v.6, p. 3051-3064, 1992.

NEWELL, K. J.; TANNOCK, I. F. Reduction of intracellular pH as a possible mechanism for killing cells in acidic regions of solid tumors: effects of carbonylcyanide-3-cholorophenylhydrazone. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 49, p. 4477-4482, 1989.

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, p.90-129, 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.

PARONE, P. A.; JAMES, D.; MARTINOU, J. C. **Biochimie**, Paris, v. 84, p. 105-111, 2002.

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. In _____ **Heterocycles in life and society**. Chichester : John Wiley & Sons, 1997. 301p.

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 45, p. 501-530, 1976.

PRESSAMN, B. C.; HARRIS, E. J.; JAGGER, W. S.; JONHSON, J. H. Antibiotic mediated transport of alkali ions across lipid barriers. **Biochemistry**, Washington DC, v. 58, p. 1949-1956, 1967.

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.

RAFF, M. C. Social controls on survival and cell death. **Nature**, London, v. 356, p. 397-400, 1992.

REGULA, K. M.; ENS, K.; KIRSHENBAUM, L. A. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, London, v. 35, p. 559-567, 2003.

REHSE, K.; KONIG, P. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, XII. Mesoionic oxatriazoles and related noncyclic nitrosohydrazine derivatives. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 328, p. 137-142, 1995.

ROSSI, E.; AZZONE, G. F. Ion transport in liver mitochondria. Energy barrier and stoichiometry of aerobic K^+ translocation. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 7, p. 418-426, 1969.

RUDOLPH, W.; DIRSCHINGER, J. Clinical comparison of nitrates and sydnonimines. **Eur. Heart. J.**, London, v.12 (suppl. E), p. 33-41, 1991.

SARTI, P.; GIUFFRE, A.; FORTE, E.; MASTRONICOLA, D.; BARONE, M. C.; BRUNORI, M. Nitric oxide and citocrome c oxidase: mechanism of inhibition and NO degradation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 274, p. 183-187, 2000.

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.

SENN-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Effects 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.

SENN-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**, Oxford, v.15, n.3, 2004 a.

SENN-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionico compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 91, p. 297-304, 2004 b.

SEPPALA, A. J.; WIKSTROM, M. K. F.; SARIS, N. E. L. Damping of mitochondrial volume oscillations by propranolol and related compounds. In: CHANCE, B.; PYE, E. K.; GHOSO, A. K.; HESS, B. **Biological and Biochemical oscillators**. New York: Academic Press, p. 115-124, 1973.

SIMPSON, J. C. E. 6-aminoacetoveratrone and Dimethoxy-3-methylantranil. **J. Chem. Soc.**, London, pt 1, p. 94-95, 1946.

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

SKULACHEV, V. P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 397, p. 7-10, 1996.

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-cytocrome *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, F. H. C. The chemistry of the sydnones. **Chem. Rev.**, Washingt, v. 64, p. 129-147, 1964.

STEWART, T. G.; KIER, L. B. Synthesis of mesoionic 1,3,4-thiadiazoles. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v. 54, n. 5, p. 731-734, 1965.

STRECKER, H. J. L-glutamic dehydrogenase from liver. **Meth. Enzymol.**, New York, v. 2, p. 220-221, 1955.

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

SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondrial as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1366, p. 151-165, 1998.

TZAGOLOFF, A. **Mitochondria**. New York: Plenum Press, 1982. 332p.

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. 353-88, 2000.

WANG, X.; ROBINSON, P. J. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. **J. Neurochem.**, v. 68, p. 443-456, 1997.

WEICKOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.423, p. 339-42, 1998.

WITKIN, J.M.; SAVTCHENKO, N.; MASHKOVSKY, M.; BEEKMAN, M.; MUNZAR, P.; GASIOR, M.; GOLDBERG, S. R.; UNGARD, J. T.; KIM, J.; SHIPPENBERG, T.; CHEFER, V. Behavioral, toxic, and neurochemical effects of sydnocarb, a novel psychomotor stimulant: comparisons with methamphetamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** Bethesda, v.288, n. 3, p. 1298-1310, 1999.

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. 1965.

ZANOTTI, A.; AZZONE, G. F. Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 201, n. 1, p. 255-265, 1980.

