

SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA



**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DO
MECANISMO DE AÇÃO DOS COMPOSTOS
1,3,4 - TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Ciências - Bioquímica.

CURITIBA
1999

SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DO
MECANISMO DE AÇÃO DOS COMPOSTOS
1,3,4 - TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Ciências - Bioquímica.

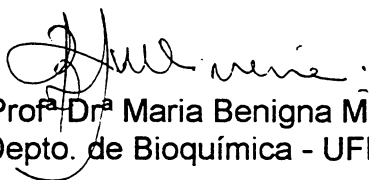
CURITIBA
1999

**Tese orientada pela Prof^a. Dra. Maria
Benigna Martinelli de Oliveira**

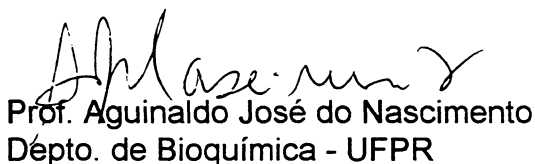
SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS
COMPOSTOS 1,3,4 - TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS

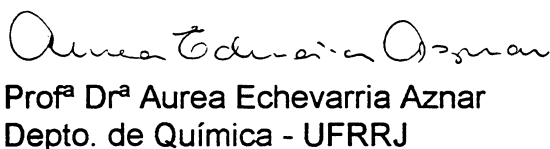
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências - **Bioquímica** da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Orientador: Prof.ª Dr.ª Maria Benigna Martinelli de Oliveira
Depto. de Bioquímica - UFPR



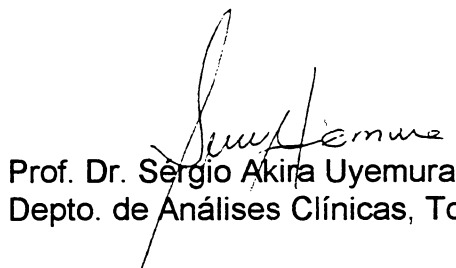
Prof. Aguiinaldo José do Nascimento
Depto. de Bioquímica - UFPR



Prof.ª Dr.ª Aurea Echevarria Aznar
Depto. de Química - UFRRJ



Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão
Depto. de Bioquímica e Imunologia - UFMG



Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura
Depto. de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas - USP

Curitiba, 16 de dezembro de 1999

***Ao Pai Criador, ao Filho Redentor e ao
Espírito que Santifica.***

Ao querido Franklin, amado esposo, amigo e companheiro, cuja compreensão e carinho me serviram de estímulo, e cuja dedicação me permitiu continuar a jornada, estando sempre comigo.

À minha filhinha Luiza, luz e encanto de minha vida.

À minha querida irmã Cristina, pelo companheirismo de sempre.

Aos meus pais Américo e Alzira e aos meus irmãos Eugênia e Cristóvão, com afeto e carinho.

***À Profª Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, com grande
admiração, respeito e carinho.***

AGRADECIMENTOS

Aos Professores do Laboratório de Oxidações Biológicas, Doutores Eva Gunilla Skare Carnieri, Annibal Campello e Maria Eliane Merlin, pelo estímulo e amizade.

Aos Professora Doutora Glaci T. Zancan, pela leitura e valiosas sugestões.

Ao Professor Doutor Aguinaldo José do Nascimento pela leitura, valiosas sugestões e auxílio na análise estatística.

À Professora Doutora Maria Lúcia Wambier Klüppel, pelo incentivo, valiosas sugestões e amizade.

À Professora Doutora Áurea Echevarria do Departamento de Química da UFRRJ, pela cessão do composto utilizado neste trabalho.

À Professora Regina Maria Vilella Babiak, pela amizade, carinho e apoio.

Aos Professores Doutores Adelar Bracht e Jorgete Constantin do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá, pelo auxílio na realização dos experimentos de perfusão.

Às Professoras Doutoras Edith Fanta e Dorly de Freitas Buchi, do Departamento de Biologia Celular da UFPR, respectivamente pela cessão de equipamentos e auxílio na análise morfológica.

Ao Dr. Sérgio Ioshii, pelas sugestões na realização dos experimentos de avaliação de apoptose.

Aos colegas Fabíola R. Stevan, Eneida J. Daloce, Fabiana Mansani, Guilhermina Noletto, Priscila Iansen, Luiz Fernando Pereira, Fábio Pedroso, Sônia Ribeiro e Fabiane Fortes, pela amizade, apoio e estímulo.

À senhora Marilza Lamour, secretária do curso de Pós-Graduação pela gentileza e dedicação.

Às bibliotecárias e funcionários da biblioteca do setor de Ciências Biológicas da UFPR, pelo auxílio prestado.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, Professores e amigos do Departamento de Bioquímica da UFPR, pelo apoio e estímulo.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	xiii
	LISTA DE TABELAS.....	xvii
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xviii
	RESUMO.....	xx
	ABSTRACT.....	xxi
1	INTRODUÇÃO.....	02
1.1	Aspectos Conceituais e Classificação dos Compostos Mesoiónicos.....	02
1.2	Atividades Biológicas dos Compostos Mesoiónicos.....	10
1.3	Objetivos.....	30
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1	Reagentes.....	32
2.2	Soluções.....	32
2.2.1	Preparo da Solução de MI-D.....	32
2.2.2	Soluções Utilizadas no Cultivo Celular.....	33
2.2.2.1	Solução de Bicarbonato de Sódio.....	33
2.2.2.2	Solução Salina Tamponada.....	33
2.2.2.3	Solução Dispersante de Células (STV).....	33
2.3	Animais.....	35
2.4	Células.....	35
2.5	Perfusão de Fígado Isolado.....	36
2.5.1	Líquido de Perfusão.....	36
2.5.2	Isolamento do Fígado.....	36
2.5.3	Análises do Perfusado.....	37
2.5.3.1	Determinação do Consumo de Oxigênio.....	37
2.5.3.2	Determinações de Metabólitos.....	38
2.5.3.2.1	Determinação de Lactato e Piruvato.....	38
2.5.3.2.2	Determinação de Glucose.....	39

2.6	Efeitos do MI-D Sobre o Metabolismo Mitocondrial.....	40
2.6.1	Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato.....	40
2.6.1.1	Isolamento de Mitocôndrias para Determinação do Consumo de Oxigênio, Potencial de Membrana e Atividade ATPásica.....	40
2.6.1.2	Isolamento de Mitocôndrias para Determinação do Grau de Inchamento Mitocondrial.....	41
2.6.1.3	Obtenção de Mitocôndrias Rompidas, para Avaliação da Atividade dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória.....	41
2.7	Métodos Analíticos Envolvendo as Preparações Mitocondriais.....	41
2.7.1	Determinação do Consumo de O ₂ , Cálculo do Coeficiente de Controle Respiratório (RCC) e Relação ADP:O.....	41
2.7.2	Determinação da Atividade dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória	42
2.7.2.1	NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase)	43
2.7.2.2	NADH-Desidrogenase (NADH: Ferricianeto Óxido-Redutase)...	43
2.7.2.3	NADH Citocromo <u>c</u> Redutase (NADH: Citocromo <u>c</u> Oxido Redutase).....	43
2.7.2.4	Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase).....	44
2.7.2.5	Desidrogenase Succínica (Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido Redutase)	44
2.7.2.6	Succinato Citocromo <u>c</u> Redutase (Succinato: Ferrocitocromo <u>c</u> Óxido-Redutase).....	45
2.7.2.7	Citocromo <u>c</u> Oxidase (Ferrocitocromo <u>c</u> : Oxigênio Óxido-Redutase)	45
2.7.2.7.1	Obtenção do Ferrocitocromo <u>c</u>	45
2.7.2.7.2	Determinação da Atividade do Complexo Citocromo <u>c</u> Oxidase.....	46
2.7.2.8	Determinação da Atividade da F ₁ F ₀ ATPase.....	46

2.7.2.8.1	Determinação da Atividade da F_1F_0 ATPase em Mitocôndrias Rompidas.....	46
2.7.2.8.2	Determinação da Atividade da F_1F_0 ATPase em Mitocôndrias Intactas.....	47
2.7.3	Determinação do Potencial de Membrana ($\Delta\Psi$).....	47
2.7.4	Determinação do Inchamento Mitocondrial (Swelling).....	49
2.7.4.1	Determinação do Inchamento em Mitocôndrias Energizadas.....	49
2.7.4.2	Determinação do Inchamento em Mitocôndrias Desenergizadas.....	49
2.7.4.2.1	Determinação do Inchamento na Presença de Valinomicina e K^+	49
2.7.4.2.2	Determinação do Inchamento na Presença de Nigericina e K^+	50
2.8	Efeitos do MI-D Sobre Membranas Sintéticas e Naturais.....	50
2.8.1	Preparo dos Liposomas.....	50
2.8.1.1	Liposomas de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC).....	50
2.8.1.2	Liposomas de Membrana Natural.....	50
2.8.2	Incorporação das Sondas aos Liposomas.....	51
2.8.3	Determinações Fluorimétricas.....	52
2.8.4	Determinação da Temperatura média de transição de fase (T_m).....	54
2.9	Efeitos do MI-D em Células Cultivadas.....	56
2.9.1	Procedimentos de Cultivo de células HeLa e L1210.....	56
2.9.2	Meio de Crescimento.....	56
2.9.3	Subculturas (Repiques).....	56
2.9.4	Coleta e Obtenção da Suspensão de Células	57
2.9.5	Contagem.....	57
2.9.6	Determinação da Viabilidade Celular.....	57
2.9.7	Determinação Consumo de Oxigênio por Células HeLa e Células L1210.....	58

2.9.8	Determinação da Produção de Lactato e Piruvato por Células L1210.....	59
2.9.9	Efeitos do MI-D Sobre a Morfologia e Ultra-Estrutura de Células HeLa.....	59
2.9.10	Avaliação dos Efeitos do MI-D como Agente Indutor de Morte Celular por Apoptose em Células HeLa.....	60
2.10	Determinação da Concentração de Proteínas.....	61
2.11	Análise Estatística.....	62
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1	Efeitos do MI-D em Fígado Perfundido.....	64
3.2	Efeitos do MI-D em Mitocôndrias Isoladas.....	72
3.3	Efeitos do MI-D Sobre a Atividade dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória.....	76
3.4	Efeitos do MI-D Sobre o Potencial Elétrico de Membrana ($\Delta\psi$).....	82
3.5	Efeitos do MI-D Sobre o Complexo F_1F_0 ATPase.....	86
3.6	Efeitos do MI-D Sobre o Inchamento Mitocondrial.....	90
3.6.1	Efeitos do MI-D Sobre o Inchamento de Mitocôndrias Energizadas.....	92
3.6.2	Efeitos do MI-D Sobre o Inchamento de Mitocôndrias Desenergizadas.....	96
3.7	Efeitos do MI-D sobre a Fluidez de Membranas	100
3.8	Efeitos do MI-D sobre Células Cultivadas.....	114
3.8.1	Efeitos do MI-D Sobre Alguns Parâmetros do Metabolismo Oxidativo de Células L1210 E Células HeLa.....	114
3.8.2	Efeitos do MI-D Sobre a Viabilidade, Morfologia e Ultraestrutura de Células HeLa	118
3.8.3	Mecanismo Envolvido na Morte Celular Induzida pelo MI-D em Células HeLa.....	133
4.	DISCUSSÃO FINAL	139
5.	CONCLUSÕES	144

ANEXO.....	146
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152

LISTA DE FIGURAS

1	Representação genérica de um composto mesoiônico.....	04
2	Representação e exemplificação dos compostos mesoiônicos dos tipos A e B	04
3	Estrutura química: A .Troponas; B . Betaínas.....	09
4	Estruturas representativas de compostos mesoiônicos com destacada atividade biológica.. ..	11
5	Estrutura química do 3-(4- X -3-nitrofenil)-1,2,3-oxadiazólio-5-olato.....	14
6	Estrutura química do A . 4-[1-oxo-3-(aril substituído)-2- propenil]-3-fenilsidnonas (série I) ; e B . 3-[4-[3-(aril substituído)-1-oxo-2-propenil] fenil] sidnonas (série II)	14
7	Estrutura química do N- etoxicarbonil-3 morfolinossidnonimina (molsidomina), morfolino sidnonimina (SIN-1) e N- nitroso - N - morfolino- acetonitrato (SIN-1A).....	17
8	Estrutura química das 3-arilalquil-N- X -5-sidnoniminas	19
9	Estrutura química das 3- alquil-N- X -5-sidnoniminas	19
10	Estrutura química das 3,4-alquil-N- X - 5-sidnoniminas	21
11	Estrutura química do RE 2047 (3-metil-N-nitroso sidnona-5- iminas	21
12	Estrutura química dos compostos mesoiônicos 3-aril substituídos oxatriazol-5-iminas, GEA 3162, GEA 3175	23
13	Estrutura química dos compostos 4-fenil-5- X -1,3,4 tiadiazóis mesoiônicos.....	25
14	Estrutura química do 1,3,4-tiadiazólio-[3,2-a]-pirimidina	25
15	Estrutura química do composto mesoiônico 1,3,4-tiadiazólio -2-aminida ativo contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
16	Estrutura química dos compostos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas mesoiônicos; em A . os ácidos conjugados; e em B . as bases livres	27
17	Estrutura química do cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoil]- 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) em A . e de seu derivado mesoiônico 5-[4-nitrocinaoil]-1,3,4-tiadiazólio-2- fenilaminida em B	29

18	Espectros de Absorção do MI-D.....	34
19	Curva de Calibração para cálculo do Potencial de Membrana ($\Delta\psi$).....	48
20	Representação Esquemática das Medições de Polarização de Fluorescência (P).	55
21	Efeitos do MI-D ($5\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre o consumo de oxigênio, glicogenólise, produção de lactato e piruvato, em fígado de rato perfundido isoladamente.....	65
22	Efeitos do MI-D ($25\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre o consumo de oxigênio, glicogenólise, produção de lactato e piruvato, em fígado de rato perfundido isoladamente.....	67
23	Absorbâncias (340 nm) do MI-D nas amostras coletadas, nos diferentes tempos, durante o experimento de perfusão.....	70
24	Efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	74
25	Efeitos do MI-D sobre o RCC e razão ADP/O de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	75
26	Efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato desacopladas por FCCP.	78
27	Efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato desacopladas por FCCP.....	79
28	Efeitos do MI-D sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi$) de mitocôndrias isoladas de fígado de rato	83
29	Efeito do MI-D sobre potencial de membrana ($\Delta\psi$) de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	85
30	Efeitos do MI-D sobre o complexo F_1F_0 ATPase de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	89
31	Efeitos do MI-D sobre o inchamento de mitocôndrias energizadas, na presença de íons sódio.....	93
32	Efeitos do MI-D sobre o inchamento induzido por valinomicina, na presença de potássio, em mitocôndrias de fígado de rato desenergizadas.....	97

33	Efeitos do MI-D sobre o inchamento induzido por nigericina, em presença de potássio, em mitocôndrias de fígado de rato desenergizadas.....	99
34	Efeitos do MI-D ($5\mu\text{mols.L}^{-1}$) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) do DPH	103
35	Efeitos do MI-D ($5\mu\text{mols.L}^{-1}$) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) do DPH-PA.....	104
36	Efeitos do MI-D ($15\mu\text{mols.L}^{-1}$) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) do DPH.....	105
37	Efeitos do MI-D ($15\mu\text{mols.L}^{-1}$) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) do DPH-PA.....	106
38	Efeitos do FCCP ($1\mu\text{mol.L}^{-1}$) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) do DPH.....	108
39	Polarização de fluorescência (P) do DPH em membrana mitocondrial, em função da temperatura. Efeitos do MI-D $5\mu\text{mols.L}^{-1}$	110
40	Polarização de fluorescência (P) do DPH-PA em membrana mitocondrial, em função da temperatura. Efeitos do MI-D $5\mu\text{mols.L}^{-1}$	111
41	Polarização de fluorescência (P) do DPH em membrana mitocondrial, em função da temperatura. Efeitos do MI-D $25\mu\text{mols.L}^{-1}$	112
42	Polarização de fluorescência (P) do DPH-PA em membrana mitocondrial, em função da temperatura. Efeito do MI-D $25\mu\text{mols.L}^{-1}$ de MI-D.....	113
43	Efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio por células HeLa e células L1210.....	115
44	Efeitos do MI-D sobre a produção de L- lactato por células L1210.....	119
45	Efeitos do MI-D sobre a viabilidade celular.....	121

46	Células HeLa: aspectos da monocamada controle observada por Microscopia Óptica	122
47	Células HeLa: aspectos da monocamada controle observada por Microscopia Óptica.....	123
48	Efeitos do MI-D (25 $\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre as células HeLa observadas por Microscopia Óptica.....	124
49	Células HeLa: aspectos da monocamada controle observada por Microscopia eletrônica de Transmissão.....	126
50	Células HeLa: aspectos da monocamada controle observada por M.E.T.....	127
51	Efeitos do MI-D (25 $\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre as células HeLa observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	128
52	Efeitos do MI-D (25 $\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre as células HeLa observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Fragmentação do núcleo.....	129
53	Efeitos do MI-D (25 $\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre as células HeLa observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	130
54	Efeitos do MI-D (25 $\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre as células HeLa observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	132
55	Células HeLa: aspectos da monocama controle observada por Microscopia Óptica - Método TUNEL.....	135
56	Efeito do MI-D como indutor de apoptose em células HeLa observadas por Microscopia Óptica - Método TUNEL.....	136

LISTA DE TABELAS

1	Heterocíclicos Mesoiónicos do Tipo A.....	06
2	Heterocíclicos Mesoiónicos do Tipo B.....	08
3	Efeitos do MI-D ($5\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre o consumo de oxigênio, glicogenólise, produção de lactato e piruvato, glicólise e razão lactato piruvato (NAD^+/NADH) em fígado de rato perfundido isoladamente.....	68
4	Efeitos do MI-D ($25\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre o consumo de oxigênio, glicogenólise, produção de lactato e piruvato, glicólise e razão lactato piruvato (NAD^+/NADH) em fígado de rato perfundido isoladamente.....	68
5	Efeitos do MI-D sobre os complexos enzimáticos da cadeia respiratória.....	80
6	Efeitos do MI-D sobre a viabilidade celular.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	-absorbância
ADP/O	- quociente entre nmols de ADP e nanoátomos de oxigênio consumidos durante o estado III.
BSA	- albumina de soro bovino
CCP	- carbonil cianeto fenilhidrazona
DAB	- diaminobenzidina
DMPC	- dimiristoil- fosfatidilcolina
DMSO	- dimeltisulfóxido
DNP	- 2,4 dinitrofenol
DPH	- 1,6-difenil-1,3,5 - hexatrieno
DPH-PA	- 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]-fenil-ácido propiônico
DPIP	- 2,6 diclorofenolindofenol
EDTA	- ácido etileno diamino tetracético
EGTA	- ácido etileno glicol bis (éter 2- amino-etil) N,N,N',N' tetracético
FCCP	- carbonil cianeto p- trifluormetoxifenilhidrazona
Hepes	- N - (2 – hidroxietil) piperazina N' (ácido 2- etano sulfônico)
I ₅₀	- concentração do desacoplador responsável por 50% do efeito
LD ₅₀	- dose que causa morte em 50%
NaCN	- cianeto de sódio
M.T.E.	- microscopia eletrônica de transmissão
M.O	- microscopia óptica
OSCP	- oligomycin -sensitivity conferring protein
P	- polarização
Pi	- fosfato inorgânico
PBS	- solução salina tamponada
PEP	- fosfoenolpiruvato
PMS	- fenazina metassulfato
PMSF	- fluoreto de fenil-metil-sulfonila
PTP	- poros de transição de permeabilidade

RCC	- coeficiente de controle respiratório
STV	- solução de tripsina verseno
TCA	- ácido tricloroacético
TdT	- deoxinucleotidil transferase terminal
T _m	- temperatura média de transição termotrópica de fase
Tris	- tris (hidroximetil) amino metano
TUNEL	- TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling
Δp	- força próton-motriz
$\Delta P/\Delta T$	- diferença do grau de polarização em função da diferença de temperatura.
$\Delta\psi$	- potencial elétrico de membrana

RESUMO

Os compostos mesoiônicos apresentam potencial aplicação terapêutica, devido às suas propriedades químicas. Suas regiões de cargas positiva e negativa, associadas a um sistema aromático poliheteroatômico, favorecem a interação destes compostos com biomoléculas. Por outro lado, a ausência de uma carga líquida facilita a sua passagem através de membranas biológicas. Neste estudo, foram investigados os efeitos de um novo composto mesoiônico, o cloreto de 4-fenil-5-(4-nitrocinaoíl)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) para o qual foi descrita uma importante ação antitumoral. O MI-D promove, em fígado de rato alimentado, a inibição no consumo de oxigênio, o estímulo da glicogenólise e uma discreta inibição da glicólise, conforme o demonstrado pelos valores diminuídos de lactato e piruvato. Verificou-se que o MI-D reduz a eficiência da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As análises dos complexos da cadeia respiratória sugerem que o alvo de inibição do composto mesoiônico situa-se após o complexo I e entre os complexos II e III. O MI-D promove o colapso do potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$). A atividade da enzima ATPase foi drasticamente aumentada em presença do MI-D em mitocôndrias intactas, mas inibida em mitocôndria desacopladas com FCCP. O MI-D altera a fluidez e a elasticidade da membrana mitocondrial interna, conforme o verificado nos ensaios de inchamento mitocondrial em presença de acetato de sódio, de K^+ mais valinomicina e K^+ mais nigericina. Os resultados dos estudos de polarização de fluorescência das sondas DPH e DPH-PA em vesículas multilamelares sintéticas (DMPC) e naturais, sugerem que o MI-D se instala na membrana mitocondrial diminuindo sua fluidez, afetando tanto os centros hidrofóbicos, monitorados pela sonda DPH, quanto a região externa, mais hidrofílica, monitorada pela sonda DPH-PA. Verificou-se que em células HeLa e L1210, o MI-D estimula o consumo de oxigênio do estado IV induzido por oligomicina, e, ainda em células L1210, o composto mesoiônico estimulou a produção de lactato. A monocamada de células HeLa tratadas com o MI-D apresenta alterações morfológicas, características do processo de morte celular por apoptose, a saber: a) formação de blebs na membrana plasmática; b) condensação da cromatina e c) fragmentação do núcleo. A confirmação do MI-D como indutor de apoptose foi realizada através de ensaios utilizando o método de TUNEL. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o MI-D atua como um agente desacoplador inibitório, induz a morte celular por apoptose e, sugere, ainda, que tal mecanismo possa ser responsável pelo efeito antitumoral deste composto.

ABSTRACT

Mesoionic compounds possess structural features which confer on them potential biological activity and pharmaceutical use. Their structures, with well separated regions of positive and negative charges, associated with a polyheteroatomic system, enable them to interact with biomolecules. Although the compounds are internally charged, they are overall electrically neutral, enabling them *in vivo* to cross the biological membranes. In this investigation we studied the effects of a hitherto not examined mesoionic compound, MI-D (4- phenyl-5-(4-nitrocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride) for which has been demonstrated to have an important anti-tumoral effect. MI-D infusion in livers from well-fed rats inhibits oxygen consumption, stimulates glycogenolysis, and promotes a discreet inhibition of glycolysis, according to a decrease in production of lactate and pyruvate. It also depresses the phosphorylation efficiency of liver mitochondria as indicated by accentuated decreases of the respiratory control coefficient and ADP/O ratio. Analysis of segments of the respiratory chain suggests that the MI-D inhibition site is after complex I and between complex II and III. The electrical potential ($\Delta\psi$) is collapsed depending on MI-D concentration. ATPase activity is dramatically increased by action of MI-D in intact mitochondria, but inhibited in FCCP - uncoupled mitochondria. MI-D interferes with inner mitochondrial membrane fluidity and elasticity, as demonstrated by assays of mitochondrial swelling in the presence of sodium acetate, valinomycin + K^+ and nigericin + K^+ . In order to evaluate the effects of MI-D on membrane fluidity artificial DMPC membranes and native mitochondrial membranes were used. The effect of MI-D on the fluorescence polarization of DPH, probing the bilayer core, and of its anionic propionic acid derivative, DPH-PA, probing the outer regions of the bilayer, in DMPC bilayers and in native membranes were investigated. The results suggest that MI-D shifts the midpoint of phase transition to higher values and that the mesoionic compound orders the fluid phase of both preparations of the lipid, either in the hydrophobic core or in the outer regions of the bilayer. In HeLa and L1210 cells, MI-D inhibits oxygen consumption sustained by endogenous substrates, but when the respiration was inhibited by oligomycin, it promoted an accentuated stimulus. The glycolysis of L1210 cells was highly increased by action of MI-D. HeLa monolayers treated with MI-D presented the morphological alterations characteristic of cellular death by apoptosis as shown by the appearance of cytoplasmic blebs; nuclear chromatin condensation and nuclear fragmentation. Confirmation that MI-D acts as an inducer of apoptosis was obtained by specific labeling of DNA fragmentation by a TUNEL assay. The results presently obtained enable us to classify MI-D as a new inhibitory uncoupling agent, able to induce cell death by apoptosis and suggest that mechanisms of such actions can be involved in its anti-tumoral effect.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Conceituais e Classificação dos Compostos Mesoiónicos

A constatação de que os grupos heterocíclicos eram responsáveis pela atividade biológica de inúmeros compostos de origem vegetal, e ainda de que as mais importantes reações dos seres vivos como a provisão de energia, transmissão de impulsos nervosos, visão, metabolismo e transferência de informação hereditária ocorrem com a participação destes grupos, conduziu a um significativo avanço na química orgânica (POZHARSKÜ et al., 1997).

Entre os heterocíclicos naturais de maior importância, destacam-se os alcalóides. Extraídos de plantas, alguns destes compostos, dentre outras ações, atuam como importantes estimulantes do sistema nervoso central. Além dos efeitos benéficos, alguns alcalóides apresentam efeitos colaterais indesejáveis, como a quinina, que apresenta elevado grau de toxicidade a despeito de sua efetividade no tratamento da malária. Para resolver os problemas relacionados à toxicidade e também com a finalidade de se buscar substâncias de aplicação farmacológica, surgiram os compostos similares sintetizados em laboratório, que apresentam a vantagem de possibilitar a realização de substituições estruturais até alcançar-se os compostos com efeitos desejados (POZHARSKÜ et al., 1997). Com este objetivo, muitos compostos heterocíclicos têm sido sintetizados em laboratório. Dentre estes, surgiram os chamados compostos mesoiônicos. O termo mesoiônico foi sugerido pela primeira vez por SIMPSON (1946), para descrever moléculas cuja representação por estrutura covalente ou polar não é possível.

Em 1955, BACKER & OLLIS, definiram como mesoiônicos, os compostos que apresentassem, em sua estrutura, um anel com as seguintes características:

1-) todos os átomos compartilhando um sexteto de elétrons π apresentando considerável energia de ressonância;

2-) caráter aromático, heterocíclico, com cinco ou seis elementos, incapaz de ser representado por estrutura covalente;

3-) carga positiva no anel heterocíclico, balanceada por uma carga negativa em átomo ou grupo exocíclico;

4-) estrutura planar, ou próxima a isto.

Embora a definição original do termo mesoiônico (BACKER & OLLIS, 1955) permitisse que fossem classificados como tal alguns compostos heterocíclicos que apresentassem em sua estrutura anéis constituídos de 6 membros, recomendou-se, na década de 70, que o termo fosse restrito a anéis heterocíclicos de 5 membros. Assim, foi proposta na definição original a seguinte modificação: *“um composto pode ser apropriadamente classificado como mesoiônico quando for constituído por um anel heterocíclico de 5 membros, o qual não pode ser representado satisfatoriamente por uma estrutura covalente ou polar, e que possua um sexteto de elétrons π associados aos 5 átomos que formam o anel”* (OLLIS & RAMSDEN, 1976).

Assim definidos, os compostos mesoiônicos podem ser genericamente representados pela fórmula demonstrada na figura 1, onde os constituintes indicados pelas letras a-f podem ser: carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre com seus respectivos substituintes, específicos para cada tipo de composto (OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982)

Análises dos possíveis sistemas mesoiônicos, permitiram sua classificação em dois tipos - A e B -, de acordo com a origem dos 8 elétrons π , distribuídos entre o anel heterocíclico (carga positiva) e o átomo ou grupamento exocíclico (carga negativa). Na figura 2 estão demonstradas as fórmulas genéricas e exemplos dos compostos mesoiônicos dos tipos A e B, onde os números sobrescritos, nas primeiras, indicam a origem dos 8 elétrons π . A partir da observação destes exemplos, ressalta-se que a classificação dos compostos mesoiônicos como do tipo A ou B é dependente

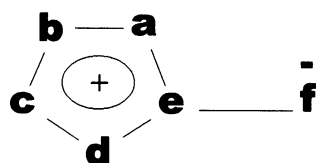


FIGURA 1. Representação genérica de um composto mesoiônico. FONTE: OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982.

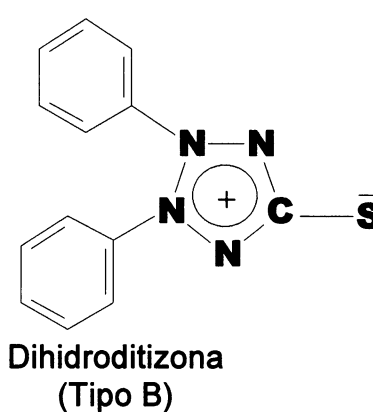
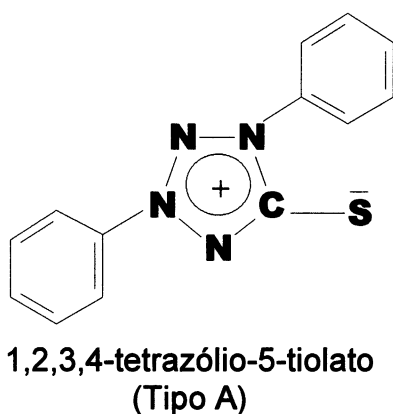
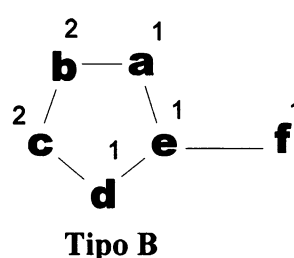
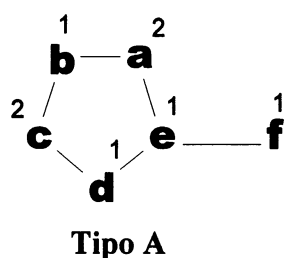


FIGURA 2. Representação e exemplos dos compostos mesoiônicos dos tipos A e B. O 1,2,3,4-tetrazólio-5-tiolato é um exemplo de composto mesoiônico do tipo A e seu isômero dehidroditizona, do tipo B. FONTE: OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982.

da natureza dos substituintes do anel heterocíclico, e não apenas do tipo de anel (NEWTON & RAMSDEN, 1982).

Entre as décadas de 50 e 80, foram sintetizados mais de 70 compostos mesoiônicos. Até o ano de 1982, os compostos mesoiônicos do tipo A incluíam aproximadamente 60 compostos, pertencendo o anel mesoiônico aos seguintes sistemas: oxazóis, dioxóis, diazóis, tiazóis, ditióis, oxadiazóis, oxatiazóis, triazóis, tiadiazóis, oxatriazóis, tetrazóis, tiatriazóis, oxatióis, selenazóis e ditiadiazóis (NEWTON & RAMSDEN, 1982). Os diferentes grupos de compostos mesoiônicos do tipo A, estão listados na tabela 1.

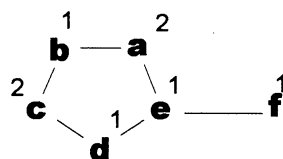
Já os compostos mesoiônicos do tipo B, em menor número, listados na tabela 2, somaram até 1982, 13 compostos, incluindo os seguintes sistemas: oxazóis, diazóis, tiazóis, ditióis, tiadiazóis e tetrazóis.

Como se observa nas tabelas 1 e 2, o anel principal pode dar origem a compostos do tipo A ou B, em função da natureza do substituinte, sendo que este irá definir o número de elétrons atribuído a cada átomo do composto, definindo assim sua classificação (NEWTON & RAMSDEN, 1982).

Conforme se ressaltou, o termo mesoiônico pode ser utilizado apenas para compostos que não possam ser representados por estrutura covalente ou polar. Desta forma, moléculas que exibem um alto grau de fixação de cargas positiva e negativa sobre átomos específicos, como as troponas, cuja estrutura esta mostrada na figura 3A, e as betaínas, representadas na figura 3B, não podem ser classificadas como mesoiônicas.

Devido às suas características estruturais, os compostos mesoiônicos apresentam propriedades muito interessantes. Suas regiões de cargas positiva e negativa, associadas a um sistema aromático poliheteroatômico, favorecem a interação destes compostos com biomoléculas. Por outro lado, a ausência de uma carga líquida na molécula, facilita a sua passagem através de membranas biológicas (KIER & ROCHE, 1967). Estes aspectos têm motivado os estudos das possíveis atividades biológicas destas drogas, intimamente relacionadas

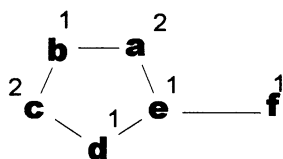
TABELA 1-Heterocíclicos Meso-iônicos do Tipo A



SISTEMAS	ÁTOMOS ou GRUPOS					
	a	b	c	d	e	f
Oxazóis						
1,3-Oxazólio-4-olatos	NR	CR	O	CR	C	O
1,3-Oxazólio-5-olatos	O	CR	NR	CR	C	O
1,3-Oxazólio-5-aminidas	O	CR	NR	CR	C	NR
1,3-Oxazólio-4-aminidas	NR	CR	O	CR	C	NR
Dioxóis						
1,3-Dioxólio-4-olatos	O	CR	O	CR	C	O
Diazóis						
1,3-Diazólio-4-olatos	NR	CR	NR	CR	C	O
1,3-Diazólio-4-aminidas	NR	CR	NR	CR	C	NR
1,3-Diazólio-4-tiolatos	NR	CR	NR	CR	C	S
1,3-Diazólio-metilidas	NR	CR	NR	CR	C	CXY _b
Tiazóis						
1,3-Tiazólio-5-olatos	S	CR	NR	CR	C	O
1,3-Tiazólio-4-olatos	NR	CR	S	CR	C	O
1,3-Tiazólio-5-aminidas	S	CR	NR	CR	C	NR
1,3-Tiazólio-5-tionas	S	CR	NR	CR	C	S
1,3-Tiazólio-4-aminidas	NR	CR	S	CR	C	NR
Ditióis						
1,3-Ditiólio-4-olatos	S	CR	S	CR	C	O
1,3-Ditiólio-4-aminidas	S	CR	S	CR	C	NR
Oxadiazóis						
1,3,4-Oxadiazólio-2-olatos	O	CR	NR	N	C	O
1,3,4-Oxadiazólio-2-aminidas	O	CR	NR	N	C	NR
1,3,4-Oxadiazólio-2-tiolatos	O	CR	NR	N	C	S
1,3,4-Oxadiazólio- metilidas	O	CR	NR	N	C	CXY _b
1,2,3-Oxadiazólio-5-olatos (sidnonas)	O	N	NR	CR	C	O
1,2,3-Oxadiazólio-5-aminidas (sidnoniminas)	O	N	NR	CR	C	NR
1,2,3-Oxadiazólio-5-tiolatos	O	N	NR	CR	C	S
Oxatiazóis						
1,3,2-Oxatiazólio-5-olatos	O	N	S	CR	C	O
Triazóis						
1,2,3-Triazólio-4-olatos	NR	N	NR	CR	C	O
1,2,3-Triazólio-4-aminidas	NR	N	NR	CR	C	NR
1,2,3-Triazólio-4-tiolatos	NR	N	NR	CR	C	S
1,2,4-Triazólio-3-olatos	NR	CR	NR	N	C	O
1,2,4-Triazólio-3-aminidas	NR	CR	NR	N	C	NR
1,2,4-Triazólio-3-tiolatos	NR	CR	NR	N	C	S
1,2,4-Triazólio-3-metilidas	NR	CR	NR	N	C	CXY _b
1,2,4-Triazólio-3-selenolatos	NR	CR	NR	N	C	Se

continua

TABELA 1 - Heterocíclicos Mesoioônicos do Tipo A



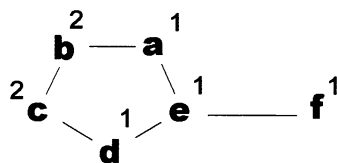
continuação

SISTEMAS	ÁTOMOS ou GRUPOS					
	a	b	c	d	e	f
Tiadiazóis						
1,3,4-Tiadiazólio-2-olatos	S	CR	NR	N	C	O
1,3,4-Tiadiazólio-2-aminidas	S	CR	NR	N	C	NR
1,3,4-Tiadiazólio-2-tiolatos	S	CR	NR	N	C	S
1,3,4-Tiadiazólio-2-metilidas	S	CR	NR	N	C	CXY _b
1,2,3-Tiadiazólio-4-olatos	NR	N	S	CR	C	O
1,2,3-Tiadiazólio-5-olatos	S	N	NR	CR	C	O
1,2,3-Tiadiazólio-5-aminidas	S	N	NR	CR	C	NR
1,2,3-Tiadiazólio-5-tiolatos	S	N	NR	CR	C	S
1,2,3-Tiadiazólio-5-metilidas	S	N	NR	CR	C	CXY _b
1,2,4-Tiadiazólio-3-olatos	NR	CR	S	N	C	O
1,2,4-Tiadiazólio-3-aminidas	NR	CR	S	N	C	NR
Oxatriazóis						
1,2,3,4-Oxatriazólio-5-olatos	O	N	NR	N	C	O
1,2,3,4-Oxatriazólio-5-aminidas	O	N	NR	N	C	NR
1,2,3,4-Oxatriazólio-5-tiolatos	O	N	NR	N	C	S
Tetrazóis						
1,2,3,4-Tetrazólio-5-olatos	NR	N	NR	N	C	O
1,2,3,4-Tetrazólio-5-aminidas	NR	N	NR	N	C	NR
1,2,3,4-Tetrazólio-5-tiolatos	NR	N	NR	N	C	S
1,2,3,4-Tetrazólio-5-metilidas	NR	N	NR	N	C	CXY _b
1,2,3,4-Tetrazólio-5-selenolatos	NR	N	NR	N	C	Se
Tiatriazóis						
1,2,3,4-Tiatriazólio-5-olatos	S	N	NR	N	C	O
1,2,3,4-Tiatriazólio-5-aminidas	S	N	NR	N	C	NR
1,2,3,4-Tiatriazólio-5-tiolatos	S	N	NR	N	C	S
1,2,3,4-Tiatriazólio-5-metilidas	S	N	NR	N	C	CXY _b
Oxatióis						
1,3-Oxatiólio-4-olatos	S	CR	O	CR	C	O
1,3-Oxatiólio-5-olatos	O	CR	S	CR	C	O
Selenazóis						
1,3-Selenazólio-4-olatos	NR	CR	Se	CR	C	O
Ditiadiazóis						
1,3,2,4-ditiadiazólio-5-olato	S	N	S	N	C	O
1,3,2,4-ditiadiazólio-5-aminidas	S	N	S	N	C	NR

^bOs substituintes X e Y incluem CO₂ Et, CN ou um resíduo fluorenilida.

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

TABELA 2 - Heterocíclicos Mesoioônicos do Tipo B



SISTEMAS	ÁTOMOS ou GRUPOS					
	a	b	c	d	e	f
Oxazóis						
1,2-Oxazólio-4-olatos	CR	O	NR	CR	C	O
1,2-Oxazólio-4-aminidas	CR	O	NR	CR	C	NR
Diazóis						
1,2-Diazólio-4-olatos	CR	NR	NR	CR	C	O
1,2-Diazólio-4-aminidas	CR	NR	NR	CR	C	NR
Tiazóis						
1,3-Tiazólio-4-olatos	CR	S	NR	CR	C	O
1,3-Tiazólio-4-aminidas	CR	S	NR	CR	C	NR
Ditióis						
1,2-Ditiólio-4-olatos	CR	S	S	CR	C	O
1,2-Ditiólio-4-tiolatos	CR	S	S	CR	C	S
Tiadiazóis						
1,2,5-tiadiazólio-3-olatos	N	S	NR	CR	C	O
Tetrazóis						
1,2,3,4-Tetrazólio-5-olatos	N	NR	NR	N	C	O
1,2,3,4-Tetrazólio-5-aminidas	N	NR	NR	N	C	NR
1,2,3,4-Tetrazólio-5-tiolatos	N	NR	NR	N	C	S
1,2,3,4-Tetrazólio-5-metilidas	N	NR	NR	N	C	CXY _b

_bOs substituintes X e Y incluem CO₂ Et, CN ou um resíduo fluorenilida.

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

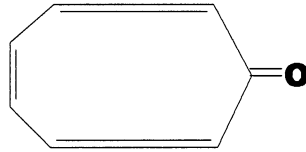


FIGURA 3 A. Estrutura química das troponas FONTE: KIER & ROCHE, 1967.

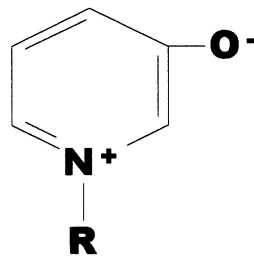


FIGURA 3 B. Estrutura química das Betaínas. FONTE: KIER & ROCHE, 1967.

à presença de determinados substituintes no anel (GLENNON et al., 1981; BADACHIKAR et al., 1986; CORELL et al., 1994; GRYNBERG et al., 1997)

A atividade biológica de alguns compostos mesoiônicos dos tipos A e B é comprovada por vasta literatura, sendo muitos destes compostos patenteados (OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982) e, dentre estes, alguns são comercialmente utilizados como medicamentos (BIAM, 1992). No entanto, com relação a composição do anel mesoiônico, os que apresentam atividade biológica relevante podem ser agrupados em 4 classes principais: as sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olatos), as sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminidas), os oxatriazóis e os 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos, cujas estruturas estão representadas na figura 4 (KIER & ROCHE, 1967).

1.2 Atividades Biológicas dos Compostos Meso-iônicos

Sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olatos)

As sidnonas (figura 4A), foram os primeiros compostos mesoiônicos sintetizados (EARL & MACKNEY, 1935), como também os mais estudados até a atualidade. O primeiro estudo de uma possível atividade biológica das sidnonas, foi realizado por BROOKES & WALKER (1957). Os autores sintetizaram sidnonas cujas estruturas se relacionavam com α -aminoácidos naturais. Estas drogas tiveram sua atividade testada, *in vitro*, contra vários microorganismos, dentre eles: *Streptococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli*. Porém, tais estudos não obtiveram sucesso.

Posteriormente, DAVIS et al. (1959), demonstraram *in vivo* a efetividade de 3-fenilsidnonas no controle da ferrugem do trigo e feijão. Entretanto, como não foi observado efeito *in vitro* contra o fungo, os autores sugeriram que o composto tornaria o tecido do hospedeiro desfavorável ao desenvolvimento da doença. O fenômeno observado foi justificado como decorrente da analogia

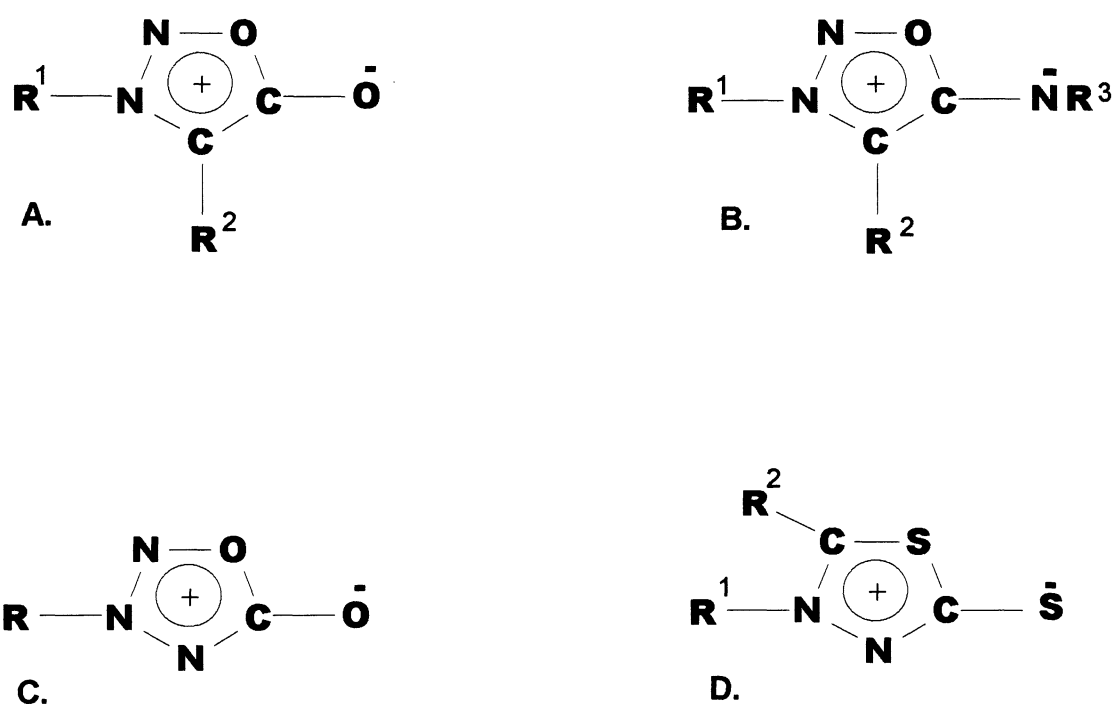


FIGURA 4. Estruturas representativas de compostos mesoiônicos com destacada atividade biológica: A. sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olato); B. sidnoniminas (1,2,3-oxadiazólio-5-aminida); C. oxatriazóis (1,2,3,4 oxatriazólio-5-olato) e D. 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos (1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato). FONTE: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

estrutural entre as sidnonas sintetizadas e os aminoácidos fenilalanina e glicina.

GRECO et al. (1962), por sua vez, demonstraram a efetividade de 3-(p-metoxibenzil)-sidnonas contra carcinoma 755 em camundongos. O mesmo composto, no entanto, foi inativo contra sarcoma 180 e células leucêmicas L - 1210. Em trabalho posterior, o mesmo grupo de pesquisadores (NYBERG & CHEN, 1965), verificou, em camundongos, a atividade de derivados de 3-piperonilsidnonas - análogo estrutural da 3-(p-metoxibenzil) sidnonas -, contra *Plasmodium berghei*, o agente causador da malária. O mecanismo de ação do composto não foi esclarecido, mas uma valiosa informação foi obtida após a submissão do composto à hidrólise ácida ou básica: os produtos da hidrólise, piperonilhidrazina e N-nitroso-N-piperonilglicina, não apresentaram atividade antimalárica, sugerindo que a integridade do anel mesoiônico constituía-se fator essencial à atividade biológica do composto.

Estudos desenvolvidos por BRUZZESE et al. (1965a), também evidenciaram a importância da integridade do anel para a atividade dos compostos mesoiônicos. De início, os autores constataram, em ratos, a ação analgésica, antiinflamatória e hipoglicemiante para determinadas 3-aminoalquil-sidnonas. Porém, quando tais compostos foram submetidos a hidrólise ácida, não apresentaram a mesma atividade (BRUZZESE et al., 1965b).

Em adição ao trabalho pioneiro de GRECO et al. (1962), a ação antineoplásica das sidnonas foi demonstrada também em estudos mais recentes, desenvolvidos por GRYNBERG et al. (1992). Estes autores evidenciaram a atividade de aril-sidnonas contra sarcoma 180, carcinoma de Ehrlich, histiocitoma fibroso - induzido por 20 metil clorantreno em camundongos B10A (B10MCII) - , e células leucêmicas L1210. Foram testados os compostos 3-(4-X-3-nitrofenil)-1,2,3-oxadiazólio-5-olatos (figura 5), onde X correspondia aos substituintes, Cl, anel pirrolidino, piperidino ou morfolino. Os resultados demonstraram que os compostos que apresentavam o Cl ou o anel

pirrolidino como substituintes, aumentavam o tempo de sobrevivência de animais portadores de sarcoma 180, carcinoma de Ehrlich ou de B10MCII, sendo o composto com o substituinte Cl, o mais citotóxico contra todas as células tumorais testadas *in vitro*. Destaca-se, ainda, que os compostos cujos substituintes eram o anel piperidino ou morfolino não apresentaram atividade antitumoral. Estes resultados não apenas reiteraram a efetividade das sidnonas como agentes antineoplásicos, como também a importância da presença de determinados substituintes no anel para que o composto apresente atividade biológica.

Também na década de 90, demonstrou-se para as sidnonas as atividades antiinflamatória e analgésica (SATYANARAYANA & RAO, 1995). Os autores pesquisaram a atividade de duas séries de compostos. Os compostos da série I eram 4-[1-oxo-3-(aril substituído)-2-propenil]-3-fenilsidnonas (figura 6A) e os da série II eram 3-[4-[3-(aril substituído)-1-oxo-2-propenil]fenil]sidnonas (figura 6B). Estes, na dose de 100mg/Kg, foram capazes de inibir, em ratos, a formação de edema induzido por carragenana, mostrando, portanto, uma atividade antiinflamatória. A ação analgésica em camundongos foi também avaliada, e, na mesma dose, observou-se a diminuição do número de contorções induzidas pela administração de ácido acético. Os derivados da série I, que apresentavam como substituintes em R os grupamentos 4-N(CH₃)₂ ou 4-Cl, apresentaram maior atividade antiinflamatória, inibindo a formação do edema em 54% e 51%, respectivamente, em relação ao controle. Quanto à ação analgésica, os derivados da mesma série, que apresentavam como substituintes em R o grupamento 4-OH foram os mais efetivos, reduzindo em 49% o número de contorções em relação ao controle. A presença do flúor como substituinte em R, conferiu ao composto uma atividade analgésica similar à verificada para a aspirina, com redução do número de contorções em relação ao controle, em 62%.

Ainda em relação aos os efeitos biológicos atribuídos às sidnonas, BADACHIKAR et al. (1986), descreveram a atividade antibacteriana de derivados 3-[p-(N-metil-etil-N-fenilcarbamoil)] fenilsidnonas. Os compostos

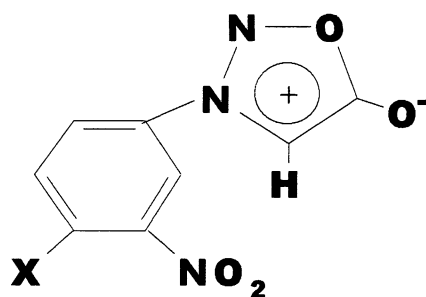


FIGURA 5. Estrutura química do 3-(4-X-3-nitrofenil)-1,2,3-oxadiazólio-5-olato. FONTE: GRYNBERG et al., 1992.

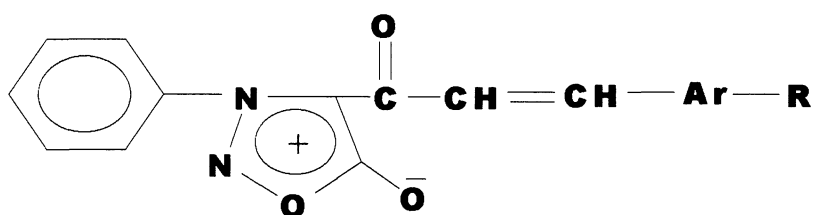


FIGURA 6 A. Estrutura química do 4-[1-oxo-3-(aril substituído)-2-propenil]-3-fenilsidnonas (série I). FONTE: SATYANARAYANA & RAO, 1995.

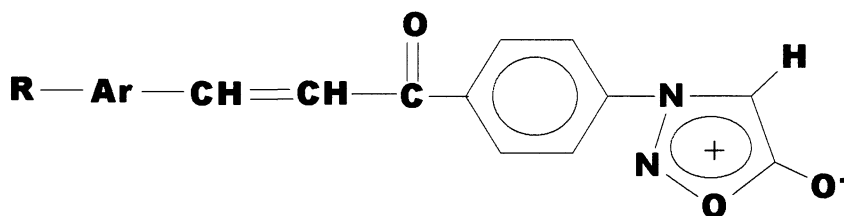


FIGURA 6 B. Estrutura química do 3-[4-[3-(aril substituído)-1-oxo-2-propenil]fenil] sidnonas (série II) . FONTE: SATYANARYANA & RAO, 1995.

utilizados, nas doses de 25 a 100 μ g, foram efetivos contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas pyocynea*, *Proteus vulgaris* e *E. coli* cultivados. Por sua vez, MOUSTAFA & EISA (1992) também evidenciaram atividade antibacteriana, *in vitro*, para derivados (3 ou 4-acetilfenil) sidnonas, contra *S. aureus*. Vale ressaltar, que embora tenha sido constatada a atividade antibacteriana para tais derivados, nenhum deles apresentou atividade maior que a verificada para a estreptomicina, composto utilizado como referência. Ainda neste contexto, foram sintetizadas cefalosporinas e penicilinas, em cuja estrutura estava presente o anel mesoiônico característico das sidnonas. Tais drogas também apresentaram importante atividade antibacteriana (OLLIS & RAMSDEN, 1976).

A atividade biológica das sidnonas tem sido estudada, também, sob outro enfoque. Algumas pesquisas avaliaram a ação do composto 3-[2-(2,4,6-trimetilfenil) tioetil-4]-metilsidnonas (TTMS) sobre o citocromo P 450, em cultura de hepatócitos de embriões de galinha (SUTHERLAND et al., 1986; MACKIE et al., 1991). Segundo a literatura citada, este composto seria um substrato suicida para o citocromo P 450, promovendo a formação de um pigmento identificado como *N*-alquilprotoporfirina IX. Tal pigmento atuaria como inibidor da enzima ferroquelatase, havendo, em conseqüência, uma diminuição do “pool” de grupamentos heme. Em resposta a esta diminuição, ocorreria uma ativação da δ -aminolevulinato sintase.

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

Com relação as sidnoniminas (figura 4B), os estudos de relevância surgiram nas décadas de 80 e 90, sendo a maioria relacionada a ação destes compostos sobre o sistema cardiovascular (MAJID et al., 1980 ; REHSE et al., 1993a,b,c, 1995a). Tal efeito, segundo a literatura citada, seria resultante da liberação de NO da estrutura das sidnoniminas sintetizadas. Este efector ativa a enzima guanilato ciclase, que catalisa a síntese de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), determinando, então, o relaxamento da musculatura vascular (MONCADA et al., 1991). Desta forma, drogas que induzem a liberação de NO exercem efeitos importantes sobre o sistema cardiovascular, sendo utilizadas no tratamento de doenças que afetam este sistema, como por exemplo a Angina de Peito (RUDOLPH et al., 1991). Entre os compostos mesoiônicos liberadores de NO, utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares, o mais citado é a molsidomina (N-etoxicarbonil)-3-morfolinosidnonimina (figura 7) (MAJID et al., 1980; RUDOLPH et al., 1991). Os efeitos desta sidnonimina estão relacionados a seus dois metabólitos, o SIN-1 (3-mofolinosidnonimina) e SIN-1A (N-nitroso-N-morfolino-acetonitrilo), representados na figura 7. A ação vasodilatadora promovida pela molsidomina é comparável àquelas observadas para os nitratos de uso terapêutico, como a nitroglicerina (MAJID et al., 1980; RUDOLPH et al., 1991). Os principais efeitos atribuídos a molsidomina (vasodilatador, coronariodilatador e antiagregante plaquetário), o tornam indicado ao tratamento da angina de peito e insuficiência cardíaca congestiva (BIAM, 1992).

Diante dos importantes efeitos descritos para as sidnoniminas sobre o sistema cardiovascular, buscou-se elucidar a origem do NO liberado da estrutura destes compostos. Alguns autores sugeriram que o NO seria liberado diretamente do anel mesoiônico, após sua abertura (HOGG et al., 1992). Por outro lado, em estudo publicado por REHSE et al. (1993a), sugeriu-se que determinados substituintes do anel mesoiônico, como por exemplo o N-NO, seriam os precursores do NO formado. No estudo em questão, foi avaliado o

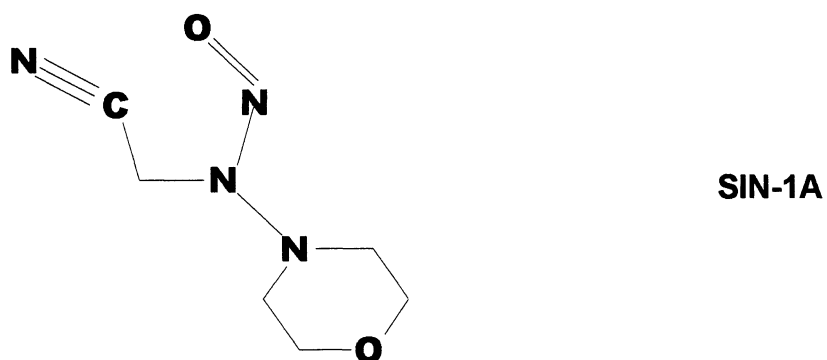
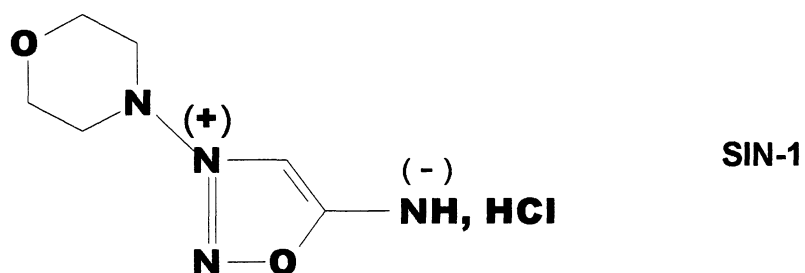
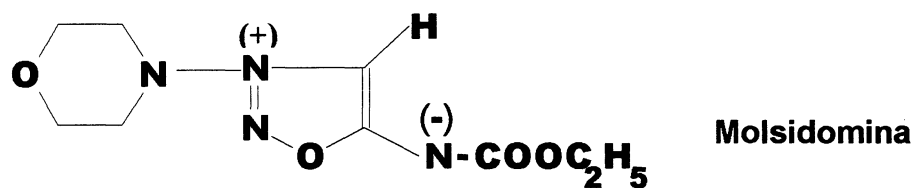


FIGURA 7. Estrutura química do N-etoxicarbonil-3-morfolinosidnonimina (molsidomina), morfolino sidnonimina (SIN-1) e N-nitroso-N-morfolino-acetonitrilo (SIN-1A). FONTE: RHESE et al., 1995b; KANKAANRANTA et al., 1996.

efeito antiagregante plaquetário “in vitro” de vários derivados 3-*aril*alquil-N-X-5-sidnoniminas substituídos (figura 8), observando-se maior atividade para o composto onde X correspondia ao grupamento N-NO e R₁, R₂, R₃ e R₄ ao átomo de H. No entanto, a atividade verificada - inibição da agregação plaquetária induzida pelo colágeno - IC₅₀ 0,7 μmols/L -, não parecia estar diretamente relacionada ao composto, mas a produtos resultantes da degradação fotolítica deste, devido à incidência da luz visível no agregômetro. Estes produtos de degradação ativos foram denominados “espécies ligadas ao NO”. Ainda no mesmo estudo, com o objetivo de verificar a formação destas espécies também *in vivo*, o mesmo derivado de maior atividade (X correspondendo ao grupamento N-NO e R₁, R₂, R₃ e R₄ ao átomo de H), foi avaliado quanto à atividade anti-trombótica. Usando um modelo de trombose induzida por laser, em ratos (REHSE et al., 1991), foi observada uma inibição de aproximadamente 28% em vênulas e 48% em arteríolas, após a administração oral do composto na dose de 60mg/Kg de peso. Estes resultados sugeriam a formação de espécies relacionadas ao NO, também *in vivo*, confirmando o potencial uso dos derivados 3-*aril*alquil-N-nitroso-5-sidnoniminas como agentes anti-trombóticos, doadores de NO.

Em trabalho posterior, REHSE et al. (1993b) avaliaram a atividade anti-trombótica, *in vitro* e *in vivo*, bem como a atividade vasodilatadora *in vivo*, de compostos 3-*alquil*-N-X-5-sidnoniminas (figura 9). Os compostos mais ativos, como anti-trombóticos tanto *in vitro*, conforme avaliado pela inibição da agregação plaquetária pelo teste Born, como *in vivo*, conforme avaliado pela inibição da formação de trombo, induzida por laser em ratos (REHSE et al., 1991), foram os que apresentavam como substituintes em X o grupamento N-NO, e como substituintes em R grupamentos mais lipofílicos, como por exemplo grupos hexil e ciclohexil. Segundo os autores, a presença de substituintes lipofílicos favoreceriam a interação destes compostos com a membrana plaquetária, facilitando a entrada destes na plaqueta, ou a liberação de quantidades significativas de NO ou espécies relacionadas. Paralelamente

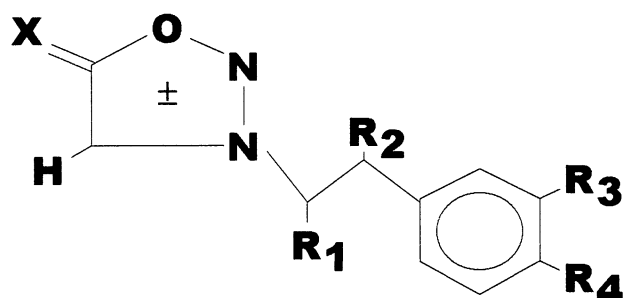


FIGURA 8. Estrutura química das 3-arylalkyl-*N*-X-5-sidnoniminas. FONTE: RHESE et al., 1993a.

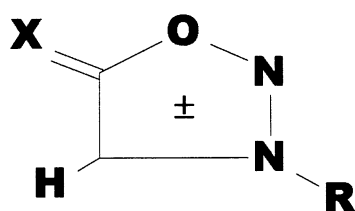


FIGURA 9. Estrutura química das 3-alkyl-*N*-X-5-sidnoniminas FONTE: RHESE et al., 1993b.

à atividade de anti agregantes plaquetários, os compostos considerados doadores de NO, como os nitratos orgânicos e a própria molsidomina, são conhecidos por sua ação vasodilatadora (RUDOLPH et al., 1991). Procurando avaliar tal efeito, os autores investigaram a ação vasodilatadora após a administração oral do composto que apresentava como substituintes em X e em R os grupamentos N-NO e CH₃, respectivamente. Foram utilizados como modelo experimental, cães portadores de hipertensão renal, conscientes, que receberam 3mg/Kg do composto, por via oral. Os resultados obtidos - redução da pressão sistólica e endodiastólica ventricular esquerda -, indicavam a utilidade do composto para o tratamento de Angina de Peito.

Nesta mesma linha de pesquisa, REHSE et al. (1993c) investigaram, por sua vez, também o efeito dos substituintes na posição 4 do anel sidnonimina (3,4-disubstituídos N-X-5-sidnoniminas, figura 10). Reiterando os resultados dos trabalhos anteriores, foi observada uma maior atividade - inibição da agregação plaquetária induzida pelo colágeno - quando X era correspondente ao grupamento N-NO e R₁ e R₂ (posições 3 e 4) a grupamentos mais lipofílicos como feniletil e ciclohexil, respectivamente. A lipofilicidade dos substituintes foi relacionada à maior interação dos compostos com a membrana plaquetária, enquanto a presença do grupo nitroso (N-NO) à liberação de NO.

Ainda com referência à atividade antitrombótica das sidnoniminas, REHSE et al. (1995a) demonstraram a inibição da adesão de leucócitos, induzida por estímulo elétrico, em vênulas mesentéricas de ratos, após a administração oral do composto RE 2047 (3-metil-N-nitroso-5-sidnoniminas, figura 11), na dose de 60 mg/Kg de peso.

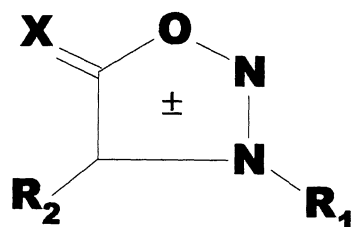


Figura 10. Estrutura química das 3,4-alkil-N-X-5-sidnoniminas. FONTE: RHESE et al., 1993c

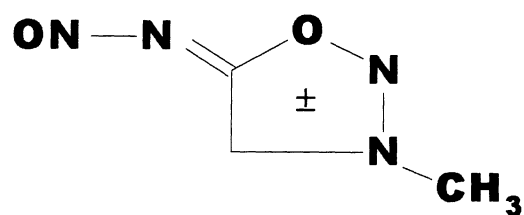


FIGURA 11. Estrutura química do RE 2047 (3-metil-N-nitroso-sidnona-5-imas) FONTE: RHESE et al., 1995a.

Oxatriazóis Mesoiônicos

Assim como as sidnoniminas, atribuiu-se igualmente aos oxatriazóis mesoiônicos (figura 4C), a propriedade de atuarem como doadores de NO. Têm sido descritas as sínteses de vários oxatriazóis mesoiônicos, denominados de compostos GEA (derivados 3-aryl substituídos oxatriazóis-5-imina) (CORELL et al., 1994). Tais compostos, foram avaliados quanto à sua atividade biológica, sendo caracterizados, a partir dos resultados obtidos, agentes anti agregantes plaquetários, fibrinolíticos, trombolíticos e broncolíticos, como liberadores de NO. Em estudo posterior (KANKAANRANTA et al., 1996), foram realizados ensaios que comprovaram a liberação de NO das estruturas de dois compostos GEA, denominados GEA 3162 e GEA 3175 (figura 12). Tal como no caso do metabólito da molsidomina SIN-1 (figura 7) o NO foi liberado a partir do anel mesoiônico.

1,3,4-Tiadiazóis Mesoiônicos

Estudos com derivados 1,3,4-tiadiazóis, quarta classe de derivados mesoiônicos, representados na figura 4D, também têm demonstrado uma importante atividade biológica. No entanto, ao contrário das sidnonas e sidnoniminas, a disponibilidade de informações na literatura é mais limitada.

A atividade biológica destes compostos foi relatada pela primeira vez por STEWART & KIER, em 1965. Os autores testaram derivados 4-fenil-5-X-1,3,4-tiadiazólio mesoiônicos (figura 13) contra *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* e *E. coli*, *in vitro*. Através da técnica de difusão em ágar a sensibilidade dos microorganismos foi avaliada frente a vários derivados mesoiônicos. A atividade de tais derivados foi estimada pela medida da zona de inibição do crescimento, sendo que os de maior atividade apresentavam como substituintes em X os grupamentos metil, etil ou isopropil. Derivados com cadeia longa ou grupamentos volumosos na posição 5 eram inativos.

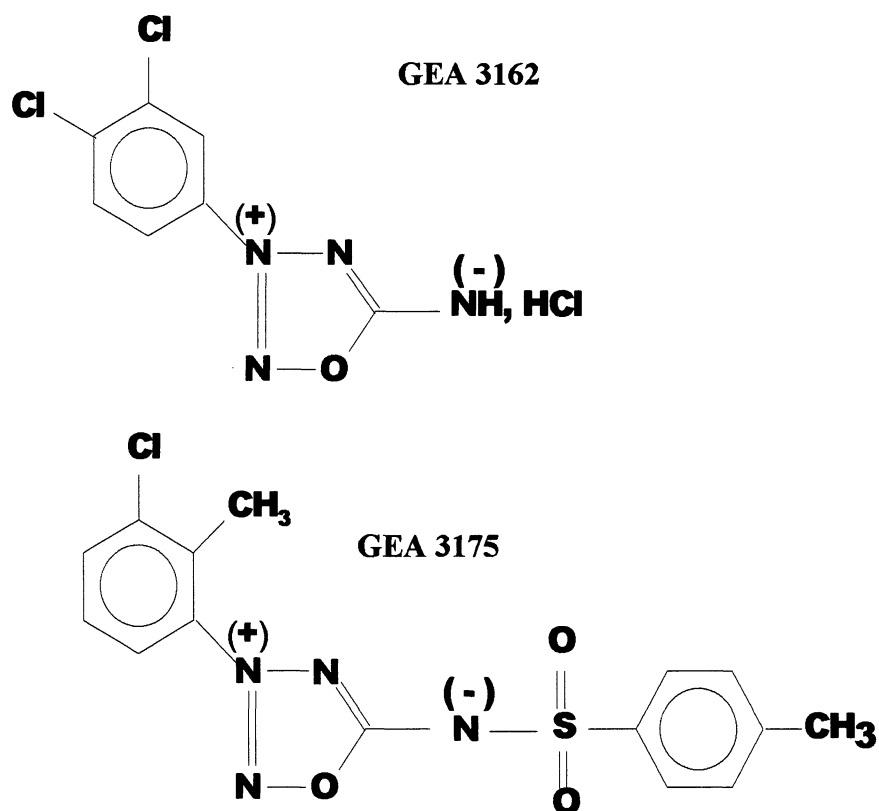


FIGURA 12. Estrutura química dos compostos mesoiônicos 3-aryl substituídos oxatriazóis-5-iminas, GEA 3162, GEA 3175 FONTE: KANKAANRANTA et al.,1996.

GLENNON et al. (1981) descreveram a inibição da enzima adenosina 3',5'- monofosfato fosfodiesterase por compostos mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis [3,2-a] pirimidinas (figura 14). Segundo os autores, tal inibição deveu-se ao fato de que os derivados sintetizados eram análogos estruturais às xantinas naturais, inibidores conhecidos da fosfodiesterase. A inibição na atividade da enzima foi dependente da presença de determinados substituintes (posições correspondentes a R₂, R₆ e R₈), na estrutura dos derivados mesoiônicos. Substituintes mais hidrofóbicos, como fenil ou benzil, exerciam maior inibição sobre a enzima. Por outro lado, substituintes alquila de cadeia curta aboliam os efeitos dos derivados sobre a fosfodiesterase. ROGERS et al. (1981) demonstraram que a inibição promovida pelos derivados 1,3,4 -tiadiazóis-pirimidinas mesoiônicos era similar à observada para a teofilina. A partir de estudos cinéticos, os pesquisadores sugeriram que tal inibição era do tipo competitiva. Nesse estudo, como no anterior, foi observada maior atividade na presença de substituintes mais hidrofóbicos.

Considerando a proposta de DALY (1982) de que os principais efeitos farmacológicos das xantinas estariam relacionados mais à sua ação como antagonista dos receptores de adenosina, do que propriamente, à inibição direta sobre a enzima fosfodiesterase, GLENNON et al. (1984) estudaram a possível ação antagonista dos derivados 1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos sobre os receptores de adenosina. Estes autores avaliaram os efeitos *in vitro* de várias classes de compostos mesoiônicos análogos às xantinas, sobre as duas classes de receptores de adenosina, A₁ e A₂, relacionados à inibição e a ativação da enzima adenilato ciclase, respectivamente. Os compostos 1,3,4 -tiadiazóis [3,2- a] pirimidinas (figura 14) foram antagonistas somente aos receptores adenosina do tipo A₁, embora tal efeito tenha sido menos pronunciado que o exercido pela teofilina, composto utilizado para comparação.

LIMA et al. (1986) descreveram atividade antifúngica e antibacteriana para o derivado 4,5-difenil-2-tiolato-1,3,4-tiadiazólio. Este composto foi testado *in vitro* contra as bactérias *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*,

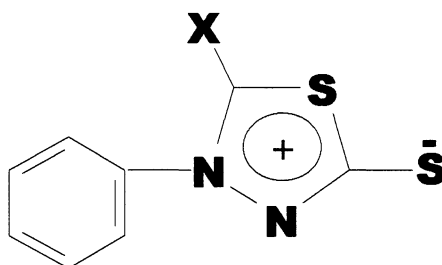


FIGURA 13. Estrutura química dos compostos 4-fenil-5-X-1,3,4-tiadiazóis mesoiônicos FONTE: STEWART & KIER, 1965.

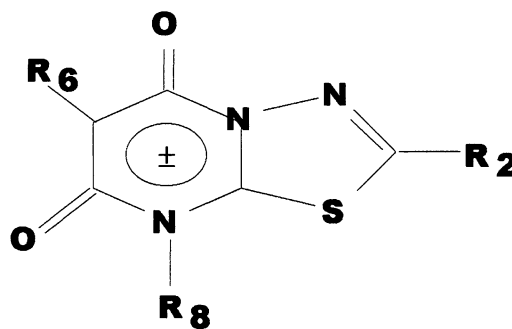


FIGURA 14. Estrutura química do 1,3,4-tiadiazólio-[3,2-a]-pirimidina FONTE: GLENNON et al., 1981.

Streptomyces albus, *Streptomyces griseus*, e os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula* sp., *Penicillium* sp., *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*. A dose utilizada para a inibição do crescimento dos microorganismos variou de 200 a 400µg/ml.

Derivados 1,3,4-tiadiazóis também foram ativos *in vitro* contra leveduras. MONTANARI et al. (1992) testaram os compostos 1,3,4-tiadiazólio - 2-aminida contra *S. cerevisiae*, usando técnicas de microcalorimetria. A atividade antifúngica significativa foi observada somente para composto 1,3,4-tiadiazólio-2 aminida (figura 15) quando estava presente como substituinte em X, o grupamento NO₂. Estudos posteriores de MONTANARI et al. (1997) relataram a síntese e a atividade antimicrobiana de compostos 1,3,4-tiadiazóis-2-aminida contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Foram avaliadas tanto a forma de ácidos conjugados como a de bases livres (figuras 16A e 16B) dos compostos sintetizados, sendo os ácidos conjugados os mais ativos contra as bactérias testadas. Os autores também demonstraram que para os ácidos conjugados, a presença de Br, Cl ou NO₂ na posição 4 do anel fenila ligado ao carbono 5 (X- figura 16A), promovia o aumento da atividade do composto contra *B. cereus* e *S. aureus*.

Um novo derivado 1,3,4-tiadiazólio foi sintetizado no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (1994). Trata-se do cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D), precursor do composto mesoiônico 4-fenil-5-[4-nitrocinaoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (figura 17), cuja estrutura foi determinada por RMN ¹H e ¹³C e espectroscopia de massas (GRYNBERG et al., 1997).

Para este composto, CANTO-CAVALHEIRO et al. (1996) demonstraram a atividade contra *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, com LD₅₀ de 1,7 mmols/L e 2,6 mmols/L para os dois parasitas, respectivamente.

Avaliando a atividade antitumoral, GRYNBERG et al. (1997), verificaram significativa inibição no crescimento de sarcoma 180 e de tumor de Ehrlich,

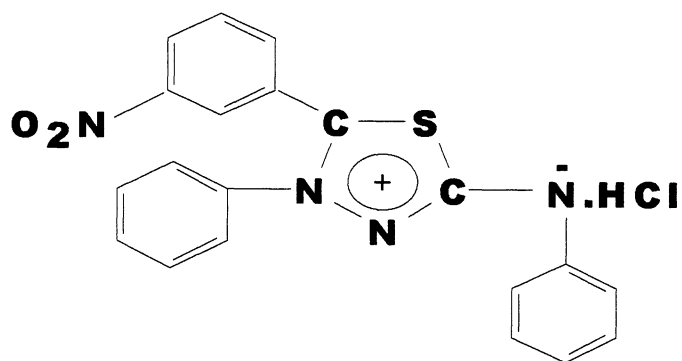


FIGURA 15. Estrutura química do composto mesoiônico 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida ativo contra *Saccharomyces cerevisiae*. FONTE: MONTANARI et al., 1992.

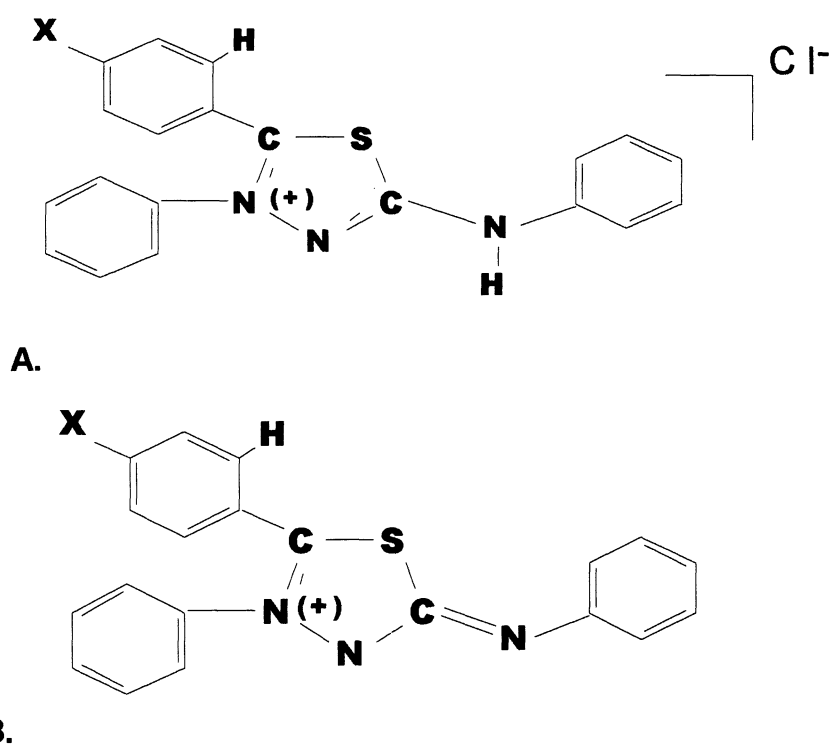


FIGURA 16. Estrutura química dos compostos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas mesoiônicos; em A. ácidos conjugados; e em B. bases livres. FONTE: MONTANARI et al., 1997.

quando da administração intraperitoneal de MI-D em camundongos, nas doses de 30 e 25 mg/Kg, respectivamente, não tendo sido afetados os parâmetros hematológicos de animais não portadores de tumor, quando administrados 15 mg/Kg de MI-D.

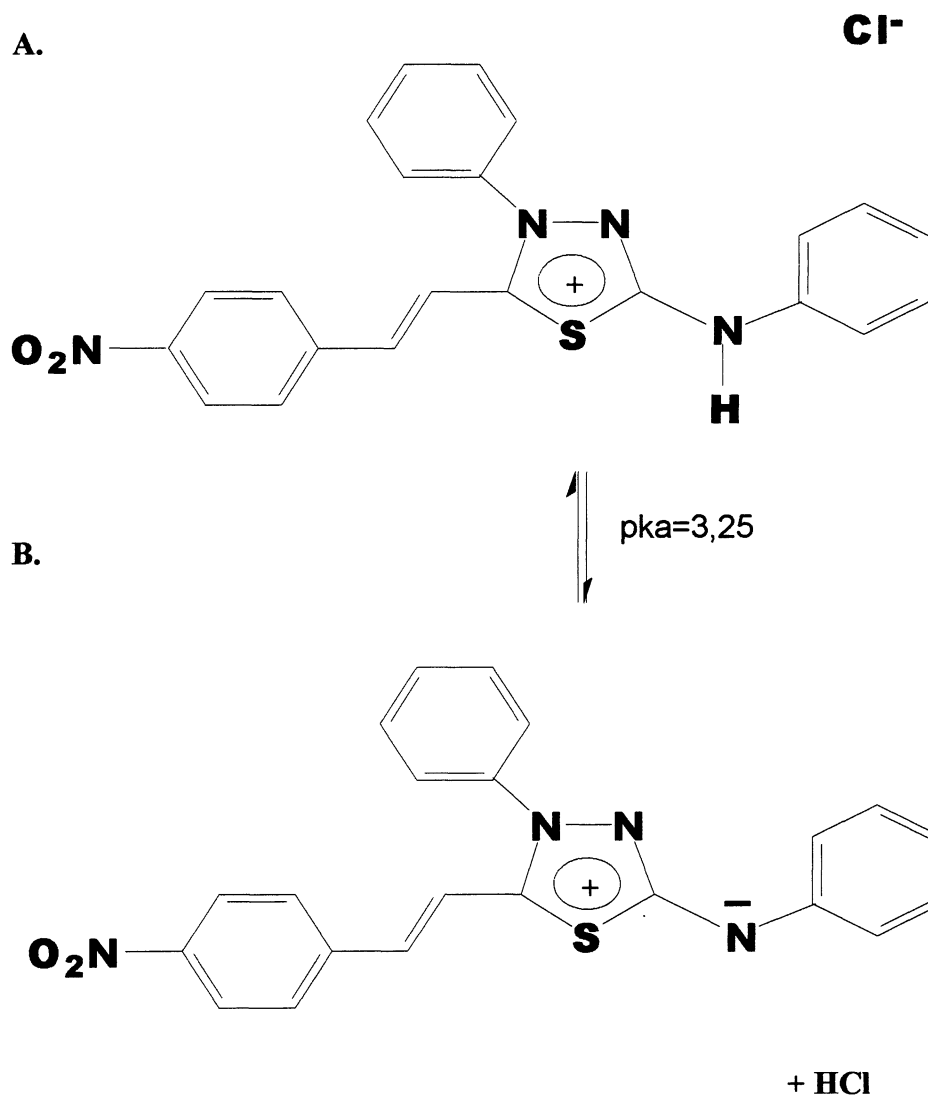


FIGURA 17. Estrutura Química do cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) em A. e de seu derivado mesoiônico 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida em B. FONTE: GRYNBERG et al., 1997.

1.3 OBJETIVOS

Em contraste aos vários trabalhos que tratam da potencialidade do uso dos compostos mesoiônicos como fármacos, particularmente os derivados 1,3,4-tiadiazóis, faltam na literatura dados que esclareçam o mecanismo bioquímico de sua ação, bem como seus efeitos no âmbito global da função celular.

O objetivo geral do presente trabalho, portanto, é o de contribuir para a elucidação dos efeitos, a nível celular, dos compostos mesoiônicos representados, mais particularmente, pelo cloreto de 4-fenil-5-(4-nitrocinaoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D) e seu derivado mesoiônico 4-fenil-5-(4-nitrocinaoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida, para os quais foi descrita uma importante ação antitumoral (GRYNBERG et al.,1997).

Neste sentido, através de modelos experimentais como a perfusão de fígado isolado; mitocôndrias isoladas; células intactas e membranas artificiais e naturais, serão avaliados os efeitos do MI-D sobre:

- 1) a glicogenólise e glicólise;
- 2) a função mitocondrial;
- 3) a interação com membranas;
- 4) a morfologia, ultra estrutura e morte celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Foram obtidos da Sigma Chemical Co. : DMSO, D-manitol, Hepes, EGTA, EDTA, albumina de soro bovino, ácido glutâmico e succínico, rotenona, ADP, ATP, NADH, NAD⁺, citocromo c (Tipo IV - coração de boi), fosfoenolpiruvato, piruvato quinase (tipo I, 100U/mg de proteína), lactato desidrogenase (tipo I, 60U/mg de proteína), FCCP, safranina O, valinomicina, oligomicina, antimicina A, nigericina, fluoreto de fenil-metil-sulfonila, DMPC, paraformaldeído e tetróxido de ósmio.

Os reagentes a seguir indicados foram adquiridos dos laboratórios: ferricianeto de potássio (Riedel), cianeto de sódio (Baker), DPIP (Eastman), sondas fluorescentes DPH e DPH-PA (Molecular Probes), meio essencial mínimo de Eagle (Flow laboratories), soro fetal bovino estéril (Laborclin), tripsina (Difco), glutaraldeído, cacodilato de sódio e resina epon (Polysciences)

Os demais reagentes, também com alto grau de pureza, foram obtidos da Merck.

O Kit ApopTag Plus foi fornecido pela Oncor.

MI-D (cloreto de 4-fenil-5-(4-nitrocinaoíl)-1,3,4-tiodiazólio-2-fenilamina) foi sintetizado e gentilmente doado pela Prof^a. Dra. Áurea Echevarria do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O composto teve sua estrutura confirmada por RMN ¹H e ¹³C e espectroscopia de massas (GRYNBERG et al., 1997).

2.2 Soluções

2.2.1 Preparo da Solução de MI-D

A solução de MI-D foi preparada em DMSO à concentração final de 5 mmols.L⁻¹. Esta solução estoque foi mantida congelada a -18°C, e utilizada no prazo máximo de 1 mês, após o preparo. Análises de RMN de ¹H e ¹³C e

espectroscopia de massa confirmaram que composto, assim armazenado, conserva suas características estruturais (ECHEVARRIA, Comunicação pessoal). Para a utilização nos ensaios, a solução estoque foi diluída em meio de reação, a fim de obter-se a concentração final desejada para cada situação experimental.

O espectro de absorção do MI-D em DMSO e da solução diluída em tampão Tris-maleato 10 mmols.L⁻¹, pH 7, KCl 50 mmols.L⁻¹, estão apresentados na figura 18A e 18B, respectivamente.

2.2.2 Soluções Utilizadas no Cultivo Celular

2.2.2.1 Solução de Bicarbonato de Sódio

A solução de bicarbonato de sódio, foi preparada à concentração de 7,5% (p/v) e distribuída em tubos, no volume de dez mL. Após a esterilização feita em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por trinta minutos, esta solução foi mantida à temperatura ambiente, sendo utilizada para ajustar o pH do meio de crescimento.

2.2.2.2 Solução Salina Tamponada

A solução salina tamponada (PBS), em pH 7,4, foi preparada rotineiramente na forma de solução estoque cinco vezes concentrada, sendo constituída nestas condições de: Na₂HPO₄ 40,5 mmols.L⁻¹, NaCl 680 mmols.L⁻¹, KH₂PO₄ 7,3 mmols.L⁻¹. Esta solução foi esterilizada em autoclave a 120° C, 1 atm de pressão e mantida a 4°C. No momento do uso, fez-se a diluição em água bidestilada estéril.

2.2.2.3 Solução Dispersante de Células (STV)

A solução dispersante de células ou solução tripsina-verseno (STV), preparada com a finalidade de descolar as células HeLa do frasco de cultura, constituiu-se de: tripsina 50mg%, NaCl 137mmol.L⁻¹, KCl 5,4 mmols.L⁻¹,

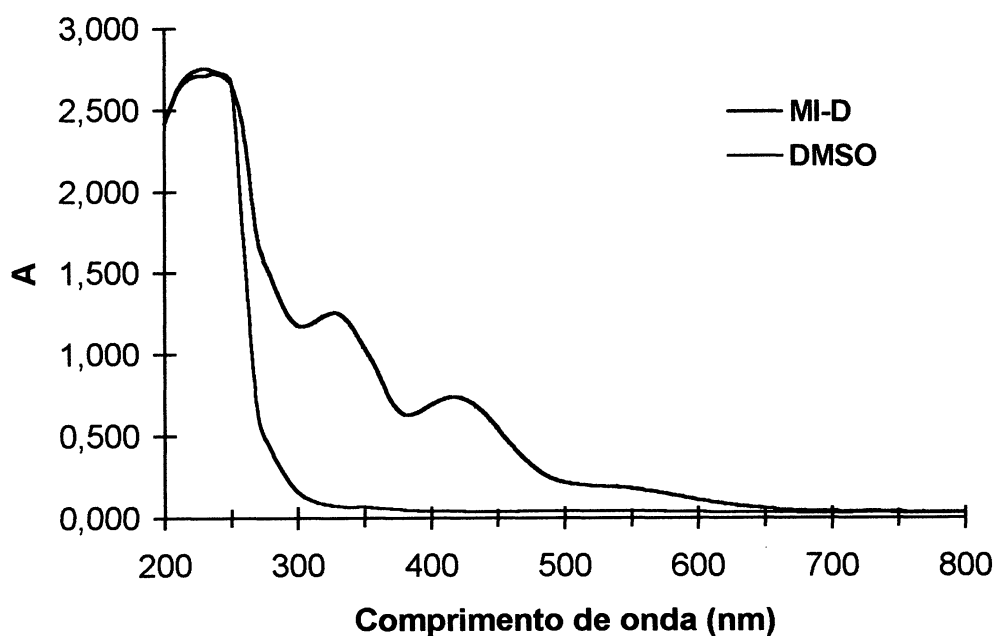
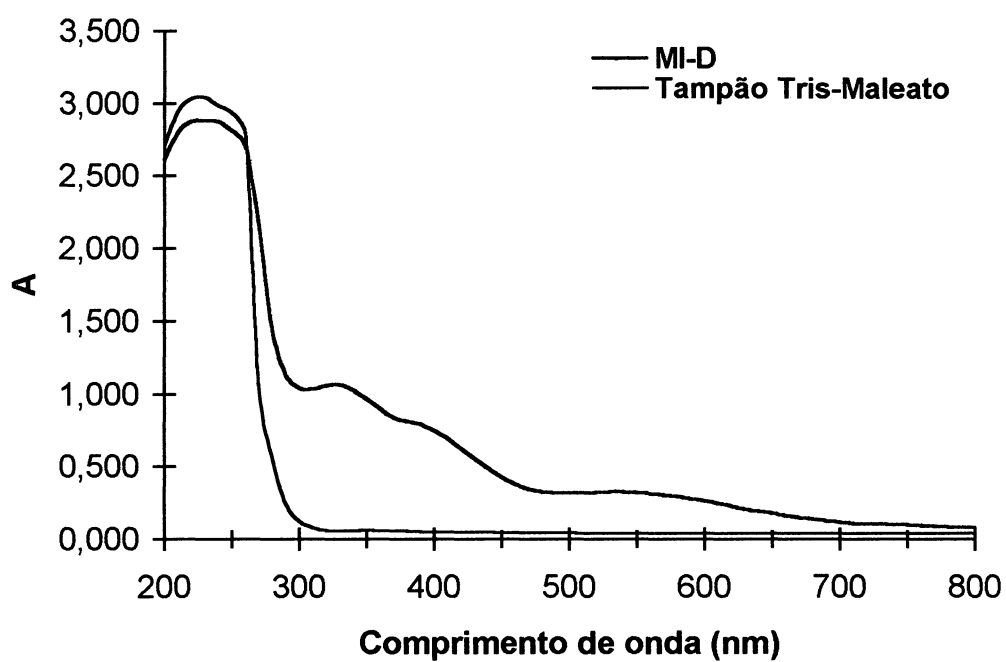


FIGURA 18. Espectros de Absorção do MI-D. A. Espectro de absorção do MI-D na concentração de $80 \mu\text{mols.L}^{-1}$, em tampão Tris - maleato 10 mmols.L^{-1} , pH 7, KCl 50 mmols.L^{-1} . B. Espectro de absorção do MI-D na concentração de $80 \mu\text{mols.L}^{-1}$ em DMSO.

KH_2PO_4 0,44 mmol.L^{-1} , dextrose 5 mmols.L^{-1} , vermelho de fenol 2mg%, NaHCO_3 2,3 mmol.L^{-1} e EDTA 0,53 mmols.L^{-1} . A esterilização da solução foi feita por filtração, utilizando-se membranas de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 μm , marca Millipore, em aparelho Sartorius. Após a filtração a solução STV foi mantida -18°C .

2.3 Animais

Para os experimentos de perfusão de fígado e isolamento de mitocôndrias de fígado de rato, foram utilizados ratos machos albinos Wistar, com peso variando entre 220-330 g, mantidos nos biotérios do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá e do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, respectivamente. Os animais foram alimentados com dieta balanceada Purina® e água *ad libitum* e, para o isolamento das mitocôndrias de fígado, os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas permitindo-se água *ad libitum*.

2.4 Células

Neste trabalho foram utilizadas células da linhagem HeLa e L1210. Células HeLa são derivadas de carcinoma de cervix uterino humano, crescem em monocamada e apresentam aparência epitelial. As células L1210 constituem-se de uma linhagem leucêmica de linfócitos e desenvolvem-se em suspensão. As duas linhagens foram procedentes da American Type Culture Collection, sendo as células HeLa adquiridas da Seção de Cultivo Celular do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, a passagem nº 104, enquanto as L1210 foram gentilmente doadas ao Laboratório de Cultivo Celular da UFPR pela Dra. Bartira B. Rossi, do Departamento de Imunologia, da UFRJ.

2.5 Perfusão de Fígado Isolado

Os experimentos de perfusão de fígado foram realizados no Laboratório de Metabolismo Hepático, do Departamento de Farmácia e Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, com a supervisão do Prof. Dr. Adelar Brach. Foram utilizadas técnicas de perfusão de rotina daquele laboratório e avaliadas a glicólise e glicogenólise.

2.5.1 Líquido de Perfusão

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão de Krebs-Henseleit-bicarbonato (KREBS & HENSELEIT, 1932), que apresenta um pH de 7,4 quando saturado com uma mistura de oxigênio e dióxido de carbono na proporção de 95:5. A composição do tampão foi a seguinte: NaCl 115mmols.L⁻¹, NaHCO₃ 25 mmols.L⁻¹, KCl 6 mmols.L⁻¹, Na₂SO₄ 1,2 mmols.L⁻¹, MgCl₂ 1,18 mmols.L⁻¹, NaH₂PO₄ 1,25 mmols.L⁻¹, CaCl₂ 2,5 mmols.L⁻¹ e BSA 20mg%.

2.5.2 Isolamento do Fígado

Para a realização dos experimentos, animais alimentados foram anestesiados com nembutal sódico (50mg/Kg) e o fígado retirado segundo procedimento cirúrgico descrito por KELMER-BRACHT et al. (1984). Todo o procedimento cirúrgico foi gentilmente realizado pela Prof^a. Dra. Jorgette Constantin, do Departamento de Farmácia e Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá.

Uma vez isolado o fígado, o caminho do líquido que perfundiu o órgão foi o seguinte: o líquido de perfusão mantido em reservatório foi sugado por uma bomba peristáltica, passando por um oxigenador, onde foi aquecido e oxigenado. A seguir, passou para a câmara de perfusão, chegando ao fígado através de uma cânula inserida na veia porta. O líquido de perfusão deixou o fígado através de outra cânula inserida na veia cava superior, banhou um eletrodo de platina (integrante do aparelho de perfusão) e atingiu a câmara para coleta de amostras, que foi realizada a cada 2 minutos. A análise dos

metabólitos (glucose, lactato e piruvato) foi feita no perfusado e o consumo de oxigênio foi monitorado durante todo o experimento.

A velocidade de infusão do líquido de perfusão foi de 32 mL. min⁻¹. Para a determinação dos efeitos do MI-D sobre a glicólise, glicogenólise e consumo de oxigênio do órgão, a droga foi infundida no sistema com o auxílio de uma bomba de precisão. Quando posicionada para injetar no sistema 0,9 mL por minuto, sendo o fluxo de 32 mL. min⁻¹, a diluição da solução contendo a droga foi de 36 vezes. Desta forma, para alcançar uma concentração molar de 5 μmols.L⁻¹ e 25 μmols.L⁻¹ de MI-D, foram preparadas soluções concentradas do composto mesoiônico. O MI-D foi dissolvido inicialmente em DMSO, sendo esta solução diluída em tampão de Krebs-Hanseleit-bicarbonato. às concentrações de 0,18 mmols.L⁻¹ e 0,9 mmols.L⁻¹. A concentração do solvente (20 mmols.L⁻¹) utilizada nos experimentos foi sempre a mesma, tendo sido previamente demonstrado (KEMMELMEYER, Comunicação pessoal) que nas condições experimentais utilizadas o DMSO não interfere nos parâmetros analisados.

2.5.3 Análises do Perfusado

2.5.3.1 Determinação do Consumo de Oxigênio

A concentração de oxigênio venoso foi determinada polarograficamente através de um eletrodo de platina combinado com um eletrodo de prata/cloreto (KELMER-BRACHT et al., 1984). O eletrodo que está inserido dentro da câmara do fígado é banhado pelo perfusado, sendo o sinal gerado enviado ao polarógrafo onde é ampliado. Por sua vez, o sinal ampliado segue para um registrador potenciométrico que assinala as variações ocorridas na tensão de oxigênio.

As variações na concentração venosa de O₂, isto é, do perfusado, foram expressas em μmols de O₂ consumido.min⁻¹.g⁻¹ de fígado, usando-se a fórmula:

$$VO_2 = \frac{(C_a - C_v).F}{p} \quad (\text{equação 1})$$

onde: C_v é a concentração venosa de O_2 ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$); C_a é a concentração arterial (esta última é constante e igual a $0,86 \mu\text{mols.mL}^{-1}$ a 37°C para a concentração salina do tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (CLARK, 1956)); F é o fluxo através do órgão, em mL.min^{-1} ; p é o peso úmido do fígado em gramas. A calibração foi efetuada, sabendo-se que a concentração de O_2 em água a 37°C , é igual a $0,19\text{mmols.L}^{-1}$, quando em ar atmosférico (ESTRABOOK, 1967).

2.5.3.2 Determinação de Metabólitos

Com a finalidade de se verificar a influência do MI-D nos métodos de dosagem, avaliou-se, em experimentos preliminares, a atividade das enzimas lactato desidrogenase e glucose oxidase, havendo-se constatado que a presença do composto mesoiônico não interferia na atividade destas enzimas. Da mesma forma, a absorvância do perfusado foi determinada a 340 nm e 505 nm para verificar uma possível interferência do MI-D no comprimento de onda em que as dosagens seriam efetuadas.

2.5.3.2.1 Determinação de Lactato e piruvato

As dosagens de L-lactato e piruvato foram realizadas enzimaticamente em volume final de 1,2 mL e 1,5 mL, respectivamente, como sugerido por GUTMAN & WAHLEFELD (1974) e CZOC & LAMPRECHT (1974). O sistema de reação para dosagem de L-lactato foi constituído de tampão glicina $0,1\text{mol.L}^{-1}$ - hidrazina $0,4\text{mols.L}^{-1}$, pH 9,5, NAD^+ $1,5 \text{ mmols.L}^{-1}$, e 3U de lactato desidrogenase e 0,2 mL do perfusado. A quantidade de NADH, foi determinada a 340 nm, após 90 minutos de incubação a 37°C .

O piruvato foi dosado em meio de reação contendo: tampão Tris-HCl $0,1\text{mol.L}^{-1}$, pH 7,4, NADH $0,15 \text{ mmols.L}^{-1}$, 0,1U de lactato desidrogenase e 1 mL do perfusado. A quantidade de NADH foi determinada a 340 nm, após 20 minutos de incubação a 37°C . Os valores encontrados foram utilizados para o cálculo da produção de metabólitos pelo órgão.

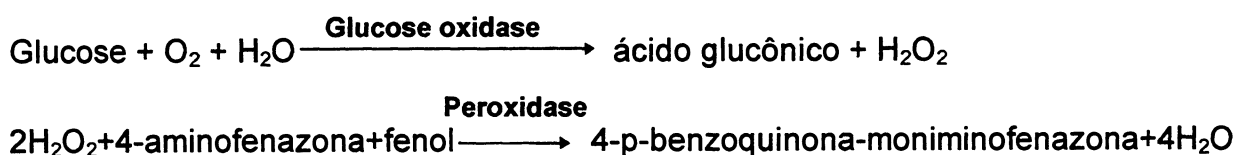
A produção dos metabólitos foi expressa em $\mu\text{mols. min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de fígado, sendo calculada pela fórmula:

$$FL \text{ e } FP = \frac{F \cdot A \cdot D}{6,22 \times 10^3 \cdot P} \quad (\text{equação 2})$$

Nesta fórmula, FL e FP significam, respectivamente, a produção de lactato e piruvato; F representa o fluxo do líquido de perfusão através do órgão; A, a variação da absorvância; D, a diluição da amostra; P, o peso do fígado.

2.5.3.2 Determinação de Glucose

A glucose foi determinada com o uso do KIT Glucose E enzimática - CELM, cujo método utiliza glucose-oxidase, peroxidase e aminofenazona como aceitador de elétrons. O fundamento da técnica está demonstrado nas seguintes reações:



O sistema de incubação foi constituído por 1 mL do meio de reação e 0,2 mL do perfusado ou 0,2 mL da solução padrão de glucose ($0,5 \text{ mmols.L}^{-1}$). Após incubação a 37°C , por 20 minutos, foi determinada a formação da 4-p-benzoquinona-moniminofenazona a 505 nm.

A produção de glucose pelo órgão foi expressa em $\mu\text{mols. min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de fígado, utilizando-se a fórmula:

$$FG = \frac{F \cdot C_p \cdot A_a}{P \cdot A_p} \quad (\text{equação 3})$$

onde FG é a produção de glucose; F é o fluxo do líquido de perfusão através do órgão; C_p , a concentração do padrão; A_a , a variação da absorvância da amostra do perfusado; P, o peso do fígado; A_p , a absorvância do padrão.

2.6 Efeitos do MI-D Sobre o Metabolismo Mitocondrial

Para a avaliação dos efeitos do MI-D sobre os parâmetros do metabolismo mitocondrial, nomeadamente: consumo de oxigênio, potencial de membrana ($\Delta\psi$), inchamento mitocondrial e atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória, foram utilizadas as doses de 12, 15, 25, 38, 50, 65 e 80 nmols do MI-D. mg^{-1} de proteína mitocondrial. Para a realização dos ensaios da atividade do complexo F_1F_0 ATPase foram incluídas, ainda, as concentrações de 160 e 240 nmols. mg^{-1} . de proteína.

Em todas as situações experimentais o MI-D foi incubado por 2 minutos com as preparações mitocondriais, antes do início dos experimentos. Vale ainda ressaltar, que foram realizados controles apenas com o solvente DMSO, nas proporções correspondentes àquelas utilizadas nos ensaios.

2.6.1 Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato

2.6.1.1 Isolamento de Mitocôndrias para Determinação do Consumo de Oxigênio, Potencial de Membrana e Atividade ATPásica.

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por VOSS et al. (1961), com algumas modificações, utilizando-se como meio de extração: D-Manitol 250 mmols.L^{-1} , tampão Hepes 10 mmols.L^{-1} , pH 7,2, EGTA 1 mmol.L^{-1} e BSA 0,1 g%. Para a obtenção das mitocôndrias, os animais foram sacrificados por decapitação. O fígado foi imediatamente retirado e imerso em meio de extração gelado. Após lavado, o órgão foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador van potter elvehjen, usando-se sucessivamente pistilo frouxo e normal. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 320 x g a 4°C em centrífuga Beckman, modelo J-21B, durante 5 minutos, para eliminação de restos de células intactas, membranas e núcleos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante foi centrifugado a 12.600 x g, durante 10 minutos, a 4°C. O precipitado obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspenso, lavado duas vezes em meio de extração por

centrifugação a $8.100 \times g$, durante 10 minutos, a 4°C . As mitocôndrias obtidas, foram ressuspensas em meio de extração à concentração de 50 mg.mL^{-1} .

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

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

2.6.1.3 Obtenção de Mitocôndrias Rompidas, para Avaliação da Atividade dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória.

Mitocôndrias de fígado de rato, isoladas como descrito no item 2.6.1.1, foram congeladas em nitrogênio líquido, por um período mínimo de 24 horas e máximo de 7 dias. As organelas foram rompidas por 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Os fragmentos de membrana obtidos, cujos componentes da cadeia respiratória apresentavam atividade satisfatória, foram utilizados para a realização dos experimentos.

2.7 Métodos Analíticos Envolvendo as Preparações Mitocondriais

2.7.1 Determinação do Consumo de O_2 , Cálculo do Coeficiente de Controle Respiratório (RCC) e Relação ADP/O.

O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas foi monitorado polarograficamente com eletrodo de oxigênio tipo Clark, em oxígrafo Gilson. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,3 mL, sob agitação, em câmara fechada termostaticada, a temperatura de 30°C (VOSS et al., 1963).

O sistema de reação, constituído de: D-Manitol 125 mmols.L⁻¹, tampão Hepes 10mmols.L⁻¹, pH 7,2, KCl 65 mmols.L⁻¹, EGTA 0,1 mmols.L⁻¹ e BSA 0,1g%, foi suplementado com succinato de sódio 2,5 mmols.L⁻¹, rotenona 10 μmols.L⁻¹, K₂HPO₄ 0,8mmols.L⁻¹ e ADP 0,08 mmols.L⁻¹, ou com glutamato de sódio 5mmols.L⁻¹, K₂HPO₄ 1,6mmols.L⁻¹ e ADP 0,16 mmols.L⁻¹, na ausência de rotenona. A quantidade de mitocôndrias utilizada em cada experimento, expressa com relação à concentração de proteínas, foi de 0,5 mg, quando o substrato utilizado foi o succinato de sódio e, de 2,0 mg, quando o glutamato de sódio foi o substrato oxidável.

As velocidades respiratórias foram expressas em nmols de O₂ consumidos.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína, considerando-se que a solubilidade do O₂ na água, a 30°C e 1 atm é de 235μmols.L⁻¹ (ESTABROOK, 1967). A relação ADP:O foi determinada como descrito por CHANCE & WILLIAMS (1955), considerando a concentração de ADP utilizada no sistema e os átomos-grama de oxigênio consumidos durante a respiração na presença de ADP (estado III). O coeficiente de controle respiratório (RCC) foi obtido da razão entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado III) e a velocidade após o consumo de ADP (estado IV).

2.7.2 Determinação da Atividade dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória

A determinação das atividades das enzimas ligadas à cadeia respiratória foi realizada em preparações de mitocôndrias rompidas como descrito no item 2.6.1.3. Os métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos em aparelhos Aminco Chance Dual Wavelength/Split Beam acoplado a registrador ou espectrofotômetro Hitachi, modelo U - 2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300. Em alguns casos a atividade foi determinada polarograficamente através do consumo de O₂, na forma descrita no item anterior.

2.7.2.1 NADH Oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade do complexo NADH oxidase foi determinada espectrofotometricamente como recomendado por SINGER (1974).

O sistema de reação, à temperatura de 28° C, em volume final de 3,0 mL, foi constituído de: tampão fosfato 80 mmols.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 50µmols.L⁻¹, NADH 0,17mmols.L⁻¹ e 300 µg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de NADH, acompanhando-se a velocidade de oxidação da coenzima a 340 nm. Os resultados foram expressos em nmols de NADH oxidado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando-se o coeficiente de extinção molar do NADH de 6.220 mols.L⁻¹ . cm⁻¹.

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

A atividade do complexo NADH-desidrogenase foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por SINGER (1974), que recomenda o uso do ferricianeto como acceptor artificial de elétrons. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 3,0 mL, em sistema de reação constituído de: tampão fosfato 50 mmols.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmols.L⁻¹, NADH 0,17 mmols.L⁻¹, ferricianeto de potássio 0,6mmols.L⁻¹, rotenona 1 µmol.L⁻¹ e 100µg de proteína mitocondrial. A reação foi monitorada a 420 nm e os resultados expressos em micromols de ferricianeto reduzido. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína, considerando-se o coeficiente de extinção molar do ferricianeto de 1.040mols.L⁻¹. cm⁻¹ (CREUTZ & SUTIN, 1973).

2.7.2.3 NADH Citocromo c Redutase (NADH: Citocromo c Óxido Redutase)

A atividade do complexo NADH: citocromo c redutase foi avaliada pelo método descrito por SOMLO (1965), em sistema de reação constituído de: tampão fosfato 50 mmols.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2mmols.L⁻¹, NADH 50 µmols.L⁻¹, citocromo c (oxidado) 40 µmols.L⁻¹, NaCN 1mmols.L⁻¹ e 100µg proteína

mitocondrial . A reação ocorreu a 28° C, em volume final de 1 mL e foi iniciada pela adição de NADH. A velocidade de redução do citocromo c foi acompanhada a 550 nm e o resultado expresso em nmols de citocromo c reduzido. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial, considerando-se a diferença no coeficiente de extinção do citocromo c (red-ox) a 550 nm de 19.000 mols. $\text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (KEYHANI & KEYHANI, 1975).

2.7.2.4 Succinato Oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade do complexo succinato oxidase foi determinada através do registro polarográfico do consumo de O_2 pelo método de SINGER (1974).

O sistema de reação, em volume final de 1,3 mL, foi constituído de tampão fosfato $80 \text{ mmols} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,4, succinato de sódio $10 \text{ mmols} \cdot \text{L}^{-1}$ e 1 mg de proteína mitocondrial. A reação ocorreu a 30° C e foi iniciada pela adição do substrato. Os resultados foram expressos em nmols de oxigênio consumidos. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial, considerando-se a solubilidade do O_2 em água e 1 atm de $235 \mu\text{mols} \cdot \text{L}^{-1}$ a 30°C (ESTABROOK, 1967).

2.7.2.5 Desidrogenase Succínica (Succinato: Fenazina Metasulfato Óxido Redutase)

A atividade da desidrogenase succínica foi determinada pelo método de Singer (1974), utilizando-se DPIP e PMS como aceptores artificiais de elétrons. O sistema de reação em volume final de 1 mL continha tampão fosfato de sódio $50 \text{ mmols} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,4, succinato de sódio $20 \text{ mmols} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCN $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, EDTA $2 \text{ mmols} \cdot \text{L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g}$ de proteína mitocondrial. A mistura foi incubada por 10 minutos a 28°C, tendo-se iniciado a reação pela adição de DPIP $60 \mu\text{mols} \cdot \text{L}^{-1}$ e PMS $1 \text{ mmols} \cdot \text{L}^{-1}$. A velocidade de redução do DPIP foi monitorada a 600nm e os resultados foram expressos em nmols de DPIP

reduzidos.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 19.100mols.L⁻¹.cm⁻¹ para o DPIP reduzido (SINGER, 1974).

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

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

O sistema de reação em volume final de 1 mL foi constituído de: tampão fosfato 50 mmols.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 2 mmols.L⁻¹, NaCN 1 mmols.L⁻¹, succinato de sódio 5 mmols.L⁻¹, rotenona 2 μmols.L⁻¹ e 100 μg de proteína mitocondrial. Os reagentes presentes no sistema foram incubados por 10 minutos a 28° C e a reação iniciada pela adição de 40μmols.L⁻¹ do citocromo c. A redução do citocromo c foi acompanhada a 550 nm e a atividade enzimática foi expressa em nmols de citocromo c reduzido.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando-se a diferença do coeficiente de extinção do citocromo c (red-ox) a 550 nm de 19.000 mols.L⁻¹.cm⁻¹ (KEYHANI & KEYHANI, 1975).

2.7.2.7 Citocromo c Oxidase (Ferrocitocromo c: Oxigênio Óxido-redutase)

2.7.2.7.1 Obtenção do Ferrocitocromo c

Para a obtenção da forma reduzida do citocromo c utilizou-se o ditionito de sódio (Na₂S₂O₈) como agente redutor. O ferrocitocromo c foi separado do excesso de ditionito por cromatografia em coluna de Sephadex G-25 (YONETANI & RAY, 1965). A concentração de citocromo c reduzido foi, então, determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 27.700mols.L⁻¹.cm⁻¹ a 550nm (MARGOLIACH, 1954). O ferrocitocromo preparado através

deste procedimento contém menos de 5% da proteína na forma oxidada e se mantém reduzido durante 24 horas.

2.7.2.7.2 Determinação da Atividade do Complexo Citocromo c Oxidase

A atividade do complexo citocromo c oxidase foi determinada espectrofotometricamente segundo MASON et al. (1973). O sistema de reação foi constituído de: tampão fosfato 50mmols.L⁻¹ pH 7,4, EDTA 2 mmols.L⁻¹, ferrocitocromo c 30 μ mols.L⁻¹ e 100 μ g proteína mitocondrial. A atividade foi expressa em nmols de citocromo c oxidado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando-se a diferença no coeficiente de extinção molar do citocromo c (red-ox) a 550 nm como descrito no item anterior.

2.7.2.8 Determinação da Atividade da F₁F₀ ATPase

2.7.2.8.1 Determinação da Atividade da F₁F₀ ATPase em Mitocôndrias Rompidas

A atividade da ATPase (ATP fosfohidrolase) foi determinada medindo-se a liberação de fosfato inorgânico decorrente da hidrólise do ATP, na presença de um sistema regenerador de ATP, de acordo com o descrito por PULMANN et al. (1960), com algumas modificações.

O ensaio foi realizado a 37°C, em sistema de reação constituído de D-manitol 170 mmols.L⁻¹, Tris-HCl 50 mmols.L⁻¹, pH 7,4, acetato de magnésio 3 mmols.L⁻¹, acetato de potássio 30 mmols.L⁻¹, PEP 1 mmol.L⁻¹, piruvato quinase 4 unidades, lactato desidrogenase 3 unidades, NADH 0,2mmols.L⁻¹, ATP 3 mmols.L⁻¹ e 100 μ g de proteína mitocondrial. A reação em volume final de 1,0 mL foi iniciada com a adição de ATP e os resultados expressos em nmols de fosfato liberado min⁻¹.mg⁻¹ de proteína mitocondrial, considerando que 1 nmol de NADH oxidado corresponde a 1 nmol de fosfato liberado.

2.7.2.8.2 Determinação da Atividade da F_1F_0 ATPase em mitocôndrias intactas

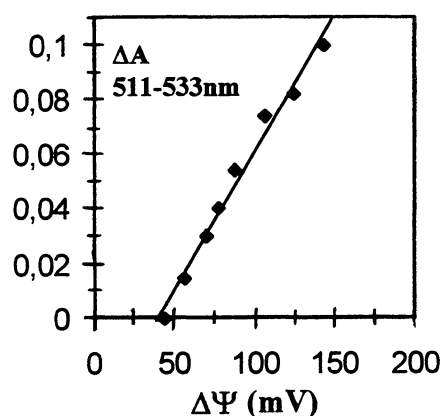
A atividade da F_1F_0 ATPase em mitocôndrias intactas foi determinada na ausência ou presença de $1\mu\text{mols.L}^{-1}$ de FCCP, através do método de PULLMAN et al. (1960), com algumas modificações. O sistema de reação foi constituído de: sacarose 50 mmols.L^{-1} , tampão Tris - HCl 12 mmols.L^{-1} , pH 7,4, KCl 50 mmols.L^{-1} e 3 mg de proteína mitocondrial. O volume de reação foi de 1mL e a temperatura de 30°C .

A reação foi iniciada com a adição de ATP 3 mmols.L^{-1} e mantida sob agitação constante. Após 10 minutos adicionou-se TCA, em concentração final de 5%, com o objetivo de finalizar a reação. Em seguida, centrifugou-se o material a $7.800 \times g$ por 1 min, sendo o fosfato inorgânico presente no sobrenadante dosado segundo o método de SUMNER (1944). Os resultados foram expressos em nmols de fosfato liberado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial.

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

O potencial de membrana ($\Delta\Psi$) foi estimado através da variação de densidade óptica promovida pela captação de Safranina O em mitocôndrias energizadas com glutamato ou succinato de sódio, como descrito por AKERMAN & WIKSTRON (1976). O sistema de reação, em volume final de 3 mL, mantido a 28°C foi constituído de: D - manitol 250 mmols.L^{-1} , tampão Hepes 10 mmols.L^{-1} , pH 7,2, e suplementado com Na_2HPO_4 $0,5\text{ mmols.L}^{-1}$, safranina O $10\mu\text{mols.L}^{-1}$, succinato de sódio 3 mmols.L^{-1} , rotenona $4\mu\text{mols.L}^{-1}$ e 1,5 mg de proteína mitocondrial. Quando o glutamato de sódio (6 mmols.L^{-1}) foi utilizado como substrato, a rotenona foi omitida. As variações na absorvância a 511-533 nm foram registradas em espectrofotômetro Aminco Chance Dual Wavelength/Split Beam acoplado a registrador.

Para determinar o $\Delta\psi$ em cada caso experimental, foram previamente elaboradas curvas de calibração conforme exemplificado na figura 19, onde mediu-se o potencial de membrana desenvolvido pela difusão de K^+ na presença de valinomicina ($0,12 \text{ mmols.L}^{-1}$), de acordo com a metodologia descrita por AKERMAN & WIKSTRON (1976). O potencial foi calculado utilizando-se a equação de Nerst (equação 4), considerando o K^+ (in) 120 mmols.L^{-1} , conforme ROSSI & AZZONE (1969) .



Equação de Nerst: (equação 4)

$$\Delta\psi = 60 \log \frac{K^+ (\text{in})}{K^+ (\text{out})}, \text{ onde } K^+ (\text{in}) = 120 \text{ mmols.L}^{-1}$$

Figura 19. Curva de Calibração para cálculo do Potencial de Membrana ($\Delta\psi$).

Substrato: Succinato de Sódio. As mudanças espectrais da Safranina O, expressas como ΔA , estão relacionadas ao potencial de difusão de K^+ (mV). Coeficiente de correlação da curva de 0,98.

2.7.4 Determinação do Inchamento Mitocondrial (Swelling)

Os experimentos visando determinar o inchamento mitocondrial foram desenvolvidos em aparelhos Aminco Chance Dual Wavelength/Split Beam acoplado a registrador ou espectrofotômetro Hitachi, modelo U - 2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300, no comprimento de onda de 546 nm.

2.7.4.1 Determinação do Inchamento em Mitocôndrias Energizadas

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

2.7.4.2 Determinação do Inchamento em Mitocôndria Desenergizadas

2.7.4.2.1 Determinação do Inchamento na Presença de Valinomicina e K⁺

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

2.7.4.2.2 Determinação do Inchamento na Presença de Nigericina e K^+

O inchamento mitocondrial devido à entrada passiva de K^+ na matriz, foi acompanhado espectrofotometricamente, na ausência de substrato oxidável, a temperatura de 28°C (MORENO & MADEIRA, 1990). O meio de reação em volume final de 3 mL continha: KNO_3 135 mmols.L⁻¹, tampão Hepes 5 mmols.L⁻¹, pH 7,4, EDTA 0,1 mmol.L⁻¹, antimicina A 2 µg, rotenona 4µmols.L⁻¹, nigericina 2 µg e 1 mg de proteína mitocondrial.

2.8 Efeitos do MI-D Sobre Membranas Sintéticas e Naturais

2.8.1 Preparo dos Liposomas

2.8.1.1 Liposomas de Dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC)

Os liposomas foram preparados como recomendado por ANTUNES-MADEIRA et al. (1980), utilizando DMPC em concentração final de 345 µmols/L⁻¹. O fosfolípídeo foi dissolvido em clorofórmio e o solvente foi evaporado, até a secura, em evaporador rotatório, a 25°C. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com tampão Tris - maleato 10 mmols.L⁻¹, pH 7, KCl 50 mmols.L⁻¹ e disperso por agitação manual, em banho a 30°C, isto é, 7°C acima da temperatura de transição do fosfolípídeo. A amostra foi agitada vigorosamente durante 1 minuto e então submetida a ultrasonicação suave, utilizando-se banho de sonicação THORTON T 7. O tempo de ultrasonicação foi controlado pela turbidez da suspensão, medida a 600nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U 2001 UV/VIS. A sonicação foi interrompida quando atingido o valor aproximado de 0,2 em absorbância. Os liposomas preparados nestas condições são multilamelares (ANTUNES-MADEIRA et al., 1995).

2.8.1.2 Liposomas de Membrana Natural

Para a preparação dos liposomas de membrana natural utilizou-se a metodologia recomendada por ANTUNES-MADEIRA (1989). As mitocôndrias

de fígado de rato foram isoladas pelo método VOSS et al. (1961), em meio de extração constituído de sacarose 250 mmols.L⁻¹, Tris-HCl 10 mmols.L⁻¹, pH 7,4. Retirou-se da suspensão mitocondrial obtida, uma pequena amostra para a determinação de fosfato inorgânico (FISKE & SUBBAROW, 1925). Esta amostra foi submetida a hidrólise em ácido perclórico por 2 horas a 180 °C. Imediatamente após a retirada da amostra para a dosagem de fosfato, a suspensão mitocondrial foi congelada em nitrogênio líquido e assim conservada até sua utilização. Para o preparo das membranas naturais as mitocôndrias foram descongeladas, suspensas em volume adequado de tampão Tris-Maleato 10 mmols.L⁻¹, pH 7, KCl 50 mmols.L⁻¹, ao qual se adicionou PMSF 10 μmols.L⁻¹, como inibidor de proteases. A concentração de fosfolípidos foi mantida em 345 μmols.L⁻¹. Esta suspensão foi agitada vigorosamente durante 1 minuto e submetida a ultrasonicação suave, nas mesmas condições já descritas para o preparo dos liposomas de DMPC.

2.8.2 Incorporação das Sondas aos Liposomas

Foram utilizadas duas sondas o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), que se localiza no interior hidrofóbico da membrana, e o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno-ácido propiônico (DPH-PA), que permanece ancorado à superfície da membrana. O DPH e o DPH-PA foram solubilizados em tetrahydrofurano e dimetilformamida, respectivamente (LENTZ et al., 1976; TROTTER & STORCH, 1989).

Alíquotas de soluções concentradas de sonda foram incorporadas, sob agitação vigorosa em vórtex, nas suspensões de liposomas previamente aquecidas a 30°C. A concentração final de sonda e o quociente sonda/lípido foram de 1,73 μmols.L⁻¹ e 1/200, respectivamente, tanto na situação de uso do DPH quanto do DPH-PA.

No caso dos liposomas de DMPC, o MI-D, nas concentrações de 5 μmols.L⁻¹ e 15 μmols.L⁻¹, foi adicionado à preparação logo após a adição das sondas fluorescentes. Já para os liposomas de membrana natural, o composto,

nas concentrações de $5\mu\text{mols.L}^{-1}$ e $25\mu\text{mols.L}^{-1}$, foi adicionado duas horas após à adição das sondas.

As preparações de liposomas foram incubadas no escuro, durante aproximadamente 18 horas, em temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para os liposomas de DMPC e de 4°C para os liposomas de membrana natural. Ambas as sondas incorporam-se rapidamente às membranas dos liposomas multilamelares, atingindo intensidade de fluorescência constante ao fim de 90 minutos de incubação (LENTZ et al., 1976).

Foram elaborados controles para cada situação experimental. Para cada amostra (suspensão de membranas contendo sonda), foi preparado um controle branco (sem sonda), contendo o volume correspondente dos solventes que foram utilizados para dissolver as sondas (tetrahydrofurano ou dimetilformamida). Este controle, que sofreu tratamento igual ao da amostra, foi utilizado na correção das medições fluorimétricas, para deduzir a interferência da luz dispersa pelas partículas em suspensão ("light scattering"). Controles referentes ao DMSO, solvente do MI-D, também foram realizados, nas mesmas condições.

2.8.3 Determinações Fluorimétricas

As medições fluorimétricas foram efetuadas em espectrofotofluorometro AMINCO (American Instruments Company), modelo SPF - 125, equipado com banho de circulação PHARMACIA, com controle de temperatura de $0,1^{\circ}\text{C}$.

Para as medições de polarização de fluorescência (P) foram montados dois polarizadores Polaroid: um, entre a amostra e o monocromador de excitação, para interceptar o feixe de excitação; outro, entre a amostra e o monocromador de emissão, para interceptar o feixe de emissão (analisador). A polarização de fluorescência foi determinada de acordo com o procedimento ilustrado na figura 20.

A amostra foi excitada pelo componente vertical da luz monocromática e foram medidas as intensidades da luz emitida quando o analisador estava orientado paralela ($I_{||}$) e perpendicularmente (I_{\perp}) à direção de polarização da luz da excitação. As direções de polarização de $I_{||}$ e I_{\perp} foram, respectivamente, as dos eixos Z e dos X, como o ilustrado na figura 20. O índice de polarização de fluorescência foi, então, calculado como recomendado por LITMAN & BARENHOLZ (1982), pelo quociente descrito na equação 5:

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} \quad (\text{equação 5})$$

Considerando que a intensidade de $I_{||}$ e I_{\perp} foi medida depois de o feixe de luz atravessar a rede de difração do monocromador de emissão, onde ocorre dispersão e alteração da polarização, a dispersão da luz, dependente do comprimento de onda, resulta em transmissão desigual dos dois componentes da luz polarizada. Assim, foi necessário introduzir ainda um fator de correção nesta equação. A correção matemática desta distorção instrumental foi feita conforme recomendado por TOPLAK et al. (1990), introduzindo-se na equação anterior o fator:

$$G = \frac{I_{\perp}^*}{I_{||}^*} \quad (\text{equação 6})$$

em que I_{\perp}^* e $I_{||}^*$ correspondem às intensidades dos componentes vertical e horizontal da luz emitida quando o polarizador está orientado horizontalmente. A amostra excitada com o componente horizontal da luz proveniente do monocromador de excitação deveria produzir idênticos componentes vertical e horizontal da luz emitida, porque as probabilidades de reorientação das moléculas excitadas, durante o tempo de vida da excitação, são idênticas em todas as direções horizontal e vertical. A diferença dos componentes vertical e horizontal, depois de atravessarem o monocromador de emissão, deve-se à dispersão e, portanto, transmissão desigual desses componentes. O valor corrigido do índice de polarização visualizado na equação 7, é:

$$P = \frac{I_{||} - G \cdot I_{\perp}}{I_{||} + G \cdot I_{\perp}} \quad (\text{equação 7})$$

Finalmente, deve-se salientar que a interferência da dispersão da luz pelas partículas em suspensão da amostra foi descontada de todas as intensidades de fluorescência medidas ($I_{||}$, I_{\perp} , I_{\perp}^* e $I_{||}^*$) subtraindo-se-lhes as correspondentes intensidades de luz emitida por um controle branco (sem sonda), nas mesmas condições da amostra. Assim, para cada amostra, a determinação do índice de polarização exigiu 8 leituras independentes da quantidade de luz emitida nas diversas condições (LITMAN & BARENHOLZ, 1982)

As medições de polarização de fluorescência foram realizadas selecionando 365 nm para o comprimento de onda de excitação e 450 nm para o comprimento de emissão (LITMAN & BARENHOLZ, 1982; TROTTER & STORCH, 1989). As fendas de excitação e emissão foram selecionadas em 4 nm. Para cada preparação os valores de polarização foram determinados no intervalo de 10°C a 40°C, variando-se a temperatura a cada 1°C ou 2 °C. As temperaturas foram medidas com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ utilizando-se termômetro digital Minipa, modelo APPA -MT 510.

2.8.4 Determinação da Temperatura Média de Transição de Fase (T_m).

Para determinação da temperatura média de transição de fase (T_m), a curva de polarização foi decomposta em três segmentos lineares e a T_m foi considerada como o ponto médio da projeção vertical do segmento com a maior inclinação. A temperatura média de transição foi estimada, ainda, graficamente, pela razão $\Delta P/\Delta T$ em função da temperatura.

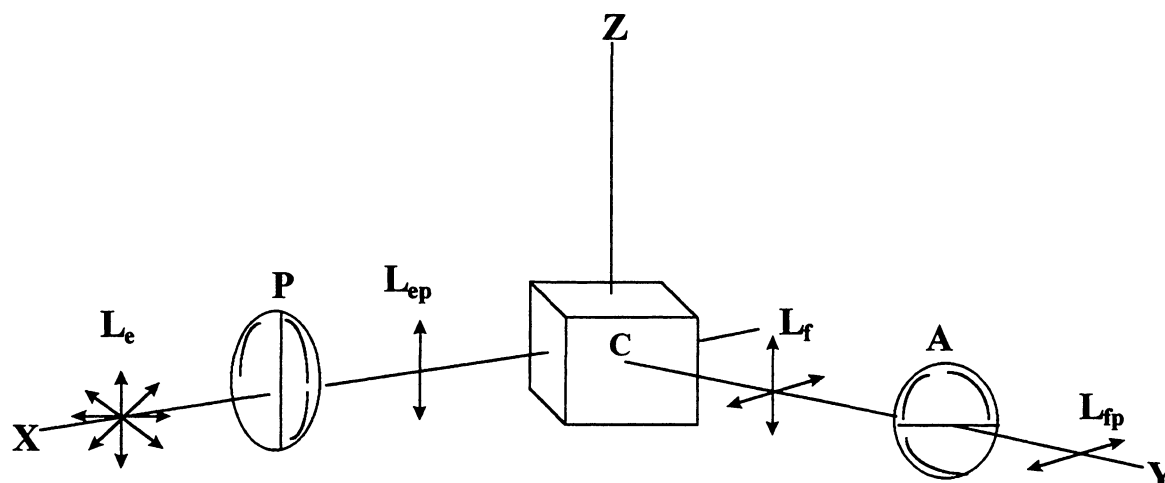


FIGURA 20. Representação Esquemática das Medições de Polarização de Fluorescência (P). A luz monocromática de excitação (L_e) ao passar pelo polarizador (P), orientado na vertical, dá lugar a um componente vertical de luz polarizada (L_{ep}) que excita a amostra contida na célula C. A luz emitida (L_f) ao passar pelo analisador (A) dá lugar a componentes da luz polarizada (L_{fp}), $I_{||}$ ou I_{\perp} conforme o analisador estiver colocado paralelamente ou a 90° à direção de polarização da luz de excitação.

No processo, são preferencialmente excitadas as moléculas da amostra que se encontram alinhadas com o vetor eletromagnético do feixe polarizado de excitação. Estas moléculas, devido a difusão, vão depois orientar-se em várias direções no período de tempo do estado excitado e, por isso, é possível detectar na emissão componentes polarizados paralelamente, ($I_{||}$) e perpendicularmente (I_{\perp}) à excitação. Isto é, as moléculas excitadas vão reorientar-se em todas as direções do espaço e, assim, a fluorescência emitida é depolarizada. O grau de polarização reflete-se no decréscimo de I_{\perp} e aumento de $I_{||}$. (Adaptado de VAN HOLDE, 1975)

2.9 Efeitos do MI-D em Células Cultivadas

2.9.1 Procedimentos de Cultivo de Células HeLa e L1210

Todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular, foram realizadas em capela de fluxo laminar vertical (VECO).

O material de vidro usado nas culturas foi esterilizado a seco, a 180°C, por 6 horas. Rolhas e tampas foram esterilizadas em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por trinta minutos, e depois secos em estufa a 37°C .

2.9.2 Meio de Crescimento

Foi utilizado o meio essencial mínimo de Eagle disponível em forma de pó reconstituível. Após reconstituição em água bidestilada, o meio foi esterilizado por filtração como descrito no item anterior. Para o crescimento das células HeLa e L1210 o meio de Eagle foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) e bicarbonato de sódio (7,5%) em quantidade suficiente para ajustar o pH em 7,4. O crescimento ocorreu a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 72 horas e 48 horas, para as células HeLa e L1210, respectivamente. Decorrido este tempo, as células foram coletadas e/ou subcultivadas. No caso das células L1210 o crescimento ocorreu em atmosfera de 5% de CO₂ em estufa SANYO, modelo MCO - 17A. O crescimento das células foi acompanhado por observação em microscópio invertido OLYMPUS, mod. CK 2.

2.9.3 Subculturas (Repiques)

Os repiques das células HeLa foram feitos a cada 72 horas de crescimento, levando-se em consideração o grau de confluência das células. Após a remoção do meio de cultivo, as culturas foram lavadas com 5 mL de solução salina tamponada, para a remoção do meio residual, adicionando-se em seguida 5 mL da solução de tripsina (STV) pré-aquecida a 37°C. A tripsinização foi realizada por aproximadamente 3 minutos. Na seqüência, a

solução dispersante foi cuidadosamente removida, sendo adicionada quantidade adequada de meio de cultivo. O descolamento das células da superfície das garrafas foi realizado com auxílio de uma pipeta equipada com pera. A suspensão resultante foi distribuída em novas garrafas de Roux na concentração de aproximadamente 2×10^6 células por garrafa, completando-se o volume para 100 mL com meio de crescimento.

No caso das células L1210, crescidas em suspensão, os repiques foram feitos por diluição na proporção de 1:3 da cultura inicial.

2.9.4 Coleta e Obtenção da Suspensão de Células

A coleta das células HeLa foi feita por tripsinização ou por raspagem com auxílio de borracha macia ("rubber policeman"), conforme a necessidade do experimento. Na seqüência, as células foram lavadas por três vezes em PBS e suspensas no mesmo meio.

A coleta das células L1210 foi realizada a 4°C por centrifugação a 320 x g, por 5 min. Em seguida as células foram lavadas por três vezes também por centrifugação a 320 x g, em PBS, e finalmente suspensas nesta mesma solução.

2.9.5 Contagem

Células colhidas foram suspensas em solução salina tamponada e quantificadas utilizando-se hemocitômetro NEUBAUER de duas câmaras com auxílio de microscópio OLYMPUS.

2.9.6 Determinação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada pela técnica de exclusão do corante azul de tripan, de acordo com PHILLIPS (1973). Esta técnica baseia-

se no fato de que células viáveis, nas quais a integridade da membrana celular é preservada, mantém a habilidade de excluir o corante; enquanto células não viáveis permitem a entrada do azul de tripan, apresentando-se coradas quando observadas ao microscópio óptico.

O azul de tripan foi preparado a 0,4% (p/v) em solução salina tamponada. Para cada mL da suspensão celular, utilizou-se 0,1 mL da solução do corante, efetuando-se a contagem das células em no máximo 4 minutos após a adição do corante. A porcentagem de células viáveis foi calculada usando-se a relação mostrada na equação 8:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{células não coradas}}{\text{células coradas} + \text{células não coradas}} \times 100 \text{ (equação 8)}$$

2.9.7 Determinação Consumo de Oxigênio por Células HeLa e Células L1210

A velocidade do consumo de oxigênio por células HeLa e células L1210 energizadas com succinato de sódio foi determinada polarograficamente em oxígrafo Gilson. O sistema de reação constituído de Na_2HPO_4 8 mmols.L⁻¹, NaCl 136 mmols.L⁻¹, KH_2PO_4 1,46 mmols.L⁻¹, pH 7,4, foi suplementado com succinato de sódio 10 mmols.L⁻¹ e ADP 0,8 mmols.L⁻¹. A quantidade de células presentes nos experimentos foi fixada em 1×10^6 em volume final de 1,3 mL. As células foram incubadas por 2 min na ausência ou presença de MI-D, na concentração de 60 $\mu\text{mols.L}^{-1}$. Após esse tempo, adicionou-se 8 μg de digitonina. O experimento foi realizado à temperatura de 28°C e o consumo de oxigênio foi expresso em nmols de oxigênio consumidos por minuto por 10^6 células, considerando a solubilidade do oxigênio em água, a 1 atm, nesta temperatura, como sendo de 250 $\mu\text{mols.L}^{-1}$ (ESTRABOOK,1967). Controles

com quantidades correspondentes do solvente DMSO também foram realizados.

2.9.8 Determinação da Produção de Lactato e Piruvato por Células L1210

Células L1210 crescidas por 48 horas, foram suspensas em solução PBS e incubadas a temperatura ambiente, sob agitação. Após 2 minutos de incubação das células com o MI-D ($60 \mu\text{mols.L}^{-1}$), foi adicionada ao sistema α -D-glucose 5mmols.L^{-1} . Alíquotas coletadas aos tempos de 0, 2, 4, 10, 20 e 40 minutos foram imediatamente centrifugadas a $7.800 \times g$ por 1 minuto em centrífuga Microcentaur - Sanyo. No sobrenadante foram dosados L- lactato e piruvato segundo descrito por GUTMAN & WAHLEFELD (1974) ; CZOC & LAMPRECHT (1974). O sistema para dosagem do lactato, em volume final de 1 mL, continha tampão glicina $0,1\text{mol.L}^{-1}$ - hidrazina $0,4\text{mols.L}^{-1}$, pH 9,5, NAD^+ $1,5 \text{ mmols.L}^{-1}$, e 3U de lactato desidrogenase e quantidades adequadas da amostra. A quantidade de NADH formada foi determinada a 340 nm, após 90 minutos de incubação a 37°C .

O piruvato foi dosado em volume final de 1 mL, em meio de reação contendo tampão Tris-HCl $0,1\text{mol.L}^{-1}$, pH 7,4, NADH $0,15 \text{ mmols.L}^{-1}$, 0,1U de lactato desidrogenase e quantidades adequadas da amostra. A quantidade de NADH oxidado foi determinada a 340 nm, após 20 minutos de incubação a 37°C .

2.9.9 Efeitos do MI-D Sobre a Morfologia e Ultra-Estrutura de Células HeLa

Monocamadas de células HeLa crescidas durante 48 horas em lamínulas de vidro ou frascos de Roux, foram incubadas, a 25°C , na presença de $25 \mu\text{mols.L}^{-1}$ de MI-D diluído em solução salina tamponada, durante 90 minutos. Decorrido o tempo de incubação, a solução foi desprezada e as

células crescidas em lamínula foram processadas para microscopia óptica, enquanto as crescidas em garrafa foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T). Para a microscopia óptica a monocamada de células foi fixada em solução de BOUIN (formaldeído 4% v/v: ácido pícrico saturado:ácido acético, 4:15:1) por 5 minutos, a temperatura ambiente, desidratada com etanol a 70% e corada com Hematoxilina-Eosina. A morfologia das células HeLa tratadas com o MI-D foi observada em microscópio OLYMPUS. Para a M.E.T a monocamada foi fixada durante 120 minutos em solução constituída de glutaraldeído 2,5% (v/v), paraformaldeído 4% (p/v), CaCl_2 5 mmols.L⁻¹, tampão cacodilato 100 mmols.L⁻¹, pH 7,2. A seguir, as células foram lavadas com tampão cacodilato 100 mmols.L⁻¹, pH 7,2, gentilmente raspadas, colhidas por centrifugação (70xg, 3 min). Após centrifugação, as células foram fixadas durante 60 minutos em tetróxido de ósmio a 1,0% (p/v) e ferricianeto de potássio 0,8% (p/v) em solução tampão cacodilato 100 mmols.L⁻¹ pH 7,2, suplementado com CaCl_2 2,5 mmols.L⁻¹ (BUCHI & SOUZA, 1992). Após desidratação em acetona, o material foi incluso em resina epon. Os blocos foram cortados em ultramicrotomo e os efeitos do MI-D sobre a organização ultraestrutural de células HeLa foram avaliados através de microscopia eletrônica de transmissão em Microscópio JEOL-JEM 1200 EXII, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. A preparação do material e análise por microscopia eletrônica foram realizadas com a colaboração da Professora Doutora DORLY F. BUCHI, do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, da UFPR.

2.9.10 Avaliação dos Efeitos do MI-D como Agente Indutor de Morte Celular por Apoptose em Células HeLa

A detecção da apoptose em células HeLa foi realizada com o uso do Kit APOP TAG[®] PLUS - ONCOR. A metodologia empregada é descrita na literatura como ensaio TUNEL (GAVRIELI et al., 1992). Esta técnica, tem como fundamento a marcação e extensão das extremidade 3'-OH de fitas únicas ou

duplas do DNA fragmentado, durante o processo apoptótico, através da adição de resíduos de nucleotídeos ligados a digoxigenina. Estes nucleotídeos são cataliticamente adicionados ao DNA pela enzima deoxinucleotidil transferase terminal (TdT), enzima que catalisa a adição de nucleotídeos trifosfato as extremidades 3'-OH do DNA. Em seguida à marcação, é adicionado um anticorpo anti-digoxigenina, ligado a enzima peroxidase. A peroxidase localizada gera um intenso sinal quando em contato com o substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB), evidenciando assim as células apoptóticas .

Para a realização dos experimentos visando avaliar a apoptose, as culturas de células HeLa desenvolveram-se por 48 horas em lamínulas de vidro, acondicionadas em placas de cultura de múltiplos poços, nas condições já descritas. A monocamada de células foi lavada com PBS, e incubada com o MI-D, diluído em salina tamponada, na concentração final de $25\mu\text{mols.L}^{-1}$, a temperatura de 25 °C, por 90 min. Após o tratamento com o composto mesoiônico, a monocamada foi lavada com PBS, fixada com paraformaldeído 1% (p/v) em PBS por 10 minutos e tratada com proteinase K $20\mu\text{g.mL}^{-1}$. As etapas posteriores do processamento seguiram as recomendações do fabricante do KIT, ressaltando-se, apenas, que o tempo ideal de incubação com o DAB, requerido à revelação das células apoptóticas, foi estabelecido por observação ao microscópio óptico. A monocamada de células foi, então, corada com verde de metila 1% (p/v) em acetato de sódio $0,1\text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,0.

2.10 Determinação da Concentração de Proteínas

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

2.11 Análise Estatística

Com exceção dos resultados dos experimentos de perfusão de fígado, os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (média \pm dp), submetendo-se à análise de variância (fator duplo) e teste de Tukey, para a comparação das médias. Os resultados dos experimentos de perfusão de fígado, foram expressos como média \pm erro padrão da média (média \pm ep da média), sujeitando-se à análise de variância (fator único) e teste de Tukey para comparação da médias. Nos dois casos, foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p \leq 0,05$.

No tocante aos experimentos de polarização de fluorescência correspondentes às membranas naturais, os resultados foram submetidos a análise de regressão linear, analisando-se os coeficientes de correlação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeitos do MI-D em Fígado Perfundido

Como demonstrado por GRYNBERG et al. (1997), o MI-D exerce importante efeito antitumoral em animais portadores de sarcoma 180, apresentando uma baixa toxicidade hematológica. Estas importantes observações, somadas à hepatotoxicidade que pode ser ocasionada por xenobióticos, pela sua biotransformação e/ou acumulação (KULKARNI & BYAZKOWSKI, 1994), conduziu a uma avaliação dos efeitos do MI-D sobre atividades essenciais deste órgão. Desta forma, os experimentos cujos resultados são descritos a seguir, foram desenvolvidos com a finalidade de se detectar possíveis reações adversas do MI-D sobre fígado intacto.

As figuras 21 e 22 e tabelas 3 e 4, mostram o efeito do MI-D quando perfundido nas concentrações de $5 \mu\text{mols.L}^{-1}$ e $25 \mu\text{mols.L}^{-1}$, em fígado de rato alimentado. Como não foram adicionados substratos ao meio de perfusão, as atividades metabólicas do órgão foram mantidas através da mobilização de substratos endógenos, tais como glicogênio e ácidos graxos. Nestes experimentos, em que se analisou o consumo de oxigênio, a glicogenólise e a glicólise, o MI-D foi infundido por um período de 24 minutos, dos 10 aos 34 minutos do experimento de perfusão, que teve a duração total de 54 minutos.

Verifica-se na figura 21 e tabela 3 que o MI-D, na concentração de $5 \mu\text{mols.L}^{-1}$, causou apenas discretos efeitos sobre o consumo de oxigênio, sendo as oscilações observadas não significativas estatisticamente. Entretanto, destaca-se que o pequeno estímulo no consumo de oxigênio (8%), observado no início da infusão do composto mesoiônico, aos 18 minutos do experimento, foi reproduzível em todos experimentos realizados. Na figura 21 verifica-se também que a liberação de glucose de $1,26 \mu\text{mols.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$, no início do experimento, permaneceu praticamente inalterada durante todo o período de infusão do MI-D. Porém, curiosamente, após o término da infusão do composto, os níveis de glucose começaram a aumentar, atingindo valores 23% superiores ($1,55 \mu\text{mols.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$) aos iniciais. Quanto à produção de

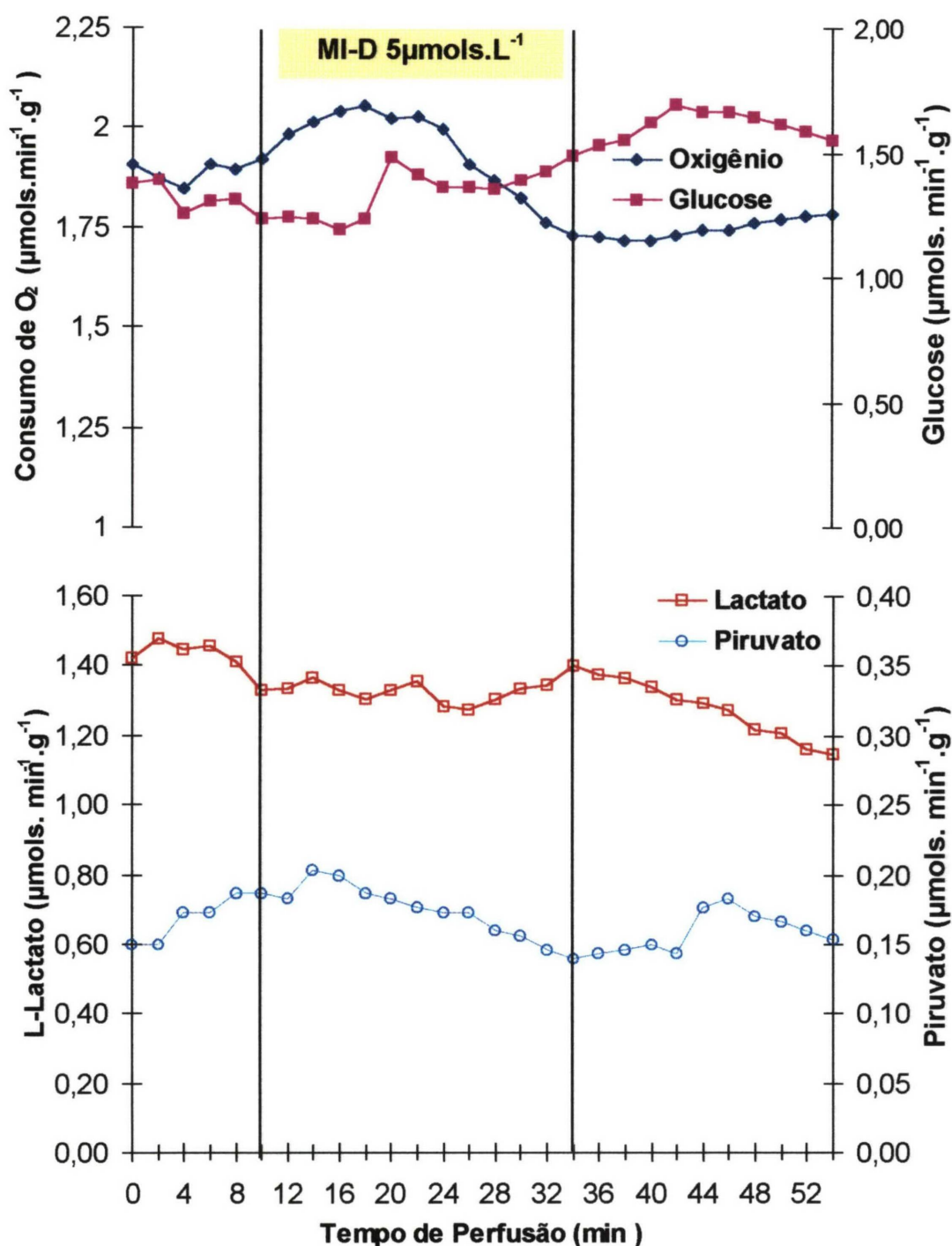


FIGURA 21. Efeitos do MI-D ($5\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre o consumo de oxigênio, glicogenólise, produção de lactato e piruvato, em fígado de rato perfundido isoladamente. Fígados de ratos alimentados foram perfundidos isoladamente como o descrito em Materiais e Métodos, item 2.5.2. O MI-D na concentração de $5\mu\text{mols.L}^{-1}$ foi infundido no intervalo de 10 a 34 minutos do experimento de perfusão. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.

lactato e piruvato, os efeitos foram caracterizados por uma diminuição de 20% na produção de lactato em relação aos momentos iniciais do experimento, sem alteração no perfil da produção de piruvato (figura 21, tabela 3).

Comparando-se estes resultados com aqueles mostrados na figura 22 e tabela 4, obtidos pela infusão de $25 \mu\text{mols.L}^{-1}$ de MI-D, pode-se verificar, nestes últimos, um efeito mais intenso do composto mesoiônico sobre o consumo de oxigênio. Com a infusão do MI-D, o consumo de oxigênio, diminuiu de $1,81 \mu\text{mols.min}^{-1}\text{.g}^{-1}$, para $1,14 \mu\text{mols.min}^{-1}\text{.g}^{-1}$ ou seja, ocorreu um decréscimo de 37%. Este efeito pode ser caracterizado como irreversível (uma vez que persistiu após o término da infusão do composto), e dependente da concentração do MI-D. A figura 22 e tabela 4 mostram, ainda, que a infusão de MI-D, na dose de $25 \mu\text{mols.L}^{-1}$, exerceu um efeito pronunciado sobre a glicogenólise. Os níveis de glucose, que no início do experimento eram de $1,14 \mu\text{mols.min}^{-1}\text{.g}^{-1}$, aumentaram consideravelmente após a infusão do MI-D, chegando a valores de $2,2 \mu\text{mols.min}^{-1}\text{.g}^{-1}$ ao final do experimento. Este estímulo, de 100%, foi irreversível, permanecendo os valores elevados após o término da infusão do MI-D. Vale ressaltar que, como os experimentos de perfusão foram realizados em sistema não recirculante, não ocorre o acúmulo de metabólitos (KIMMIG et al., 1983). Em razão disto, toda a glucose liberada pelo órgão é proveniente do glicogênio. A produção de lactato e piruvato, em contraste ao observado para a concentração de $5 \mu\text{mols.L}^{-1}$ de MI-D, foi significativamente afetada pela presença de $25 \mu\text{mols.L}^{-1}$ do composto mesoiônico. Os resultados da figura 22 e tabela 4 para estes metabólitos mostram que nos primeiros minutos do experimento a produção de lactato era $1,39 \mu\text{mols.min}^{-1}\text{.g}^{-1}$. Aos 26 min do experimento, tal valor diminuiu para $0,92 \mu\text{mols.min}^{-1}\text{.g}^{-1}$, ou seja, caiu a valores 34% inferiores aos iniciais. Terminada a infusão do composto, os níveis de lactato aumentaram, sem retornarem, no entanto, aos valores iniciais, persistindo uma diminuição de 19% ($1,13 \mu\text{mols.min}^{-1}\text{.g}^{-1}$). Quanto à produção de piruvato, a infusão do MI-D provocou uma diminuição na liberação deste metabólito, na ordem de 50%, vez que os valores iniciais de $0,23 \mu\text{mols.min}^{-1}\text{.g}^{-1}$ caíram para $0,11 \mu\text{mols.min}^{-1}\text{.g}^{-1}$ aos 16

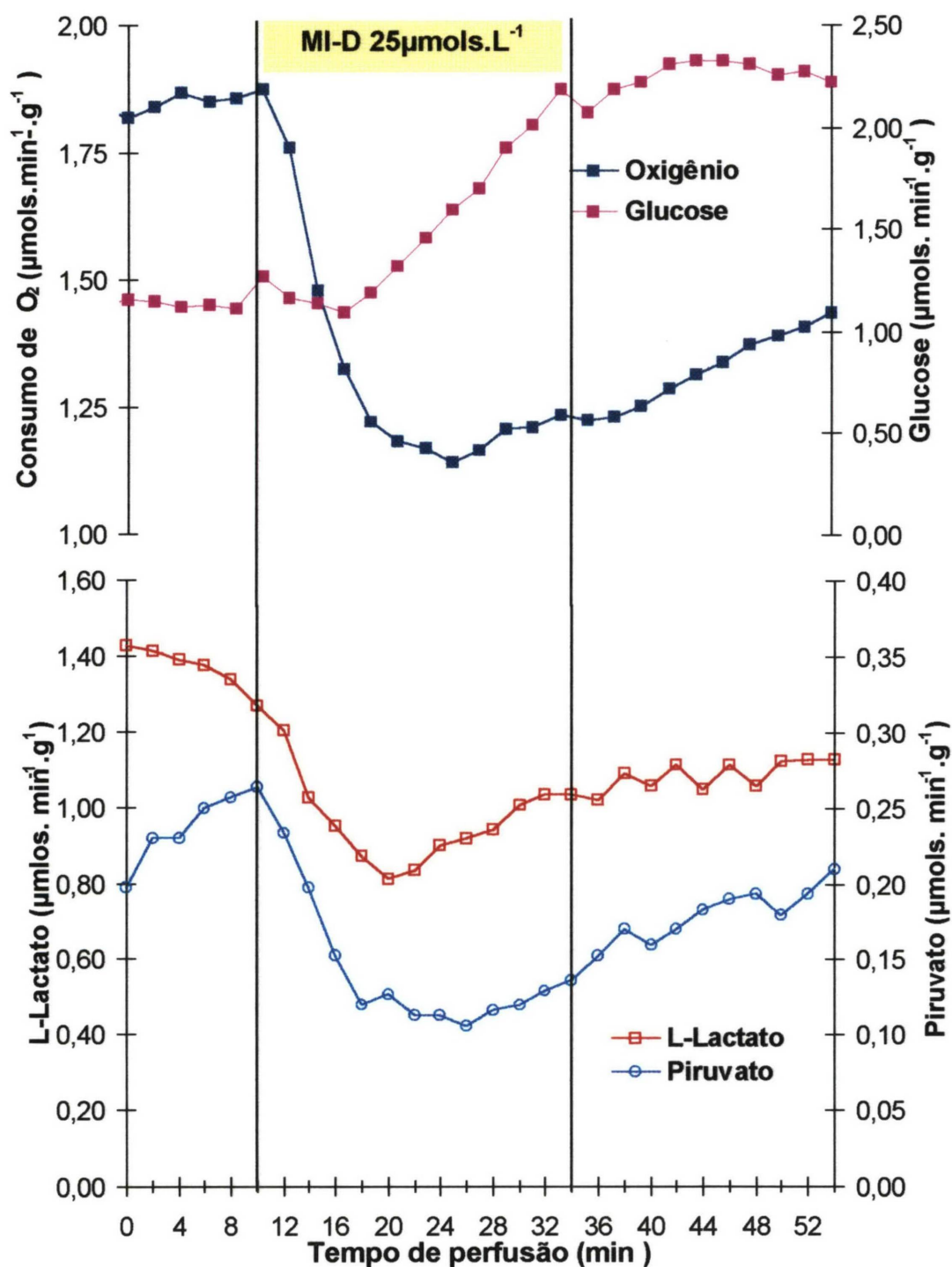


FIGURA 22. Efeitos do MI-D ($25\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre o consumo de oxigênio, glicogenólise, produção de lactato e piruvato, em de fígado de rato perfundido isoladamente. Fígados de ratos alimentados foram perfundidos isoladamente como o descrito em Materiais e Métodos, item 2.5.2. O MI-D na concentração de $25\mu\text{mols.L}^{-1}$ foi infundido no intervalo de 10 a 34 minutos do experimento de perfusão. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.

TABELA 3. Efeitos do MI-D ($5\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre o consumo de oxigênio, glicogenólise, produção de lactato e piruvato, glicólise e razão lactato piruvato (NAD^+/NADH) em fígado de rato perfundido isoladamente.

	Basal (4 min)	Infusão de MI-D $5\mu\text{mols.L}^{-1}$ (26 min)	Após infusão de MI-D (54 min)
Consumo de oxigênio ($\mu\text{mols}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	1,85 ± 0,09	1,91 ± 0,18	1,79 ± 0,09
Glucose ($\mu\text{mols}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	1,26 ± 0,12	1,36 ± 0,11	1,55 ± 0,13
L- Lactato ($\mu\text{mols}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	1,45 ± 0,19	1,29 ± 0,16	1,15 ± 0,28
Piruvato ($\mu\text{mols}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,15 ± 0,02
Glicólise (lactato+piruvato) ($\mu\text{mols}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	1,6 ± 0,17	1,45 ± 0,14	1,31 ± 0,28
Razão lactato/piruvato	9,0 ± 2,1	7,9 ± 1,9	6,9 ± 1,04

Fígados de ratos alimentados foram perfundidos isoladamente como o descrito em Materiais e Métodos, item 2.5.2. O MI-D na concentração de $5\mu\text{mols.L}^{-1}$ foi infundido no intervalo de 10 a 34 minutos do experimento de perfusão. Os valores representam a média ± ep da média de 3 experimentos independentes. Não há diferença entre as médias ($p \leq 0,05$) nas condições do ensaio.

TABELA 4. Efeitos do MI-D ($25\mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre o consumo de oxigênio, glicogenólise, produção de lactato e piruvato, glicólise e razão lactato piruvato (NAD^+/NADH) em fígado de rato perfundido isoladamente.

	Basal (4 min)	Infusão de MI-D $25\mu\text{mols.L}^{-1}$ (26 min)	Após infusão de MI-D (54 min)
Consumo de oxigênio ($\mu\text{mols}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	1,81 ± 0,08	*1,14 ± 0,08	1,41 ± 0,17
Glucose ($\mu\text{mols}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	1,14 ± 0,03	1,60 ± 0,16	*2,22 ± 0,25
L-Lactato ($\mu\text{mols}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	1,39 ± 0,24	0,92 ± 0,2	1,13 ± 0,27
Piruvato ($\mu\text{mols}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	0,23 ± 0,02	*0,11 ± 0,02	0,21 ± 0,04
Glicólise (lactato+piruvato) ($\mu\text{mols}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	1,58 ± 0,18	1,02 ± 0,3	1,34 ± 0,3
Razão lactato/piruvato	6,0 ± 1,17	8,2 ± 1,5	5,7 ± 1,0

Fígados de ratos alimentados foram perfundidos isoladamente como o descrito em Materiais e Métodos, item 2.5.2. O MI-D na concentração de $25\mu\text{mols.L}^{-1}$ foi infundido no intervalo de 10 a 34 minutos do experimento de perfusão. Os valores representam a média ± ep da média de 3 experimentos independentes.

* Valores estatisticamente diferentes, a nível de $p \leq 0,05$.

minutos da infusão do composto, ou seja, aos 26 minutos do experimento. Após o término da infusão do composto mesoiônico os níveis de piruvato, tal como o observado para o lactato, embora tenham aumentado, não alcançaram os valores iniciais. Em função das variações ocorridas na produção de piruvato e de lactato, a glicólise, estimada pela somatória da produção de piruvato e lactato (THURMAN & SCHOLZ, 1977; KIMMIG et al., 1983), também foi alterada. Este efeito foi particularmente visível na dose de $25\mu\text{mols.L}^{-1}$ de MI-D. No início do experimento, os valores observados para a glicólise eram de $1,58\mu\text{mols.min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Aos 16 min de infusão do MI-D tal valor decresceu para $1,02\mu\text{mols.min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, havendo uma redução de 35%. Ao final do experimento de perfusão, a glicólise não retornou aos valores iniciais, persistindo em valores 15% inferiores. No entanto, a razão lactato/piruvato, que reflete o estado do sistema redox NAD^+/NADH citosólico (WILLIAMSON et al., 1967) e que antes da infusão do MI-D ($25\mu\text{mols.L}^{-1}$) era de 6,0, aos 16 minutos da infusão do composto mesoiônico aumentou para 8,0 (36%), retornando praticamente aos valores iniciais (5,7), ao término do experimento.

As figuras 23A e 23B mostram medidas de absorbâncias, a 340nm, do perfusado que deixou o fígado. Tais medidas foram feitas inicialmente com a finalidade de se avaliar uma eventual interferência do xenobiótico nos procedimentos de leitura das dosagens de lactato e piruvato, realizadas neste comprimento de onda. Entretanto, estas medidas forneceram também uma importante informação referente à quantidade de MI-D que deixava o fígado. Considerando que a absorbância da solução de MI-D $5\mu\text{mols.L}^{-1}$ e $25\mu\text{mols.L}^{-1}$ em meio de perfusão eram respectivamente 0,068 e 0,38, antes da infusão, a recuperação do composto após a perfusão ficou muito abaixo do esperado, visto que a absorbância para o MI-D $5\mu\text{mols.L}^{-1}$ não ultrapassou 0,02 (figura 23A) e no segundo caso, para o MI-D $25\mu\text{mols.L}^{-1}$ (figura 23B) não ultrapassou 0,15. Isto sugere que aproximadamente 50% da quantidade inicial do MI-D infundida permaneceu retida no órgão. Esta possibilidade poderia explicar, ao menos em parte, a irreversibilidade dos efeitos já mencionados. Além disto, os efeitos tardios observados sobre a glicogenólise e consumo de oxigênio,

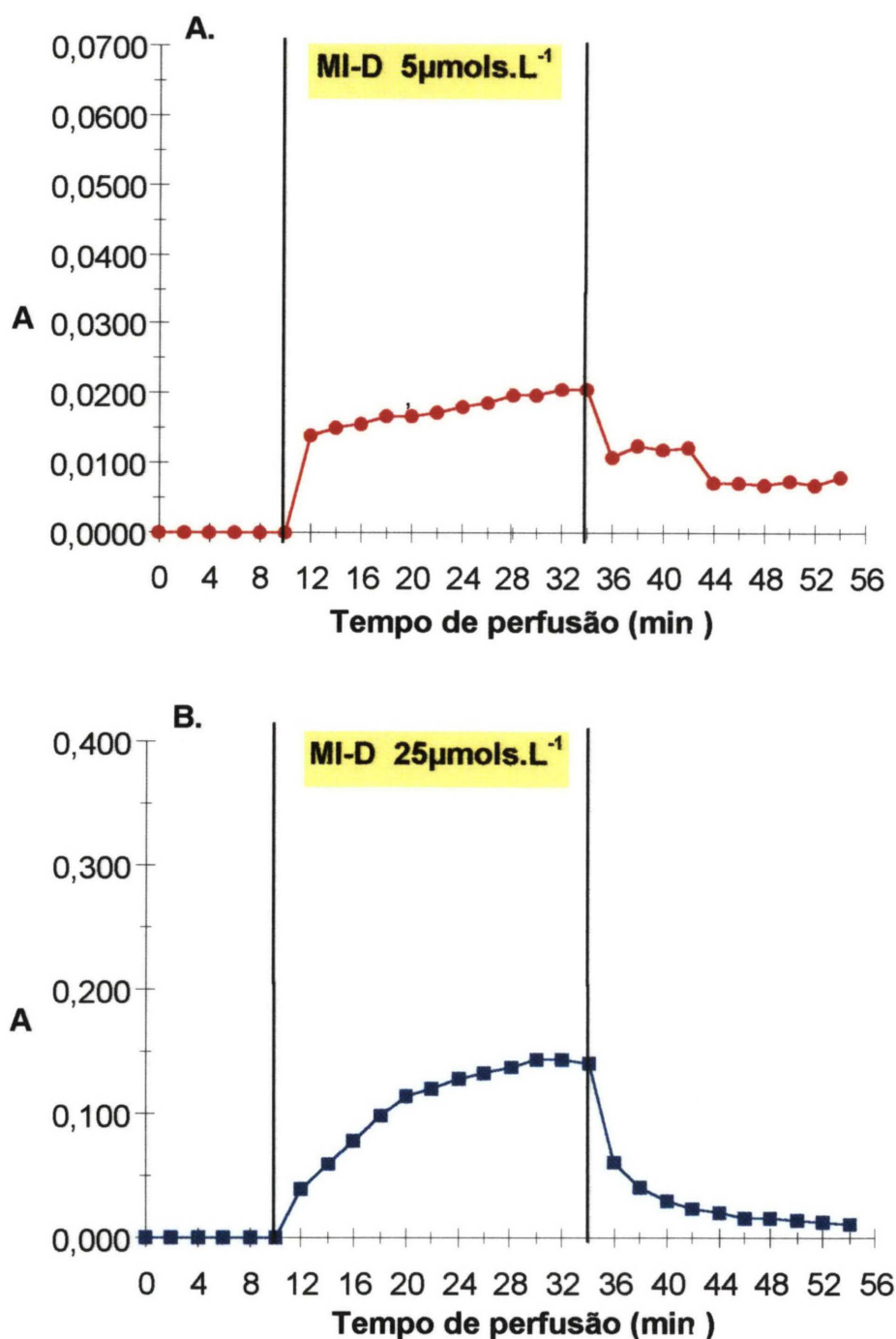


FIGURA 23. Absorbâncias (340 nm) do MI-D nas amostras coletadas, nos diferentes tempos, durante o experimento de perfusão. A. MI-D 5 $\mu\text{mols.L}^{-1}$ - absorbância da droga infundida de 0,068; B. MI-D 25 $\mu\text{mols.L}^{-1}$ - absorbância da droga infundida de 0,380. Os valores representam a média de 3 experimentos.

causados pela infusão do MI-D em baixa concentração ($5\mu\text{mols.L}^{-1}$), poderiam ser conseqüentes deste acúmulo, sugerindo que o composto mesoiônico manifeste efeitos dependentes também do tempo de exposição.

O acentuado estímulo sobre a glicogenólise observado à dose de $25\mu\text{mols.L}^{-1}$ de MI-D - figura 22 e tabela 4) exige uma análise mais detalhada. Várias drogas são conhecidas por estimularem esta importante via metabólica hepática. Entretanto, no que se refere aos compostos mesoiônicos, a disponibilidade de dados na literatura é escassa. Vale ressaltar, no entanto, as observações de GLENNON et al. (1981,1984) demonstrando que derivados mesoiônicos 1,3,4-tiadiazóis [3,2-a] piridimidinas (figura 14) foram capazes de inibir a enzima fosfodiesterase, bem como de atuar como antagonistas dos receptores de adenosina tipo A_1 . Embora interações desta natureza possam, em tese, explicar o aumento observado na glicogenólise, o MI-D não apresenta similaridade estrutural às xantinas naturais, tida como indispensável por GLENNON et al. (1981;1984). Pelo contrário, não obstante o MI-D possua em sua estrutura o anel tiadiazólio mesoiônico, a ausência do anel pirimidina e a presença de diferentes substituintes o tornam um composto muito distinto daqueles relatados pelos citados autores. A ação do MI-D em fígado perfundido é interessante na medida em que o estímulo da glicogenólise foi acompanhado de acentuada inibição do consumo de oxigênio, inibição esta, que fortemente sugere um envolvimento do composto com as atividades mitocondriais. Entretanto, o MI-D não estimulou a glicólise, diferindo, portanto, dos inibidores clássicos da cadeia respiratória, como por exemplo o cianeto, que em fígado perfundido promove o estímulo da glicogenólise e glicólise (CONAGLEN et al., 1984).

Quanto à inibição da glicólise observada pela infusão do MI-D, não se pode descartar a possibilidade de que este efeito resulte da ação do composto sobre alguma enzima desta via, vez que não foram desenvolvidos experimentos específicos com tal finalidade. No entanto, o aumento da razão lactato/piruvato, que neste caso reflete o estado redox do citosol, isto é a razão NAD^+/NADH , durante o período de infusão do composto mesoiônico, foi

decorrente do decréscimo da produção de piruvato (50%) que, por sua vez foi mais acentuado que o observado para o lactato (34%), sugerindo uma diminuição do cofator na sua forma reduzida.

Considerando os efeitos do MI-D em fígado perfundido, particularmente na dose de $25\mu\text{mols.L}^{-1}$, sobre o consumo de oxigênio e glicogenólise, tornou-se relevante esclarecer os mecanismos pelos quais o composto interfere na atividade respiratória.

3. 2 Efeitos do MI-D em Mitocôndrias Isoladas

Para se avaliar os efeitos do MI-D sobre a atividade respiratória optou-se, neste trabalho, pelo uso de mitocôndrias isoladas de fígado de rato como modelo experimental. Os experimentos cujos resultados estão apresentados nas figuras 24 e 25 foram desenvolvidos utilizando-se como substratos oxidáveis o glutamato e o succinato de sódio e foram analisados os seguintes parâmetros: consumo de oxigênio durante os estados III e IV da respiração; o coeficiente de controle respiratório (RCC) e a razão ADP/O.

Na figura 24A pode-se observar que os efeitos do MI-D sobre a velocidade respiratória de mitocôndrias isoladas, na presença de substrato e ADP (estado III), foram discretos embora não idênticos para ambos os substratos. Quando o glutamato foi utilizado como substrato, o MI-D em baixas concentrações (15 nmols.mg^{-1} de proteína) promoveu um pequeno estímulo da velocidade respiratória (20%, em relação ao controle), enquanto que em altas concentrações (65 nmols.mg^{-1} proteína), a velocidade respiratória foi aproximadamente 22% inferior ao controle. Deve-se salientar, que a análise estatística utilizada comparou os efeitos do MI-D com o valores do controle, isto é 100% de atividade na ausência do composto mesoiônico. Porém, se considerado que, na concentração de 15 nmols.mg^{-1} proteína o MI-D estimulou a velocidade respiratória em cerca de 20%, o decréscimo observado para a atividade respiratória passa a ser significativo em relação a este, a partir da concentração de 25 nmols.mg^{-1} proteína.

Quando o succinato de sódio foi utilizado como substrato, não foi observado o estímulo inicial na velocidade respiratória do estado III (figura 24A). Porém, a inibição foi significativa para as concentrações de 25 a 80 nmols de MI-D. mg^{-1} proteína, sendo o efeito inibitório de 30%, na maior dose, com relação ao controle. A inibição promovida pelo MI-D na velocidade respiratória do estado III, poderia ser justificada por quaisquer das seguintes possibilidades: a) inibição de um ou mais complexos da cadeia respiratória; b) inibição das desidrogenases dos diferentes substratos; c) inibição do translocador de nucleotídeos de adenina; d) inibição da ATPsintase; e) inibição dos transportadores dos substratos.

Na figura 24B verifica-se que a velocidade do consumo de oxigênio após a exaustão do ADP (estado IV) foi acentuadamente aumentada. O estímulo observado foi estatisticamente significativo a partir da concentração de 15 nmols MI-D. mg^{-1} de proteína mitocondrial, para os dois substratos, chegando, na concentração de 80 nmols. mg^{-1} proteína, a 190% e 152% durante a oxidação do glutamato e succinato, respectivamente. A figura 25 mostra os valores de RCC (figura 25A) e da razão ADP/O (figura 25B). Verifica-se uma drástica diminuição destes parâmetros, obviamente consequência dos efeitos exercidos pelo MI-D sobre a velocidade do consumo de oxigênio (inibição do estado III e estímulo do estado IV). Os efeitos do MI-D sobre o estado IV da respiração, sugerem uma ação desacopladora do composto mesoiônico.

Os resultados destes experimentos são compatíveis com aqueles verificados em fígado perfundido, efetuados na presença da mesma concentração da droga, embora não seja possível estabelecer no órgão intacto quais os substratos que preferencialmente estejam alimentando a cadeia respiratória. Tal compatibilidade pode ser inferida quando se observa a inibição do consumo de oxigênio em fígado perfundido (figura 22 e tabela 4), que é correspondente, nos experimentos com mitocôndria isoladas, à concentração de 65 nmols. mg^{-1} de proteína, para a oxidação do succinato de sódio (figura 24A). No entanto, a interpretação dos resultados exige algumas

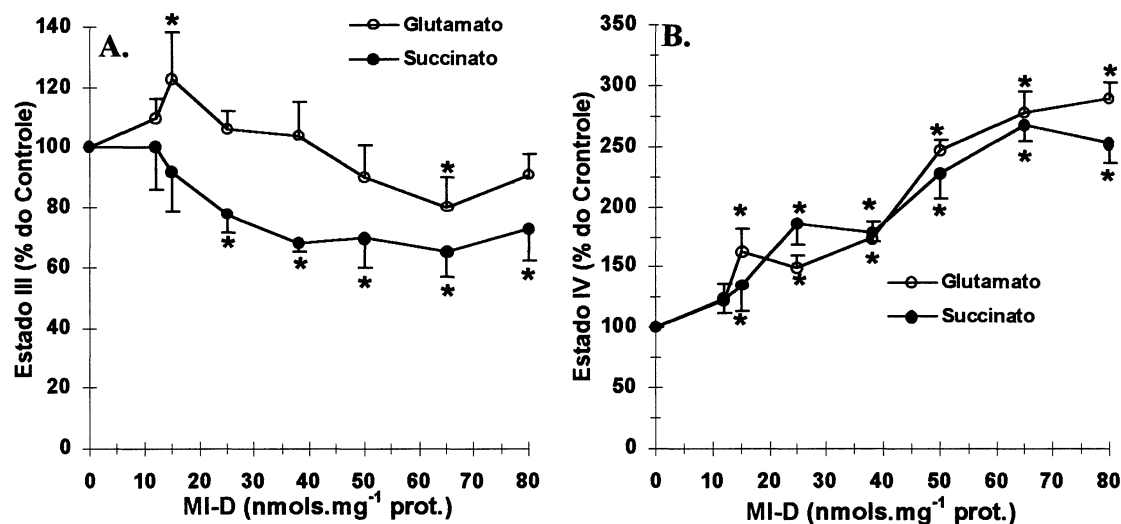


FIGURA 24. Efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As condições experimentais estão descritas no item 2.7.1 da seção de Materiais e Métodos.

A: Estado III, consumo de oxigênio na presença de ADP e substrato. 100% corresponde a $34,6 \pm 4,2$ e $38,0 \pm 4,0$ nmols de oxigênio consumidos por minuto por miligrama de proteína mitocondrial para o glutamato e succinato de sódio, respectivamente.

B: Estado IV, consumo de oxigênio mitocondrial após a exaustão de ADP. 100% corresponde a $7,0 \pm 1,1$ e $8,0 \pm 1,3$ nmols de oxigênio consumidos por minuto por miligrama de proteína mitocondrial para o glutamato e succinato, respectivamente.

Cada valor representa a média \pm dp de seis experimentos independentes.
*Valores estatisticamente diferentes do controle ($p \leq 0,05$)

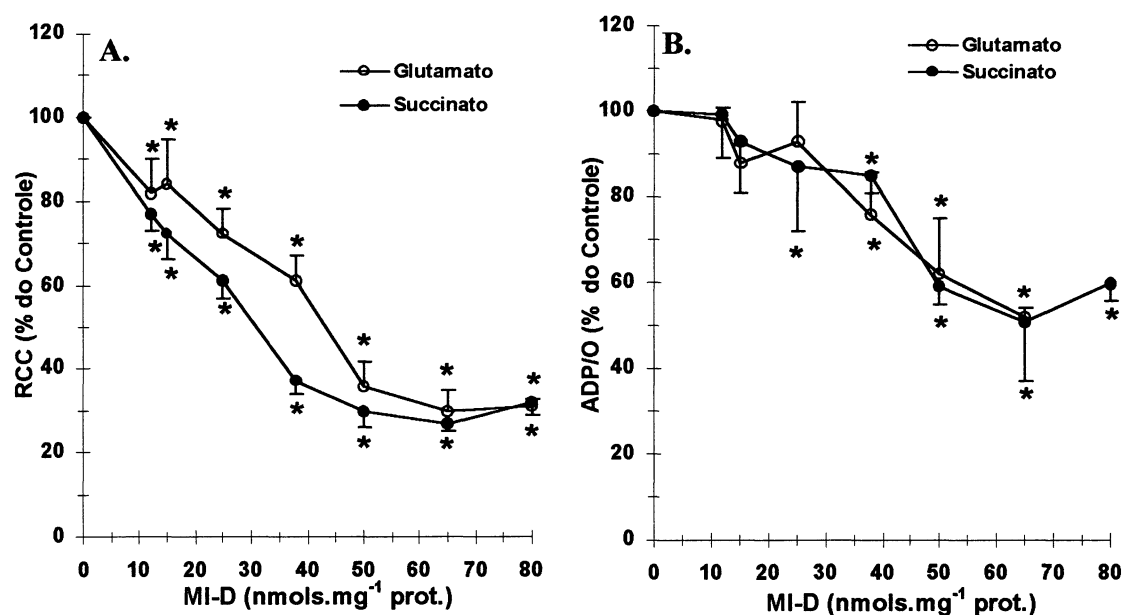


FIGURA 25. Efeitos do MI-D sobre o RCC e razão ADP/O de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As condições experimentais estão descritas no item 2.7.1 da seção de Materiais e Métodos.

A. RCC, coeficiente de controle respiratório. 100% corresponde aos valores de $4,6 \pm 0,2$ e $4,6 \pm 0,6$ para o glutamato e succinato, respectivamente.

B. ADP/O, concentração de ADP/consumo de oxigênio. 100% corresponde aos valores de $2,8 \pm 0,2$ e $1,8 \pm 0,2$ para o glutamato e succinato, respectivamente.

Cada valor representa a média \pm dp de seis experimentos independentes.
*Valores estatisticamente diferentes do controle ($p \leq 0,05$)

considerações. No fígado isolado observou-se apenas a inibição na velocidade respiratória; já em mitocôndrias isoladas em adição a inibição do estado III, observou-se, ainda, um forte estímulo na velocidade respiratória do estado IV. Embora no órgão isolado não seja possível estabelecer o estado IV da respiração - que representa a depleção total de ADP -, a visualização apenas do efeito inibitório do MI-D - redução de 37% no consumo de oxigênio -, é correspondente e compatível àquele evidenciado em mitocôndrias isoladas (30% de inibição), para o estado III da respiração, na mesma concentração do xenobiótico. Entretanto, deve-se ressaltar que compostos não mesoiônicos com ação desacopladora, quando avaliados em fígado perfundido, em condições experimentais similares às descritas neste trabalho (KEMMELMEIER et al., 1989), estimularam o consumo de oxigênio. Ainda neste sentido, PETRESCU & TARBA (1997) demonstraram que os antiinflamatórios não esteroidais, ácido acetil salicílico e diclofenaco, estimularam o consumo de oxigênio, a glicogenólise e glicólise. Segundo os autores, tais efeitos seriam resultantes da ação desacopladora destes compostos. Desta forma, os efeitos do MI-D em fígado perfundido são singulares, permitindo supor que proteínas integrais de membrana, tais como aquelas constituintes dos complexos da cadeia respiratória, possam ser alvos de interação com o composto mesoiônico.

3.3 Efeitos do MI-D Sobre a Atividade Dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória

Com a finalidade de esclarecer os efeitos do MI-D sobre o estado III da respiração, foram realizados ensaios com mitocôndrias desacopladas por FCCP e mitocôndrias rompidas. Em ambas as situações experimentais, é possível avaliar o transporte de elétrons através da cadeia respiratória, descartando os efeitos relacionados à fosforilação oxidativa. Em mitocôndrias rompidas é possível, ainda, avaliar os efeitos do composto mesoiônico na ausência da barreira representada pela membrana mitocondrial interna.

A figura 26 mostra os resultados de experimentos em que o efeito do MI-D foi avaliado em preparações mitocondriais desacopladas por FCCP, e, portanto, com o transporte de elétrons ocorrendo em velocidade máxima. Nesta situação experimental a diminuição do consumo de oxigênio é particularmente evidente, sugerindo que o composto mesoiônico compromete o transporte de elétrons. A figura 27 mostra que o efeito do MI-D sobre o consumo de oxigênio é dependente da concentração de FCCP utilizada. Os resultados da figura 27A e 27B foram obtidos em presença de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FCCP, respectivamente. Enquanto a velocidade respiratória é praticamente a mesma para as duas concentrações de FCCP, a magnitude da inibição pelo MI-D diferiu apesar de terem sido usadas concentrações rigorosamente idênticas do composto mesoiônico. Verifica-se ainda que a inibição do consumo de oxigênio na presença do MI-D é dependente do tempo (figura 27). Efeitos semelhantes a este, não foram encontrados em literatura recente. Porém, VAN DAM (1967) relata uma ação de inibição do consumo de oxigênio por agentes desacopladores quando utilizados em concentrações elevadas ou combinados com outro agente desacoplador. Considerando os efeitos do MI-D sobre o estado IV, esta possibilidade não pode ser descartada; pode-se supor ainda que esta condição favoreça a interação do composto com os complexos enzimáticos da cadeia respiratória, devido a um dano generalizado da membrana mitocondrial.

Em preparações de mitocôndrias rompidas foram investigados os efeitos do MI-D sobre a atividade dos complexos NADH oxidase, NADH desidrogenase, succinato oxidase, NADH-citocromo c redutase, citocromo oxidase e succinato desidrogenase. Os resultados estão apresentados na tabela 5.

Verifica-se que o trajeto dos elétrons do NADH até o oxigênio, ou seja, o segmento NADH oxidase, é inibido de forma significativa a partir da concentração de 38 nmols.mg^{-1} proteína. Esta inibição atinge um valor máximo de 32%, se tomado como parâmetro a média dos controles, realizados na ausência de MI-D. Tal valor é superior àquele observado pela oxidação do

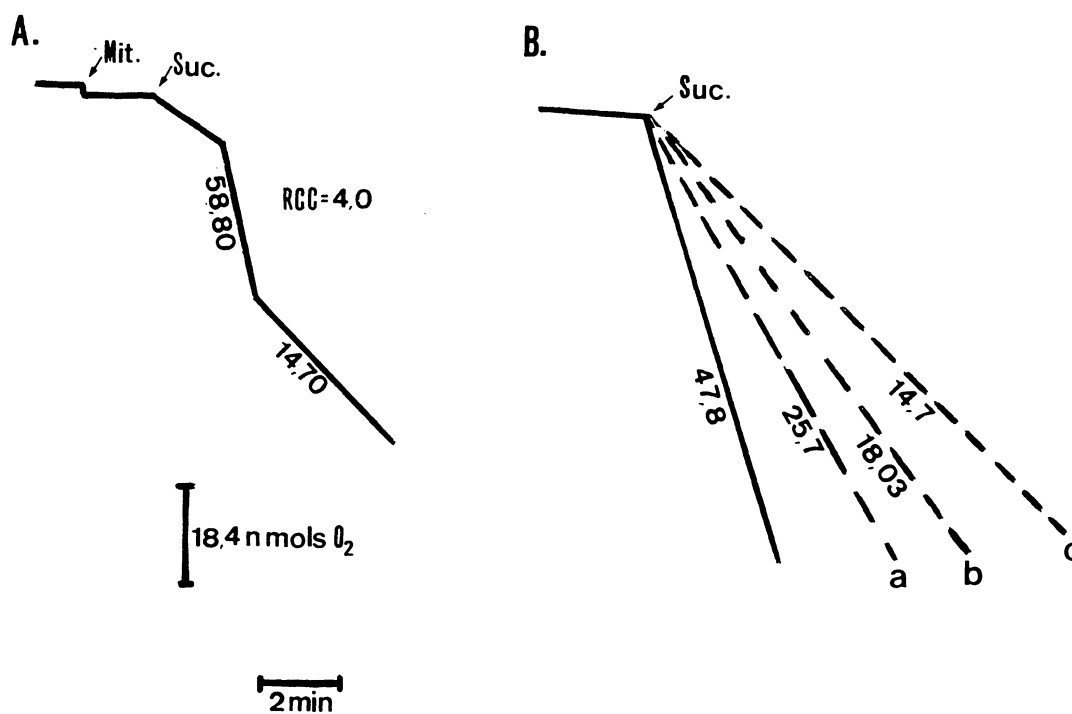


FIGURA 26. Efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias de fígado de rato desacopladas por FCCP. **A.** Ensaio controle realizado na ausência de FCCP e MI-D - RCC- coeficiente de controle respiratório. **B.** Consumo de oxigênio na presença de FCCP 0,5 $\mu\text{mols.L}^{-1}$ (—) e MI-D (- - -) nas concentrações de a. 25; b. 50 e c. 80 nmols.mg^{-1} de proteína mitocondrial. Adições **Mit.** -mitocôndrias; **Suc.**-succinato de sódio 2,5 mmols.L^{-1} . As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 2.7.1. Os traçados são representativos de três experimentos independentes. As velocidades respiratórias estão expressas em $\text{nmols de O}_2 \text{ consumidos.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial.

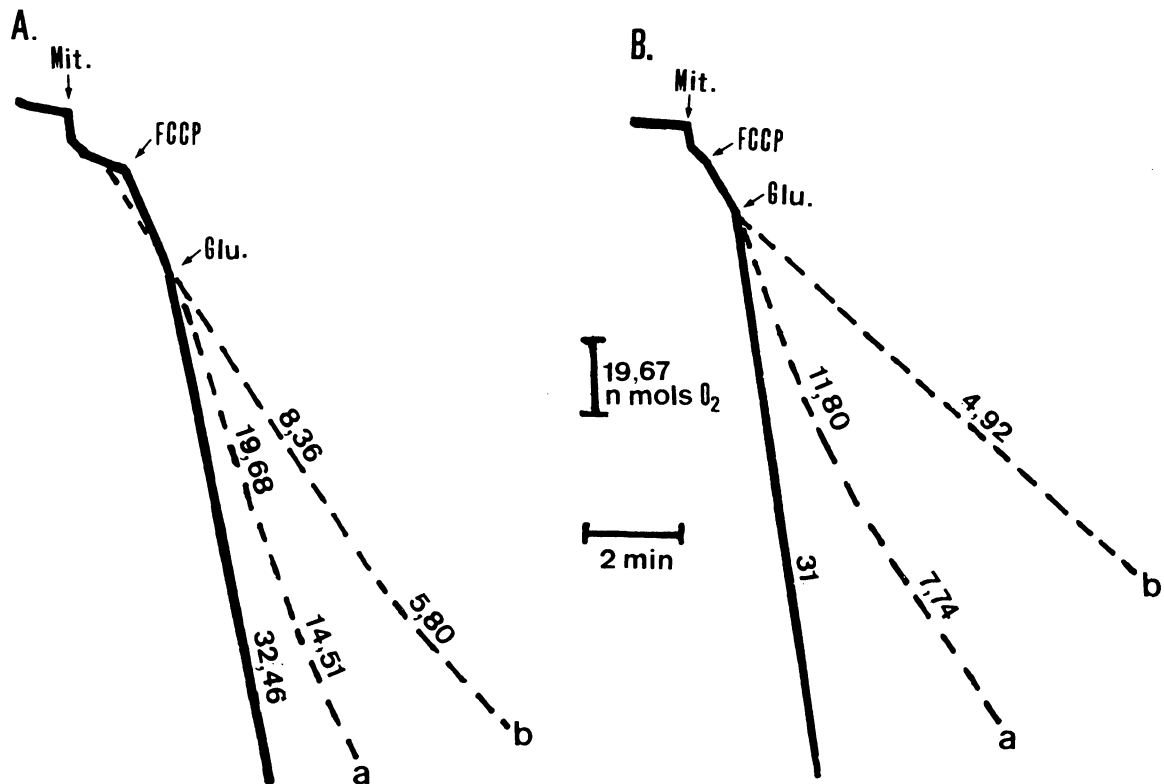


FIGURA 27. Efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias de fígado de rato desacopladas por FCCP. A Consumo de oxigênio na presença de FCCP $0,1 \mu\text{mols.L}^{-1}$ (—) e MI-D (- - -) nas concentrações de a. 50 e b. 80 nmols.mg^{-1} de proteína mitocondrial. **B.** Consumo de oxigênio na presença de FCCP $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (—) e MI-D (- - -) nas concentrações de a. 50 e b. 80 nmols.mg^{-1} de proteína mitocondrial. Adições: **Mit.** mitocôndria; **Glu.** glutamato de sódio 5 mmols.L^{-1} . As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 2.7.1. Os traçados são representativos de três experimentos independentes. As velocidades respiratórias estão expressas em $\text{nmols de O}_2 \text{ consumidos min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial.

TABELA 5. Efeitos do MI-D sobre os complexos enzimáticos da cadeia respiratória.

Enzimas	% do controle (média ± dp)							
	MI-D (nmols.mg ⁻¹ prot.)							
	0	12.0	15.0	25.0	38.0	50.0	65.0	80.0
NADH Oxidase	100	97±7	103±10	94±8	88±5*	80±2*	74±8*	68±4*
NADH desidrogenase	100	94±5	92±8	99±8	88±6	96±7	93±2	94±4
NADH citocromo c redutase	100	98±8	94±2	93±7	84±6*	80±8*	78±4*	77±7*
Succinato oxidase	100	97±2	86±3*	77±5*	66±3*	70±8*	58±5*	45±5*
Citocromo c oxidase	100	102±5	100±3	99±5	97±6	98±6	95±5	96±3
Succinato desidrogenase	100	100±5	95±12	88±8	79±7*	94±8	95±13	97±11
Succinate citocromo c redutase	100	98±8	107±5	91±7	91±4	93±5	87±6*	80±8*

As condições experimentais estão descritas no item 2.7.2 da seção de Materiais e Métodos
 100% corresponde a atividade dos controles : **NADH oxidase** - 15 nmols de NADH oxidado. min⁻¹.mg⁻¹;
NADH desidrogenase - 5,0 μmols de ferricianeto reduzido. min⁻¹.mg⁻¹; **NADH citocromo c redutase** -
 200 nmols de citocromo c reduzido.min⁻¹. mg⁻¹; **Succinato oxidase** - 20 nmols de O₂ consumidos.min⁻¹.
 mg⁻¹; **Citocromo c oxidase** - 400 nmols de citocromo c oxidado.min⁻¹. mg⁻¹; **Succinato desidrogenase**-
 60 nmols de DPIP reduzido. min⁻¹. mg⁻¹ e **Succinato citocromo c redutase** - 200 nmols de
 ferricitocromo c reduzido.min⁻¹.mg⁻¹. Cada valor representa a média ± dp de quatro experimentos
 independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência de MI-D) - p ≤ 0,05.

glutamato durante o estado III (20% - figura 24A) Esta aparente discrepância pode ser justificada pela diferença entre as metodologias utilizadas. Com efeito, no ensaio enzimático que utiliza mitocôndrias rompidas, as enzimas que constituem os complexos da cadeia respiratória estão mais acessíveis ao composto mesoiônico que nos ensaios em que se utilizam mitocôndrias intactas.

Os dados apresentados na tabela 5 mostram, também, que o MI-D promove uma inibição significativa do transporte de elétrons do succinato ao oxigênio, isto é, na succinato oxidase, a partir de 15 nmols.mg⁻¹ proteína . A inibição de cerca de 55% é também, neste caso, maior que a observada para o estado III da respiração, quando utilizado o succinato de sódio como substrato oxidável (30%, figura 24A). Como no caso anterior, isto poderia ser explicado pelas características das preparações utilizadas.

O MI-D não exerceu qualquer efeito sobre a atividade NADH-desidrogenase (NADH: ferricianeto óxido-redutase), indicando que a inibição observada no ensaio da NADH oxidase não ocorre a nível do complexo I da cadeia respiratória. Por outro lado, a Succinato desidrogenase (succinato: fenazina metasulfato óxido redutase), foi inibida de forma estatisticamente significativa na dose de 38nmols.mg⁻¹proteína. Esta inibição, de apenas 20%, quando comparada a de 55% observada para a enzima Succinato Oxidase, sugere que o MI-D exerça também um efeito inibitório sobre o complexo III e/ou IV da cadeia respiratória. De fato, como pode ser observado na tabela 5, o MI-D promoveu uma inibição de 20% sobre a atividade da NADH-Citocromo c redutase, que abrange os complexos I a III da cadeia transportadora de elétrons. A inibição foi significativa a partir da dose de 38 nmols.mg⁻¹ proteína. Uma inibição da mesma magnitude (20%) foi observada sobre o segmento Succinato citocromo c redutase (Succinato: ferrocitocromo c óxido-redutase) . Tal efeito foi significativo para as doses de 65 e 80 nmols MI-D.mg⁻¹ proteína .

Como o complexo Citocromo oxidase (ferrocitocromo c: oxigênio óxido-redutase) não foi inibido, os resultados descritos sugerem que o sitio de

inibição do MI-D está localizado após o complexo I e entre os complexos II e III da cadeia respiratória, justificando a inibição sobre o estado III da respiração, observada na figura 24 A, para os dois substratos utilizados.

3.4 Efeitos do MI-D Sobre o Potencial Elétrico de Membrana ($\Delta\psi$)

A força próton motriz (Δp), responsável pela síntese de ATP, é constituída por dois componentes: o ΔpH , resultante da diferença na concentração de prótons através da membrana mitocondrial e o $\Delta\psi$ (potencial elétrico de membrana), decorrente da diferença do potencial elétrico entre as duas fases aquosas separadas pela membrana mitocondrial (NICHOLLS & FEGURSON, 1992). Considerando que o último componente, contribui com aproximadamente 90% da energia disponível para a formação da força próton motriz (Δp) (NICHOLLS & FEGURSON, 1992), e a acentuada redução, promovida pelo MI-D, na capacidade da mitocôndria em fosforilar o ADP (figura 24), tornou-se fundamental avaliar os efeitos da droga sobre o $\Delta\psi$.

Os efeitos do MI-D sobre o potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$), em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, foram avaliados utilizando-se safranina O. Este corante, deslocando-se do meio extra para o intramitocondrial sob a influência do $\Delta\psi$, interage com sítios aniônicos da membrana, agregando-se em palissadas. Tal fenômeno é acompanhado de alterações espectrofotométricas registradas a 511-533nm, permitindo estabelecer uma relação linear entre o valor de $\Delta\psi$, resultante da energização da membrana, e a variação da densidade óptica, resultante do acúmulo e ligação das moléculas de safranina no interior da mitocôndria (ZANOTTI & AZZONE, 1980). Desta forma, a partir do registro das mudanças espectrais, a 511nm-533nm, foram calculados os valores de $\Delta\psi$ em mV (AKERMAN & WIKSTROM, 1976). Os traçados da figura 28, são representativos dos efeitos do MI-D sobre o $\Delta\psi$, evidenciando a redução na capacidade de gerar o $\Delta\psi$ das preparações mitocondriais, quando em presença do composto mesoiônico. Os resultados mostrados na figura 29, evidenciam os efeitos do MI-D sobre o $\Delta\psi$, quando utilizados como substratos o glutamato ou succinato de sódio.

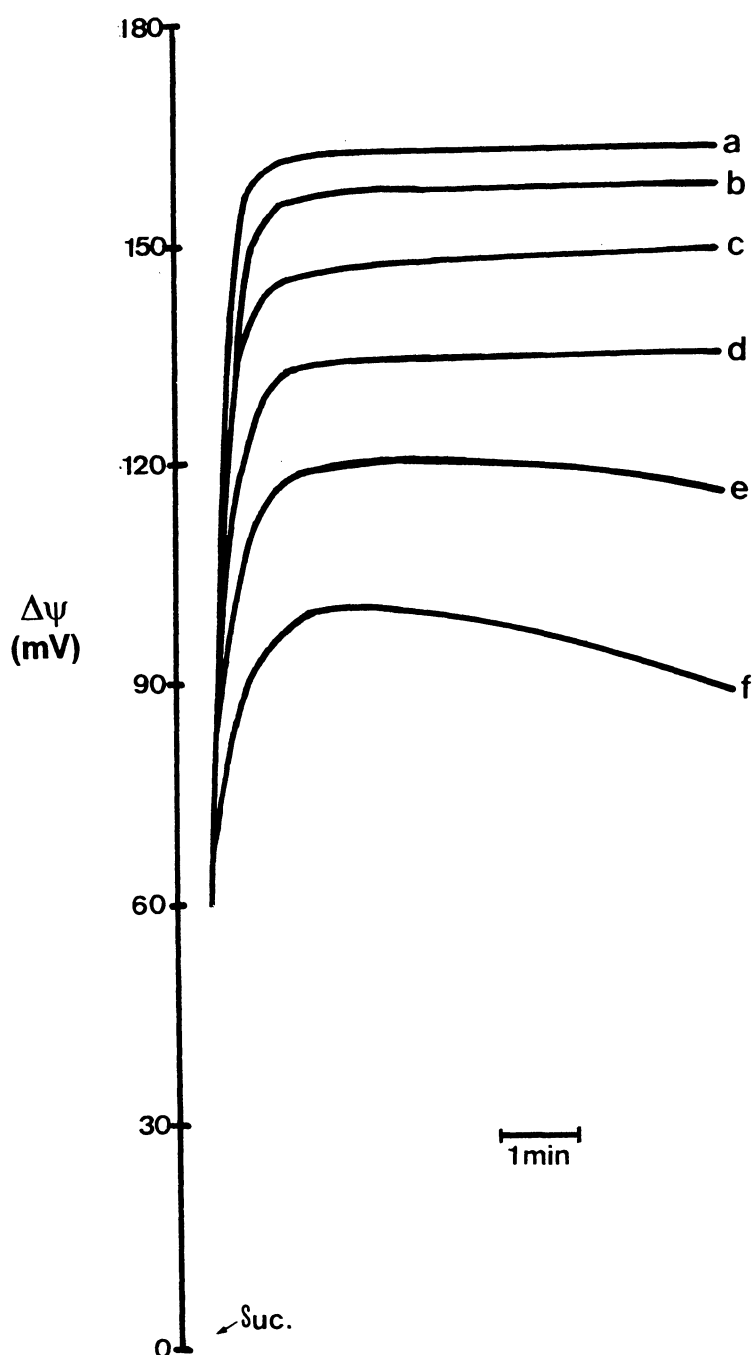


FIGURA 28. Efeitos do MI-D sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi$) de mitocôndrias de fígado de rato. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 2.7.3. MI-D estava presente nas concentrações de a. 0, b. 12, c. 25, d. 50, e. 65 e f. 80 nmols.mg⁻¹ proteína mitocondrial. Os traçados são representativos de quatro experimentos independentes.

Verifica-se uma queda progressiva no potencial formado para os dois substratos, observando-se, porém, que a concentração responsável pelo colapso do potencial de membrana difere para cada substrato. Enquanto 65nmols de MI-D. mg^{-1} proteína foram suficientes para abolir completamente o $\Delta\psi$, quando utilizado o glutamato de sódio como substrato, o mesmo parâmetro diminuiu em 40% na concentração de MI-D de 80 nmols. mg^{-1} proteína, quando o substrato foi o succinato. A diferença na magnitude dos efeitos poderia resultar dos mecanismos pelos quais cada substrato tem acesso à mitocôndria. Sabe-se que a entrada de glutamato é dependente do ΔpH , sendo mediada por dois tipos de transportadores. O primeiro opera com a entrada simultânea de H^+ (co-transporte de H^+), em troca do aspartato; o segundo facilita a entrada do glutamato em troca do OH^- . Já a entrada de succinato ocorre através do transportador de dicarboxilatos, não sendo, portanto, dependente do ΔpH (NICHOLLS & FEGURSON,1992). Desta forma, é razoável supor que os efeitos mais pronunciados do MI-D, poderiam estar relacionados à entrada do glutamato, que é dependente do ΔpH . Ainda nos experimentos em que o glutamato de sódio foi utilizado como substrato oxidável, nota-se, também, uma elevação no potencial de membrana (conc. 15 nmols. mg^{-1} proteína), em relação a dose anterior (12 nmols. mg^{-1} proteína). Este efeito, observado em todos os experimentos, mostrou-se ainda mais intrigante, quando comparado aos resultados do consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas (figura 24 A), em que se mostrou um pequeno estímulo na velocidade respiratória do estado III, para o mesmo substrato, na mesma dose. Todos estes resultados poderiam ser justificados, se confirmada a hipótese de que o MI-D, antes de promover o colapso do potencial, dissipasse o ΔpH , devido à dissociação de um próton (grupo $-\text{NH}-$) de sua estrutura (figura 17). Se assim fosse, o aumento no potencial de membrana e na velocidade respiratória do estado III, observados em baixas doses do composto mesoiônico, quando o glutamato era o substrato oxidável, seria decorrente de uma resposta termodinâmica para restabelecer a força próton motriz (Δp).

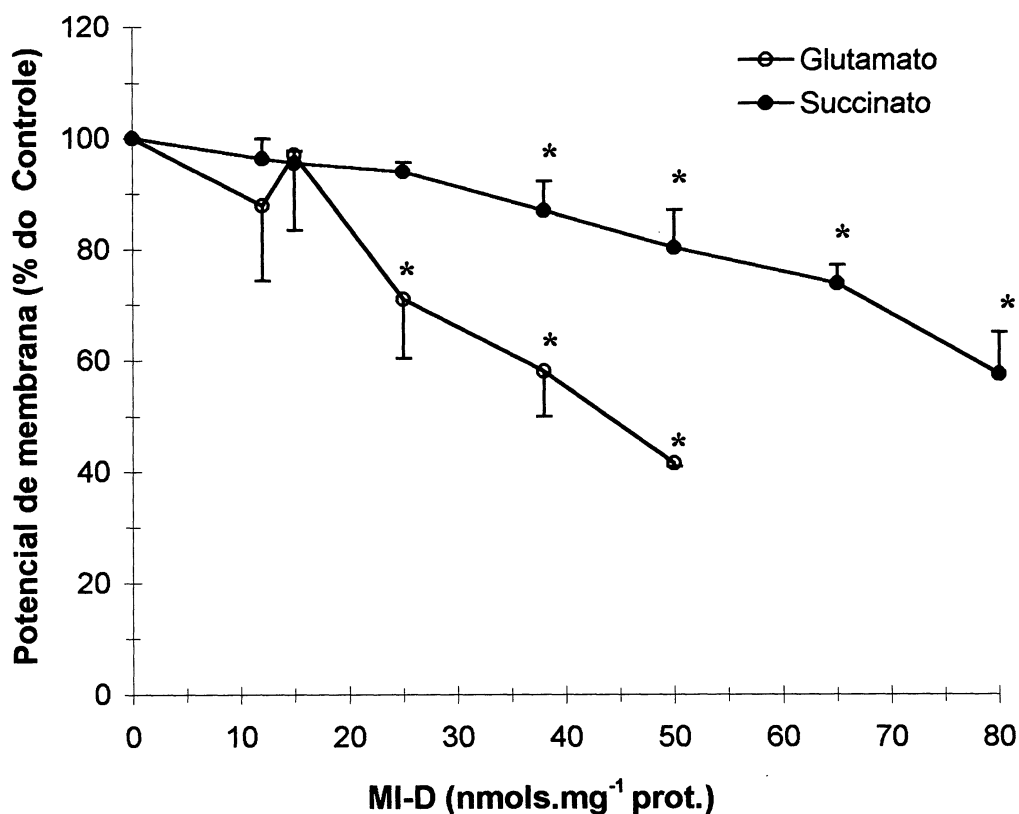


FIGURA 29. Efeitos do MI-D sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi$) de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Mitocôndrias de fígado de rato foram incubadas nas condições descritas em Materiais e Métodos, item 2.7.3, energizadas com glutamato (O) ou succinato de sódio (●). Cada valor representa a média \pm dp de quatro experimentos independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência de MI-D) a nível de significância de $p \leq 0,05$. 100% corresponde a $170 \pm 10,9$ mV de potencial elétrico de membrana.

O colapso do $\Delta\psi$ pode decorrer tanto de uma restrição no fluxo de elétrons, quanto de um efeito desacoplador (NICHOLLS & FEGURSON, 1992). No caso do MI-D este efeito está provavelmente relacionado à sua ação desacopladora (*como indicado pelo aumento da velocidade do estado IV da respiração, diminuição no coeficiente de controle respiratório (RC) e razão ADP/O* - (figuras 24B, 25A e B), visto que, a inibição observada sobre os complexos da cadeia transportadora de elétrons (tabela 5), não é suficiente para justificar seus drásticos efeitos sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi$). Resta esclarecer se os mecanismos responsáveis pelo efeito desacoplador do MI-D estão relacionados à dissociação de prótons da sua estrutura, como ocorre no caso dos desacopladores clássicos, e/ou à interação com a membrana mitocondrial, considerando o caráter lipofílico da droga.

3.5 Efeitos do MI-D Sobre o Complexo F_1F_0 ATPase

Para o melhor entendimento das ações do MI-D quanto às funções ligadas à energia, seu efeito foi avaliado sobre a atividade do complexo F_1F_0 ATPase (ATP sintase). Neste complexo enzimático o componente F_0 , constituído de polipeptídios hidrofóbicos, se encontra inserido na membrana mitocondrial interna, sendo responsável pela captação de prótons do espaço intermembranas e sua liberação na matriz mitocondrial. O componente solúvel F_1 , inclui 5 tipos de subunidades ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ e ϵ), na estequiometria de $3\alpha:3\beta:1\gamma:1\delta:1\epsilon$. Este componente é responsável pela síntese de ATP - por ocasião do transporte de elétrons e passagem de prótons pelo componente F_0 -, ou hidrólise de ATP, em presença do nucleotídeo e ausência de substratos para a cadeia respiratória (NICHOLLS & FEGURSON, 1992). A interação entre F_1 e F_0 é garantida por dois outros componentes: F_6 e OSCP, sendo que esta última confere sensibilidade à oligomicina. Estas proteínas associam-se aos componentes F_1 e F_0 do complexo enzimático, auxiliando a regular a permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons e garantindo a eficiência da fosforilação oxidativa (TZAGOLOFF, 1982).

Segundo MITCHELL (1961), o transporte de elétrons através da cadeia respiratória leva a formação da força próton motriz (Δp), gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna. A utilização desse gradiente está acoplada à síntese de ATP através da ATP sintase, uma vez que os prótons só podem retornar a matriz mitocondrial através do componente F_o do complexo enzimático. De maneira ampla, os desacopladores podem ser definidos como agentes químicos que seletivamente impedem a utilização da energia química derivada do transporte de elétrons para a fosforilação do ADP em ATP. Operacionalmente, isto significa um decréscimo no número de mols de fosfato inorgânico convertidos para a forma ligada organicamente por átomo de oxigênio consumido, isto é, a razão P/O tende a zero na presença de substrato, enquanto a respiração continua (HEYTLER, 1997). Este aspecto portanto distingue os desacopladores dos inibidores da fosforilação oxidativa, como por exemplo a oligomicina, que liga-se ao componente OSCP do complexo F_1F_o ATPase, ou o atractilato, que inibe o translocador ADP/ATP (TZAGOLOFF, 1982). Assim, agentes desacopladores, translocadores de H^+ ou protonóforos, são substâncias capazes de bloquear a síntese ATP, pois promovem a entrada de prótons na matriz mitocondrial, o que resulta na dissipação da força próton-motriz (Δp). A entrada de prótons na matriz mitocondrial, faz ainda com que o componente F_1 do complexo enzimático passe a hidrolisar ATP, o que ocorre com a extrusão simultânea de prótons, através do componente F_o . Desta maneira, a atividade ATPásica é muito baixa em mitocôndrias acopladas, e aumenta na presença de desacopladores clássicos como o FCCP.

Os efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio (figura 24B, 25A e B), e potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) (figura 29), sugeriram o efeito desacoplador da droga. Assim, a avaliação da atividade da ATPase permite verificar tanto a influência da droga sobre a enzima, como seu eventual efeito desacoplador. Neste estudo, a atividade do complexo enzimático foi avaliada utilizando-se preparações de mitocôndrias intactas, mitocôndrias rompidas e ainda de mitocôndrias intactas desacopladas com o desacoplador clássico,

FCCP. Os resultados destes experimentos estão representados na figura 30. Verifica-se que o MI-D não exerceu qualquer efeito sobre o complexo F_1F_0 ATPase em mitocôndrias rompidas, excluindo-se, assim, a interferência direta deste composto sobre o complexo enzimático. Este resultado também exclui a possibilidade de que a inibição do estado III seja decorrente de uma ação inibitória do MI-D sobre esta enzima.

Em contraste, quando se utilizou uma preparação de mitocôndrias intactas, o MI-D promoveu um forte estímulo na atividade hidrolítica da ATPase. Este efeito, característico para os agentes desacopladores clássicos, foi dose dependente, chegando na dose de $160 \text{ nmols.mg}^{-1}$ proteína a 300%, com relação ao controle, realizado na ausência do MI-D. Um aumento posterior na concentração de MI-D, para 240 nmols/mg proteína, promoveu uma acentuada diminuição na atividade hidrolítica da ATPase (figura 30). Tal efeito inibidor é também descrito para os desacopladores 2,4 dinitrofenol (DNP) (SLATER, 1967) e FCCP (BERTINA & SLATER, 1975), quando usados em concentrações maiores do que as necessárias para desacoplar a mitocôndria. Outra informação que pode ser inferida a partir destes resultados, com mitocôndrias intactas, é a de que ao menos até a concentração de $160 \text{ nmols.mg}^{-1}$ proteína, o MI-D não interfere no translocador de nucleotídeos de adenina.

O efeito do MI-D, em mitocôndrias desacopladas por FCCP, pode também ser observado na figura 30. Esta última situação experimental foi introduzida, considerando o conhecido fato de que o excesso ou a combinação simultânea de agentes desacopladores pode resultar em velocidades sub-máximas de alguns parâmetros mitocondriais, como a velocidade da hidrólise de ATP (KRAAYENHOLF & VAN DAM, 1969) e/ou do consumo de oxigênio, como o já discutido neste trabalho (figura 27). À semelhança do que ocorreu com o consumo de oxigênio, também neste caso a combinação simultânea dos agentes desacopladores (MI-D e FCCP) determinou a diminuição da velocidade da hidrólise de ATP. Este resultado fortalece a proposição

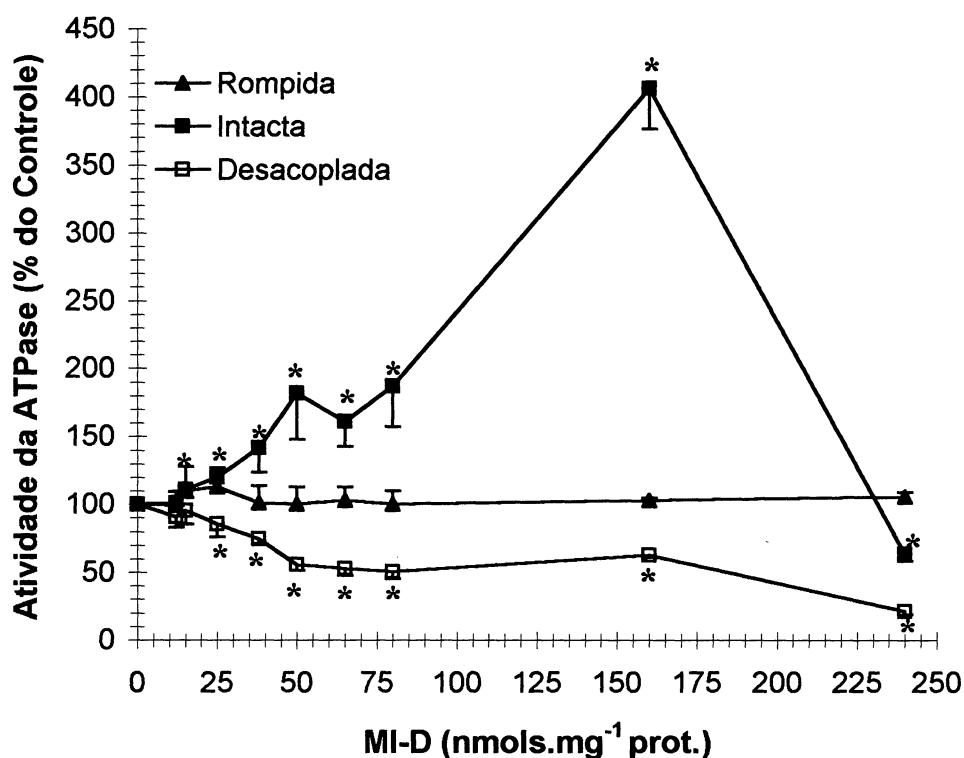


FIGURA 30. Efeitos do MI-D sobre o complexo F_1F_0 ATPase de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. (▲) Mitocôndrias rompidas. 100% corresponde a 700 ± 112 nmols de P_i liberados. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. (■) Mitocôndrias intactas - 100% de atividade corresponde a $20 \pm 1,1$ nmols de P_i liberados. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. (□) Mitocôndrias desacopladas com FCCP - 100% de atividade corresponde a $91,3 \pm 5,6$ nmols de P_i liberados. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 2.7.2.8. Os dados representam a média \pm dp de quatro experimentos independentes. * Valores estatisticamente diferentes do controle ($p \leq 0,05$)

aventada inicialmente de que o MI-D possa ocasionar importantes alterações de membrana.

Portanto, os resultados obtidos da ação do MI-D sobre o complexo F_1F_0 ATPase caracterizam o MI-D com um novo agente desacoplador, e sugerem que seus efeitos não estão relacionados apenas à dissociação do próton do grupamento -NH- presente em sua estrutura, como também à sua possível interação com constituintes de membrana mitocondrial interna.

Segundo HEYTLER (1997) a comparação da potência dos diferentes desacopladores, é melhor visualizada quando se considera a concentração capaz de promover 50% deste efeito. Estas concentrações são mais convenientemente expressas como pI_{50} ($-\log$ de I_{50} , onde I_{50} é expressa em mols.L^{-1}). Para o MI-D, o valor de pI_{50} variou de 3,9 a 4,9 em função das condições em que foram realizados os ensaios. Estes valores são equivalentes aos calculados para os desacopladores DNP e dicumarol, de 5,1 e 5,0, respectivamente (HEYTLER, 1997).

3.6 Efeitos do MI-D Sobre o Inchamento Mitocondrial

O fenômeno osmótico de entumescimento ("swelling") das mitocôndrias somente é possível devido à elasticidade da membrana mitocondrial interna. Em verdade, esta elasticidade está associada ao desdobramento das cristas desta membrana, o que permite um aumento considerável do volume da matriz, sem que ocorra o rompimento da organela (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). Este fenômeno está intimamente relacionado ao deslocamento vetorial de prótons induzido pelo fluxo de elétrons, seja em direção ao oxigênio, pela oxidação de substratos, seja na direção contrária, impulsionado pela hidrólise de ATP (PAKER et al., 1966; MUSTAFA et al., 1966). O gradiente de prótons gerado pela energia derivada do transporte de elétrons pode fazer com que ácidos fracos - como por exemplo o ácido acético -, sofram uma redistribuição entre os espaços intra e extra mitocondrial. Desta forma, o íon acetato distribui-se entre os espaços intra e extra mitocondrial de acordo com a

diferença de pH entre os dois compartimentos, enquanto a forma protonada, por ser neutra, distribui-se igualmente entre os dois espaços (KLINGENBERG & ROTTENBERG, 1977). Devido ao fato de a forma protonada ser a permeante, o influxo ou efluxo de acetato é sempre acompanhado de um próton e, portanto, uma acidificação do meio externo é acompanhada de um aumento na concentração de acetato no interior da mitocôndria. A pressão osmótica gerada por tal aumento é um fator determinante para o inchamento da organela.

A entrada de cátions, tal como o Na^+ , cujo acesso depende do potencial eletroquímico gerado, bem como a de ânions permeantes na matriz mitocondrial, levam, igualmente, a alterações osmóticas, que induzem o fluxo de água, resultando em mudança do volume da matriz (MUSTAFA et al., 1966). Dependendo das condições experimentais, o processo de entumescimento mitocondrial pode ocorrer com outros cátions permeáveis como Ca^{2+} ou K^+ mais valinomicina (TZAGOLOFF, 1982 ; NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

As suspensões mitocondriais são turvas e capazes de dispersar a luz. Esta dispersão ocorre em função da diferença do índice de refração entre o conteúdo da matriz mitocondrial e o meio. Eventos que promovam a diminuição desta diferença - como por exemplo o aumento do volume da matriz mitocondrial, devido à entrada de solutos permeáveis - , resultam na diminuição da dispersão da luz, com o índice de refração da matriz aproximando-se ao do meio (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). Desta forma, medidas da dispersão da luz por suspensões mitocondriais constituem o fundamento da técnica que avalia o grau de entumescimento ou "swelling" mitocondrial. Embora relativamente simples, esta técnica fornece informações valiosas sobre o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, os processos envolvidos na fosforilação oxidativa, bem como sobre a elasticidade e permeabilidade da membrana mitocondrial interna (NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

Os resultados dos experimentos anteriores sugerem uma possível interação do MI-D com a membrana mitocondrial interna. Com a finalidade de avaliar se os efeitos do MI-D comprometem propriedades desta membrana, como por exemplo sua elasticidade e permeabilidade, ensaios de inchamento mitocondrial foram desenvolvidos, utilizando-se preparações energizadas pela oxidação de substratos, ou não energizadas.

3.6.1 Efeitos do MI-D Sobre o Inchamento de Mitocôndrias Energizadas

Neste trabalho, as medidas de “swelling” mitocondrial foram feitas conforme sugerido por MUSTAFA et al. (1966). O inchamento mitocondrial foi conduzido na presença de acetato de sódio e, como substrato oxidável o glutamato de sódio. A figura 31 mostra o efeito do MI-D sobre o “swelling” mitocondrial nestas condições experimentais. O traçado A da figura 31 corresponde ao ensaio controle, realizado na ausência do composto mesoiônico. Nestes experimentos, em que as mitocôndrias estavam incubadas em meio apropriado, já contendo o acetato de sódio, a adição do glutamato desencadeou o aumento do volume mitocondrial, tendo em vista a diminuição da absorbância observada.

A capacidade de contração da membrana mitocondrial, por sua vez, pode igualmente ser avaliada através da reversão do inchamento mitocondrial. Esta contração resulta da adição de inibidores da cadeia respiratória ou da F_1F_0 ATPase. Nestes experimentos, a reversão do inchamento mitocondrial foi alcançada pela adição de rotenona, reforçando que o inchamento é dependente da transferência de elétrons via NADH-desidrogenase.

Nos experimentos mostrados nos traçados B-E da figura 31, o MI-D foi incubado por dois minutos com as preparações mitocondriais, em meio contendo acetato de sódio, precedente à adição do glutamato. Verifica-se que a presença do MI-D, mesmo em baixas concentrações e na ausência do substrato oxidável, causou algum grau de “swelling” mitocondrial

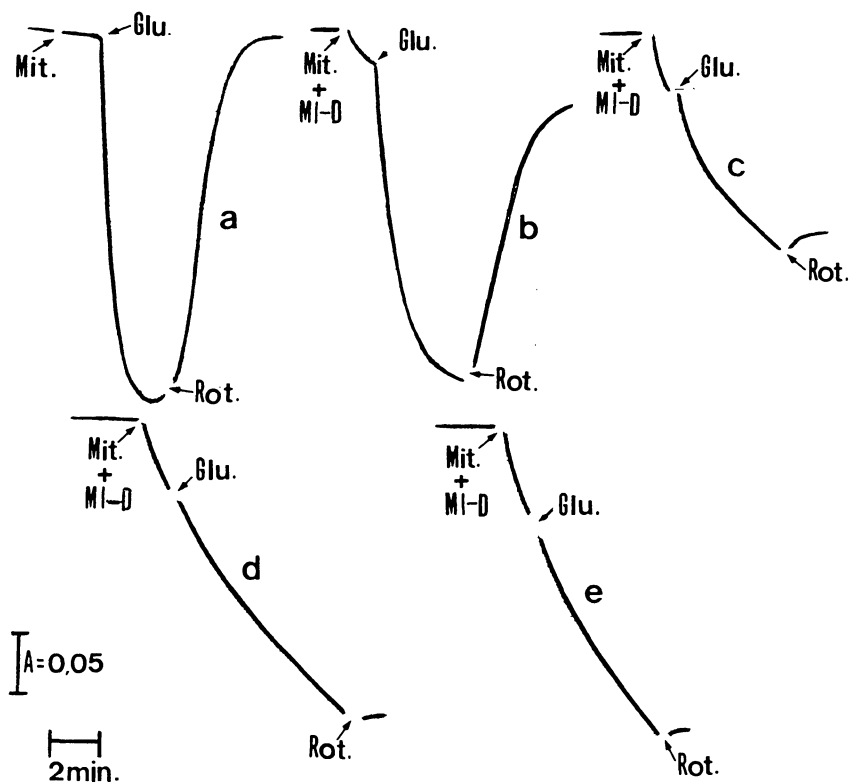


FIGURA 31. Efeitos do MI-D sobre o inchamento de mitocôndrias, energizadas, na presença de íons sódio. Mit.- mitocôndria; Glu.- glutamato de sódio; Rot.- rotenona. MI-D estava presente nas concentrações: a. 0 ; b.15; c. 38; d. 50, e. 80 nmols.mg⁻¹ de proteína mitocondrial. O inchamento e sua reversão foram induzidos pela adição de glutamato de sódio 15 mmols.L⁻¹ e rotenona 4 μmols.L⁻¹, respectivamente. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 2.7.4.1. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

(Figura 31B-E), sendo este efeito mais acentuado para as maiores concentrações (Figura 31 D e E). A análise dos traçados B e C desta figura mostra que, embora o MI-D (concentrações de 15 e 38 nmols.mg⁻¹ proteína) tenha promovido este inchamento inicial, o processo continuou dependente da adição do substrato oxidável, e, nestas condições, o MI-D levou a uma progressiva diminuição do “swelling”. Entretanto, conforme pode ser observado nos traçados D e E da mesma figura, concentrações mais elevadas de MI-D induzem a um “swelling” independente da adição do substrato e irreversível, a partir de 38 nmols.mg⁻¹ proteína mitocondrial.

Considerando que a extensão do inchamento mitocondrial é determinada pelo potencial eletroquímico de prótons; que a velocidade do inchamento resulta da permeabilidade da membrana mitocondrial; que a velocidade de contração reflete a velocidade de redução do potencial eletroquímico e, por fim, que a amplitude de tal contração é determinada pelo grau de elasticidade da membrana, pode-se concluir que os resultados obtidos nestes experimentos são totalmente compatíveis aos já descritos neste trabalho, ou seja, a inibição da velocidade do estado III e, principalmente, o efeito desacoplador do MI-D. Portanto, a inibição do trabalho osmótico pelo composto mesoiônico resulta do colapso do gradiente de prótons, efeito característico de um desacoplador. Sendo assim, considerando que a entrada de Na⁺ está condicionada ao potencial formado, esta diminuição da amplitude do “swelling” poderia ser esperada. Um efeito mais drástico sobre a membrana, comprometendo sua elasticidade, parece também comprovado a partir da observação de que o “swelling” se torna irreversível com o aumento da concentração do composto mesoiônico.

Os resultados mostrados nos traçados D, E da figura 31 são de interpretação mais difícil e conduzem a uma comparação com aqueles obtidos para o $\Delta\psi$. Observa-se o que MI-D nas doses de 65 e 80 nmols.mg⁻¹ proteína causou o colapso do $\Delta\psi$ (figura 29). Considerando que a entrada de íons sódio é dependente deste potencial, esperar-se-ia que o inchamento da organela não ocorresse nestas condições. Entretanto, tal inchamento ocorreu, como

resultado, provavelmente, de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial. Constitui ainda especulação definir-se se este aumento da permeabilidade ao sódio resulte da troca do cátion por prótons provenientes do MI-D, liberados na matriz mitocondrial. Em relação a esta questão, em mitocôndrias funcionais, os carreadores capazes de promover o antiporter Na^+/H^+ (ou K^+/H^+) são importantes à manutenção do potencial eletroquímico de prótons (Δp), vez que o potencial de membrana ($\Delta\psi$) em mitocôndria energizada, de -180 mV, poderia levar influxo de cátions para a matrix mitocondrial, resultando no inchamento da organela. Estes carreadores evitam que isto ocorra, ao permitirem a troca de cátions presentes na matriz mitocondrial por prótons do espaço intermembranas. Este efluxo de cátions é favorecido pelo ΔpH , de aproximadamente -0,5, equivalente a concentração de três vezes mais prótons no espaço intermembranas em relação à matriz (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). A presença de um agente desacoplador, como o MI-D, resultaria, entre outros efeitos, no colapso do ΔpH , com o fornecimento de prótons suficientes para serem trocados por Na^+ , determinando o inchamento da organela. Isto poderia justificar o aumento da amplitude do inchamento para as maiores dose de MI-D (50 e 80 nmols.mg⁻¹ proteína) em relação a dose de 38 nmols.mg⁻¹ proteína.

Portanto, o MI-D exerce dois tipos de efeitos, dependentes da concentração: 1) em baixas concentrações (15 e 38 nmols.mg⁻¹ proteína - figura 31 B e C), o composto inibe o inchamento mitocondrial devido ao colapso do potencial eletroquímico de prótons, dificultando a entrada de Na^+ ; 2) em altas concentrações (50 e 80 nmols.mg⁻¹ proteína - figura 31 D e E), o composto promove “swelling” em condições em que o potencial eletroquímico de prótons foi completamente colapsado. Esta última observação é de explicação mais difícil. De todo modo, pode-se supor que o inchamento ocorra nesta condição porque a permeabilidade da membrana foi alterada.

Por fim, os resultados do MI-D sobre o inchamento de mitocôndrias energizadas são coerentes com os efeitos já discutidos neste trabalho, e sugerem, fortemente, a sua interação com a membrana mitocondrial interna.

3.6.2 Efeitos do MI-D Sobre o Inchamento de Mitocôndrias Desenergizadas

A avaliação do “swelling” em mitocôndrias desenergizadas é importante porque descarta a interferência do MI-D sobre alvos enzimáticos da cadeia respiratória, o que poderia restringir o inchamento.

Mitocôndrias intactas, na ausência de substrato oxidável, são pouco permeáveis ao K^+ . Esta permeabilidade pode ser aumentada pela adição do ionóforo valinomicina, um carreador móvel que catalisa também o uniporte de Cs^+ , Rb^+ , K^+ e NH_4^+ (PRESSMAN, 1976; TZAGOLOFF, 1982; NICHOLLS & FERGUSON, 1992). Por não apresentar carga, nem resíduos ionizáveis, a valinomicina adquire a carga do metal, que se encontra complexado no centro polar da molécula. Tanto a forma complexada, como a não complexada da valinomicina são capazes de transitar pela membrana mitocondrial (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). Portanto, no inchamento mitocondrial induzido em suspensão de mitocôndrias pela adição de valinomicina e sal de potássio, a velocidade e a amplitude deste inchamento indicam a velocidade do transporte de K^+ (TZAGOLOFF, 1982). Considerando que os efeitos do MI-D sobre a velocidade respiratória e fosforilação oxidativa estão relacionados à possível inserção e/ou interação da droga com a membrana mitocondrial interna, foram realizados experimentos de inchamento mitocondrial na presença de valinomicina e nitrato de potássio. Para eliminar uma eventual interferência do potencial eletroquímico de prótons - gerado pela oxidação de substratos endógenos -, foram incluídos nos experimentos os inibidores da cadeia respiratória, rotenona e antimicina. Os resultados apresentados na figura 32 mostram que o MI-D causou uma redução de 30% na amplitude do “swelling” em todas as doses investigadas (12-80 nmols.mg⁻¹ proteína), porém, este efeito não foi dependente das doses empregadas. Este resultado indica que o composto interfere no “trânsito” do ionóforo através da membrana, impossibilitando o acesso dos íons K^+ à matriz mitocondrial. Como o trânsito do ionóforo, por sua vez, depende da fluidez da membrana, é pertinente a proposição de que o MI-D ao interferir no “swelling”, dirigido pelo potencial de difusão de K^+ mais valinomicina, esteja afetando a fluidez desta membrana.

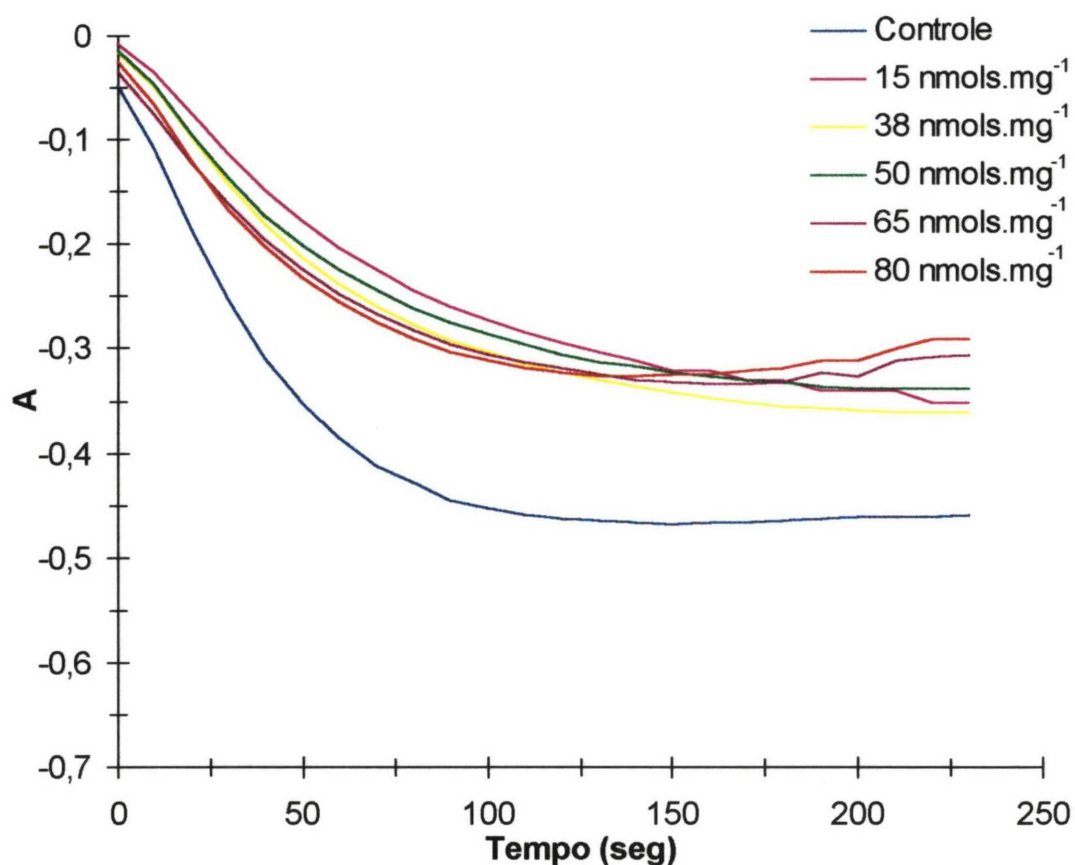


FIGURA 32. Efeitos do MI-D sobre o inchamento induzido por valinomicina, na presença de potássio, em mitocôndrias de fígado de rato desenergizadas. MI-D estava presente no sistema de incubação, nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de materiais e métodos, item 2.7.4.2.1. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

Vale ainda ressaltar, que ao final do experimento de inchamento (a partir de 150 segundos), foi verificada uma discreta contração da organela, para as doses de 65 e 80 nmols.mg⁻¹ proteína, em todos os ensaios realizados. Este efeito é decorrente do efluxo de K⁺, resultante, possivelmente, da troca com os prótons liberados pelo MI-D na matriz mitocondrial. Este efeito, embora discreto, não pode ser ignorado devido a sua reprodutibilidade. Desacopladores clássicos como o FCCP e o DNP, promovem efeitos similares (HARRIS et al., 1967; PRESSMAN et al., 1967).

Uma outra forma de avaliar o “swelling” em preparações de mitocôndrias desenergizadas envolve o uso do ionóforo nigericina e um sal de potássio. Ao contrário da valinomicina, a nigericina é um ionóforo que libera um próton ao ligar um cátion em sua estrutura, formando um complexo neutro que pode se difundir através da membrana. Este ionóforo apresenta seletividade para os cátions ligantes na seguinte ordem: K⁺ > Rb⁺ > Na⁺. A forma protonada da nigericina também apresenta mobilidade, o que permite ao ionóforo catalisar a troca eletroneutra de K⁺ por H⁺. Desta forma, o “swelling” somente ocorrerá se for adicionado ao sistema um desacoplador (TZAGOLOFF, 1982; NICHOLLS & FERGUSON, 1992).

Com o objetivo de comprovar o efeito desacoplador do MI-D - liberação de prótons na matriz mitocondrial -, foram realizados os experimentos de inchamento mitocondrial na presença de nigericina e sais de potássio. Nos resultados apresentados na figura 33 verifica-se que nenhum “swelling” ocorre na dose de 15 nmols de MI-D. mg⁻¹ de proteína. Porém, nas concentrações de 38 a 80 nmols. mg⁻¹ proteína o composto MI-D induziu o inchamento mitocondrial, sendo este efeito dose-dependente. Na maior dose avaliada, 80 nmols. mg⁻¹ proteína, verifica-se que o composto mesoiônico promove a contração da organela. Pode-se especular que tal contração resulte do aumento da concentração de prótons no exterior da organela, gerando um gradiente capaz de dirigir a reentrada de prótons na matriz, com conseqüente efluxo de K⁺.

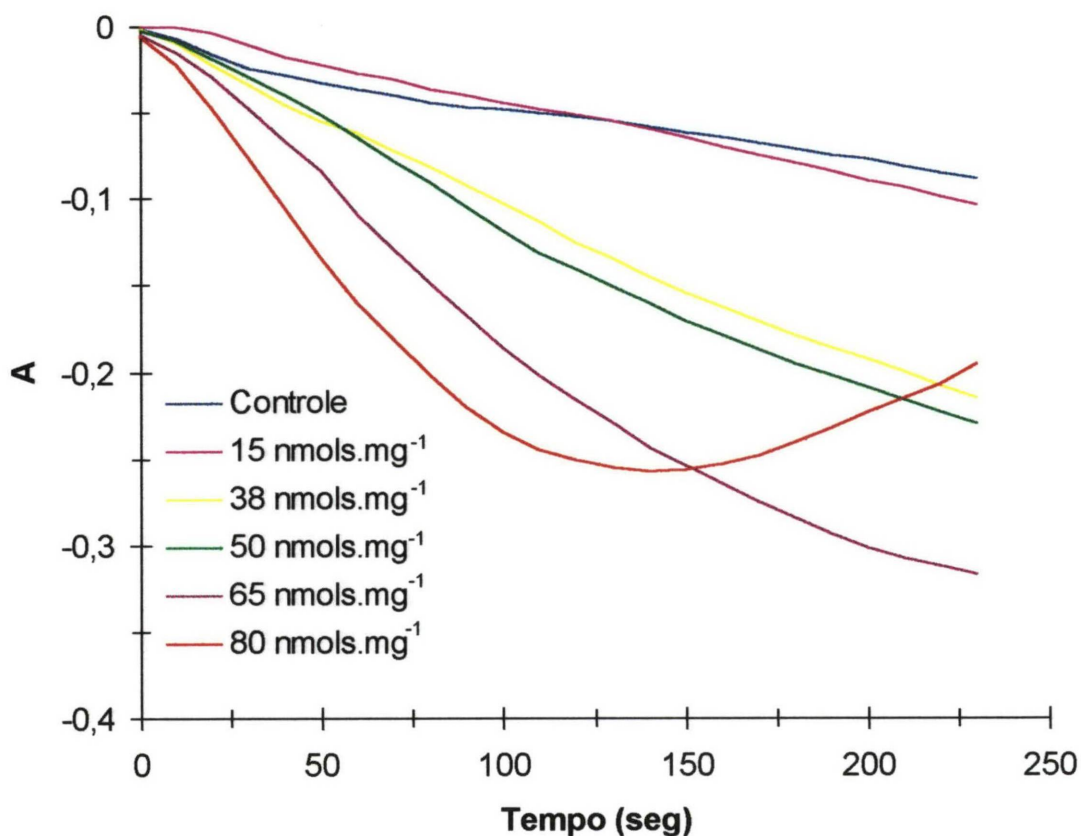


Figura 33. Efeitos do MI-D sobre o inchamento induzido por nigericina, em presença de potássio, em mitocôndrias de fígado de rato desenergizadas. MI-D estava presente no sistema de incubação, nas concentrações indicadas. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 2.7.4.2.2. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

Estes resultados reiteram o efeito desacoplador do MI-D e sugerem, mais uma vez, que a droga interage com a membrana mitocondrial interna. Tal interação pode resultar na liberação do próton dissociável de sua estrutura, ou no aumento da permeabilidade desta membrana a prótons.

3.7 Efeitos do MI-D Sobre a Fluidez de Membranas

Os efeitos do MI-D descritos até aqui caracterizam este composto como um novo agente desacoplador. Tal efeito parece estar diretamente relacionado à sua interação com a membrana mitocondrial, como sugerido pela inibição do “swelling” induzido por valinomicina e K^+ .

Com a finalidade de esclarecer tal possibilidade, foram realizados experimentos de polarização de fluorescência, utilizando-se, para tanto, as sondas DPH e DPH-PA, de parâmetros físicos similares e de localização bem definida em membranas. Estas sondas são amplamente utilizadas para o monitoramento da fluidez de diferentes regiões da bicamada (TROTER & STORCH, 1989; KITAGAWA et al., 1991). A polarização de fluorescência do DPH e DPH-PA informa sobre a difusão rotacional das duas sondas, totalmente dependente da fluidez da membrana (SHINITZKY & BARENHOLZ, 1974; LITMAN & BARENHOZ, 1982). A sonda DPH localiza-se no centro hidrofóbico da bicamada e fornece informações sobre esta região. Por sua vez, a DPH-PA, permanece ancorada junto à região polar do fosfolípido, fornecendo informações sobre a fluidez da bicamada, próxima à superfície (TROTER & STORCH, 1989). Ressalta-se que o significado do termo fluidez é oposto ao da polarização de fluorescência das sondas DPH ou DPH-PA, ou seja, quanto menor a fluidez, maior a polarização de fluorescência e vice-versa.

No presente estudo, utilizou-se como modelos experimentais, membranas artificiais e naturais. Como modelo de membranas artificiais foram utilizados liposomas constituídos de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC). Como se sabe, as dispersões de lecitina em meio aquoso se constituem, quase que

exclusivamente, de bicamadas lamelares (ANTUNES-MADEIRA et al., 1995). Porém, a conformação e o empacotamento dos lipídios na bicamada estão sujeitos a reorganização. Estas transições podem ser induzidas por mudanças na temperatura, no pH, no potencial de membrana, na concentração de íons e, ainda, devido à presença de drogas (JAIN & WU, 1977).

Induzida por mudanças na temperatura, a transição do lipídio envolve a passagem do estado gel para o de líquido cristalino. Durante a fase gel, as cadeias acil estão em forma altamente ordenada. Tal organização exige que todas as ligações carbono-carbono (C-C) estejam na conformação trans. Já no estado de líquido-cristalino, algumas ligações C-C estão na conformação “gauche” (JAIN & WU, 1977).

Para a interpretação dos resultados obtidos no presente estudo faz-se necessário considerar os seguintes aspectos:

- a) a conformação “gauche” entre as ligações C-C é mais provável quanto mais afastado está o carbono do grupo carboxil em direção ao final metil do ácido graxo. Tanto acima como abaixo da temperatura média de transição (T_m) a porção da cadeia hidrocarbonada próxima do centro da bicamada é mais fluída ou desorganizada do que a porção da cadeia próxima ao grupo polar;
- b) a orientação média e o empacotamento da cadeia hidrocarbonada muda abruptamente a partir do nono carbono do grupo carboxil, indicando que a região compreendida entre os C_1 e C_9 possuem um parâmetro de ordem constante. No final das cadeias hidrocarbonadas (a partir de C_{10}), há uma considerável desordem;
- c) a forma da transição térmica de fase resulta da interação altamente cooperativa entre as moléculas de lipídeo. Portanto, o tamanho da unidade cooperativa que sofre transição é regulado pela interação na região C_1 e C_9 das cadeias acil;

d) quando o perfil de transição de fase de uma bicamada lipídica é modificado por um aditivo, isto significa que o aditivo perturba a organização da bicamada. O tipo de perturbação é indicado pela forma do perfil de transição .

Neste estudo, o traçado da transição de fase, dependente da temperatura, será denominado de perfil termotrópico.

Os efeitos do MI-D na polarização de fluorescência (P) do DPH e DPH-PA , dependente da temperatura, em liposomas multilamelares de DMPC, estão demonstrados nas figuras 34 a 37. A temperatura média de transição de fase (T_m), para as sondas DPH e DPH-PA, nas curvas controle (ausência da droga), foi estimada em 23,5 °C, valor semelhante ao descrito por outros autores que utilizaram esta mesma metodologia (ANTUNES-MADEIRA et al.,1991,1995). Esta T_m corresponde à temperatura na qual os fosfolipídios passam do estado de gel para o de líquido-cristalino. Abaixo da T_m as cadeias acil dos ácidos graxos estão empacotadas de forma ordenada, o que restringe o movimento das sondas, resultando em altos valores de P. Acima da T_m as cadeias acil dos ácidos graxos estão desordenadas e possuem uma maior liberdade de movimento, permitindo, assim, que as sondas também se movimentem com maior facilidade, o que resulta em valores mais baixos de P.

Conforme pode ser observado nas figuras 34 e 35, o MI-D na concentração de $5\mu\text{mols.L}^{-1}$, não afetou a polarização de fluorescência das sondas DPH (figura 34) e DPH-PA (figura 35) nas temperaturas estudadas, que, em intervalos de 2°C, variaram de 10° a 42°C. Porém, na concentração de $15\mu\text{mols.L}^{-1}$, o MI-D aumentou significativamente a polarização de fluorescência do DPH (figura 36) e DPH-PA (figura 37) a partir da temperatura de 22°C. Verificou-se tal efeito na fase fluida da preparação. O valor calculado da T_m aumentou de 23,5 (DPH e DPH-PA) para 25°C na presença da droga, para as duas sondas. Estes resultados sugerem que o MI-D: a) é capaz de inserir-se na bicamada lipídica, promovendo distúrbios tanto na fase hidrofílica como hidrofóbica dos liposomas de DMPC; b) promove a diminuição da fluidez

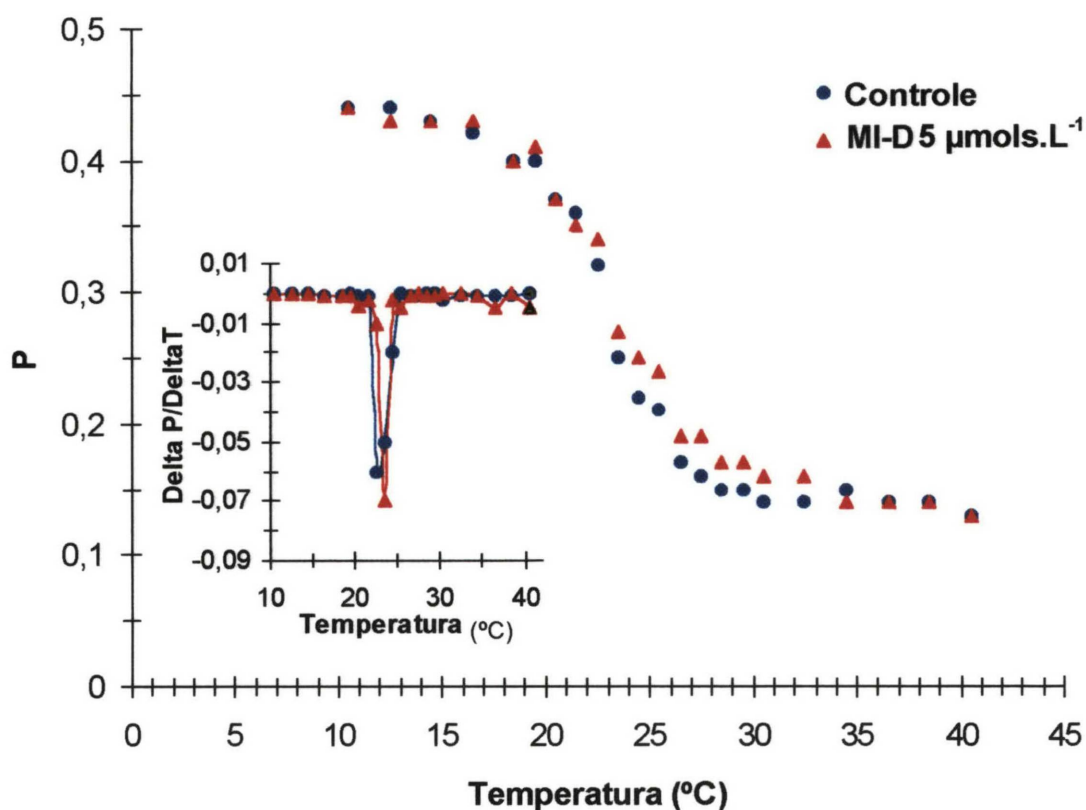


FIGURA 34. Efeitos do MI-D ($5\mu\text{mols.L}^{-1}$) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) do DPH. O encarte representa a polarização diferencial do DPH ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, itens 2.8.2 e 2.8.3. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

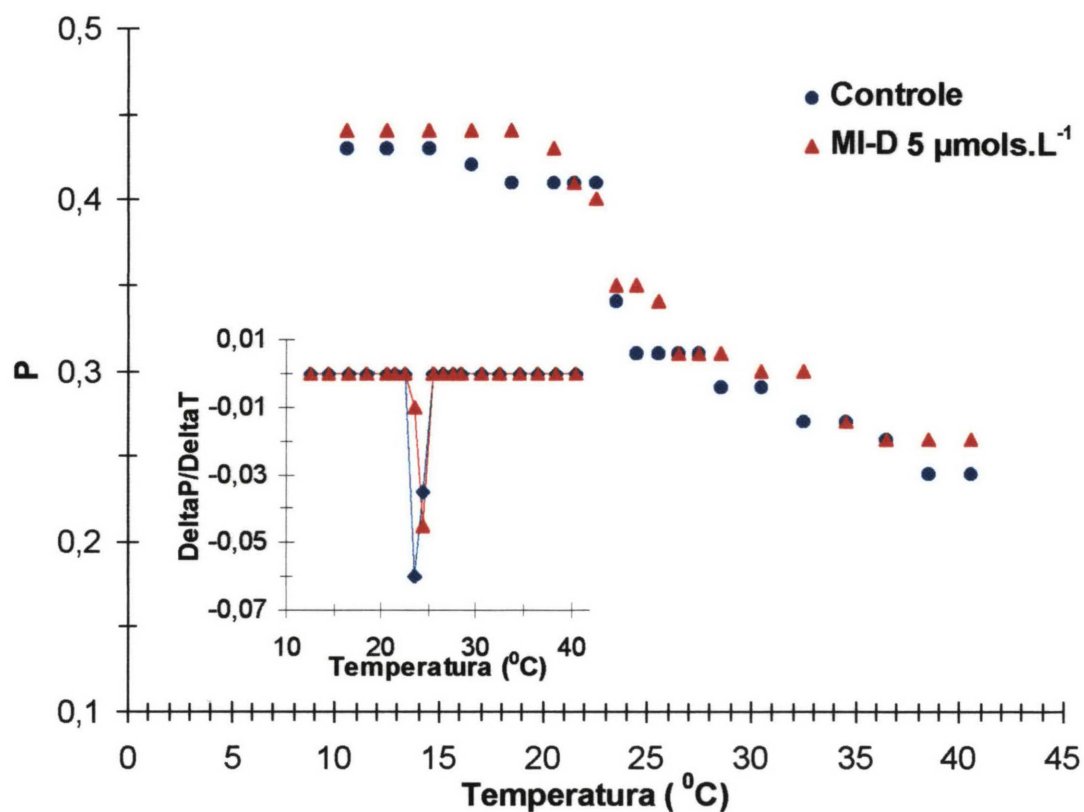


FIGURA 35. Efeitos do MI-D ($5 \mu\text{mols.L}^{-1}$) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) do DPH-PA. O encarte representa a polarização diferencial do DPH-PA ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, itens 2.8.2 e 2.8.3. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

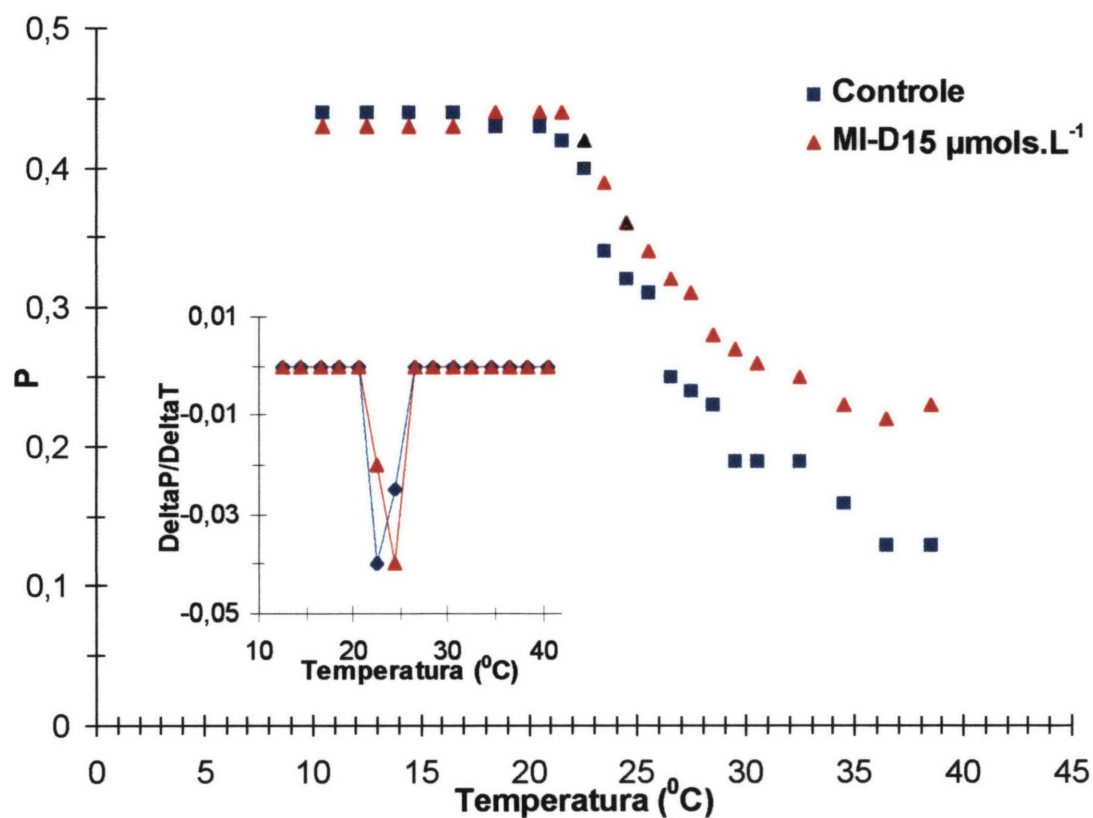


FIGURA 36. Efeitos do MI-D ($15 \mu\text{mols.L}^{-1}$) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) do DPH. O encarte representa a polarização diferencial do DPH ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, itens 2.8.2 e 2.8.3. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

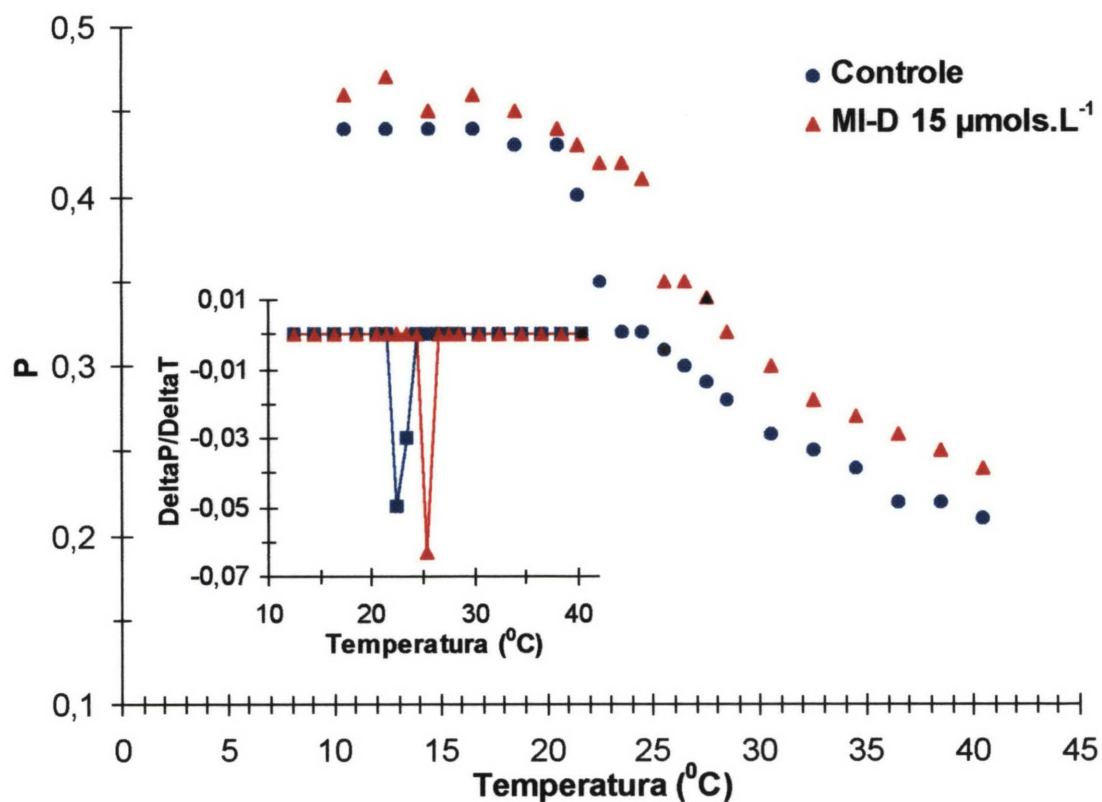


FIGURA 37. Efeitos do MI-D ($15 \mu\text{mols.L}^{-1}$) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) do DPH-PA. O encarte representa a polarização diferencial do DPH-PA ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, itens 2.8.2 e 2.8.3. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

da bicamada lipídica (enrijecimento), conforme o evidenciado pelo aumento dos valores de P na fase fluída da preparação.

Considerando os resultados observados e a possibilidade de que os efeitos desacopladores do MI-D dependam de sua interação com a membrana mitocondrial, tornou-se conveniente avaliar de que forma os desacopladores clássicos afetam a fluidez de membranas. O desacoplador escolhido foi o FCCP - utilizado na concentração de $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ -, sendo determinados os valores de polarização da sonda DPH em liposomas de dimiristoil-fosfatidilcolina. Como se observa na figura 38, o efeito do FCCP é semelhante ao constatado para o MI-D, ou seja, o desacoplador exerce um efeito condensante sobre a fase fluída da membrana, com a temperatura média de transição aumentando em aproximadamente 2°C em relação ao controle. Conforme reconhecido na literatura, o FCCP é capaz de transitar através da membrana mitocondrial, liberando na matriz um próton de sua estrutura. Tanto a forma protonada como a desprotonada do desacoplador possuem trânsito livre na membrana mitocondrial. A forma aniônica do FCCP preserva sua capacidade de movimento através da membrana mitocondrial, em razão de um extenso sistema de orbitais π presente em sua estrutura. A presença destes orbitais promove a deslocalização de cargas, mantendo a sua lipofilicidade (NICHOLLS & FERGUSON, 1992). O MI-D, tal como o FCCP, possui um próton dissociável bem como um sistema de orbitais π em sua estrutura. Esta particularidade, sugere que o efeito desacoplador do MI-D possa resultar de um mecanismo semelhante ao descrito para o FCCP.

Os efeitos do MI-D sobre os liposomas de DMPC demonstram que o MI-D, nas condições avaliadas, pode interagir tanto com as regiões mais hidrofóbicas quanto com as mais hidrofílicas da bicamada de fosfolipídios. Entretanto, os liposomas de DMPC, constituídos de ácidos graxos saturados, diferem da membrana mitocondrial, rica em ácidos graxos insaturados e proteínas. Portanto, com a finalidade de avaliar a interação do MI-D com membranas mais fluídas que aquelas de DMPC, liposomas de membranas naturais foram preparados a partir de mitocôndrias isoladas. Tal como

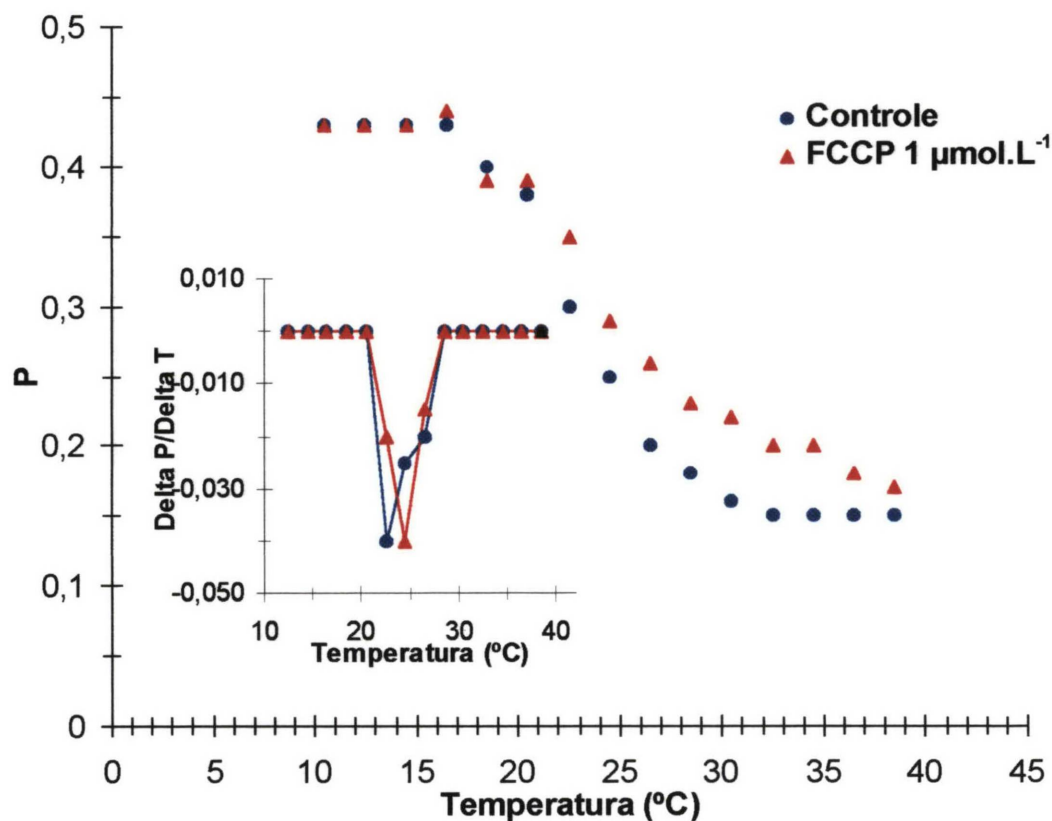


FIGURA 38. Efeitos do FCCP ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) do DPH. O encarte representa a polarização diferencial do DPH ($\Delta P/\Delta T$) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, itens 2.8.2 e 2.8.3. Os valores representam o perfil de dois experimentos independentes.

anteriormente, foram utilizadas as sondas DPH e DPH-PA, e avaliados os efeitos do MI-D nas concentrações de $5\mu\text{mols.L}^{-1}$ e $25\mu\text{mols.L}^{-1}$. Os resultados destes experimentos estão apresentados nas figuras 39 a 42.

O perfil apresentado para todos os ensaios de polarização de fluorescência utilizando liposomas de membrana natural, diferem daqueles observados para os liposomas de DMPC, já discutidos. Isto porque a membrana mitocondrial, à semelhança de outras membranas biológicas, encontra-se, no intervalo de 10° e 40°C no estado fluído, sendo que variações na temperatura levam a mudanças no grau desta fluidez (ÖHKI, 1988).

Para as duas sondas utilizadas, DPH (figura 39) e DPH-PA (figura 40), o MI-D, em baixa concentração ($5\mu\text{mols.L}^{-1}$), não alterou a fluidez dos liposomas de membrana natural, vez que os valores de P para as condições do controle e na presença do MI-D foram praticamente idênticos. A ausência de efeitos da droga na concentração de $5\mu\text{mols.L}^{-1}$ é concordante com aquela verificada para os liposomas de DMPC, apresentados nas figuras 34 e 35.

Em contraste, na concentração de $25\mu\text{mols.L}^{-1}$, o composto apresentou um efeito condensante, evidenciado pelo aumento dos valores da polarização, para as sondas DPH (figura 41) e DPH-PA (figura 42) utilizadas. Este efeito é compatível com aquele verificado na fase fluída dos liposomas de DMPC, na concentração de MI-D $15\mu\text{mols.L}^{-1}$ (figuras 36 e 37).

Conclui-se, destes resultados, que o MI-D se instala na membrana mitocondrial, afetando tanto os centros hidrofóbicos, monitorados pela sonda DPH, quanto a região externa, mais hidrofílica, monitoradas pela sonda DPH-PA, diminuindo sua fluidez. A interação do MI-D com a membrana mitocondrial pode comprometer todos os processos dependentes de sua integridade, como o transporte de substratos para a cadeia respiratória e a formação do potencial eletroquímico de prótons, dentre outros. Desta forma, pode-se propor que os efeitos desacopladores do MI-D possam resultar, ao menos em parte, de sua inserção na membrana mitocondrial.

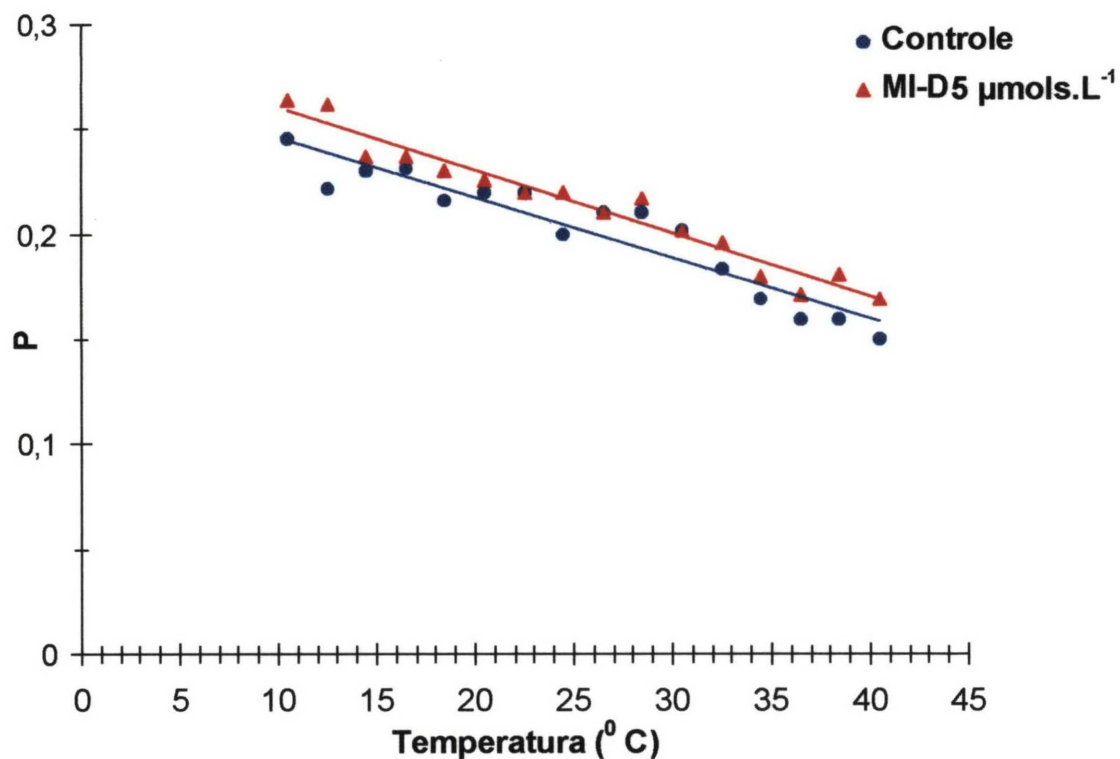


FIGURA 39. Polarização de fluorescência (P) do DPH em membrana mitocondrial, em função da temperatura. Efeitos do MI-D $5\mu\text{mols.L}^{-1}$. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, itens 2.8.2 e 2.8.3. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo método de regressão linear, obtendo-se os seguintes coeficientes de correlação: 0,9 (controle) e 0,95 (MI-D).

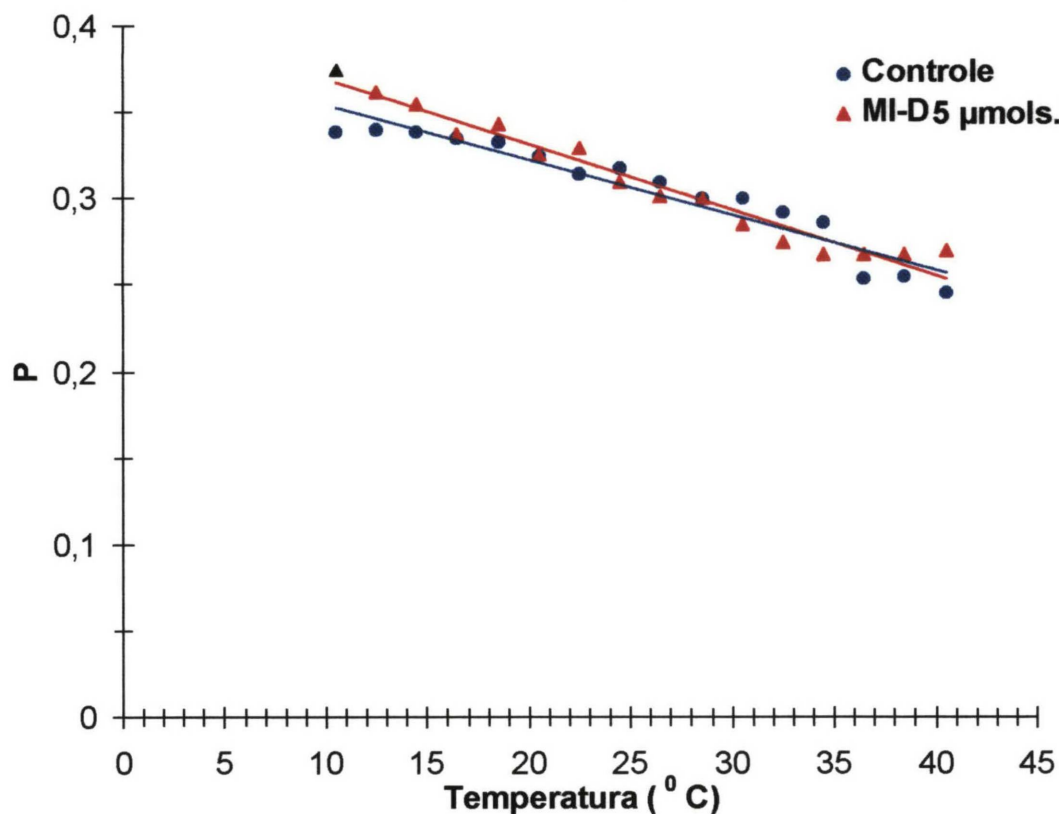


FIGURA 40. Polarização de fluorescência (P) do DPH-PA em membrana mitocondrial, em função da temperatura. Efeitos do MI-D 5 $\mu\text{mols.L}^{-1}$. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, itens 2.8.2 e 2.8.3. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo método de regressão linear, obtendo-se os seguintes coeficientes de correlação: 0,91 (controle) e 0,96 (MI-D).

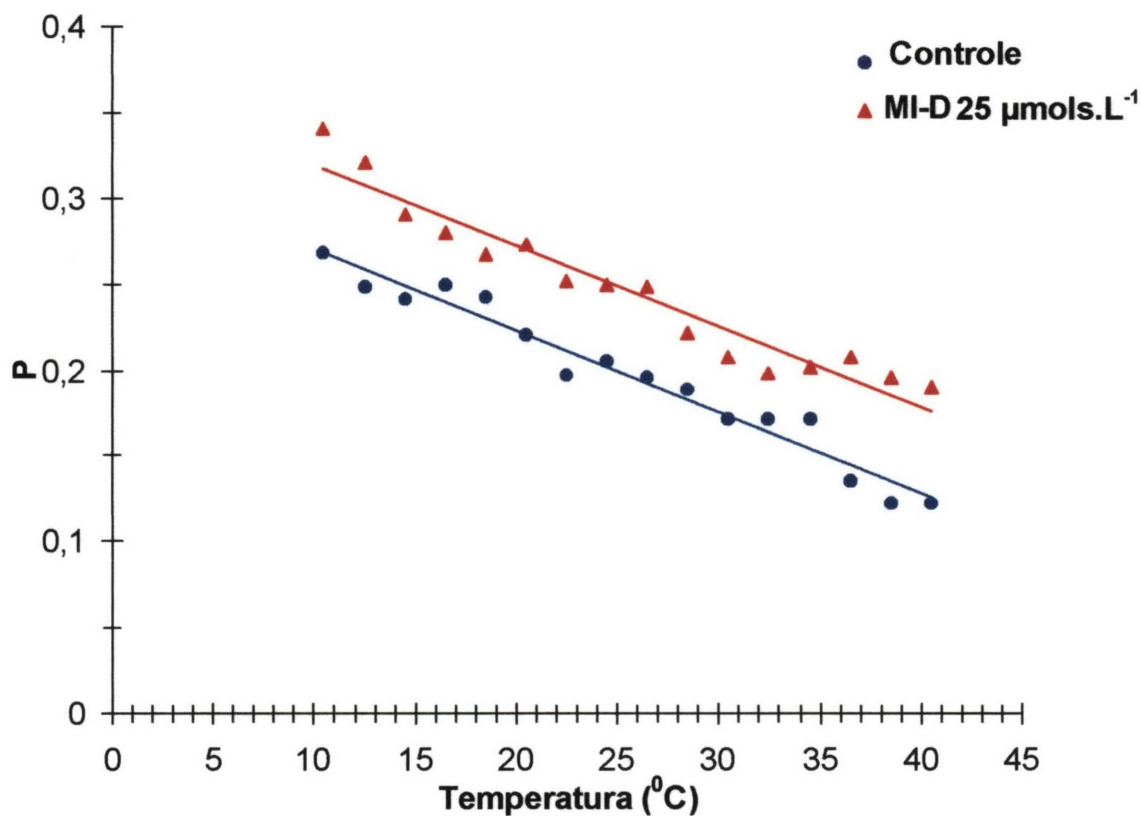


Figura 41. Polarização de fluorescência (P) do DPH em membrana mitocondrial, em função da temperatura. Efeitos do MI-D 25μmols.L⁻¹. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, itens 2.8.2 e 2.8.3. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo método de regressão linear, obtendo-se os seguintes coeficientes de correlação: 0,93 (controle) e 0,96 (MI-D).

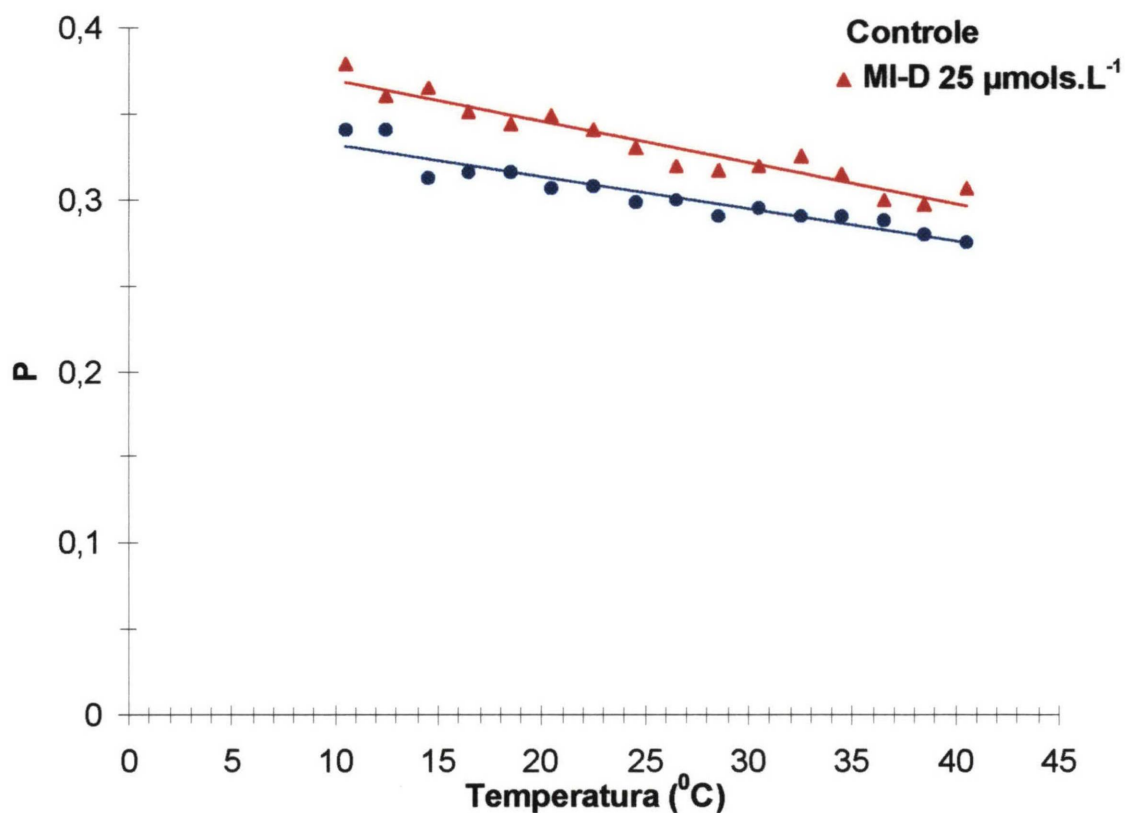


FIGURA 42. Polarização de fluorescência (P) do DPH-PA em membrana mitocondrial, em função da temperatura. Efeitos do MI-D 25µmols.L⁻¹. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, itens 2.8.2 e 2.8.3. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo método de regressão linear, obtendo-se os seguintes coeficientes de correlação: 0,90 (controle) e 0,92 (MI-D).

3.8 Efeitos do MI-D Sobre Células Cultivadas

Os efeitos do MI-D sobre fígado perfundido e mitocôndrias isoladas, indicam que a droga compromete drasticamente as funções energéticas celulares. Porém, enquanto no fígado o acúmulo de glicogênio e a glicogenólise representam funções diferenciadas deste órgão, nas células transformadas, a capacidade de acumular o polissacarídeo é limitada, provavelmente por exibirem um alto fluxo glicolítico (WEBER, 1977a,b). Desta forma, seria pouco provável visualizar, nestas células, efeitos do MI-D relacionados à glicogenólise, como aqueles mostrados nos experimentos de perfusão de fígado. Assim, com o objetivo de investigar a ação do xenobiótico a nível celular, os efeitos do MI-D foram avaliados sobre o metabolismo oxidativo de duas linhagens celulares: células L1210, linfócitos leucêmicos que se desenvolvem em suspensão e, células HeLa, de origem epitelial, provenientes de carcinoma de cervix uterino humano. Nas células L1210, avaliou-se os efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio e glicólise. Já em células HeLa, foram avaliados os efeitos da droga sobre a viabilidade celular, consumo de oxigênio, bem como sobre a morfologia e ultraestrutura da monocamada .

3.8.1 Efeitos do MI-D Sobre Alguns Parâmetros do Metabolismo Oxidativo de Células L1210 e Células HeLa

Na figura 43 estão demonstrados os efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio, de células L1210 e células HeLa. Os resultados observados na figura 43 (traçados A e B) , correspondem aos ensaios realizados em células intactas, sem a presença de substratos exógenos. Verifica-se que a adição do MI-D, nestas condições, resultou na inibição da velocidade do consumo de oxigênio. Tal inibição nas células L1210 foi dependente do tempo, passando de 20% nos primeiros minutos da adição do MI-D ($60 \mu\text{mols.L}^{-1}$), para 50% ao final do experimento. Já para as células HeLa a inibição observada foi de 40%, mantendo-se tal valor constante durante o transcorrer do experimento. Como foram utilizadas células intactas, pode-se concluir, destes resultados, que o

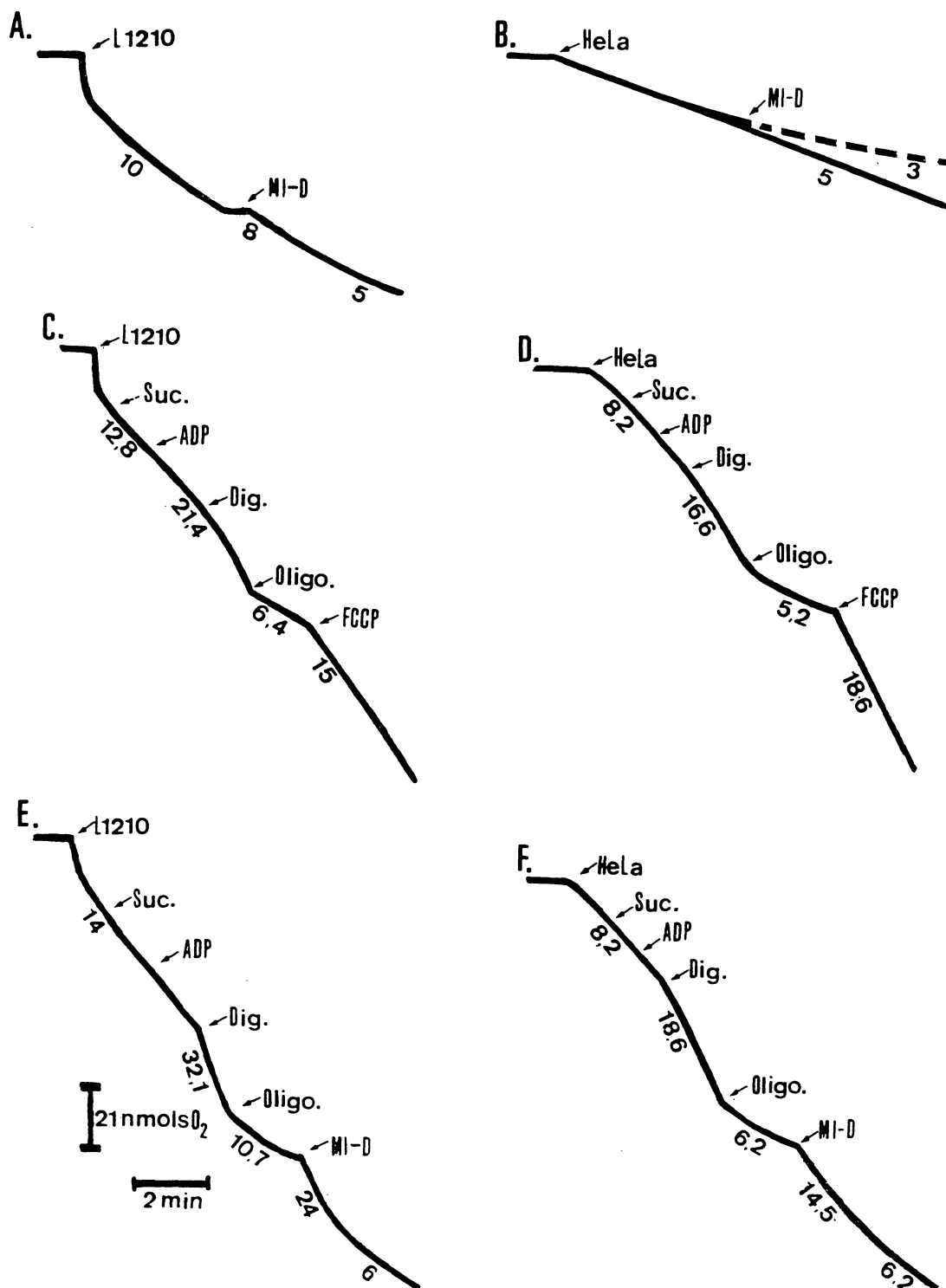


FIGURA 43. Efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio por células HeLa e células L1210. Os traçados A, C e E correspondem às células L1210 e os traçados B, D e F às células HeLa. Adições: **Suc.** succinato de sódio 10 mmols.L⁻¹, **Dig.** Digitonina 8,0 µg, **Oligo.** Oligomicina 4,0 µg. Quando indicado o MI-D e FCCP foram adicionados nas concentrações de 60µmols.L⁻¹ e 1µmol.L⁻¹, respectivamente. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos item 2.9.7. Os traçados são representativos de três experimentos independentes.

composto mesoiônico pode atravessar a membrana plasmática e tem a mitocôndria como um dos seus alvos intracelulares. Para interpretação dos resultados observados, deve-se considerar que em células intactas, como o observado em fígado perfundido, sempre há ADP disponível para a fosforilação, prevalecendo, assim, o estado III da respiração. Desta forma, neste modelo experimental, observou-se apenas o efeito inibitório do MI-D sobre o consumo de oxigênio (inibição de 50%), sendo tal efeito compatível com o evidenciado em mitocôndrias isoladas e em fígado perfundido.

Vale ressaltar que a concentração de MI-D capaz de induzir a inibição da respiração em células L1210 e HeLa, é maior do que as responsáveis pelo mesmo efeito em mitocôndrias isoladas (dose de 80 nmols.mg^{-1} proteína correspondente a $31 \text{ } \mu\text{mols.L}^{-1}$). No entanto, considerando-se o caráter lipofílico do MI-D, é possível supor que o composto se distribua entre outros componentes membranares, chegando à mitocôndria em concentração inferior à inicialmente adicionada.

Uma das vantagens de se trabalhar com células isoladas refere-se à possibilidade de análise das atividades mitocondriais "*in situ*". Isto é possível utilizando-se preparações permeabilizadas com digitonina, uma saponina que interage com colesterol das membranas, possibilitando a entrada de substratos antes não permeáveis (BOGUCKA et al., 1990; VERCESI & DOCAMPO, 1992). Tal condição experimental foi utilizada para estudar os efeitos do MI-D. Os traçados C e D da figura 43 são referentes às células L1210 e HeLa, respectivamente. Verifica-se em ambos os casos que a adição de succinato e ADP não modifica a velocidade de consumo de oxigênio, mostrando que estes substratos não têm acesso à célula. Para as células HeLa este fato já era conhecido (CAETANO, 1991). Por sua vez, a adição de digitonina duplica a velocidade de consumo de oxigênio, sendo tal efeito resultante da permeabilização da membrana plasmática e da conseqüente entrada do succinato e ADP à mitocôndria. A subseqüente adição de oligomicina, antibiótico que se liga ao componente OSCP do complexo F_1F_0 ATPase, impedindo a entrada de prótons na matriz mitocondrial, via canal F_0 , e a

conseqüente síntese de ATP (TZAGOLOFF, 1982; NICHOLS & FERGUSON, 1992), inibe o consumo de oxigênio, simulando o estado IV da respiração. É amplamente conhecido que os desacopladores clássicos, como o FCCP, são capazes de reverter a inibição no consumo de oxigênio causada pela adição deste antibiótico (TERADA, 1981). Como se observa na figura 43, traçados C e D, a adição do FCCP ($1\mu\text{mol.L}^{-1}$) promoveu o aumento da velocidade do consumo de oxigênio de 134%, para as células L1210 e de 257%, para as células HeLa, no estado IV induzido por oligomicina. Os traçados E e F da figura 43 são representativos de experimentos onde o MI-D ($60\mu\text{mol.L}^{-1}$) foi adicionado nas mesmas condições. Verifica-se que o composto mesoiônico promoveu um aumento no consumo de oxigênio em aproximadamente 124% e 133% para as células L1210 e HeLa, respectivamente. Ainda nos traçados E e F da figura 43, observa-se que o MI-D após o estímulo inicial no consumo de oxigênio, promove sua inibição, sendo esta de 44% para as células L1210. No caso das células HeLa verifica-se que aos 4 minutos da adição de MI-D também ocorreu uma diminuição do consumo de oxigênio. Estes resultados sugerem que os efeitos do MI-D sobre a cadeia respiratória são dependentes do tempo de exposição ao composto mesoiônico.

Chama a atenção o fato de que o efeito do MI-D difere daquele observado para o FCCP, no que se refere a inibição sobre o consumo de oxigênio. Tal diferença, no entanto poderia ser resultante apenas das diferentes concentrações de MI-D e FCCP utilizadas nos ensaios, ou de diferentes mecanismos pelos quais os dois desacopladores promovem seus efeitos.

Levando-se em conta que os efeitos do MI-D sobre o consumo de oxigênio foram muito semelhantes para as duas linhagens celulares investigadas, optou-se, assim, por avaliar os efeitos do composto mesoiônico sobre a glicólise, apenas em células L1210. Com tal finalidade células L1210 foram incubadas com 5mmol/L de glucose, na presença ou ausência de $60\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D. Foi determinada a produção tanto de lactato quanto de

piruvato. Verificou-se que a produção de piruvato não foi alterada, porém, a produção de lactato aumentou significativamente, como observado na figura 44. O composto mesoiônico promoveu um aumento nos níveis de lactato, de 132 e 36%, com relação ao controle (ausência de MI-D), aos 20 e 40 minutos de incubação, respectivamente. Tal aumento justifica-se pelos efeitos do MI-D sobre a função mitocondrial .

Estes resultados contrapõem-se àqueles observados em fígado perfundido (figura 22, tabela 4), em que se demonstrou a inibição da via glicolítica como verificado pela diminuição nos níveis de piruvato e lactato. No entanto, deve-se considerar que as concentrações de MI-D utilizadas nos experimentos foram diferentes, de $25\mu\text{mols.L}^{-1}$ em fígado perfundido e $60\mu\text{mols.L}^{-1}$ em células L1210. Além disso, os dois modelos experimentais apresentam diferenças metabólicas consideráveis, particularmente no que diz respeito a utilização da glucose. De todo modo, esta aparente discrepância de efeitos sobre a via glicolítica é de difícil interpretação, exigindo um estudo das possíveis ações do MI-D sobre as enzimas desta via.

3.8.2 Efeitos do MI-D Sobre a Viabilidade, Morfologia e Ultraestrutura de Células HeLa

Uma vez esclarecidos os principais efeitos do MI-D relacionados ao metabolismo, particularmente às funções ligadas a energia, é de especial interesse avaliar as ações do composto mesoiônico à nível da morfologia e ultraestrutura celular. Tal interesse resulta do reconhecimento do delicado papel da mitocôndria no balanceamento do complexo equilíbrio entre a vida e a morte da célula (SUSIN et al., 1998). A organela pode induzir a morte celular: 1) por interromper o transporte de elétrons e metabolismo energético; 2) por alterar o potencial redox celular e, 3) por liberar proteínas ativadoras do processo apoptótico (PETIT et al., 1996; SUSIN et al., 1998). Desta forma, neste trabalho, os efeitos causados pelo MI-D sobre a viabilidade, morfologia e ultra estrutura celular foram avaliados em células HeLa. A escolha desta

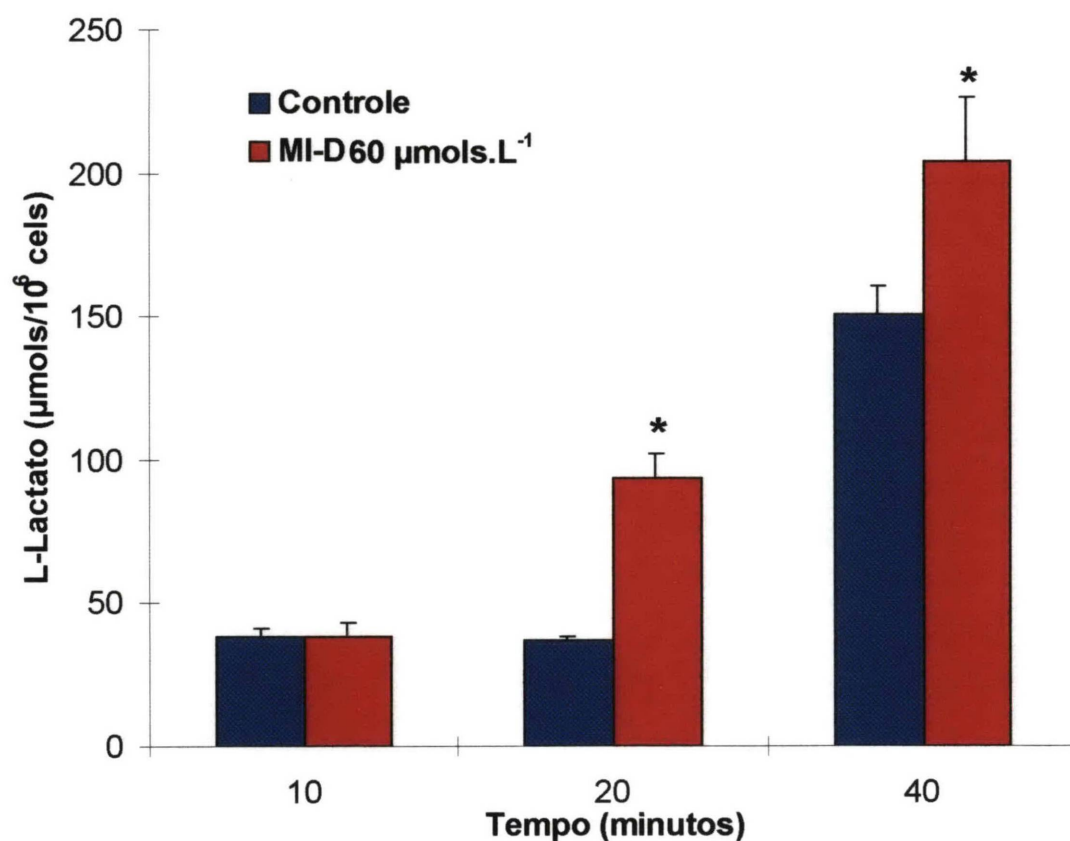


FIGURA 44. Efeitos do MI-D sobre a produção de L-lactato por células L1210. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 2.9.8. Os valores representam a média \pm dp de 5 experimentos independentes. *Valores estatisticamente diferentes do controle (ausência de MI-D) - $p \leq 0,05$

linhagem motivou-se pela simplicidade das condições de cultivo e manuseio, bem como pelo conhecido comportamento destas células em cultura (OLIVEIRA et al., 1989; BASTOS et al., 1990; CAETANO et al., 1992; CAETANO et al., 1997; BABIAK et al., 1998; MELO et al., 1998). As células HeLa constituem-se de uma linhagem contínua proveniente de adenocarcinoma de cervix uterino humano (GEY et al., 1952). Tais células crescem aderidas a superfícies de vidro ou plástico, desenvolvendo-se como monocamadas. Seu cultivo é relativamente simples, exigindo apenas o meio essencial mínimo de Eagle, suplementado com glutamina e soro fetal bovino (10% v/v), sem a necessidade de controle rigoroso dos níveis de O₂ e CO₂ (OLIVEIRA, 1986).

A figura 45 e tabela 6 mostram os efeitos do MI-D sobre a viabilidade celular, avaliada pelo azul de tripan. Nesta técnica, células viáveis, cuja a integridade da membrana celular é preservada, mantêm a habilidade de excluir o corante; enquanto células não viáveis permitem a entrada do azul de tripan, apresentando-se coradas quando observadas ao microscópio óptico. Através desta técnica, observa-se que o composto mesoiônico, em diferentes concentrações, não afeta, de maneira significativa, a viabilidade celular, até sessenta minutos do tratamento. No entanto, deve-se ressaltar que embora seja utilizada frequentemente, esta técnica não permite a visualização detalhada das alterações celulares, sendo necessário o emprego de outras metodologias. Desta forma, decidiu-se avaliar os efeitos do MI-D sobre a morfologia e ultra estrutura da monocamada de células HeLa. As figuras 46 e 47 mostram as células provenientes de culturas de experimentos controle observadas por microscopia óptica, onde se verificam as características epiteliais, citoplasma basófilo e núcleos grandes com um ou mais nucléolos, como é próprio para esta linhagem. Os elementos celulares encontram-se justapostos, constituindo uma monocamada contínua, sendo estes os aspectos normais da monocamada celular (CARNEIRO LEÃO, et al., 1997). A figura 48 mostra resultados dos experimentos nos quais o composto mesoiônico foi adicionado a monocamadas confluentes de células HeLa, na concentração de 25µmols.L⁻¹. Verifica-se que as células apresentaram-se mais arredondadas,

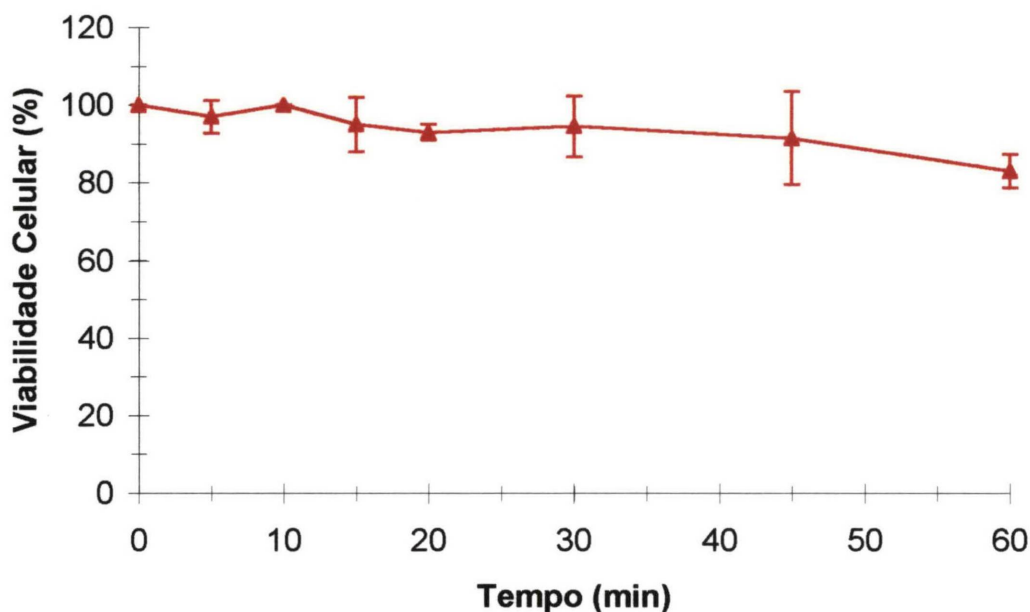


FIGURA 45. Efeitos do MI-D sobre a viabilidade celular. Células HeLa crescidas por 48 horas, foram incubadas na ausência ou presença de MI-D na concentração de $25\mu\text{mols.L}^{-1}$. Nos tempos determinados a viabilidade celular foi determinada conforme descrito em Materiais e Métodos, item 2.9.6. Os valores representam a média \pm dp de dois experimentos.

TABELA 6. Efeitos do MI-D Sobre Viabilidade Celular

MI-D ($\mu\text{mols.L}^{-1}$)	Tempo (min)		
	0	30	60
0	$90 \pm 7,0$	100 ± 0	$97,5 \pm 3,53$
25	$90 \pm 3,5$	$94 \pm 1,4$	$77 \pm 2,82$
50	100 ± 0	$97 \pm 4,24$	$85,5 \pm 13,3$
75	$97 \pm 3,53$	$80 \pm 2,12$	$82,5 \pm 6,3$
100	$91 \pm 4,24$	$87,5 \pm 2,12$	$82,5 \pm 6,36$

Células HeLa crescidas por 48 horas, foram incubadas na ausência ou presença de MI-D nas concentrações indicadas. Nos tempos determinados a viabilidade celular foi determinada, conforme descrito em Materiais e Métodos, item 2.9.6. Os valores representam a média \pm dp de dois experimentos.

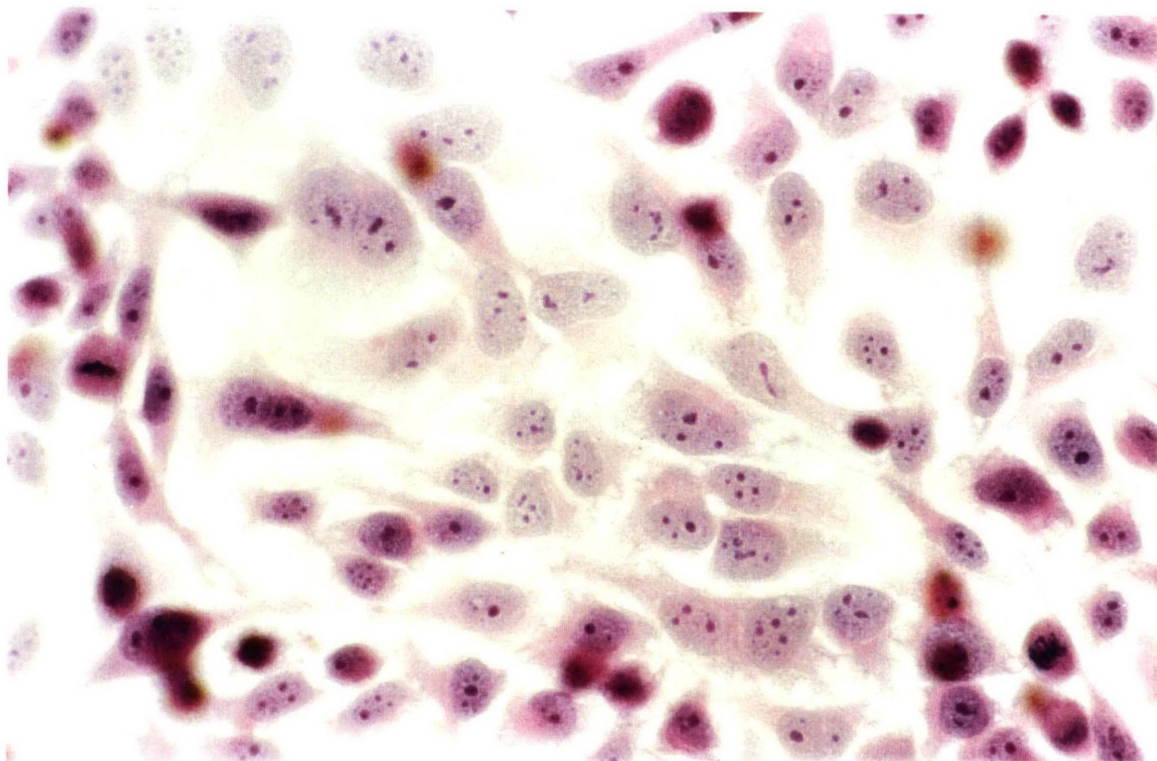


FIGURA 46. Células HeLa: aspectos da monocamada controle observada por Microscopia Óptica. Ampliação original 400x. Coloração Hematoxilina e Eosina.

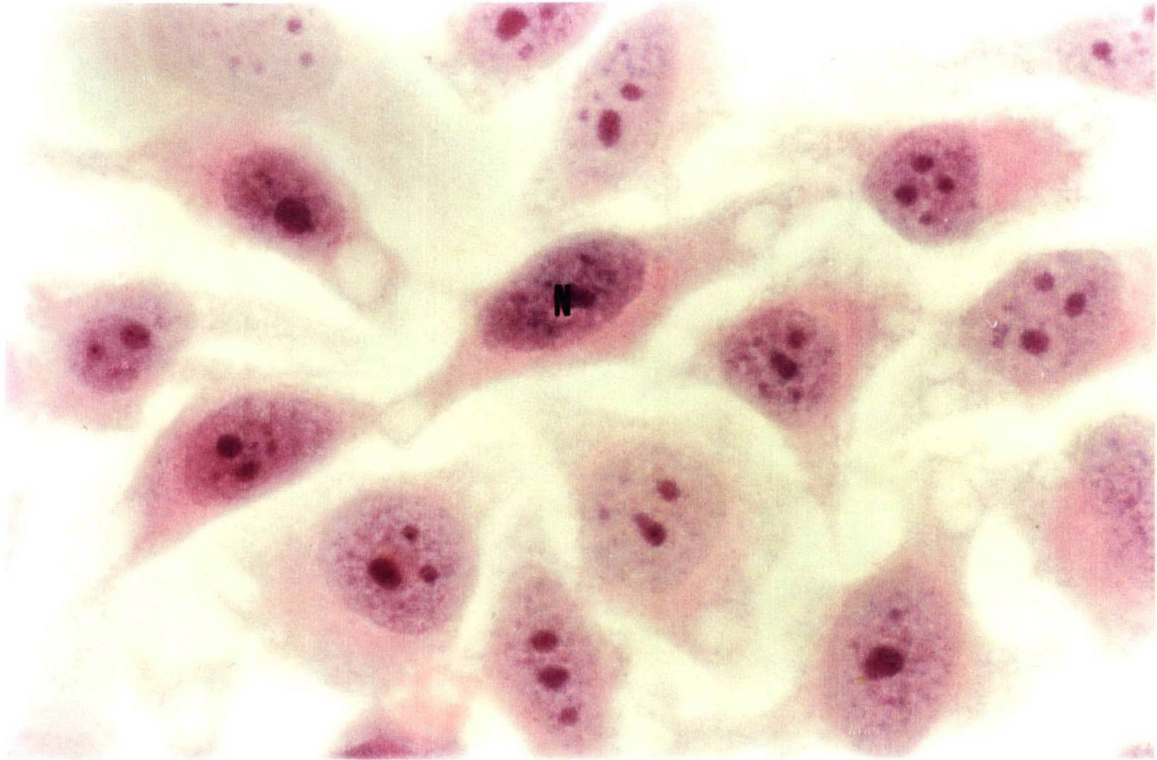


FIGURA 47. Células HeLa: aspectos da monocamada controle observada por Microscopia Óptica. Ampliação original 1.000x. Coloração Hematoxilina e Eosina. N - núcleo.

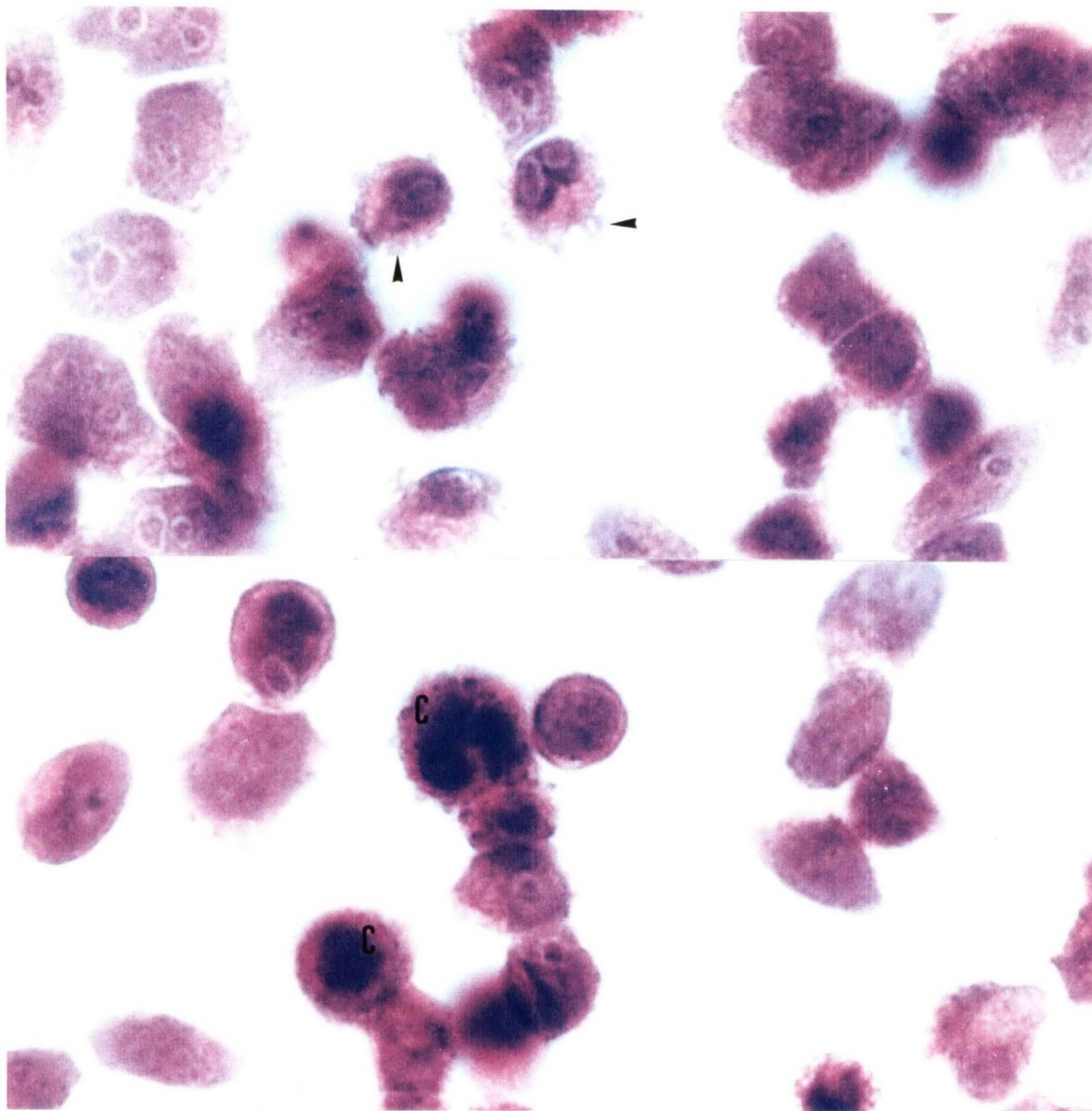


FIGURA 48. Efeitos do MI-D ($25 \mu\text{mols.L}^{-1}$) sobre as células HeLa observadas por Microscopia Óptica. Ampliação original 1.000x. Pontas de setas - expansões globosas (*blebs*); C - cromatina condensada. Coloração Hematoxilina e Eosina.

além da ocorrência evidente de expansões globosas (*blebs*), bem como da condensação da cromatina nuclear, características resultantes de “sofrimento celular”.

Observadas por M.E.T. (figura 49), as células HeLa apresentam aspecto globoso e justaposto, este último decorrente de junções do tipo desmossomo. O núcleo encontra-se bem delimitado pelo envoltório nuclear, observando-se a distribuição homogênea da hétero e eucromatina. Delgadas microvilosidades periféricas distribuem-se regularmente na periferia das células, estando possivelmente relacionadas à adesão à superfície de crescimento. No citoplasma observam-se as organelas, como as mitocôndrias, e o retículo endoplasmático, de aspectos morfológicos normais. A figura 50 destaca, em maior aumento, o complexo de Golgi e mitocôndrias.

As drásticas alterações de morfologia causadas pelo MI-D nas células HeLa, podem também ser observadas nas figuras 51 a 54. Na figura 51 observa-se o padrão de alteração celular. As microvilosidades delgadas observadas na ausência da droga foram substituídas por expansões globosas (*blebs*). Ainda na figura 51, pode-se verificar que o núcleo de uma das células está bipartido. Melhores detalhes da fragmentação nuclear podem ser observados na figura 52, onde é possível visualizar a condensação da heterocromatina junto à membrana nuclear. Este padrão de alteração, que tem sido associado ao processo apoptótico, é bem documentado. A proporção do núcleo ocupado pela cromatina condensada, varia conforme o tipo de células, sendo particularmente alta nas linfóides e muito menor naquelas que tem pouca heterocromatina, tal como células HeLa (McGAHON et al., 1995). Concomitantemente às alterações nucleares, uma série de eventos podem ser observados também no citoplasma, como se mostra na figura 52. Verifica-se o citoplasma vacuolizado e restos de retículos, ambos decorrentes do efeito do MI-D. Os detalhes do citoplasma vacuolizado podem ainda ser observados, em maior aumento, na figura 53. Já com referência às expansões globosas (*blebs*), estas dão origem a estruturas independentes, envoltas por uma

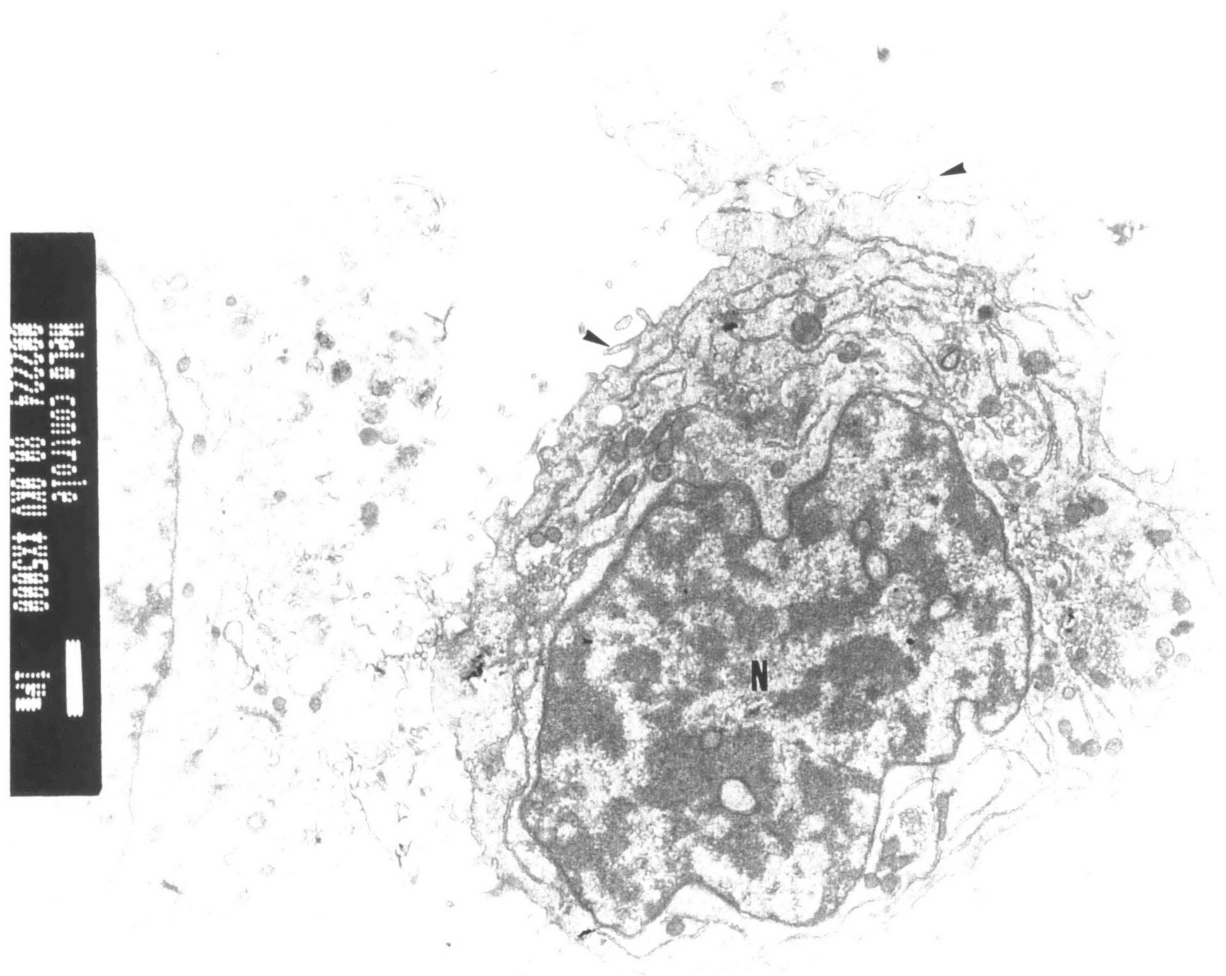


FIGURA 49. Células HeLa: aspectos da monocamada controle observada por Microscopia eletrônica de Transmissão. N - núcleo; ponta de seta - microvilosidades.

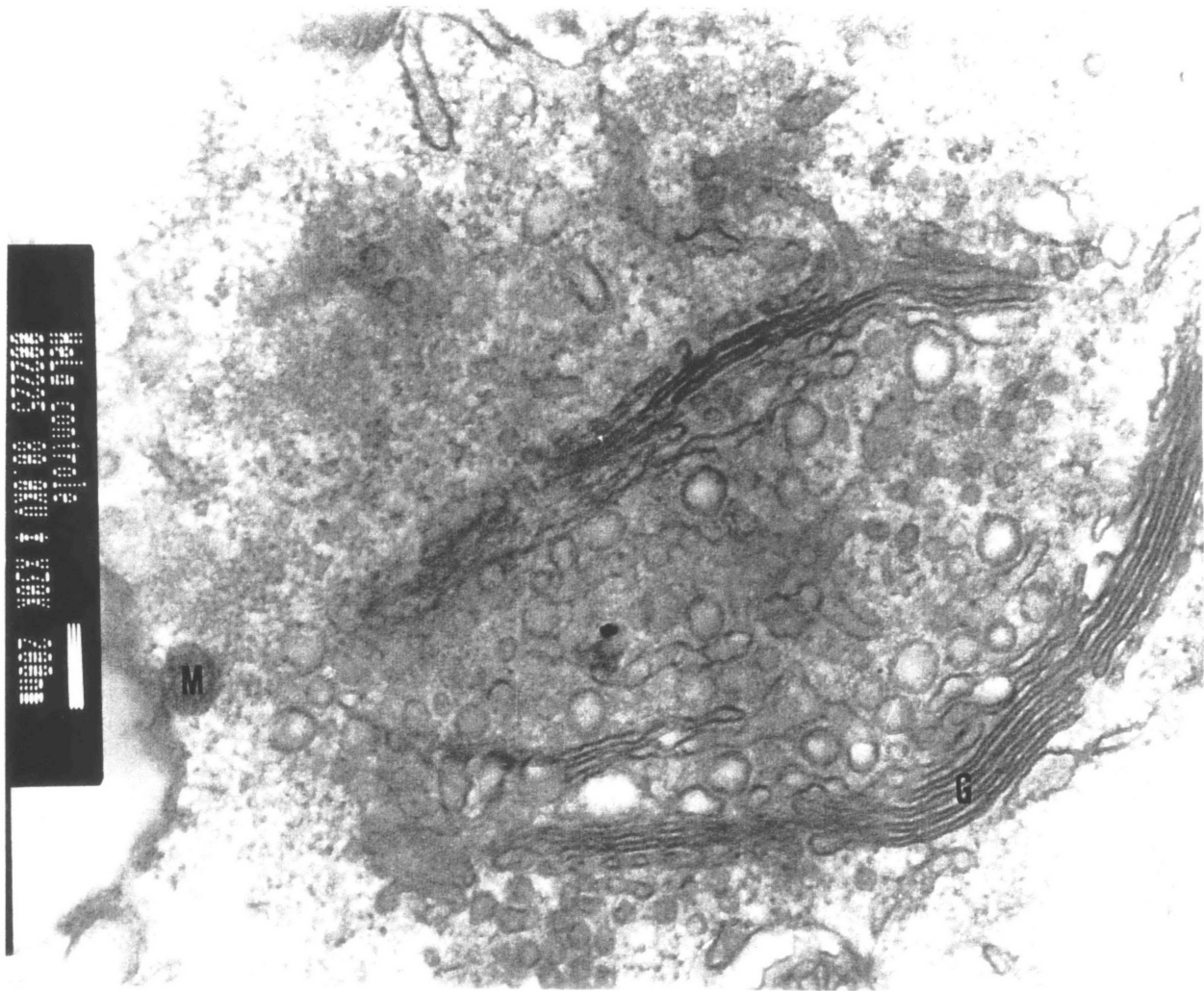


FIGURA 50. Células HeLa: aspectos da monocamada controle observada por Microscopia Eletrônica de Transmissão. **G** - complexo de Golgi; **M** - mitocôndria.

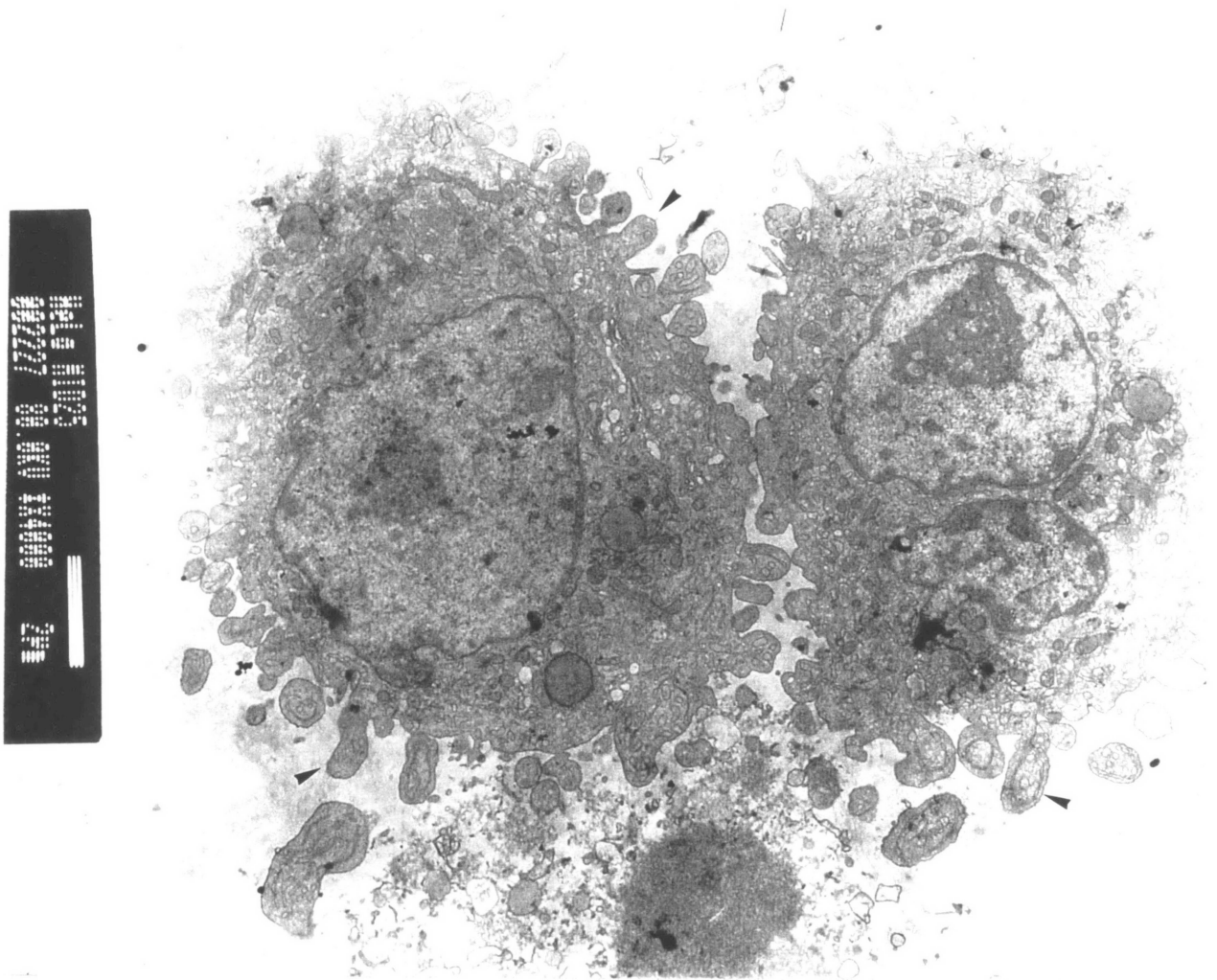


FIGURA 51. Efeitos do MI-D ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) sobre as células HeLa observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Pontas de setas - expansões globosas (*blebs*).

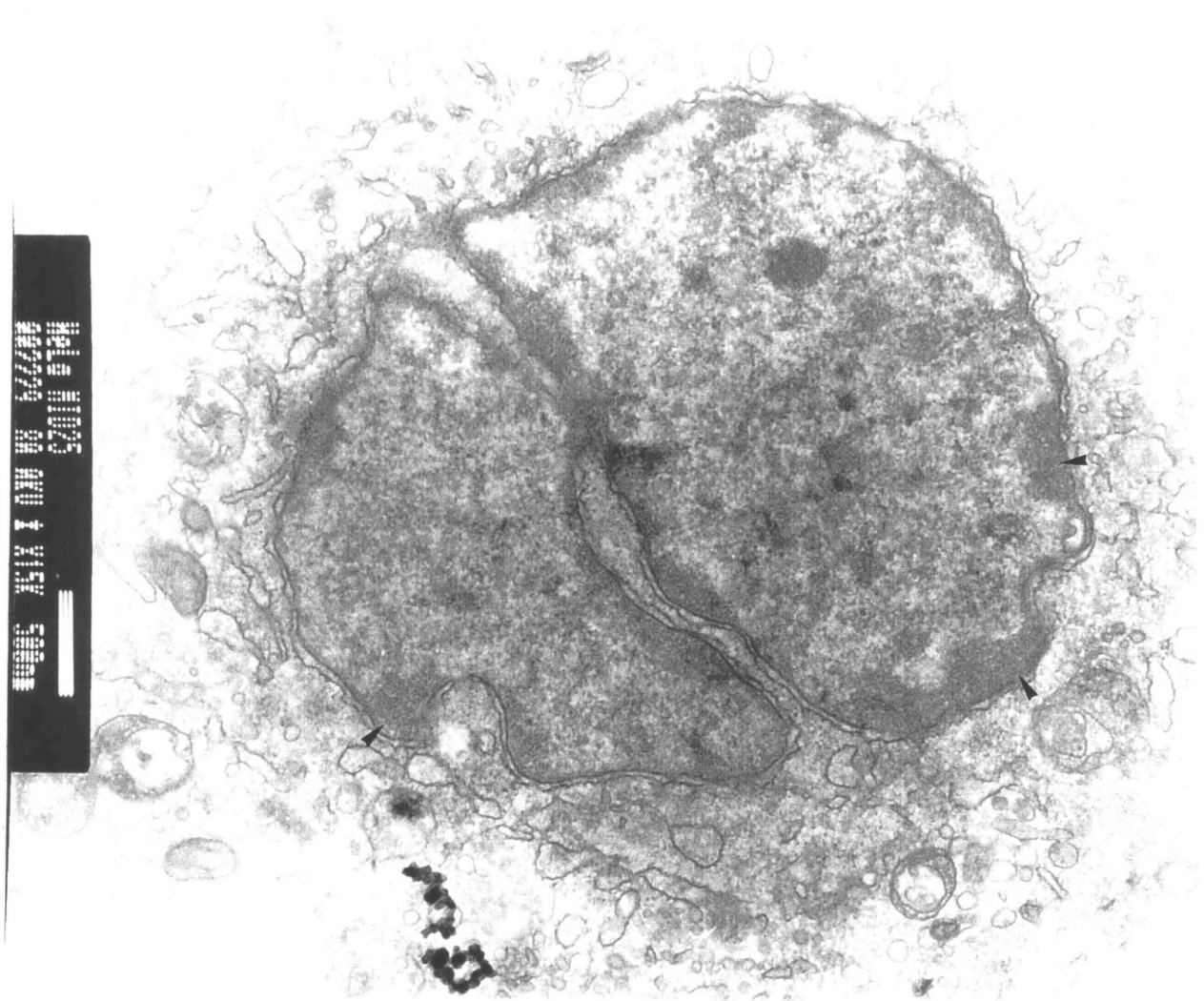


FIGURA 52. Efeitos do MI-D ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) sobre as células HeLa observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Fragmentação do núcleo. Pontas de setas - cromatina condensada .

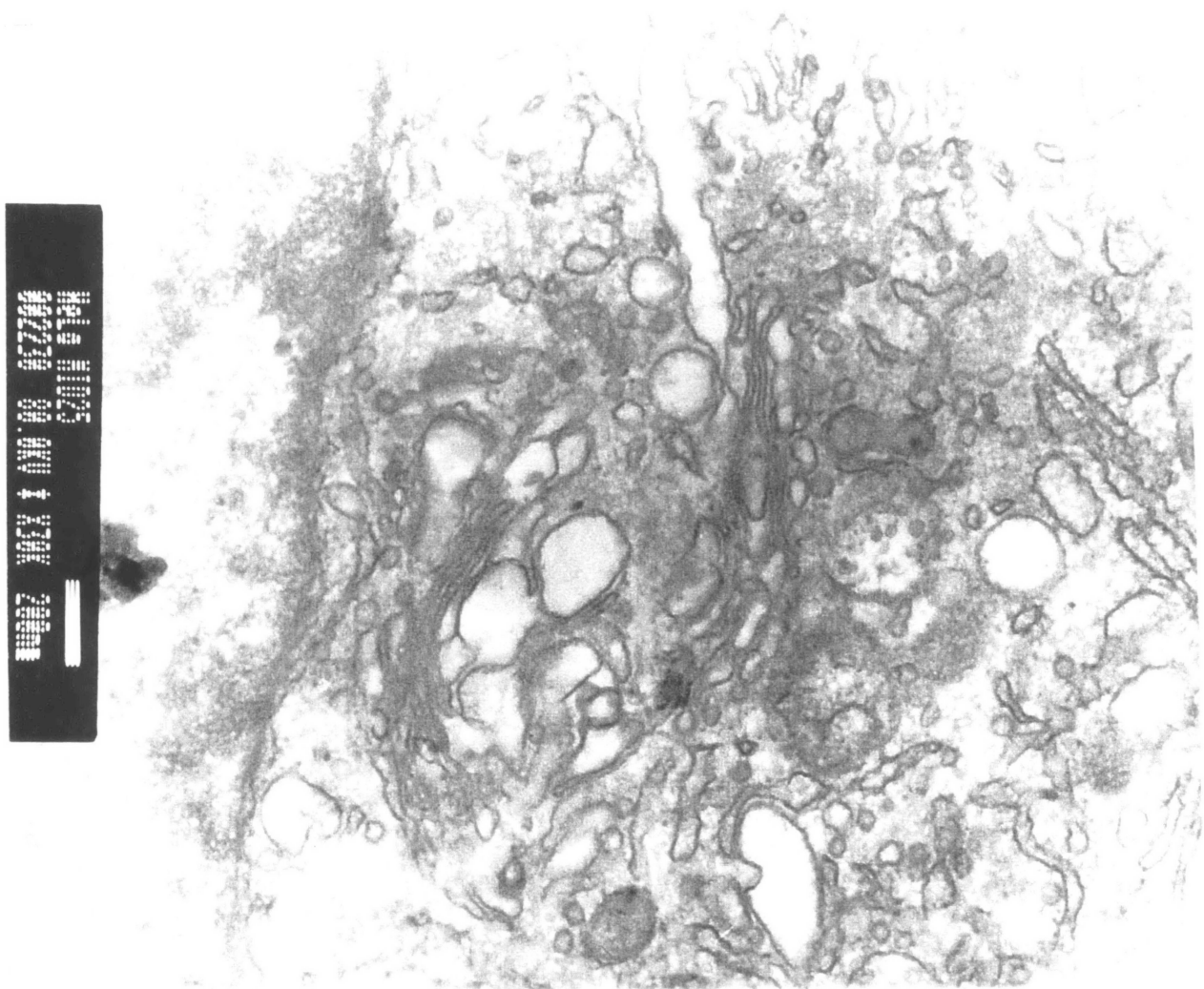


FIGURA 53. Efeitos do MI-D ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sobre as células HeLa observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

unidade dupla de membrana, contendo porções do sistema endomembranas, conforme o observado na figura 54.

Os resultados demonstrados nas figuras 51 a 54 demonstram que o composto mesoiônico impõe um alto grau de sofrimento às células. Considerando que todas as alterações nucleares e citoplasmáticas induzidas pelo MI-D, são características da morte celular mediada por apoptose (KEER, et al., 1995), pode-se sugerir que o composto mesoiônico seja capaz de induzir a morte celular por tal mecanismo. Esta possibilidade pode ser considerada como surpreendente, se levado em conta que os efeitos do MI-D sobre o metabolismo energético, estão mais relacionados à indução de morte celular por necrose. Isto porque, embora não seja possível determinar exatamente quais os sítios bioquímicos afetados e determinantes da morte celular, sabe-se que estão envolvidos: 1) a integridade de membranas, da qual depende a homeostase iônica e osmótica da célula e organelas; 2) a respiração, envolvendo a fosforilação oxidativa e a produção de ATP; 3) a síntese protéica e 4) a preservação da integridade do aparelho genético da célula (COTRAN et al., 1994). Dentre estes sistemas pelo menos dois são afetados pelo MI-D, nomeadamente, a integridade de membranas e a fosforilação oxidativa. Obviamente, tais sistemas estão interrelacionados, pois uma depleção de ATP, comprometerá, entre outros parâmetros, o funcionamento da Na^+/K^+ ATPase, levando ao acúmulo intracelular de Na^+ , com difusão de K^+ para fora da célula. Como conseqüência deste desequilíbrio osmótico, ocorrerá um influxo de água na célula, resultando em inchamento celular. Estes eventos, entre outros, são reconhecidos como envolvidos no processo de morte celular por necrose (COTRAN et al., 1994). Portanto, mesmo diante das evidências de que o MI-D induz a morte celular por apoptose, é necessário que tal informação seja confirmada. Além disto, considerando ainda a observação de MCGAHON et al. (1995) de que a definição dos mecanismos de morte celular, por apoptose ou necrose, requer a utilização de pelo menos duas metodologias distintas, optou-se por avaliar a

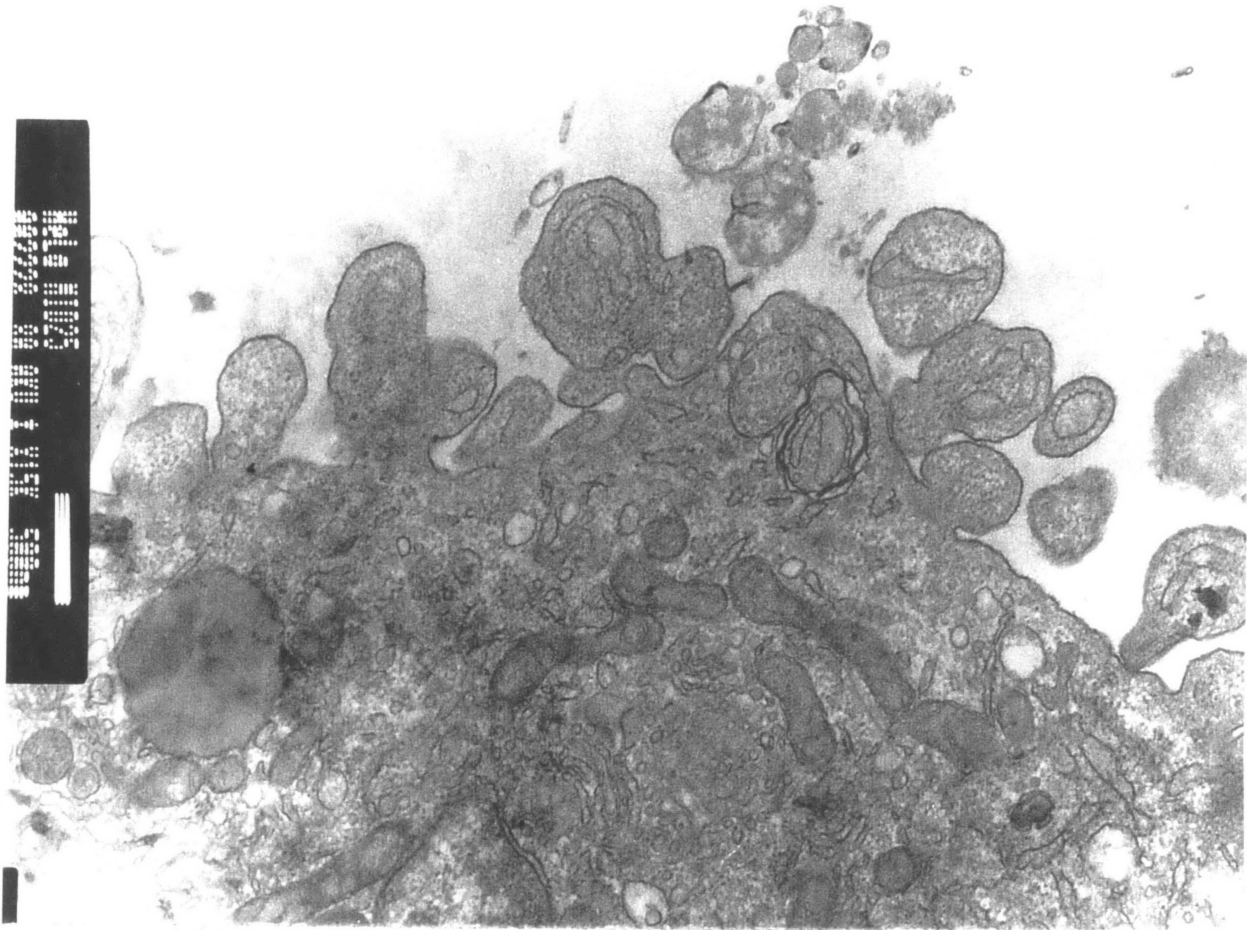


FIGURA 54. Efeitos do MI-D ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sobre as células HeLa observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

ocorrência de apoptose, utilizando, também, uma segunda metodologia, além do critério morfológico.

3.8.3 Mecanismo Envolvido na Morte Celular Induzida pelo MI-D em Células HeLa

A condensação da cromatina observada nas figuras 51 e 52, que caracteriza o núcleo das células apoptóticas, tem sido muito estudada. Esta alteração está relacionada à fragmentação internucleossomal do DNA nuclear, catalisada por uma endonuclease $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dependente, produzindo fragmentos que são múltiplos de 180 a 200 pares de bases (WYLLIE, 1980). Este padrão característico diferencia a apoptose da necrose, na qual ocorre uma fragmentação aleatória do DNA. Através de técnicas de eletroforese é possível diferenciar os padrões de quebra do DNA e, conseqüentemente, o mecanismo da morte celular. Entretanto, esta técnica apresenta como desvantagem a homogeneização de uma população de células e a análise do “pool” de DNA extraído, subestimando a fragmentação característica do DNA, mostrando, assim, a apoptose como um evento ocasional. Por outro lado, as técnicas de microscopia eletrônica, embora definam características morfológicas bastante úteis para detecção da apoptose, são trabalhosas e demoradas. A técnica enzimática, descrita na literatura como ensaio TUNEL, tornou possível a detecção do DNA fragmentado *“in situ”*, ou seja, no núcleo celular. Além desta vantagem, o método é específico para a apoptose com relação à necrose e é de simples realização (GAVRIELI et al., 1992; GOLD et al., 1994). Neste trabalho, a detecção da apoptose em células HeLa foi realizada através desta metodologia que utiliza a enzima deoxinucleotidil transferase terminal (TdT). Esta enzima adiciona nucleotídios ligados a digoxigenina à extremidades 3'-OH do DNA fragmentando. Em etapa posterior são adicionados anticorpos anti-digoxigenina ligados a peroxidase, que, por sua vez gera um intenso sinal (coloração marrom) quando em contato com o substrato cromogênico DAB (diaminobenzidina).

A figura 55 mostra os experimentos controle, realizados na ausência de MI-D, onde as células crescidas em lamínulas de vidro, foram submetidas ao procedimento de detecção da apoptose pelo método TUNEL. Observam-se células justapostas, de núcleo corado em verde azulado e aspecto normal. Em contraste, a figura 56, que demonstra a monocamada após o tratamento com o MI-D $25\mu\text{mols.L}^{-1}$, apresenta células mais arredondadas, que perderam seu aspecto epitelíóide, possivelmente, neste caso, porque o MI-D interfere na adesão celular. A presença de células apoptóticas é evidenciada pela coloração marrom escura dos núcleos, resultante da ação da peroxidase sobre os substrato cromogênico (DAB).

Estes resultados confirmam que o MI-D leva à morte celular por apoptose. O fato de o ensaio de viabilidade celular, pelo critério de exclusão do azul de tripan, apresentado na figura 45 e tabela 6, ter revelado a ausência de efeitos do MI-D, na mesma concentração em que se confirmou a morte celular por apoptose, por M.E.T e TUNEL, pode ser justificado porque as células apoptóticas mantêm sua integridade de membrana horas após o início do processo (MACGAHON et al., 1995).

Como já discutido, até recentemente acreditava-se que a mitocôndria estaria envolvida apenas no processo de necrose, mantendo-se morfológicamente normal durante a apoptose. No entanto, foi proposto por SKULACHEV (1996) que o inchamento mitocondrial é importante, também, durante o processo apoptótico. Adicionalmente, vários modelos experimentais evidenciam que a apoptose é precedida de uma queda do $\Delta\psi$, relacionada, obviamente, ao desacoplamento do transporte de elétrons da produção de ATP (PETIT et al., 1996, SUSIN et al., 1998). O protonóforo CCP teve seu efeito descrito como indutor de apoptose (ZAMZAMI et al., 1996). A queda de $\Delta\psi$ tem sido relacionada à abertura de um canal de grande condutância, o poro de transição de permeabilidade, cujos constituintes incluem proteínas da membrana interna, como o translocador de nucleotídeos de adenina, e proteínas da membrana externa, como a porina (BEUTNER et al., 1998). Embora neste trabalho não tenham sido realizados experimentos específicos

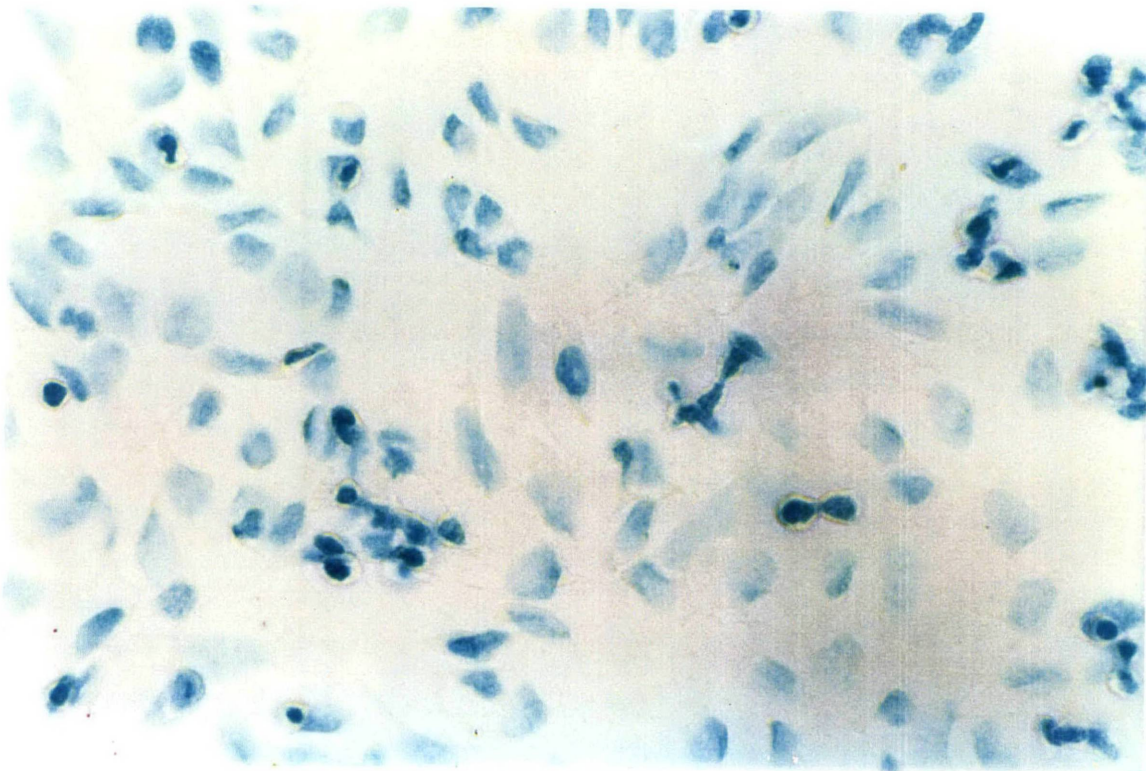


FIGURA 55. Células HeLa : aspectos da monocama controle observada por Microscopia Óptica - Método TUNEL. Ampliação original 400x. Coloração verde metila.

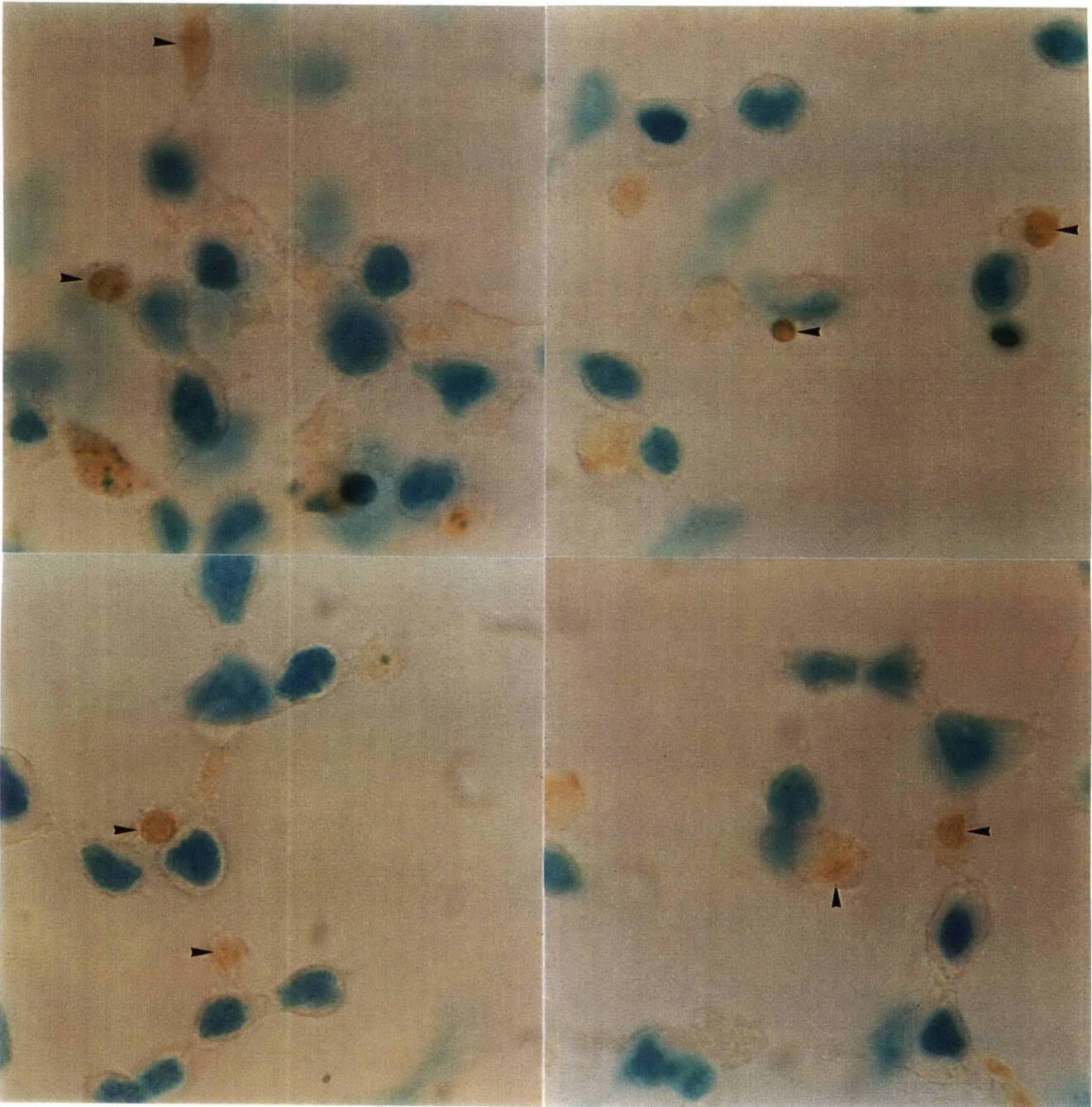


FIGURA 56. Efeito do MI-D ($25 \mu\text{mols. L}^{-1}$) como indutor de apoptose em células HeLa observadas por Microscopia Óptica - Método TUNEL. Ampliação original 1.000x. Coloração - Verde de Metila. **Setas** - células apoptóticas.

neste sentido, não se descarta a possibilidade de que o MI-D possa promover a abertura e/ou formação do poro de transição de permeabilidade. Tais possibilidades, além de outras envolvendo as proteínas Bcl₂ e Bax (REED, 1997), ficam reservados à investigação futura acerca do mecanismo pelo qual o MI-D causa a apoptose.

DISCUSSÃO FINAL

4. DISCUSSÃO FINAL

No presente trabalho, os resultados apresentados permitem avaliar os efeitos do MI-D sobre as funções da mitocôndria no contexto celular, quer sob o aspecto relacionado ao metabolismo energético, quer no tocante ao fator determinante da sobrevivência celular.

Sob o aspecto do metabolismo energético, o principal efeito do MI-D é o de desacoplador. Seu mecanismo de ação mostrou-se, em parte, semelhante ao dos desacopladores clássicos, como o FCCP e DNP, sendo que o valor de pI_{50} para o MI-D (4,9), foi bastante similar ao calculado para o DNP, pI_{50} (5,1). Não obstante esta similaridade com os desacopladores clássicos, incluindo o valor do pKa, que para estes agentes varia de 4 a 8 (HEYTLER et al., 1997), o MI-D porém, não pode ser classificado como tal. Com efeito, a despeito de apresentar algumas características próprias destes agentes, tais como o fato de tratar-se de um ácido, com pKa entre $3,25 \pm 0,2$ (ECHEVARRIA, Comunicação pessoal), com aparente capacidade de aumentar a condutância da membrana mitocondrial interna a prótons, o MI-D, no entanto, exerce um efeito inibitório sobre a velocidade respiratória do estado III, na mesma faixa de concentração em que promove o desacoplamento. Compostos com tal propriedade, segundo MORELAND (1994), são mais corretamente classificados como desacopladores inibitórios. Por outro lado, a ação desacopladora do MI-D parece resultar também de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, descritas como intimamente relacionadas à morte celular. Quanto a este aspecto, ampliando-se o contexto das pesquisas e renovando-se o universo das investigações, as mitocôndrias, atualmente, posicionam-se com papel tão relevante quanto àquele relacionado ao âmbito da bioenergética celular, apresentando-se agora, como verdadeiro fiel da balança entre a vida e a morte celular (KIBERSTIS, 1999; SUSIN et al., 1998).

Em verdade, as mitocôndrias, já há algum tempo, vêm sendo relacionadas à morte celular. Tal envolvimento, porém, era relatado apenas

como passivo, isto é, decorrente do colapso energético provocado por danos destas organelas. No tocante a apoptose, fenômeno definido como um sistema suicida da célula, observado durante a morfogênese normal dos organismos, quando da remodelação de tecidos ou em resposta a infecções patológicas ou a outros danos irreparáveis à célula (RAFF, 1992), têm-se atribuído às mitocôndrias um papel decisivo (SKULACHEV, 1996; PETIT et al., 1996; CAI et al., 1998; SUSIN et al., 1998).

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

O envolvimento do MI-D, como indutor de apoptose, na fase pré-mitocondrial, seria possível se considerado que este xenobiótico promove a inibição da velocidade respiratória do estado III. Segundo alguns autores, inibidores do transporte de elétrons podem favorecer a formação de espécies reativas de oxigênio (SKULACHEV, 1996; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999), as quais parecem ser responsáveis, ao lado de outros fatores, pela formação de megacanaís na membrana mitocondrial também denominados de poros de transição de permeabilidade (PTP) (SKULACHEV, 1996; PETIT et al., 1996; SUSIN et al., 1998). Tais poros se constituem de complexos dinâmicos de multiproteínas, localizados provavelmente nos sítios de contato da membrana mitocondrial interna e externa (BEUTNER et al., 1998). Uma interessante proposta feita por SKULACHEV (1996) é a de que a abertura dos megacanaís resultaria no desacoplamento momentâneo da respiração, com o conseqüente aumento do consumo de oxigênio e eliminação das espécies reativas de oxigênio. Caso isto acontecesse, ocorreria o fechamento dos poros e a retomada da respiração normal da mitocôndria. Se, entretanto, tais espécies continuassem se acumulando, os PT continuariam abertos resultando

no inchamento da organela, com rompimento da membrana mitocondrial externa e posterior rompimento da própria mitocôndria. Tal rompimento, por sua vez, levaria à liberação no citosol de proteínas “suicidas”, descritas na literatura como fatores indutores da apoptose (AIF) ou fatores ativadores das caspases (Apaf) (SUSIN et al., 1998). Neste aspecto, vale destacar que a indução da transição de permeabilidade mitocondrial resulta na liberação do citocromo *c* no citosol (YANG & CORTOPASSI, 1998) e que a presença deste é reconhecida como um importante desencadeador da apoptose (LIU et al., 1996; ZHIVOTOVSKY et al., 1998), devido à sua interação com outros fatores ativadores (Apaf) que, por sua vez, desencadeia a ativação das caspases (ZOU et al., 1997).

Já em relação à fase mitocondrial, os estudos de potencial de membrana, inchamento mitocondrial e de polarização de fluorescência, evidenciaram que o MI-D efetivamente afeta a integridade da membrana mitocondrial interna. Constitui, porém, matéria para estudos futuros, saber se os danos causados pelo MI-D envolvem ou não a formação de poros de transição de permeabilidade. Para tanto, seria interessante a realização de estudos na presença de conhecidos inibidores da formação destes poros, como a ciclosporina A e bongkrecoato (HALESTRAP et al., 1997). Ensaio visando esclarecer se o MI-D promove a liberação de proteínas mitocôndriais como o citocromo *c*, poderiam definir, ainda, o envolvimento do xenobiótico também na fase pós mitocondrial da apoptose. Em verdade, o que se mostra evidente é que a presença do MI-D produz efeitos estreitamente relacionados aos observados durante a apoptose, nomeadamente: a) colapso do potencial de membrana, b) alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna (estudos de inchamento e polarização de fluorescência) e c) alterações morfológicas- condensação da cromatina (fragmentação do DNA - ensaio TUNEL), fragmentação do núcleo e presença de *blebs* (M.E.T).

A possibilidade de que o composto mesoiônico possa levar a morte celular também por necrose, não pode ainda ser descartada. Esta hipótese foi levantada ao observar-se que entre as células tratadas com o MI-D, algumas

apresentavam-se inchadas, característica de morte celular por necrose. Este fato não representaria nenhuma surpresa, se for considerado que os dois mecanismos de morte celular, necrose e apoptose, apresentam limites de diferenciação bastante estreitos, baseados, na maioria das vezes, em aspectos morfológicos. Além disto, sabe-se que: a) agentes considerados como clássicos indutores de necrose, como por exemplo a hipoxia, também levam a apoptose (SHIMIZU et al., 1996); b) uma mesma toxina pode induzir a apoptose em baixas concentrações e necrose em altas (KROEMER et al., 1998) c) a oncoproteína Bcl-2 pode inibir tanto a apoptose como a necrose (KANE, 1993).

Por fim, conclui-se que os efeitos do MI-D culminam em morte celular, relacionada ao evento primário de colapso do potencial de membrana. Neste sentido, SKULACHEV (1998) sugeriu que uma ação desacopladora poderia explicar o efeito terapêutico de um composto. Em verdade, sabe-se que o desacoplamento é responsável pelo efeito terapêutico de algumas drogas utilizadas no tratamento do câncer (NEWELL & TANNOCK, 1989, DECAUDIN et al, 1997). Sendo assim, os resultados obtidos para o MI-D podem estar relacionados à atividade antitumoral do composto mesoiônico descrito por GRYNBERG et al. (1997), além do que não seria surpresa se a este composto estiverem relacionadas outras propriedades no contexto da bioquímica farmacológica.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o MI-D:

- 1) atua como agente desacoplador, efeito diretamente relacionado às características estruturais do composto (hidrofobicidade e presença de um próton dissociável), comprometendo a permeabilidade e elasticidade da membrana mitocondrial interna;
- 2) atravessa a membrana plasmática, produzindo efeitos que comprometem as provisões de ATP, necessárias à sobrevivência celular;
- 3) é indutor de morte celular por apoptose.

O MI-D, portanto, afeta de maneira significativa o metabolismo energético, produzindo efeitos tão intensos a ponto de conduzir à morte celular.

Considerando que o interesse sobre este composto advém de seu efeito antitumoral (GRYNBERG et al., 1997), esta ação pode ser indicativa de seu futuro uso terapêutico.

ANEXO

Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria

Silvia M.S.C. Cadena^a, Eva G.S. Carnieri^a, Aurea Echevarria^b,
Maria Benigna M. de Oliveira^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, C.P. 19046, C.E.P. 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil

^bDepartamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Received 3 September 1998; received in revised form 5 October 1998

Abstract MI-D (4-phenyl-5-(4-nitro-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride), a new mesoionic compound, depressed the phosphorylation efficiency of liver mitochondria as deduced from an accentuated decrease of the respiratory control coefficient and ADP/O ratio. Analysis of segments of the respiratory chain suggested that the MI-D inhibition site is further on than complex I and between complexes II and III. The transmembrane electrical potential ($\Delta\psi$) was collapsed dependent on MI-D concentration. ATPase activity was dramatically increased by MI-D in intact mitochondria, but inhibited in carbonylcyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)-uncoupled mitochondria. These results suggest that MI-D acts as an uncoupler agent, a property closely related to its structural characteristics.

© 1998 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Mesoionic compound; Mitochondrial uncoupling; ATPase

1. Introduction

Mesoionic compounds such as sydrones, sydnonimines, isosydrones, and mesoionic 1,3,4-thiadiazoles possess structural features, which confer on them potential biological activity and pharmaceutical use [1–5]. Their structures having well separated regions of positive and negative charge, associated with a polyheteroatomic system, enable them to interact with biomolecules, such as DNA and proteins. Although the molecules are internally charged, they are neutral overall, and therefore can cross biological membranes *in vivo* [6].

A number of mesoionic compounds have also been examined in the search for anticancer agents [7–9]. Recently, Grynberg et al. [10] synthesized a new one, the 4-phenyl-5-(4-nitro-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride (MI-D; Fig. 1), that was shown to enhance survival of Ehrlich and S-180 tumor-bearing mice, preventing the growth of the

tumor, with no significant concomitant alterations in the hematological parameters in test animals.

In spite of the different types of biological activity that have been assigned to mesoionic compounds, much of their biological and toxicological action mechanisms at molecular and cellular levels remain to be elucidated. Considering that the liver is a target organ for toxic effects caused by several xenobiotics and the important anti-tumoral effect of MI-D demonstrated by Grynberg et al. [10], amplification of knowledge about this mesoionic compound is of interest. We therefore describe here the effect of MI-D on some energy-linked functions in isolated rat liver mitochondria.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Safranin *O*, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (FCCP), sodium succinate, sodium glutamate, rotenone, bovine serum albumin (BSA), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), mannitol, sucrose, phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate kinase, lactate dehydrogenase and NADH were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents were commercial products of the highest available purity grade. MI-D (4-phenyl-5-(4-nitro-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride) was synthesized in the Department of Chemistry of the Rural Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, as described [10]. Its structure was confirmed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and mass spectrometry [10]. For use in mitochondrial assays, MI-D was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and then further diluted with the assay medium.

2.2. Animals

These were male albino rats (Wistar strain, 220–300 g), which received a standard laboratory diet (Purina). All animals were starved 12 h before being sacrificed; none of them were found to have any gross pathological lesions.

2.3. Preparation of rat liver mitochondria

Mitochondria were isolated from rat liver by the method of Voss et al. [11], using an extraction medium consisting of 250.0 mM mannitol, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.2, 1.0 mM ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) and 0.1 g% BSA. Only mitochondrial preparations, with respiratory control above 4.0, were used. Disrupted mitochondria were obtained by a freeze-thawing treatment and used to determine the activities of enzymes linked to the respiratory chain and ATPase. MI-D was incubated for 2 min with the mitochondrial preparations before initiation of the assays. For each one to be valid, duplicate solvent controls with DMSO were included. DMSO, in the concentrations used in these experiments, had no effect on mitochondrial properties.

2.4. Oxygen uptake

Oxygen uptake and oxidative phosphorylation were evaluated at 30°C in a 1.3-ml thermostatically controlled water-jacketed closed chamber with magnetic stirring. Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode with a Gilson oxygraph [12,13]. The reaction medium containing 125.0 mM mannitol,

*Corresponding author. Fax: (55) (41) 2662042.
E-mail: mbmo@bio.ufpr.br

Abbreviations: HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; EGTA, ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; BSA, bovine serum albumin; PMS, *N*-methylidibenzopyrazine methyl sulfate; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; PEP, phosphoenolpyruvate; CCCP, carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone; DNP, 2,4-dinitrophenol; $\Delta\psi$, transmembrane electrical potential; DMPC, dimyristoylphosphatidylcholine; DMSO, dimethylsulfoxide; DPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol; Pi, inorganic phosphate

65.0 mM KCl, 10.0 mM HEPES-KOH, pH 7.2, 0.1 mM EGTA and 0.1 g% BSA, was supplemented either with 10.0 μ M rotenone, 0.8 mM inorganic phosphate (Pi), 0.08 mM ADP, 3.0 mM sodium succinate and 0.5 mg of mitochondrial protein, or 1.6 mM Pi, 0.16 mM ADP, 5.0 mM sodium glutamate and 2.0 mg of mitochondrial protein. The respiratory rate is expressed as nmols of oxygen consumed per min per mg of mitochondrial protein, according to Estabrook [14].

2.5. Measurements of activities of the enzymatic complex of the respiratory chain

NADH oxidase, NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase activities were assayed spectrophotometrically [15]. Succinate oxidase activity was evaluated polarographically according to Singer [15]. NADH-cytochrome *c* reductase and succinate cytochrome *c* reductase activities were measured by reduction of cytochrome *c* at 550 nm as described by Somlo [16]. The activity of cytochrome *c* oxidase was evaluated according to Mason et al. [17].

The activity of ATPase in broken and intact mitochondria was evaluated as described by Pullman et al. [18], but with modifications. In disrupted mitochondria the enzyme was assayed at 37°C, using a system consisting of 170.0 mM mannitol, 50.0 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-HCl, pH 7.4, 3.0 mM magnesium acetate, 30.0 mM potassium acetate, 1.0 mM PEP, 4.0 U pyruvate kinase, 3.0 U lactate dehydrogenase, 0.2 mM NADH, 3.0 mM ATP, and 100.0 μ g of mitochondrial protein. Results are expressed as nmols of Pi liberated per min per mg, considering that 1.0 nmol of oxidized NADH corresponds to 1.0 nmol of Pi liberated. ATPase activity of intact mitochondria was assayed at 30°C in the presence or absence of 1.0 μ M FCCP, the reaction medium consisting of 50.0 mM sucrose, 120.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50.0 mM KCl, 3.0 mM ATP, and 3.0 mg of mitochondrial protein. Liberated orthophosphate was measured according to Summer [19] and the results expressed as nmols of Pi liberated per min per mg.

2.6. Measurements of mitochondrial transmembrane electrical potential ($\Delta\Psi$)

The transmembrane potential was evaluated at 30°C with safranin O [20]. The standard reaction medium consisted of 250.0 mM man-

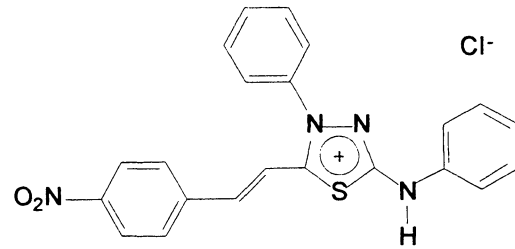


Fig. 1. Chemical structure of 4-phenyl-5-(4-nitrocinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride.

nitol, 10.0 mM HEPES, pH 7.2, and was supplemented with 0.5 mM Pi, 10.0 μ M safranin O, 1.5 mg of mitochondrial protein, 3.0 mM sodium succinate and 4.0 μ M rotenone. When sodium glutamate (6.0 mM) was used as substrate, rotenone was omitted. Absorbance at 511–533 nm was registered in an Aminco Chance dual wavelength beam recording spectrophotometer, and the transmembrane electrical potential ($\Delta\Psi$) estimated as described by Rossi and Azzoni [21].

2.7. Protein determinations

Mitochondrial protein was assayed by the method of Lowry et al. [22], using bovine serum albumin as standard.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out as analysis of variance and test of Tukey for average comparison. Mean values \pm S.D. were used.

3. Results and discussion

Fig. 2 shows the effect of various concentrations of MI-D

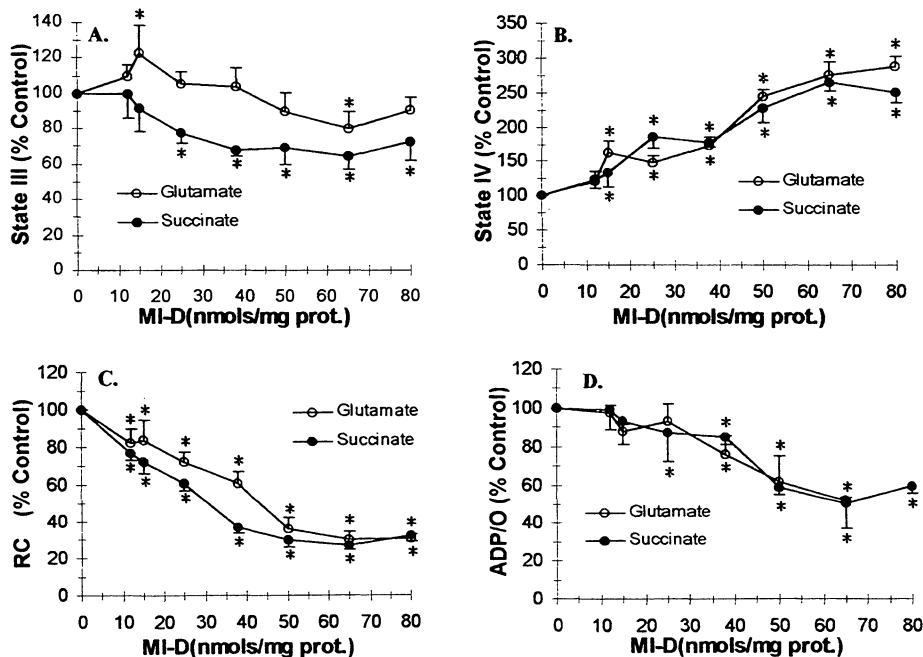


Fig. 2. Effects of MI-D on mitochondrial respiration with sodium glutamate (○) or sodium succinate (●) as substrate. Conditions for oxygen uptake measurements are described in Section 2. A: State III, mitochondrial oxygen uptake in the presence of ADP and substrate. 100% activity corresponds to 34.6 ± 4.2 and 38.0 ± 4.0 nmol of oxygen consumed per min per mg of mitochondrial protein for glutamate and succinate, respectively. B: State IV, mitochondrial oxygen uptake after exhaustion of ADP. 100% activity corresponds to 7.0 ± 1.1 and 8.0 ± 1.3 nmol of oxygen consumed per min per mg of protein for glutamate and succinate, respectively. C: RCC, respiratory control coefficient. 100% corresponds to values of 4.6 ± 0.2 and 4.6 ± 0.6 for glutamate and succinate, respectively. D: ADP/O, ADP concentration/oxygen consumption. 100% corresponds to values of 2.8 ± 0.2 and 1.8 ± 0.2 for glutamate and succinate, respectively. Each value represents the mean \pm S.D. of six different experiments. *Significantly different from control ($P < 0.05$).

on the respiratory parameters of functionally intact mitochondria. In these experiments, glutamate and succinate were the oxidizable substrates and the analyzed parameters were: (i) the rates of oxygen consumption in states III (Fig. 2A) and IV (Fig. 2B) of mitochondrial respiration; (ii) the respiratory control coefficient (RC) (Fig. 2C); and (iii) the ADP/O ratio (Fig. 2D). In Fig. 2A it can be observed that the effect of MI-D on preparations of mitochondria respiring in the presence of substrates and ADP (state III) was discrete for both substrates, besides not being identical. When glutamate was used, MI-D at 15.0 nmol/mg protein promoted a slight but statistically significant increase in the respiratory rate, but with a decrease (22%) when 65.0 nmol MI-D/mg protein was used. When succinate was the substrate, the effect of MI-D on state III was inhibitory (30%), up to 25.0 nmol/mg protein. In contrast, as can be seen in Fig. 2B, the rate of oxygen consumption after ADP exhaustion (state IV) was strongly increased reaching 80.0 nmol/mg protein, a stimulus of 190% and 152% during oxidation of glutamate and succinate, respectively (Fig. 2B). The values for RC and ADP/O ratios were lower (Fig. 2C and D), indicating that MI-D could, in addition to an effect on components of respiratory chain, give rise to an accentuated uncoupler effect.

In order to clarify the effects of MI-D on state III respiration, assays were carried out using broken mitochondria. Under this experimental condition, an evaluation could be made of electron transport throughout the respiratory chain, independent of the membrane barrier, phosphorylation activity or other processes dependent on $\Delta\Psi$; in addition, a determination could be performed of the site of respiratory chain inhibition. The presence of the drug in the system decreased

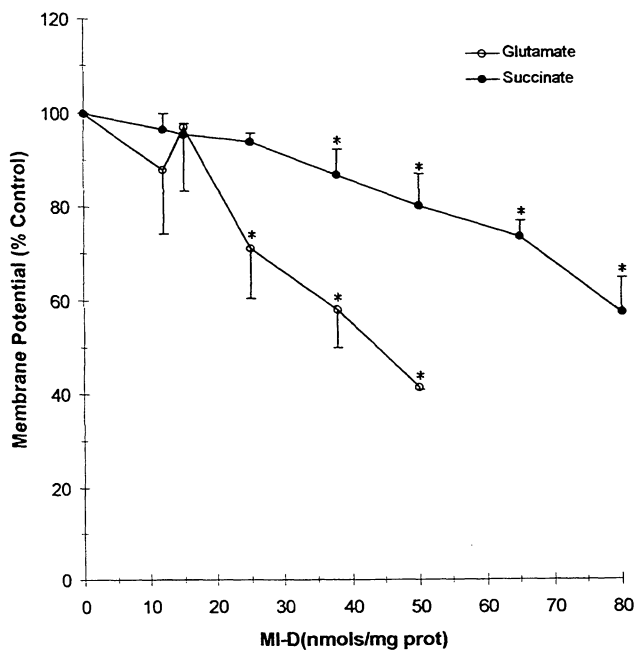


Fig. 3. Effect of MI-D on $\Delta\Psi$. Rat liver mitochondria (1.5 mg) was incubated under the standard incubation conditions, as described in Section 2 and energized with sodium glutamate (○) or sodium succinate (●). Each value represents the mean \pm S.D. of four different experiments. *Values significantly different relative to absence of MI-D ($P < 0.05$). 100% corresponds to 170 ± 10.9 mV of transmembrane electrical potential.

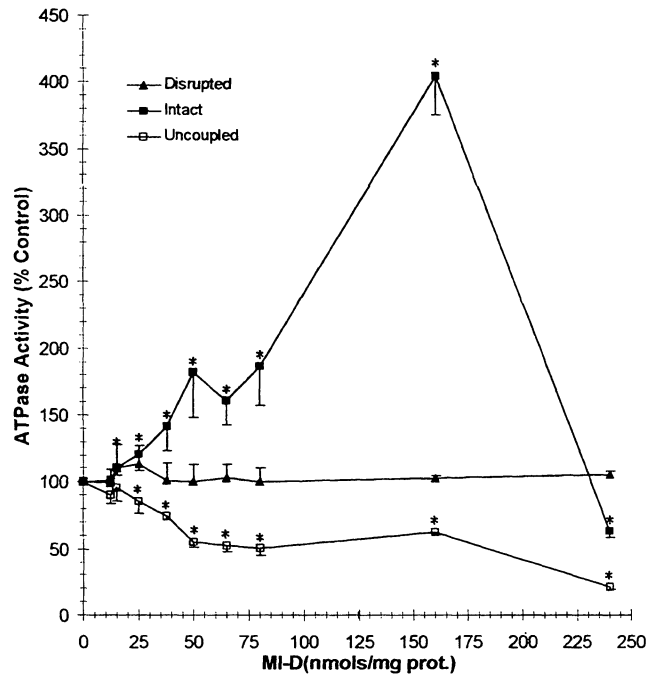


Fig. 4. Effects of MI-D on ATPase. (▲) Disrupted mitochondria. 100% activity is that of 700.0 ± 112.0 nmol of Pi released per min per mg of mitochondrial protein. (■) Intact mitochondria. 100% activity is that of 20.0 ± 1.1 nmol of Pi released per min per mg of mitochondrial protein. (□) FCCP-uncoupled mitochondria. 100% activity is that of 91.3 ± 5.6 nmol of Pi released per min per mg of mitochondrial protein. The assay conditions are described in Section 2. The data are the means \pm S.D. of four different experiments. *Significantly different from control ($P < 0.05$).

the activities of NADH and succinate oxidase by 32% and 55%, respectively. The segments of the respiratory chain, namely NADH-cytochrome *c* reductase, succinate-cytochrome *c* reductase, as well as succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase, suggesting that the site of MI-D inhibition is further on than complex I and between complexes II and III. These results explain those pointed out by Fig. 2A, in terms of a decrease of oxygen consumption at state III. Small differences in inhibition values could signify particular properties of the mitochondrial preparations used, especially considering that in broken mitochondria the disrupted membrane barrier could allow direct interaction of MI-D with the enzymatic complexes.

Fig. 3 shows that MI-D impairs the development of $\Delta\Psi$ by mitochondria energized with succinate or glutamate, the concentration of the drug for total potential collapse being different for each substrate. While 65.0 nmol/mg protein was sufficient to abolish $\Delta\Psi$ completely when glutamate was the substrate, with succinate a decrease of 40% was observed at 80.0 nmol/mg protein. The different magnitude effects could be results of the mechanism by which each substrate had access into the mitochondria; glutamate depended on the Δ pH across the inner mitochondrial membrane, while succinate depended on the dicarboxylate carrier [23]. The effects promoted by MI-D on $\Delta\Psi$ must be related with its uncoupling property, since its effect as inhibitor of electron transport was not sufficient to explain the drastic collapse of the transmembrane potential observed.

In order to better visualize the uncoupler action of MI-D, the effect of this xenobiotic was evaluated on ATPase activity; the results are shown in Fig. 4. In these experiments the enzyme was assayed in preparations consisting of disrupted, intact and FCCP-uncoupled mitochondria. This last condition was included considering the reports that excess or simultaneous combinations of uncoupler agents might result in submaximal rates of mitochondrial parameters as a decrease of ATP hydrolysis [24] and/or oxygen consumption [25]. No effect on ATPase activity was detected when MI-D was evaluated using disrupted mitochondria preparations, excluding a direct interference of this drug on the enzyme. In contrast, as would be expected for an uncoupler agent, MI-D promoted a strong stimulus on the hydrolytic activity of ATPase, assayed in intact mitochondria. This stimulus was dependent on MI-D concentration and reached 300% at 160.0 nmol/mg protein. A further increase in drug concentration, up to 240.0 nmol/mg protein, was accompanied by an accentuated decrease of ATP hydrolysis. This has also been described for compounds such as 2,4-dinitrophenol (DNP) [26] and FCCP [27], when used in concentrations higher than those necessary for uncoupling mitochondria. The effect of MI-D, as evaluated on ATPase of FCCP-treated mitochondria, was inhibitory (Fig. 4). In addition, MI-D was able to remove the inhibition caused by oligomycin (data not shown). These results characterize and include MI-D as a new uncoupler agent, although of lower potency than FCCP, and suggest that the effects of this xenobiotic depend on its interaction with membrane constituents. In this context it has been shown that both membrane lipids and proteins change simultaneously during the uncoupling event [28]. Specific interactions with membrane polypeptides, similar to those described for analogues of the classical uncouplers DNP and FCCP [29,30] and also suggested from studies with recoupling agents [31], could be involved during the interaction of MI-D with the membrane. In order to deal with this possibility, experiments of fluorescence polarization developed in our laboratory with dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) liposomes (data not shown), have pointed to a distribution of MI-D molecules in both phospholipid bilayer region and phospholipid/water interface, as described for uncoupler agents [32].

The actions of MI-D on mitochondria are complex with a diverse spectrum of responses being manifested. While MI-D satisfies most, if not all of the criteria for an uncoupler agent, at higher concentrations it can act as electron transport inhibitor. An inhibition of state III, particularly when succinate was the substrate, became evident within the stimulatory concentration range of state IV. Compounds with such properties have been classified as inhibitory uncouplers [33]. The effects of MI-D on the mitochondria were in close relationship with its structural properties, the bulky hydrophobic groups, in addition to the presence of an acid-dissociable group, justifying all the presently observed results.

In a recent review Skulachev [34] pointed that in some instances an uncoupling action could explain the therapeutic effect of a drug. This seems true for the antitumor action of carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) [35] and other anticancer drugs [36]. In this respect, the results presented herein could be involved in the antitumor activity of MI-D described by Grynberg et al. [10].

Acknowledgements: This investigation was supported by the Brazilian Research Council (CNPq and CAPES). The authors thank Dr. Aguiñaldo José Nascimento for suggestions for the statistical analysis, Dr. Maria Lúcia W. Klüppel for critical reading and Dr. Philip Albert James Gorin for the language corrections.

References

- [1] Lima, E.O., Maia, R.F., Barbosa Filho, J.M. and Xavier Filho, L. (1986) *Rev. Microbiol.* 17, 132–136.
- [2] Moustafa, M.A.A. and Eisa, H.M. (1991) *Arch. Pharm.* 325, 397–401.
- [3] Corell, T., Pedersen, S.B., Lissau, B., Moilanen, E., Mätsa-Ketelä, T., Kankaanranta, H., Vuorinen, P., Vapaatalo, H., Rydell, E., Andersson, R., Marcinkiewicz, E., Korbut, R. and Gryglewski, R.J. (1994) *Pol. J. Pharmacol.* 46, 553–566.
- [4] Satyanarayana, K. and Rao, M.N.A. (1995) *J. Pharm. Sci.* 84, 263–266.
- [5] Rehse, K., Ciborski, T. and Müller, B. (1995) *Arch. Pharm. (Weinheim)* 328, 125–126.
- [6] Kier, L.B. and Roche, E.B. (1967) *J. Pharm. Sci.* 56, 149–169.
- [7] Greco, C.V., Nyberg, W.H. and Cheng, C.C. (1962) *J. Med. Pharm. Chem.* 5, 861–865.
- [8] Grynberg, N., Gomes, R., Shinzato, T., Echevarria, A. and Miller, J. (1992) *Anticancer Res.* 12, 1025–1028.
- [9] Shinzato, T.O., Grynberg, N., Gomes, R.M., Echevarria, A. and Miller, J. (1989) *Med. Sci. Res.* 17, 865–866.
- [10] Grynberg, N., Santos, A.C. and Echevarria, A. (1997) *Anti-Cancer Drugs* 8, 88–91.
- [11] Voss, D.O., Campelo, A.P. and Bacila, M. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 48–51.
- [12] Voss, D.O., Cowles, J.C. and Bacila, M. (1963) *Anal. Biochem.* 6, 211–222.
- [13] Chance, B. and Williams, G.R. (1955) *J. Biol. Chem.* 217, 383–393.
- [14] Estabrook, R.W. (1967) in: *Mitochondrial Respiratory Control and the Polarographic Measurement of ADP/O Ratios* (Estabrook, R.W. and Pullman, M.E., Eds.) *Methods in Enzymol.*, Vol. 10, pp. 41–47. Academic Press, New York, NY.
- [15] Singer, T.P. (1974) in: *Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline and α -Glycerophosphate Dehydrogenases* (Glick, D., Ed.) *Methods Biochem. Anal.*, Vol. 22, pp. 123–175. John Wiley, New York, NY.
- [16] Somlo, M. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 97, 183–201.
- [17] Mason, T.L., Poyton, R.O., Wharton, D.C. and Shatz, G. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1346–1354.
- [18] Pullman, M.E., Penefski, H.S. and Data, A. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 3322–3329.
- [19] Sumner, J.B. (1944) *Science* 100, 413–414.
- [20] Akerman, K.E.O. and Wikstrom, M.F.K. (1976) *FEBS Lett.* 68, 191–197.
- [21] Rossi, E. and Azzone, G.F. (1969) *Eur. J. Biochem.* 7, 418–426.
- [22] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 262–275.
- [23] Nicholls, D.G. and Ferguson, S.J. (1992) *Bioenergetics 2*, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, London.
- [24] Van Dam, K. and Kraayenhof, R. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 172, 189–197.
- [25] Van Dam, K. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 131, 407–411.
- [26] Slater, E.C. (1967) in: *Application of Inhibitors and Uncouplers for a Study of Oxidative Phosphorylation* (Estabrook, R.W. and Pullman, M.E., Eds.) *Methods in Enzymology*, Vol. 10, pp. 48–57. Academic Press, New York, NY.
- [27] Bertina, R.M. and Slater, E.C. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 376, 492–504.
- [28] Zimmer, G. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 181, 26–32.
- [29] Hanstein, W.G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 456, 129–148.
- [30] Katre, N.V. and Wilson, D.F. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 191, 647–656.

- [31] Starkov, A.A., Bloch, D.A., Chernyak, B.V., Dedukhova, V.I., Mansurova, S.E., Severina, I.I., Simonyan, R.A., Vygodina, T.V. and Skulachev, V.P. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1318, 159–172.
- [32] Terada, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 639, 225–242.
- [33] Moreland, D.E. (1994) in: *Effects of Toxicants on Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation* (Hodgson, E. and Levi, P.E., Eds.) *Introduction to Biochemical Toxicology*, pp. 345–366. Appleton and Lange, Norwalk, CT.
- [34] Skulachev, V.P. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 100–124.
- [35] Newell, K.J. and Tannock, I.F. (1989) *Cancer Res.* 49, 4477–4482.
- [36] Keller, B.J., Marsman, D.S., Popp, J.A. and Thurman, R.G. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 237–244.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERMAN, K. E. O; WIKSTRÖM, M., F., K.. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS. Lett.**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 191-197, 1976.
- ANTUNES-MADEIRA, M. C.; MADEIRA, V. M. C. Membrane partitioning of organophosphorus and organochlorine insecticides and its implications for mechanisms of toxicity. **Pestic. Sci.**, Chichester, v. 26, p. 167-179, 1989.
- ANTUNES-MADEIRA, M.C.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. C. DDT-membrane interactions studied with two fluorescent probes. **Pestic. Sci.**, Chichester, v. 33, p. 347-357, 1991.
- ANTUNES-MADEIRA, M.C.; CARVALHO, A. P.; MADEIRA, V. M. C. Effects of insecticides on thermotropic lipid phase transitions. **Pestic. Biochem. Physiol.**, Orlando, v. 14, p. 161-169, 1980.
- ANTUNES-MADEIRA, M. C.; VIDEIRA, R. A.; KLÜPPEL, M. L.; MADEIRA, V.M.C. Amiodarone effects on membrane organization evaluated by fluorescence polarization. **Int. J. Cardiol.**, Shannon, v. 48, p. 211-218, 1995.
- BABIAK, R. M. V., CAMPELLO, A. P.; CARNIERI, E. G. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 16, p. 283-293, 1998.
- BADACHIKAR, S. V.; TIKARE, R. K.; PURANIK, G. S. Synthesis, reactions & biological activity of 3-[*p*-(N-methyl/ethyl-N-phenylcarbamoyl)] phenylsydones. **Indian J. Chem.**, New Delhi, v. 25B, p. 1079-1080, 1986.
- BAKER, W.; OLLIS, W. D. Meso-ionic compounds. **Chem. Ind.**, Belgrade, v. 16, p. 910-911, 1955.

- BASTOS, M. T. C. C.; OLIVEIRA, M. B. M.; CAMPELLO, A. P.; KLÜPPEL, M. L. W. Methotrexate: studies on cellular metabolism IV. Effect on the mitochondrial oxidation of cytosolic-reducing equivalents in HeLa cells. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 8, p. 199-203, 1990.
- BERTINA, R. M.; SLATER, R. E. The effects of phosphate and electron transport on the carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone - induced ATPase of rat-liver mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 376, p. 492-504, 1975.
- BEUTNER, G.; RÜCK, A.; RIEDE, B.; BRDICZKA, A. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1368, p. 7-18, 1998.
- BIAM. Disponível em: <http://cri.ensmp.fr/biam/www/sub4665.html>. Acessado em 28/06/1999.
- BOGUCKA, K.; WRONISZEWSKA, A.; BEDNAREK, M.; DUSZYNSKI, J.; WOJTCZAC, L. Energetics of Ehrlich ascites mitochondria: membrane potential of isolated mitochondria within digitonin-permeabilized cells. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1015, p. 503-509, 1990.
- BROOKES, P.; WALKER, J. Formation and properties of sydnone imines, a new class of mesoionic compound, and some sydnones related to natural α -amino-acids. **J. Chem. Soc. (LOND)**, London, p. 4409-4416, 1957.
- BRUZZESE, T.; CASADIO, S.; MARAZZI-UBERTI, E.; TURBA, C. Synthesis and pharmacological screening of 3-aminoalkyl-sydnones. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v. 54, n. 7, p. 1041-1044, 1965a.
- BRUZZESE, T.; CASADIO, S.; COPPI, G.; MARAZZI-UBERTI, E. Synthesis and pharmacological screening of aminoalkyl-hydrazines. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v. 54, n. 7, p. 1056-1057, 1965b.

- BUCHI, D. F.; SOUZA, W. Internalization of surface components ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Bologna, v. 24, p. 135-141, 1992.
- CAETANO, N. N. **Avaliação de alguns parâmetros metabólicos de células HeLa e efeito do metotrexato**. Curitiba, 1991. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- CAETANO, N. N.; CAMPELLO, A. P.; CARNIERI, E. G. S.; KLÜPPEL, M. L. W.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of methotrexate (MTX) on NAD(P)⁺ dehydrogenases of HeLa cells: malic enzyme, 2 - oxoglutarate and isocitrate dehydrogenases. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 15, p. 259-264, 1997.
- CAETANO, N. N.; CAMPELO, A. P.; KLÜPPEL, M. L. W.; OLIVEIRA, M. B. M. Calcium transport by HeLa cell mitochondria. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 8, p. 781-787, 1992.
- CAI, J.; YANG, J.; JONES, D. P. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1366, p.139-149, 1998.
- CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; CARVALHO, A. A.; GOMES, C. L.; ECHEVARRIA, A.; IVO, A.; JANSEN, A. M.; LEON, L. L. A comparative study on the effect of mesoionic compounds against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/www-mem/96/caxambu/che.html>. Acessado em 08/11/1999.
- CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; BUCHI, D. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J., OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Bologna, v. 29, n. 4, p. 503-509, 1997.

- CHANCE , B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 217, n.1, p. 383-393, 1955.
- CLARK, L. C. Monitoring and control of blood O₂ tension. **Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs**, Hagerstown, v. 2, p. 41-49, 1956.
- CONAGLEN, J. V.; MALTHUS, R. S.; REDSHAW-LOTEN, J. C.; SNEYD, J. G. T. The action of anoxia and cyanide on glycogen breakdown in the liver of the *gsd/gsd* rat. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 145, p. 323-327, 1984.
- CORELL, T.; PEDERSEN, S. B.; LISSAU, B.; MOILANEN, E.; METSÄ-KETELÄ, T.; KANKAANRANTA, H.; VUORINEN, P.; VAPAATALO, H.; RYDELL, E.; ANDERSSON, R.; MARCINKIEWICZ, E.; KORBUT, R.; GRYGLEWSKI, R. J. Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. **Pol. J. Pharm.**, Cracow, v. 46, p. 553-566, 1994.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Cell injury and cellular death. In:____. **Robbins. Pathologic basis of disease**. Philadelphia: W. B. Saunders company, 1994. p. 1-21.
- CREUTZ, C.; SUTIN, N. Reduction of ferricytochrome c by dithionite ion: electron transfer by parallel adjacent and remote pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington DC, v. 70, n. 6, p. 1701-1703, 1973.
- CZOC, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate - 2 - phosphate. **Methods Enzym. Anal.**, Weinheim, p. 1446-1451, 1974.
- DALY, J. W. Adenosine receptors: targets for future drugs. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v. 25, n. 3, p. 197-207, 1982.
- DAVIS, D.; BECKER, H. J.; ROGERS, E. F. The chemotherapy of wheat and bean rust diseases with sydnones. **Phytopathology**, St. Paul, v. 49, p. 821-823, 1959.

- DEUCAUDIN, D.; GELEY, S.; HIRSCH, T.; CASTEDO, M.; MARCHETTI, P.; MACHO, A.; KOFLER, R.; KROEMER, G. Bcl-2 and Bcl-X_L antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 57, p. 62-67, 1997.
- EARL, J. C.; MACKNEY, A. W. The action of acetic anhydride on N-Nitrosophenylglycine and some of its derivatives. **J. Chem. Soc. (LOND)**, London, p. 899 - 900, 1935.
- ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. **Methods Enzymol.**, New York, v. 10, p. 41-47, 1967.
- FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 66, p. 375-400, 1925.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.**, New York, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.
- GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 12, p. 264-265, 1952.
- GLENNON, R. A.; ROGERS, M. E.; SMITH, J. D.; EL-SAID, M. K. Mesoionic xanthine analogues: phosphodiesterase inhibitory and hypotensive activity. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v. 24, n. 6, p. 658-661, 1981.
- GLENNON, R. A.; TEJANI-BUTT, S. M.; PADGETT, W.; DALY, J. W. Mesoionic xanthine analogues: antagonists of adenosine receptors. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v. 27, n. 10, p. 1364-1367, 1984.

- GOLD, R.; SCHMIED, M.; GIEGERICH, G.; BREITSCHOPF, H.; HARTUNG, H. P.; TOYKA, K. V.; LASSMANN, H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 71, n. 2, p. 219-225, 1994.
- GRECO, C. V.; NYBERG, W. H.; CHENG, C. C. Synthesis of sydnone and sydnone imines. **J. Med. Pharm. Chem.**, Washington DC, v. 5, p. 861-865, 1962.
- GRYNBERG, N.; GOMES, R.; SHINZATO, T. ECHEVARRIA, A.; MILLER, J. Some new aryl-sydnones: effects on murine tumours. **Anticancer Res.**, Attiki, v 12, n. 3, p. 1025-1028, 1992.
- GRYNBERG, N.; SANTOS, A. C.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium - 2-aminide class. **Anti-Cancer Drugs**, Oxford, v. 8, p. 88-91, 1997.
- GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. A. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. **Methods Enzym. Anal.**, Weinheim, p. 1464-1469, 1974.
- HALESTRAP, A. P.; WOODFIELD, K.; CONNERN, C. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 272, n. 6, p. 3346-3354, 1997.
- HARRIS, E. J.; VAN DAM, K.; PRESSMAN, B. C. Dependence of uptake of succinate by mitochondria on energy and its relation to potassium retention. **Nature**, v. 18, p. 1126-1127, 1967.
- HEYTLER, P. G. Uncouplers of oxidative phosphorylation. In: PACKER, L.; FLEISCHER, S. **Select methods in enzymology - Biomembranes**, San Diego: Academic Press, 1997. p 613-623.

- HOGG, N.; DARLEY-USMAR, V. M.; WILSON, M. T.; MONCADA, S. Production on hydroxyl radicals from simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. **Biochem. J.**, London, v. 281, p. 419-424, 1992.
- JAIN, M. K.; WU, N. M. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer. **J. Memb. Biol.**, New York, v. 34, p. 157-201, 1977.
- KANE, D. J.; SARAFIAN, T. A.; ANTON, R.; HAHN, H.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S.; ÖRD, T.; BREDESEN, D. E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, Washington DC, v. 262, 1274-1277, 1993.
- KANKAANRANTA, H.; RYDELL, E.; PETERSSON, A. S.; HOLM, P.; MOILANEN, E.; CORELL, T.; KARUP, G.; VUORINEN, P.; PEDERSEN, S. B.; WENNMALM, A; METSÄ-KETELÄ, T. Nitric oxide-donating properties of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives. **Br. J. Pharm.**, Basingstoke, v. 117, p. 401-406, 1996.
- KEER, J. R. F.; GOBÉ, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. In: SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A. **Methods in cell biology - Cell death**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 1-27.
- KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII, E. L.; ANDRADE, P. V. M.; BRACHT, A. Construção de aparelho de perfusão de fígado para estudos de regulação do metabolismo e de mecanismos de ação de drogas. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v. 27, n. 4, p. 419-438, 1984.
- KEMMELMEIER, F. S.; BRACHT, A. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug mefenamic acid on energy metabolism in the perfused rat liver. **Biochem. Pharmacol.**, Kidlington, v. 38, n. 5, p. 823-830, 1989.

- KEYHANI, J.; KEYHANI, E. Cytochrome c oxidase biosynthesis and assembly in *Candida utilis* yeast cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 167, p. 588-595, 1975.
- KIBERSTIS, P. A. Mitochondria make a comeback. **Science**, Washington DC, v. 283, p. 1475, 1999.
- KIER, L. B.; ROCHE, E. B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v. 56, n. 2, p. 149-168, 1967.
- KIMMIG, R.; MAUCH, T. J.; KERZL, W.; SCHWABE, U.; SCHOLZ, R. Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver. 1. Kinetics of inhibitory effect on glycolysis and the stimulatory effect on glycogenolysis. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 136, p. 609-616, 1983.
- KITAGAWA, S.; MATSUBAYASHI, M.; KOTANI, K.; USUI, K.; KATEMANI, F. Asymmetry of membrane fluidity in the lipid bilayer of blood platelets: fluorescence study with diphenylhexatriene and analogs. **J. Memb. Biol.**, New York, v. 119, p. 221-227, 1991.
- KLINGENBERG, M.; ROTTENBERG, H. Relation between the gradient of the ATP/ADP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 73, p. 125-130, 1977.
- KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.**, Tarrytown, v. 26, n. 3/4, p. 463-471, 1999.
- KRAAYENHOF, R.; VAN DAM, K.; Interaction between uncouplers and substrates in rat liver mitochondria **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 172, p. 189-197, 1969.
- KREBS, H. A.; HENSELEIT, K. Untersuchungen über die hannstoffbildung im tierkörper .**Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, Berlin, v. 210, p.33-66, 1932.

- KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. In: HOFFMAN, J. F.; WEER, P. **Ann. Rev. Physiol.**, Palo Alto, p. 619-642, 1998.
- KULKARNI, A. BYAZKOWSKI, J. Z. Hepatotoxicity. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. **Introduction to biochemical toxicology**. Norwalk: Appleton & Lange, 1994. p. 464-465.
- LENTZ, B. R.; BARENHOLZ, Y.; THOMPSON, T. E. Fluorescence depolarization studies of phase transition and fluidity in phospholipid bilayers. 1-Single component phosphatidylcholine liposomes. **Biochemistry**, Washington DC, v. 15, n. 20, p. 4521-4528, 1976.
- LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; FILHO, J. M. B.; FILHO, L. X. Atividades antibacteriana e antifúngica de derivados mesoiônicos. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 132-136, 1986.
- LITMAN. B. J. ; BARENHOLZ, Y. Fluorescent probe diphenylhexatriene. **Methods. Enzymol.**, New York, v. 81, p. 678-685, 1982.
- LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, Cambridge, v. 86, p. 147-157, 1996.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. C.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.** Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MACGAHON, A. J.; MARTIN, S. J.; BISSONETE, R. P.; MAHBOUBI, A.; YUFANG, S.; MOGIL, R.J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R. The end of cell line: methods for the study of apoptosis in vitro. In: SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A. **Methods in cell biology - Cell death**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 154-165.

- MACKIE, J. E.; BACK, D. W.; HAMILTON, J. W.; MARKS, G. S. Elevation of δ -aminolevulinic acid synthase and cytochrome P_B₁ P450 messenger RNA levels by dihydropyridines, dihydroquinolines, sydnone and *N*-ethylprotoporphyrin IX. **Biochem. Pharmacol.**, Kidlington, v. 42, n. 3, p. 475-483, 1991.
- MAJID, P.A.; DEFEYTER, P. J. F.; VAN DER WALL, E. E.; WARDEH, R.; ROOS, J. P. Molsidomine in the treatment of patients with angina pectoris. **N Engl. J. Med.**, Boston, v. 302, n. 1, p. 1-6, 1980.
- MARGOLIASH, E. The chromatographic behaviour of cytochrome *c* on cation exchangers. **Biochem. J.**, London, v. 56, p. 535-543, 1954.
- MASON, T. L.; POYTON, R. O.; WHARTON, D. C.; SCHATZ, G. Cytochrome *c* oxidase from bakers' yeast. Isolation and properties. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 248, n. 4, p. 1346-1354, 1973.
- MELO, R. F.; STEVAN, F. R.; CAMPELLO, A. P.; CARNIERI, E. G. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Occurrence of the Crabtree effect in HeLa cells. **Cell Biochem. Func.**, Chichester, v. 16, p. 99-105, 1998.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type mechanism. **Nature**, London, v. 191, p. 144-148, 1961.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharm. Rev.**, Baltimore, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.
- MONTANARI, C. A. ; BEEZER, A. E.; SANDALL, J. P. B.; MONTANARI, M. L. C.; MILLER, J.; GIESBRECHT, A. M. On the interaction of some mesoionic compounds with *Saccharomyces-cerevisiae* by biological microcalorimetry. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 274-278, 1992.

- MONTANARI, C. A., AMARAL, A. T.; GIESBRECHT, A. M. Synthesis and antibacterial activity of some new 1,3,4- thiadiazolium -2-aminide derivatives. **Pharmaceutical Sciences**, Wallingford, v. 3, p. 565-568, 1997.
- MORELAND, D. E. Effects of toxicants on oxidative photophosphorylation. In: HODGSON, E; LEVI, P.E. **Introduction to biochemical toxicology**. Norwalk: Appleton and Lange, 1994. p. 345-366.
- MORENO, J. M.; MADEIRA, V. M. C. Interference of parathion with mitochondrial bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1015, 361-367, 1990.
- MOUSTAFA, M. A. A.; EISA, H. M. Synthesis and antimicrobial activity of 3 - (substituted-phenyl) - sydnones. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 325, p. 397-401, 1992.
- MUSTAFA, M. G.; UTSUMI, K.; PACKER, L. Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, Orlando, v. 24, n. 3, p. 381-385, 1966.
- NEWELL, K. J.; TANNOCK, I. F. Reduction of intracellular pH as a possible mechanism for killing cells in acidic regions of solid tumors: effects of carbonylcyanide-3-cholorophenylhydrazone. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 49, p. 4477-4482, 1989.
- NEWTON, C. G.; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic heterocycles . **Tetrahedron**, Kidlington, v. 38, n. 20, p. 2965-3011, 1982.
- NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 2**. San Diego: Academic Press, 1992. 254p.
- NYBERG, W. H.; CHENG, C. C. 3-Piperonylsydnone. A new type of antimalarial agent. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v 8, p. 531-533, 1965.

- OHKI, K. Ca^{2+} induced lateral phase separation in ternary mixture of phosphatidic acid, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine inferred by calorimetry. **J. Biochem.**, Berlin, v. 104, p. 14-17, 1988.
- OLIVEIRA, M. B. M. **Estudos dos efeitos do metotrexato sobre alguns parâmetros metabólicos de células HeLa e em fígado perfundido.** Curitiba, 1986. 107 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- OLIVEIRA, M. B. M.; CAMPELLO, A. P.; KLÜPPEL, M. L. W. Methotrexate: studies on cellular metabolism: III. Effect on the transplasma-membrane redox activity and ferricyanide-induced proton extrusion by HeLa cells. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 7, p. 135-137, 1989.
- OLLIS, W. D.; RAMSDEN, C. A. Meso-ionic compounds. **Adv. Heterocycl. Chem.**, San Diego, v.19, n. 1, p. 1-121, 1976
- PACKER, L.; UTSUMI, K.; MUSTAFA, M. G. Oscillatory states of mitochondria. I. Electron and energy transfer pathways. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 117, p. 381-393, 1966.
- PETIT, P. X.; SUSIN, S; ZAMZAMI, N.; MIGNOTTE, B.; KROEMER, G. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 396, p. 7-13, 1996.
- PETRESCU, I.; TARBA, C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1318, p. 385-394, 1997.
- PHILLIPS, H. J. Dye exclusion tests for viability. In: KRUSE, Jr., P., F., PATTERSON, Jr., M. K. **Tissue culture: methods and applications.** New York: Academic Press, p. 406-408, 1973.

- POZHARSKÜ, A. F.; SOLDATENKOV, A. T.; KATRITZKY, A. R. In _____
Heterocycles in life and society. Chichester : John Wiley & Sons, 1997.
301p.
- PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Ann. Rev. Biochem.**,
Palo Alto, v. 45, p. 501-530, 1976
- PRESSMAN, B. C.; HARRIS, E. J.; JAGGER, W. S.; JOHNSON, J. H. Antibiotic
mediated transport of alkali ions across lipid barriers. **Biochemistry**,
Washington DC, v. 58, p. 1949-1956, 1967.
- PULLMAN, M. E.; PENEFSKY, H. S.; DATTA, A.; RACKER, E. Partial
resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I.
Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine
triphosphatase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 235, n. 11, p. 3322-3329,
1960.
- RAFF, M. C. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**, London, v.
356, p. 397-400, 1992.
- REED, J. C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. **Nature**, London, v.
387, p. 773-776, 1997.
- REHSE, K.; CIBORSKI, T.; MÜLLER, B. Platelet aggregation inhibiting and
anticoagulant effects of oligoamines, XXVII: Inhibition of leucocyte
adherence to endothelium by oligoamine RE 1492C and the NO-donor RE
2047. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 328, p. 125-126, 1995a.
- REHSE, K.; KÄMPFE, M.; SCHLEIFER, K. New NO-donors with antithrombotic
and vasodilating activities, I: 3 arylalkyl-N-nitroso-5-sydnone imines. **Arch.**
Pharm., Weinheim, v. 326, p. 483-487, 1993a.

- REHSE, K.; KESSELHUT, A.; SHEIN, V.; KÄMPFE, M.; ROSE, B.; UNSÖLD, E. Platelet aggregation inhibiting and anticoagulant effects of oligoamines. 15. Antithrombotic effect of selected oligoamines in rats. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 324, p. 301-305, 1991.
- REHSE, K.; KONIG, P. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, XII. Mesoionic oxatriazoles and related monocyclic nitrosohydrazine derivatives. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 328, p. 137-142, 1995b.
- REHSE, K.; SCHLEIFER, K. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, III: 3,4 disubstituted *N*-nitroso-5-sydnone imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 326, p. 929-939, 1993c.
- REHSE, K.; SCHLEIFER, K.; CIBORSKI, T.; BOHN, H. New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, II: 3 alkyl-*N*-nitroso-5-sydnone imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v. 326, p. 791-797, 1993b.
- ROGERS, M. E.; GLENNON, R. A.; SMITH, J. D.; BOOTS, M. R.; NANAVATI, N.; MACONAUGHEY, J. E.; AUB, D.; THOMAS, S. Mesoionic purinone analogues as inhibitors of cyclic-AMP phosphodiesterase: a comparison of several ring systems. **J. Med. Chem.**, Washington DC, v. 24, n. 11, p. 1284-1287, 1981.
- ROSSI, E.; AZZONE, G. F. Ion transport in liver mitochondria. Energy barrier and stoichiometry of aerobic K^+ translocation. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 7, p. 418-426, 1969.
- RUDOLPH, W.; DIRSCHINGER, J. Clinical comparison of nitrates and sydnonimines. **Eur. Heart. J.**, London, v.12 (suppl. E), p. 33-41, 1991.

- SATYANARAYANA, K.; RAO, M. N. A. Synthesis and antiinflammatory, analgesic and antipyretic testing of 4-[1-oxo-(3-substituted aryl) - 2 - propenyl] - 3 - phenylsydnones and 3 - [4 - (3 - (substituted aryl) - 1 - oxo - 2 - propenyl) phenyl] sydnones. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v 84, n. 2, p 263-266, 1995.
- SEPPALA, A. J.; WIKSTROM, M. K. F.; SARIS, N. E. L. Damping of mitochondrial volume oscillations by propranolol and related compounds. In: CHANCE, B.; PYE, E. K.; GHOSO, A. K.; HESS, B. **Biological and Biochemical oscillators**. New York: Academic Press, p. 115-124, 1973.
- SHIMIZU, S.; EGUCHI, Y.; KAMIKE, W.; ITOH, Y.; HASEGAWA, J.; YAMABE, K.; OTSUKI, Y.; MATSUDA, H.; TSUJIMOTO, Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-X_L. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 56, p. 2161-2166, 1996.
- SHINITZKI, M.; BARENHOLZ, Y. Dynamics of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing dicetylphosphate. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 249, n. 8, p. 2652-2657, 1974.
- SIMPSON, J. C. E. 6 - Aminoacetoveratrone and 5 : 6 - Dimethoxy - 3 - meylantranil. **J. Chem. Soc. (LOND)**, London, pt. 1, p. 94 -95, 1946.
- SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenaseS. **Methods Biochem. Anal.**, Weinheim, 1974, v. 22, p. 123-175, 1974.
- SKULACHEV, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1363, p. 100-124, 1998.
- SKULACHEV, V. P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 397, p. 7-10, 1996.

- SLATER, E. C. Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation. **Methods Enzymol.**, New York, v. 10, p. 48-57, 1967.
- SOMLO, M. Induction des lactico-cytocrome c reductases (D - ET L -) de la levure aerobie par les lactates (D - ET- L). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 97, p. 183-201, 1965.
- STEWART, T. G.; KIER, L. B. Synthesis of mesoionic 1,3,4-thiadiazoles. **J. Pharm. Sci.**, Washington DC, v. 54, n. 5, p. 731-734, 1965.
- SUMNER, J. B. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. **Science**, Washington, v. 100, p. 413-414, 1944.
- SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondrial as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1366, p. 151-165, 1998.
- SUTHERLAND, E. P.; MARKS, G. S.; GRAB, L. A.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. Porphyrinogenic activity and ferrochelataze -inhibitory activity of sydnones in chick embryo liver cells. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 197, n. 1,2, p. 17-20, 1986.
- TERADA, H. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 639, p. 225-242, 1981.
- THURMAN, R. G.; SCHOLZ, R. Interaction of glycolysis and respiration in perfusion rat liver - changes in oxygen uptake following the addition of ethanol. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 75, p. 13-21, 1977.
- TOPLACK, H.; BATCHIULIS, V.; HERMETTER, A; HUNZINKER, T.; HONEGGER, U. E.; WIESMANN, U. N. Effects of culture and incubation conditions on membrane fluidity in monolayers of culture cells measured as fluorescence anisotropy using trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1028, p. 67-72, 1990.

- TROTTER, P. J.; STORCH, J. 3-[*p*-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl] phenylpropionic acid (PA-DPH): characterization as a fluorescent membrane probe and binding to fatty acid binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 982, p. 131-139, 1989.
- TZAGOLOFF, A. **Mitochondria**. New York: Plenum Press, 1982. 332p.
- VAN DAM, K. The inhibitory effect of uncouplers of oxidative phosphorylation on mitochondria respiration. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 131, p. 407-411, 1967.
- VAN HOLDE, K. E. Absorption and emission of radiation. In: HAGER, L.; WOLD, F. **Physical biochemistry**. New Jersey: Prentice-Hall, 1975. p. 171-175.
- VERCESI, A. E.; DOCAMPO, R. Ca²⁺ transport by digitonin - permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. **Biochem. J.**, London, v. 284, p. 463-467, 1992.
- VOSS, D. O.; CAMPELO, A. P.; BACILA, M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, Orlando, v. 4, n. 1, p. 48 - 51, 1961.
- VOSS, D. O.; COWLES, J. C.; BACILA, M. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 6, p.211-222, 1963.
- WEBER, G. Enzymology of cancer cells. First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 296, p. 486-493, 1977a.
- WEBER, G. Enzymology of cancer cells. Second of two parts. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 296, p. 541-552, 1977b.

- WILLIAMSON, D. H.; LUND, P.; KREBS, H. A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. **Biochem. J.**, London, v. 103, p. 514-527, 1967.
- WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, London, v. 284, p. 555-556, 1980.
- YANG, J. C.; CORTOPASSI, G. A. Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome c. **Free Radical Biol. Med.**, Tarrytown, v. 24, n. 4, p. 624-631, 1998.
- YOETANI, T.; RAY, G. S. Studies on cytochrome oxidase. VI. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome oxidase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 240, n. 8, p. 1965.
- ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GÓMEZ-MONTERREY, I.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **J. Exp. Med.**, New York, v. 183, p. 1533-1544, 1996.
- ZANOTTI, A. ; AZZONE, G. F. Safranin as membrane probe in rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 201, n. 1, p. 255-265, 1980.
- ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; BRUSTUGUN, O. T.; DOSKELAND, S; O. Injected cytochrome c induces apoptosis. **Nature**, London, v. 391, p. 449-450, 1998.
- ZOU, H. HENZEL, W. J.; LIU, X.; LUTSCHG, A. WANG, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, Cambridge, v. 90, p. 405-413, 1997.