



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019018495-3 A2



(22) Data do Depósito: 07/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/04/2020

(54) **Título:** DERIVADOS DE DESMETILANETOLA TRITONA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS COM A PRODUÇÃO MITOCONDRIAL DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO (ERO)

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/385; A61K 31/41; A61K 31/4184; A61K 31/423; A61K 31/428; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 07/03/2017 EP 17159691.9; 07/03/2017 US 62/467,874.

(71) **Depositante(es):** OP2 DRUGS; CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE BORDEAUX; INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE); UNIVERSITÉ DE BORDEAUX.

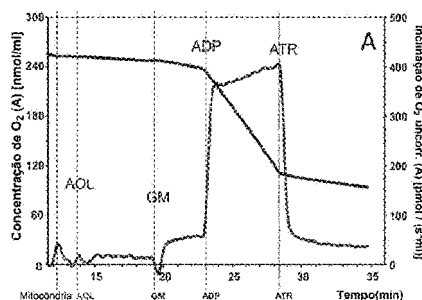
(72) **Inventor(es):** PHILIPPE DIOLEZ; FRÉDÉRIC MARIN; OLIVIER PETITJEAN.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2018055651 de 07/03/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/162581 de 13/09/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 05/09/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se à desmetilanelotol tritona (AOX) e seus derivados, especialmente derivados da fórmula (I), para a prevenção e tratamento de doenças cuja iniciação e/ou evolução está relacionada à produção e efeitos de espécies reativas de oxigênio (ERO) de origem mitocondrial.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: "DERIVADOS DE DESMETILANETOLA TRITIONA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS COM A PRODUÇÃO MITOCONDRIAL DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)"

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere à desmetilanelona tritona (AOX) e seus derivados, especialmente derivados da fórmula (I) conforme divulgado nas reivindicações, para a prevenção e tratamento de doenças cuja iniciação e/ou evolução se relaciona com a produção e os efeitos de espécies reativas de oxigênio (ERO) de origem mitocondrial.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A mitocôndria está no centro da agora amplamente reconhecida "teoria dos radicais livres do envelhecimento" e, portanto, envolvida na patogênese de quase todas as doenças associadas ao envelhecimento, incluindo doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas (doença de Parkinson, doença de Alzheimer e afins), câncer e diabetes, bem como disfunções teciduais de origem isquêmica. Essa teoria afirma que o acúmulo de danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) afeta inúmeras funções celulares, em particular funções mitocondriais, essenciais para o suprimento de energia e o ótimo funcionamento celular. As mitocôndrias aparecem assim como os principais alvos da ERO,

uma vez que o funcionamento celular ideal é crucial para fornecer a energia para uma célula se reparar.

[003] Curiosamente, as mitocôndrias são a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, portanto, são particularmente afetadas por danos oxidativos. Consequentemente, a autoprodução mitocondrial de ERO causa dano oxidativo que contribui para a disfunção mitocondrial e a morte celular.

[004] Vários antioxidantes foram testados em relação aos papéis fisiológicos e patológicos das ERO. A pesquisa de antioxidantes forneceu inúmeras moléculas naturais e projetadas que modulam as ERO com seletividade variada contra as diferentes origens das ERO, sendo fisiológicas (sinalização celular) ou patológicas. No entanto, embora as ERO tenham sido relacionadas a inúmeras doenças e os antioxidantes tenham mostrado promessas em muitos experimentos pré-clínicos, quase todos os ensaios clínicos de terapêuticas baseadas em antioxidantes mostraram eficácia limitada (Orr et al., **2013**. Free Radic. Biol. Med. 65: 1047-59).

[005] Além disso, vários estudos recentes também demonstraram que a redução excessiva de ERO nas células é prejudicial e parece que é necessário um equilíbrio adequado da produção de ERO para o funcionamento celular (Goodman et al., **2004**. J. Natl. Cancer Inst. **96 (23)**: 1743-50; Bjelakovic

et al., 2007. JAMA. 297 (8): 842-57). Como consequência, há um interesse crescente na inibição seletiva da produção de ERO pelas mitocôndrias que não afetaria a sinalização celular pela produção de ERO citosólica.

[006] Como o dano oxidativo mitocondrial contribui para uma ampla gama de doenças humanas, foram desenvolvidos antioxidantes projetados para serem acumulados por mitocôndrias *in vivo*. O mais extensivamente estudado desses antioxidantes direcionados às mitocôndrias é o MitoQ, que contém uma porção de quinona antioxidante ligada covalentemente a um cátion lipofílico de trifenilfosfônio. O MitoQ foi agora utilizado em vários estudos *in vivo* em ratos e camundongos e em dois ensaios em fase II em humanos. As condições de alta produção de ERO agora são mais bem caracterizadas. Parece que as ERO podem ser produzidas em vários sítios da cadeia respiratória nas mitocôndrias (Quinlan et al., 2013. Redox Biol. 1: 304-12). A produção máxima de superóxido/H₂O₂ ocorre sob condições de alta redução de carreadores de elétrons, principalmente quinonas, e altos valores de potencial da membrana mitocondrial. Paradoxalmente, essas condições são satisfeitas quando a fosforilação oxidativa mitocondrial é baixa (baixa contração muscular) ou sob condições de baixo oxigênio (hipóxia).

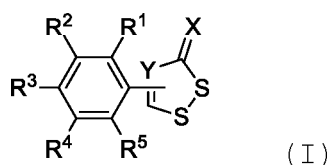
[007] O Requerente demonstra aqui que AOX (desmetilacetolactona) não atua como uma molécula

antioxidante inespecífica clássica, mas mais interessadamente como um inibidor seletivo direto da produção de radicais de oxigênio (ERO) predominantemente no sítio I₂ do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, o principal sítio mitocondrial de produção de ERO e o principal responsável por disfunções mitocondriais.

[008] Portanto, a presente invenção se refere a AOX e seus derivados de bioisósteros para tratar e/ou prevenir doenças relacionadas aos radicais livres de oxigênio.

SUMÁRIO

[009] A presente invenção se refere a um composto de fórmula (I)



ou um tautômero, sal ou solvato farmacologicamente aceitável do mesmo, em que X, Y, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos abaixo;

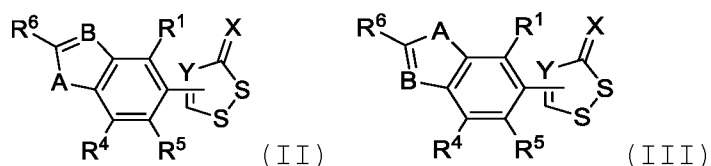
para uso como inibidor da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas aos radicais livres de oxigênio.

[010] Em uma modalidade, o composto para uso da invenção é selecionado a partir de 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditio-3-tiona; 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditio-3-ona; Oxima de 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditio-3-ona; 5-(4-hidroxifenil)-

3H-1,2,4-ditiazole-3-tiona; 4-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol-3-tiona; 5-(2-hidroxibenzo[d]oxazol-5-il)-3H-1,2-ditiol-3-tiona; 5-(2-hidroxibenzo[d]tiazol-6-il)-3H-1,2-ditiol-3-tiona; 5-(benzofuran-5-il)-3H-1,2-ditiol-3-tiona; e 5-(3-tioxo-3H-1,2-ditiol-5-il)-1H-indol-1-carboxilato de metila.

[011] Em uma modalidade, o composto para uso da invenção é 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol-3-tiona (AOX).

[012] Em uma modalidade, o composto para uso da invenção é um composto de fórmula (II) ou (III)



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que X, Y, R¹, R⁴, R⁵, R⁶, A e B são como definidos abaixo.

[013] Em uma modalidade, o composto da invenção inibe a produção mitocondrial de ERO. Em uma modalidade, o composto da invenção inibe a produção mitocondrial de ERO no sítio I₀ do complexo I de mitocôndrias.

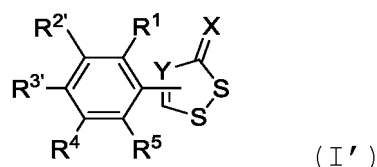
[014] Em uma modalidade, as doenças relacionadas aos radicais livres de oxigênio são selecionadas do grupo que compreende doenças cardiovasculares, doenças do envelhecimento, doenças autoimunes, síndromes progeróides, síndromes parkinsonianas, doenças neurológicas, lesões

isquêmicas e de reperfusão, doenças infecciosas, doenças musculares, pulmão, rim e doenças hepáticas.

[015] Em uma modalidade, as doenças cardiovasculares são selecionadas do grupo que compreende infarto do miocárdio, toxicidade cardíaca (incluindo toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas), hipertensão arterial pulmonar, insuficiência cardíaca, doenças cardiopulmonares, isquemia, ataque cardíaco, acidente vascular cerebral, trombose e embolia.

[016] Em uma modalidade, o composto da invenção é para prevenir metástases.

[017] A presente invenção também se refere a um composto de fórmula (I')



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que X, Y, R¹, R^{2'}, R^{3'}, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos abaixo.

[018] Em uma modalidade, o composto da invenção é de fórmula (IIa), (IIb), (IIIa) ou (IIIb) como definido abaixo,

ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[019] Em uma modalidade, o composto da invenção é de fórmula (IIa-1), (IIa-2), (IIIa-1) ou (IIIa-2) como definido abaixo, ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[020] Em uma modalidade, o composto da invenção é de fórmula (IIa-1a), (IIa-1b), (IIa-1c), (IIa-1d), (IIa-1e), (IIa-2a), (IIa-2b), (IIa-2c), (IIa-2d), (IIa-2e), (IIIa-1a), (IIIa-1b), (IIIa-1c), (IIIa-1d), (IIIa-1e), (IIIa-2a), (IIIa-2b), (IIIa-2c), (IIIa-2d) ou (IIIa-2e), conforme definido abaixo, ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[021] Em uma modalidade, o composto da invenção é da fórmula (IIb-1), (IIb-2), (IIb-3), (IIb-4), (IIb-5), (IIIb-1), (IIIb-2), (IIIb-3), (IIIb-4) ou (IIIb-5) como definido abaixo, ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo.

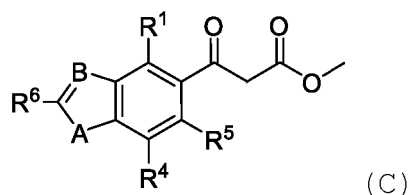
[022] A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo o composto da invenção, ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, e pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável.

[023] A presente invenção também se refere a um medicamento compreendendo o composto da invenção ou um

tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[024] A presente invenção também se refere a um processo para fabricar um composto de Fórmula (IIa-1), conforme definido abaixo, ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado por compreender:

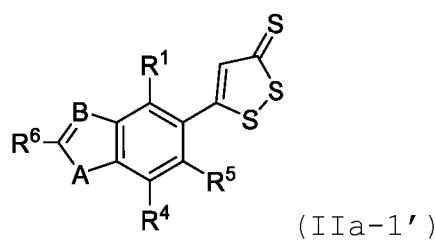
a) ciclizar um composto de fórmula (C)



em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos abaixo;

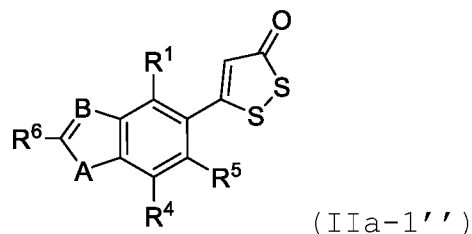
com um reagente à base de enxofre, na presença de um siloxano;

para obter um composto de fórmula (IIa-1')



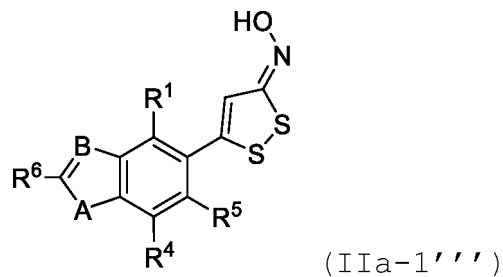
ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos abaixo;
e opcionalmente:

b1) o composto de fórmula (IIa-1') pode reagir com um oxidante; de preferência o oxidante é o acetato de mercúrio $\text{Hg}(\text{OAc})_2$; para obter um composto de fórmula (IIa-1'')



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos abaixo;

b2) o composto de fórmula (IIa-1') pode reagir com a hidroxilamina $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$; na presença de uma base; de preferência, a base é acetato de sódio (AcONa); para obter um composto de fórmula (IIa-1''')



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos abaixo.

DEFINIÇÕES

[025] Na presente invenção, os seguintes termos têm os seguintes significados:

[026] O termo "**cerca de**", precedendo uma figura, significa mais ou menos 10% do valor da referida figura.

[027] O termo "**alcoxi**", como aqui utilizado por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um grupo -O-alquil em que alquil é como aqui definido.

[028] O termo "**alquil**", conforme usados aqui por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um radical hidrocarbíl de fórmula C_nH_{2n+1} , em que n é um número maior ou igual a 1. Geralmente, os grupos alquil desta invenção compreendem de 1 a 8 átomos de carbono, preferencialmente de 1 a 6 átomos de carbono, mais preferencialmente de 1 a 4 átomos de carbono, mais preferencialmente de 1 a 3 átomos de carbono. Os grupos alquil podem ser lineares ou ramificados. Grupos alquil adequados incluem metil, etil, propil, butil, pentil, hexil, heptil e octil.

[029] O termo "**alquilamino**", como aqui utilizado por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um grupo -NH-alquil em que alquil é como aqui definido.

[030] O termo "**alquiloxicarbonil**", como aqui utilizado por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um grupo -C(=O)-O-alquil, em que alquil é como aqui definido. Um grupo alquiloxicarbonil preferido é metiloxicarbonil.

[031] O termo "**alquilsulfonil**", conforme usados aqui por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um grupo -SO₂-alquil em que alquil é como aqui definido.

[032] O termo "**amino**", conforme usados aqui, se refere a um grupo -NH_2 .

[033] O termo "**aminoalquil**", como aqui utilizado por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um grupo -alquil-NH_2 em que alquil é como aqui definido.

[034] O termo "**aminossulfonil**", conforme usados aqui por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um grupo $\text{-SO}_2\text{-NH}_2$.

[035] O termo "**aril**", conforme usados aqui por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um grupo hidrocarbil aromático poliinsaturado com um único anel (ou seja, fenil) ou vários anéis aromáticos fundidos (por exemplo, naftil), tipicamente contendo 5 a 12 átomos; preferencialmente 6 a 10. Exemplos não limitativos de aril compreendem fenil, naftalenil.

[036] O termo "**bioisósteros**", conforme usado neste documento, se refere a compostos ou grupos que possuem formas e volumes moleculares quase iguais, aproximadamente a mesma distribuição de elétrons, e que exibem propriedades físicas e atividades biológicas semelhantes.

[037] O termo "**carboxi**", conforme usados aqui, se refere a um grupo -COOH .

[038] O termo "**carboxialquil**", como aqui utilizado por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um grupo -alquil-COOH em que alquil é como aqui definido.

[039] O termo "**halo**" ou "halogênio" significa flúor, cloro, bromo ou iodo.

[040] O termo "**haloalquil**" em si ou como parte de outro substituinte, se refere a um radical alquil como aqui definido, em que um ou mais hidrogênios são substituídos por um halogênio como aqui definido. Exemplos não limitativos de haloalquil incluem fluorometil, difluorometil e trifluorometil.

[041] O termo "**heteroaril**", como aqui utilizado por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um grupo aril como aqui definido, em que pelo menos um átomo de carbono é substituído por um heteroátomo. Por outras palavras, se refere a 5 a 12 anéis simples aromáticos de átomos de carbono ou sistemas de anéis contendo 2 anéis que são fundidos, tipicamente contendo 5 a 6 átomos; em que um ou mais átomos de carbono são substituídos por átomos de oxigênio, nitrogênio e/ou enxofre, onde os heteroátomos de nitrogênio e enxofre podem opcionalmente ser oxidados e os heteroátomos de nitrogênio podem opcionalmente ser quaternizados. Exemplos não limitativos desse heteroaril incluem: oxazolil, tiazolil, imidazolil, furanil e pirrolil.

[042] Os termos "**IC₅₀**" ou "**meia concentração inibidora máxima**" representam a concentração de um inibidor necessário para 50% de inibição *in vitro*. É comparável a uma "**EC₅₀**" ou "**meia concentração efetiva máxima**" para medicamentos

agonistas. "**EC₅₀**" também representa a concentração plasmática necessária para obter 50% de um efeito máximo *in vivo*.

[043] O termo "**nitrooxialquil**", conforme usados aqui por si só ou como parte de outro substituinte, se refere a um grupo alquil-ONO₂ em que alquil é como aqui definido.

[044] A expressão "**excipiente farmacêuticamente aceitável**" se refere a um excipiente que não produz uma reação adversa, alérgica ou outra reação indesejável quando administrada a um animal, preferencialmente um ser humano. Inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores de absorção e similares. Para administração humana, as preparações devem atender aos padrões de esterilidade, pirogenicidade, segurança geral e pureza, conforme exigido pelos escritórios regulatórios, como, por exemplo, FDA Office ou EMA.

[045] O termo "**ERO**", como usados aqui, se refere a espécies reativas de oxigênio. ERO são espécies químicas quimicamente reativas que contêm oxigênio. Os exemplos incluem, entre outros, peróxidos ([O-O]²⁻ e R-O-O-R, como H₂O₂), superóxido (O₂·⁻), radical hidroxila (·OH) e oxigênio singlete (¹O₂). Nas células, as ERO são produzidas como um subproduto do metabolismo do oxigênio; no entanto, o estresse ambiental pode levar a um aumento da produção de ERO pelas células, denominada "estresse oxidativo", levando a danos

significativos nas estruturas celulares. Vários sítios distintos de produção de ERO foram identificados até o momento, entre os quais mitocôndrias (e em particular os sítios I_Q , I_F , III_{QO} , SDH e mGPDH da cadeia respiratória mitocondrial), microssomas (por exemplo, citocromo P450 e diamina oxidase), peroxissomos e algumas enzimas na membrana plasmática (por exemplo, NADPH oxidase e lipooxigenase). Dependendo da localização dentro da célula onde as ERO são liberadas e armazenadas, é possível distinguir ainda mais entre "ERO citosólica" e "ERO mitocondrial". Por exemplo, o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (sítios I_Q e I_F) e o sítio SDH do complexo mitocondrial II produzem e liberam ERO em direção ao lúmen mitocondrial, que é, portanto, considerado como "ERO mitocondrial"; enquanto o complexo III da cadeia respiratória mitocondrial (sítio III_{QO}) e do sítio mGPDH produz e libera ERO em direção ao citoplasma celular, que é considerado como "ERO citosólico".

[046] O termo "**sal**" dos compostos da invenção é usado aqui para descrever a adição de ácido e seus sais básicos. Sais de adição de ácido adequados são formados a partir de ácidos que formam sais não tóxicos. Exemplos não limitativos incluem acetato, trifluoroacetato, adipato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato/carbonato, bissulfato/sulfato, borato, tetrafluoroborato, camsilato, citrato, ciclamato, edisilato, esilato, formato, fumarato,

gluceptato, gluconato, gluconato, gluconato, glucato, hexafluorofosfato, hibenazato, cloridrato/cloreto, brometo/brometo, iodeto/iodeto, isionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, palmitato sais de fosfato de hidrogênio/fosfato de di-hidrogênio, piroglutamato, sacarato, estearato, succinato, tanato, tartarato, tosilato, trifluoroacetato e sais de xinofoato. Os sais de base adequados são formados a partir de bases que formam sais não tóxicos. Exemplos não limitativos incluem alumínio, arginina, benzetina, cálcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnésio, meglumina, olamina, potássio, sódio, trometamina, 2-(dietilamino) etanol, etanolamina, morfolina, 4-(Sais de 2-hidroxietil) morfolina e zinco. Hemisais de ácidos e bases também podem ser formados, por exemplo, sais de hemissulfato e hemicalcium. Os sais farmacologicamente aceitáveis preferidos incluem cloridrato/cloreto, bromidrato/brometo, bissulfato/sulfato, nitrato, citrato e acetato.

[047] O termo "**sítio I₀**", como aqui utilizado, se refere ao sítio de ligação à ubiquinona da NADH: ubiquinona oxidoreductase (também conhecida como complexo mitocondrial I). O sítio I₀ produz ERO que são liberadas dentro do lúmen mitocondrial.

[048] O termo "**sítio I_F**", como aqui utilizado, se refere ao sítio de ligação à flavina do complexo mitocondrial I. O sítio I_F produz ERO que são liberadas no interior do lúmen mitocondrial.

[049] O termo "**sítio III_{Qo}**", conforme usados aqui, se refere ao sítio de ligação à ubiquinona do complexo do citocromo *bc1* (também conhecido como complexo mitocondrial III). O sítio III_{Qo} produz ERO que são liberadas para o citoplasma celular.

[050] O termo "**sítio SDH**", como usado aqui, se refere a succinato desidrogenase (também conhecido como complexo mitocondrial II). O sítio SDH produz ERO que são liberadas dentro do lúmen mitocondrial.

[051] O termo "**sítio mGPDH**", como aqui utilizado, se refere à glicerol 3-fosfato desidrogenase. O sítio mGPDH produz ERO que são liberadas em direção ao citoplasma celular.

[052] O termo "**solvato**" é usado aqui para descrever um composto nesta invenção que contém quantidades estequiométricas ou sub estequiométricas de uma ou mais molécula de solvente farmacologicamente aceitável, como etanol ou água. O termo "hidrato" se refere a quando o referido solvente é água.

[053] O termo "**indivíduo**" se refere a um animal, incluindo um humano. No sentido da presente invenção, um

indivíduo pode ser um paciente, isto é, uma pessoa que recebe atenção médica, está passando ou foi submetido a um tratamento médico ou monitorado para o desenvolvimento de uma doença. Em uma modalidade, o indivíduo é um homem. Em outra modalidade, o indivíduo é uma mulher.

[054] O termo "**tautômero**" se refere a compostos orgânicos que são interconversíveis por uma reação química chamada tautomerização. A referida reação química envolve a migração de um átomo ou próton de hidrogênio, acompanhado por uma troca de uma ligação simples e ligação dupla adjacente.

[055] A expressão "**quantidade terapeuticamente eficaz**" significa nível ou quantidade de agente que visa, sem causar efeitos colaterais negativos ou adversos significativos ao alvo, (1) atrasar ou impedir o aparecimento de uma doença, distúrbio ou condição relacionada ao oxigênio livre radicais; (2) desacelerar ou interromper a progressão, agravamento ou deterioração de um ou mais sintomas da doença, distúrbio ou condição relacionada aos radicais livres de oxigênio; (3) promover melhorias dos sintomas da doença, distúrbio ou condição relacionada aos radicais livres de oxigênio; (4) reduzir a gravidade ou incidência da doença, distúrbio ou condição relacionada aos radicais livres de oxigênio; ou (5) curar a doença, distúrbio ou condição relacionada aos radicais livres de oxigênio. Uma quantidade

terapeuticamente eficaz pode ser administrada antes do início da doença, distúrbio ou condição relacionada aos radicais livres de oxigênio, para uma ação profilática ou preventiva. Alternativa ou adicionalmente, a quantidade terapêuticamente eficaz pode ser administrada após o início da doença, distúrbio ou condição relacionada aos radicais livres de oxigênio, para uma ação terapêutica.

[056] Os termos "**tratar**", "**tratamento**" ou "**alívio**" se referem ao tratamento terapêutico e a medidas profiláticas ou preventivas; em que o objetivo é prevenir ou desacelerar a condição patológica ou doença alvo. Os que precisam de tratamento incluem aqueles que já estão com a doença, bem como aqueles que têm a doença ou aqueles em quem a doença deve ser evitada. Um indivíduo ou mamífero é "tratado" com sucesso para uma doença ou afecção ou condição se, após receber o tratamento de acordo com a presente invenção, o indivíduo ou mamífero mostrar redução observável e/ou mensurável ou ausência de um ou mais dos seguintes itens: redução de produção de ERO; e/ou alívio, até certo ponto, para um ou mais dos sintomas associados à doença ou condição específica; redução da morbimortalidade e melhoria da qualidade de vida. Os parâmetros acima para avaliar o sucesso do tratamento e a melhoria da doença são facilmente mensuráveis por procedimentos de rotina familiares a um médico.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[057] Um objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas a radicais livres de oxigênio em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um inibidor da produção mitocondrial de espécies de oxigênio reativo (ERO).

[058] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ERO) para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas aos radicais livres de oxigênio, em que o referido inibidor inibe a produção mitocondrial de ERO.

[059] Em uma modalidade, o inibidor da invenção não afeta a produção fisiológica (citosólica) de ERO. Em uma modalidade, a produção fisiológica (citosólica) de ERO não é modulada em mais de 5% (aumento ou diminuição) na presença do inibidor da invenção. Em uma modalidade, a produção fisiológica (citosólica) de ERO não é modulada em mais de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 14%, 16%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% (aumento ou diminuição) na presença do inibidor da invenção.

[060] O termo "**não afeta**", conforme usado aqui, se refere a uma ausência de efeito do inibidor da invenção medido por

técnicas conhecidas pelo especialista na técnica para determinar o nível de produção de ERO.

[061] Em outra modalidade, o inibidor da invenção não é um inibidor da produção de ERO citosólica.

[062] Em uma modalidade, o inibidor da invenção não afeta a produção fisiológica (citosólica) de ERO em pelo menos um sítio selecionado de III_{QO} e mGPDH.

[063] Em uma modalidade, o inibidor da invenção não diminui a produção fisiológica (citosólica) de ERO de pelo menos um sítio selecionado de III_{QO} e mGPDH em mais de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14 %, 16%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% ou mais.

[064] Em uma modalidade preferida, o inibidor da invenção não diminui a produção fisiológica (citosólica) de ERO a partir do sítio III_{QO} do complexo III da cadeia respiratória mitocondrial.

[065] A produção de ERO citosólica é determinada pela diferença entre a produção total de ERO celular e a produção interna de ERO mitocondrial. Alternativamente, a produção de ERO citosólica pode ser determinada em um ensaio *in vitro* da produção de ERO de NAD(P)H oxidase.

[066] Em outra modalidade, o inibidor da invenção atua a montante da produção de ERO.

[067] Os testes para detectar a produção de ERO citosólica são bem conhecidos no estado da técnica e para os especialistas na técnica.

[068] Exemplos de tais testes incluem, mas não estão limitados a:

[069] (1) Medição da produção global de ERO celulares: Diacetato de 5-(e-6)-clorometil-2', 7'-diclorodihidrofluoresceína, éster acetílico (CM-H₂DCFDA) e/ou H₂DCFDA são indicadores de espécies reativas citosólicas de oxigênio (ERO) nas células. O CM-H₂DCFDA difunde-se passivamente nas células, onde seus grupos acetato são clivados por esterases intracelulares e seu grupo clorometil reativo a tiol reage com glutathiona intracelular e outros tiois. A oxidação subsequente produz um aduto fluorescente que fica preso dentro da célula, facilitando assim estudos de longo prazo (Zhang et al., 2008. J. Cardiovasc. Pharmacol. **51** (5): 443-9; Sarvazyan, 1996. Am. J. Physiol **271** (5 Pt 2): H2079-2085).

[070] (2) Medição da produção de ERO mitocondrial nas células:

Medir a ERO intracelular em células intactas e atribuir a origem às mitocôndrias é muito mais difícil. Nos últimos anos, a força motivadora de prótons crucial para a função mitocondrial foi explorada para direcionar uma variedade de compostos à matriz mitocondrial altamente negativa usando o cátion lipofílico trifenilfosfônio TPP + como um conjugado

de "entrega". Entre estes, o MitoSOX Red, também chamado de mito-hidroetidina ou mito-di-hidrohidroetidíio, é usado predominantemente na estimativa de ERO mitocondrial. A fração TPP + do MitoSOX permite o acúmulo múltiplo de hidroetidina sensível a ERO na matriz mitocondrial e a oxidação da hidroetidina por superóxido dá origem a um produto de oxidação fluorescente específico, o 2-hidroxietidíio (Zhao et al., 2005. Proc. Natl. Acad Sci. USA **102 (16)**: 5727-5732; Polster et al., 2014. Methods Enzymol. **547**: 225-250).

[071] Em uma modalidade, o inibidor da invenção é um inibidor seletivo da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ERO).

[072] Em uma modalidade, o inibidor da invenção é um inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO em pelo menos um sítio selecionado de I_Q , I_F e SDH.

[073] Em uma modalidade, um inibidor seletivo da produção mitocondrial de acordo com a presente invenção diminui a produção de ERO mitocondrial de pelo menos um sítio selecionado de I_Q , I_F e SDH em mais de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12 %, 14%, 16%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% ou mais, afetando a produção de ERO mitocondrial dos sítios remanescentes da produção de ERO em menos de 50 %, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 18%, 16%, 14%, 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou menos.

[074] Em uma modalidade, inibidores que são inibidores seletivos da produção de ERO mitocondrial a partir de um único sítio de produção de ERO mitocondrial diminuem a produção de ERO de um dos sítios de produção de I_Q , I_F ou SDH em mais de 18%, enquanto afetam a produção de ERO dos sítios restantes da produção de ERO em menos de 10%.

[075] Em uma modalidade preferida, o inibidor da invenção é um inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO no sítio I_Q e/ou I_F do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial.

[076] O complexo I da cadeia respiratória mitocondrial pode gerar ERO a partir de dois sítios distintos: o sítio de ligação à ubiquinona e o sítio mononucleotídeo da flavina.

Sítio de Ligação à Ubiquinona do Complexo I (I_Q):

[077] Para analisar especificamente a produção de ERO a partir do I_Q , o succinato 5 mM pode ser usado como substrato para fornecer elétrons à cadeia respiratória. A produção de ERO I_Q é excepcionalmente sensível a mudanças na força motriz de prótons (PMF) através da membrana interna mitocondrial ($PMF = \Delta\Psi_m + \Delta pH$). Portanto, um limiar conservador para o ensaio $\Delta\Psi_m$ ao avaliar a seletividade dos acertos no ensaio ERO I_Q pode ser utilizado.

[078] O vazamento de elétrons do sítio I_Q é mais bem caracterizado durante o transporte reverso de um Q-pool reduzido para a matriz NAD^+ via CI na presença de um PMF

forte. Experimentalmente, as condições que favorecem a produção de ERO I_Q são consideradas muito distantes da fisiologia, levando muitos a descartar sua relevância, apesar de sua capacidade de altas taxas. No entanto, mesmo quando fornecidas com concentrações mais baixas de glutamato (para alimentar elétrons para a frente através do IC) e succinato (para alimentar elétrons ao contrário), as mitocôndrias respiratórias ainda produzem níveis significativos de ERO sensível à rotenona (ou seja, ERO I_Q). Além disso, análises comparativas mostram uma relação inversa entre a produção máxima de ERO do sítio I_Q (mas não o sítio I_F) e a vida útil máxima em diversas espécies de vertebrados (Lambert et al., 2007. Aging Cell. **6** (5): 607-18; Lambert et al., 2010. Aging Cell. **9** (1): 78-91). Portanto, moduladores seletivos de I_Q ERO ofereceriam oportunidades únicas para investigar o papel putativo da produção de ERO mitocondrial em processos normais e patológicos.

Sítio de Ligação à Flavina do Complexo I (I_F):

[079] Para analisar especificamente a produção de ERO a partir de I_F , a solução de substrato para fornecer elétrons à cadeia respiratória pode compreender glutamato 5 mM, malato 5 mM e rotenona 4 μ M. O sítio I_F produz ERO a uma taxa proporcional ao estado de redução do pool de NADH na matriz mitocondrial (Treberg et al., 2011. J. Biol. Chem. **286** (36):

31361-72). O bloqueio do I_Q do sítio com o pesticida rotenona pode aumentar a produção de ERO a partir do sítio I_F , impedindo a oxidação da flavina. A produção máxima de ERO a partir do sítio de ligação à flavina do complexo I (sítio I_F) é relativamente baixa em comparação aos sítios I_Q e III_Q e isso pode levar a uma maior variabilidade neste ensaio e subsequentemente a uma maior taxa de falsos positivos na tela original.

[080] A inibição da atividade do complexo I pela rotenona e pela neurotoxina MPP^+ tem sido associada ao parkinsonismo em roedores e seres humanos, sugerindo uma ligação entre o complexo I disfuncional, a produção de ERO e a neurodegeneração. Os compostos que são capazes de inibir a produção de ERO do complexo I podem, portanto, ser úteis na terapia.

[081] Em outra modalidade, o inibidor ou inibidor seletivo da invenção é um inibidor seletivo da produção mitocondrial da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no sítio I_Q do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial.

[082] O termo "**inibidor seletivo**", conforme usado neste documento, pode se referir a um composto capaz de inibir a produção de ERO no sítio I_Q do complexo I, além de ter efeitos mínimos na produção de ERO a partir dos sítios restantes e no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e fosforilação

oxidativa. Por exemplo, nas mitocôndrias isoladas, na presença de rotenona (ou seja, quando a produção de ERO no sítio I_0 é inibida) e antimicina A (ou seja, quando a ERO é produzida principalmente pelo complexo III), a IC_{50} do composto na inibição da ERO a produção é cerca de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 vezes maior do que na ausência de rotenona.

[083] Em uma modalidade, o termo "**inibidor seletivo**", conforme usados aqui, também pode se referir, exclusiva ou inclusivamente com qualquer uma das definições aqui fornecidas, a um composto capaz de inibir a produção de ERO mitocondrial no sítio I_0 do complexo I com um IC_{50} variando de cerca de 0,1 μM a cerca de 20 μM , preferencialmente cerca de 10 μM . Em uma modalidade, o termo "**inibidor seletivo**", conforme usados aqui, também pode se referir, exclusiva ou inclusivamente com qualquer uma das definições aqui apresentadas, a um composto capaz de inibir a produção de ERO mitocondrial no sítio I_0 do complexo I com um IC_{50} de cerca de 0,1 , 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 15,5, 16,0, 16,5, 17,0, 17,5, 18,0, 18,5, 19,0, 19,5, 20 μM . Em outra modalidade, o referido composto não inibe significativamente a produção de ERO citosólica em um ensaio *in vitro* da produção de EOS NAD(P)H oxidase.

[084] O termo "**inibidor seletivo**", conforme usados aqui, também pode se referir, exclusiva ou inclusivamente com qualquer uma das definições aqui fornecidas, a um composto capaz de inibir a produção de ERO no sítio I_Q do complexo I, enquanto tem efeitos mínimos na produção de ERO a partir dos demais sítios e no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e fosforilação oxidativa. Por exemplo, em mitocôndrias isoladas, na presença de rotenona (ou seja, quando a produção de ERO no sítio I_Q é inibida), o IC_{50} do composto na inibição da produção de ERO é de cerca de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 vezes maior ou mais do que na presença de antimicina A (isto é, adicionada após a rotenona, portanto, quando as ERO são produzidas principalmente pelo complexo III).

[085] Os testes para detectar especificamente as ERO produzidas no sítio I_Q do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em mitocôndrias isoladas de vários tecidos são bem conhecidos do especialista.

[086] Ensaaios de alto rendimento para a identificação de inibidores da produção de ERO em sítios definidos em mitocôndrias isoladas sem também alterar a produção de energia também são descritos. Os ensaios identificam moduladores específicos do sítio da produção de ERO, além de revelar efetores menos específicos, como antioxidantes de ação ampla e vários inibidores da bioenergética mitocondrial. Por conseguinte, inibidores que discriminam

entre vazamentos indesejados de elétrons no oxigênio (produção de ERO) em sítios específicos dentro da cadeia de transporte de elétrons sem alterar os fluxos normais de elétrons e prótons acoplados à energia através da membrana mitocondrial interna podem ser identificados. Os ensaios adaptam os ensaios padrão baseados em fluorescência da produção de ERO mitocondrial usando o corante Amplex UltraRed (Invitrogen) e $\Delta\Psi_m$ usando o corante potenciométrico TMRM (Invitrogen) a um formato de microplaca de alto rendimento. É fornecido um conjunto principal de cinco ensaios ERO e um $\Delta\Psi_m$ para detecção robusta de modulação funcional em mitocôndrias de músculo esquelético isoladas recentemente. Cinco sítios principais de produção de ERO (sítio I_Q , I_F , III_Q , SDH e mGPDH) podem ser alvos separadamente, variando os substratos e inibidores adicionados a uma mistura de ensaio comum. Uma contra-tela para monitorar $\Delta\Psi_m$ pode ser executada em paralelo para eliminar compostos que são provavelmente inibidores gerais ou desacopladores da produção normal de energia mitocondrial.

[087] Em outra modalidade, os inibidores são testados a 2,5 μM em duplicado contra todos os ensaios. A fluorescência do ponto final é normalizada para DMSO e as cavidades de controle do inibidor mitocondrial conhecidos incluídos em cada placa. Os resultados positivos em cada ensaio ERO podem ser inicialmente filtrados aplicando um limiar de

preferência 15% ou mais preferencialmente 18% ou ainda mais preferencialmente 20% ou mais redução nesse ensaio. Cada ensaio ERO pode ser empregado como uma contra-tela contra os outros, enquanto também elimina compostos que alteraram Δm na contra-tela baseada em TMRM. Portanto, os hits filtrados podem ser subsequentemente avaliados para eliminar aqueles que alteraram os outros ensaios ERO em mais de, por exemplo, 20% ou 18% ou 15% ou $\Delta\Psi m$ em mais de, preferencialmente 10% ou mais preferencialmente 5% ou ainda mais preferencialmente 4%.

[088] Em outra modalidade, o inibidor da invenção não afeta a fosforilação oxidativa significativa diretamente nas mitocôndrias, preferencialmente a fosforilação oxidativa é modulada em menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5%.

[089] As doenças relacionadas aos radicais livres de oxigênio estão relacionadas a desequilíbrios do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Em particular, doenças relacionadas a disfunções mitocondriais são induzidas pela produção de ERO mitocondrial.

[090] As doenças relacionadas aos radicais livres de oxigênio incluem, entre outras, doenças cardiovasculares, doenças do envelhecimento, doenças autoimunes, síndromes progeroides, síndromes parkinsonianas, doenças neurológicas, lesões isquêmicas e de reperfusão, doenças infecciosas, doenças musculares, doenças pulmonares, renais e hepáticas.

[091] As doenças cardiovasculares relacionadas a radicais livres de oxigênio incluem, entre outras, hipertensão, toxicidade cardíaca (incluindo toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de medicamentos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e toxicidade cardíaca de medicamentos antivirais), insuficiência cardíaca independentemente de origem, isquemia, infarto do miocárdio, ataque cardíaco, acidente vascular cerebral, aterosclerose, fibrilação cardíaca, hipertensão, trombose e embolia, condições alérgicas/inflamatórias como asma brônquica, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, diabetes tipo II, diabetes mellitus e surdez (DAD, também conhecida como síndrome de Ballinger-Wallace), doenças inflamatórias, febre reumática, hipertensão arterial pulmonar, cardiomiopatias sindrômicas (como a síndrome de Barth, síndrome de Costello, ataxia de Friedreich, síndrome de LEOPARD, síndromes de Noonan, síndrome cardiofaciocutânea, cardioencefalomopatia e síndrome de Alstrom), respostas imunes inatas e doenças cardiopulmonares, como doenças crônicas doença pulmonar obstrutiva, embolia pulmonar, pericardite, coarctação de aorta, tetralogia de Fallot, estenose aórtica, estenose mitral, regurgitação aórtica, regurgitação mitral, pneumoconiose, bronquiectasia, cardiomiopatias e/ou tolerância endotelial à nitroglicerina.

[092] As doenças do envelhecimento relacionadas aos radicais livres de oxigênio incluem, entre outras, degeneração macular relacionada à idade (DMRI), envelhecimento da pele, danos UV à pele, afinamento, flacidez, rugas, aparência de manchas na idade, vasos sanguíneos e áreas quebrados de secura, queratose seborreica, queratoses solares, Síndrome de Kindler, doença de Bowen, câncer de pele, artrite, espondilite anquilosante, poliartropatias inflamatórias, artrite de joelho, poliartrite epidêmica, artrite psoriática, catarata, surdez, câncer, metástase, prevenção de processos de metástase, doenças de fígado, transplante, neoplasias e toxicidade de agentes antineoplásicos ou imunossupressores e produtos químicos, osteoporose, poiquilodermia, acrogeria, poiquiloderma esclerosante hereditário, disqueratose congênita, xeroderma pigmentoso, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, síndrome de Cockayne e doenças induzidas por poluição.

[093] As doenças autoimunes relacionadas aos radicais livres de oxigênio incluem, entre outras, esclerose múltipla, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes mellitus tipo I, doença de Crohn; miastenia grave, doença de Grave, esclerodermia, síndrome de Sjogren, colite ulcerosa, cirrose biliar primária, hepatite auto-imune, tireoidite de Hashimoto, espondilite anquilosante, psoríase.

[094] A doença autoimune pode ser uma doença autoimune relacionada a doenças do sangue, como anemia hemolítica autoimune, anemia perniciosa e trombocitopenia autoimune.

[095] A doença autoimune também pode ser arterite temporal, síndrome antifosfolípide, vasculites como a granulomatose de Wegener e doença de Behcet.

[096] Outras doenças autoimunes incluem polimiosite, dermatomiosite, espondiloartropatias, como espondilite anquilosante, síndrome antifosfolipídica e polimiocisite.

[097] As síndromes progeroides relacionadas aos radicais livres de oxigênio incluem, mas não se limitam a, progeria, síndrome de Bloom, síndrome de Cockayne, síndrome de De Bary, disqueratose congênita, dermatia restritiva, síndrome de Rothmund-Thomson, tricotiodistrofia, síndrome de Werner, síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch e xeroderma pigmentoso.

[098] As síndromes parkinsonianas relacionadas aos radicais livres de oxigênio incluem, mas não se limitam a, doença de Parkinson (DP), paralisia supranuclear progressiva, atrofia de múltiplos sistemas, degeneração corticobasal ou demência do corpo de Lewy, parkinsonismo induzido por toxinas e uma variante precoce de DP como como um parkinsonismo autossômico recessivo ligado ao PARK6 ou um parkinsonismo autossômico recessivo ligado ao PINK1.

[099] As doenças neurológicas relacionadas aos radicais livres de oxigênio incluem, entre outras, demência, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e envelhecimento, doença de Huntington, ataxia de Friedreich, doença de Wilson, síndrome de Leigh, síndrome de Kearns - Sayre, neuropatia ótica hereditária de Leber, distúrbios cognitivos, transtornos do humor, distúrbios do movimento, discinesia tardia, lesão cerebral, apoptose, demência, epilepsia, demência epilética, demência pré-senil, demência pós-traumática, demência senil, demência vascular, demência associada ao HIV-1, demência pós-AVC, esquizofrenia, síndrome de Down , doença dos neurônios motores, amiloidose, amiloide associado ao diabetes tipo II, doença de Creutzfeldt-Jakob, morte celular necrótica, síndrome de Gerstmann-Straussler, kuru e scrapie animal, amilóide associado à hemodiálise a longo prazo, amilóide cardíaco senil e polineuropatia amiloidótica familiar, cerebropatia distúrbios neurossuccnicos, perda de memória, intoxicação por alumínio, reduzindo o nível de ferro nas células da indivíduos vivos, reduzindo os níveis de íons metálicos de transição livre em mamíferos, pacientes com quantidades tóxicas de metal no corpo ou em certos compartimentos do corpo, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, acinetopsia, demência relacionada ao álcool, tauopatia relacionada à idade primária, afasia anômica, anosognosia,

apraxia, apraxia da fala, agnosia verbal auditiva, demência frontotemporal, degeneração lobar frontotemporal, afasia progressiva logopênica, emaranhado neurofibrilar, fonagnosia, doença de Pick, afasia primária progressiva, afasia não fluente progressiva, demência semântica, síndrome da demência esteroide, disgnosia visual e espacial, efeitos secundários de aminoglicosídeos e toxicidade da cocaína.

[100] Lesões isquêmicas e de reperfusão relacionadas a radicais livres de oxigênio incluem, mas não estão limitadas a, acidente vascular cerebral, isquemia cerebral, síndrome do derrame cerebral, endarterectomia carotídea, síndrome do derrame cerebelar, acromatopsia cerebral, hemorragia cerebral, infarto cerebral, trombose do seio venoso cerebral, hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia intracraniana, acidente vascular cerebral lacunar, síndrome medular lateral, síndrome pontina lateral, infarto parcial da circulação anterior, infarto da circulação posterior, acidente vascular cerebral silencioso, acidente vascular cerebral Associação, cinto de acidente vascular cerebral, recuperação de acidente vascular cerebral, ataque isquêmico transitório, acidente vascular cerebral, síndrome de Weber, obesidade, preservação de órgãos para lesão de transplante, isquemia e reperfusão.

[101] As doenças infecciosas relacionadas aos radicais livres de oxigênio incluem, entre outras, hepatite C, sepse, miopatias infecciosas e choque séptico.

[102] As doenças musculares relacionadas aos radicais livres de oxigênio incluem, entre outras, miopatias, miopatias mitocondriais, distrofia muscular facio-escápulo-umeral, distrofia muscular facio-escápulo-umeral tipo 1, distrofia muscular facio-escápulo-umeral tipo 1, distrofia muscular facio-escápulo-umeral tipo 2, miopatia relacionada ao Receptor Ryan Ryan 1 (RYR1) 1, selenoproteína 1 (selenoproteína 1) miopatia relacionada à síndrome de Kearns - Sayre, cardiomiopatias, distúrbio do movimento, atrofia muscular induzida pela imobilização, lesão por queimadura muscular esquelética e contratura de Dupuytren.

[103] As doenças pulmonares, renais e hepáticas relacionadas a radicais livres de oxigênio incluem, entre outras, fibrose cística, asma, doenças induzidas por poluição, doenças cardiopulmonares, hipertensão arterial pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica, embolia pulmonar, pneumoconiose, bronquiectasia, asma brônquica, disfunção do diafragma induzida por ventilador, câncer de pulmão, doença hepática gordurosa por álcool, doença hepática gordurosa, diabetes, preservação renal ex vivo, inflamação hepática na hepatite C, lesão renal na diabetes tipo I e cirrose.

[104] Em uma modalidade, as doenças a serem tratadas em particular na presente invenção são degeneração macular relacionada à idade, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, lesão isquêmica e de reperfusão, hipertensão arterial pulmonar, esclerodermia, aterosclerose, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, artrite, toxicidade pulmonar, doenças cardiopulmonares, doenças inflamatórias, câncer, metástase, toxicidade cardíaca (incluindo toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e toxicidade cardíaca de fármacos antivirais), insuficiência cardíaca independentemente da origem, isquemia, ataque do coração, acidente vascular cerebral, trombose e embolia, asma, condições alérgicas/inflamatórias, asma brônquica, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, doença de Huntington, distúrbios cognitivos, progeria, síndromes progeroides, demência epiléptica, demência pré-senil, demência pós-traumática, demência senil, vascular demência, demência associada ao HIV-1, demência pós-AVC a, síndrome de Down, doença dos neurônios motores, amiloidose, amiloide associada ao diabetes tipo 11, doença de Creutzfeldt-Jakob, morte celular necrótica, síndrome de Gerstmann-Straussler, scrapie de kuru e animal, amiloide associado a hemodiálise a longo prazo, amiloide cardíaco senil e familiar Polineuropatia amiloidótica, cerebropatia,

distúrbios neurosuccínicos, perda de memória, intoxicação por alumínio, reduzindo o nível de ferro nas células de indivíduos vivos, reduzindo os níveis de íons metálicos de transição livre em mamíferos, pacientes com quantidades tóxicas de metal no corpo ou em certos compartimentos corporais, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, catarata, diabetes, câncer, doenças hepáticas, envelhecimento da pele, transplante, efeitos secundários ototóxicos de aminoglicosídeos, neoplasias e toxicidade de agentes e produtos químicos antineoplásicos ou imunossupressores, respostas imunes inatas e Ataxia de Friedreich.

[105] Em uma modalidade, as doenças a serem tratadas em particular na presente invenção são doenças cardiovasculares relacionadas a radicais de oxigênio livres selecionadas do grupo que compreende infarto do miocárdio, toxicidade cardíaca (incluindo toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, de preferência toxicidade cardíaca de antraciclinas), hipertensão arterial pulmonar, insuficiência cardíaca, doenças cardiopulmonares, isquemia, ataque cardíaco, acidente vascular cerebral, trombose e embolia.

[106] Em uma modalidade, as doenças a serem tratadas em particular na presente invenção são doenças do

envelhecimento, DMRI, envelhecimento da pele, doenças cardiovasculares como, por exemplo, toxicidade cardíaca de antraciclinas, progeria e síndromes progeróides, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, Ataxia de Friedreich, isquemia reperfusão, doenças cardiopulmonares, asma, câncer, metástase e/ou doenças induzidas por poluição.

[107] Em uma modalidade, uma doença a ser particularmente evitada e/ou tratada na presente invenção é toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas. Um mecanismo responsável pela toxicidade das antraciclinas se refere à produção de ERO e a danos no DNA específicos do sítio. A indução do estresse oxidativo desempenha realmente um papel na toxicidade cardíaca das antraciclinas ao induzir danos no DNA, danos nos sarcômeros, disfunção mitocondrial e perda de sinalização pró-sobrevivência, mediando tanto a morte quanto a sobrevivência dos cardiomiócitos (Valcovici et al., 2016. Arch. Med. Sci **12 (2)**: 428-435).

[108] Em uma modalidade, uma doença a ser particularmente evitada e/ou tratada na presente invenção é a hipertensão pulmonar. De fato, o efeito deletério dos agentes que promovem a geração de ERO na vasculatura pulmonar tem sido demonstrado e, inversamente, o efeito benéfico dos agentes antioxidantes em modelos animais de hipertensão pulmonar. A produção de ERO tem sido diretamente ligada ao

remodelamento vascular pulmonar, disfunção endotelial, respostas vasoconstritivas alteradas, inflamação e modificações da matriz extracelular, todas características importantes da fisiopatologia da hipertensão pulmonar (Freund-Michel et al., **2013**. Ther. Adv. Respir. Dis. **7** (3): 175-200).

[109] Em uma modalidade, uma doença a ser particularmente evitada e/ou tratada na presente invenção é lesão isquêmica e de reperfusão. De fato, o excesso de produção de ERO é um fator crítico na gênese da lesão por reperfusão (Granger et al., 2015. Redox Biol. 6: 524-51).

[110] Em uma modalidade, uma doença a ser particularmente evitada e/ou tratada na presente invenção é a diabetes. De fato, a hiperglicemia crônica e o subsequente aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) deterioram a função celular e aumentam a resistência à insulina, o que leva ao agravamento do diabetes tipo 2 (Kaneto et al. **2010**. Mediators Inflamm., **2010**: 453892), mas também de outros tipos de diabetes, como MODY (diabetes de início da maturidade dos jovens).

[111] Em uma modalidade, uma doença a ser particularmente evitada e/ou tratada na presente invenção é a doença de Parkinson. De fato, a disfunção mitocondrial e o dano oxidativo, que resultam no aumento da produção de ERO, são condições frequentemente encontradas em áreas

cerebrais danificadas da doença de Parkinson (Muñoz et al., **2016**. Parkinsons Dis. **2016**: 7049108).

[112] Em uma modalidade, uma doença a ser particularmente evitada e/ou tratada na presente invenção é a degeneração macular. De fato, a produção e acumulação excessivas de ERO juntamente com o estresse oxidativo, em particular nas células do epitélio pigmentar da retina, desempenham um papel na patogênese da degeneração macular. Os níveis de ERO aumentam na retina envelhecida, levando ao estresse oxidativo e resultam em danos aos fotorreceptores, células epitélio pigmentares da retina e coriocapilares no processo de apoptose (Nita et al., **2016**. Oxid. Med. Cell. Longev. **2016**: 3164734).

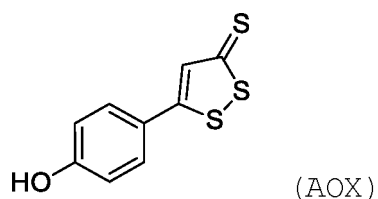
[113] Em uma modalidade, uma doença a ser particularmente evitada e/ou tratada na presente invenção é a esclerodermia. De fato, a NADPH oxidase, uma importante fonte de ERO, mostrou-se regulada positivamente nos fibroblastos de esclerodermia, resultando em grandes acúmulos de ERO, que por sua vez desempenham um papel crítico na ativação celular e no dano ao DNA (Spadoni et al., **2015**). Rheumatol **67 (6)**: 1611-22).

[114] Em uma modalidade, uma doença a ser particularmente evitada e/ou tratada na presente invenção é a metástase. De fato, a produção de ERO está envolvida em mecanismos de crescimento e metástase de tumores: a migração,

invasão, clonogenicidade, tomada metastática e metástase espontânea são promovidas pela seleção natural de um fenótipo mitocondrial associado à produção de ERO e à atividade aberrante do ciclo de TCA, um mecanismo denominado “interruptor mitocondrial metastático” (Porporato et al., 2014. Cell Reports. **8 (3)**: 754-766). A hiperprodução de ERO também promove a angiogênese e os inibidores recíprocos da produção de ERO são produtos antiangiogênicos.

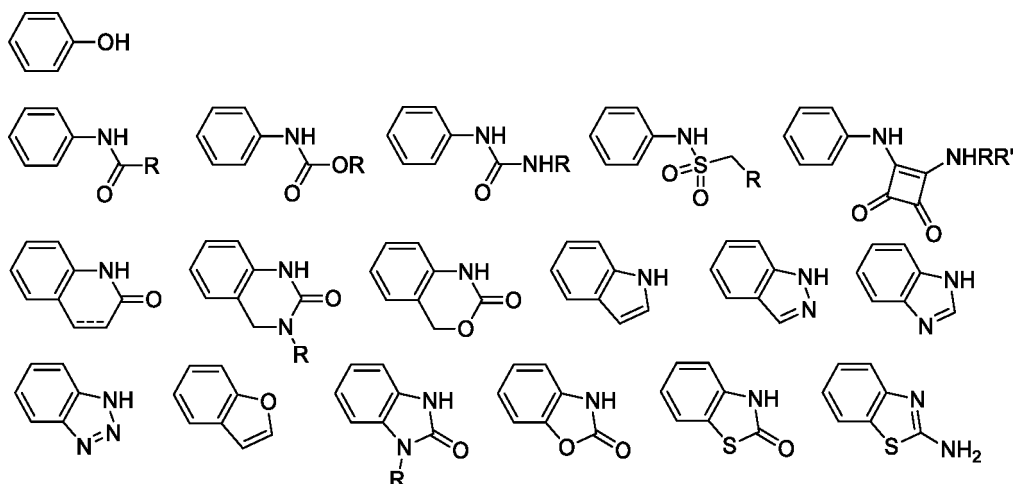
[115] De acordo com uma modalidade, o inibidor ou inibidor seletivo da invenção é AOX ou um derivado do mesmo.

[116] AOX corresponde ao desmetilanotola tritiona, também chamado 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditio1-3-tiona:

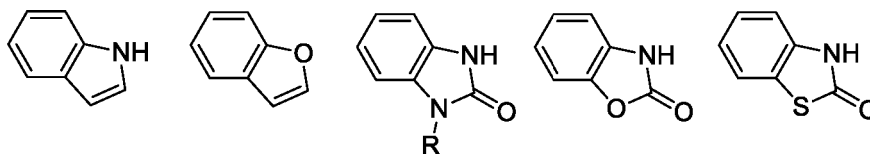


[117] De acordo com uma modalidade, os derivados de AOX são seus bioisósteros, preferencialmente bioisósteros de fenol.

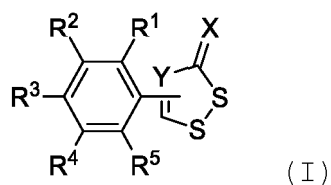
[118] Em uma modalidade, os bioisósteros de fenol são, por exemplo, os seguintes grupos, tautômeros e seus derivados opcionalmente substituídos:



[119] Em uma modalidade específica, os bioisósteros fenólicos preferidos da invenção são aqueles abaixo, tautômeros e seus derivados opcionalmente substituídos:



[120] De acordo com uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são, portanto, compostos de fórmula (I)



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

X representa S, O ou NHOH; de preferência **X** é S ou O; mais preferencialmente, **X** é S;

Y representa CH, C ou N; de preferência **Y** é CH ou N; mais preferencialmente **Y** é CH;

R^1 , R^2 , R^4 e R^5 representam cada um independentemente hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil;

R^3 é hidroxí; ou R^3 e R^2 , juntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam uma fração heteroaril de 5 membros, em que $-R^3-R^2-$ representa

$-A-CR^6=B-$ ou $-B=CR^6-A-$; em que:

A representa O, S ou NR^7 ; em que R^7 representa hidrogênio, alquil C_1-C_8 ou alquiloxicarbonil;

B representa CH ou N; e

R_6 representa hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil.

[121] De acordo com uma modalidade preferida, na fórmula (I):

X representa S, O ou NHOH; de preferência X é S;

Y representa CH, C ou N; de preferência Y é CH;

R^1 , R^2 , R^4 e R^5 representam cada um independentemente hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou

carboxialquil; preferencialmente R^1 , R^2 , R^4 e R^5 representam hidrogênio;

R^3 é hidroxil; ou R^3 e R^2 , juntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam uma fração heteroaril de 5 membros, em que $-R^3-R^2-$ representa $-A-CR^6=B-$; em que

A representa O, S ou NR^7 ; em que R^7 representa hidrogênio ou grupo alquil C_1-C_8 ;

B representa CH ou N; e

R^6 representa hidrogênio, hidroxil, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxil, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil;

[122] De acordo com uma modalidade preferida, X representa S. De acordo com outra modalidade preferida, X representa O. De acordo com uma modalidade preferida, Y representa CH. De acordo com outra modalidade preferida, Y representa N.

[123] De acordo com uma modalidade preferida, R^3 e R^2 , juntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam uma fração heteroaril de 5 membros, em que $-R^3-R^2-$ representa $-A-CR^6=B-$; em que:

A representa O, S ou NR^7 ; em que R^7 representa hidrogênio, alquil C_1-C_8 ou alquiloxicarbonil; de preferência R^7 representa hidrogênio ou alquiloxicarbonil;

B representa CH ou N; e

R^6 representa hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil; de preferência R^6 representa hidrogênio ou hidroxila.

[124] Mais preferencialmente, $-R^3-R^2-$ representa $-O-C(OH)=N-$ ou $-N(COOMe)-CH=CH-$, mais preferencialmente $-R^3-R^2-$ representa $-O-C(OH)=N-$.

[125] De acordo com outra modalidade preferida, R^3 e R^2 , juntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam uma fração heteroaril de 5 membros, em que $-R^3-R^2-$ representa $-A-CR^6=B-$; em que

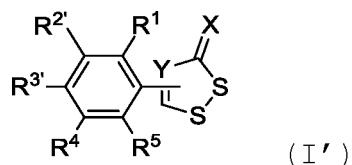
A representa O , S ou NR^7 ; em que R^7 representa hidrogênio, alquil C_1-C_8 ou alquiloxicarbonil; de preferência R^7 representa hidrogênio ou alquiloxicarbonil;

B representa CH ou N ; e

R^6 representa hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil; de preferência R^6 representa hidrogênio ou hidroxila.

[126] Mais preferencialmente, $-R^3-R^2-$ representa $-N=C(OH)-S-$.

[127] De acordo com uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são, portanto, compostos de fórmula (I')



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

X representa S, O ou NHOH; de preferência **X** é S ou O; mais preferencialmente, **X** é S;

Y representa CH, C ou N; de preferência **Y** é CH ou N; mais preferencialmente **Y** é CH;

R¹, **R⁴** e **R⁵** representam cada um independentemente hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil;

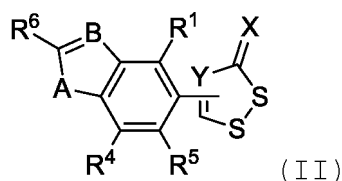
[128] **R^{2'}** e **R^{3'}**, juntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam uma fração heteroaril de 5 membros em que **-R^{3'}-R^{2'}-** representa **-A-CR⁶ = B-** ou **-B = CR⁶-A-**; em que:

A representa O, S ou NR⁷; em que **R⁷** representa hidrogênio, alquil C₁-C₈ ou alquiloxicarbonil;

B representa CH ou N; e

R^6 representa hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil.

[129] De acordo com uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são compostos de fórmula (II)



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que X, Y, R^1 , R^4 , R^5 , R^6 , A e B são como definidos na fórmula (I).

[130] De acordo com uma modalidade, na fórmula (II):

X representa S, O ou NHOH; de preferência **X** é S;

Y representa CH, C ou N; de preferência **Y** é CH;

A representa O, S ou NR^7 ; em que R^7 representa hidrogênio ou grupo alquil C_1-C_8 ;

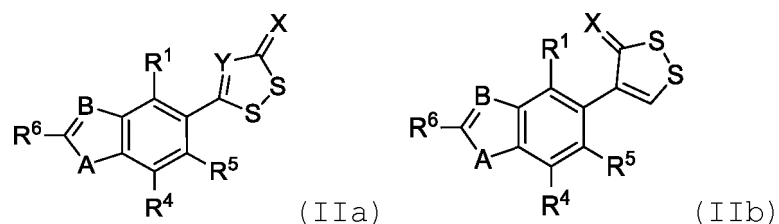
B representa CH ou N;

R^1 , R^4 e R^5 representam cada um independentemente hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil;

R^6 representa hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril,

alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil.

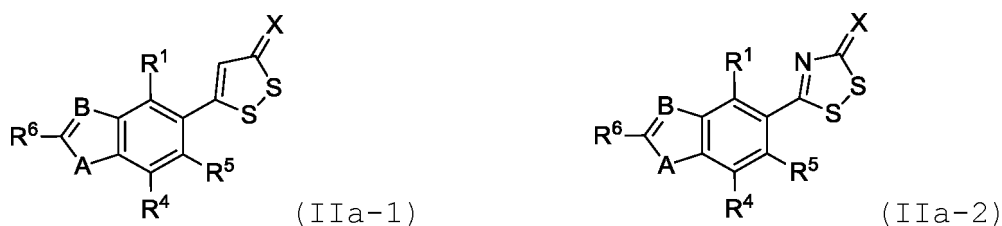
[131] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (II) são de fórmulas (IIa) ou (IIb)



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que X, Y, A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos acima.

[132] Em uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIa).

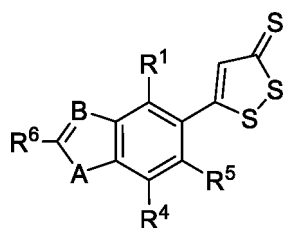
[133] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (IIa) são de fórmulas (IIa-1) ou (IIa-2)



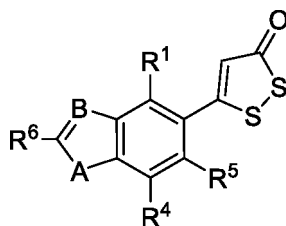
ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que X, A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos acima.

[134] Em uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIa-1). Em outra modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIa-2).

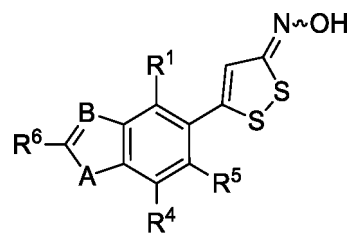
[135] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (IIa-1) são de fórmulas (IIa-1'), (IIa-1'') ou (IIa-1''')



(IIa-1')



(IIa-1'')

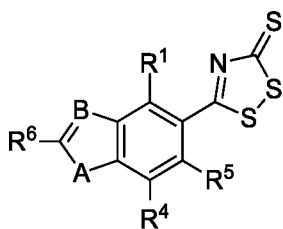


(IIa-1''')

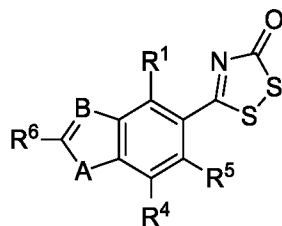
ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos acima.

[136] Em uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIa-1') ou (IIa-1''), mais preferencialmente de fórmula (IIa-1').

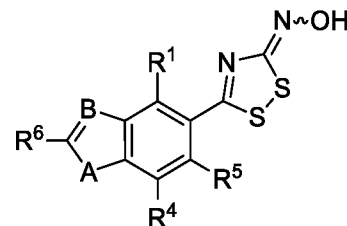
[137] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (IIa-2) são de fórmulas (IIa-2'), (IIa-2'') ou (IIa-2''')



(IIa-2')



(IIa-2'')

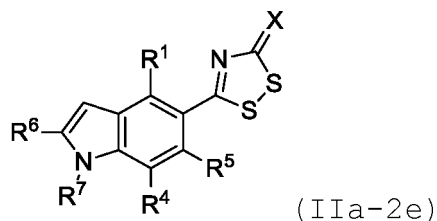
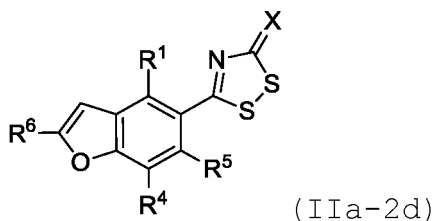
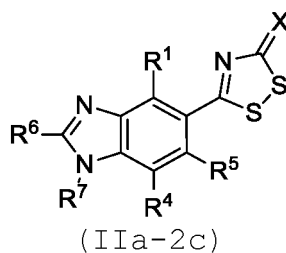
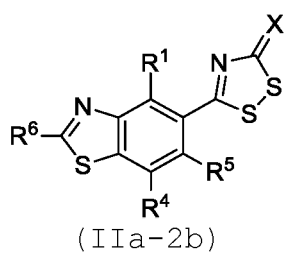
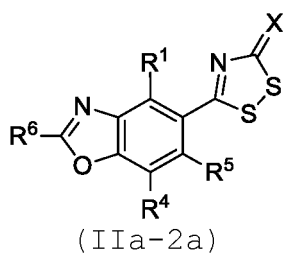
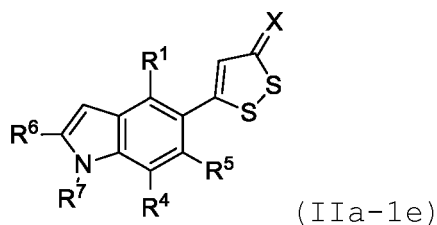
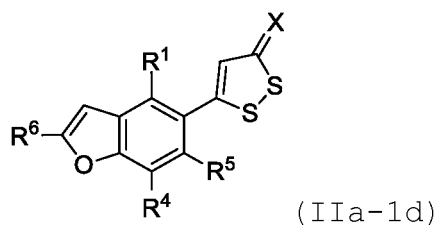
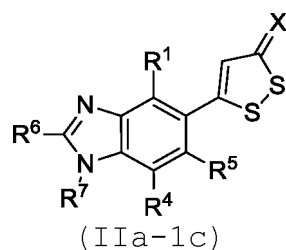
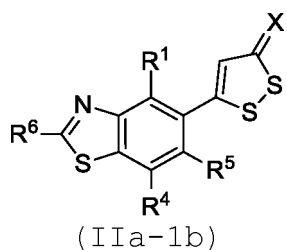
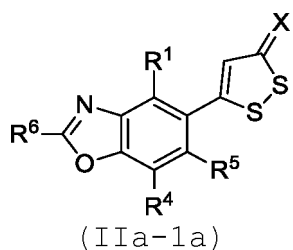


(IIa-2''')

ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos acima.

[138] Em uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIa-2') ou (IIa-2'').

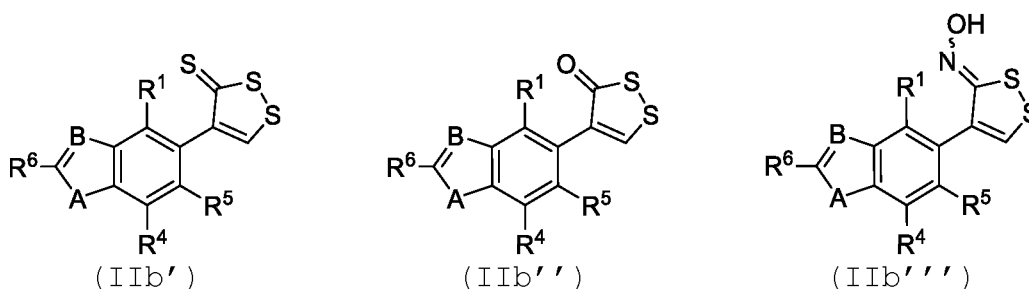
[139] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (IIa-1) e (IIa-2) são de fórmulas (IIa-1a), (IIa-1b), (IIa-1c), (IIa-1d), (IIa-1e), (IIa-2a), (IIa-2b), (IIa-2c), (IIa-2d) ou (IIa-2e)



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **X**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵**, **R⁶** e **R⁷** são como definidos acima.

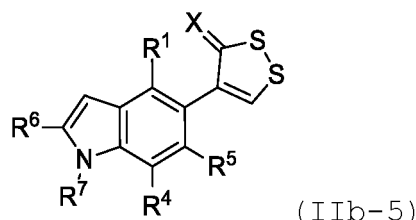
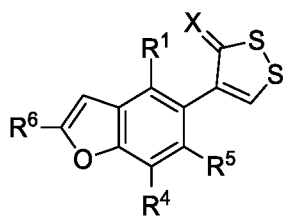
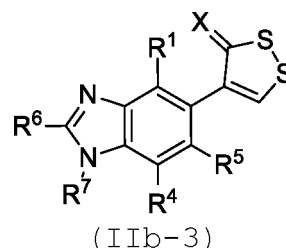
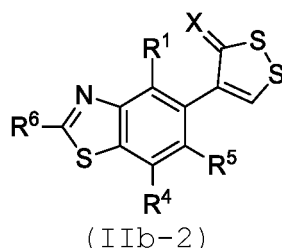
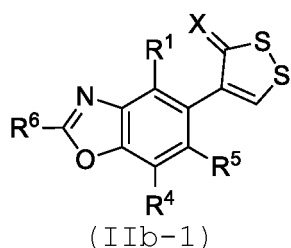
[140] Em uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIa-1a), (IIa-1b), (IIa-1e), (IIa-2a), (IIa-2b) ou (IIa-2e), mais preferencialmente de fórmula (IIa-1a) ou (IIa-1e); mais preferencialmente de fórmula (IIa-1a).

[141] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (IIb) são de fórmulas (IIb'), (IIb'') e (IIb''')



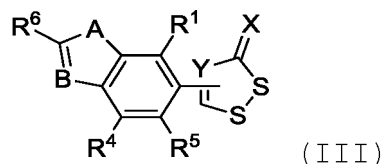
ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos acima.

[142] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (IIb) são de fórmulas (IIb-1), (IIb-2), (IIb-3), (IIb-4) ou (IIb-5)



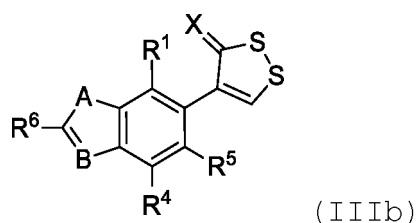
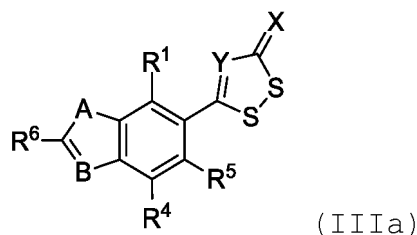
ou um tautômero, sal ou solvato farmacologicamente aceitável do mesmo, em que **X**, **R**¹, **R**⁴, **R**⁵, **R**⁶ e **R**⁷ são como definidos acima.

[143] De acordo com uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são compostos de fórmula (III)



ou um tautômero, sal ou solvato farmacologicamente aceitável do mesmo, em que **X**, **Y**, **R**¹, **R**⁴, **R**⁵, **R**⁶ **A** e **B** são como definidos na fórmula (I).

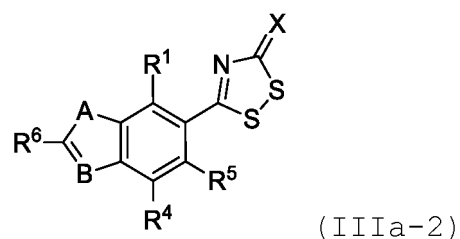
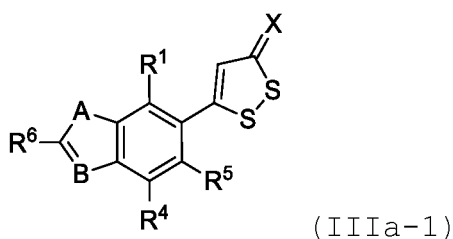
[144] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (III) são de fórmulas (IIIa) ou (IIIb)



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **X**, **Y**, **A**, **B**, **R**¹, **R**⁴, **R**⁵ e **R**⁶ são como definidos acima.

[145] Em uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIIa).

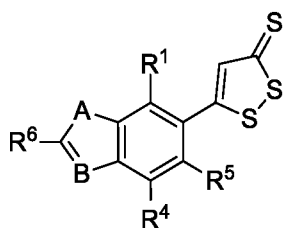
[146] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (IIIa) são de fórmulas (IIIa-1) ou (IIIa-2)



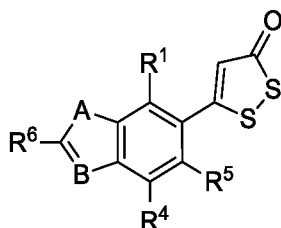
ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **X**, **A**, **B**, **R**¹, **R**⁴, **R**⁵ e **R**⁶ são como definidos acima.

[147] Em uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIIa-1). Em outra modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIIa-2).

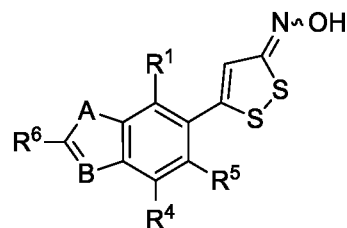
[148] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (IIIa-1) são de fórmulas (IIIa-1'), (IIIa-1'') ou (IIIa-1''')



(IIIa-1')



(IIIa-1'')

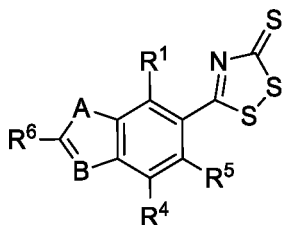


(IIIa-1''')

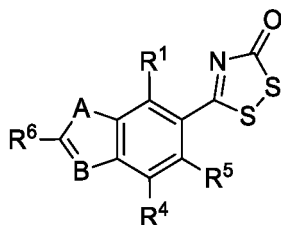
ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos acima.

[149] Em uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIIa-1') ou (IIIa-1''), mais preferencialmente de fórmula (IIIa-1').

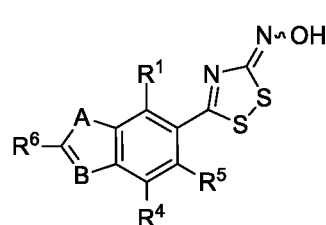
[150] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (IIIa-2) são de fórmulas (IIIa-2'), (IIIa-2'') ou (IIIa-2''')



(IIIa-2')



(IIIa-2'')

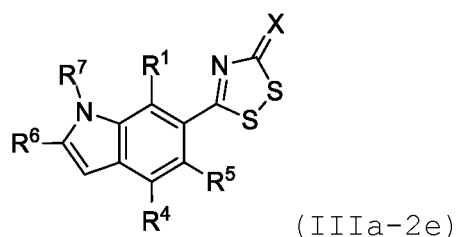
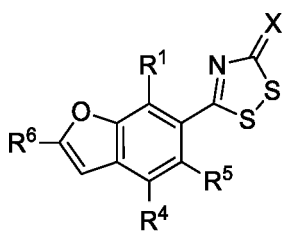
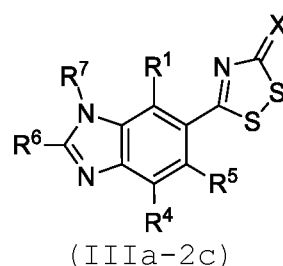
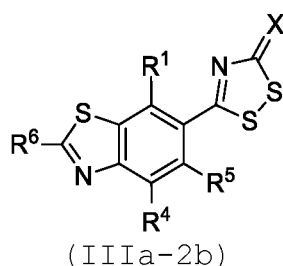
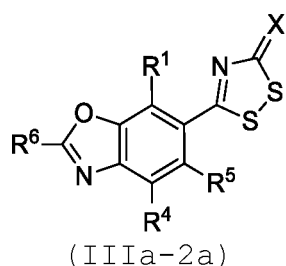
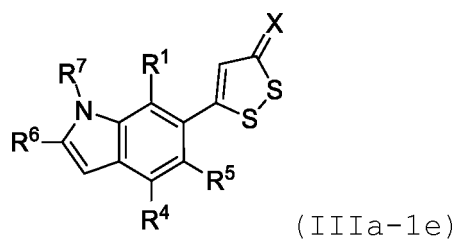
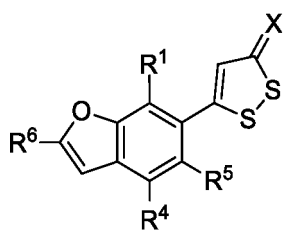
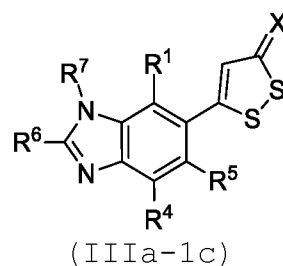
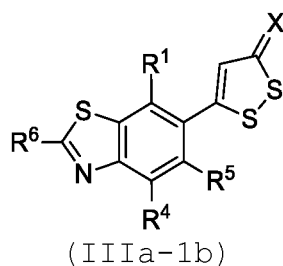
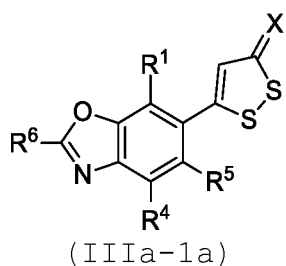


(IIIa-2''')

ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos acima.

[151] Em uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmula (IIIa-2') ou (IIIa-2'').

[152] De acordo com uma modalidade preferida, os compostos de fórmula (IIIa-1) e (IIIa-2) são de fórmulas (IIIa-1a), (IIIa-1b), (IIIa-1c), (IIIa-1d), (IIIa-1e), (IIIa-2a), (IIIa-2b), (IIIa-2c), (IIIa-2d) ou (IIIa-2e)

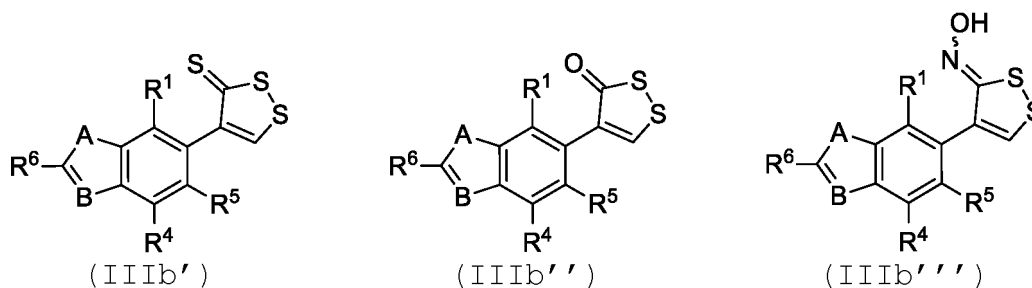


ou um tautômero, sal ou solvato farmacologicamente aceitável do mesmo, em que A, B, R¹, R⁴, R⁵, R⁶ e R⁷ são como definidos acima.

[153] Em uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são de fórmulas (IIIa-1a), (IIIa-1b), (IIIa-1e),

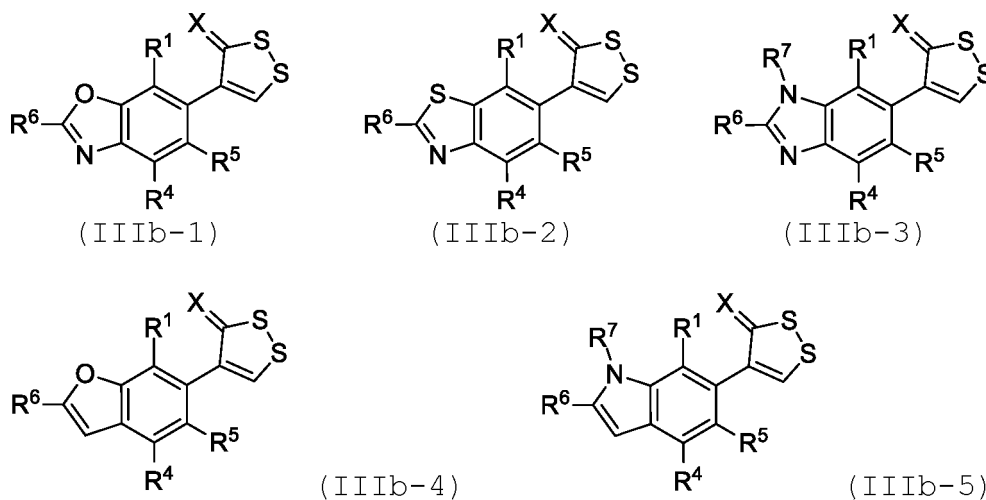
(IIIa-2a), (IIIa-2b) ou (IIIa-2e), mais preferencialmente de fórmula (IIIa-1b).

[154] De acordo com uma modalidade preferida, compostos de fórmula (IIIb) são de fórmulas (IIIb'), (IIIb'') e (IIIb''')



ou um tautômero, sal ou solvato farmacologicamente aceitável do mesmo, em que A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos acima.

[155] De acordo com uma modalidade preferida, compostos de fórmula (IIIb) são de fórmulas (IIIb-1), (IIIb-2), (IIIb-3), (IIIb-4) ou (IIIb-5)



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵**, **R⁶** e **R⁷** são como definidos acima.

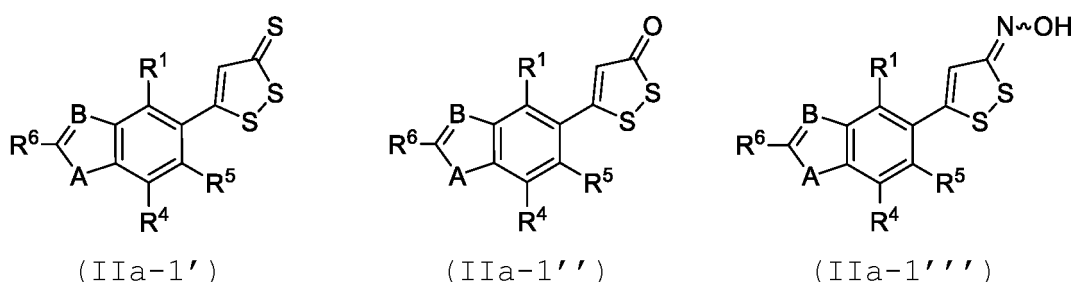
[156] De acordo com uma modalidade específica, os inibidores da invenção são selecionados de:

5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol-3-tiona (**AOX**);
 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol-3-ona (**Cp1**);
 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol-3-ona oxima (**Cp2**);
 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona (**Cp3**);
 4-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol-3-tiona (**Cp4**);
 5-(2-hidroxibenzo[d]oxazol-5-il)-3H-1,2-ditiol-3-tiona (**Cp5**);
 5-(2-hidroxibenzo[d]tiazol-6-il)-3H-1,2-ditiol-3-tiona (**Cp6a**);
 5-(benzofuran-5-il)-3H-1,2-ditiolo-3-tiona (**Cp8**); e
 metil 5-(3-tioxo-3H-1,2-ditiol-5-il)-1H-indol-1-carboxilato (**Cp9a**).

[157] De acordo com uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são selecionados de **AOX**, **Cp1**, **Cp3**, **Cp4**, **Cp5**, **Cp6a** e **Cp9a**. De acordo com uma modalidade preferida, os inibidores da invenção são selecionados de **AOX**, **Cp1**, **Cp3**, **Cp5** e **Cp6a**. De acordo com uma modalidade preferida, o inibidor da invenção é **AOX**. De acordo com uma modalidade preferida, o inibidor da invenção é **Cp1**. De acordo com uma modalidade preferida, o inibidor da invenção é **Cp3**.

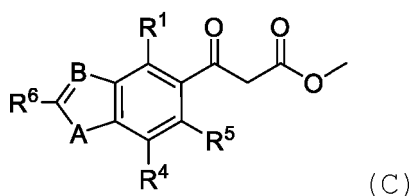
De acordo com uma modalidade preferida, o inibidor da invenção é **Cp5**. De acordo com uma modalidade preferida, o inibidor da invenção é **Cp6a**.

[158] A invenção também se refere a um processo para fabricar compostos de fórmula (IIa-1), mais especificamente de fórmulas (IIa-1'), (IIa-1'') e (IIa-1'''), como definidas anteriormente:



o referido processo compreendendo:

a) ciclizar um composto de fórmula (C)



em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos acima;

com um reagente à base de enxofre; de preferência, o reagente à base de enxofre é P₄S₁₀;

na presença de um siloxano; de preferência, o siloxano é o hexametildisiloxano (Me₃SiOSiMe₃, HMDO);

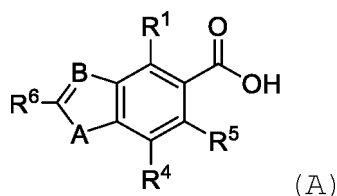
para obter um composto de fórmula (IIa-1') como definido acima;

e opcionalmente:

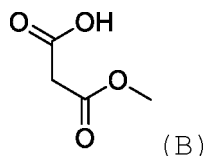
b1) o composto de fórmula (IIa-1') pode reagir com um oxidante; de preferência o oxidante é o acetato de mercúrio $\text{Hg}(\text{OAc})_2$; para obter um composto de fórmula (IIa-1'') como definido acima; ou

b2) o composto de fórmula (IIa-1') pode reagir com a hidroxilamina $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$; na presença de uma base; de preferência, a base é acetato de sódio (AcONa); para obter um composto de fórmula (IIa-1'''), conforme definido acima.

[159] De acordo com uma modalidade, o processo para fabricar compostos de fórmula (IIa-1) pode compreender uma etapa preliminar da fabricação do intermediário (C) compreendendo a reação de um derivado ácido da fórmula (A)

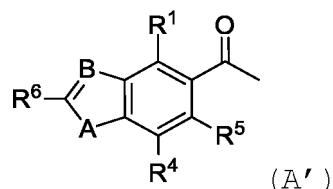


em que **A**, **B**, **R**¹, **R**⁴, **R**⁵ e **R**⁶ são como definidos acima;
com um ácido 3-metoxi-3-oxopropanóico (B)



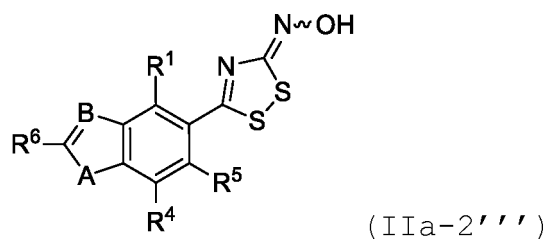
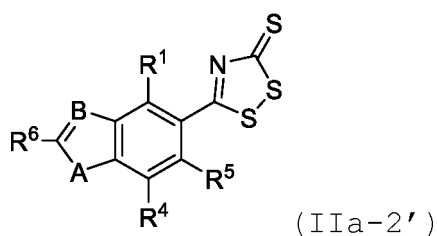
na presença de cloreto de magnésio (MgCl_2), depois diimidazolil cetona e depois HCl ; para obter o composto de fórmula (C).

[160] De acordo com uma modalidade, o processo para fabricar compostos de fórmula (IIa-1) pode compreender uma etapa preliminar da fabricação do intermediário (C) compreendendo a reação de um derivado ácido da fórmula (A')



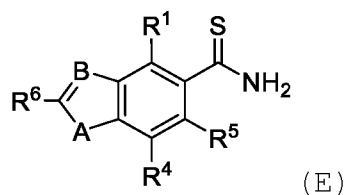
em que A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos acima; com dimetilcarbonato na presença de hidreto de sódio, para obter o composto de fórmula (C).

[161] A invenção também se refere a um processo para fabricar um composto de fórmula (IIa-2), mais especificamente de fórmulas (IIa-2') e (IIa-2''')



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos acima;

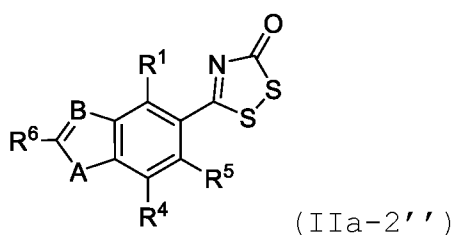
o referido processo compreendendo o composto de ciclização da fórmula (E)



em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos acima;
com dissulfeto de carbono (CS₂), na presença de uma base; de preferência, a base é hidreto de sódio (NaH); para obter um composto de fórmula (IIa-2') como definido acima;

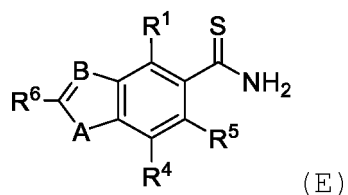
e opcionalmente o composto de fórmula (IIa-2') pode reagir com a hidroxilamina NH₂OH-HCl; na presença de uma base; de preferência, a base é acetato de sódio (AcONa); para obter um composto de fórmula (IIa-2'''), conforme definido acima.

[162] A invenção também se refere a um processo para fabricar um composto de fórmula (IIa-2'')



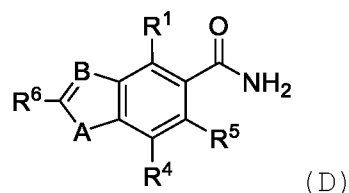
ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos acima;

o referido processo compreendendo a reação de um composto de fórmula (E)



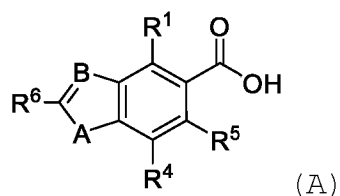
em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos acima;
com cloreto de clorocarbonilsulfenil, para obter um composto
de fórmula (IIa-2'').

[163] De acordo com uma modalidade, o intermediário (E)
pode ser obtido por reação do derivado de amida (D)



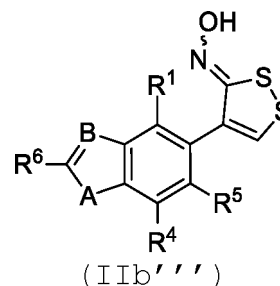
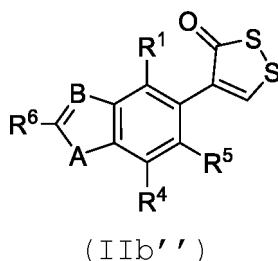
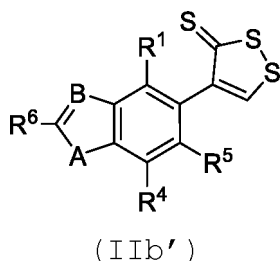
em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos acima;
com reagente de Lawesson, para obter um composto de fórmula
(E) como definido acima.

[164] De acordo com uma modalidade, o intermediário
amida (D) pode ser obtido por reação do derivado ácido da
fórmula (A)



em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são como definidos acima;
com uréia CO(NH₂)₂, na presença de uma base; de preferência,
a base é piridina (C₅H₅N); para obter um composto de fórmula
(D).

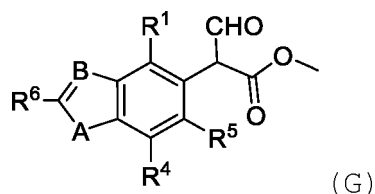
[165] A invenção também se refere a um processo para fabricar compostos de fórmula (IIb), mais especificamente de fórmulas (IIb'), (IIb'') e (IIb''')



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos acima;

o referido processo compreendendo:

a) ciclizar um composto de fórmula (G)



em que A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos acima;

com um reagente à base de enxofre; de preferência, o reagente à base de enxofre é o octasulfur S₈; na presença do reagente de Lawesson; para obter um composto de fórmula (IIb') como definido acima;

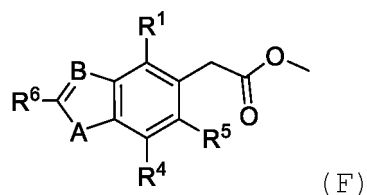
e opcionalmente:

b1) o composto de fórmula (IIb') pode reagir com um oxidante; de preferência o oxidante é o acetato de mercúrio

Hg(OAc)₂; para obter um composto de fórmula (IIb'') como definido acima; ou

b2) o composto de fórmula (IIb'') pode reagir com a hidroxilamina NH₂OH-HCl; na presença de uma base; de preferência, a base é acetato de sódio (AcONa); para obter um composto de fórmula (IIb''') como definido acima.

[166] De acordo com uma modalidade, o processo para fabricar compostos da fórmula (IIb) pode compreender uma etapa preliminar da fabricação do intermediário (G) compreendendo a reação de um derivado éster da fórmula (F)



em que A, B, R¹, R⁴, R⁵ e R⁶ são como definidos acima; com um ácido de Lewis; de preferência, o ácido de Lewis é TiCl₄; na presença de base; de preferência, a base é trietilamina (Et₃N); para obter um composto de fórmula (G) como definido acima.

[167] A presente invenção também se refere a uma composição compreendendo ou consistindo em ou consistindo essencialmente no inibidor ou inibidor seletivo da invenção.

[168] A presente invenção também se refere a uma composição para o tratamento ou para uso no tratamento de doenças relacionadas a radicais de oxigênio livres em um

indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo ou consistindo em ou consistindo essencialmente no inibidor, como descrito acima.

[169] A presente invenção também se refere a uma composição para o tratamento ou para utilização no tratamento de doenças relacionadas a radicais de oxigênio livres, em que a referida composição compreende ou consiste em ou consiste essencialmente em um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[170] A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica que compreende ou consiste essencialmente ou consiste no inibidor ou inibidor seletivo da invenção, em combinação com pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável.

[171] A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica para o tratamento ou para uso no tratamento de doenças relacionadas aos radicais livres de oxigênio em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo ou consistindo em ou consistindo essencialmente no inibidor, como descrito acima, em combinação com pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável.

[172] A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica para tratamento ou para uso no tratamento de doenças relacionadas a radicais livres de

oxigênio, em que a referida composição farmacêutica compreende ou consiste em ou consiste essencialmente em um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[173] Excipientes adequados incluem água, solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose e soluções de etanol, glicose, sacarose, dextrano, manose, manitol, sorbitol, polietileno glicol (PEG), fosfato, acetato, gelatina, colágeno, Carbopol®, óleos vegetais, e similar. Pode-se incluir adicionalmente conservantes, estabilizadores, antioxidantes, antimicrobianos e agentes tampão adequados, tais como, por exemplo, BHA, BHT, ácido cítrico, ácido ascórbico, tetraciclina e similares.

[174] Outros exemplos de excipientes farmacêuticamente aceitáveis que podem ser utilizados na composição da invenção incluem, mas não estão limitados a trocadores de íons, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas séricas, como albumina sérica humana, substâncias tampão como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas parciais de glicerídeos de ácidos graxos vegetais saturados, água, sais ou eletrólitos, como sulfato de protamina, hidrogenofosfato dissódico, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinil pirrolidona substâncias à base de celulose, polietileno glicol, carboximetilcelulose

de sódio, poliacrilatos, ceras, polímeros em bloco de polietileno-polioxipropileno, polietileno glicol e gordura de lã.

[175] Além disso, alguns excipientes podem incluir surfactantes (por exemplo, hidroxipropilcelulose); carreadores adequados, como, por exemplo, solventes e meios de dispersão que contêm, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e semelhantes), misturas adequadas destes e óleos vegetais, como, por exemplo, óleo de amendoim e óleo de gergelim; agentes isotônicos, tais como, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio; agentes de revestimento, tais como, por exemplo, lecitina; agentes que retardam a absorção, tais como, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina; conservantes, tais como, por exemplo, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, clorobutanol, timerosal e semelhantes; tampões, tais como, por exemplo, ácido bórico, bicarbonato de sódio e potássio, boratos de sódio e potássio, carbonato de sódio e potássio, acetato de sódio, bifosfato de sódio e semelhantes; agentes de tonicidade, tais como, por exemplo, dextrano 40, dextrano 70, dextrose, glicerina, cloreto de potássio, propileno glicol, cloreto de sódio; antioxidantes e estabilizadores, tais como, por exemplo, bissulfito de sódio, metabissulfito de sódio, tiossulfito de sódio, tioureia e semelhantes; agentes umectantes ou

clarificantes não iônicos, tais como, por exemplo, polissorbato 80, polissorbato 20, poloxâmero 282 e tiloxapol; agentes modificadores da viscosidade, tais como, por exemplo, dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulose, hidroximetilpropilcelulose, lanolina, metilcelulose, petrolato, polietileno glicol, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulose; e similar.

[176] Outros exemplos de excipientes farmacêuticamente aceitáveis são ciclodextrinas (CD) e seus derivados. As ciclodextrinas podem permitir melhorar a solubilização e/ou estabilização do princípio ativo. De preferência, a ciclodextrina é uma beta-ciclodextrina. Em uma modalidade, a ciclodextrina é selecionada de SBE-ciclodextrina (SBE: sulfobutil éter) e HP-ciclodextrina (HP: hidroxipropil) ou seus derivados. Em uma modalidade, a ciclodextrina é SBE-ciclodextrina, preferencialmente SBE-beta-ciclodextrina. Em uma modalidade, a ciclodextrina é HP-ciclodextrina, preferencialmente HP-beta-ciclodextrina.

[177] A presente invenção também se refere a um medicamento que compreende ou consiste em ou consiste essencialmente no inibidor ou inibidor seletivo da invenção.

[178] A presente invenção também se refere a um medicamento para tratamento ou para uso no tratamento de doenças relacionadas a radicais livres de oxigênio em um

indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo ou consistindo em ou consistindo essencialmente no inibidor, como descrito acima.

[179] A presente invenção também se refere a um medicamento para tratamento ou para uso no tratamento de doenças relacionadas a radicais de oxigênio livres, em que o referido medicamento compreende ou consiste em ou consiste essencialmente em um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[180] A presente invenção também se refere a uma composição cosmética compreendendo o inibidor da invenção.

[181] A presente invenção também se refere a uma composição cosmecêutica compreendendo o inibidor da invenção.

[182] Outro objetivo da invenção é um meio de conservação ou meio de preservação compreendendo ou consistindo em ou consistindo essencialmente no inibidor da invenção.

[183] Em uma modalidade, o meio de conservação é para a preservação de órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas. Em uma modalidade, os referidos órgãos incluem, mas não estão limitados a coração, fígado, rim, pulmão, pâncreas, intestino, pele e córnea. Em uma modalidade, os referidos órgãos são para transplante, isto é, a transferência de qualquer órgão ou tecido corporal do seu local de origem para um local receptor. Especificamente, em um procedimento

de transplante de aloenxerto, o local de origem do transplante está em um indivíduo doador e o local receptor está em outro indivíduo receptor.

[184] Em uma modalidade, o meio de conservação compreende o inibidor da invenção em uma concentração que varia de 0,1 μM a 120 μM , ou seja, em uma concentração de cerca de 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM ou 120 μM .

[185] Em uma modalidade, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção devem ser administradas sistemicamente ou localmente.

[186] Em uma modalidade, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção deve ser administrada por via oral, por injeção, topicamente, nasal, bucal, retal, vaginal, intratraqueal, por endoscopia, transmucosa, e por administração percutânea.

[187] Em uma modalidade, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção são injetadas, de preferência injetadas sistemicamente. Exemplos de formulações adaptadas a injeções sistêmicas incluem, mas não estão limitadas a soluções ou suspensões líquidas, formas

sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção. Exemplos de injeções sistêmicas incluem, entre outros, injeção intravenosa, subcutânea, intramuscular, intradérmica e intraperitoneal e perfusão. Em outra modalidade, quando injetada, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção são estéreis. Os métodos para obter uma composição farmacêutica estéril incluem, entre outros, síntese de GMP (GMP significa "Boas práticas de fabricação").

[188] Em outra modalidade, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção é administrada por via oral. Exemplos de formulações adaptadas à administração oral incluem, mas não estão limitadas a formas sólidas, formas líquidas e géis. Exemplos de formas sólidas adaptadas à administração oral incluem, entre outros, pílula, comprimido, cápsula, cápsula de gelatina mole, cápsula de gelatina dura, cápsula, comprimido, comprimido, pastilha, comprimido revestido de açúcar, comprimido revestido de açúcar ou dispersão /ou pastilha de desintegração, pó, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da administração oral e pastilha efervescente. Exemplos de forma líquida adaptada à administração oral incluem, mas não

estão limitados a soluções, suspensões, soluções potáveis, elixires, frasco selado, poção, banho, xarope e licor.

[189] Em outra modalidade, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção é administrada topicamente. Exemplos de formulações adaptadas à administração tópica incluem, mas não se limitam a, bastões, batons, ceras, cremes, loções, pomadas, bálsamos, géis, gloss, preparações de filtro solar, cosméticos, máscaras, lavadoras ou produtos de limpeza, preparações depilatórias e/ou semelhante.

[190] A administração tópica caracteriza a administração, administração ou aplicação da composição, composição farmacêutica, medicamento, composição cosmética ou composição cosmecêutica da invenção diretamente no local de interesse para um efeito localizado (geralmente em uma ou mais superfícies expostas ou externas) do mesmo, como a camada mais externa da epiderme, que é exposta e visualmente observável), por exemplo, usando mãos, dedos ou uma grande variedade de aplicadores (roll-up, roll-on ou outro bastão, recipiente para tubos, bola de algodão, pó de arroz, cotonete, bomba, pincel, tapete, pano e/ou similares). A aplicação pode ser feita, por exemplo, colocando, colocando, esfregando, varrendo, derramando, espalhando e/ou massageando a pele, ou sobre a pele, ou por qualquer outro

método conveniente ou adequado. De preferência, a administração tópica é efetuada sem qualquer absorção significativa de componentes da composição na corrente sanguínea do indivíduo (para evitar um efeito sistêmico).

[191] A composição, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção da invenção podem ser misturadas para formar creme ou loção branca, lisa, homogênea, opaca ou loção com, por exemplo, álcool benzílico a 1% ou 2% (p/p) como conservante, cera emulsificante, glicerina, palmitato de isopropil, ácido láctico, água purificada e solução de sorbitol. Além disso, as composições podem conter polietilenoglicol 400 (PEG 400). Eles podem ser misturados para formar pomadas com, por exemplo, álcool benzílico a 2% (p/p) como conservante, petrolato branco, cera emulsificante e tenox II (hidroxianisol butilado, galato de propila, ácido cítrico, propileno glicol). Almofadas ou rolos de tecido de bandagem, por exemplo, gaze, podem ser impregnados com as composições em solução, loção, creme, pomada ou outra forma semelhante, também para aplicação tópica.

[192] Em outra modalidade, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção também podem ser aplicadas topicamente usando um sistema transdérmico, como

um adesivo polimérico à base de acrílico com um agente de reticulação resinoso impregnado com a composição e laminado a um suporte impermeável.

[193] Em uma modalidade, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da presente invenção podem ser administradas como um adesivo transdérmico, mais particularmente como um adesivo transdérmico de liberação sustentada. Os adesivos transdérmicos podem incluir qualquer forma convencional, como, por exemplo, matriz adesiva, matriz polimérica, adesivo de reservatório, matriz ou estrutura laminada do tipo monolítico, e geralmente são compostos de uma ou mais camadas de suporte, adesivos, intensificadores de penetração, um controle de taxa opcional membrana e um revestimento de liberação que é removido para expor os adesivos antes da aplicação. Os adesivos de matriz polimérica também compreendem um material formador de matriz polimérica. Os emplastos transdérmicos adequados são descritos em mais detalhes, por exemplo, nas patentes US 5.262.165, 5.948.433, 6.010.715 e 6.071.531, cuja divulgação de cada um deles é incorporada aqui na sua totalidade.

[194] Exemplos de formulações adaptadas à administração transdérmica incluem, mas não estão limitados a unguento, pasta, creme, filme, bálsamo, adesivo, como, por exemplo,

adesivo transdérmico, gel, formas lipossômicas e semelhantes.

[195] Em uma modalidade, a composição transdérmica é uma pomada, pasta, creme; filme, bálsamo, adesivo, tal como, por exemplo, adesivo transdérmico, gel, formas lipossômicas ou semelhantes.

[196] Em uma modalidade da invenção, a pomada é uma pomada oleaginosa; uma pomada emulsionada tal como, por exemplo, óleo em água ou uma pomada água em óleo; ou uma pomada solúvel em água, de preferência é uma pomada oleaginosa.

[197] Em uma modalidade da invenção, a pomada oleaginosa utiliza bases tais como, por exemplo, óleos vegetais e animais; gorduras vegetais e animais; ceras; vaselina, tal como, por exemplo, vaselina branca ou óleo de vaselina; e parafina tal como, por exemplo, parafina líquida ou óleo de parafina.

[198] Em uma modalidade da invenção, a composição transdérmica compreende ainda um ou mais excipientes. Excipientes farmacêuticamente aceitáveis adequados são bem conhecidos dos especialistas. Exemplos de excipientes adequados incluem, mas não estão limitados a veículos, agentes emulsificantes, agentes endurecedores, modificadores ou espessantes reológicos, surfactantes, emolientes,

conservantes, umectantes, agentes tampão, solventes, agentes hidratantes e estabilizadores.

[199] Em outra modalidade, uma via de administração específica pode ser intraocular. Em outra modalidade, a via de administração pode ser uma administração ocular tópica, como, por exemplo, a administração de colírios ou banhando o olho em uma solução oftálmica compreendendo o inibidor da invenção.

[200] A solução oftálmica se refere a preparações líquidas estéreis, semissólidas ou sólidas destinadas à administração no globo ocular e/ou à conjuntiva, ou à inserção no saco conjuntival ou à administração no segmento posterior do olho. Conforme usados aqui, o termo "segmento posterior do olho" se refere aos dois terços posteriores do olho, compreendendo a membrana hialóide anterior e as estruturas por trás dela (humor vítreo, retina, coróide, nervo ótico). Em particular, uma composição oftálmica pode ser administrada no vítreo, por exemplo, por injeção intravítrea. Exemplos de composições oftálmicas incluem, mas não estão limitados a colírios, loções para os olhos, pós para colírios e pós para loções para os olhos e composições a serem injetadas no saco conjuntival ou no vítreo.

[201] Exemplos de carreadores incluem, mas não estão limitados a água; solução salina tamponada; vaselina (vaselina, também conhecida como parafina branca macia);

petrolato; óleos, tais como, por exemplo, óleo mineral, óleo vegetal, óleo animal, óleo de parafina, óleo de mamona ou óleo de vaselina; ceras orgânicas e inorgânicas, tais como, por exemplo, microcristalina, parafina, cera de abelha e cera de ozocerita; polímeros naturais, tais como, por exemplo, xantanos, gelatina, celulose, colágeno, amido ou goma arábica; polímeros sintéticos; álcoois; polióis; e similar. Em uma modalidade da invenção, o carreador é um creme de base, compreendendo um agente emulsificante, um ingrediente em fase oleosa e um ingrediente em fase aquosa.

[202] Exemplos de excipientes bem conhecidos de base de pomada ou loção incluem, mas não estão limitados a vaselina, Plastibase™ (que é uma base preparada com polietileno (peso molecular médio de cerca de 21000 Da) e parafina líquida) e ESMA-P™ (fabricado em cera microcristalina).

[203] Exemplos de agentes emulsificantes incluem, mas não estão limitados a álcool cetílico, álcool cetostearílico, álcool estearílico, carboxipolimetileno, policarbófilo, polietileno glicol e seus derivados, polioxietileno e seus derivados, como, por exemplo, polissorbato 20 ou polissorbato 80, isoladamente ou em combinação com álcoois graxos como, por exemplo, álcool cetílico, álcool estearílico e álcool cetostearílico e ésteres de sorbitano, como, por exemplo, éster de ácido graxo de sorbitano.

[204] Exemplos de ingredientes na fase oleosa incluem, mas não estão limitados a vaselina, como, por exemplo, vaselina branca, vaselina amarela ou óleo de vaselina, parafina, como, por exemplo, parafina líquida ou óleo de parafina, dimeticona e suas misturas.

[205] Exemplos de ingredientes da fase aquosa incluem, mas não estão limitados a água, glicerol e propilenoglicol.

[206] Exemplos de agentes endurecedores incluem, mas não estão limitados a álcool estearílico, álcool cetostearílico e álcool cetílico.

[207] Exemplos de modificadores de reologia ou espessantes incluem, mas não estão limitados a carbômeros como, por exemplo, Carbopol® e aminas de sebo de polioxietileno, como, por exemplo, Ethomeen®.

[208] Exemplos de surfactantes incluem, mas não estão limitados a surfactantes aniônicos, catiônicos, anfotéricos e não iônicos, como, por exemplo, lauril sulfato de sódio, álcool cetostearílico, álcool cetílico, lauril sulfato de magnésio, uma cera ou uma combinação dos mesmos.

[209] Exemplos de emolientes incluem, mas não estão limitados a petrolato branco ou amarelo (vaselina branca ou amarela), petrolato líquido (vaselina líquida), parafina ou aquafor.

[210] Exemplos de conservantes incluem, mas não estão limitados a conservantes antimicrobianos, como, por exemplo,

nipagina (hidroxibenzoato de metila), nipasol (hidroxibenzoato), butilparabeno, etilparabeno, metilparabeno, propilparabeno potássio, propilparabeno sódico, ésteres de parahidroxibenzoato de potássio, ácido sórbico sorbato, ácido benzóico, parabenos, clorobutanol, fenol, timerosal, benzoato de sódio e álcool benzílico.

[211] Exemplos de umectantes incluem, mas não estão limitados a propileno glicol e alginato de propileno glicol.

[212] Exemplos de agentes tamponantes incluem, mas não estão limitados a hidróxido de sódio, ácido cítrico e hidróxido de potássio.

[213] Exemplos de solventes incluem, mas não estão limitados a água, isopropanol, álcool benzílico e propileno glicol.

[214] Exemplos de agentes hidratantes incluem, entre outros, glicerina, óleo mineral, óleo de rícino endurecido com polioxietileno e vaselina, propilenoglicol, parafinas, ceras, como, por exemplo, cera de abelha, polietileno glicóis ou suas misturas, como, por exemplo, macrogol (macrogol é uma mistura de polietilenoglicóis de diferentes pesos moleculares), álcool estearílico, álcool benzílico, ésteres de para-hidrobenzoato (parabenos), hidrocarboneto gelificado, ácido cítrico, esqualeno, lanolinas, glicerina, óleo de mamona endurecido com polioxietileno, éster gordo de sorbitano, glicerina gorda ésteres, gorduras animais e

vegetais, óleos, amido, tragacanto, derivados de celulose, silicones, bentonites, ácido silícico, talco, óxido de zinco e suas misturas.

[215] Exemplos de estabilizadores incluem, mas não estão limitados a carboidratos como, por exemplo, sacarose, lactose e trealose, álcoois de açúcar, como, por exemplo, manitol e sorbitol, aminoácidos como, por exemplo, histidina, glicina, fenilalanina e arginina.

[216] Em uma modalidade da invenção, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção podem ser usadas em conjunto com sistemas de entrega que facilitam a entrega dos agentes ao sistema nervoso central. Por exemplo, vários melhoradores de permeabilidade da barreira hematoencefálica no sangue (BBB) podem ser utilizados para aumentar transitória e reversivelmente a permeabilidade da barreira hematoencefálica a um agente de tratamento. Esses melhoradores de permeabilidade da BBB incluem, entre outros, leucotrienos, agonistas de bradicinina, histamina, disruptores de junção estanques (por exemplo, zonulina, zot), soluções hiperosmóticas (por exemplo, manitol), agentes contratantes citoesqueléticos e alquilgliceróis de cadeia curta (por exemplo, 1-O-pentilglicerol). As vias oral, sublingual, parenteral, de implantação, nasal e inalatória podem fornecer a entrega do agente ativo ao

sistema nervoso central. Em algumas modalidades, os compostos da presente invenção podem ser administrados ao sistema nervoso central com efeitos mínimos no sistema nervoso periférico.

[217] A barreira hematoencefálica (BBB) é uma barreira física e um sistema de mecanismos de transporte celular entre os vasos sanguíneos no sistema nervoso central (SNC) e a maioria das áreas do próprio SNC. O BBB mantém a homeostase, restringindo a entrada de produtos químicos potencialmente prejudiciais no sangue e permitindo a entrada de nutrientes essenciais. No entanto, o BBB pode representar uma barreira formidável para a entrega de agentes farmacológicos ao SNC para tratamento de distúrbios ou manutenção ou aprimoramento de funções cerebrais normais e desejáveis, como cognição, aprendizado e memória.

[218] Em uma modalidade, o inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica são administrados em uma forma de liberação sustentada. Em outra modalidade, a composição, a composição farmacêutica ou o medicamento compreende um sistema de entrega que controla a liberação do modulador.

[219] Em uma modalidade, o inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção são

administrados em uma dose determinada pelo especialista na técnica e adaptada pessoalmente a cada indivíduo.

[220] Será entendido que o uso diário total do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da presente invenção será decidido pelo médico assistente dentro do escopo do julgamento médico correto. A quantidade terapeuticamente eficaz específica para qualquer paciente em particular dependerá de uma variedade de fatores, incluindo a doença a ser tratada e a gravidade da doença; a composição específica empregada, a idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do indivíduo; o tempo de administração, via de administração, a duração do tratamento; fármacos utilizados em combinação ou coincidentes com o inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção; e fatores semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas. Por exemplo, está bem dentro da habilidade da técnica iniciar doses de um composto terapêutico em níveis inferiores aos necessários para alcançar o efeito terapêutico desejado e aumentar gradualmente a dosagem até que o efeito desejado seja alcançado; mas, pelo contrário, pode ser igualmente útil começar com uma dose de carga, uma maneira de atingir a concentração plasmática em estado estacionário mais rapidamente e depois seguir com uma dose de manutenção

calculada para compensar exatamente o efeito do processo de eliminação.

[221] Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção é administrada pelo menos uma vez por dia, duas vezes por dia, pelo menos três vezes por dia.

[222] Em outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção é administrada a cada dois, três, quatro, cinco, seis dias.

[223] Em outra modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção é administrada duas vezes por semana, toda semana, a cada duas semanas, uma vez por mês.

[224] Em uma modalidade da invenção, a quantidade diária do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica a ser administrada a um indivíduo varia de cerca de 1 µg/dia a cerca de 100 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 50 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 10 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 9 mg/dia, de cerca

de 1 µg/dia a cerca de 8 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 7 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 6 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 5 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 4 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 3 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 2 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 1 mg/dia, de cerca de 1 µg/dia a cerca de 100 µg/dia.

[225] Em uma modalidade da invenção, a quantidade diária do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica a ser administrada a um indivíduo varia de cerca de 1 µg/dia a cerca de 10 mg/dia, de cerca de 5 µg/dia a cerca de 10 mg/dia, de cerca de 10 µg/dia a cerca de 7,5 mg/dia, de cerca de 10 µg/dia a cerca de 5 mg/dia, de cerca de 10 µg/dia a cerca de 2,5 mg/dia, de cerca de 10 µg/dia a cerca de 2 mg/dia, de cerca de 10 µg/dia a cerca de 1 mg/dia, de cerca de 10 µg/dia a cerca de 0,75 mg/dia, de cerca de 10 µg/dia a cerca de 0,5 mg/dia, de cerca de 10 µg/dia a cerca de 0,25 mg/dia.

[226] Em uma modalidade da invenção, a quantidade diária do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica a ser administrada a um indivíduo varia de cerca de 0,1 mg/dia a cerca de 2000 mg/dia , de cerca de 0,1 mg/dia a cerca de 1500 mg/dia, de cerca de 0,1 mg/dia a cerca de

1000 mg/dia, de cerca de 0,1 mg/dia a cerca de 500 mg/dia, de cerca de 0,1 mg/dia a cerca de 200 mg/dia, de cerca de 0,5 mg/dia a cerca de 2000 mg/dia, de cerca de 0,5 mg/dia a cerca de 1500 mg/dia, de cerca de 0,5 mg/dia a cerca de 1000 mg/dia, de cerca de 0,5 mg/dia a cerca de 500 mg/dia, de cerca de 0,5 mg/dia a cerca de 200 mg/dia, de cerca de 1 mg/dia a cerca de 2000 mg/dia, de cerca de 1 mg/dia a cerca de 1500 mg/dia, de cerca de 1 mg/dia a cerca de 1000 mg/dia, de cerca de 1 mg/dia a cerca de 500 mg/dia, de cerca de 1 mg/dia a cerca de 200 mg/dia.

[227] Em uma modalidade da invenção, a quantidade diária do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica a ser administrada a um indivíduo é de cerca de 1 µg/dia, cerca de 2 µg/dia, cerca de 4 µg/dia, cerca de 6 µg/dia, cerca de 8 µg/dia, cerca de 10 µg/dia, cerca de 15 µg/dia, cerca de 20 µg/dia, cerca de 20 µg/dia, cerca de 25 µg/dia, cerca de 25 µg/dia, cerca de 30 µg/dia, cerca de 35 µg/dia, cerca de 40 µg/dia, cerca de 45 µg/dia, cerca de 50 µg/dia, cerca de 55 µg/dia, cerca de 60 µg/dia, cerca de 60 µg/dia, cerca de 65 µg/dia, cerca de 70 µg/dia, cerca de 70 µg/dia, cerca de 75 µg/dia, cerca de 80 µg/dia, cerca de 85 µg/dia, cerca de 90 µg/dia, cerca de 95 µg/dia, cerca de 100 µg/dia, cerca de 150 µg/dia, cerca de 150 µg/dia, cerca de 200 µg/dia, cerca de 200 µg/dia, cerca de 250 µg/dia, cerca

de 300 µg/dia, cerca de 350 µg/dia, cerca de 400 µg/dia, cerca de 450 µg/dia, cerca de 500 µg/dia.

[228] Em uma modalidade da invenção, a quantidade diária do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica a ser administrada a um indivíduo é de cerca de 0,1 mg/dia, 0,2 mg/dia, 0,3 mg/dia, 0,4 mg/dia, 0,5 mg/dia, 0,6 mg/dia, 0,7 mg/dia, 0,8 mg/dia, 0,9 mg/dia, 1 mg/dia, 2 mg/dia, 4 mg/dia, 6 mg/dia, 8 mg/dia, 10 mg/dia, 15 mg/dia, 20 mg/dia, 25 mg/dia, 30 mg/dia, 35 mg/dia, 40 mg/dia, 45 mg/dia, 50 mg/dia, 75 mg/dia, 100 mg/dia, 125 mg/dia, 150 mg/dia, 175 mg/dia, 200 mg/dia, 300 mg/dia, 400 mg/dia, 500 mg/dia, 600 mg/dia, 700 mg/dia, 800 mg/dia, 900 mg/dia, 1000 mg/dia, 1200 mg/dia, 1400 mg/dia, 1600 mg/dia, 1800 mg/dia, 2000 mg/dia.

[229] Em uma modalidade da invenção, a quantidade diária do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica a ser administrada a um indivíduo varia de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 10 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 5 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 1 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 0,9 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 0,8 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 0,7 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 0,6

mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 0,5 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 0,4 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 0,3 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 0,2 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 0,1 mg/kg/dia, de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 10 µg/kg/dia.

[230] Em uma modalidade da invenção, a quantidade diária do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica a ser administrada a um indivíduo varia de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 1 mg/kg/dia, de cerca de 0,5 µg/kg/dia a cerca de 1 mg/kg/dia, de cerca de 1 µg/kg/dia a cerca de 0,75 mg/kg/dia, de cerca de 1 µg/kg/dia a cerca de 0,5 mg/kg/dia, de cerca de 1 µg/kg/dia a cerca de 0,25 mg/kg/dia, de cerca de 1 µg/kg/dia a cerca de 0,2 mg/kg/dia, de cerca de 1 µg/kg/dia a cerca de 0,1 mg/kg/dia, de cerca de 1 µg/kg/dia a cerca de 0,075 mg/kg/dia, de cerca de 1 µg/kg/dia a cerca de 0,05 mg/kg/dia, de cerca de 1 µg/kg/dia a cerca de 0,025 mg/kg/dia.

[231] Em uma modalidade da invenção, a quantidade diária do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica a ser administrada a um indivíduo varia de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 20 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 15 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia

a cerca de 12 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 10 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 9 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 8 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 7 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 6 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 5 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 4 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 3 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 2 mg/kg/dia, de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 1 mg/kg/dia.

[232] Em uma modalidade da invenção, a quantidade diária do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica a ser administrada a um indivíduo é de cerca de 0,1 µg/kg/dia, cerca de 0,2 µg/kg/dia, cerca de 0,4 µg/kg/dia, cerca de 0,6 µg/kg/dia, cerca de 0,8 µg/kg/dia, cerca de 1 µg/kg/dia, cerca de 1,5 µg/kg/dia, cerca de 1,5 µg/kg/dia, cerca de 2,0 µg/kg/dia, cerca de 2,5 µg/kg/dia, cerca de 3,0 µg/kg/dia, cerca de 3,5 µg/kg/dia, cerca de 4,0 µg/kg/dia, cerca de 4,5 µg/kg/dia, cerca de 5,0 µg/kg/dia, cerca de 5,0 µg/kg/dia, cerca de 5,5 µg/kg/dia, cerca de 6,0 µg/kg/dia, cerca de 6,5 µg/kg/dia, cerca de 7,0 µg/kg/dia, cerca de 7,5 µg/kg/dia, cerca de 7,5 µg/kg/dia, cerca de 8,0 µg/kg/dia, cerca de 8,5 µg/kg/dia, cerca de 9,0 µg/kg/dia, cerca de 9,5 µg/kg/dia, cerca de 10,0 µg/kg/dia, cerca de 15,0 µg/kg/dia, cerca de 15,0 µg/kg/dia, cerca de 20,0 µg/kg/

dia, cerca de 25,0 µg/kg/dia, cerca de 30,0 µg/kg/dia, cerca de 35,0 µg/kg/dia, cerca de 40,0 µg/kg/dia, cerca de 45,0 µg/kg/dia, cerca de 50,0 µg/kg/dia.

[233] Em uma modalidade da invenção, a quantidade diária do inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica a ser administrada a um indivíduo é de cerca de 0,01 mg/kg/dia, cerca de 0,02 mg/kg/dia, cerca de 0,03 mg/kg/dia, cerca de 0,04 mg/kg/dia, cerca de 0,05 mg/kg/dia, cerca de 0,06 mg/kg/dia, cerca de 0,07 mg/kg/dia, cerca de 0,07 mg/kg/dia, cerca de 0,08 mg/kg/dia, cerca de 0,09 mg/kg/dia, cerca de 0,1 mg/kg/dia, cerca de 0,2 mg/kg/dia, cerca de 0,3 mg/kg/dia, cerca de 0,4 mg/kg/dia, cerca de 0,5 mg/kg/dia, cerca de 0,6 mg/kg/dia, cerca de 0,7 mg/kg/dia, cerca de 0,8 mg/kg/dia, cerca de 0,9 mg/kg/dia, cerca de 1 mg/kg/dia, cerca de 1,5 mg/kg/dia, cerca de 2 mg/kg/dia, cerca de 2,5 mg/kg/dia, cerca de 3 mg/kg/dia, cerca de 3,5 mg/kg/dia, cerca de 4 mg/kg/dia, cerca de 4,5 mg/kg/dia, cerca de 5 mg/kg/dia, cerca de 6 mg/kg/dia, cerca de 7 mg/kg/dia, cerca de 8 mg/kg/dia, cerca de 9 mg/kg/dia, cerca de 10 mg/kg/dia, cerca de 10 mg/kg/dia, cerca de 12 mg/kg/dia, cerca de 14 mg/kg/dia, cerca de 16 mg/kg/dia, cerca de 18 mg/kg/dia, cerca de 20 mg/kg/dia.

[234] Em uma modalidade da invenção, o inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a

composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção devem ser administrados em uma quantidade de cerca de 1 µg a cerca de 100 mg, de cerca de 1 µg para cerca de 50 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 10 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 9 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 8 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 7 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 6 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 5 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 4 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 3 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 2 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 1 mg, de cerca de 1 µg a cerca de 100 µg.

[235] Em uma modalidade da invenção, o inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção devem ser administrados em uma quantidade de cerca de 1 µg a cerca de 10 mg, de cerca de 5 µg para cerca de 10 mg, de cerca de 10 µg a cerca de 7,5 mg, de cerca de 10 µg a cerca de 5 mg, de cerca de 10 µg a cerca de 2,5 mg, de cerca de 10 µg a cerca de 2 mg, de cerca de 10 µg a cerca de 1 mg, de cerca de 10 µg a cerca de 0,75 mg, de cerca de 10 µg a cerca de 0,5 mg, de cerca de 10 µg a cerca de 0,25 mg.

[236] Em outra modalidade, o inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção devem ser administrados em uma quantidade de cerca de 0,02 mg a cerca de 2000 mg, de cerca de 0,02 mg a cerca de 1500 mg, de cerca

de 0,02 mg a cerca de 1000 mg, de cerca de 0,02 mg a cerca de 500 mg, de cerca de 0,02 mg a cerca de 200 mg, de cerca de 0,02 mg a cerca de 100 mg, de cerca de 0,02 mg a cerca de 50 mg, de cerca de 0,02 mg a cerca de 25 mg, de cerca de 0,02 mg a cerca de 10 mg, de cerca de 0,02 mg a cerca de 5 mg.

[237] Em outra modalidade, o inibidor, a composição, a composição farmacêutica, o medicamento, a composição cosmética ou a composição cosmecêutica da invenção devem ser administrados em uma quantidade de cerca de 0,02 mg, 0,04 mg, 0,06 mg, 0,08 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1 mg, 1,5 mg, 2 mg, 2,5 mg, 3 mg, 3,5 mg, 4 mg, 4,5 mg, 5 mg, 5,5 mg, 6 mg, 6,5 mg, 7 mg, 7,5 mg, 8 mg, 8,5 mg, 9 mg, 9,5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1000 mg, 1200 mg, 1400 mg, 1600 mg, 1800 mg, 2000 mg.

[238] Em uma modalidade, o método da invenção é para um tratamento crônico. Em outra modalidade, o método da invenção é para um tratamento agudo.

[239] Em uma modalidade da invenção, o indivíduo é diagnosticado com uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio. Em outra modalidade da invenção, o indivíduo

está em risco de desenvolver uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio.

[240] Em uma modalidade, o referido indivíduo é um adulto, um adolescente, uma criança, uma criança pequena ou uma criança recém-nascida.

[241] Outro objetivo da presente invenção é um método para inibir a produção de radicais livres de oxigênio em um indivíduo necessitado, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo de produção mitocondrial de ERO.

[242] Outro objetivo da presente invenção é um método para inibir a produção de radicais livres de oxigênio em um indivíduo em necessidade, sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[243] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[244] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio em um indivíduo necessitado, agindo sobre mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou seletivo inibidor da produção mitocondrial de ERO.

[245] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio em um indivíduo necessitado sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[246] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de doenças cardiovasculares relacionadas a radicais livres de oxigênio em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[247] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de doenças cardiovasculares relacionadas a

radicais livres de oxigênio em um indivíduo necessitado, agindo sobre mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo de produção mitocondrial de ERO.

[248] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de doenças cardiovasculares relacionadas a radicais livres de oxigênio em um indivíduo necessitado sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[249] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de infarto do miocárdio em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[250] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de infarto do miocárdio em um indivíduo em necessidade do mesmo, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I, compreendendo a administração de uma

quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[251] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de infarto do miocárdio em um indivíduo em necessidade do mesmo sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[252] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[253] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca em um indivíduo em necessidade, agindo sobre mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[254] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca em um indivíduo

necessitado sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[255] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas em um indivíduo em necessidade deste, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[256] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas em um indivíduo em necessidade deste, atuando nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I, compreendendo a administração de uma

quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[257] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas em um indivíduo em necessidade do mesmo sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[258] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção da hipertensão pulmonar em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[259] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção da hipertensão pulmonar em um indivíduo necessitado, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I, compreendendo a administração de uma quantidade

eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[260] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção da hipertensão pulmonar em um indivíduo em necessidade do mesmo sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[261] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de lesão de isquemia-reperfusão em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[262] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de lesão de isquemia-reperfusão em um indivíduo necessitado, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[263] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de lesão de isquemia-reperfusão em um indivíduo em

necessidade, sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[264] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento em um indivíduo em necessidade, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[265] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento em um indivíduo em necessidade, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[266] Outro objetivo da presente invenção é um método para tratamento e/ou prevenção; ou para o tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento em um indivíduo em necessidade, sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[267] Outro objetivo da presente invenção é um método para aumentar a secreção de insulina em um indivíduo em necessidade, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[268] Outro objetivo da presente invenção é um método para aumentar a secreção de insulina em um indivíduo em necessidade, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[269] Outro objetivo da presente invenção é um método para aumentar a secreção de insulina em um indivíduo necessitado sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[270] Outro objetivo da presente invenção é um método para proteger neurônios em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz no indivíduo de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[271] Outro objetivo da presente invenção é um método para proteger neurônios em um indivíduo em necessidade do mesmo, agindo nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I,

compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[272] Outro objetivo da presente invenção é um método para proteger neurônios em um indivíduo em necessidade do mesmo, sem inibir a produção de ERO citosólica, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[273] Outro objetivo da presente invenção é um método para preservar órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas, preferencialmente antes de um procedimento de transplante, compreendendo o contato dos referidos órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas com um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[274] Outro objetivo da presente invenção é um método para preservar órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas, de preferência antes de um procedimento de transplante, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I, compreendendo o contato dos referidos órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas com um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO.

[275] Outro objetivo da presente invenção é um método para preservar órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas, de preferência antes de um procedimento de transplante, sem inibir a produção de ERO citosólica,

compreendendo o contato desses órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas com um inibidor ou seletivo. inibidor da produção mitocondrial de ERO.

[276] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para inibir a produção de radicais livres de oxigênio em um indivíduo em necessidade, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[277] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para inibir a produção de radicais livres de oxigênio em um indivíduo em necessidade, sem inibir a produção de ERO citosólica.

[278] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio.

[279] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio, atuando nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[280] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para

tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio sem inibir a produção de ERO citosólica.

[281] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença cardiovascular relacionada a radicais livres de oxigênio.

[282] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença cardiovascular relacionada a radicais livres de oxigênio, atuando nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[283] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença cardiovascular relacionada a radicais livres de oxigênio sem inibir a produção de ERO citosólica.

[284] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de infarto do miocárdio.

[285] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de infarto do miocárdio, atuando nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[286] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de infarto do miocárdio sem inibir a produção de ERO citosólica.

[287] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca.

[288] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca, atuando nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[289] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca sem inibir a produção de ERO citosólica.

[290] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas.

[291] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, atuando nas mitocôndrias em I_Q do complexo I.

[292] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais

preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas sem inibir a produção de ERO citosólica.

[293] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção da hipertensão pulmonar.

[294] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção da hipertensão pulmonar, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[295] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção da hipertensão pulmonar sem inibir a produção de ERO citosólica.

[296] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de lesões de isquemia-reperfusão.

[297] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de lesões de isquemia-reperfusão, agindo nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[298] Outro objetivo da presente invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de lesão de isquemia-reperfusão sem inibir a produção de ERO citosólica.

[299] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento.

[300] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento, atuando nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[301] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção; ou para uso no tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento sem inibir a produção de ERO citosólica.

[302] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para aumentar a secreção de insulina.

[303] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para

aumentar a secreção de insulina, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[304] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para aumentar a secreção de insulina sem inibir a produção de ERO citosólica.

[305] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para proteger os neurônios.

[306] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para proteger os neurônios, atuando nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[307] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para proteger os neurônios sem inibir a produção de ERO citosólica.

[308] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para preservar órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas, preferencialmente antes de um procedimento de transplante.

[309] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para preservar órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas,

preferencialmente antes de um procedimento de transplante, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[310] Outro objetivo da invenção é um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para preservar órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas, preferencialmente antes de um procedimento de transplante, sem inibir a produção de ERO citosólica.

[311] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para inibir a produção de radicais livres de oxigênio em um indivíduo necessitado, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[312] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para inibir a produção de radicais livres de oxigênio em um indivíduo em necessidade, sem inibir a produção de ERO citosólica.

[313] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratar e/ou prevenir pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio.

[314] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para o tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença

relacionada aos radicais livres de oxigênio, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[315] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratar e/ou prevenir pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio sem inibir a produção de ERO citosólica.

[316] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratar e/ou prevenir pelo menos uma doença cardiovascular relacionada a radicais livres de oxigênio.

[317] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratar e/ou prevenir pelo menos uma doença cardiovascular relacionada a radicais livres de oxigênio, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[318] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratar e/ou prevenir pelo menos uma doença cardiovascular relacionada a radicais livres de oxigênio sem inibir a produção de ERO citosólica.

[319] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para o tratamento e/ou prevenção de infarto do miocárdio.

[320] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção de infarto do miocárdio, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[321] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratar e/ou prevenir infarto do miocárdio sem inibir a produção de ERO citosólica.

[322] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca.

[323] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratar e/ou prevenir a insuficiência cardíaca, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[324] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratar e/ou prevenir a insuficiência cardíaca sem inibir a produção de ERO citosólica.

[325] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade

cardíaca de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas.

[326] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[327] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade cardíaca de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas sem inibir a produção de ERO citosólica.

[328] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para o tratamento e/ou prevenção da hipertensão pulmonar.

[329] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para

tratamento e/ou prevenção da hipertensão pulmonar, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[330] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratar e/ou prevenir a hipertensão pulmonar sem inibir a produção de ERO citosólica.

[331] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção de lesão por isquemia-reperfusão.

[332] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção de lesão de isquemia-reperfusão, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[333] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratamento e/ou prevenção de lesão de isquemia-reperfusão sem inibir a produção de ERO citosólica.

[334] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para o tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento.

[335] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para

tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[336] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para tratar e/ou prevenir doenças do envelhecimento sem inibir a produção de ERO citosólica.

[337] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para aumentar a secreção de insulina.

[338] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para aumentar a secreção de insulina, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[339] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para aumentar a secreção de insulina sem inibir a produção de ERO citosólica.

[340] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para proteger os neurônios.

[341] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para proteger os neurônios, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[342] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para proteger os neurônios sem inibir a produção de ERO citosólica.

[343] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para preservar órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas, preferencialmente antes de um procedimento de transplante.

[344] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para preservar órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas, preferencialmente antes de um procedimento de transplante, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[345] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO para preservar órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas, preferencialmente antes de um procedimento de transplante, sem inibir a produção de ERO citosólica.

[346] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para inibir a produção de radicais livres de oxigênio em um indivíduo necessitado, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[347] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na

fabricação de um medicamento para inibir a produção de radicais livres de oxigênio em um indivíduo em necessidade, sem inibir a produção de ERO citosólica.

[348] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio.

[349] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[350] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença relacionada aos radicais livres de oxigênio sem inibir a produção de ERO citosólica.

[351] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença cardiovascular relacionada a radicais livres de oxigênio.

[352] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença cardiovascular relacionada a radicais livres de oxigênio, atuando nas mitocôndrias no I_Q complexo I.

[353] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de pelo menos uma doença cardiovascular relacionada a radicais livres de oxigênio sem inibir a produção de ERO citosólica.

[354] Outro objetivo da presente invenção é a utilização de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de infarto do miocárdio.

[355] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de infarto do miocárdio, agindo sobre as mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[356] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou

prevenção de infarto do miocárdio sem inibir a produção de ERO citosólica.

[357] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca.

[358] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca, atuando nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[359] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca sem inibir a produção de ERO citosólica.

[360] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas.

[361] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[362] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de toxicidade cardíaca, preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas, toxicidade cardíaca de fármacos anticâncer, toxicidade de quinolonas e/ou toxicidade cardíaca de fármacos antivirais, mais preferencialmente toxicidade cardíaca de antraciclinas sem inibir a produção de ERO citosólica.

[363] Outro objetivo da invenção é a utilização de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção da hipertensão pulmonar.

[364] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção

da hipertensão pulmonar, atuando nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[365] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção da hipertensão pulmonar sem inibir a produção de ERO citosólica.

[366] Outro objetivo da presente invenção é a utilização de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de lesões por isquemia-reperfusão.

[367] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de lesão de isquemia-reperfusão, atuando nas mitocôndrias no sítio I_Q do complexo I.

[368] Outro objetivo da presente invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de lesão de isquemia-reperfusão sem inibir a produção de ERO citosólica.

[369] Outro objetivo da invenção é a utilização de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento.

[370] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[371] Outro objetivo da invenção é a utilização de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de doenças do envelhecimento sem inibir a produção de ERO citosólica.

[372] Outro objetivo da invenção é a utilização de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para aumentar a secreção de insulina.

[373] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para aumentar a secreção de insulina, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[374] Outro objetivo da invenção é a utilização de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para aumentar a secreção de insulina sem inibir a produção de ERO citosólica.

[375] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para a proteção de neurônios.

[376] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para proteger os neurônios, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[377] Outro objetivo da invenção é a utilização de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para proteger neurônios sem inibir a produção de ERO citosólica.

[378] Outro objetivo da invenção é a utilização de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para preservar órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas, preferencialmente antes de um procedimento de transplante.

[379] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para preservação de órgãos, tecidos biológicos e/ou células vivas, preferencialmente antes de um procedimento de transplante, atuando nas mitocôndrias no sítio I_0 do complexo I.

[380] Outro objetivo da invenção é o uso de um inibidor ou inibidor seletivo da produção mitocondrial de ERO na fabricação de um medicamento para preservar órgãos, tecidos

biológicos e/ou células vivas, preferencialmente antes de um procedimento de transplante, sem inibir a produção de ERO citosólica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[381] A **Figura 1** ilustra a ausência de efeito da AOL (5-(4-metoxifenil)-3H-1,2-ditio1-3-tiona) na respiração mitocondrial. Painel A: Após incubação na presença de AOL (20 μ M neste exemplo), mitocôndrias isoladas de coração de camundongo estavam oxidando glutamato + malato (GM) como substrato. A fosforilação foi desencadeada pelo difosfato de adenosina (ADP) e interrompida pela atractillosida (ATR), um inibidor específico do translocador de adenina. Painéis B a D: O estudo clássico da fosforilação oxidativa mitocondrial na presença de vários substratos respiratórios foi realizado na presença de concentrações crescentes de AOL (de 5 a 80 μ M). Não houve diferenças estatísticas na respiração mitocondrial sob os diferentes estados energéticos após a adição da AOL. A taxa de oxidação após a adição de ADP reflete a atividade de síntese de adenosina trifosfato (ATP) das mitocôndrias isoladas.

[382] A **Figura 2** apresenta os principais sítios de produção de radicais de oxigênio por mitocôndrias isoladas na presença de substratos dos complexos I e III na presença de ATR (estado 4) para obter a produção máxima de ERO mitocondrial. Como dito anteriormente, a produção de ERO

mitocondrial é altamente dependente da atividade e condições mitocondriais. Embora a AOL tenha sido testada sob inúmeras condições, por uma questão de clareza, optamos por apresentar aqui apenas os resultados mais demonstrativos. A presença de todos os substratos (isto é, glutamato, malato e succinato), dando os elétrons para toda a cadeia, é a mais próxima das condições *in situ* na célula. Sob essas condições de substrato, avaliamos o efeito da presença de AOL na produção de ERO pela cadeia completa sob ATR (inibição da fosforilação: produção máxima) e pelo complexo I (inibido pela rotenona) e complexo II (inibido pela Antimicina A). As cores se referem à Figura 3.

[383] A **Figura 3** apresenta o efeito da AOL (5 a 80 μM) na produção de ERO/ H_2O_2 por mitocôndrias isoladas na presença de substratos dos complexos I e II na presença de ATR (estado 4), efeito de rotenona, antimicina A e mixotiazol. Na ausência de inibidores específicos dos complexos, a produção de ERO é máxima e provém principalmente do transporte reverso de elétrons no sítio I_O (veja a Figura 4). Após a adição de rotenona, que inverte especificamente o transporte de elétrons pela inibição do I_O , a produção diminui e ocorre quase inteiramente no sítio III_{O} . A adição subsequente de Antimicina A, que bloqueia a transferência dos elétrons para o oxigênio, aumenta a produção de ERO no sítio III_{O} e,

finalmente, o mixotiazol bloqueia a produção de ERO no sítio III_{QO} (consulte a Figura 2 para obter detalhes).

[384] A **Figura 4** é um esquema que apresenta o sítio de ação da AOL na produção de mitocôndrias ERO e os sítios onde a AOL tem pouca ou nenhuma ação.

[385] A **Figura 5** é um histograma mostrando o efeito de 10 e 20 μ M de AOL na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) em ilhotas isoladas de camundongos machos C57Bl/6J. A combinação de três experiências é exibida. Ilhotas de dois camundongos para cada experimento; cinco ilhotas cada cavidade; quatro a seis cavidades cada condição. Os dados de secreção de insulina foram normalizados para o grupo Glc-Veh 11 mM, que foi considerado 100%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus 3 mM de Glc-Veh; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ versus 11 mM de Glc-Veh; ANOVA unidirecional e teste pós-hoc de Bonferroni.

[386] A **Figura 6** é um histograma mostrando a massa gorda determinada após 3 semanas de tratamento. A massa gorda é expressa em gramas (g). Os dados são expressos como média \pm SEM.

[387] A **Figura 7** é um histograma mostrando a massa magra determinada após 3 semanas de tratamento. A massa magra é expressa em gramas (g). Os dados são expressos como média \pm SEM.

[388] A **Figura 8** é um gráfico que mostra o efeito do tratamento crônico com AOL (5 mg/kg e 10 mg/kg) nas respostas à glicose durante um teste de tolerância à insulina (ITT). O gráfico representa alterações nos níveis de glicose no sangue durante uma ITT. Os dados são expressos como média \pm SEM.

[389] A **Figura 9** é um histograma mostrando o efeito da AOL nos níveis de glicose no sangue. Após cinco semanas de tratamento, a glicemia foi medida em camundongos em jejum de 2 horas. Os dados são expressos como média \pm SEM.

[390] A **Figura 10** é um histograma mostrando o efeito neuroprotetor da AOL (5 mg/kg bid por 11 dias) nas contagens de células TH positivas no SN em camundongos tratados com MPTP. Dados expressos como média \pm SEM (n = 10-11) e analisados usando ANOVA de medidas repetidas unidirecionais seguidas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett. ** P < 0,01; *** P < 0,001 c.f. Veículo MPTP +.

[391] A **Figura 11** é um gráfico que mostra o efeito da AOL na recuperação da contratilidade cardíaca durante a fase de reperfusão após isquemia. Os dados são expressos como média \pm SEM para controle (preto) e tratado com AOL (cinza) para 6 experiências independentes.

[392] A **Figura 12** é um gráfico que mostra o efeito da AOL no tamanho do infarto das fatias de corações isquêmicos. No final do período de reperfusão, os corações foram corados

com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). O tecido vivo parece vermelho, enquanto o tecido danificado parece branco.

[393] A **Figura 13** é um conjunto de dois gráficos que mostram o efeito do tratamento da AOL na pressão arterial pulmonar e na remodelação do coração. Painel A: efeito da AOL (colunas tracejadas) na pressão arterial pulmonar média (mPAP) medida em camundongos normóxicos (N, colunas brancas), camundongos hipóxicos crônicos (CH, colunas cinza claro) e camundongos tratados com monocrotalina (MCT, cinza escuro) colunas). Painel B: hipertrofia ventricular direita expressa como o índice de Fulton (isto é, proporção do peso do ventrículo direito (VD) em relação ao ventrículo esquerdo mais o peso do septo (VE + S)). n é o número de camundongos. *, ** e *** indicam uma diferença significativa para $P < 0,05$, $0,01$ e $0,0001$, respectivamente, contra N. ### indica uma diferença significativa para $P < 0,05$ versus CH. † e †† indicam uma diferença significativa para $P < 0,05$ e $0,01$, respectivamente, contra N + AOL. ‡ indica uma diferença significativa para $P < 0,05$ versus MCT.

[394] A **Figura 14** é um conjunto de gráficos que mostram o efeito da AOL no remodelamento das artérias pulmonares (AP). O efeito da AOL (colunas tracejadas) no remodelamento da PA foi avaliado medindo-se a porcentagem da espessura medial da PA em camundongos normóxicos (N, colunas brancas), camundongos hipóxicos crônicos (CH, colunas cinza claro) e

camundongos tratados com monocrotalina (MCT, escuro) colunas cinza). As artérias intraacinares observadas para estimar o remodelamento da AP foram separadas em três grupos com diâmetros transversais diferentes (Painel A: abaixo de 50 μm ; Painel B: entre 50 a 100 μm ; Painel C: entre 100 e 150 μm). n é o número de embarcações. *, ** e *** indicam uma diferença significativa para $P < 0,05$, $0,01$ e $0,0001$, respectivamente, contra N. ## e ### indicam uma diferença significativa para $P < 0,01$ e $0,0001$ versus CH. uma diferença significativa para $P < 0,05$ e $0,01$, respectivamente, contra N + AOL. † indica uma diferença significativa para $P < 0,05$ versus MCT.

[395] A **Figura 15** é um conjunto de gráficos que mostram o efeito da AOL na espessura da camada nuclear externa (ONL) da retina, na degeneração progressiva da retina induzida pela luz. Painel A: efeito do veículo e da AOL em animais "não transferidos". Os animais foram criados sob iluminação cíclica de baixa intensidade e receberam injeções de veículo ou AOL três vezes ao dia durante 7 dias. Quinze dias após o final do tratamento, foi realizada análise histológica da retina. Os dados são expressos como média \pm espessura SEM do ONL, para animais não tratados (cinza claro, pontos quadrados), animais tratados com veículo (cinza escuro, pontos triangulares) e animais tratados com AOL (preto, pontos redondos), em μm , de nervo ótico e a cada 0,39 mm nos

polos superior e inferior do disco ótico. Painei B: efeito do veículo e da AOL em animais "transferidos". Os animais foram criados sob iluminação cíclica de baixa intensidade e transferidos para raios cíclicos de alta intensidade por 7 dias, durante os quais receberam injeções de veículo ou AOL três vezes ao dia. No final do tratamento, os animais foram transferidos de volta sob condições de iluminação cíclica de baixa intensidade e a análise histológica da retina foi realizada quinze dias depois. Os dados são expressos como média \pm espessura SEM do ONL, para animais não tratados (cinza claro, pontos quadrados), animais tratados com veículo (cinza escuro, pontos triangulares) e animais tratados com AOL (preto, pontos redondos), em μ m, de nervo ótico e a cada 0,39 mm nos polos superior e inferior do disco ótico.

[396] A **Figura 16** é um conjunto de gráficos que mostram uma experiência de SOD2-KO de vida útil em quatro grupos de camundongos (WT-KOL: camundongos do tipo selvagem tratados com veículo; WT-AOL: camundongos do tipo selvagem tratados com AOL; KO-KOL: SOD2- Camundongos KO tratados com veículo; camundongos KO-AOL: SOD2-KO tratados com AOL). Os dados são expressos como valores médios. Painei A: evolução do peso corporal dos camundongos, em gramas ao longo do tempo, em dias. Painei B: corrigido pela linha de base do peso corporal dos camundongos, como uma porcentagem do ganho de peso ao

longo do tempo, em dias. Painei C: proporção de sobrevivência entre os grupos KO-KOL e KO-AOL, em porcentagem ao longo do tempo, em dias.

[397] A **Figura 17** é um gráfico que mostra a atividade da succinato desidrogenase (SDH) no coração, entre cinco grupos de camundongos (WT-KOL: camundongos do tipo selvagem tratados com veículo; WT-AOL: camundongos do tipo selvagem tratados com AOL; KO-KOL: Camundongos SOD2-KO tratados com veículo; KO-AOL: camundongos SOD2-KO tratados com AOL; WT: camundongos não tratados do tipo selvagem). A densidade ótica da reação SDH amostrada de cortes cardíacos foi medida com o software de processamento de imagem Image Analyst MKII (Akos). Esta densidade foi expressa na forma de nível médio de cinza, em que nível médio de cinza = soma de cinza/número de pixels medidos. Os dados são expressos como valores médios da densidade ótica medida.

[398] A **Figura 18** é um conjunto de gráficos mostrando a coloração Oil Red O de fatias de fígado de camundongos WT e SOD2-KO, tratados ou não com AOL. O histograma representa o tamanho médio das gotículas de lipídios (Painei A), a densidade das gotículas (número de gotículas/área hepática) (Painei B) e a área lipídica total (tamanho médio x número de gotículas) (Painei C).

[399] A **Figura 19** mostra o efeito de AOX na oxidação mitocondrial. Um experimento típico mostrando respiração

mitocondrial sob várias condições de fosforilação oxidativa na presença de AOX é mostrado na Figura 19A. AOX foi adicionado às mitocôndrias para uma incubação de 5 minutos antes do ensaio de fosforilação oxidativa. O consumo de oxigênio (traço cinza escuro) inicia após a adição do substrato (GM: Glutamato-Malato) e é ativado pelo ADP (estado de fosforilação). A fosforilação é interrompida pelo ATR (atractillosideo) e a baixa respiração residual reflete a integridade da membrana interna mitocondrial. A Figura 19B apresenta a evolução das taxas de oxidação mitocondrial durante os diferentes estados respiratórios descritos acima (substratos Succ/ROT: GM, succinato e rotenona) na presença de concentrações crescentes de AOX no DMSO.

[400] A **Figura 20** mostra o efeito de AOX na fosforilação de ATP mitocondrial. A taxa de fosforilação foi medida simultaneamente com a taxa de oxidação, como descrito anteriormente em Gouspillou et al. (2014. Aging Cell. 13 (1): 39-48) e os efeitos de concentrações crescentes de AOX foram relatados. Os resultados são expressos como uma porcentagem relativa ao controle da unidade de pH/s de evolução.

[401] A **Figura 21** mostra o efeito do aumento das concentrações de AOX na produção de radicais de oxigênio por mitocôndrias isoladas na presença de substratos dos complexos I e III (glutamato, malato e succinato) na presença

de ATR, portanto sob condições de maior produção pelo complexo I. A medição da ERO produzida pelas mitocôndrias foi realizada usando o sistema clássico de peroxidase-Amplex Red, que mede a aparência de H_2O_2 pela oxidação de Amplex Red dando resorufina fluorescente (ver Figura 22B).

[402] A **Figura 22** mostra a ausência de efeito de AOX na ERO não mitocondrial em um ensaio *in vitro*, em comparação com AOL e Oltipraz. ERO/ H_2O_2 não mitocondriais foram obtidos usando NAD (P) H oxidase disponível comercialmente na presença de NAD (P) H reduzido e medidos novamente usando o sistema clássico de peroxidase-Amplex Red (Figura 22B). O efeito do aumento das concentrações das diferentes moléculas testadas é apresentado na Figura 22A. As linhas horizontais retas representam a porcentagem média da produção de EROs em todas as concentrações testadas, para AOL (99,2%) e AOX (109,9%).

[403] A **Figura 23** mostra o efeito de AOX na viabilidade das linhas celulares de carcinoma A549 e H460, expressas em% para o controle (0 μM AOX). As células foram incubadas com doses crescentes, de 0 a 500 μM AOX, e a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de sulforodamina B (SRB) (Figura 23A). Os resultados também são expressos como o log da concentração de AOX (Figura 23B).

[404] A **Figura 24** mostra a ausência de efeito de AOX e AOL na respiração das células H460, conforme avaliado pela abordagem oxigráfica.

[405] A **Figura 25** mostra a ausência de efeito de AOX na atividade metastática de células de carcinoma, usando o teste de Transwell. Resumidamente, as células de carcinoma H460 foram colocadas na camada superior de uma membrana permeável às células e, após um período de incubação, as células que migraram através da membrana são coradas e contadas. A Figura 25A mostra fotografias das células tingidas no compartimento inferior para as diferentes condições (controle, 5 μ M AOX, 10 μ M AOX e 10 μ M NAC [N-acetilcisteína]). A Figura 25B é um histograma mostrando os resultados da Figura 25A.

[406] A **Figura 26** mostra a contração das artérias intrapulmonares induzidas por serotonina (5HT) ou endotelina (ET-1) na presença de AOL (Figura 26A) ou AOX (Figura 26B) em diferentes concentrações. ANOVA bidirecional: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

[407] A **Figura 27** mostra a proliferação de células do músculo liso arterial pulmonar (PASMC) após incubação em soro fetal de bezerro a 10% (FCS), FCS a 0,2% e FCS a 0,2% + FCS a 0,2% + serotonina 100 μ M (5HT), na presença ou na ausência de AOL.

[408] A **Figura 28** mostra o efeito da AOL, AOX e Oltipraz (0 a 80 μ M) na produção de ERO/H₂O₂ pelos sítios I_Q e III_Q

de mitocôndrias isoladas, quando direcionados individualmente usando a combinação de succinato (substrato energético do complexo respiratório 2) e inibidores conhecidos da cadeia respiratória, nomeadamente para o sítio I_Q , succinato 10 mM sozinho e para o sítio III_{Qouter} , succinato 10 mM, rotenona 4 μ M e antimicina 2,5 μ M A. A Figura 28A mostra o efeito das três moléculas no sítio I_Q e a Figura 28B mostra o efeito sobre site III_{Qo} .

[409] A **Figura 29** mostra o efeito dos análogos AOX (Cp1; Cp2; Cp3; Cp4; Cp5; Cp6a; Cp8; Cp9a) (de 0 a 25 μ M) na produção de ERO/H_2O_2 pelos sítios I_Q e III_{Qo} de mitocôndrias isoladas, quando direcionados individualmente usando a combinação de succinato (substrato energético do complexo respiratório 2) e inibidores conhecidos da cadeia respiratória, nomeadamente para o sítio I_Q , succinato 10 mM sozinho e para o sítio III_{Qouter} , succinato 10 mM, rotenona 4 μ M e rotimona 2,5 μ M e antimicina A. A Figura 29A mostra a efeito de (painel superior) Cp1, Cp2, Cp3, Cp4, (painel inferior) Cp5, Cp6a, Cp8 e Cp9a no sítio I_Q e a Figura 29B mostra o efeito de Cp5, Cp6a e Cp9a no sítio III_{Qo} .

EXEMPLOS

[410] A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos.

EXEMPLOS QUÍMICOS

Procedimentos experimentais gerais

Reagentes e solventes

[411] Todos os reagentes de grau sintético e solventes foram utilizados como fornecidos. Os solventes utilizados nas reações foram secos, destilados, se necessário, de acordo com o estado da técnica. Alguns solventes estavam comercialmente disponíveis como secos e foram utilizados como tais.

Condições de reação

[412] Quando eram necessárias condições secas, o material de vidro era seco no forno e as reações eram realizadas sob uma atmosfera de nitrogênio. A temperatura ambiente (t.a.) se refere a 20-25 °C. As temperaturas de reação de -78 °C foram obtidas usando CO₂ sólido e acetona. Para aqueles a 0 °C, um banho de gelo foi empregado e onde o calor era necessário, um banho de óleo com termômetro de contato foi usado.

[413] As reações foram monitoradas por TLC. A TLC foi realizada usando placas Merck, DC Kieselgel 60 F254 DC25 pré-revestidas com folhas de alumínio UV254 com gel de sílica e indicador fluorescente. Os indicadores utilizados incluem solução de ácido fosfomolibdico etanólico.

Cromatografia flash

[414] O gel de sílica, MN Kieselgel 60, grau 15-40 microns da Macherey-Nagel foi usado na purificação de produtos brutos por cromatografia flash em coluna. As

amostras foram aplicadas diretamente no topo da coluna sílica/solvente ou aplicadas como pasta de sílica gel seca.

Cromatografia Flash automatizada

[415] Sistema de purificação Teledyne Isco Combiflash Companion TM As amostras brutas foram dissolvidas em uma pequena quantidade de solvente adequado e aplicadas a colunas pré-embaladas RediSep®. A coluna foi colocada no sistema de purificação Teledyne Isco Combiflash Companion® e a purificação automática foi realizada usando um programa de gradiente de solvente. O sistema foi utilizado com a instalação automatizada de coleta de frações, onde os compostos foram detectados por UV ou coletando todas as frações.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

[416] A RMN foi registrada nos instrumentos Bruker UltraShield operando a 400 MHz (¹H) e 100 MHz (¹³C). A calibração foi realizada usando a troca de solvente residual do solvente deuterado. Quando CDCl₃ foi empregado como solvente, a calibração foi realizada neste sinal de solvente em 7,26 (¹H) e 77,16 (¹³C). Quando os aromáticos estavam presentes na amostra a ser analisada, Me₄Si foi adicionado ao CDCl₃ e os espectros foram calibrados a 0,0 (¹H). Quando D₂O foi utilizado, o sinal da água foi designado como referência interna em 4,79 ppm (¹H). Para CD₃OD, a referência interna foi designada em 3,31 ppm (¹H) e 49,0 ppm (¹³C NMR).

Para $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, a referência interna foi designada a 2,50 ppm (1H) e 39,5 ppm (^{13}C). Para ^{19}F , CFCl_3 como referência externa foi usada. Os desvios químicos são relatados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento são fornecidas em Hertz (Hz). As abreviaturas para a multiplicidade dos sinais de próton e carbono são as seguintes: s singlete, d duplete, dd duplete de duplete, dt duplete de trigêmeos, ddt duplete de duplete de trigêmeos, t trigêmeo, tt trigêmeo de trigêmeos, q, quinteto, m multiplete.

Espectroscopia de massa (MS) e cromatografia líquida acoplada à análise por espectrometria de massa em tandem (LC-MS)

[417] A análise de massa foi realizada em um detector de massa Waters 3100, Waters Alliance 2695. Sensibilidade de 1 pg com ESI ou APCI. A varredura de 10.000 Da/s acelera até 2.000 Da para compatibilidade total com segundos picos de LC rápidos e largos. Ionização de amostragem ortogonal dupla com fonte ZSpray [™]. Múltiplas estratégias de detecção disponíveis com os detectores óticos Tunable UV (TUV), Photodiode Array (PDA) e ELS (Evaporative Light Scattering). Ou a análise de massa foi realizada em UPLC/MS: Xevo G2 Qtof. O espectrômetro de massa Xevo G2 QToF, com tecnologia UPLC®/MSE e QuanTof.

Análises do ponto de fusão

[418] Os pontos de fusão foram medidos em um instrumento STUART SMP3.

Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

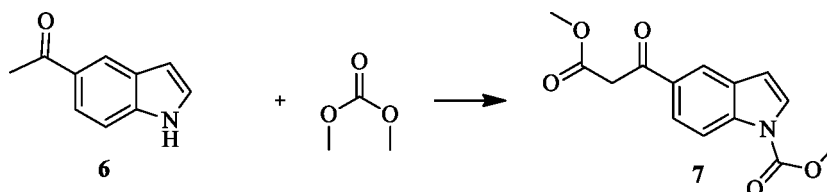
[419] As análises de HPLC-DAD foram realizadas em um sistema analítico de HPLC da Waters equipado com coluna analítica adequada, software Empower, sistema de entrega multissolvente Waters Delta 600 e um detector de matriz de fotodiodo (Waters 2996) e/ou refratômetro, um controlador de sistema (Waters 600), e um injetor Rheodyne 7725i com um loop de amostra de 20 µL foi usado.

Síntese de compostos intermediários (C)

[420] **Procedimento geral A.** Um balão de fundo redondo de 100 mL equipado com agitador magnético é carregado com ariletanona comercial apropriada e dimetilcarbonato. O hidreto de sódio (60% em óleo mineral) é adicionado lentamente com agitação e o todo é submetido a refluxo durante a noite. A mistura é vertida em água, acidificada com HCl (2M) e extraída com acetato de etilo. A camada orgânica é lavada com água (50 mL) e solução de salmoura saturada (50 mL). A camada orgânica é seca sobre Na₂SO₄ anidro e o solvente é removido sob pressão reduzida. O material em bruto é purificado por cromatografia em coluna sobre sílica gel utilizando solvente adequado para dar o correspondente 3-oxo-3-arylpropanoato de metila.

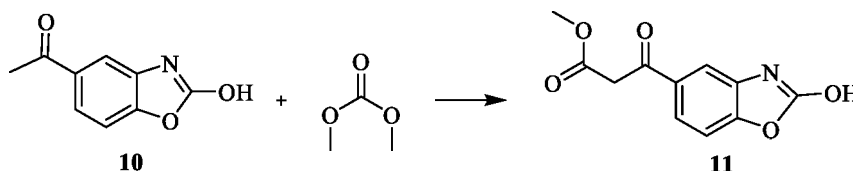
[421] Os intermediários **7**, **11** e **13** foram sintetizados usando o procedimento geral de alquilação A.

Intermediário 7: 5- (3-metoxi-3-oxopropanoil) -1H-indole-1-carboxilato de metila



[422] A reação foi realizada de acordo com o procedimento geral de alquilação A, utilizando **6** como ariletanona (1,03 g, 6,47 mmol), dimetilcarbonato (12 mL) e hidreto de sódio (2,5 g, 64,7 mmol). Após processamento e purificação, o composto **7** foi obtido (m = 1,4 g, 78%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 8,30 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 7,78 (dd, J = 8,7, 1,7 Hz, 1H), 7,55 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 6,64 (dd, J = 3,1, 0,7 Hz, 1H), 4,23 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,66 (s, 3H).

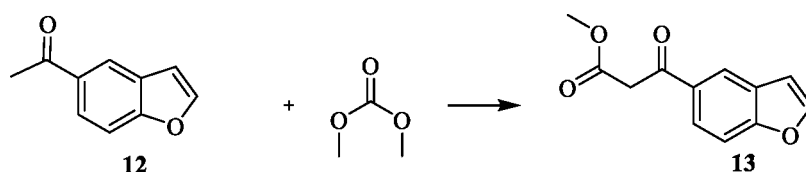
Intermediário 11: 3- (2-hidroxibenzo [d] oxazol-5-il) -3-oxopropanoato de metila



[423] A reação foi realizada de acordo com o procedimento geral de alquilação A, usando **10** como ariletanona (1,9 g, 10,7 mmol), dimetilcarbonato (24 mL) e hidreto de sódio (4,75

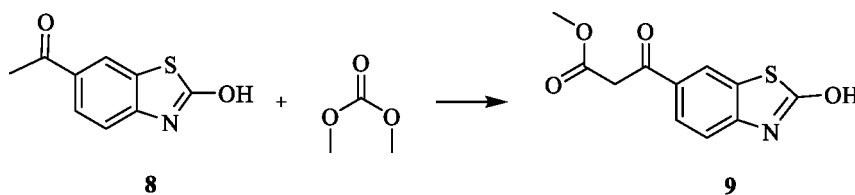
g, 118 mmol). Após processamento e purificação, o composto 11 foi obtido (m = 580 mg, 23%). ^1H RMN (400 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm) 11,94 (s, 2H), 7,77 (dd, J = 8,4, 1,8 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 1,7 Hz, 2H), 7,44 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,23 (s, 3H), 3,64 (s, 6H).

Intermediário 13: 3- (benzofuran-5-il) -3-oxopropanoato de metila



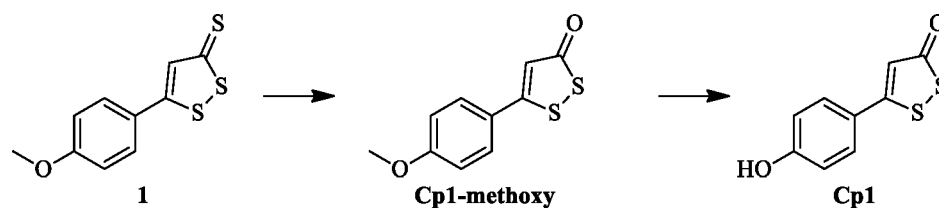
[424] A reação foi realizada de acordo com o procedimento geral de alquilação A, usando 12 como ariletanona (1,45 g, 9,06 mmol), dimetilcarbonato (25 mL) e hidreto de sódio (2,17 g, 90,6 mmol). Após processamento e purificação, o composto 13 foi obtido (m = 1,58 g, 80%). ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 8,35 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,98 - 8,01 (m, 1H), 7,89 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,00 - 7,01 (m, 1H), 4,17 (s, 2H), 3,65 (s, 3H).

Intermediário 9: 3- (2-hidroxibenzo [d] tiazol-6-il) -3-oxopropanoato de metila



[425] Um balão de fundo redondo de 100 mL equipado com agitador magnético foi carregado com hidreto de sódio (60% em óleo mineral) (1 g, 48 mmol), dimetilcarbonato (4,2 mL) e tetra-hidrofurano (30 mL). A ariletanona comercial **8** (1,94 g, 10 mmol) em tetra-hidrofurano (30 mL) foi adicionada lentamente com agitação e o todo foi submetido a refluxo por 72 h. A mistura foi vertida lentamente em água, acidificada com cloreto de amônio saturado (50 mL) e extraída com acetato de etila. A camada orgânica foi lavada com água (50 mL) e seca sobre Na₂SO₄ anidro. Após evaporação sob pressão reduzida, o material em bruto foi purificado por cristalização em acetato de etila para dar o correspondente 3-oxo-3-arylpropanoato de metila **9** (m = 1,89 g, 75%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 12,33 (s, 1H), 8,24 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 7,89 (dd, J = 8,4, 1,8 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,17 (s, 2H), 3,65 (s, 3H).

Síntese do composto **Cp1**

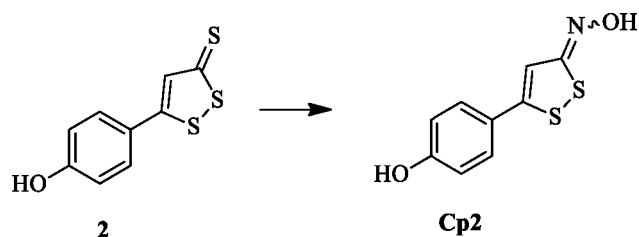


[426] **Etapa 1.** Cp1-metoxi: 5-(4-metoxifenil)-3H-1,2-ditio-3-ona. Foi adicionado acetato de mercúrio (II) (4 g, 12,5 mmol) a uma solução de ditona **1** comercial (1 g, 4,16 mmol) em mistura de ácido acético (v = 25 mL) e clorofórmio

(v = 80 mL). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. O conjunto foi filtrado e evaporado. O sólido obtido foi cromatografado em sílica gel (éter de petróleo: acetona = 90: 10) para dar um Cp1-metoxi sólido amarelo (800 mg, 85% de rendimento). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,59 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,98 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,77 (s, 1H), 3,88 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 194,29, 170,13, 162,52, 128,08, 125,08, 116,30, 114,75, 55,60.

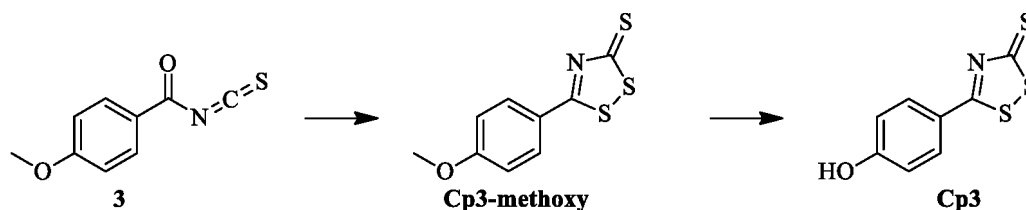
[427] **Etapa 2.** Cp1: 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditio1-3-ona. Uma mistura de éter metil aril Cp1-metoxi (410 mg, 1,83 mmol) e cloridrato de piridina (630 mg, 5,5 mmol) foi colocada em um balão de fundo redondo e submetida a irradiação de micro-ondas a 250 W por 5 minutos. Após a conversão completa, a mistura de reação foi passada através de uma cromatografia em coluna (diclorometano: metanol = 97: 3) para dar a ditio1 Cp1 (m = 70 mg, 10% de rendimento). ^1H RMN (400 MHz, Acetona- D_6) δ (ppm) 9,31 (s, 1H), 7,80 - 7,66 (m, 2H), 7,05 - 7,00 (m, 2H), 6,98 (s, 1H). ^{13}C RMN (101 MHz, Acetona- D_6) δ (ppm) 192,95, 170,48, 161,08, 160,96, 128,34, 123,94, 116,25, 116,16, 115,17.

Síntese do composto Cp2



[428] Cp2: 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditíol-3-ona oxima. Adicionou-se cloridrato de hidroxilamina (140 mg, 2 mmol) a uma solução de ditiona 2 comercial (224 mg, 1 mmol) e acetato de sódio (165 mg, 2 mmol) em etanol ($v = 5$ mL). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite e depois concentrada sob pressão reduzida. O sólido obtido foi cromatografado em sílica gel (diclorometano) para dar a ditiona Cp2 ($m=51$ mg, 32%) como um sólido vermelho. ^1H RMN (400 MHz, DMSO-D_6) δ (ppm) 11,55 (s, 1H), 10,08 (s, 1H), 7,51 (d, $J=8,7$ Hz, 2H), 7,07 (s, 1H), 6,84 (d, $J=8,7$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO-D_6) 5 (ppm) 161,99, 159,83, 153,46, 128,36, 123,71, 116,30, 112,77.

Síntese do composto Cp3



Ref.: MacDonald & McKinnon, 1967. *Can. J. Chem.* **45** (11):1225-1229

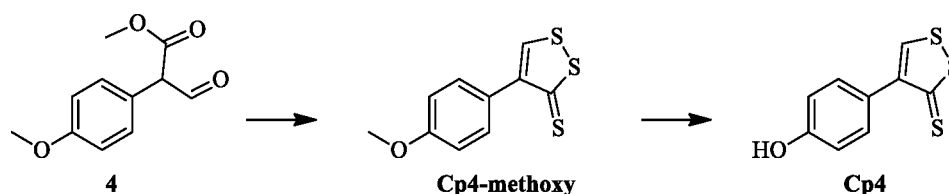
[429] **Etapa 1.** Cp3-metoxi: 5-(4-metoxifenil)-3H-1,2,4-ditiazole-3-tiona. O isotiocianato comercial 3 (3 g, 15,5 mmol) e pentassulfeto de fósforo (6 g, 13,5 mmol) em

dissulfeto de carbono (18 mL) foram colocados em um balão de fundo redondo e submetidos a irradiação de micro-ondas a 65W por 15 minutos. Após a conversão completa, a solução foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo oleoso foi tratado com etanol (aproximadamente 30 mL) e arrefecido a 0 °C. As frações em bruto foram filtradas e recristalizadas a partir de (diclorometano: etanol = 1: 1) para dar um Cp3-metoxi sólido amarelo (m = 220 mg, 7% de rendimento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8,12 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,26 (s, 1H), 7,00 (d, J = 9,0 Hz, 3H), 3,92 (s, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 185,35, 160,71, 126,65, 119,04, 110,23, 51,10.

[430] **Etapa 2.** Cp3: 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2,4-ditiazole-3-tiona. Uma mistura de éter metil arílico Cp3-metoxi (300 mg, 1,25 mmol) e diclorometano (v = 6 mL) foi colocada em um balão de fundo redondo e resfriada a 0 °C. Adicionou-se lentamente tribrometo de boro, 1M em diclorometano (v = 6 mL, 6 mmol) e o conjunto foi agitado durante a noite. Após a conversão completa, a mistura reacional foi vertida em água para dar uma suspensão. O sólido foi removido por filtração e lavado com água. A precipitação em diclorometano produz o fenol desejado Cp3 (m = 270 mg, 95%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 11,09 (s, 1H), 8,07 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,97 (d, J = 8,8 Hz, 2H). ¹³C

RMN (101 MHz, DMSO-D₆) 5 (ppm) 214,93, 191,66, 165,12, 132,15, 122,22, 117,20.

Síntese do composto Cp4



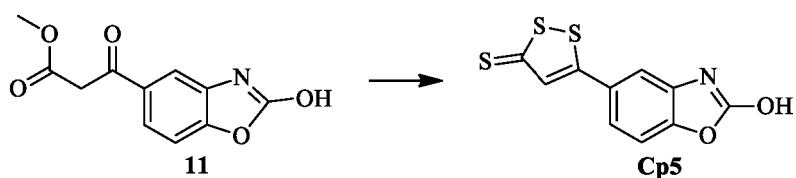
Ref.: Brown et al., 2014. *Bioorg Med Chem Lett.* **24 (24)**:5829-5831

[431] **Etapa 1.** Cp4-metoxi: 4-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditíol-3-tiona. A mistura de 2-(4-metoxifenil)-3-oxopropanoato de metila 4 (3,79 g, 19,52 mmol), reagente de Lawesson (7,89 g, 19,52 mmol) e enxofre (313 mg, 9,59 mmol) em 250 mL de tolueno foram aquecidos sob refluxo por 270 minutos. Quando a reação foi concluída, a mistura foi filtrada e o filtrado foi concentrado. A purificação por cromatografia em coluna (éter de petróleo: acetona = 10: 1) permitiu a um sólido vermelho. O sólido obtido foi lavado com éter e cristalizado em acetona para dar Cp4-metoxi (1,56 g, 33% de rendimento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 5 (ppm) 8,37 (s, 1H), 7,50 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,97 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 3,84 (s, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) 5 (ppm) 214,12, 160,10, 153,04, 149,08, 130,28, 125,43, 113,88, 55,35.

[432] **Etapa 2.** Cp4: 4-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditíol-3-tiona. Uma mistura de éter metil aril Cp4-metoxi (171 mg, 0,71 mmol) e cloridrato de piridina (264 mg, 0,86 mmol) foi

colocada em um balão de fundo redondo e sujeita a irradiação de micro-ondas a 250 W por 5 minutos. Após a conversão completa, a mistura reacional foi passada através de uma cromatografia em coluna (diclorometano: metanol = 97: 3) para dar a ditona Cp4 (m = 51 mg, 32%). ^1H RMN (400 MHz, acetona- D_6) δ (ppm) 8,94 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 7,50 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 8,6 Hz, 1H).

Síntese do composto Cp5

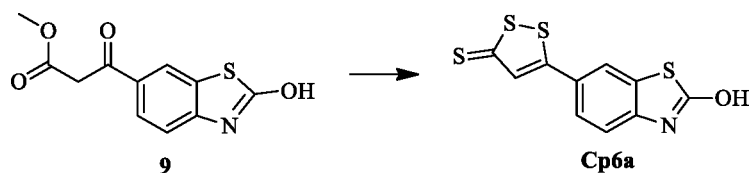


[433] **Procedimento geral B.** O pentassulfureto de fósforo (0,7 mmol), o enxofre (1 mmol), o hexametildisiloxano HMDO (3 mmol) são aquecidos em xileno (2,5 mL) a 145 °C a 5 5 °C. O 3-oxo-3-arylpropanoato de metilo apropriado é adicionado por porções e a mistura reacional é aquecida sob refluxo durante 1 h onde a reação está terminada. Posteriormente, as tions brutas são filtradas e os filtrados são concentrados. A purificação por cromatografia em coluna e cristalizações permite dar a correspondente arilditiona.

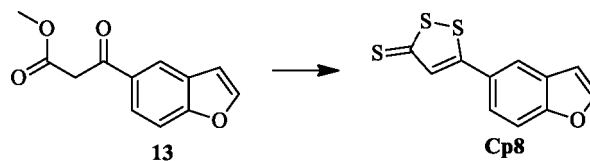
[434] Cp5: 5-(2-hidroxibenzo[d]oxazol-5-il)-3H-1,2-ditíol-3-tiona. A síntese do composto Cp5 foi realizada de acordo com o procedimento geral de tionação B, usando o intermediário 11 (580 mg, 2,47 mmol), P_4S_{10} (658 mg, 1,53 mmol), enxofre (79 mg, 2,55 mmol), HMDO (0,76 mL, 7,65 mmol)

e xileno (5 mL). Após o processamento, a rápida purificação em sílica gel (THF) e a cristalização em etanol e acetona, Cp5 (m = 70 mg) foram obtidas como um sólido vermelho-escuro. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm) 12,07 (s, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,66 (dd, J = 8,4, 2,0 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 1,8 Hz), 1H), 7,45 (d, J = 8,4 Hz, 1H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm) 215,73, 173,92, 154,61, 146,65, 136,06, 132,07, 127,48, 122,31, 110,94, 108,69.

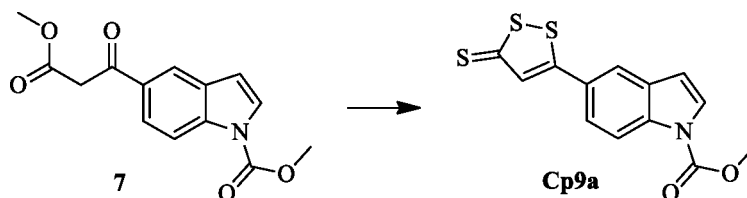
Síntese do composto Cp6a



[435] CP6a: 5- (2-hidroxibenzo [d] tiazol-6-il) -3H-1,2-ditíol-3-tiona. A reação foi realizada de acordo com o procedimento geral de tionação B usando o intermediário 9 (700 mg, 2,55 mmol), P_4S_{10} (680 mg, 1,53 mmol), enxofre (81,5 mg, 2,55 mmol), HMDO (1,63 mL, 7,65 mmol), e xileno (6 mL). Após o processamento, foi obtida purificação rápida em sílica gel (THF) e posterior purificação por fase reversa em C18 (gradiente de acetonitrila: água) Cp6a (m = 6,7 mg) como um sólido vermelho. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm) 8,26 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,84 (dd, J = 8,4, 1,9 Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,22 (d, J = 8,4 Hz, 1H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm) 173,85, 170,59, 144,13, 140,39, 135,24, 126,37, 125,48, 122,20, 112,62.

Síntese do composto **Cp8**

[436] Cp8: 5-(benzofuran-5-il)-3H-1,2-ditíol-3-tiona. A reação foi realizada de acordo com o procedimento geral de tionação B, usando o intermediário 12 (1,58 g, 7,25 mmol), P₄S₁₀ (1,93 g, 4,35 mmol), enxofre (232 mg, 7,25 mmol), HMDO (0,76 mL, 21,7 mmol) e xileno (15 mL). Após o processamento, a rápida purificação em sílica gel (diclorometano) e a cristalização em etanol e acetona, Cp8 (m = 890 mg) foram obtidas como um sólido amarelo. H RMN (400 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 8,26 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 8,14 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,86 - 7,81 (m, 3H), 7,75 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,06 (dd, J = 2,2, 0,9 Hz, 1H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 215,64, 174,84, 156,73, 148,51, 135,82, 128,82, 126,87, 124,25, 121,26, 113,04, 107,68.

Síntese do composto **Cp9a**

[437] Cp9a: 5-(3-tioxo-3H-1,2-ditíol-5-il)-1H-indole-1-carboxilato de metila. A reação foi realizada de acordo com o procedimento geral de tionação B usando o intermediário 7

(700 mg, 2,55 mmol), P_4S_{10} (680 mg, 1,53 mmol), enxofre (81,5 mg, 2,55 mmol), HMDO (1,63 mL, 7,65 mmol), e xileno (6 mL). Após o processamento, a rápida purificação em sílica gel (THF) e a cristalização em etanol e acetona, obtivemos Cp9a ($m = 55$ mg) como um sólido vermelho-escuro. 1H NMR (400 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm) 8,20 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 7,81 (s, 1H), 7,69 (dd, $J = 8,7, 1,8$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,49 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 6,59 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 3,84 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm) 176,78, 138,90, 134,27, 132,59, 128,85, 122,84, 120,72, 111,52, 102,57, 34,12, 33,24, 31,09.

EXEMPLOS DE BIOLOGIA

Exemplo 1: AOL não afeta a fosforilação oxidativa mitocondrial

Material e métodos

Procedimentos animais e declaração de ética

[438] Todas as experiências descritas foram realizadas de acordo com o Guia do Conselho Nacional e Europeu de Pesquisa para o cuidado e uso de animais de laboratório. P. Diolez possui uma licença válida para realizar experimentos em animais pelo Serviço Veterinário da Saúde e da Proteção Animal do Ministère de l'agriculture et de la Forêt, France (17/03/1999, número de licença 3308010).

Materiais

[439] Todos os produtos químicos eram de grau reagente, adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO), exceto sacarose e NADH oxidase (que foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha)). O composto tritioanetol (AOL, correspondente a 5- (4-metoxifenil) -3H-1,2-ditio1-3-tiona) foi um presente da empresa privada GMPO (Paris, França). Solução-mãe de 15 mM foi preparada em DMSO e mantida no escuro a 0 °C por apenas alguns dias.

Isolamento de mitocôndrias

[440] Camundongos Wistar machos (250-325 g; obtidos da Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, França) foram mortos por deslocamento deslumbrante e cervical, e o coração foi rapidamente removido e lavado em meio de isolamento a frio contendo sacarose 100 mM, 180 mM KCl, Tris 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 10 mM e BSA desengordurada a 0,1% (p/v) (pH 7,2).

[441] O isolamento das mitocôndrias cardíacas foi realizado em câmara fria. Antes da homogeneização, os corações (cerca de 1,5 g) foram picados com tesoura e tratados por 5 minutos em 5 mL do mesmo meio suplementado com protease (2 mg de proteinase bacteriana tipo XXIV por mL de tampão de isolamento) com agitação. A suspensão de tecido foi vertida em um homogeneizador Potter de vidro de 50 mL, diluído com 20 mL de tampão de isolamento e depois homogeneizado por 3 minutos usando um pilão de Teflon motorizado. O homogenato foi filtrado através de pano

parafusado (Sefar Nitex) para remover detritos e centrifugado a 8.000 g por 10 minutos. O sedimento resultante foi lavado com 5 mL de tampão de isolamento, ressuspenso em 25 mL do mesmo tampão e depois indivíduo a centrifugação em baixa velocidade (400 g) por 8 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado duas vezes a 7.000 g por 15 minutos para produzir um sedimento mitocondrial lavado que foi suavemente ressuspenso em 150 mL de tampão de isolamento. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Sigma, kit # B6916) usando BSA como padrão. As mitocôndrias foram mantidas em gelo a uma concentração final de 40-50 mg/mL por menos de 5 horas.

Respiração mitocondrial

[442] As taxas de consumo de oxigênio das mitocôndrias cardíacas (0,1 mg/mL), incubadas na ausência ou na presença de AOL em doses crescentes (de 0 a 80 μ M de concentração final), foram registradas polarograficamente sob agitação constante a 25 °C usando um oxímetro de alta resolução (Oxygraph-2K, Oroboros Instruments, Áustria). O meio de respiração consistia em sacarose 140 mM, KCl 100 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM e BSA a 1 g/L (p/v) de BSA, essencialmente livre de ácidos graxos (pH 7,2).

Produção mitocondrial de ERO/H₂O₂

[443] As taxas de produção de ERO/H₂O₂ das mitocôndrias cardíacas foram avaliadas através da oxidação do indicador

incolor e não fluorescente Amplex Red na presença de peroxidase de rábano silvestre (HRP, EC 1.11.1.7, Sigma). O H_2O_2 reage com o Amplex Red em uma estequiometria 1: 1, produzindo o composto fluorescente resorufina (excitação: 560 nm; emissão: 585 nm) que é estável após a formação. A fluorescência foi medida continuamente com um espectrofluorômetro equipado com controle de temperatura e agitação (SAFAS Xenius, Monaco). As mitocôndrias isoladas (0,1 mg/mL) foram incubadas no mesmo tampão experimental do que anteriormente, suplementadas com 15 μM de Amplex Red e 10 $\mu\text{g/mL}$ de HRP. Glutamato (5 mM)/malato (2,5 mM) juntamente com succinato (5 mM) foram utilizados como substratos complexos I e II, respectivamente. As experiências foram conduzidas sob condições não fosforilantes na presença de atractillosida 15 μM , isto é, sob condições do estado IV em que a membrana mitocondrial é máxima. Posteriormente, rotenona (1,5 μM), antimicina A (2 μM) e mixotiazol (0,2 μM) foram adicionados sequencialmente para inibir os centros redox na cadeia de transferência de elétrons (Figura 2), a saber, sítios I_Q , I_F (com rotenona), III_{Q_i} (com antimicina A) e III_{Q_o} (com mixotiazol). O ensaio foi finalmente calibrado com quantidades conhecidas de H_2O_2 (etapas de 300 nM), na presença de todos os compostos relevantes, incluindo AOL. O teste de controle da ausência de efeito da AOL no próprio ensaio Amplex Red e a produção de NAD(P)H oxidase ERO/ H_2O_2

foram realizadas na ausência de mitocôndrias cardíacas e na presença de NAD(P)H oxidase (EC 1.6. Soluções de 3,3, 5 mU/mL, Sigma) e NADH (100 μ M).

Resultados

[444] Verificamos primeiro (Figura 1) que o composto AOL não afetou a fosforilação oxidativa diretamente nas mitocôndrias isoladas do coração de camundongos. Isso foi realizado usando o método agora clássico do oxígrafo. As mitocôndrias foram primeiro incubadas com várias concentrações de AOL (5 a 80 μ M) e, em seguida, foi adicionado substrato respiratório (estado do substrato, curva preta), seguido de uma concentração de ADP saturada para obter a taxa de fosforilação oxidativa máxima (curva cinza) e, finalmente, a adição de atractillosida (ATR) que inibe o translocador ADP/ATP e fornece a taxa de vazamento mitocondrial sob condições não fosforilantes (Figura 1A). Os outros painéis da Figura 1B-D apresentam os resultados obtidos com diferentes combinações de substratos respiratórios: glutamato + malato que alimentam elétrons ao complexo I, succinato (+ rotenona) para o complexo II e glutamato + malato + succinato para alimentar elétrons para ambos os complexos. Esta última combinação de substrato foi escolhida por se assemelhar mais às condições *in vivo* em que o ciclo de Krebs funciona e o succinato e o NADH são oxidados pela cadeia respiratória. Os resultados indicam que

estatisticamente não foram observadas diferenças na presença de AOL para a grande variedade de concentrações testadas (Figura 1), demonstrando nessas condições a ausência de efeito da AOL na fosforilação oxidativa mitocondrial - ou seja, na atividade da cadeia respiratória e Síntese de ATP - assim como na integridade da membrana interna mitocondrial (taxa de vazamento, após adição de ATR). Este último resultado indica que a AOL não afeta o rendimento da fosforilação oxidativa. Juntos, todos esses resultados confirmam a ausência de qualquer efeito prejudicial da AOL, documentado pelo uso deste medicamento para a saúde humana por um longo tempo.

Exemplo 2: AOL inibe a produção de superóxido/H₂O₂ pelas mitocôndrias

[445] Como dito anteriormente, a produção de ERO mitocondrial é altamente dependente da atividade e condições mitocondriais. Embora tenhamos testado os efeitos da AOL na produção de ERO pelas mitocôndrias sob inúmeras condições, optamos por apresentar aqui, por uma questão de clareza, apenas os resultados mais demonstrativos dos efeitos muito específicos da AOL. Como já discutido, a presença da combinação de substrato (isto é, glutamato, malato e succinato) (Figura 2A), fornecendo os elétrons para toda a cadeia respiratória, é a mais representativa das condições *in situ* na célula onde o metabolismo é ativo. Além disso, a

produção mitocondrial máxima de ERO/ H_2O_2 não ocorre sob condições de alta fosforilação mitocondrial, mas sob condições de alta redução de carreadores de elétrons, isto é, baixa ou nenhuma fosforilação. Essas condições são cumpridas na presença de ATR (inibição do translocador ATP/ADP pelo ATR, (Figura 1) e pudemos verificar efetivamente que a adição de ATR sob condições de saturação de ADP desencadeou a produção de ERO que estava no limite de detecção sob condições máximas de fosforilação (resultados não mostrados). Sob essas condições, as EROs são produzidas em diferentes sítios da cadeia respiratória (Orr et al., 2013. Free Radic. Biol. Med. 65: 1047-1059; Quinlan et al., 2013. Redox Biol. 1: 304-312) (Figura 2) Os principais sítios de produção estão sítioizados nos complexos I e III, onde ocorrem grandes mudanças na energia potencial dos elétrons (Balaban et al., 2005. Cell. 120 (4): 483-495; Goncalves et al., 2015. J. Biol. Chem. 290 (1): 209-27), que também permitem o bombeamento de prótons nesses sítios.

[446] Projetamos uma série de titulações de inibidores para decifrar a ação da AOL na produção de ERO por toda a cadeia respiratória sob condições de produção máxima de ERO (Figura 2E). Na ausência de inibidores específicos dos complexos, a produção de ERO é máxima e provém principalmente do transporte reverso de elétrons no sítio I_0 (Figura 2A). É crucial observar que as ERO produzidas pelo complexo I, seja

pelo sítio I_Q (sítio da quinona) ou pelo sítio I_F (sítio da flavina), são entregues no lado interno da matriz da membrana mitocondrial interna. Após a adição de rotenona, um inibidor clássico do complexo I que se liga especificamente ao I_Q , a produção de ERO diminui fortemente e ocorre quase inteiramente no sítio III_{QO} e uma produção restante no sítio I_F . Se devido à presença de substratos do complexo I e produção de NADH que não são inibido pela rotenona (Figura 2B). A adição subsequente de antimicina A, um inibidor da transferência de elétrons para o citocromo c, causa um aumento na proporção reduzida de quinona oxidada, que ainda é reduzida pela atividade do complexo II e, portanto, um aumento concomitante da produção de ERO no sítio III_{QO} (Figura 1C). Finalmente, a adição de mixotiazol, um inibidor do complexo III sítio III_{QO} , abole a produção do complexo III ERO e a produção muito baixa restante pode ser atribuída ao sítio da flavina do complexo I, para o qual não temos inibidor conhecido (Goncalves et al., 2015. J. Biol. Chem. 290 (1): 209-27).

[447] A Figura 3 ilustra o efeito da presença de concentrações crescentes de AOL (de 5 a 80 μM) na produção de ERO/ H_2O_2 medida nas diferentes condições definidas na Figura 2. Parece claramente a partir dos resultados apresentados nesta figura que apenas a AOL afeta a produção de ERO medida na ausência de inibidor, em aproximadamente

80%, enquanto não foram observadas diferenças estatísticas com esse intervalo de concentrações de AOL em ERO/H₂O₂ medido sob as outras condições. Como pode ser visto na Figura 2, esta condição específica (somente ATR presente) é a única condição em nosso ensaio em que as EROs são produzidas pelo complexo I (sítio I_Q). Quando a rotenona é adicionada ao ensaio, a produção de ERO/H₂O₂ parece insensível à AOL, mesmo em altas concentrações, independentemente do sítio envolvido. A clara ausência de efeito em vários sítios de produção de ERO mitocondrial não é apenas surpreendente, mas também faz perguntas interessantes sobre o próprio mecanismo de ação da AOL nas mitocôndrias. De fato, esses resultados descartam a hipótese básica do modo de ação da AOL descrito nos artigos anteriores e na base da patente para seu uso terapêutico. Esses resultados demonstram efetivamente que a AOL não é um limpador radical; caso contrário, sua ação seria independente da origem dos ERO. No entanto, como a AOL claramente diminui fortemente a produção de ERO pelo complexo I no sítio I_Q, e somente nesse sítio, temos a evidência de que a AOL inibe especificamente a formação de ERO nesse sítio.

[448] Embora o mecanismo ainda precise ser investigado, são apresentadas evidências de que o composto AOL interfere especificamente com o complexo mitocondrial I e inibe seletivamente a produção de superóxido a partir do sítio de

ligação à ubiquinona do complexo I (sítio I_0), sem efeitos na produção de superóxido de outros sítios ou na fosforilação oxidativa. Até onde sabemos, há apenas um composto com propriedades comparáveis que foi descrito recentemente, a N-ciclo-hexil-4-(4-nitrofenoxi) benzenossulfonamida (Orr et al., 2013. Free Radic. Biol. Med. 65: 1047- 1059). Assim como a AOL, esse composto não modifica a atividade do complexo I como componente da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa.

[449] A especificidade da AOL foi ainda testada *in vitro* usando o sistema peroxidase-Amplex Red utilizado para a medição de ERO/H_2O_2 por mitocôndrias, que na verdade mede a aparência de H_2O_2 pela oxidação de Amplex Red à resorufina fluorescente (ver Figura 4) Na ausência de mitocôndrias e ao adicionar um sistema produtor de H_2O_2 ao sistema de medição, foi possível testar o efeito da AOL nesse sistema. Isto foi realizado usando NAD(P)H oxidase comercial que produz H_2O_2 na presença de NAD(P)H adicionado e medindo a redução de Amplex Red em resorufina (Figura 4). Não observamos qualquer inibição da fluorescência nessas condições, que excluem qualquer efeito da AOL na NAD(P)H oxidase ou na atividade da peroxidase (resultados não mostrados). Esses resultados confirmam que a AOL não interfere no sistema de medição nem interage diretamente com o H_2O_2 . Curiosamente, esses resultados também demonstram que a AOL não inibe a produção

de ERO/ H_2O_2 pela NADP(H) oxidase, que é um - se não o - maior produtor de ERO/ H_2O_2 não mitocondrial nas células. O esquema da Figura 4 recapitula as diferentes informações sobre o modo de ação da AOL na produção de ERO/ H_2O_2 pelas mitocôndrias e NAD(P)H oxidase e enfatiza a especificidade muito alta demonstrada aqui. Esses resultados estão em flagrante contraste com afirmações anteriores sobre o efeito putativo da AOL como eliminador radical.

[450] Quando testada em mitocôndrias isoladas do coração de camundongos, a AOL diminui efetivamente a produção de ERO/ H_2O_2 mitocondrial (nas mitocôndrias isoladas, o H_2O_2 é produzido a partir da redução de ERO pela superóxido dismutase mitocondrial). No entanto, os resultados apresentados aqui demonstram claramente que a AOL não atua como um simples antioxidante ou limpador de radicais. Embora os antioxidantes sejam eliminadores gerais de ERO/ H_2O_2 , a AOL apresenta uma seletividade completa em relação à formação de ERO pelo sítio I_0 no complexo I, o que demonstra que a AOL não interage simplesmente com radicais superóxido, mas impede especificamente sua formação no complexo I. A esse respeito, A AOL, portanto, aparece como membro de uma nova classe de protetores de estresse oxidativo, cujo único membro foi descrito muito recentemente (Orr et al., 2013. Free Radic. Biol. Med. 65: 1047-1059). Enquanto os antioxidantes geralmente não interferem diretamente no transporte de

elétrons e eliminam as ERO e/ou H_2O_2 a jusante da produção e, portanto, nunca podem suprimir totalmente o efeito das EROs (Orr et al., 2013. Free Radic. Biol. Med. 65: 1047-1059), A AOL pode agir de maneira diferente, impedindo a formação de ERO e, portanto, sendo mais ativa para proteger as mitocôndrias de seus próprios ERO.

[451] Os dados aqui apresentados vão além e demonstram que a AOL é um inibidor específico da formação de ERO no sítio I_Q do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. No entanto, são necessárias experiências adicionais para verificar se a AOL não tem efeito algum em outros sítios mitocondriais, mas isso não impede as conclusões acima. Também mostramos aqui algumas evidências de que a AOL pode interagir apenas com mitocôndrias sem afetar a formação de radicais de oxigênio no citosol e, portanto, não afetaria a sinalização intracelular.

[452] A inibição da atividade do complexo I pela rotenona ou pela neurotoxina MPP^+ tem sido associada ao parkinsonismo em roedores e humanos, sugerindo uma ligação entre o complexo I disfuncional, a produção de ERO e a neurodegeneração (Langston et al., 1983. Science. 219 (4587): 979-980; Betarbet et al., 2000. Nat. Neurosci. 3 (12): 1301-1306). Por outro lado, análises comparativas mostram uma relação inversa entre a produção máxima de superóxido/ H_2O_2 do sítio I_Q , mas não o sítio I_F , e a vida útil máxima em diversas

espécies de vertebrados (Lambert et al., 2007. Aging Cell. 6 (5): 607- 618; Lambert et al., 2010. Aging Cell. 9 (1): 78-91). Portanto, moduladores seletivos da produção de superóxido/H₂O₂ do sítio I_Q ou sítio I_F ofereceriam oportunidades únicas para investigar o papel putativo da produção de ERO mitocondrial em processos normais e patológicos (Orr et al., 2013. Free Radic. Biol. Med. 65: 1047-1059). Existem também algumas especulações, mesmo controversas, de que o sítio III_Q - não afetado pela AOL - desempenha um papel importante na sinalização celular durante a hipóxia.

[453] Em conclusão, parece que as propriedades da AOL podem representar um avanço na busca de moduladores específicos da produção de ERO/H₂O₂ nas células. Esta é uma questão importante atualmente na pesquisa, e a AOL tem uma enorme vantagem em relação às moléculas recém-descobertas, uma vez que já está autorizada para uso humano.

- AOL atua a montante da produção de ERO, garantindo, portanto, maior proteção que os antioxidantes clássicos;

- AOL atua especificamente na produção de ERO mitocondrial;

- AOL garante proteção mitocondrial, crucial para inúmeras doenças, principalmente cardíacas;

- AOL não interfere na sinalização celular;

- A AOL atua especificamente no I_Q do sítio no complexo I, que é o principal sítio mitocondrial e pode estar implicado em doenças importantes, incluindo a doença de Parkinson e a fibrilação cardíaca.

[454] A AOL pode representar o primeiro membro de uma nova classe de "protetores" que impedem especificamente a produção de ERO nas mitocôndrias e, portanto, pode ser usada para proteção mitocondrial durante vários estresses oxidativos e, portanto, prevenir doenças, com muito pouco efeito colateral na sinalização essencial de ERO celular.

Exemplo 3: Efeito da AOL em uma doença cardiovascular: diabetes

Efeito do composto AOL na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) em ilhotas pancreáticas de camundongo

[455] O objetivo do estudo foi investigar a capacidade do composto AOL em modular a secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos.

Material e métodos

[456] As experiências foram conduzidas em estrita conformidade com as recomendações da União Europeia (2010/63/EU) e foram aprovadas pelo Ministério da Agricultura e Pescas da França (autorização n° 3309004) e pelo comitê de ética local da Universidade de Bordeaux. Foram

feitos esforços máximos para reduzir o sofrimento e o número de animais utilizados.

[457] Foram realizadas três experiências independentes e, para cada um deles, dois camundongos foram sacrificados e as ilhotas foram isoladas de acordo com o procedimento descrito a seguir.

[458] Ilhotas pancreáticas foram isoladas pelo método de digestão com collagenase. Resumidamente, o pâncreas foi inflado com solução de Hanks contendo 0,33 mg/mL de collagenase (Sigma-Aldrich), glicose 5,6 mM e albumina sérica bovina a 1%, pH 7,35, removido e mantido a 37 °C por 6-9 minutos. Após digestão tecidual e remoção exócrina por três lavagens consecutivas, as ilhotas foram coletadas manualmente, sob lupa binocular. As ilhotas foram deixadas se recuperando da digestão cultivando por 20-24 horas em meio RPMI-1640 contendo glicose 11 mM (Invitrogen, CA, EUA) e suplementadas com glutamina 2 mM, 200 UI/mL de penicilina, 200 µg/mL de estreptomicina e 8% soro bovino fetal sem o carvão-dextrano (Invitrogen).

[459] Para cada experimento estático de GSIS, as ilhotas de dois camundongos foram incubadas pela primeira vez por 2 horas a 37 °C em 3 mL de solução tampão de Krebs-bicarbonato (em mM): 14 NaCl, 0,45 KCl, 0,25 CaCl₂, 0,1 MgCl₂, 2 HEPES e 3 de glicose, equilibrado com uma mistura de 95% de O₂: 5% de CO₂, pH 7,4. Em seguida, grupos de cinco ilhotas com

tamanhos correspondentes foram transferidos para cavidades de placas de 24 cavidades com 0,5 mL de tampão fresco contendo um dos seguintes estímulos: glicose 3 mM (Glc) e glicose 11 mM mais veículo (DMSO a 0,4% em bicarbonato de Krebs tampão) ou 11 mM de glicose mais o fármaco diluído a ser testado (10 μ M ou 20 μ M de AOL no veículo) e incubados por mais 1 hora. Foram utilizadas seis cavidades diferentes para cada condição experimental. No final da incubação, albumina bovina foi adicionada a cada cavidade para uma concentração final de 1% e a placa foi colocada a 4 °C por 15 minutos para interromper a secreção de insulina. Em seguida, a mídia foi coletada e armazenada a -20 °C para medição subsequente do conteúdo de insulina por ELISA (kit da Mercodia, Uppsala, Suécia), de acordo com as instruções do fabricante. A secreção de insulina em cada cavidade foi calculada como ng de insulina por ilhota e por hora de incubação e depois expressa como porcentagem de secreção de insulina no grupo veículo de glicose 11 mM, que foi considerado 100%.

A descrição dos grupos experimentais é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1.

Abreviação do grupo	3 mM Glc-Veh	11 mM Glc-Veh	11 mM Glc + AOL 10 μ M	11 mM Glc + AOL 20 μ M
Definição de grupo	Grupo tratado com veículo e 3 mM de glicose	Grupo tratado com veículo e 11 mM de glicose	Grupo tratado com AOL 10 μ M e 11 mM de glicose	Grupo tratado com AOL 20 μ M e 11 mM de glicose
Número de cavidades	4-6	5-6	4-6	6

Resultados

[460] Os valores individuais de secreção de insulina obtidos em cada uma das três experiências foram combinados e calculados a média. Estes são expressos como a porcentagem relativa de secreção de insulina, normalizada no grupo veículo de glicose 11 mM (Figura 5).

[461] A análise combinada dos dados mostra que a AOL aumentou o GSIS em 10 e 20 μ M, mostrando uma potência semelhante, com um aumento de GSIS variando em torno de 65-75% em comparação com o grupo de veículo com glicose 11 mM (ANOVA unidirecional; pós-teste de Bonferroni) para análise estatística, consulte a Tabela 2.

Tabela 2.

	ANOVA unidirecional	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F	P
Experiência n° 1	Tratamento	50630	3	16880	18,36	< 0,0001
	Residual	16540	18	919,0		
Experiência n° 2	Tratamento	44790	3	14930	21,46	< 0,0001
	Residual	12530	18	695,9		
Experiência n° 3	Tratamento	193700	3	64570	35,16	< 0,0001
	Residual	33060	18	1837		
Experimentos combinados	Tratamento	244100	3	81360	33,13	< 0,0001
	Residual	152200	62	2455		

Conclusão

[462] O estudo demonstra que a AOL, nas doses testadas (10 e 20 µM), melhora o GSIS e estimula significativamente a secreção de insulina *in vitro*, em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos.

[463] Assim, esses achados sugerem que a AOL pode ser particularmente útil em condições patológicas nas quais a secreção de insulina é deficiente, como diabetes, incluindo diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 e outros tipos de diabetes, como MODY (Diabetes com início na maturidade dos jovens).

Efeitos de um tratamento crônico com AOL na ingestão de alimentos, peso corporal e metabolismo da glicose em camundongos obesos induzidos por dieta

Material e métodos

[464] O objetivo do estudo foi determinar se o composto AOL, administrado diariamente nas doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg por até cinco semanas por administração intraperitoneal (i.p.) diária em camundongos obesos induzidos por dieta (DIO)

alimentados com uma dieta rica em gorduras (HFD), modifica a ingestão de alimentos, o peso corporal, a adiposidade e o metabolismo da glicose.

[465] Os camundongos foram alimentados *ad libitum* com um HFD (60% de calorias provenientes de gordura, principalmente banha) por doze semanas antes do início do estudo farmacológico. Os animais receberam AOL ou seu veículo por administração intraperitoneal (i.p.) e foram mantidos em HFD durante todo o estudo. A ingestão de alimentos e o peso corporal foram medidos diariamente e registrados por até três semanas consecutivas.

[466] Para distribuição apropriada dos camundongos nos diferentes grupos experimentais antes do início do estudo farmacológico, avaliamos sua composição corporal *in vivo* usando uma Echo MRI 900 (EchoMedical Systems, Houston, Texas, EUA) (ver também Cardinal et al., 2014 Mol. Metab. 3 (7): 705-16; Cardinal et al., 2015. Endocrinology. 156 (2): 411-8). As medições diárias da ingestão alimentar e do peso corporal foram obtidas utilizando uma balança (modelo TP1502, Denver Instruments).

[467] Trinta camundongos machos C57/Bl6J de 7 semanas de idade chegaram ao laboratório em 25 de fevereiro de 2016 e foram submetidos a uma primeira análise de composição corporal *in vivo* (Echo MRI 900, EchoMRI Systems) após 1 semana de adaptação à sala experimental. Após esta primeira

análise por ressonância magnética, os animais foram alimentados com uma dieta rica em gordura (HFD) ad libitum por um período de doze semanas. Posteriormente, eles foram submetidos a uma segunda análise por ressonância magnética e foram distribuídos em 3 grupos experimentais de peso corporal equivalente e composição corporal.

[468] Após o início do tratamento farmacológico (dia 1), a ingestão de alimentos (FI) e o peso corporal (BW) foram medidos diariamente antes da fase escura em animais alojados em sua gaiola. O derramamento de alimentos era verificado diariamente. O alimento consumido foi calculado subtraindo o alimento deixado nas tremonhas da quantidade pré-ponderada inicial. FI e BW foram medidos por três semanas consecutivas. Posteriormente, os animais foram submetidos a uma terceira análise de ressonância magnética, a fim de observar os efeitos potenciais do tratamento sobre a composição corporal (alterações na gordura e na massa magra), seguidos de um teste de tolerância à glicose (GTT) e um teste de tolerância à insulina (ITT). Os camundongos receberam diariamente i.p. administração da AOL ou de seu veículo por um período total de cinco semanas, até que eles fossem sacrificados.

[469] Um analisador de composição de corpo inteiro para ressonância magnética de eco nuclear (Echo MRI 900; EchoMedical Systems) foi usado para avaliar repetidamente a gordura corporal e a massa magra em camundongos conscientes.

[470] GTT e ITT são rotineiramente usados para avaliar a modulação dinâmica do metabolismo da glicose, respectivamente, durante um desafio de glicose e um desafio de insulina. Eles fornecem informações sobre a presença de intolerância à glicose e possível resistência à ação do hormônio insulina.

[471] Os animais foram injetados i.p. com 1,5 g/kg de D-glicose (Sigma-Aldrich) para o GTT ou com 0,5 U/kg de insulina (Humulin, Lilly, França) para o ITT. Para o GTT e ITT, os animais foram submetidos a jejum durante a noite. Os testes foram realizados na manhã seguinte. Amostras de sangue foram coletadas da veia da cauda em diferentes momentos (0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração i.p. de glicose ou insulina) e a concentração de glicose foi medida usando bastões de glicose (OneTouch Vita, Lifescan France, Issy Moulineaux, França).

[472] No sacrifício, as amostras de sangue foram coletadas, a glicose no sangue foi avaliada rapidamente usando bastões de glicose e as amostras de sangue foram então centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. O plasma obtido foi armazenado a -80 °C para medição subsequente de insulina, realizada por meio de um ELISA (kit da Mercodia, Uppsala, Suécia), de acordo com as instruções do fabricante.

[473] O índice HOMA-IR, que fornece informações sobre a presença de resistência à insulina, foi calculado usando a fórmula $(\text{Glicose mmol/L} \times \text{Insulina mU/L})/22,5$.

[474] As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA). As medidas repetidas de ANOVA bidirecional foram realizadas para analisar os efeitos do fator de tratamento, o fator tempo e sua interação na ingestão de alimentos, peso corporal, GTT e ITT. ANOVA one-way foi realizada para comparar o efeito do fator de tratamento na ingestão cumulativa de alimentos, composição corporal, AUC de GTT e ITT e glicose circulante, insulina e HOMA-IR no momento do sacrifício. Quando os resultados da ANOVA foram significativos ($p < 0,05$), foi realizado o teste post hoc de Tukey para permitir comparações múltiplas adequadas entre os grupos. Os dados são expressos como média \pm SEM. Os gráficos foram gerados usando o software GraphPad Prism.

Resultados

[475] O tratamento não teve um efeito significativo no peso corporal ou na porcentagem (%) de alteração do peso corporal calculada a partir do dia 1 em que o peso corporal foi medido antes da primeira administração da AOL.

[476] A administração crônica de AOL após três semanas tendeu a reduzir a massa gorda ($p = 0,13$, figura 6), embora não tivesse efeito na massa magra (figura 7). Os valores

médios \pm SEM estão representados nas Figura 6 e 7 e a análise estatística é mostrada na Tabela 3 e na Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3. Análise estatística dos dados representados na Figura 6.

ANOVA unidirecional	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F	P
Tratamento	18.50	2	9.248	2.151	0.1366
Residual	111.8	26	4.299		

Tabela 4. Análise estatística dos dados representados na Figura 7.

ANOVA unidirecional	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F	P
Tratamento	2.773	2	1.387	1.256	0.3014
Residual	28.70	26	1.104		

[477] AOL na dose de 10 mg/kg diminuiu significativamente a ação da insulina nos níveis circulantes de glicose durante uma ITT (Figura 8), sugerindo a presença de resistência à insulina. Consequentemente, também foi encontrado um efeito de tratamento ao analisar a AUC (AUC veh: $12812,50 \pm 750,35$, AUC AOL 5 mg/kg: $15006,56 \pm 1139,69$, AUC AOL 10 mg/kg: $18168,33 \pm 1562,90$, ANOVA FID (2, 23) = 5,186, $p = 0,0138$), com o grupo AOL 10 mg/kg apresentando uma AUC significativamente maior que o grupo veículo (Tukey pós-hoc, $p = 0,0107$). Os valores médios \pm SEM estão representados na Figura 8 e a análise estatística é mostrada na Tabela 5.

Tabela 5. Análise pós-hoc sobre o fator de tratamento para dados na Figura 8. Os números na tabela de análise Pós-hoc de Tukey representam os valores de p. Os valores em **negrito** correspondem a resultados significativos ($p < 0,05$).

Tukey pós-hoc	Veículo	AOL 5 mg/kg	AOL 10 mg/kg
Veículo		0.532016	0.023546
OP 5 mg/kg	0.532016		0.232976
OP 10 mg/kg	0.023546	0.232976	

[478] No momento do sacrifício, após cinco semanas de tratamento, os níveis de glicose no sangue foram medidos em camundongos em jejum de 2 horas.

[479] A AOL tendeu a diminuir os níveis de glicose no sangue (Figura 9) e a análise estatística na Tabela 6.

Tabela 6. Análise estatística dos dados representados na Figura 9.

ANOVA unidirecional	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F	p
Tratamento	3972	2	1986	2.586	0.0980
Residual	16898	22	768.1		

Conclusão

[480] Em animais obesos induzidos por dieta, a administração diária crônica de AOL tendeu a diminuir o peso corporal e a ingestão de alimentos em camundongos DIO (dados não mostrados). Consequentemente, isso foi associado a uma tendência de diminuição da massa gorda e dos níveis basais de glicose no sangue.

[481] No geral, esses dados sugerem que a AOL pode ter alguns efeitos benéficos em um modelo de obesidade alimentar.

Exemplo 4: Efeito da AOL em uma doença neurológica: doença de Parkinson

[482] Neste estudo, os potenciais efeitos neuroprotetores da AOL foram avaliados pela contagem do número de neurônios positivos para tirosina hidroxilase (TH) na substância negra (SN) no 1-metil-4-fenil-1,2,3 subcrônico, Modelo de camundongo 6-tetrahidropiridina (MPTP) da doença de Parkinson. Os camundongos foram tratados com AOL (5 mg/kg; i.p.) ou veículo durante 11 dias consecutivos. MPTP (20 mg/kg; i.p.) ou solução salina foi administrada nos dias de tratamento 4-8. Todos os camundongos foram mortos no dia 12 após a administração final do tratamento.

[483] A administração subcrônica de MPTP em camundongos C57/bl6 induz degeneração de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, o que leva a um número reduzido de neurônios TH positivos no SN, o que foi, nessa ocasião, uma redução de 39%.

Material e métodos

[484] Para as condições do veículo, o item de teste foi dissolvido em DMSO a 0,5%/Tween 20 a 0,95% em solução salina enquanto a AOL foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 5 mg/kg. O volume de administração foi de 10 mL/kg.

[485] Os camundongos machos C57bl/6 (Janvier) pesando 22-28 g foram alojados em uma sala com temperatura controlada sob um ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a comida e água. A fim de alcançar provisoriamente números finais de $n = 10$ por grupo, $n = 12$ por grupo foram usados para explicar possíveis perdas no decorrer do experimento. Para produzir neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra, os camundongos foram tratados com cloridrato de MPTP (20 mg/kg i.p. uma vez ao dia, durante cinco dias consecutivos).

[486] Os camundongos foram sacrificados humanamente por deslocamento cervical após a última administração.

[487] A metade caudal do cérebro (contendo a substância negra) foi colocada em paraformaldeído (4% em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS) pH 7,4) por 5 dias e depois transferida para sacarose 20% (20% em PBS 0,1 M) por crioproteção. O tecido foi então congelado em isopentano frio (a $-50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

[488] As estrias foram dissecadas, pesadas e congeladas rapidamente em gelo seco (a $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$). As amostras de tecidos são armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C})$ para uma análise por HPLC opcional da dopamina e seus metabólitos. Se esta opção não for utilizada, os estriados serão destruídos.

[489] Seções em série coronais de todo o mesencéfalo foram cortadas em um criostato a intervalos de 50 μm . As

seções foram coletadas flutuando livremente em placas de cavidade contendo solução crioprotetora, que foram armazenadas a -20 °C até o dia do processamento imuno-histoquímico da TH.

[490] A imuno-histoquímica do TH foi realizada da seguinte forma em cada quarta seção. As seções de tecido foram retiradas do freezer a -20 °C, deixadas para se ajustar à temperatura ambiente e depois enxaguadas em solução de PBS. A peroxidase endógena foi inibida por incubação em PBS contendo H₂O₂ a 0,3% por 10 minutos. Depois disso, as seções foram lavadas em PBS, incubadas em PBS soro de cavalo normal (NHS) a 4% e Triton X-100 a 0,3% por 30 minutos, para o bloqueio de sítios antigênicos não específicos. As seções foram então incubadas durante a noite à temperatura ambiente no diluente de anticorpo + anticorpo primário para tirosina hidroxilase (TH) (anticorpo isolado por afinidade anti-TH, Sigma T8700) a uma diluição de 1/10.000. As seções foram então enxaguadas abundantemente em PBS e incubadas durante 30 minutos em reagente de detecção de polímero de Immpress Ig peroxidase (Vetor MP7401). Depois disso, as seções foram cuidadosamente lavadas com PBS. A coloração imunológica foi então revelada com o kit 3,3'-Diaminobenzidina (DAB)/Tris/H₂O₂ (Vetor SK4100). Após um minuto, a revelação foi interrompida com várias lavagens de PBS. As seções foram montadas e contrastadas com 0,1% de violeta de cresil.

[491] Utilizou-se análise estereológica imparcial para estimar o número de neurônios imunopositivos para TH (TH+) (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, França). Os limites do SN foram determinados examinando o tamanho e a forma dos diferentes grupos neuronais TH+. O volume foi calculado usando a fórmula: $V = \Sigma S \cdot t$; onde ΣS é a soma das áreas da superfície, t é a espessura média da seção e d é o número de fatias entre duas seções consecutivas medidas. Uma em cada quatro seções foi usada; dissecadores óticos foram distribuídos usando um esquema de amostragem sistemática. Dissecadores (50 μm de comprimento, 40 μm de largura) foram separados um do outro por 150 μm (x) e 120 μm (y). A seguinte fórmula foi usada para estimar o número de neurônios TH+: $N = V(\text{SN}) (\Sigma Q- / \Sigma V(\text{dis}))$; onde N é a estimativa do número de células, V é o volume do SN, $\Sigma Q-$ é o número de células contadas nos dissecadores e $\Sigma V(\text{des})$ é o volume total de todos os dissecadores. O número médio estimado de neurônios e SEM foi então calculado para cada grupo.

[492] Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o prisma Graphpad versão 7. Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (MEV). O efeito da AOL foi analisado com uma ANOVA unidirecional, seguida pela análise pós-hoc de comparações múltiplas de Dunnett. Um valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo.

Resultados

[493] Houve um efeito significativo do tratamento no número de células TH+ no SN ($F_{2,29} = 10,94$, $p < 0,001$, Figura 10). O número de células TH + no SN foi reduzido em 39% ($p < 0,001$) em tratados com MPTP em comparação com animais tratados com veículo. Após a administração da AOL, o número de células TH + no SN aumentou 44% ($p < 0,01$) em comparação com o veículo nos camundongos tratados com MPTP.

Conclusão

[494] O tratamento da AOL por 11 dias consecutivos, na dose de 5 mg/kg, tem um efeito neuroprotetor significativo em comparação com o veículo, na prevenção da redução induzida por MPTP nas células TH + no SN, resultando em 44% mais células sobreviventes no SN com a administração da AOL.

[495] Esses dados sugerem que o tratamento da AOL pode proteger os neurônios dopaminérgicos na substância negra da intoxicação por MPTP.

Exemplo 5: Efeito da AOL em doenças cardiovasculares: lesão de isquemia-reperfusão

[496] O presente estudo tem como objetivo avaliar a capacidade da AOL de proteger o coração de camundongos perfundidos dos danos ocorridos após isquemia e reperfusão globais.

[497] As consequências da isquemia global de 30 minutos seguida de reperfusão de 120 minutos (Figura 11) sobre

contratilidade e viabilidade do tecido foram estudadas em coração de camundongo perfundido isolado pré-tratado ou não (veículo de controle) com AOL 10 μ M.

Material e métodos

[498] Todos os procedimentos obedeceram à Lei dos Animais do Reino Unido (Procedimentos Científicos) de 1986 e ao Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, publicado pelos Institutos Nacionais de Saúde (Publicação NIH N° 85-23. Revisada em 1996). Camundongos Wistar machos (250-300 g) foram anestesiados com isoflurano a 3%, heparinizados e sacrificados por injeção IP letal de pentobarbital (130 mg/kg). Corações (~ 0,95 g de peso fresco) foram rapidamente colhidos e colocados em tampão Krebs-Henseleit gelado (contendo mmol/L): NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 4,8, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄ 1,2, glicose 11 e CaCl₂ 1,8; gaseado com 95% de O₂/5% de CO₂ a 37 °C (pH 7,4). As perfusões cardíacas de Langendorff foram realizadas (Garlid et al., 2006. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 291 (1): H152-60) e a contratilidade foi avaliada por medição contínua do produto sob pressão de pressão (RPP), graças a um balão colocado no ventrículo esquerdo e conectado a um transdutor de pressão. Os corações foram perfundidos em um modo de fluxo constante (12 mL/min). Após 10 minutos para estabilização seguida de 10 minutos de tratamento com o veículo (Controle) ou solução de AOL 10 μ M, a isquemia normotérmica global foi

induzida pela interrupção do fluxo de perfusão por 30 minutos enquanto imerso no coração em tampão de perfusão a 37 °C. No final do período de reperfusão, os corações foram corados para avaliar o tamanho do infarto ou pinçados por congelamento usando línguas resfriadas a nitrogênio líquido. Neste último caso, os corações foram triturados sob nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para análises posteriores.

[499] No final do período de reperfusão, os corações foram corados com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC): os corações foram perfundidos por 7 minutos a 13 mL/min com uma solução de TTC a 12% (p/v), a fim de obter uma concentração final de 1% em o coração. Os corações foram então destacados da cânula e incubados por mais 4 minutos a 37 °C antes de serem cortados perpendicularmente ao eixo longitudinal em 6 fatias. As fatias foram então tratadas em solução de formalina a 4% (p/v) durante a noite a 4 °C e pesadas, antes de fotografar os dois lados de cada fatia. A superfície das áreas necróticas e de risco de cada lado foi determinada em cada fotografia por planimetria (AlphaEase v5.5), e o tamanho do infarto foi expresso como uma porcentagem da área transversal total do coração, uma vez que o coração total era submetido a isquemia.

[500] Os dados de 6 preparações independentes são expressos como média \pm SEM. Como o número n em cada grupo é

menor que 20, a distribuição foi considerada não-normal e, conseqüentemente, foi realizado um teste não-paramétrico de Mann-Whitney (SPSS statistics 17.0) para comparar os dois grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos se o valor de p estiver abaixo de 0,05.

Resultados

[501] A Figura 11 apresenta a evolução da PRP - considerada aqui como substituta da contratilidade cardíaca - durante a fase crítica da reperfusão após isquemia. Claramente, a AOL melhora a contratilidade e após uma evolução idêntica em comparação com os corações de controle tratados com AOL, mostrou uma melhora na contratilidade que era cerca de três vezes maior que os corações de controle após 2 horas de reperfusão. Nesse momento, os corações foram preparados para a coloração de TTC para avaliar a viabilidade do tecido. A maior atividade contrátil dos corações da AOL foi confirmada pela coloração com TTC, e as fotografias das fatias de corações tratados e não tratados (dados não mostrados) mostram claramente que a AOL induziu uma importante proteção do tecido cardíaco. Essa proteção foi analisada mais minuciosamente e os resultados são apresentados na Figura 12. O tamanho do infarto - tecido danificado - é expresso como porcentagem da superfície total de cada experimento independente, juntamente com o valor médio para corações tratados e não tratados com AOL. Os

resultados mostram claramente que a AOL protege significativamente o tecido cardíaco de danos por isquemia/reperfusão. De fato, cerca de 50% do tecido infartado foi resgatado pelo pré-tratamento com AOL (Figura 12).

Conclusão

[502] Esses resultados estendem, sob condições ex vivo (órgão vivo), o papel da AOL como inibidor da produção de ERO mitocondrial, provavelmente no nível do complexo I.

[503] Eles também evidenciam o interesse terapêutico da AOL na proteção tecidual contra danos à isquemia/reperfusão, não apenas no coração, mas também em qualquer tecido indivíduo à isquemia.

Exemplo 6: Efeito da AOL em uma doença cardiovascular: hipertensão pulmonar

[504] O presente estudo tem como objetivo estudar o papel das mitocôndrias na fisiologia da vasculatura pulmonar e fornecer um novo tratamento alternativo para a hipertensão pulmonar. Essa doença é caracterizada pelo aumento da pressão arterial pulmonar e remodelamento das artérias pulmonares (AP), levando ao aumento da resistência vascular pulmonar, hipertrofia do ventrículo direito, insuficiência cardíaca direita e, por fim, morte.

[505] A hipertensão pulmonar pode ser dividida em cinco grupos, entre os quais o grupo 1 corresponde à hipertensão

arterial pulmonar. No grupo 3, inclui hipertensão pulmonar por doenças pulmonares (como distúrbio pulmonar obstrutivo crônico) e/ou hipoxemia alveolar.

[506] Para abordar a questão do efeito da AOL, foram utilizados dois modelos de camundongos diferentes: um modelo de hipóxia e um modelo induzido por monocrotalina, que compartilham características fisiopatológicas com a hipertensão pulmonar do grupo 3 e do grupo 1, respectivamente.

Material e métodos

[507] Camundongos Wistar machos (300-400 g) foram separados em 3 grupos e utilizados 4 semanas depois:

- o primeiro grupo (camundongos controle ou normáxicos - N camundongos) foi alojado em ambiente;
- o segundo grupo (camundongos hipóxicos crônicos - camundongos CH) foi exposto à hipóxia crônica por 3 semanas em uma câmara hipobárica (50 kPa); e
- o terceiro grupo (camundongos MCT) foi injetado com uma dose única intraperitoneal de monocrotalina na dose de 60 mg/kg. O MCT (Sigma, St Quentin Fallavier, França) foi dissolvido em um volume igual de HCl (1 M) e NaOH (1 M).

[508] Em cada grupo, alguns animais foram tratados com AOL (Sulfarlem, EG Labo Eurogenerics. Comprimidos triturados misturados com alimentos, alimentados ad libitum) e outros animais não foram tratados. Os alimentos consumidos foram

pesados todos os dias para estimar a dose de AOL administrada. 10 mg/kg/dia foram assim administrados durante as 3 semanas de experiência para o segundo e terceiro grupos.

[509] Para cada condição, foram utilizados 7 a 10 camundongos. Todos os cuidados com os animais e procedimentos experimentais obedeceram às recomendações da Federação Europeia da Associação de Ciências de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo comitê de ética sítio (Comitê de Ética Regional de Aquitaine - referenciado 50110016-A).

[510] A hipertensão pulmonar foi avaliada medindo-se a pressão arterial pulmonar média (mPAP) e a hipertrofia do ventrículo direito. Para mensurar os camundongos PAP, N, CH e MCT foram anestesiados com pentobarbital sódico (Centravet) por injeção intraperitoneal (60 mg/kg) e o mPAP foi medido, em camundongos com tórax fechado, através de um cateter inserido na veia jugular direita e, em seguida, através os átrios direitos e o ventrículo direito na artéria pulmonar e conectados a um transdutor de pressão manométrica Baxter Uniflow. A hipertrofia do ventrículo direito foi estimada pela razão entre o ventrículo direito (VD) e o ventrículo esquerdo mais o peso do septo (VE + S) (índice de Fulton).

[511] A remodelação das artérias pulmonares (AP) foi avaliada medindo-se a porcentagem da espessura medial da AP de seções de pulmão embebido em parafina. As seções

pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (VWR) de acordo com o procedimento histológico comum. Em cada seção, três grupos de 10 artérias intracinares com diferentes diâmetros transversais foram observados para avaliar a espessura da parede medial (ou seja, diâmetros transversais inferiores a 50 µm, entre 50 a 100 µm e entre 100 e 150 µm).

Resultados

[512] Os resultados são expressos como média \pm SEM de n observações independentes. Todos os dados foram analisados usando um teste não paramétrico para amostras não pareadas (teste de Mann-Whitney). A Figura 13 mostra o efeito da AOL na pressão arterial pulmonar (Figura 13A) e na remodelação do coração (Figura 13B). n indica o número de camundongos para medições do índice mPAP e Fulton. Todos os gráficos e estatísticas de barras foram realizados com o software Graphpad PRISM (v6, Graphpad Software). $P < 0,05$ foram considerados significativos. Como visto, a AOL não teve efeito significativo no grupo controle (N camundongos). No entanto, a pressão arterial pulmonar média foi diminuída em camundongos tratados com MOL com AOL e ainda mais significativamente em camundongos com CH tratados com AOL. O tratamento da AOL, no entanto, não teve efeito no índice de Fulton.

[513] A Figura 14 mostra o efeito da AOL no remodelamento das artérias pulmonares. n indica o número de vasos

analisados para% da medição da espessura medial. Todos os gráficos e estatísticas de barras foram realizados com o software Graphpad PRISM (v6, Graphpad Software). $P < 0,05$ foram considerados significativos. A AOL mostra um efeito significativo em camundongos com CH, nos quais o diâmetro das artérias pulmonares foi reduzido em cerca de 30%.

Conclusão

[514] O tratamento da AOL, na dose oral de 10 mg/kg/dia, tem um efeito significativo na prevenção e/ou tratamento da hipertensão pulmonar *in vivo*, em particular no grupo 3 da hipertensão pulmonar. De fato, os resultados mostram uma melhora significativa da sintomatologia clínica.

[515] Esses dados sugerem que as mitocôndrias desempenham um papel importante na fisiologia da vasculatura pulmonar e estendem o uso da AOL ao tratamento da hipertensão pulmonar.

Exemplo 7: Efeito da AOL no envelhecimento da doença e síndromes progeróides: degeneração macular

[516] O presente estudo tem como objetivo avaliar a capacidade da AOL de proteger a retina contra a degeneração progressiva.

Material e métodos

[517] Os camundongos criados sob iluminação cíclica de baixa intensidade foram transferidos para iluminação cíclica de alta intensidade por uma semana e divididos em 3 grupos

(animais não tratados, animais tratados com veículo e animais tratados com AOL). Os animais tratados receberam injeções de veículo ou AOL na dose de 6 mg/kg/dia, três vezes ao dia durante os 7 dias da transferência (30 minutos antes da luz acesa; às 13:00; às 21:00). Após uma semana, os animais foram transferidos no escuro (D0).

[518] Um grupo controle ("não transferido") não foi transferido para iluminação cíclica de alta intensidade, mas recebeu o mesmo tratamento descrito acima: injeções de veículo ou AOL três vezes ao dia por 7 dias, seguidas por uma transferência no escuro (D0).

[519] No dia seguinte à transferência no escuro (D1), é realizada uma primeira eletrorretinografia. Mede o sinal eletrofisiológico que é gerado pela retina, em resposta a um estímulo luminoso. É tipicamente caracterizada por duas ondas, a onda a e a onda b. a onda a representa a deflexão inicial da córnea negativa, derivada dos cones e hastes das camadas externas dos fotorreceptores. Reflete a hiperpolarização dos fotorreceptores devido ao fechamento dos canais de íons sódio na membrana do segmento externo. A onda b representa a deflexão positiva da córnea, derivada da retina interna (predominantemente células Muller e ON-bipolares). A análise do eletrorretinograma consiste em medir a amplitude e/ou latência dessas ondas, em função da intensidade da estimulação da luz. a amplitude da onda a,

para uma dada intensidade de estimulação luminosa, depende do número de fotorreceptores; enquanto a amplitude da onda b, para uma dada intensidade de estimulação de luz e um determinado número de fotorreceptores, indica a eficiência da transmissão do sinal.

[520] Após a eletrorretinografia de D1, os animais foram transferidos de volta em condições de iluminação cíclica de baixa intensidade e uma segunda eletrorretinografia é realizada em D15.

[521] Os animais foram então sacrificados para análise histológica. A espessura das várias camadas da retina, em particular a espessura da camada nuclear externa (ONL) e da camada nuclear interna (INL), foi medida (em μm , a partir do nervo ótico e a cada 0,39 mm nos polos superior e inferior da o disco ótico).

Resultados

[522] A análise histológica é relatada na Figura 15. Mostra que, no grupo controle ("não transferido"), o tratamento com AOL não afeta a espessura da ONL (Figura 15A). Isso sugere que a AOL não tem um efeito tóxico nos fotorreceptores da retina.

[523] Pelo contrário, a transferência em condições de iluminação de alta intensidade cíclica ("transferida") induz uma diminuição significativa (pela metade em algumas áreas) do ONL, em animais não tratados. A AOL, no entanto, tende a

proteger o ONL contra danos induzidos pela luz. De fato, a análise histológica mostrou um aumento significativo da espessura do ONL em animais expostos à luz de alta intensidade tratados com AOL/cíclicos (Figura 15B).

Conclusão

[524] O tratamento da AOL tem um efeito protetor significativo contra danos induzidos pela luz na retina. Em particular, a espessura da retina mostrou-se preservada em comparação com animais não tratados, após exposição prolongada à luz de alta intensidade cíclica.

Exemplo 8: Efeito da AOL em doenças relacionadas a disfunções mitocondriais

[525] O presente estudo tem como objetivo testar o efeito da AOL *in vivo*, em um modelo de disfunção da fosforilação oxidativa.

Material e métodos

[526] Foram utilizados camundongos deficientes em Mn-Superóxido Dismutase mitocondrial (Sod2-KO) em um fundo de CD1. Essa alteração genética leva a um fenótipo adverso e à morte de animais com idade média de 8 dias. A superóxido dismutase mitocondrial é uma enzima de eliminação de radicais livres que transforma superóxido (altamente reativo) em peróxido de hidrogênio (menos reativo), que poderia atravessar as membranas mitocondriais e ser desintoxicado por sistemas antioxidantes matriciais e citosólicos. O

objetivo deste estudo foi testar se a AOL poderia resgatar o fenótipo Sod2-KO através de sua atividade na produção de superóxido de I_0 .

[527] Após o nascimento, os filhotes foram genotipados (3 dias de idade) e o tamanho da ninhada foi reduzido para 6 filhotes por gaiola. Os animais foram então tratados (AOL em Kolliphor® - 5 mg/kg) ou não (apenas Kolliphor®, observou KOL abaixo). A escolha da dosagem foi determinada principalmente pelo limite de solubilidade do composto (2,8 mM em Kolliphor®) e pelo volume injetável máximo em filhotes (6 a 7 μ L por grama de massa corporal). Dois estudos foram realizados em duas gerações diferentes dos mesmos pais: expectativa de vida; e succinato desidrogenase atividade no coração (SDH) e a coloração Oil Red O no fígado. Os animais foram pesados e injetados (intra-peritoneal) diariamente.

[528] A atividade da succinato desidrogenase é um marcador de superóxido na matriz mitocondrial. Assim, a falta de SOD2 está associada a uma diminuição da atividade do SDH no coração. O objetivo deste experimento foi testar se a AOL poderia ou não restaurar a atividade do SDH em camundongos KO.

[529] A coloração com óleo vermelho O é um marcador de lipídio que se acumulou no fígado Sod2-KO. No entanto, a ligação direta entre a produção de superóxido/peróxido de hidrogênio e o acúmulo de lipídios no fígado não é

estabelecida. O objetivo do estudo foi testar a potência da AOL para impedir o acúmulo de lipídios no fígado em camundongos Sod2-KO.

Resultados

Vida útil

[530] Foram constituídos 4 grupos:

1 - WT-KOL (n = 7), um grupo de camundongos do tipo selvagem tratados apenas com o veículo;

2 - WT-AOL (n = 17), um grupo de camundongos do tipo selvagem tratados com AOL;

3 - KO-KOL (n = 2), um grupo de camundongos Sod2-KO tratados apenas com o veículo;

4 - KO-AOL (n = 4), um grupo de camundongos Sod2-KO tratados com AOL.

[531] Os animais foram injetados uma vez por dia, a partir dos 3 dias de idade até à sua morte.

[532] As figuras 16A e 16B mostram a evolução do peso corporal (A) e a porcentagem do peso corporal inicial. Estes resultados mostram que o peso corporal e o ganho de peso corporal foram menores nos camundongos KO do que nos camundongos WT. O tratamento com AOL, no entanto, tende a aliviar esse efeito, como visto do dia 8 ao 12, sugerindo um potencial efeito benéfico do composto.

[533] A Figura 16C mostra a proporção de sobrevivência de camundongos Sod2-KO, independentemente de terem sido

tratados com AOL ou não. Como esperado, tendo em vista os resultados acima, a vida útil mediana e a vida útil máxima foram ligeiramente melhoradas pelo tratamento com AOL em camundongos KO, com camundongos tratados com AOL vivendo até 2 dias a mais em comparação com camundongos não tratados, suportando um efeito benéfico da AOL.

[534] Atividade SDH na coloração do coração e do óleo vermelho O

Foram constituídos 5 grupos:

1 - WT não injetado (n = 6), um grupo de camundongos do tipo selvagem não tratados;

2 - WT-KOL (n = 6), um grupo de camundongos do tipo selvagem tratados apenas com o veículo;

3 - WT-AOL (n = 6), um grupo de camundongos do tipo selvagem tratados com AOL;

4 - KO-KOL (n = 4), um grupo de camundongos Sod2-KO tratados apenas com o veículo;

5 - KO-AOL (n = 6), um grupo de camundongos Sod2-KO tratados com AOL

[535] Neste estudo, os animais foram tratados diariamente (5 mg/kg) do dia 3 ao dia 5. O coração e o fígado foram colhidos no dia 6.

[536] Como esperado, a atividade do SDH tendeu a diminuir (não significativo) no KO em comparação aos animais WT. No entanto, a AOL mostrou apenas um pequeno aumento na atividade

de SDH em camundongos KO, mas não conseguiu restaurar a atividade de SDH nos níveis de camundongos WT (Figura 17).

[537] A Figura 18 mostra o tamanho médio das gotículas lipídicas (Painel A), densidade (Painel B) e área (Painel C). Camundongos KO não tratados exibiram um fenótipo de alto conteúdo lipídico em comparação com animais WT. No entanto, em camundongos KO tratados com AOL, a densidade de gotículas lipídicas diminuiu em comparação com animais não tratados. Mais importante, esses resultados também mostram que o tratamento da AOL foi capaz de restaurar a área lipídica total em camundongos KO, consistente com a supressão no alvo da produção de superóxido mitocondrial *in vivo* em camundongos Sod2-KO.

Conclusão

[538] Estudos *in vivo* mostram resultados encorajadores. Embora o tratamento com a AOL não possa neutralizar completamente os efeitos da depleção de SOD2 em camundongos, os resultados mostram que a vida útil ainda pode ser prolongada por um par de dias em comparação com animais KO não tratados, juntamente com um alívio da diminuição no ganho de peso corporal. Isso sugere um efeito potencial da AOL.

[539] A biodisponibilidade da AOL é conhecida por ser muito curta. Assim, o tratamento com doses mais altas pode levar a melhorar os efeitos da AOL nessas experiências. No entanto, o KO constitutivo continua sendo um fenótipo adverso

alto para resgatar com apenas um tratamento muito específico e pode exigir ação sinérgica com outros medicamentos.

[540] *In vivo*, os resultados também mostraram que a AOL poderia restaurar o conteúdo lipídico e/ou impedir o acúmulo lipídico no fígado de camundongos Sod2-KO.

Exemplo 9: AOX afeta a fosforilação oxidativa mitocondrial em altas concentrações (acima de 20 μ M)

Material e métodos

Procedimentos animais e declaração de ética

[541] Todas as experiências descritas foram realizadas de acordo com o Guia do Conselho Nacional e Europeu de Pesquisa para o cuidado e uso de animais de laboratório. P. Diolez possui uma licença válida para realizar experimentos em animais pelo Serviço Veterinário da Saúde e da Proteção Animal do Ministère de l'agriculture et de la Forêt, France (17/03/1999, número de licença 3308010).

Materiais

[542] Todos os produtos químicos eram de grau reagente, adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO), exceto sacarose e NADH oxidase (que foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha)). AOL e AOX foram presentes da OP2 (Bordeaux, França). Soluções-mãe de 15 mM foram preparadas em DMSO e mantidas no escuro a 0 °C por apenas alguns dias.

Isolamento das mitocôndrias cardíacas

[543] Camundongos Wistar machos (250-325 g; obtidos da Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, França) foram mortos por deslocamento deslumbrante e cervical, e o coração foi rapidamente removido e lavado em meio de isolamento a frio contendo sacarose 100 mM, 180 mM KCl, Tris 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 10 mM e BSA desengordurada a 0,1% (p/v) (pH 7,2).

[544] O isolamento das mitocôndrias cardíacas foi realizado em câmara fria. Antes da homogeneização, os corações (cerca de 1,5 g) foram picados com tesoura e tratados por 5 minutos em 5 mL do mesmo meio suplementado com protease (2 mg de proteinase bacteriana tipo XXIV por mL de tampão de isolamento) com agitação. A suspensão de tecido foi vertida em um homogeneizador Potter de vidro de 50 mL, diluído com 20 mL de tampão de isolamento e depois homogeneizado por 3 minutos usando um pilão de Teflon motorizado. O homogenato foi filtrado através de pano parafusado (Sefar Nitex) para remover detritos e centrifugado a 8.000 g por 10 minutos. O sedimento resultante foi lavado com 5 mL de tampão de isolamento, ressuspenso em 25 mL do mesmo tampão e depois induzido a centrifugação a baixa velocidade (400 g) por 8 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado duas vezes a 7.000 g por 15 minutos para produzir um sedimento mitocondrial lavado que foi suavemente ressuspenso em 150 µL de tampão de isolamento. A concentração de proteína foi determinada pelo método de

Bradford (Sigma, kit # B6916) usando BSA como padrão. As mitocôndrias foram mantidas em gelo a uma concentração final de 40-50 mg/mL por menos de 5 horas.

Consumo de oxigênio mitocondrial e síntese de ATP

[545] As taxas de consumo de oxigênio das mitocôndrias cardíacas (0,1 mg/mL), incubadas na ausência ou na presença de AOX em doses crescentes (de 0 a 100 μ M de concentração final), foram registradas polarograficamente sob agitação constante a 25 °C usando um oxímetro de alta resolução (Oxygraph-2K, Oroboros Instruments, Áustria). O meio de respiração consistia em sacarose 140 mM, KCl 100 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM e BSA a 1 g/L (p/v) de BSA, essencialmente livre de ácidos graxos (pH 7,2).

[546] A síntese de ATP foi medida nas mesmas condições, usando um eletrodo de pH de alta sensibilidade (Metrohm), como descrito anteriormente (Gouspillou et al., 2014. Aging Cell. 13 (1): 39-48).

Produção mitocondrial de ERO/H₂O₂

[547] As taxas de produção de ERO/H₂O₂ das mitocôndrias cardíacas foram avaliadas através da oxidação do indicador incolor e não fluorescente Amplex Red na presença de peroxidase de rábano silvestre (HRP, EC 1.11.1.7, Sigma). O H₂O₂ reage com o Amplex Red em uma estequiometria 1: 1, produzindo o composto fluorescente resorufina (excitação: 560 nm; emissão: 585 nm) que é estável após a formação. A

fluorescência foi medida continuamente com um espectrofluorômetro equipado com controle de temperatura e agitação (SAFAS Xenius, Monaco).

[548] As mitocôndrias isoladas (0,1 mg/mL) foram incubadas no mesmo tampão experimental do que anteriormente, suplementadas com 15 μ M de Amplex Red e 10 μ g/mL de HRP. Glutamato (5 mM)/malato (2,5 mM) juntamente com succinato (5 mM) foram utilizados como substratos complexos I e II, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos sob condições não fosforilantes na presença de 15 μ M de atractillosida. Posteriormente, rotenona (1,5 μ M), antimicina A (2 μ M) e mixotiazol (0,2 μ M) foram adicionados sequencialmente para inibir os centros redox na cadeia de transferência de elétrons (ver Figura 2), a saber, sítios I_Q , I_F (com rotenona), III_{Q_i} (com antimicina A) e III_{Q_o} (com mixotiazol). O ensaio foi finalmente calibrado com quantidades conhecidas de H_2O_2 (etapas de 300 nM), na presença de todos os compostos relevantes, incluindo AOX. O teste de controle da ausência de efeito da AOL, AOX e Oltipraz no próprio ensaio Amplex Red e a produção de NAD(P)H oxidase ERO/ H_2O_2 foram realizadas na ausência de mitocôndrias cardíacas e na presença de NAD(P)H oxidase (EC 1.6.3.3, 5 mU/mL, Sigma) e NADH (100 μ M).

Resultados

[549] Primeiro testamos se o composto AOX afeta a fosforilação oxidativa diretamente nas mitocôndrias isoladas do coração de camundongos. Isso foi realizado usando o método agora clássico de oxígrafo (Figura 19A). As mitocôndrias foram incubadas primeiro com várias concentrações de AOX (20 a 100 μM) e, em seguida, foi adicionado substrato respiratório (estado do substrato, curva preta), seguido de uma concentração de ADP saturante para obter a taxa de fosforilação oxidativa máxima (inclinação do consumo de oxigênio, curva cinza) e, finalmente, a adição de atractillosida (ATR) que inibe o translocador ADP/ATP e fornece a taxa de vazamento mitocondrial sob condições não fosforilantes (Figura 19A). A Figura 19B apresenta os resultados obtidos com succinato (+ rotenona) para alimentar elétrons à cadeia respiratória. Esse substrato foi escolhido porque reflete mais de perto a regulação da cadeia respiratória. Os resultados indicam que, no estado "substrato" e no estado ATR (taxa de vazamento de prótons da membrana interna), o AOX induziu um aumento para concentrações de até 50 μM , seguido de uma diminuição para concentrações acima de 50 μM . Estes dados sugerem um efeito desacoplador de AOX na fosforilação oxidativa para concentrações superiores a 20 μM e uma inibição concomitante da taxa de oxidação. Os dados demonstram sob essas condições o efeito de altas concentrações de AOX (superior a 20 μM) na

fosforilação oxidativa mitocondrial - ou seja, na atividade da cadeia respiratória e na síntese de ATP - bem como na integridade da membrana interna mitocondrial (taxa de vazamento medida após a adição de ATR).

[550] A Figura 20 apresenta os efeitos de AOX na taxa de fosforilação (taxa de síntese de ATP) das mitocôndrias isoladas de coração de camundongo. Os resultados confirmam que concentrações inferiores a 20 μM não modificam a síntese de ATP por mitocôndrias isoladas. No entanto, concentrações mais altas efetivamente diminuem a taxa de fosforilação e a abolem completamente a 60 μM .

Exemplo 10: AOX inibe a produção de superóxido/ H_2O_2 pelas mitocôndrias

[551] Como dito anteriormente, a produção de ERO mitocondrial é altamente dependente da atividade e condições mitocondriais. Embora tenhamos testado os efeitos do AOX na produção de ERO pelas mitocôndrias sob inúmeras condições, optamos por apresentar aqui, por uma questão de clareza, apenas os resultados mais demonstrativos dos efeitos muito específicos do AOX. A presença da combinação completa de substrato (isto é, glutamato, malato e succinato) (Figura 2A), fornecendo os elétrons para toda a cadeia respiratória, é a mais representativa das condições in situ na célula onde o metabolismo é ativo. Além disso, a produção mitocondrial máxima de ERO/ H_2O_2 não ocorre sob condições de alta

fosforilação mitocondrial, mas sob condições de alta redução de carreadores de elétrons, isto é, baixa ou nenhuma fosforilação. Essas condições são atendidas na presença de ATR e pudemos verificar efetivamente que a adição de ATR sob condições de saturação de ADP desencadeou a produção de ERO que estava no limite de detecção sob condições máximas de fosforilação (resultados não mostrados). Sob essas condições, as ERO são produzidas em diferentes sítios da cadeia respiratória (Orr et al., 2013. Free Radic. Biol. Med. 65: 1047-1059; Quinlan et al., 2013. Redox Biol. 1: 304-312) (Figura 2).

[552] Projetamos uma série de titulações de inibidores para decifrar a ação da AOX na produção de ERO por toda a cadeia respiratória sob condições de produção máxima de ERO (Figura 2E). Na presença de combinação de substrato e na ausência de inibidores específicos dos complexos, a produção de ERO é máxima e provém principalmente do transporte reverso de elétrons no sítio I_Q (Figura 2A). Após a adição de rotenona, um inibidor clássico do complexo I que se liga especificamente ao sítio catalítico de I_Q , a produção de ERO diminui fortemente e ocorre quase inteiramente no sítio III_{I_Q} (Figura 2B). Portanto, a diminuição na produção de ERO (medida pelo método Amplex Red, Figura 22) após a adição de rotenona representa a atividade da produção de ERO pelo complexo I.

[553] A Figura 21 ilustra o efeito do aumento das concentrações de AOX (de 2,5 a 20 μM) na produção de ERO/ H_2O_2 medida sob essas condições. Parece claramente a partir dos resultados apresentados nesta figura que AOX inibe fortemente a produção de ERO pelo complexo I, em concentrações inferiores às necessárias com a AOL (cf. Figura 3 para comparação). De fato, concentrações de AOX tão baixas quanto 2,5 μM mostraram um efeito inibitório na produção de ERO pelo sítio I_0 , com um IC_{50} estimado de cerca de 9,5 μM (Mínimo: $-72,5272 \pm 68,64$; Máximo: $554,045 \pm 19,73$; IC_{50} : $9,46768 \pm 1,018$; Hill coeficiente: $2.61579 \pm 0,5706$).

Exemplo 11: AOX não limpa a produção de superóxido não mitocondrial/ H_2O_2 pela NAD(P)H oxidase

[554] O mecanismo de ação do AOX foi ainda testado *in vitro* usando o sistema peroxidase-Amplex Red utilizado para a medição de ERO/ H_2O_2 por mitocôndrias, que de fato mede a aparência de H_2O_2 pela oxidação do Amplex Red na resorufina fluorescente (Figura 22) Na ausência de mitocôndrias e adicionando ao sistema um sistema produtor de H_2O_2 , foi possível testar o efeito de AOX nessa produção de superóxido/mitocôndria não mitocondrial/ H_2O_2 . Isto foi realizado usando NAD(P)H oxidase comercial que produz H_2O_2 na presença de NAD(P)H adicionado e medindo a redução de Amplex Red em resorufina. Comparamos os efeitos de concentrações crescentes (10 a 100 μM) de AOX com as de AOL

e Oltipraz (Figura 22A). Os resultados apresentados mostram que, embora a AOL e a AOX não tenham efeito global na medição de ERO nessas condições, o Oltipraz diminuiu constantemente a quantidade de ERO medida pelo ensaio. Portanto, esses resultados demonstram que o Oltipraz inibe a NAD(P)H oxidase ou age como um eliminador de radicais moderado (fraco) e liga o superóxido/ H_2O_2 , que não está disponível para o teste da peroxidase, mas, em todas as circunstâncias, inibe não mitocondrial (imitando o citossólico) produção de superóxido/ H_2O_2 . Eles também excluem qualquer efeito de AOX e AOL na NAD(P)H oxidase ou na atividade peroxidase. Esses resultados confirmam que AOX e AOL não interferem no sistema de medição nem interagem diretamente com o H_2O_2 . Curiosamente, esses resultados também demonstram que AOX e AOL não inibem a produção de ERO/ H_2O_2 pela NADP(H) oxidase, que é um - se não o - maior produtor de ERO/ H_2O_2 não mitocondrial nas células. O esquema da Figura 22B recapitula as diferentes informações sobre o modo de ação de AOX e AOL na produção de ERO/ H_2O_2 pelas mitocôndrias e NAD(P)H oxidase.

[555] Quando testado em mitocôndrias isoladas do coração de camundongos, o AOX diminui efetivamente a produção de ERO/ H_2O_2 mitocondrial (nas mitocôndrias isoladas, o H_2O_2 é produzido a partir da redução de ERO pela superóxido dismutase mitocondrial). No entanto, os resultados apresentados aqui demonstram claramente que AOX não age como

um antioxidante ou limpador de radicais. Embora os antioxidantes sejam eliminadores gerais de ERO/H₂O₂, o AOX apresenta uma seletividade em relação à formação de ERO pelo sítio I_Q no complexo I, o que demonstra que o AOX não interage simplesmente com radicais superóxido, mas evita especificamente sua formação no complexo I. A esse respeito, o AOX portanto, aparece como membro de uma nova classe de protetores do estresse oxidativo, impedindo a formação de ERO e, portanto, sendo mais ativo para proteger as mitocôndrias de seus próprios ERO. Também mostramos aqui algumas evidências de que AOX só pode interagir com mitocôndrias sem afetar a formação de radicais de oxigênio no citosol e, portanto, não afetaria a sinalização intracelular.

[556] A inibição da atividade do complexo I pela rotenona ou pela neurotoxina MPP⁺ tem sido associada ao parkinsonismo em roedores e humanos, sugerindo uma ligação entre o complexo I disfuncional, a produção de ERO e a neurodegeneração (Langston et al., 1983. *Science*. 219 (4587): 979-980; Betarbet et al., 2000. *Nat. Neurosci*. 3 (12): 1301-1306). Por outro lado, análises comparativas mostram uma relação inversa entre a produção máxima de superóxido/H₂O₂ a partir do sítio I_Q, mas não o sítio I_F, e a vida útil máxima em diversas espécies de vertebrados (Lambert et al., 2007. *Aging Cell*, 6 (5): 607- 618; Lambert AJ et al., 2010. *Aging Cell*,

9 (1): 78-91). Portanto, moduladores seletivos da produção de superóxido/H₂O₂ do sítio I_Q ou sítio I_F ofereceriam oportunidades únicas para investigar o papel putativo da produção de ERO mitocondrial em processos normais e patológicos (Orr et al., 2013. Free Radic. Biol. Med. 65: 1047-1059).

[557] Esses resultados demonstram efetivamente que o AOX não é um limpador radical; caso contrário, seus efeitos nas medições de ERO seriam independentes da origem da origem superóxido/H₂O₂: mitocondrial ou não mitocondrial. Embora o mecanismo ainda precise ser investigado, são apresentadas evidências de que o composto AOX interfere especificamente no complexo mitocondrial I e inibe seletivamente a produção de superóxido a partir do sítio de ligação à ubiquinona do complexo I (sítio I_Q).

[558] Em conclusão, parece que as propriedades AOX podem representar um avanço na busca de moduladores específicos da produção de ERO/H₂O₂ direcionados às mitocôndrias nas células. A AOX atua a montante da produção de ERO, garantindo maior proteção do que os antioxidantes clássicos.

Exemplo 12: AOX inibe especificamente a produção de ERO mitocondrial, mas não a produção de ERO citosólica

Material e métodos

[559] A linhagem celular H460 e A549 de carcinoma de células não pequenas humanas foi obtida da ATCC. As células

foram cultivadas em meio de crescimento consistindo em DMEM (GIBCO), 10% de FBS (GIBCO) e 100 unidades de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO). As células foram mantidas em frascos T de 75 cm² ou frascos T de 175 cm² (BD Biosciences) em uma incubadora (modelo 3100 série, Forma Scientific, Marietta, OH) controlada a 37 °C, 95% de umidade e 5 % De CO₂. O meio de cultura celular foi atualizado a cada dois dias. A cada 2 a 3 dias, as culturas H460 e A549 foram destacadas dos frascos usando uma solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e subcultivadas. Todas as culturas foram mantidas em 80-90% de confluência no momento da subcultura.

[560] A triagem de citotoxicidade foi realizada pelo ensaio colorimétrico de sulforodamina B. As células A549 e H460 ($2 \cdot 10^3$) foram semeadas em uma placa de 96 cavidades e, após a adesão, as células foram incubadas com 5 a 500 µM de AOL ou AOX ou dimetilsulfóxido de controle (DMSO). A citotoxicidade foi avaliada após 48 horas de tratamento com sulforodamina B (SRB), de acordo com Vichai (Vichai et al., 2006. Nat. Protoc. 1 (3): 1112-6).

[561] Os ensaios de migração celular foram realizados em Transwells (Corning Inc., tamanho de poro de 8,0 µm). Para o ensaio de migração, $2 \cdot 10^4$ células em meio isento de soro foram adicionadas às cavidades superiores. Meios contendo 10% de FBS foram adicionados às cavidades inferiores. As células que migraram através do filtro após 16 horas foram

coradas com violeta de cristal a 0,2% e contadas usando o software Image J.

[562] A análise estatística foi realizada usando o GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Os resultados são expressos como valores médios \pm SEM para n experiências independentes. As comparações entre os grupos foram feitas por ANOVA unidirecional e teste de Dunnett a posteriori. Quando apropriado, testes t de Student não pareados ou teste de Mann-Whitney foram empregados. Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados

Ausência de citotoxicidade de AOX em células cultivadas

[563] A citotoxicidade do AOX foi realizada em duas linhas celulares de carcinoma (H460 e A459) para uma grande variedade de concentrações (0 a 500 μM). Os resultados são apresentados na Figura 23.

[564] Positivamente, não foi observada toxicidade significativa para concentrações inferiores a 100 μM , e a viabilidade celular diminuiu abruptamente para concentrações mais elevadas de AOX (Figura 23A). Ao traçar esses resultados em um gráfico semi-logarítmico (Figura 23B), poderíamos calcular o IC50 para alta toxicidade de dose AOX como $134,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$. Estes resultados demonstram que o AOX não tem efeito prejudicial nas células cultivadas, mesmo para altas concentrações (100 μM).

Ausência de efeito de AOX na respiração de células de carcinoma

[565] Os efeitos de AOX (0 a 40 μ M) foram avaliados em células de carcinoma usando a abordagem oxigráfica clássica e comparados aos efeitos da molécula irmã AOL.

[566] O consumo de oxigênio das células em repouso H460 foi medido continuamente e concentrações crescentes de AOL e AOX (0 a 40 μ M) foram injetadas na preparação (Figura 24). Pode-se observar que não houve alteração na taxa de consumo de oxigênio pelas células H460 com AOX ou com AOL, indicando a ausência de perturbação intracelular da atividade mitocondrial e do metabolismo energético celular. Estes resultados confirmam a ausência de efeito prejudicial da AOL e AOX nas funções celulares.

Efeito de AOX na atividade metastática de células de carcinoma

[567] O teste Transwell de migração celular foi utilizado para este ensaio e a migração de células de carcinoma H460 foi medida na presença de duas concentrações diferentes de AOX (5 e 10 μ M) e comparada com o efeito de 100 μ M de N-acetilcisteína (NAC) como um controle positivo da produção de ERO citosólica (Figura 25).

[568] A Figura 25A apresenta as fotografias de células tingidas no compartimento inferior para as diferentes condições de ensaio. Os resultados são apresentados no

histograma (Figura 25B) e demonstram a ausência de indução de atividade metastática por AOX, uma vez que o número de células que cruzam a membrana é equivalente para as condições de controle e AOX. Por outro lado, na presença de NAC - um típico limpador de radicais permeáveis às células que visa a ERO citosólica -, observamos um enorme aumento na atividade metastática.

[569] Esses resultados demonstram claramente que a ação do AOX como inibidor da produção de ERO mitocondrial não interfere na produção de ERO citosólica.

Conclusão

[570] Quando aplicado diretamente a mitocôndrias isoladas, o AOX tem alguns efeitos adversos na função mitocondrial para altas concentrações (acima de 20 μM), provavelmente devido à protonabilidade da molécula, que pode atuar como um ácido fraco e perturbar o potencial da membrana mitocondrial. No entanto, pudemos observar que essas condições não são atingidas em células intactas, onde mesmo altas concentrações não desencadeiam disfunção mitocondrial.

[571] Estes resultados demonstram, portanto, que AOX não tem efeito tóxico nas células cultivadas para concentrações acima de 100 μM , isto é, bem acima das concentrações potenciais de circulação sob tratamento terapêutico. Isso foi confirmado na ausência de efeito de AOX sob essas condições na respiração celular e no metabolismo energético.

[572] A ausência de efeito do AOX na atividade metastática das células do carcinoma, em contraste com o N-acetilcisteína (NAC), que aumentou essa atividade, confirma a especificidade do AOX para a inibição da ERO mitocondrial e a ausência de efeito do AOX na produção de ERO citosólica.

Exemplo 13: Efeito do AOX em uma doença cardiovascular: hipertensão pulmonar

[573] O presente estudo tem como objetivo fornecer um novo tratamento alternativo para a hipertensão pulmonar. Essa doença é caracterizada pelo aumento da pressão arterial pulmonar e remodelamento das artérias pulmonares (AP), levando ao aumento da resistência vascular pulmonar, hipertrofia do ventrículo direito, insuficiência cardíaca direita e, por fim, morte.

Efeitos comparativos de AOX e AOL na contratilidade das artérias intrapulmonares

[574] Para abordar a questão do efeito do AOX, foram realizadas medidas isométricas de tensão nas artérias intrapulmonares, mediante contrações induzidas por agonistas usando serotonina ou endotelina, na ausência e na presença de AOL ou AOX.

Material e métodos

[575] As artérias intrapulmonares de primeira ordem (IPA1) foram divididas em pequenos segmentos tubulares com diâmetro externo de 1,5-2 mm e utilizados para a medição da

contração isométrica. Os anéis arteriais foram montados em sistemas isolados de banho de órgãos, contendo solução de Krebs (contendo NaCl 118,4 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM e D-glicose 11,1 mM, pH 7,4 ajustado com NaOH) a 37 °C e borbulhou continuamente com 15% de O₂/5% de CO₂. Uma carga inicial de 0,8 a 1 g foi aplicada aos anéis arteriais. Os tecidos foram deixados equilibrar por 1 hora na solução de Kreb e lavados a cada 15 minutos. Uma solução de alto KCl (80 mM) foi aplicada para obter uma contração de referência usada para normalizar as respostas contráteis subsequentes.

[576] As respostas contráteis aos diferentes agonistas foram então testadas através da construção de uma curva cumulativa de concentração-resposta (CCRC) em serotonina (5HT, 10⁻⁴ a 10⁻⁸ M) ou endotelina (ET-1, 10⁻⁷ a 10⁻¹⁰ M). Quando indicado, a AOL ou AOX foram pré-incubadas por 30 minutos e, em seguida, o CCRC para agonista foi realizado na presença do medicamento. Soluções de alto tERO de potássio foram obtidas substituindo uma quantidade equimolar de KCl por NaCl da solução de Kreb. A função endotelial foi testada em cada anel, examinando o relaxamento induzido por 10 µM de carbamilcolina nos anéis arteriais pulmonares pré-contraídos induzidos por Phe de 0,3 µM. As propriedades mecânicas passivas e ativas foram avaliadas usando sistemas transdutores, acoplados ao software IOX (EMKA Technologies,

Paris, França), a fim de facilitar a aquisição e análise de dados.

Resultados

[577] A contração foi dependente da concentração de serotonina (5HT) ou endotelina (ET-1), com contrações máximas medidas com 100 μ M de 5HT e 0,1 μ M de ET-1.

[578] A AOL poderia relaxar as contrações induzidas com até $5 \cdot 10^{-5}$ M de serotonina, mas não teve efeito nas contrações induzidas pela endotelina (Figura 26A).

[579] O mesmo padrão de resposta foi observado nos anéis incubados em um banho contendo AOX a 10 μ M (Figura 26B). No entanto, usando concentrações mais altas de AOX, as contrações induzidas com 10^{-4} M de serotonina podem ser relaxadas.

Conclusão

[580] Esses dados confirmam ainda que as mitocôndrias desempenham um papel importante na fisiologia da vasculatura pulmonar e sugerem uma maior eficácia do AOX do que a AOL para diminuir a contratilidade da artéria pulmonar e, portanto, para a prevenção e/ou tratamento da hipertensão pulmonar.

Efeito da AOL na proliferação de células do músculo liso arterial pulmonar

Material e métodos

[581] A detecção da proliferação de células do músculo liso arterial pulmonar (PASMC) foi testada usando um kit de imunoenensaio colorimétrico (Roche Applied Science, Indianapolis, Ind., EUA) com base na medição da incorporação de 5-bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU) durante a síntese de DNA.

[582] As PASMC isoladas foram semeadas em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal de bezerro (FCS) a uma densidade de $5 \cdot 10^3$ células/ cavidade/ 100 μ L em uma placa de cultura de 96 cavidades. A placa de cultura foi colocada em uma incubadora umidificada a 37 °C sob 5% de CO₂ em ar. Após 48 horas, as células foram sujeitas a 48 horas de parada do crescimento em meio de cultura isento de soro suplementado com 1% de insulina-transferrina-selênio. No final deste período, PASMC foram incubados por 24 horas em meio de cultura contendo:

- 0,2% FCS (condição de controle);
- 0,2% de FCS + 10, 20, 60 ou 100 μ M de AOL;
- FCS a 0,2% + 5HT 100 μ M (serotonina);
- 0,2% de FCS + 100 μ M 5HT + 10, 20, 60 ou 100 μ M de AOL;
- 10% de FCS;
- 10% de FCS + 10, 20, 60 ou 100 μ M de AOL.

[583] Cada condição foi testada em triplicado. 10 μ L de BrdU (100 μ M) foram então adicionados ao meio e as células

foram incubadas por mais 2 horas a 37 °C. A síntese de DNA foi então testada usando o método colorimétrico, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA de BrdU recém-sintetizado foi determinado medindo a absorbância das amostras em um leitor ELISA (Spectrostar/nano; BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, França) a um comprimento de onda de 380 nm com um comprimento de onda de referência de 490 nm.

Resultados

[584] Conforme relatado na Figura 27, a AOL inibiu com sucesso a proliferação induzida por uma alta concentração de FCS (10%) ou em mais condições fisiológicas, isto é, na presença de 0,2% de FCS e 100 µM de 5HT.

Conclusão

[585] Esses dados sugerem que a AOL tem um efeito potencial na prevenção e/ou tratamento da hipertensão pulmonar.

Exemplo 14: Efeito de AOX em uma doença cardiovascular: toxicidade cardíaca de antraciclinas

[586] O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do AOX em um modelo de toxicidade cardíaca de antraciclinas. Isso foi avaliado pela administração de fármacos anticâncer derivadas da antraciclina, juntamente com AOX, em camundongos com 10 semanas de idade por 14 a 17 dias.

Material e métodos

[587] Os estudos foram realizados em camundongos Sprague-Dawley com 10 semanas de idade e diferentes tratamentos foram administrados por via intraperitoneal por 14 a 17 dias, antes da coleta do coração para análise. Para respeitar o "princípio dos três Rs" na experimentação animal, o número de grupos testados foi limitado o máximo possível, principalmente concentrando os experimentos em apenas uma molécula de antraciclina, a Doxorubicina, e comparando o efeito de AOX a um protetor alternativo. apenas molécula, nomeadamente Dexrazoxano.

[588] No final do experimento, o coração dos camundongos tratados será removido e a função cardíaca será estudada exaustivamente após a perfusão desses corações em um sistema Langendhorf para determinar a função cardíaca afetada pela doxorubicina e se o tratamento com AOX é eficiente.

[589] O estudo compreende 5 grupos diferentes para 8 camundongos cada:

1 - Grupo de controle. Os camundongos receberam apenas o veículo, composto por 5% de DMSO + 95% de NaCl 0,9%, duas vezes ao dia (manhã e noite) por 17 dias;

2 - Grupo Doxo. Os camundongos receberam doxorubicina na dose de 3 mg/kg (i.p.), a cada dois dias (manhã), a partir do dia 3, por 14 dias. Os camundongos receberam veículo apenas para qualquer outra injeção;

3 - Grupo Dexra. Os camundongos foram tratados com Dexrazoxano (agente protetor de referência) na dose de 30 mg/kg i.p. simultaneamente com doxorubicina na dose de 3 mg/kg i.p. (de acordo com a proporção de dosagem recomendada pela Agência Regional de Saúde Francesa "ARS" em 2011), a cada dois dias, a partir do dia 3, por 14 dias. Os camundongos receberam veículo apenas para qualquer outra injeção;

4 - Grupo AOX. Os camundongos foram tratados com AOX e Doxorubicina:

- 4 mg/kg i.p. AOX, manhãs e noites, por 72 horas antes da primeira injeção de Doxorubicina;

- nos dias da injeção de Doxorubicina (com base no grupo Doxo): 4 mg/kg i.p. AOX juntamente com a injeção de Doxorubicina, seguida 90 minutos depois por uma segunda injeção de AOX na dose de 4 mg/kg i.p.;

- nos dias sem injeção de doxorubicina: 4 mg/kg i.p. AOX, manhãs e noites.

5 - Grupo AOX/Carv/Enal. Os camundongos foram tratados de forma semelhante aos camundongos do grupo AOX aqui acima. As injeções de AOX foram suplementadas com um tratamento clássico para insuficiência cardíaca (Carvediol, um bloqueador β , na dose de 1 mg/kg, e Enalapril, um vasodilatador, na dose de 0,5 mg/kg).

Exemplo 15: Efeito de AOX em uma doença autoimune: esclerodermia

[590] O presente estudo tem como objetivo testar o efeito do AOX nos fibroblastos de pacientes com esclerodermia. A esclerodermia é uma doença autoimune sistêmica crônica caracterizada por uma síntese aumentada de colágeno, danos aos pequenos vasos sanguíneos, ativação de linfócitos T e produção de tecidos conjuntivos alterados.

Material e métodos

[591] Os fibroblastos de um doador saudável e de um paciente com esclerodermia são cultivados em frascos, em meio DMEM completo (10% FCS, 1% antibiótico). Após 6 horas de adesão, as células são privadas de soro durante a noite.

[592] AOX é preparado extemporaneamente. AOX foi pesado e dissolvido em DMSO a 5 mg/mL. Esta solução estoque foi posteriormente diluída para 10 e 5 mM final, em DMSO. O AOX foi ainda diluído em meio DMEM completo, para atingir concentrações finais de 40, 20 e 10 μ M.

[593] As células cultivadas foram contatadas com AOX a 40, 20 e 10 μ M. As células de controle foram contatadas com meio DMEM completo, suplementado com DMSO (0,2%) e N-acetilcisteína (3 mM). As células são incubadas em condições normóxicas (37 °C, 20% de O₂) e sob hipóxia (37 °C, 1% de O₂) por 6 ou 24 horas.

[594] Para análise de secreção de MMP-1, MIP e MCP, o sobrenadante da cultura é colhido, aliquotado e armazenado a -20 °C para dosagem. A MMP-1 é quantificada por ELISA

(Abcam), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de MCP-1 e MIP-1 α são quantificadas por CBA (Cytometric Bead Array, Biolegend).

[595] Para a análise de expressão de MMP1, colágeno e CCl₂, as células são destacadas com tripsina e lavadas com PBS. O sedimento celular é então ressuspenso em tampão de lise e a extração do RNA é realizada de acordo com as instruções do fabricante (Nucleospin RNA Plus, Macherey Nagel). 1 μ g de RNA é retro-transcrito (GoScript, Promega) e depois diluído 10 vezes antes de SYBR Green qPCR (SYBR qPCR Premix Ex Taq, Takara) em uma máquina de BioRad CFX384 PCR. Iniciadores para MMP-1, CollA2 e CCl₂ são usados para medir genes de interesse; iniciadores para Ppia, RPLP0 e EEF1A1 são usados para medir genes de referência.

Exemplo 16: AOX inibe seletivamente a produção de EROs no sítio QI, ao contrário do Oltipraz

Material e métodos

[596] Após isolar recentemente as mitocôndrias do coração de camundongos e medir a quantidade de proteínas da suspensão mitocondrial, a produção de H₂O₂ em resposta à adição exógena de concentrações crescentes de AOL, AOX e Oltipraz foi medida fluorimetricamente com Amplex Red e peroxidase de rábano silvestre (HRP).

[597] Os dois principais sítios de produção de ERO/H₂O₂ mitocondrial foram direcionados individualmente, usando a

combinação de succinato (substrato energético do complexo respiratório 2) e inibidores conhecidos da cadeia respiratória, nomeadamente para o sítio I₀, succinato 10 mM sozinho (CCCP como controle positivo) e para sítio IIIQ_{outer}, succinato 10 mM, rotenona 4 µM e antimicina A 2,5 µM (mixotiazol como controle positivo). Essas soluções de "reação" foram projetadas para gerar taxas máximas de produção de ERO/H₂O₂ predominantemente a partir de um único sítio dentro da cadeia (Quinlan et al., 2013. Redox Biol. 1: 304-12).

[598] Para a medição, uma solução de trabalho de 50 µM de reagente vermelho Amplex e 20 µg/ml de HRP foi misturada ao tampão de reação nas cavidades correspondentes de uma placa de 96 cavidades (Greiner 96 F-bottom), na ausência ou presença de concentrações crescentes (de 0 a 80 µM) de AOL, AOX ou Oltipraz. A adição de mitocôndrias a uma concentração final de 0,125 mg/mL por cavidade iniciou o ensaio. O volume total apropriado por cavidade de microplaca foi de 200 µL.

[599] As placas foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 20 a 25 minutos. Uma agitação orbital dupla (100 rpm - 3 segundos) foi aplicada antes da leitura dos valores de fluorescência do ponto final em um leitor de placas CLARIOstar (BMG LABTECH GmbH, Alemanha). De fato, o H₂O₂ reage com o Amplex Red em uma estequiometria 1: 1, produzindo o composto fluorescente resorufina que foi

analisado usando as seguintes configurações óticas (comprimento de onda de excitação a 546-20 nm; emissão a 600-40 nm; ganho: 750).

[600] Além disso, uma curva padrão de H_2O_2 , com concentrações variando de 0 a 5 μM , foi preparada no tampão experimental que consistia em (em mM): 140 sacarose, 100 KCl, 1 EGTA, 20 MgCl_2 , 10 KH_2PO_4 e 1 g/L (p/v) BSA essencialmente isento de ácidos graxos (pH 7,2).

Resultados

[601] A Figura 28 ilustra o efeito de concentrações crescentes de AOL, AOX e Oltipraz (de 0 a 80 μM) na produção de $\text{ERO}/\text{H}_2\text{O}_2$ medida sob essas condições.

[602] Parece claramente a partir dos resultados da Figura 28A que AOL e AOX inibem fortemente a produção de ERO pelo complexo I, em concentrações tão baixas quanto 2,5 μM . Pelo contrário, o Oltipraz, nas mesmas concentrações e até 80 μM , mostrou apenas um fraco efeito na inibição da produção de ERO no sítio I_0 .

[603] A Figura 28B mostra ainda que nenhum dos três compostos tem um efeito na inibição da produção de ERO pelo complexo III.

[604] Juntos, esses resultados demonstram claramente que AOL e AOX são inibidores seletivos de I_0 da produção de ERO mitocondrial, ao contrário do Oltipraz.

Exemplo 17: Análogos AOX inibem a produção de superóxido/H₂O₂ pelas mitocôndrias

Material e métodos

[605] O mesmo protocolo descrito acima no Exemplo 16 foi utilizado para medir a produção de ERO/ H₂O₂ em resposta à adição exógena de vários análogos AOX. Ou seja, uma solução de trabalho de 50 µM de reagente vermelho Amplex e 20 µg/mL de HRP foi misturada ao tampão de reação nas cavidades correspondentes de uma placa de 96 cavidades (Greiner 96 F-bottom), na ausência ou presença de concentrações crescentes (de 1 a 25 µM) de oito compostos (Cp1; Cp2; Cp3; Cp4; Cp5; Cp6a; Cp8; Cp9a). A adição de mitocôndrias a uma concentração final de 0,125 mg/mL por cavidade iniciou o ensaio. O volume total apropriado por cavidade de microplaca foi de 200 µL.

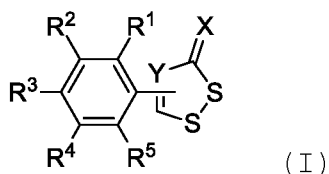
Resultados

[606] As Figura 29A e 29B ilustram o efeito de concentrações crescentes de análogos AOX (de 2,5 a 25 µM) na produção de ERO/H₂O₂ medida sob essas condições.

[607] Parece claramente a partir dos resultados apresentados nestas figuras que os análogos AOX inibem a produção de ERO pelo complexo I, seletivamente em relação ao complexo III.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto **caracterizado** pelo fato de que possui fórmula (I):



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

X representa S, O ou NHOH; de preferência **X** é S ou O; mais preferencialmente, **X** é S;

Y representa CH, C ou N; de preferência **Y** é CH ou N; mais preferencialmente **Y** é CH;

R¹, **R²**, **R⁴** e **R⁵** representam cada um independentemente hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil;

R³ é hidroxí; ou **R³** e **R²**, juntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam uma fração heteroaril de 5 membros, em que **-R³-R²-** representa **-A-CR⁶=B-** ou **-B=CR⁶-A-**; em que:

A representa O, S ou NR⁷; em que **R⁷** representa hidrogênio, alquil C₁-C₈ ou alquilocarbonil;

B representa CH ou N; e

R^6 representa hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil;

para uso como inibidor da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas aos radicais livres de oxigênio.

2. Composto para uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido composto é selecionado entre:

5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditíol-3-tiona;

5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditíol-3-ona;

5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditíol-3-ona oxima;

5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona;

4-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditíol-3-tiona;

5-(2-hidroxibenzo[d]oxazol-5-il)-3H-1,2-ditíol-3-tiona;

5-(2-hidroxibenzo[d]tiazol-6-il)-3H-1,2-ditíol-3-tiona;

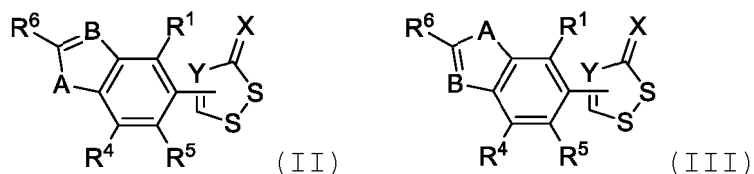
5-(benzofuran-5-il)-3H-1,2-ditíolo-3-tiona; e

metil 5-(3-tioxo-3H-1,2-ditíol-5-il)-1H-indol-1-carboxilato.

3. Composto para uso, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o

referido composto é 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditio1-3-tiona.

4. Composto para uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que possui fórmula (II) ou (III):



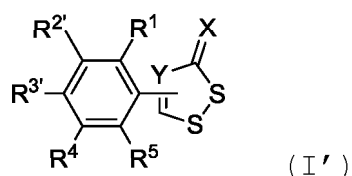
ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que X , Y , R^1 , R^4 , R^5 , R^6 , A e B são conforme definidos na reivindicação 1.

5. Composto para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o referido composto inibe a produção mitocondrial de ERO, preferencialmente o composto inibe a produção mitocondrial de ERO no sítio I_0 do complexo I de mitocôndrias.

6. Composto para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que as referidas doenças relacionadas a radicais livres de oxigênio são selecionadas do grupo que compreende doenças cardiovasculares, doenças do envelhecimento, doenças autoimunes, síndromes progeroides, síndromes parkinsonianas, doenças neurológicas, lesões isquêmicas e por reperfusão, doenças infecciosas, doenças musculares, doenças pulmonares, renais e hepáticas.

7. Composto para uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que as referidas doenças cardiovasculares são selecionadas do grupo que compreende infarto do miocárdio, toxicidade cardíaca, hipertensão arterial pulmonar, insuficiência cardíaca, doenças cardiopulmonares, isquemia, ataque cardíaco, acidente vascular cerebral, trombose e embolia.

8. Composto **caracterizado** pelo fato de que possui fórmula (I'):



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

X representa S, O ou NHOH; de preferência **X** é S ou O; mais preferencialmente, **X** é S;

Y representa CH, C ou N; de preferência **Y** é CH ou N; mais preferencialmente **Y** é CH;

R¹, **R⁴** e **R⁵** representam cada um independentemente hidrogênio, hidroxí, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxi, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil;

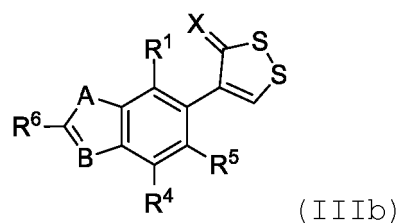
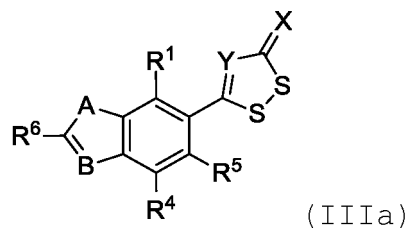
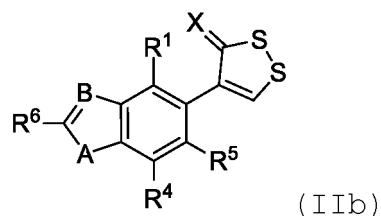
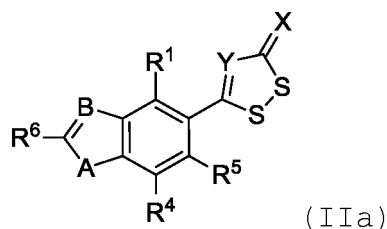
$R^{2'}$ e $R^{3'}$, juntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam uma fração heteroaril de 5 membros em que $-R^{3'}-R^{2'}-$ representa $-A-CR^6=B-$ ou $-B=CR^6-A-$; em que:

A representa O, S ou NR^7 ; em que R^7 representa hidrogênio, alquil C1-C8 ou alquilocarbonil;

B representa CH ou N; e

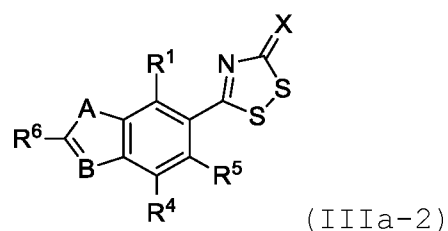
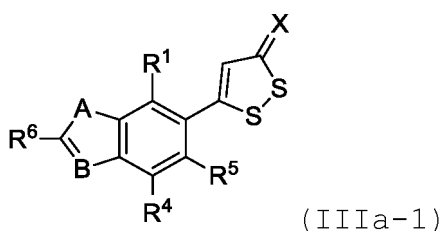
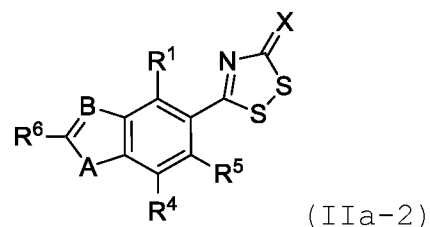
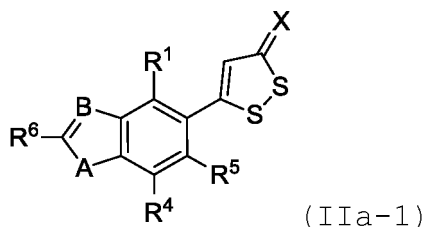
R^6 representa hidrogênio, hidroxil, halo, amino, alquilsulfonil, aminosulfonil, ciano, nitro, carboxil, aril, alcoxi, haloalquil, alquilamino, aminoalquil, nitrooxialquil ou carboxialquil.

9. Composto, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que possui fórmula (IIa), (IIb), (IIIa) ou (IIIb):



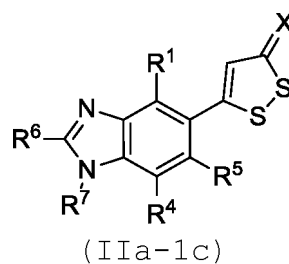
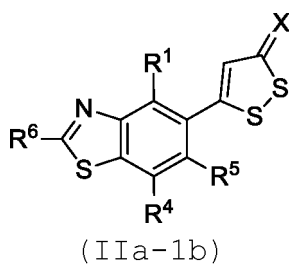
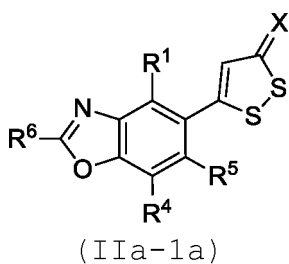
ou um tautômero, sal ou solvato farmacologicamente aceitável do mesmo, em que X, Y, A, B, R^1 , R^4 , R^5 e R^6 são conforme definidos na reivindicação 8.

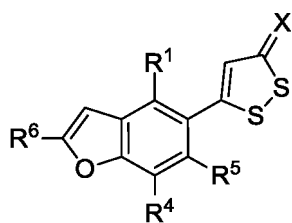
10. Composto, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, **caracterizado** pelo fato de que possui fórmula (IIa-1), (IIa-2), (IIIa-1) ou (IIIa-2)



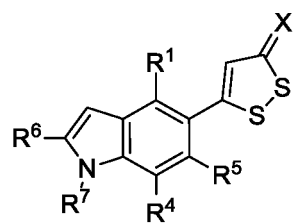
ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **X**, **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são conforme definidos na reivindicação 8.

11. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, **caracterizado** pelo fato de que possui fórmula (IIa-1a), (IIa-1b), (IIa-1c), (IIa-1d), (IIa-1e), (IIa-2a), (IIa-2b), (IIa-2c), (IIa-2d), (IIa-2e), (IIIa-1a), (IIIa-1b), (IIIa-1c), (IIIa-1d), (IIIa-1e), (IIIa-2a), (IIIa-2b), (IIIa-2c), (IIIa-2d) ou (IIIa-2e)

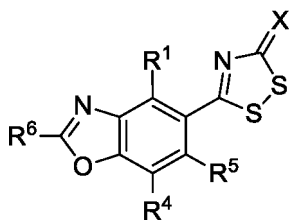




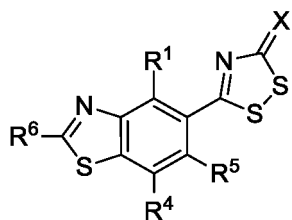
(IIa-1d)



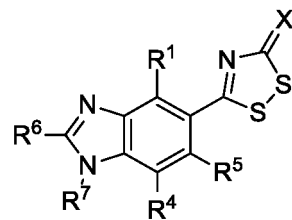
(IIa-1e)



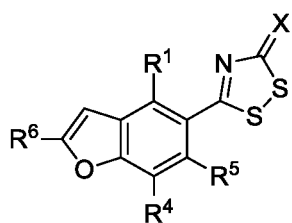
(IIa-2a)



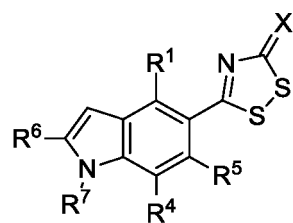
(IIa-2b)



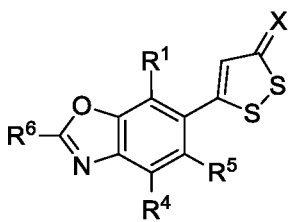
(IIa-2c)



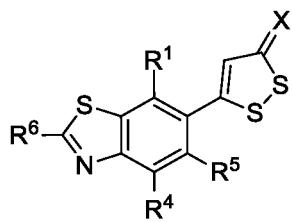
(IIa-2d)



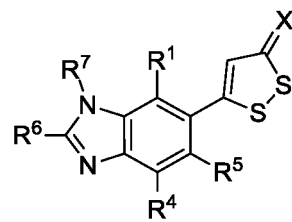
(IIa-2e)



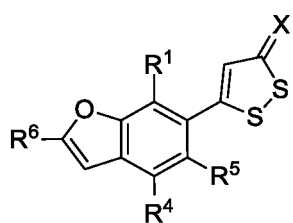
(IIIa-1a)



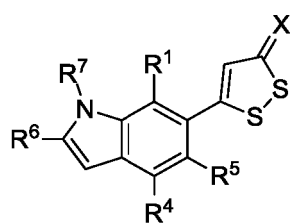
(IIIa-1b)



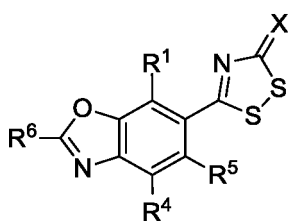
(IIIa-1c)



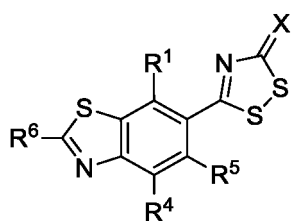
(IIIa-1d)



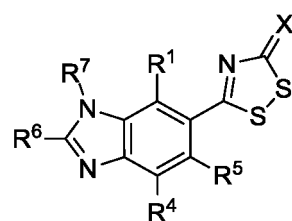
(IIIa-1e)



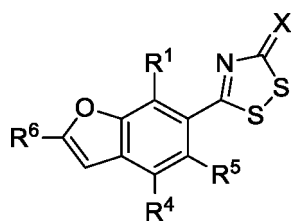
(IIIa-2a)



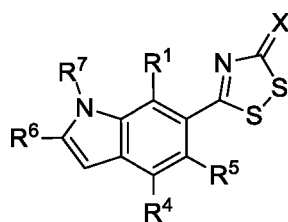
(IIIa-2b)



(IIIa-2c)



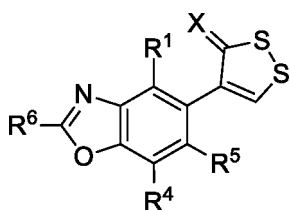
(IIIa-2d)



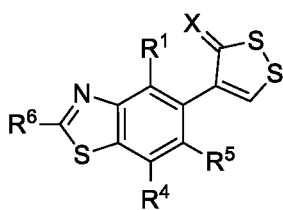
(IIIa-2e)

ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **X**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵**, **R⁶** e **R⁷** são conforme definidos na reivindicação 8.

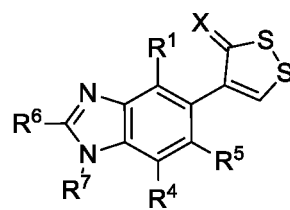
12. Composto, de acordo com a reivindicação 8 ou reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que possui fórmula (IIb-1), (IIb-2), (IIb-3), (IIb-4), (IIb-5), (IIIb-1), (IIIb-2), (IIIb-3), (IIIb-4) ou (IIIb-5)



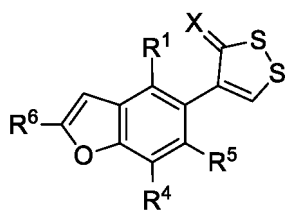
(IIb-1)



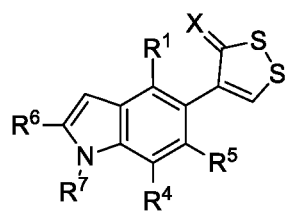
(IIb-2)



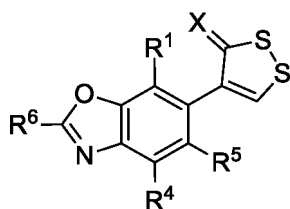
(IIb-3)



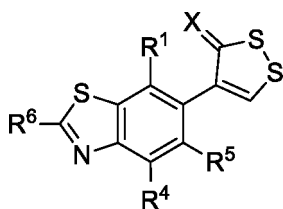
(IIb-4)



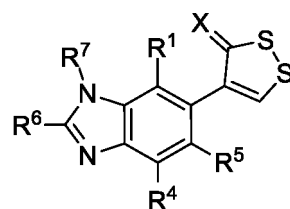
(IIb-5)



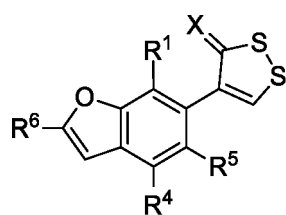
(IIIb-1)



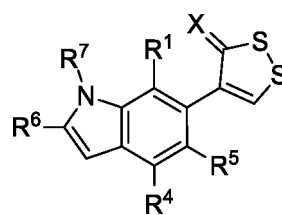
(IIIb-2)



(IIIb-3)



(IIIb-4)



(IIIb-5)

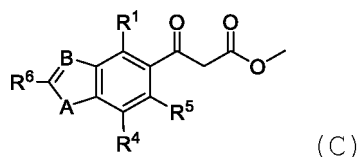
ou um tautômero, sal ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo, em que **X**, **R**¹, **R**⁴, **R**⁵, **R**⁶ e **R**⁷ são conforme definidos na reivindicação 8.

13. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 8 a 12, ou um tautômero, sal ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo, e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

14. Medicamento **caracterizado** pelo fato de que compreende um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 8 a 12, ou um tautômero, sal ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo.

15. Processo para fabricar um composto de Fórmula (IIa-1) conforme definido na reivindicação 10 ou reivindicação 11, ou um tautômero, sal ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) ciclizar um composto de fórmula (C)

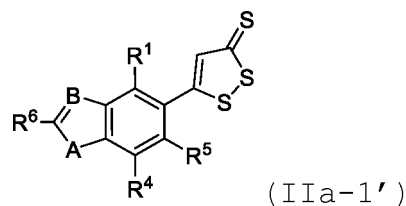


(C)

em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são conforme definidos na reivindicação 10;

com um reagente à base de enxofre, na presença de um siloxano;

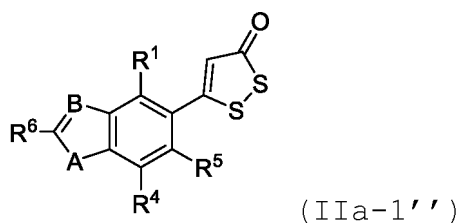
para obter um composto de fórmula (IIa-1')



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são conforme definidos na reivindicação 10;

e opcionalmente:

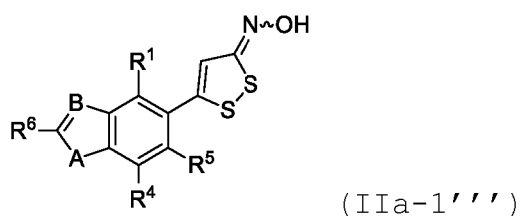
b1) o composto de fórmula (IIa-1') pode reagir com um oxidante; de preferência, o oxidante é o acetato de mercúrio $\text{Hg}(\text{OAc})_2$; para obter um composto de fórmula (IIa-1'')



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são conforme definidos na reivindicação 10;

ou

b2) o composto de fórmula (IIa-1') pode reagir com a hidroxilamina $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$; na presença de uma base; de preferência, a base é acetato de sódio (AcONa); para obter um composto de fórmula (IIa-1''')



ou um tautômero, sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que **A**, **B**, **R¹**, **R⁴**, **R⁵** e **R⁶** são conforme definidos na reivindicação 10.

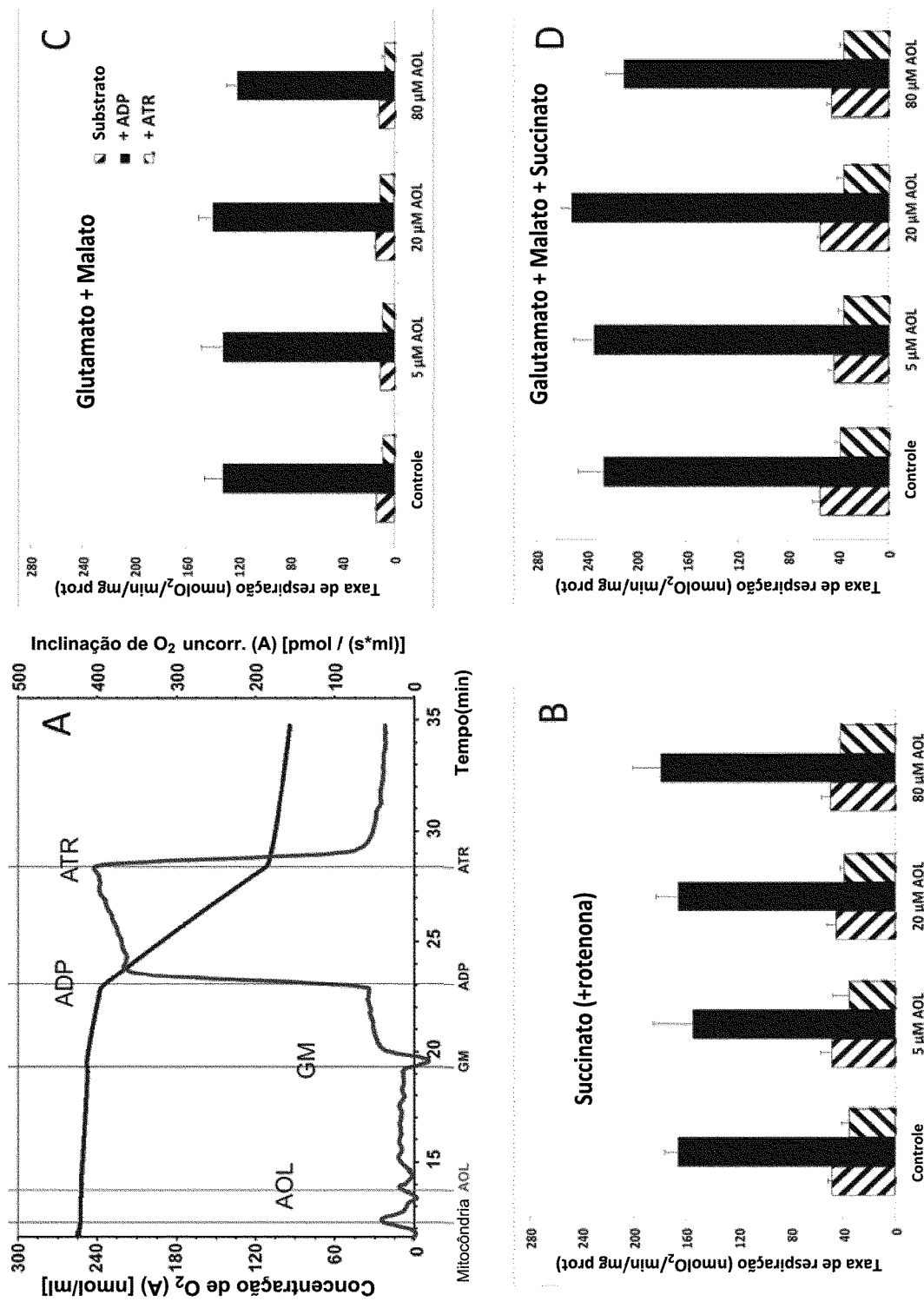


FIG. 1

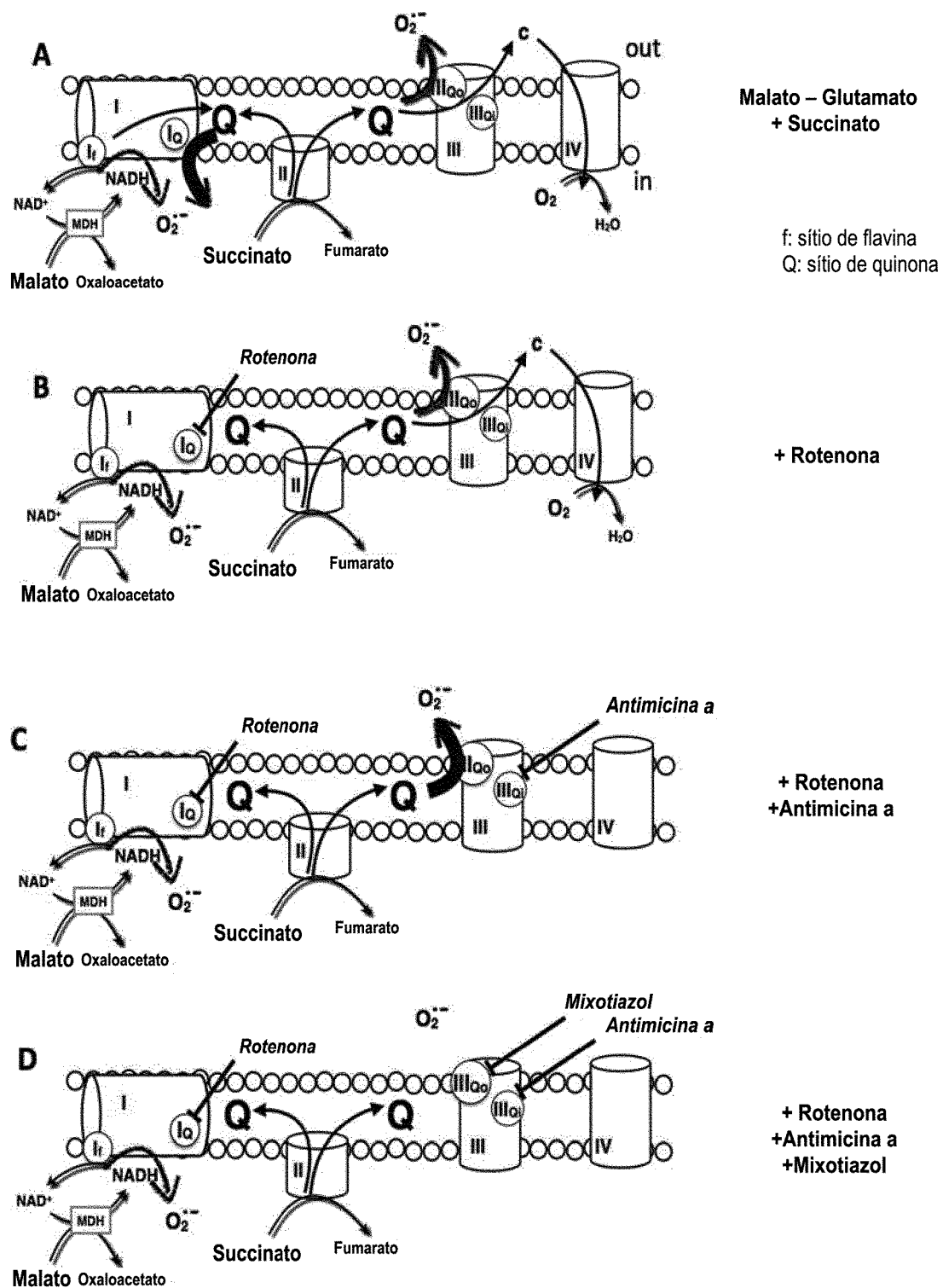


FIG. 2A-D

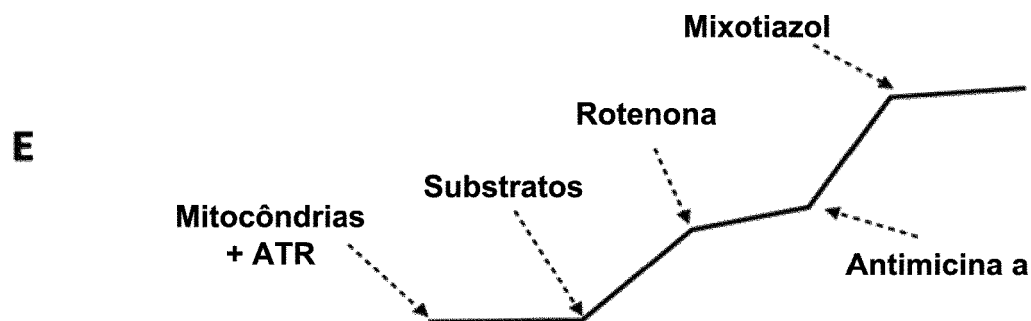


FIG. 2E

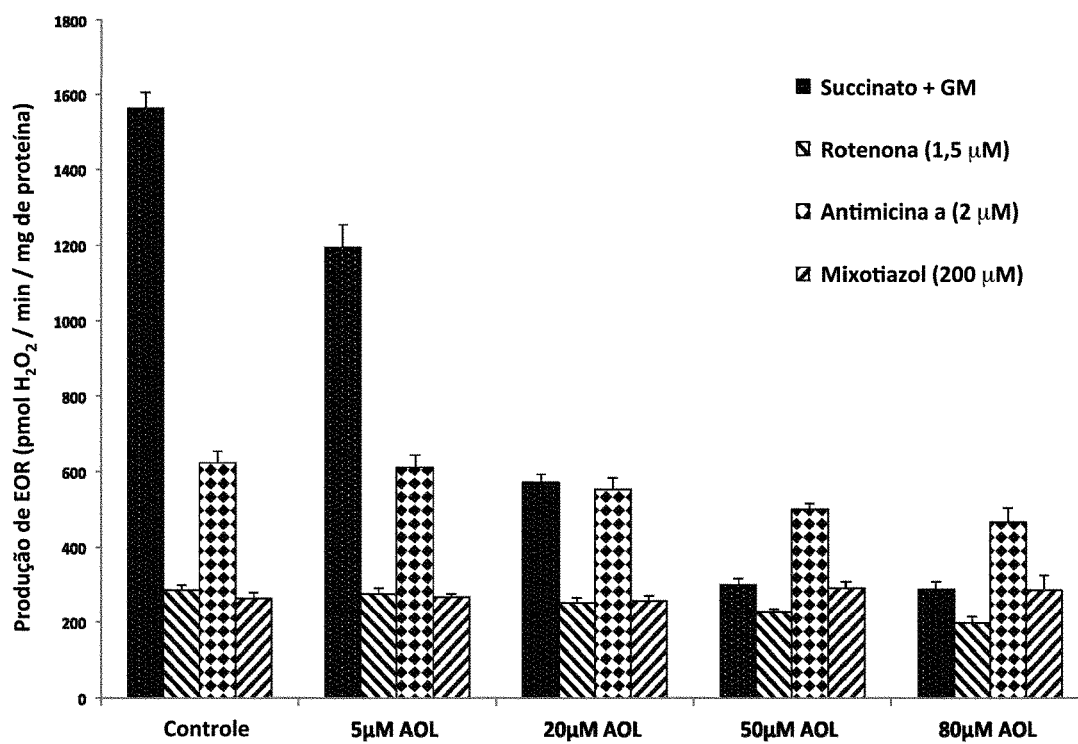


FIG. 3

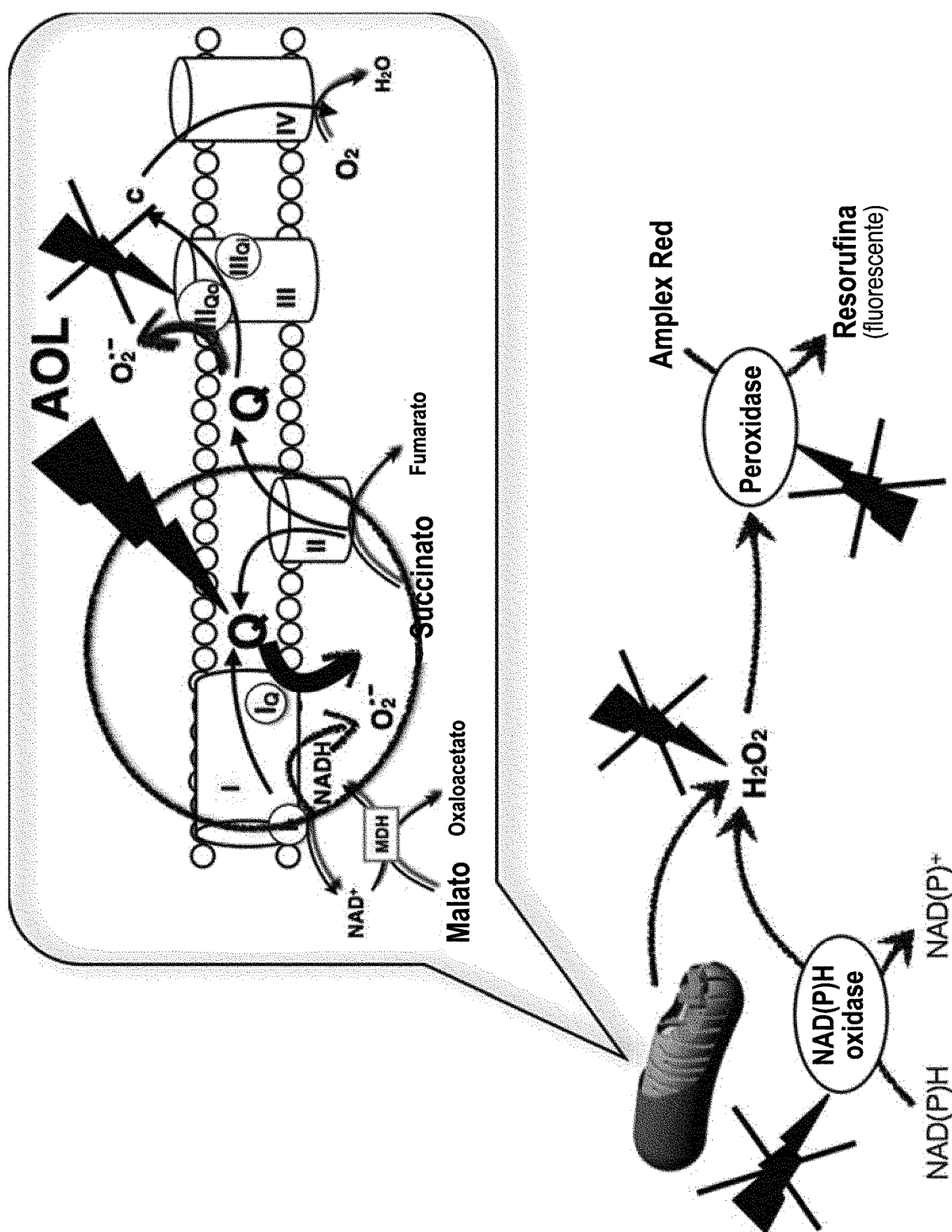


FIG. 4

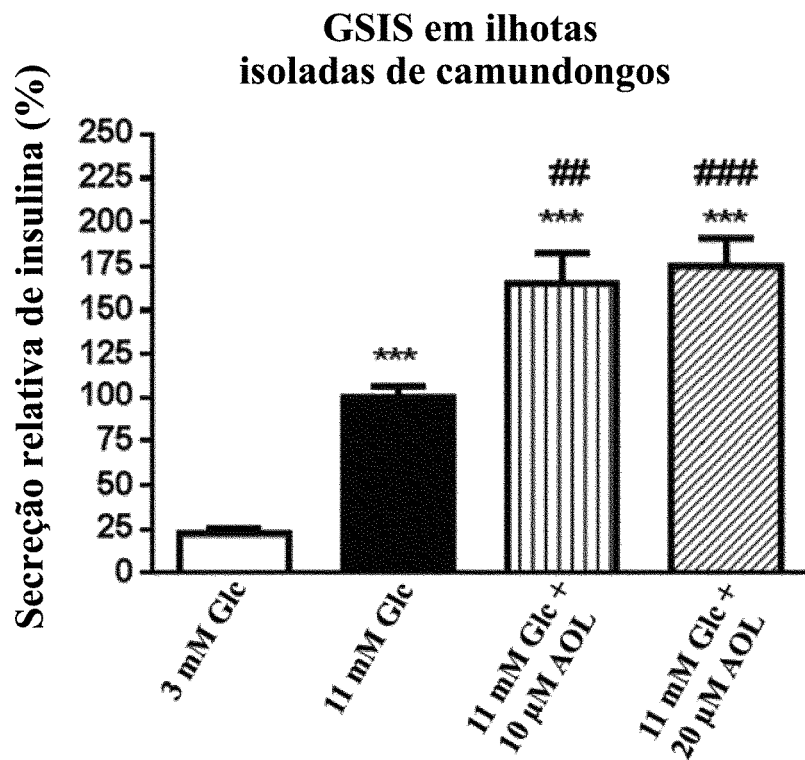


FIG. 5

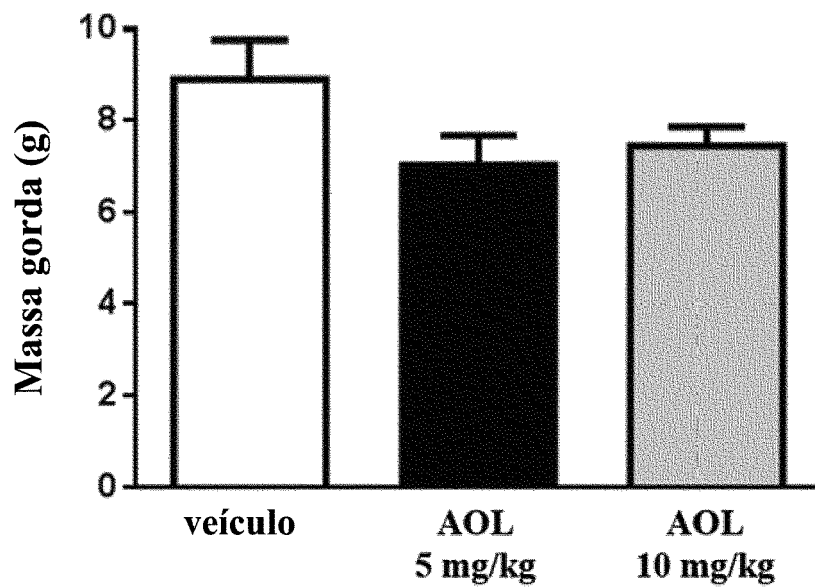


FIG. 6

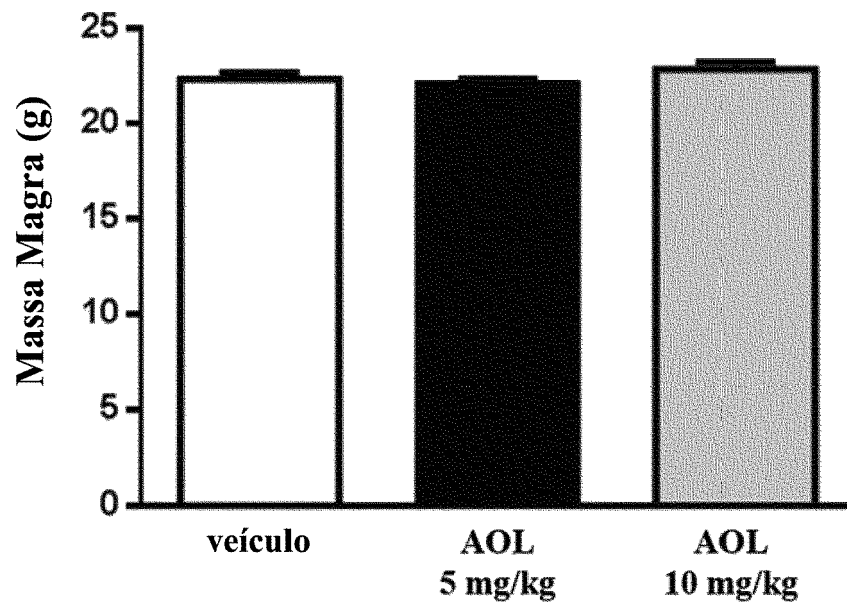


FIG. 7

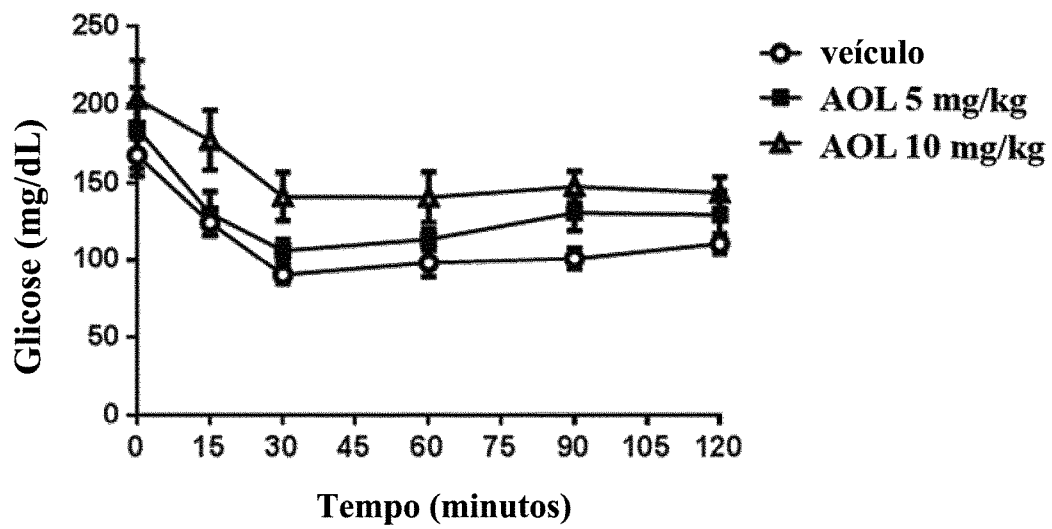


FIG. 8

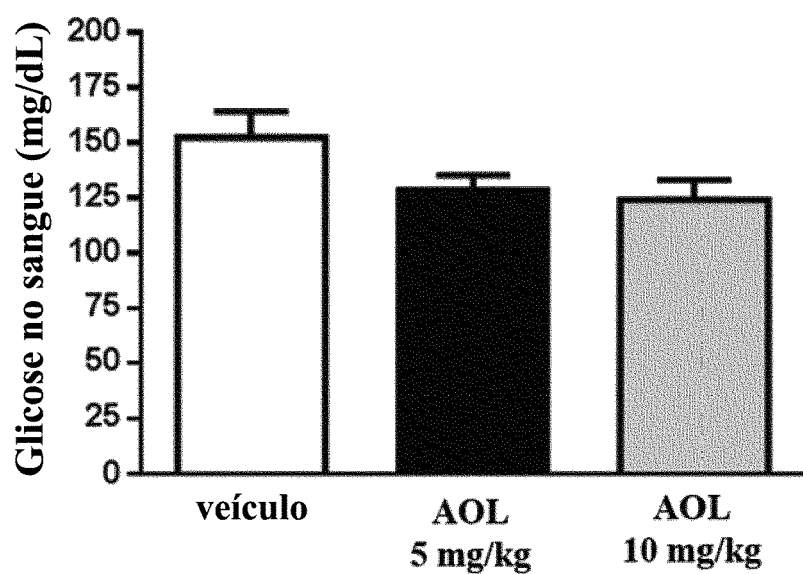


FIG. 9

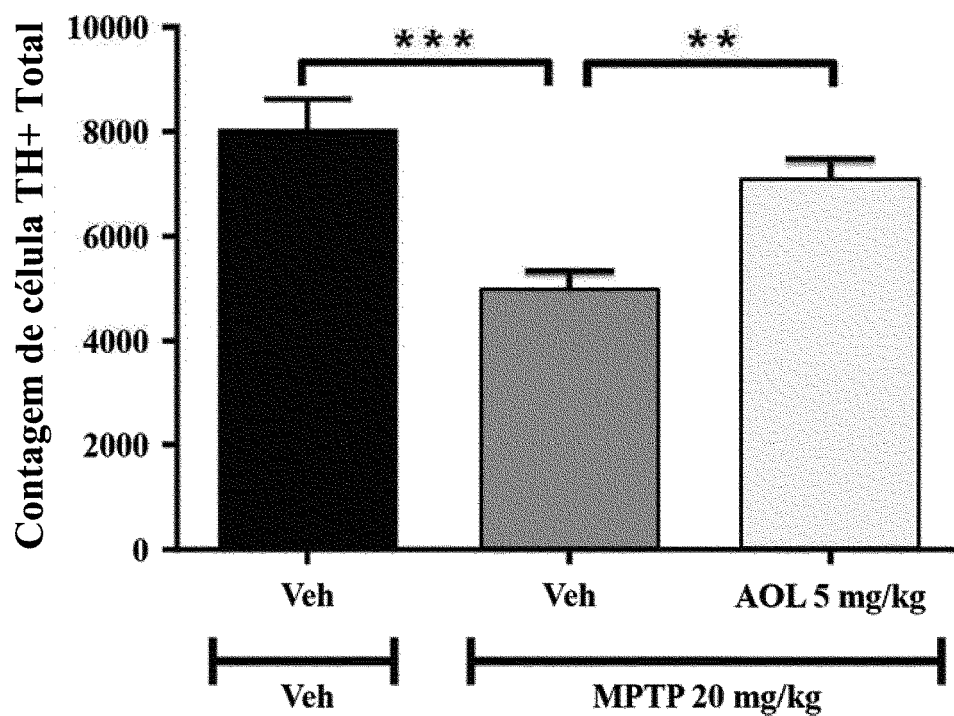


FIG. 10

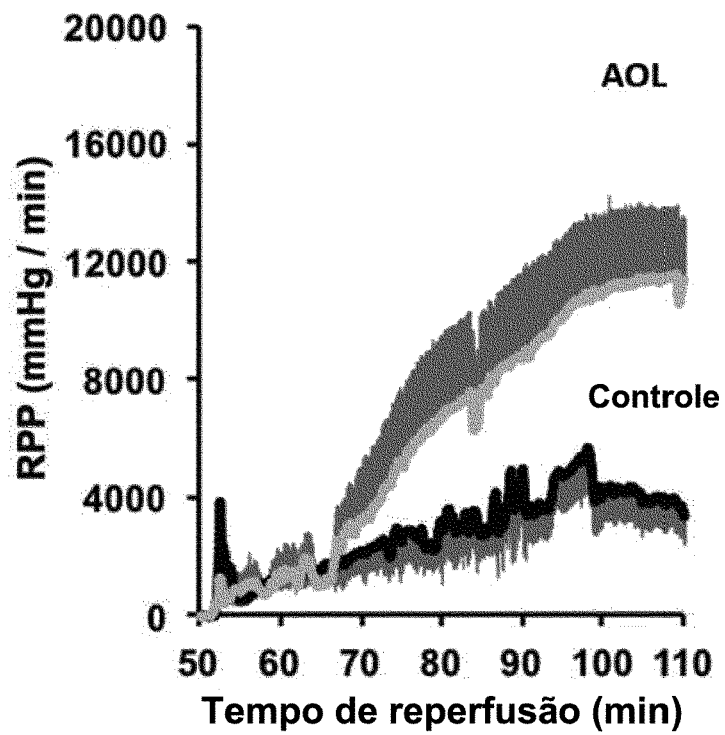


FIG. 11

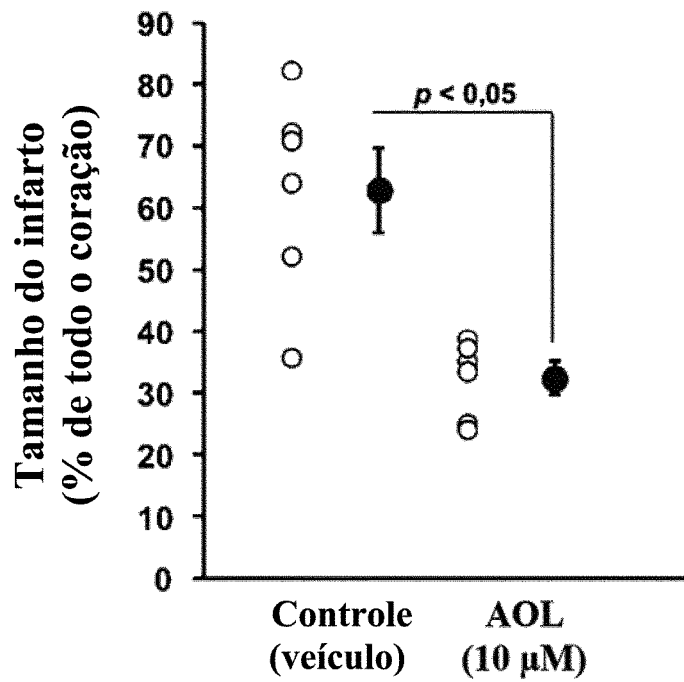


FIG. 12

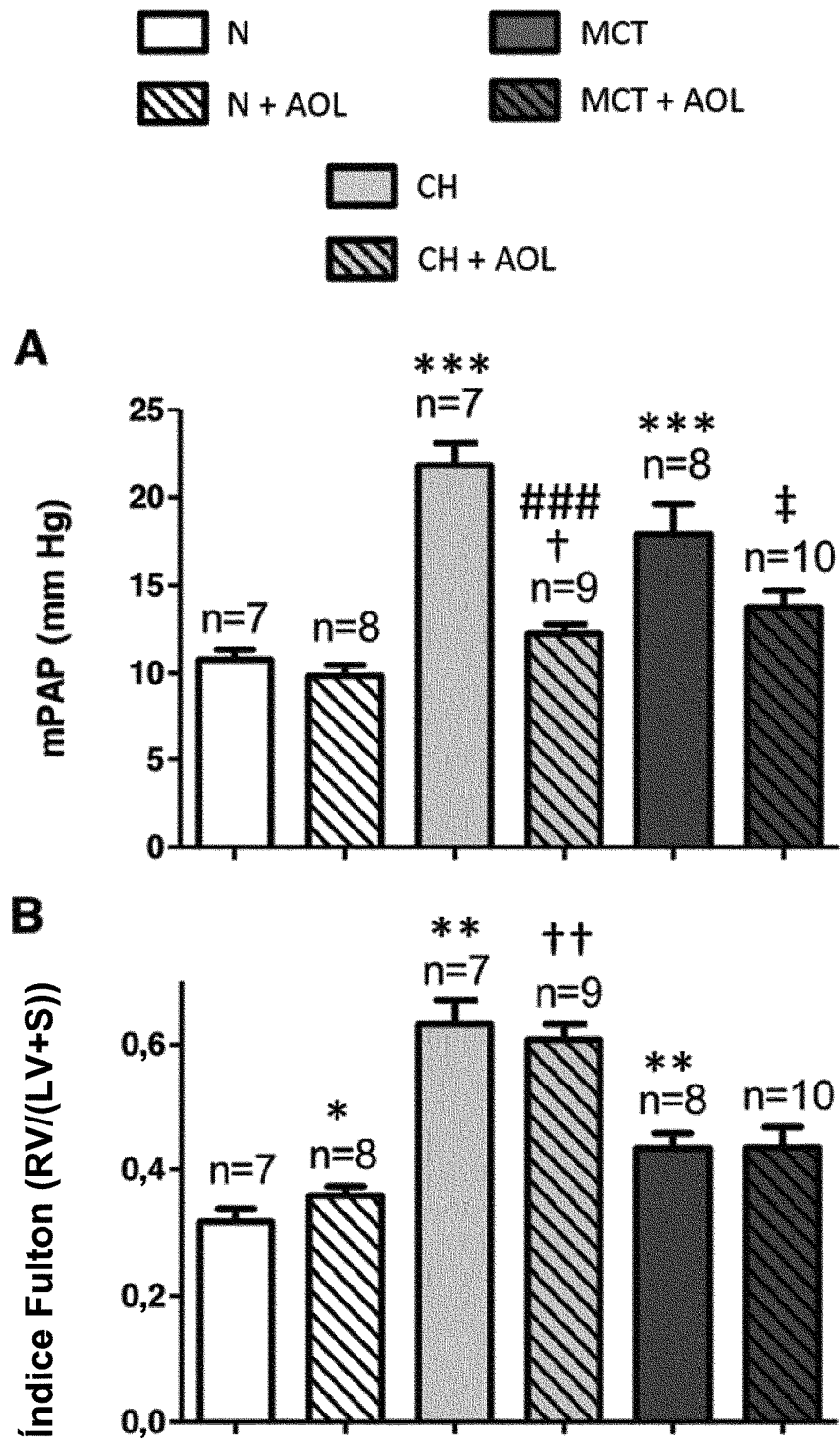


FIG. 13

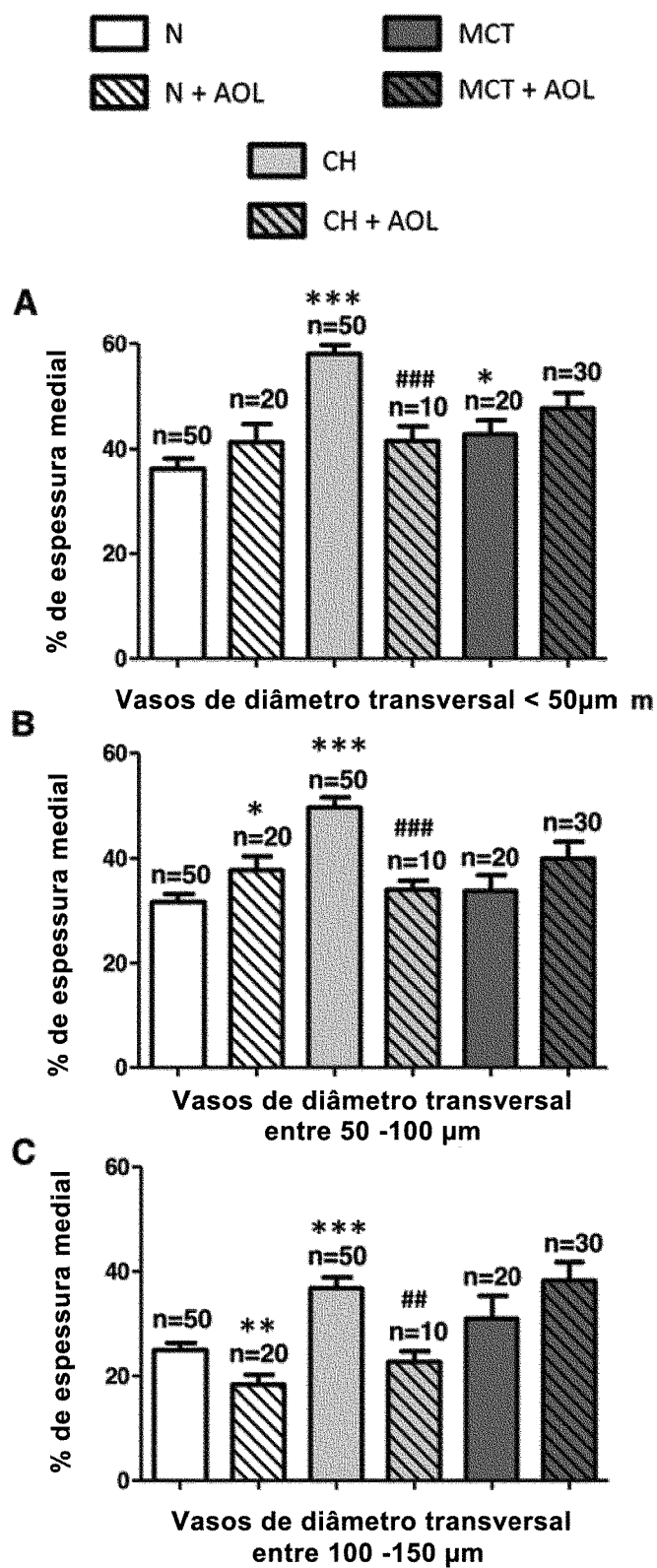


FIG. 14

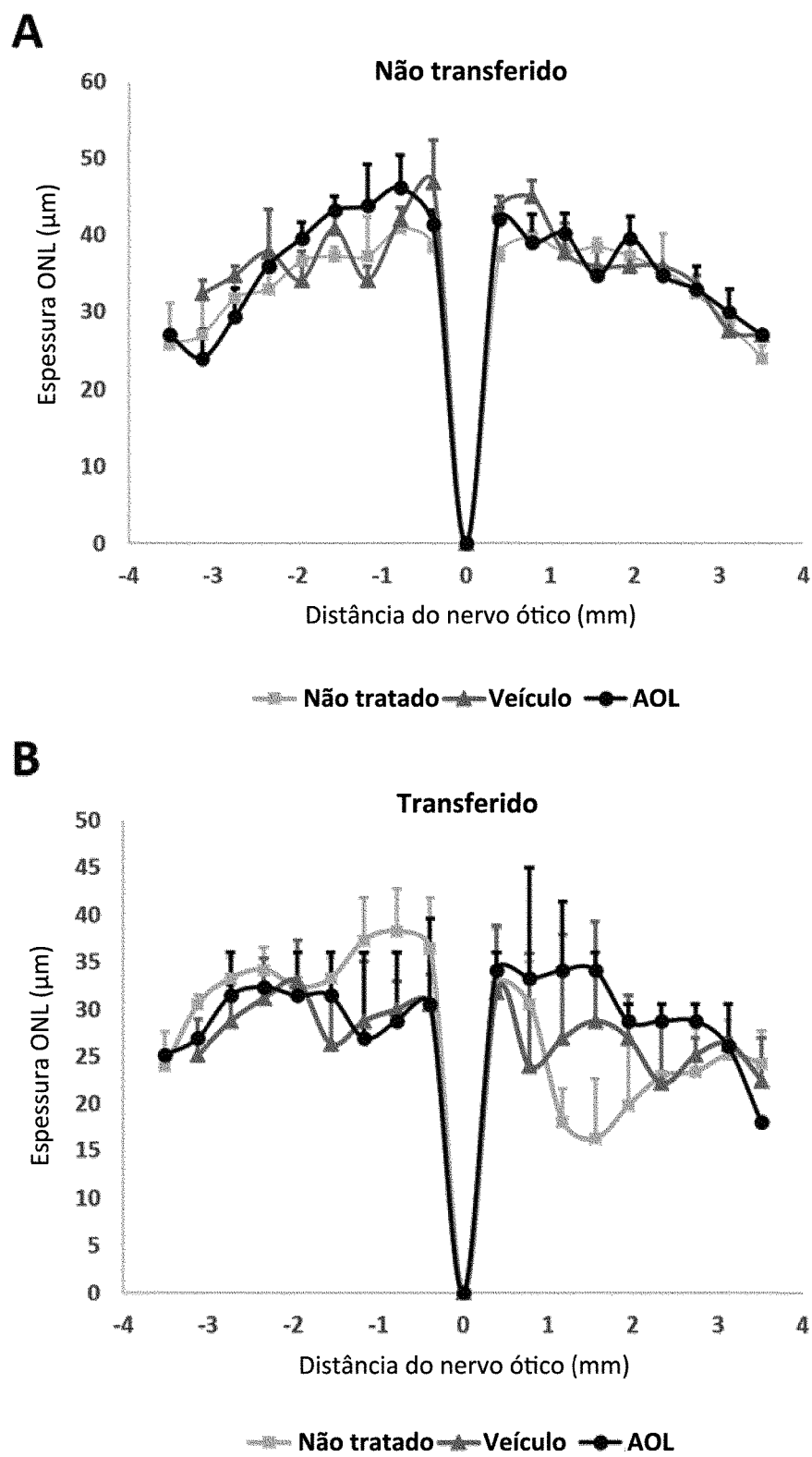


FIG. 15

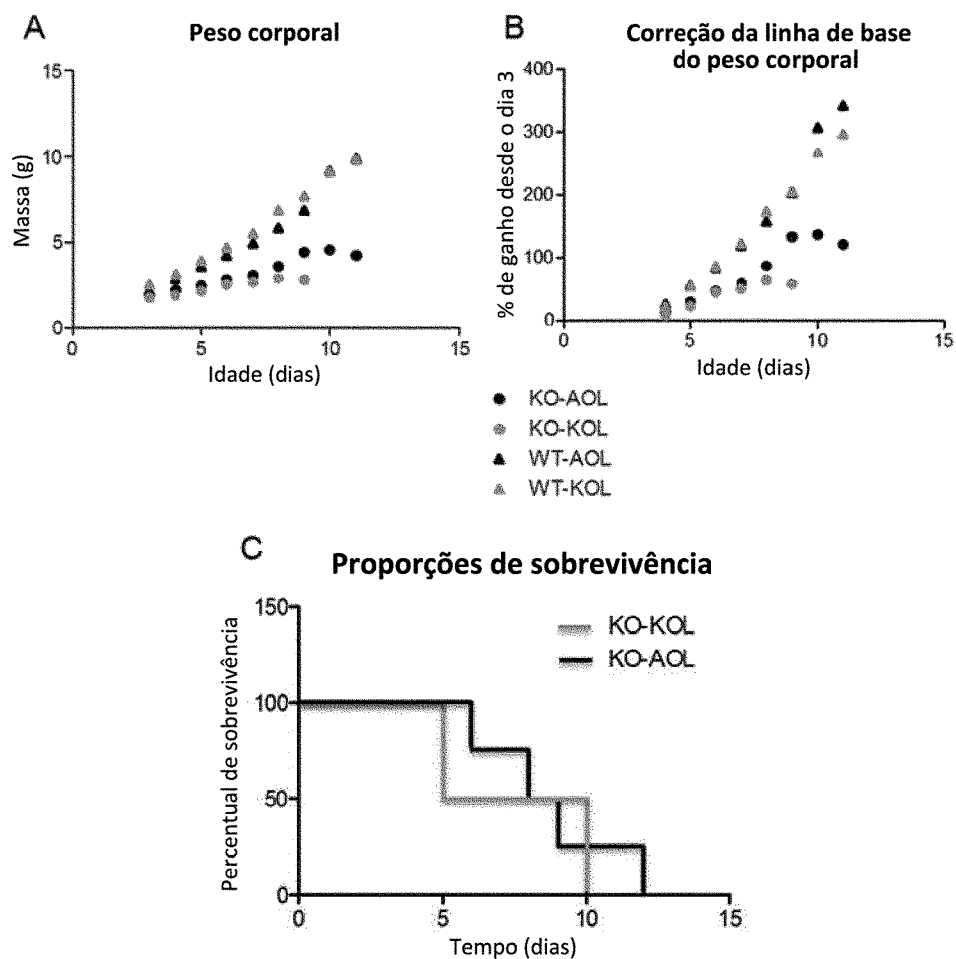


FIG. 16

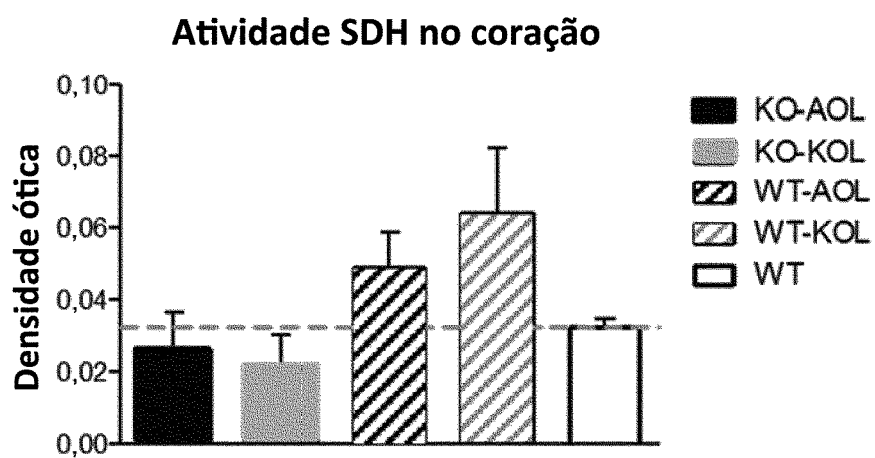


FIG. 17

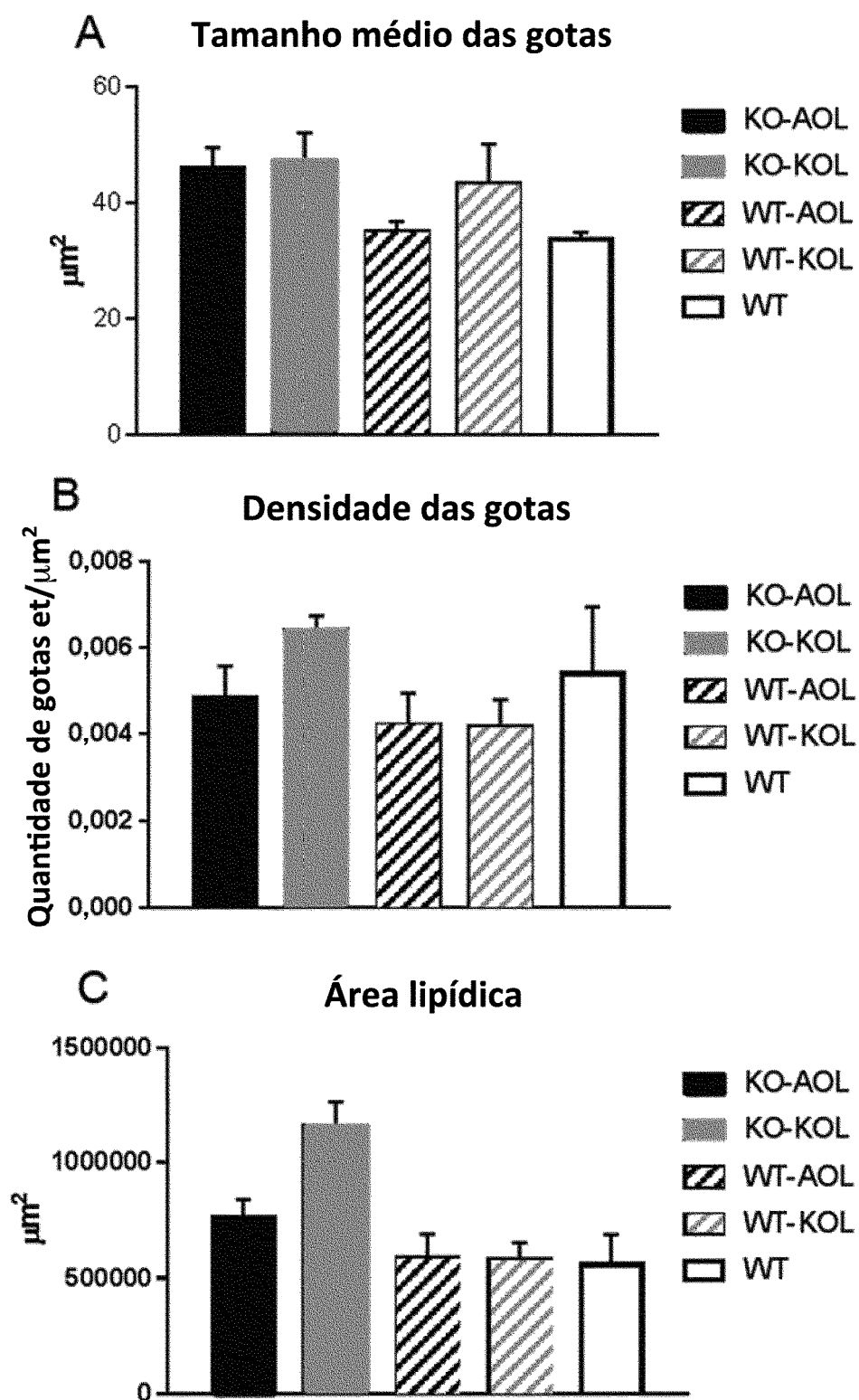


FIG. 18

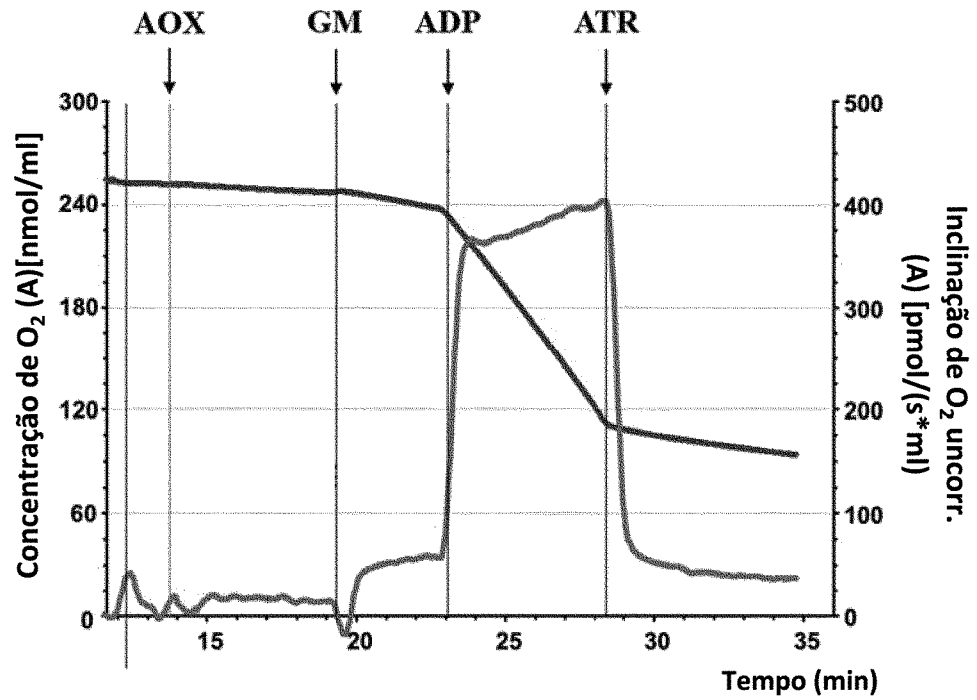
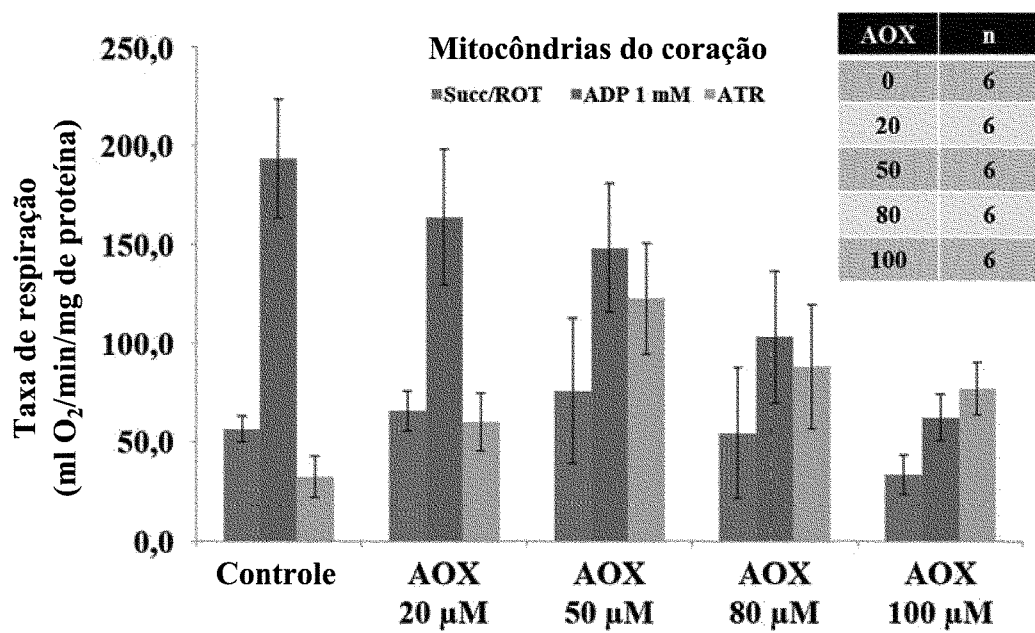
A**B**

FIG. 19

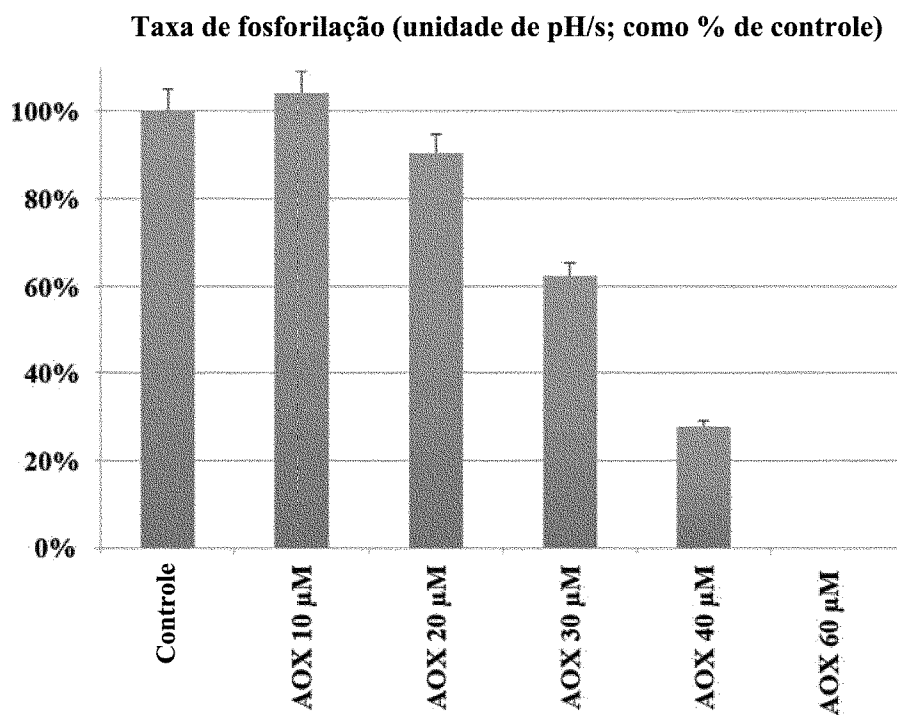


FIG. 20

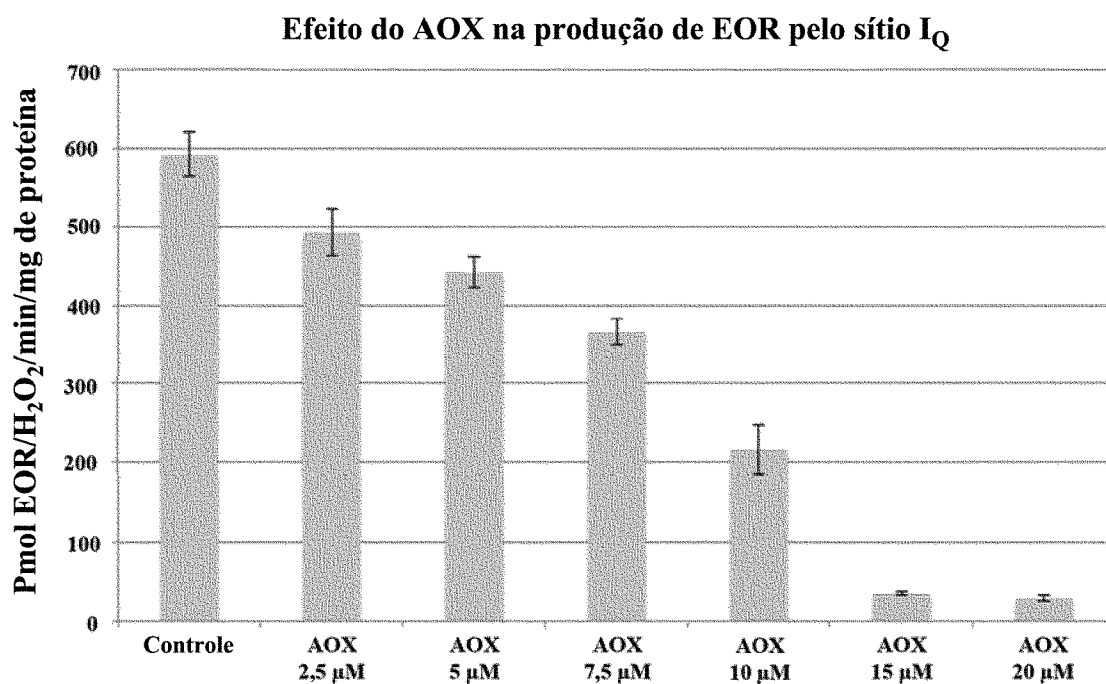


FIG. 21

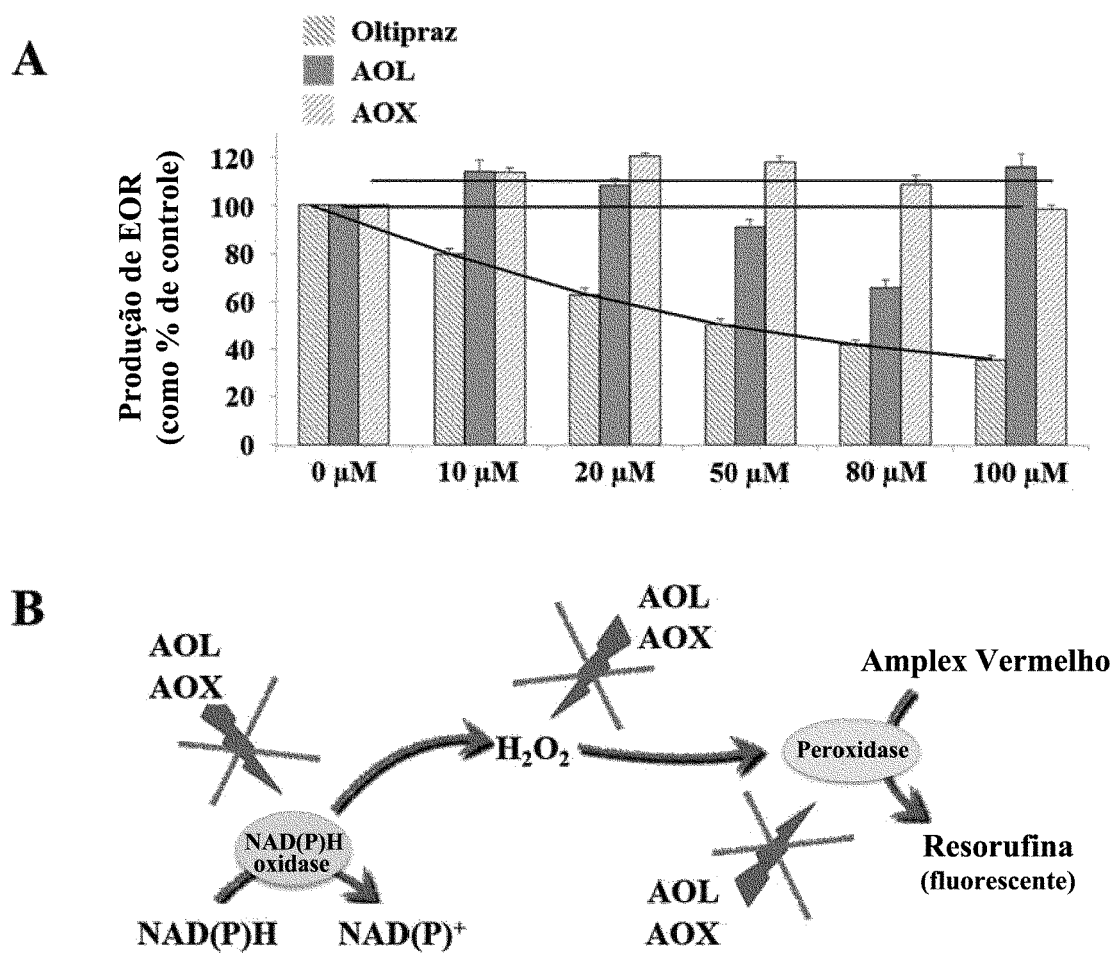


FIG. 22

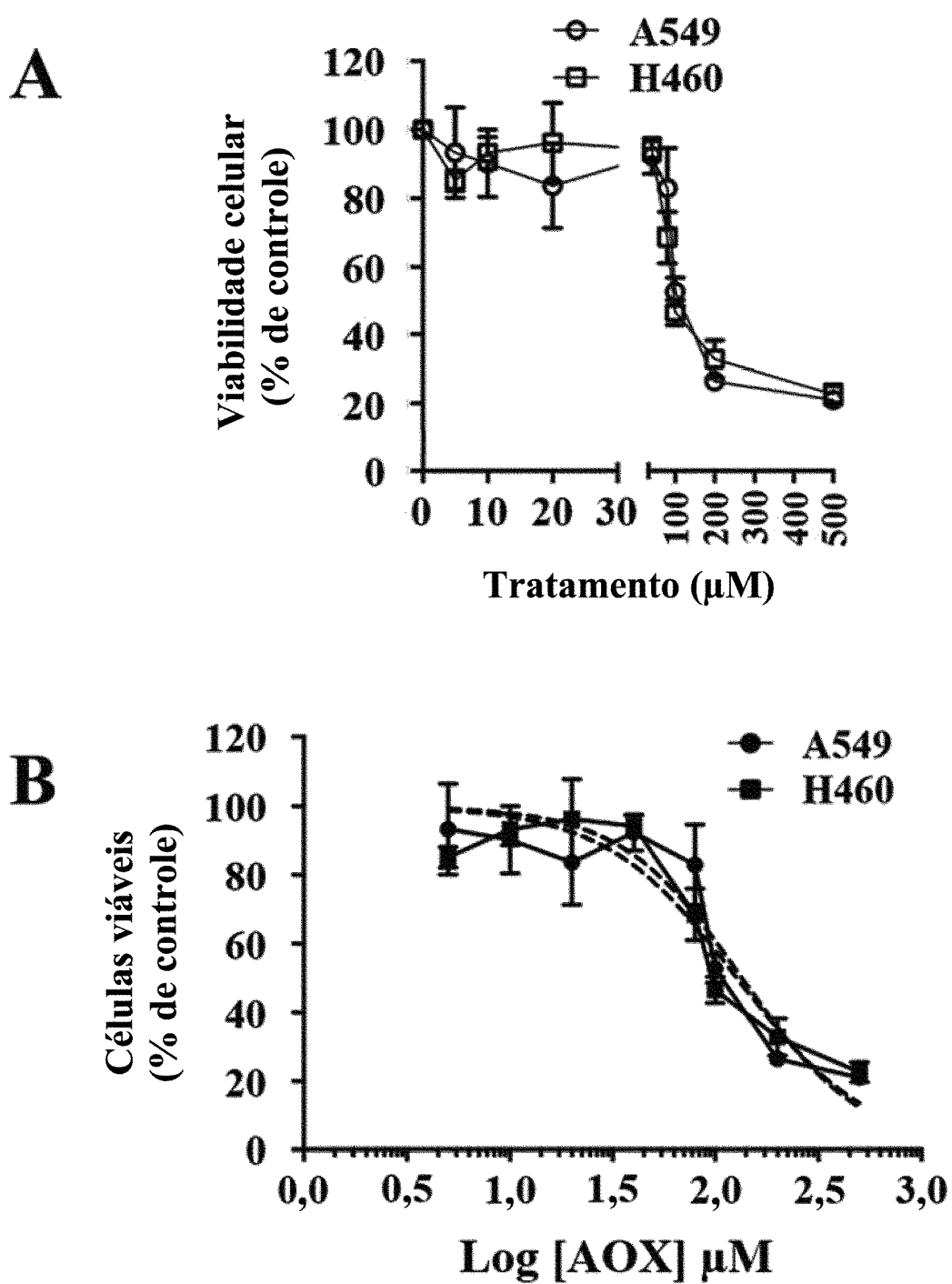


FIG. 23

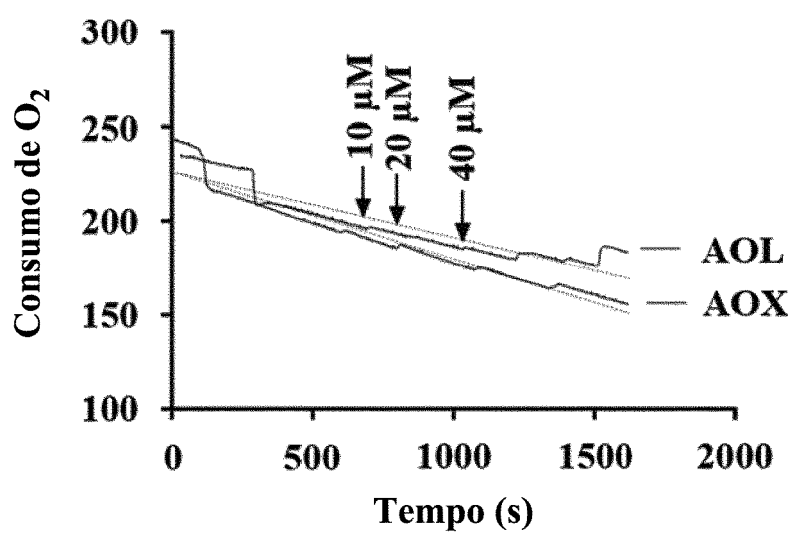


FIG. 24

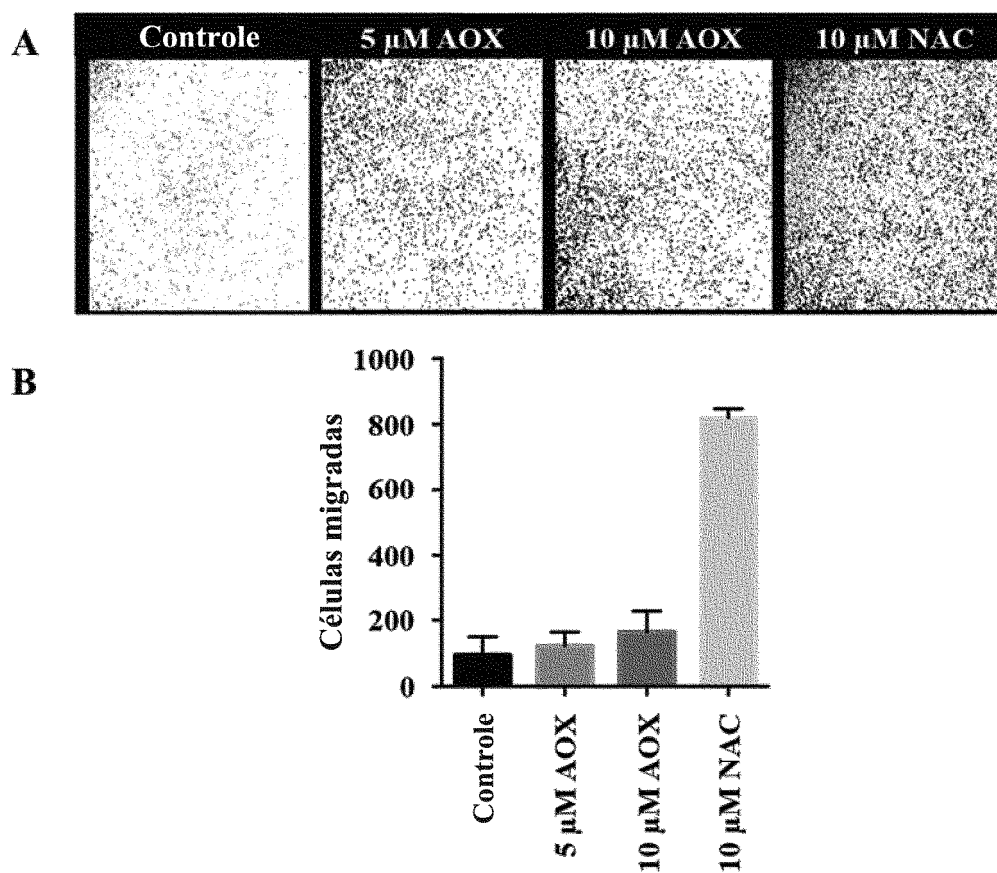


FIG. 25

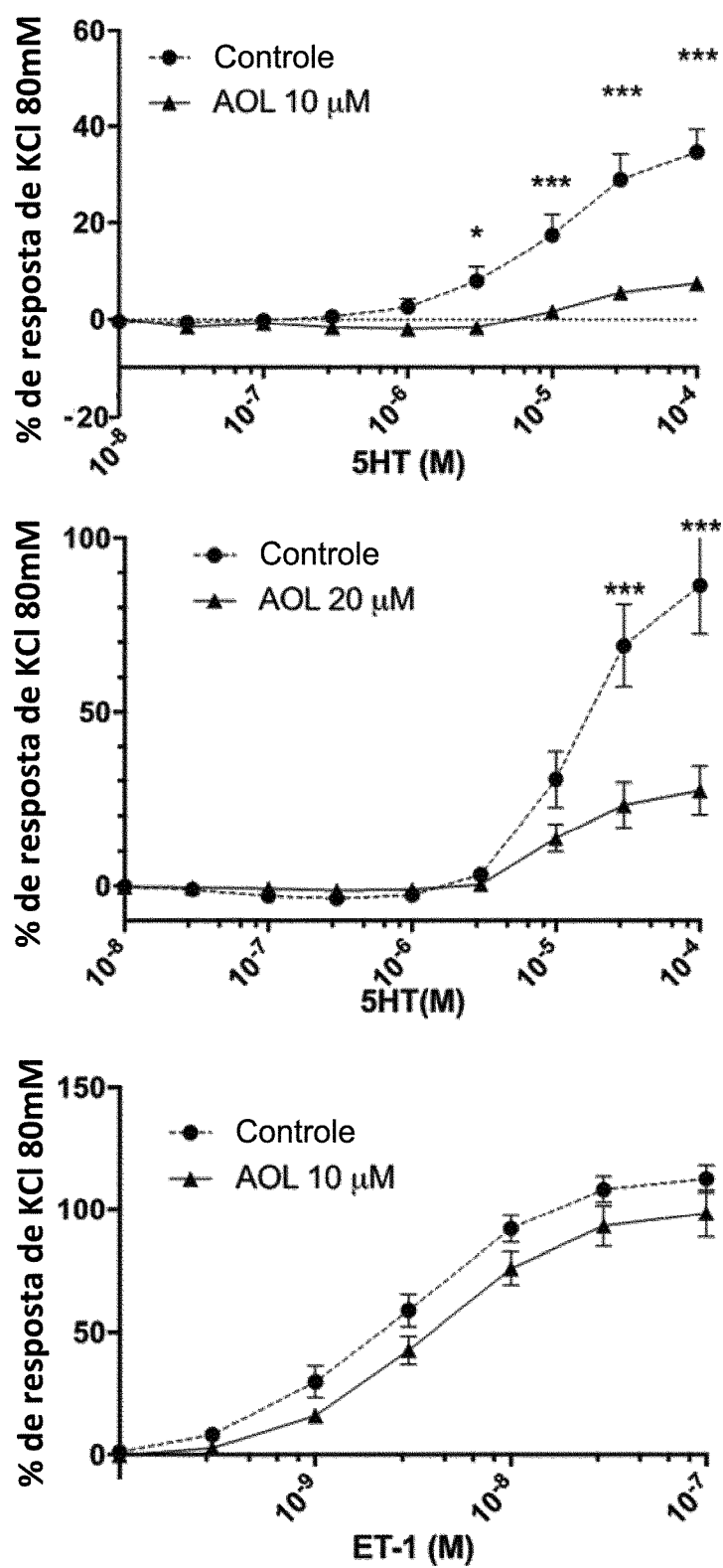


FIG. 26A

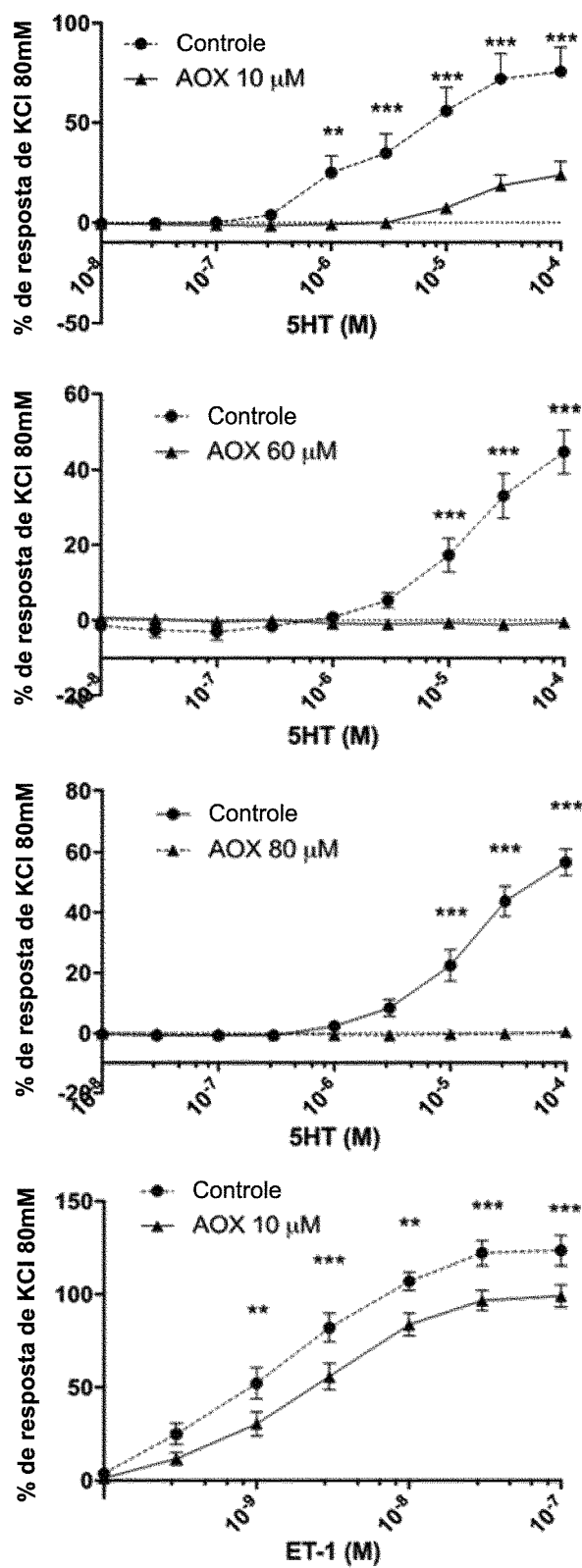


FIG. 26B

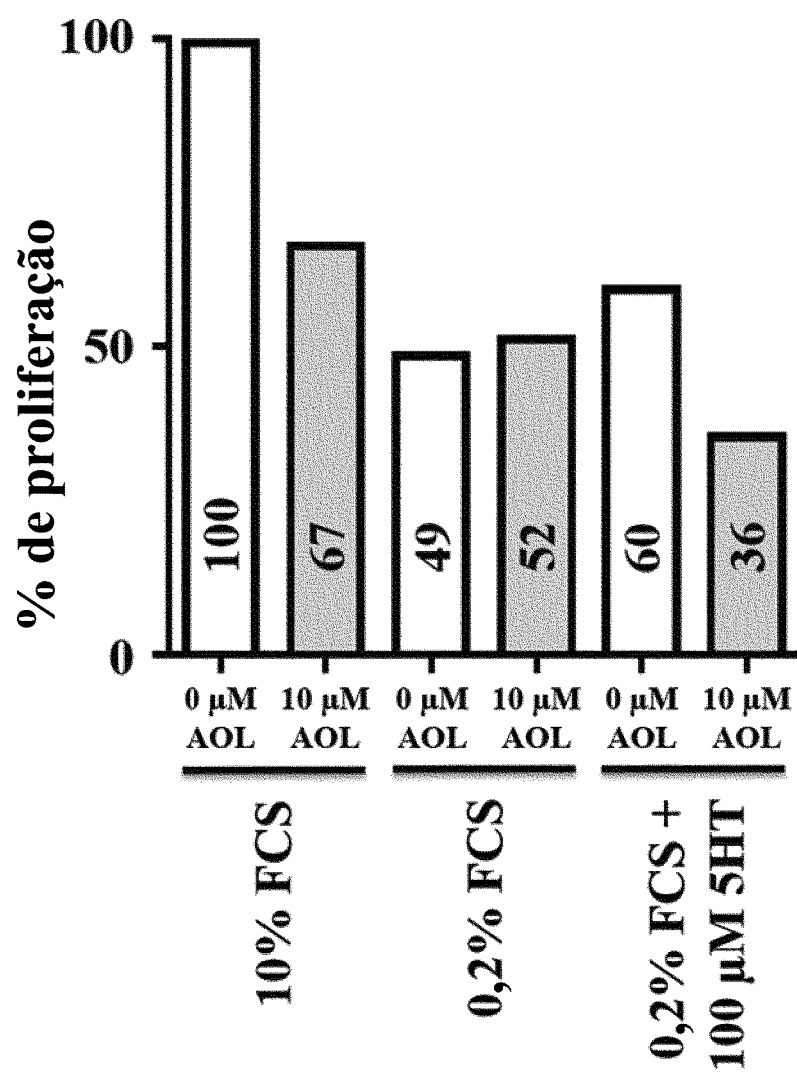


FIG. 27

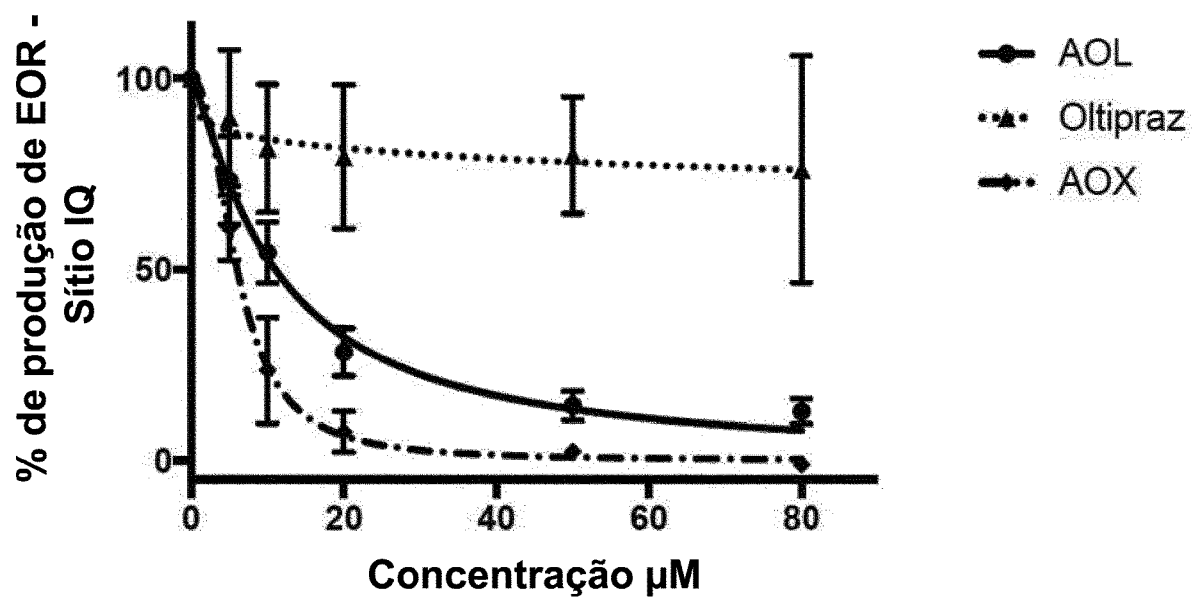


FIG. 28A

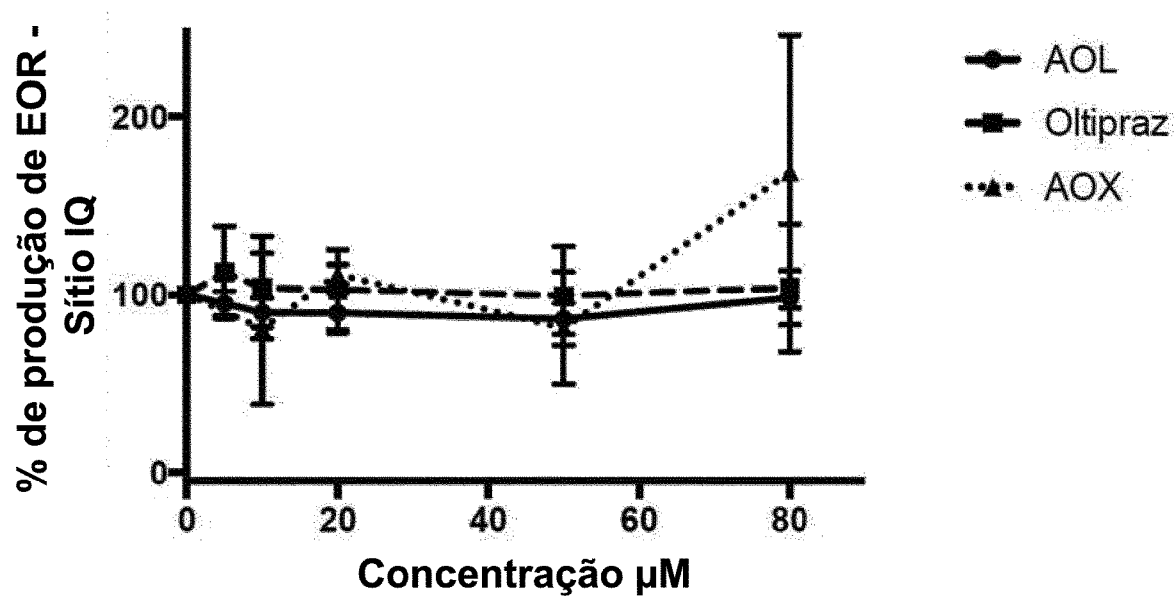


FIG. 28B

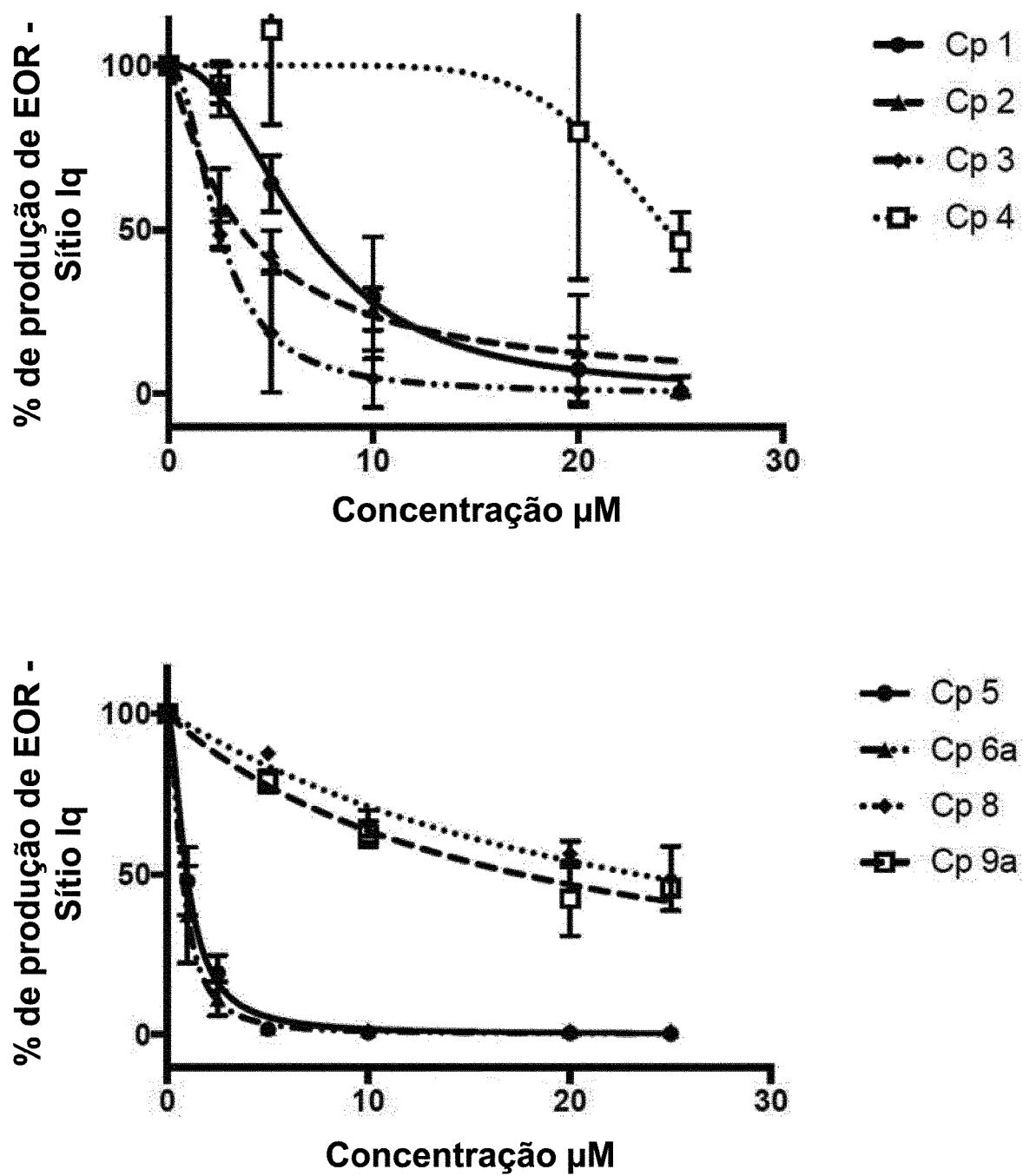


FIG. 29A

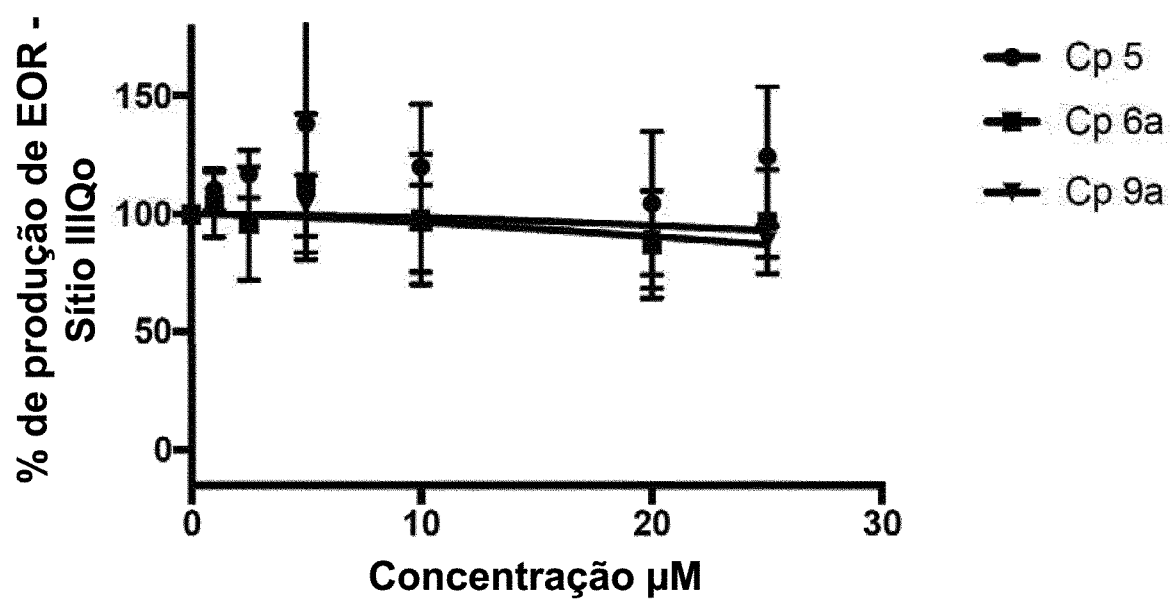
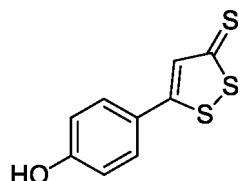


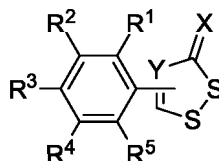
FIG. 29B

Resumo da Patente de Invenção para: "DERIVADOS DE DESMETILANETOLA TRITIONA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS COM A PRODUÇÃO MITOCONDRIAL DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) "

A presente invenção refere-se à desmetilanelotolatriona (AOX) e seus derivados, especialmente derivados da fórmula (I), para a prevenção e tratamento de doenças cuja iniciação e/ou evolução está relacionada à produção e efeitos de espécies reativas de oxigênio (ERO) de origem mitocondrial.



(AOX)



(I)