ANA MARIA KELMER BRACHT

EFEITOS METABÓLICOS E TRANSPORTE DO ÁCIDO NIFLÚMICO NO FÍGADO DE RATO

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
1993

ANA MARIA KELMER BRACHT

EFEITOS METABOLICOS E TRANSPORTE DO ACIDO NIFLUMICO NO FIGADO DE RATO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica pela Comissão formada pelos Professores:

Orientador: Prof. Dr. Adelar Bracht
UEM

Profª Drª Eva Gunilla Carnieri
UFPR

Prof. Dr. Fabio Bessa Lima
USP

Prof. Dr. Antônio Ari Gonçalves
UNICAMP

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte
UEM

Curitiba, 07 de maio de 1993

Tese orientada pelo Dr. Adelar Bracht

SUMARIO

Lista de abreviaturas e símbolos 05

Resumo 09

1. **INTRODUÇAO** 10

1.1. Estrutura do ácido niflúmico e anti-inflamatórios relacionados 10

1.2. Atividade anti-inflamatória e efeitos metabólicos do ácido niflúmico e compostos relacionados 13

1.3. Metabolização e espaço de distribuição do ácido niflúmico e compostos relacionados 20

1.4. O fígado perfundido isoladamente como modelo experimental para o estudo do metabolismo 25

1.5. O estudo de fenômenos de transporte no fígado perfundido 30

1.6. Objetivos do trabalho 32

2. **MATERIAIS E METODOS** 34

2.1. Materiais 34

2.2. Animais 34

2.3. O líquido de perfusão 34

2.4. A perfusão do fígado 35

2.5. Experimentos para a avaliação dos efeitos metabólicos do ácido niflúmico 38

2.6. Experimentos de diluição de indicadores múltiplos .. 38

2.7. Analítica 39

2.7.1. Dosagens enzimáticas 39

2.7.2. Dosagens colorimétricas 40

2.7.3. Determinação do consumo de oxigênio 40

2.7.4. Medidas de radioatividade 41

2.7.5. Dosagem espectrofotométrica do ácido niflúmico 41

2.8. Ligação do ácido niflúmico à albumina bovina 45

2.9. Métodos numéricos e estatísticos 46

2.9.1. Apresentação dos dados 46

2.9.2. A concentração livre de ácido niflúmico 46

2.9.3. Ajuste de curvas e outros procedimentos numéricos e estatísticos 47

3. **RESULTADOS E DISCUSSAO** 50

3.1. A ligação do ácido niflúmico à albumina 50

3.2. Efeitos do ácido niflúmico sobre o metabolismo hepático 60

3.2.1. Efeitos sobre o catabolismo do glicogênio e sobre o consumo de oxigênio 60

3.2.2. Efeito do ácido niflúmico sobre a neoglicogênese a partir de piruvato e parâmetros relacionados 74

3.2.3. Efeito do ácido niflúmico sobre o metabolismo do glicerol 85

3.2.4. Efeito do ácido niflúmico sobre o metabolismo da frutose 91

3.3. O espaço de distribuição, transporte e ligação intracelular do ácido niflúmico 94

3.3.1. Curvas de diluição do ácido niflúmico em resposta a infusões contínuas 95

3.3.2. Análise matemática das curvas de diluição do ácido niflúmico 100

3.3.3. Espaços de distribuição e transformação metabólica .. 108

3.3.4. Concentrações intra- e extracelulares 111

3.3.5. O ácido niflúmico ligado intracelularmente 119

4. **DISCUSSAO FINAL E CONCLUSOES** 123

4.1. O ácido niflúmico como ligante da albumina 123

4.2. Os efeitos metabólicos 124

4.3. O transporte e o espaço de distribuição 129

5. **BIBLIOGRAFIA** 141

6. **AGRADECIMENTOS** 152

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Esta lista inclui apenas os símbolos definidos no texto. Ela não contém os símbolos e abreviaturas que já são de uso corrente, tais como, mol, μmol, nmol, ATP, etc.

Símbolo	Primeira menção na página	Definição
α	45	Mol de ácido niflúmico ligado à albumina por mol de albumina nos experimentos de diálise e na equação de Scatchard
A_l	101	Albumina no meio extracelular
Alb	45	Quantidade de albumina presente no meio de incubação nos experimentos de diálise
A_{280}	45	Absorbância do ácido niflúmico a 280 nm
$C \cdot A_l$	101	Complexo ácido niflúmico-albumina no espaço extracelular
C_a	40	Concentração de oxigênio na veia porta
C_e	101	Concentração extracelular total (livre mais ligada) de ácido niflúmico
C_{ef}	101	Concentração extracelular da forma livre (não ligada) do ácido niflúmico
C_f	47	Concentração de ligante livre (ácido niflúmico) na equação de Scatchard e no algoritmo de Abumrad
C_i	101	Concentração intracelular total (livre mais ligada) de ácido niflúmico
C_{if}	101	Concentração intracelular da forma livre (não ligada) do ác. niflúmico
C_o	47	Concentração total de ligante no algoritmo de Abumrad
C_v	40	Concentração de oxigênio na veia hepática

C·X	101	Complexo do ácido niflúmico com componentes intracelulares
ED_{50}	15	Dose que produz 50% do efeito máximo
ϵ_{280}	44	Coeficiente de extinção molar do ácido niflúmico a 280 nm em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4 ($2{,}15 \cdot 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$)
ϵ_{287}	44	Coeficiente de extinção molar do ácido niflúmico em acetato de etila a 287 nm ($2{,}61 \cdot 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$)
ϵ_{340}	44	Coeficiente de extinção molar do ácido niflúmico a 340 nm em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4 ($3{,}67 \cdot 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$)
F	40	Fluxo de perfusado através do fígado (ml/min)
f(t)	103	Função de distribuição de frequência dos tempos de trânsito pelos sinusóides
f	45	Caminho ótico (cm)
f_1	101	Constante de velocidade, possivelmente de primeira ordem, para o influxo na célula da forma livre do ácido niflúmico
f_2	101	Constante de velocidade, possivelmente de primeira ordem, para o efluxo da célula da forma livre do ácido niflúmico
f_3	101	Constante de velocidade, de pseudo primeira ordem, para a biotransformação intracelular da forma livre do ácido niflúmico, igual à soma das constantes individuais de cada processo de biotransformação, *i.e.* $f_{31} + f_{32} + \ldots + f_{3n}$
FCCP	128	Carbonilcianeto *p*-trifluormetoxifenilhidrazona
F/S	24	Razão das concentrações da radioatividade de [^{14}C]ácido niflúmico no fígado e no sangue

Φ	104	Razão do volume aparente extra do ácido niflúmico para o volume aquoso
Γ	47	Produto das constantes de dissociação, *i.e.*, $K_1 \cdot K_2 \cdot \ldots K_n$, sendo n o número de sítios de ligação do ligante à albumina
k_1	113	Constante de velocidade composta, de pseudo primeira ordem, para o influxo de ácido niflúmico na célula ($= f_1 \cdot C_{ef}/C_e$)
k_2	113	Constante de velocidade composta, de pseudo primeira ordem, para o efluxo do ácido niflúmico da célula ($= f_2 \cdot C_{if}/C_i$)
k_3	103	Constante de velocidade composta mensurável, de pseudo primeira ordem, para a transformação metabólica do ácido niflúmico ($= f_3 \cdot C_{if}/C_i$)
K_1, K_2, etc.	47	Constantes de dissociação dos complexos albumina-ácido niflúmico do modelo de Scatchard
K_{a1}, K_{a2}, etc.	49	Constantes de dissociação dos complexos albumina-ácido niflúmico do modelo sequencial de Fletcher
m	53	Número de classes de sítios de ligação no modelo de Scatchard
Mb	101	Membrana plasmática
N_1, N_2, etc. ou N_i	53	Número de sítios de ligação de cada classe m do modelo de Scatchard
p	49	Probabilidade de que determinada diferença seja devida ao acaso no teste t de Student
P	40	Peso úmido do fígado
P_o	47	Concentração total de albumina no algoritmo de Abumrad
ϕ_{i1}, ϕ_{i2}, etc.	49	Inverso das constantes de dissociação do modelo de Scatchard

Q_l	45	Quantidade livre de ácido niflúmico presente nos experimentos de diálise após o sistema ter atingido o equilíbrio
Q_t	45	Quantidade total de ácido niflúmico presente no meio de incubação dos experimentos de diálise
$Q'(t)$	103	Curva de diluição de uma substância resultante de um pulso na entrada da veia porta
$Q_{nif}(t)$	105	Curva de diluição do ácido niflúmico em função do tempo, expressa como fração da concentração portal
$Q'_{água}(t')$	105	Derivada primeira da curva de diluição da água triciada corrigida para o tempo $t' = [(t-t_o)/(1+\Phi) + t_o]$ e expressa como fração por unidade de tempo
θ'	113	Razão do espaço intracelular para o espaço extracelular (sinusóide + espaço de Disse) no fígado
t	103	Tempo
$\bar{t}_r$	113	Tempo médio de trânsito de uma referência para o espaço extracelular
$\bar{t}_w$	113	Tempo médio de trânsito da água triciada
$\bar{t}_n$	113	Tempo médio de trânsito de uma substância que ocupa o mesmo espaço que o ácido niflúmico e não é metabolizada
t_o	103	Tempo de trânsito nos grandes vasos e nos tubos entre o fígado e o sistema de coleta das amostras
V_{O2}	40	Velocidade de consumo de oxigênio, expressa em $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$
V_t	45	Volume total de incubação (tubo de diálise mais líquido externo)
X	101	Componentes intracelulares aos quais se liga o ácido niflúmico

RESUMO

O ácido niflúmico é um anti-inflamatório não-esteróide, derivado do ácido antranílico. Neste trabalho foram investigados (a) a ligação do ácido niflúmico à albumina, utilizando a técnica da diálise de equilíbrio; (b) alguns efeitos metabólicos do ácido niflúmico no fígado de rato em perfusão isolada, principalmente aqueles ligados ao metabolismo energético; (c) o transporte e a distribuição do ácido niflúmico no fígado, com o auxílio da técnica da diluição de indicadores múltiplos.

A análise das curvas **ligação do ácido niflúmico** à albumina bovina revelou um total de 36 sítios de ligação. O melhor modelo de Scatchard encontrado é um modelo com três classes de sítios: (1) classe de quatro sítios com constantes de dissociação iguais a 12,3 μM; (2) classe de dois sítios com constantes de dissociação iguais a 86,1 μM; e (3), classe de 30 sítios com constantes de dissociação iguais a 4,98 mM (sítios de baixa afinidade). Em concentrações fisiológicas de ácido niflúmico e albumina apenas os sítios de alta afinidade estarão ocupados.

Os **efeitos metabólicos do ácido niflúmico** são consistentes com um desacoplamento da cadeia respiratória, conforme detectado anteriormente em mitocôndrias isoladas. O composto ativa processos citosólicos geradores de ATP (glicólise, frutólise e oxidação de glicerol) e inibe processos biossintéticos (neoglicogênese a partir de piruvato e glicerol e transformação de frutose em glicose). A par da inibição da neoglicogênese, o consumo de oxigênio é ativado. Esta ativação se dá quase que apenas na cadeia respiratória. A inibição da neoglicogênese contrasta com a liberação de glicose a partir de glicogênio endógeno (glicogenólise), a qual é ativada. Os efeitos metabólicos do ácido niflúmico correlacionam com a concentração da forma livre no perfusado. A neoglicogênese a partir de piruvato é inibida em 50% por ácido niflúmico portal livre igual a 18,82 μM.

O **transporte e a distribuição intracelular do ácido niflúmico** revelaram uma passagem extremamente rápida através da membrana celular e um espaço de distribuição aparente muito maior do que o espaço aquoso. Na ausência de albumina e quando presente na veia porta numa concentração igual a 10 μM, a razão espaço aparente do ácido niflúmico/espaço aquoso ($1+\Phi$) é igual a 43,5. Esse valor diminui com o aumento da concentração do ácido niflúmico e na presença de albumina. Mesmo com 90% de ligação à albumina no espaço extracelular, no entanto, o valor de $1+\Phi$ ainda é igual a 5,1. O grande espaço aparente do ácido niflúmico reflete uma alta concentração intracelular. Esta alta concentração intracelular não parece ser devida a algum sistema de transporte concentrativo e sim consequência de ligação a componentes intracelulares. Foi possível calcular curvas de ligação do ácido niflúmico aos componentes intracelulares, as quais revelaram duas classes de sítios de ligação com uma capacidade total de ligação igual a 7,97 μmol · (ml espaço aquoso intracelular)$^{-1}$. É possível que os demais ácidos fenâmicos (ácido mefenâmico, ácido flufenâmico, etc.) tenham comportamento semelhante ao do ácido niflúmico no tocante ao transporte e ao espaço de distribuição.

1 - INTRODUÇÃO

Este trabalho analisa, teórica e experimentalmente, algumas das relações de um anti-inflamatório, o ácido niflúmico, com o fígado. Mesmo não sendo o fígado o principal órgão alvo dos agentes anti-inflamatórios, estas relações são importantes. É nos hepatócitos que essas e outras drogas são metabolizadas e o fígado é o sítio onde ocorre o maior número de manifestações tóxicas no organismo (**Scherrer**, 1974). Além disso, estudos de distribuição de drogas no organismo inteiro, frequentemente revelam alta afinidade para com o tecido hepático, o que ocorre também com o ácido niflúmico (**Glasson** *et al.*, 1969). A seguir, nesta *Introdução*, serão tratados vários tópicos básicos e indispensáveis à interpretação dos resultados obtidos nos experimentos descritos mais adiante.

1.1. **Estrutura do ácido niflúmico e anti-inflamatórios relacionados**

O ácido niflúmico pode ser considerado um derivado do ácido antranílico, um grupo ao qual pertence um grande número de compostos com atividades anti-inflamatórias e anti-piréticas (**Scherrer**, 1974; **Scherrer**, 1985). A Figura 1 mostra a estrutura química de vários derivados do ácido antranílico, todos com atividade biológica. Os ácidos flufenâmico, mefenâmico e meclofenâmico são chamados geralmente de ácidos fenâmicos. Eles possuem

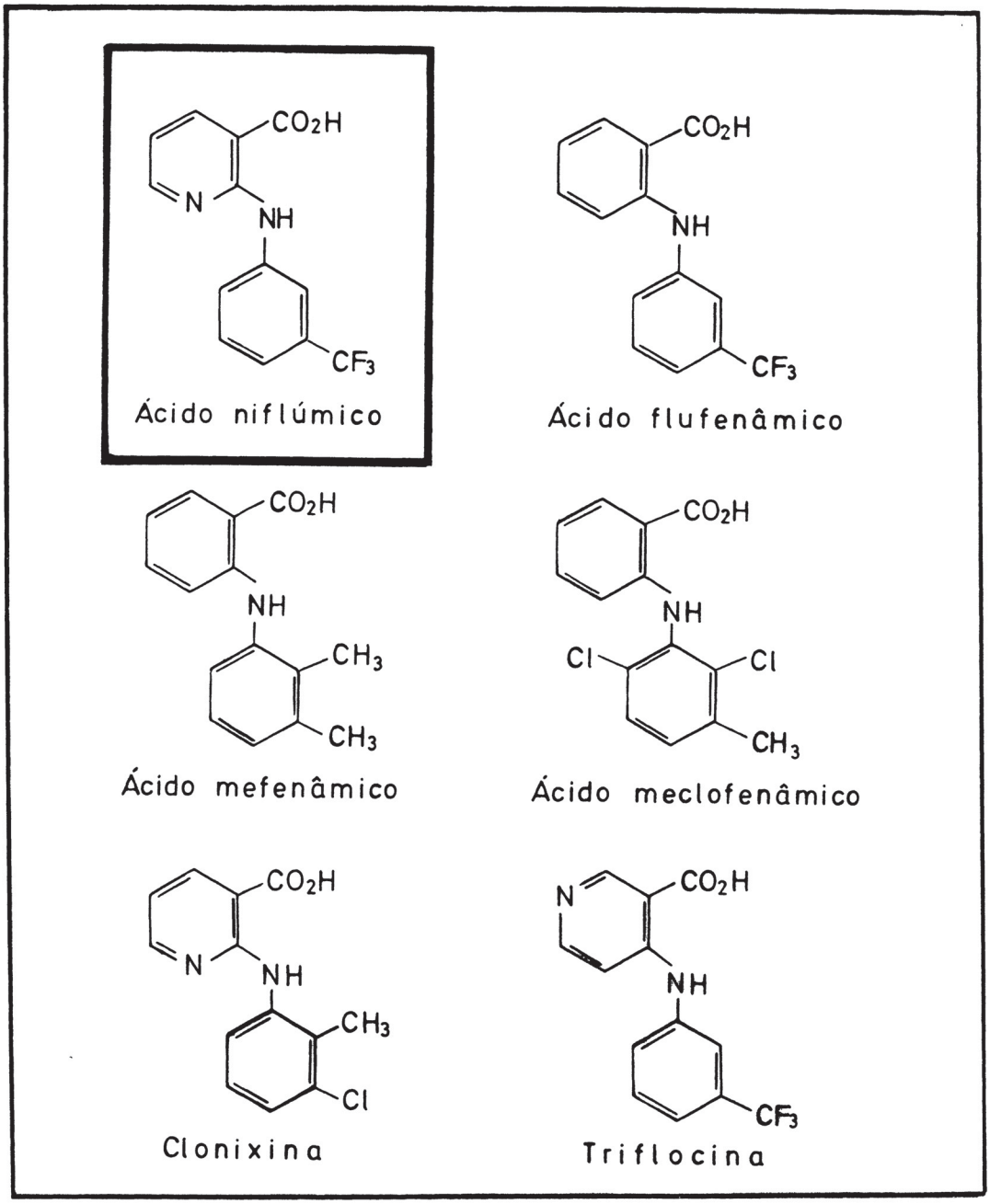

Figura 1. *Estrutura química do ácido niflúmico e de alguns anti-inflamatórios derivados do ácido antranílico* (Scherrer, 1974; Scherrer, 1985).

dois aneis aromáticos unidos por um átomo de nitrogênio. O ácido niflúmico, por outro lado, difere dos ácidos fenâmicos propriamente ditos por possuir um anel heterocíclico, no qual um dos átomos de carbono foi substituído por nitrogênio. Compostos desta classe são muitas vezes chamados de ácidos anilinonicotínicos (**Scherrer**, 1974). A Figura 1 mostra, além da estrutura do ácido niflúmico, as estruturas da clonixina e da triflocina. Todas as estruturas da Figura 1 são, no entanto, muito parecidas, tanto no que tange às propriedades físico-químicas, como também no tocante à atividade biológica (**Scherrer**, 1974). Como se poderia esperar, na intensa busca de moléculas com ação terapêutica, inúmeros derivados foram sintetizados e testados, principalmente nos laboratórios da Parke-Davis (**Scherrer**, 1974). Não parece, contudo, que se tenha logrado descobrir alguma molécula, pertencente a esse grupo, com propriedades muito diferentes das demais. Assim sendo, pode-se encarar o grupo da Figura 1 como representativo.

Tanto o ácido niflúmico, como os demais compostos da Figura 1 são pouco solúveis em água. A alcalinização, no entanto, aumenta a solubilidade e torna possível a utilização de soluções moderadamente concentradas com pH entre 7 e 8, o que dispensa o uso de solventes orgânicos em experimentos com material biológico. A solubilização pela adição de base deve-se, evidentemente, à dissociação da carboxila. A dissociação é quase completa em pH's acima de 7, pois o pK_a do grupo carboxila situa-se em torno de 4 (**Scherrer**, 1985). Graças à ressonância dos anéis aromáticos, unidos por um átomo de nitrogênio, o ácido niflúmico e todos os demais compostos relacionados apresentam de dois a três picos de absorção na faixa ultravioleta (**Ishii**, 1982;

Scherrer, 1985; **Suzuki-Kemmelmeier** e **Bracht**, 1989), fato que possibilita dosagens espectrofotométricas.

1.2. Atividade anti-inflamatória e efeitos metabólicos do ácido niflúmico e compostos relacionados

O estudo das propriedades anti-inflamatórias dos derivados do ácido antranílico remonta a 1962, com estudos patrocinados pela Parke-Davis. O primeiro a ser descrito foi o ácido mefenâmico (**Winder** *et al.*, 1962), vindo logo a seguir o ácido flufenâmico (**Winder** *et al.*, 1963). As propriedades farmacológicas do ácido niflúmico foram descritas pela primeira vez por **Boissier** *et al.* (1967). A Tabela 1 relaciona vários anti-inflamatórios com alguns parâmetros farmacológicos, inclusive a dose que reduz em 50% o edema induzido por carragenina, parâmetro muitas vezes utilizado como medida da atividade anti-inflamatória. O ácido niflúmico tem ação anti-inflamatória em doses próximas às dos ácidos flufenâmico e mefenâmico. Sua ação é nitidamente superior à da fenilbutazona e à da aspirina, mas claramente inferior à da indometacina e à do ácido meclofenâmico. Sua ação é também comparável à da clonixina (**Watnick** *et al.*, 1971), mas bem superior à da triflocina (**Scherrer**, 1974). Apresenta também propriedades analgésicas e pode ser usado no tratamento da artrite, tonsilite e reumatismo. Na clínica médica o ácido niflúmico continua sendo bastante empregado, conforme atestam os diversos estudos de natureza clínica publicados recentemente (**Florentin** *et al.*, 1989; **Verbruggen** *et al.*, 1990; **Duteil** *et al.*,

1990; **Sauvage** *et al.*, 1990; **Dreiser** *et al.*, 1990; **Missika** *et al.*, 1990; **Cannoni** *et al.*, 1990; **Moreau** *et al.*, 1990; **Rommain** *et al.*, 1991; **Illel** *et al.*, 1991).

A DL_{50} do ácido niflúmico, determinada por **Boissier** *et al.* (1967), em camundongos foi de 455 mg/kg de peso corporal na administração por via oral; e, de 200 mg/kg quando administrado por via intraperitoneal. A Tabela 1 mostra que o ácido niflúmico na circulação está quase todo ligado a proteínas plasmáticas, entre 82 e 98%. Na terapia humana os níveis plasmáticos máximos são relativamente elevados, podendo atingir até 360 μM.

Efeitos metabólicos são frequentes para substâncias com ação anti-inflamatória. Esses efeitos são em geral resultantes de uma ação sobre sistemas enzimáticos. Um efeito metabólico que parece ser comum a todos os anti-inflamatórios — e que está na base de seu mecanismo de ação — é a inibição da prostaglandina sintetase, conforme revelado pela Tabela 1. As prostaglandinas são reconhecidamente compostos que estimulam a resposta inflamatória (**Scherrer**, 1985). Todos os derivados do ácido antranílico com atividade anti-inflamatória inibem a prostaglandina sintetase. No caso do ácido niflúmico, 50% de inibição da prostaglandina sintetase *in vitro* ocorre numa concentração de 0,11 μM (**Vane**, 1973). Neste ponto, o ácido niflúmico só é comparável ao ácido meclofenâmico, que inibe a prostaglandina sintetase em 50% numa concentração também em torno de 0,1 μM (**Flower** *et al.*, 1972), sendo os ácidos mefenâmico e flufenâmico menos potentes. Esta ação do ácido niflúmico e compostos relacionados poderia, em tese, ter consequências negativas sobre a glicogenólise estimulada por hormônios, como o glucagon e a epinefrina, já que as prostaglandinas, ao que tudo

TABELA 1

Comparação de algumas propriedades de vários anti-inflamatórios. ED_{50} significa a concentração ou dose que exerce efeito correspondente a 50% do máximo.

	Inibição da Prostaglandina sintetase (ED_{50}) (μM)	Níveis plasmáticos máximos no plasma humano (μM)	Ligação a proteínas plasmáticas (%)	Redução do edema induzido por carragenina na pata de ratos (ED_{50}) (mg/kg)
Ácido meclofenâmico	0,10[a]	10[b]	99,8[b]	15,0[a]
Ácido niflúmico	0,11[a]	240-360[a]	82-98[a]	47[a]
Ácido mefenâmico	0,70[a]-2,06[c]	41[a]	45[a]	55[a]-75[c]
Ácido flufenâmico	2,49[c]	53[d]	90[d]	25[c]
Indometacina	0,17[a]-0,44[c]	5,1[a]	90[a]	2,4[c]-6,5[a]
Fenilbutazona	7,23[a]-12,3[a]	194-486[a]	98[a]	60[c]-100[a]
Aspirina	34,7[a]-83,2[c]	166-194[a]	50-80[a]	75[c]-150[a]

[a]**Vane**, 1973; [b]**Glazko** *et al.*, 1978; [c]**Ham** *et al.*, 1972; [d]**Dell** *et al.*, 1977; [e]**Flower** *et al.*, 1972.

indica, aumentam a ação desses hormônios sobre a glicogenólise (**Miller** *et al.*, 1983; **Brass** e **Garrity**, 1985b).

Há, no entanto, outros efeitos sobre enzimas ou sistemas enzimáticos que podem ter consequências muito maiores para o metabolismo celular. O ácido niflúmico e vários outros anti-inflamatórios, incluindo o ácido mefenâmico, tem ação inibidora sobre a fosforilação oxidativa, conforme detectado em experimentos realizados com mitocôndrias isoladas intactas e em diversas preparações enzimáticas (**Ishii**, 1982; **McDougall** *et al.*, 1983). **Ishii** (1982) estudou extensivamente o efeito do ácido

niflúmico sobre mitocôndrias de fígado de rato em sua monografia experimental de especialização. A Tabela 2, reproduzida de **Ishii** (1982), ilustra os efeitos da droga sobre a respiração e o controle respiratório de mitocôndrias. Com α-cetoglutarato como substrato, ácido niflúmico tem efeito na faixa entre 1 e 10 μM. A respiração do estado IV (sem ADP exógeno) é ativada; a respiração do estado III é ativada em baixas concentrações, depois inibida. O controle respiratório, dado pela razão entre as respirações no estado III para o estado IV, diminui progressivamente, até atingir a unidade. Em concentrações acima de 11 μM, o ácido niflúmico passa também a inibir a respiração no estado IV. Resultados semelhantes foram obtidos também com L-glutamato e succinato como substratos. Por outro lado, o ácido niflúmico também inibe a energização da membrana mitocondrial, como evidenciado por medidas do *swelling* controlado. Isto ocorre quando a membrana é energizada por substratos, como succinato e glutamato, mas também quando a energização ocorre por causa da hidrólise de ATP. Estes e outros dados indicam que o ácido niflúmico é, na realidade, um eficiente desacoplador da fosforilação oxidativa. Há outros efeitos que ocorrem em concentrações maiores da droga: inibição da NADH-oxidase, da succinato oxidase e da succinato desidrogenase.

Em suma, o ácido niflúmico teria capacidade de afetar o metabolismo energético em concentrações baixas (Tabela 2) quando comparado com a concentração de pico no plasma humano (Tabela 1). É preciso que se diga, no entanto, que os experimentos de **Ishii** (1982) foram feitos sem albumina ou qualquer outro ligante no meio de incubação, o que tem considerável influência sobre a atividade de qualquer droga no organismo inteiro. Embora não se

TABELA 2

Velocidades de consumo de O_2 em nmol · segundo^{-1}, por mitocôndrias de fígado de rato e o efeito do ácido niflúmico. O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente, com α-cetoglutarato 50 mM como substrato. Estado III é o estado em que as mitocôndrias estão fosforilando ADP adicionado exogenamente; o estado IV é o estado que sobrevem após o ADP adicionado exogenamente ter sido fosforilado (**Chance** e **Williams**, 1955). Todos os dados foram obtidos de **Ishii** (1982).

Concentração do ácido niflúmico (μM)	Consumo de oxigênio no estado III (nmol · segundo^{-1})	Consumo de Oxigênio no estado IV (nmol · segundo^{-1})	Razão do consumo de oxigênio no estado IV para o estado III
0	1,60	0,55	2,90
1,85	1,85	0,74	2,50
3,7	2,20	1,05	2,08
5,6	1,90	1,10	1,72
7,4	1,78	1,23	1,45
11,2	1,35	1,35	1,00

possa prever a concentração necessária, uma inibição da fosforilação sempre tem efeitos sobre várias vias metabólicas: haverá uma tendência em ativar processos anaeróbicos de fosforilação (fermentação lática) e inibir processos de biossíntese (neoglicogênese, por exemplo). O efeito sobre a respiração de células intactas deverá ser complexo, podendo haver inibição ou ativação, tudo dependendo do estado da célula e da concentração do ácido niflúmico.

A ação de anti-inflamatórios sobre as funções mitocondriais já foi objeto de vários trabalhos. **Miyabara** e **Karlem** (1965), por exemplo, estudaram a ação dos salicilatos, incluindo a aspirina,

tendo verificado que esses compostos atuam como desacopladores, além de serem capazes de inibir o transporte de elétrons. **McDougall** *et al.* (1983), num trabalho mais recente, puderam demonstrar a ação desacopladora de vários anti-inflamatórios, incluindo os ácidos mefenâmico e flufenâmico. Comparando os dados de **McDougall** *et al.* (1983) com os de **Ishii** (1982) verifica-se que como desacoplador, o ácido niflúmico é bem mais potente que o ácido mefenâmico; mas, entre o ácido niflúmico e o ácido flufenâmico a diferença é relativamente pequena, embora o primeiro pareça ser um pouco mais potente.

Com base nos dados de **McDougall** *et al.* (1983), foram realizados no Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade de Maringá vários experimentos com o ácido mefenâmico (**Suzuki-Kemmelmeier** e **Bracht**, 1989). Foi demonstrado que o ácido mefenâmico ativa a glicólise, a glicogenólise e o consumo de oxigênio, além de inibir a síntese de glicose a partir de frutose no fígado perfundido, numa faixa de concentração que vai de 100 à 1000 μM. É provável, no entanto, que haja efeitos também com concentrações abaixo de 100 μM. Essas concentrações superam em uma ordem de grandeza aquelas que provocam desacoplamento em mitocôndrias isoladas (**McDougall** *et al.*, 1983), fato que bem evidencia a impossibilidade de uma extrapolação direta das observações feitas em organelas isoladas para a célula intacta. Se, porém, o ácido niflúmico — por analogia com o que ocorre com o ácido mefenâmico — exercer os efeitos correspondentes em concentrações dez vezes maiores do que aquelas nas quais desacopla a fosforilação em mitocôndrias isoladas, esses efeitos deverão ocorrer no fígado perfundido entre 10 e 100 μM, bem abaixo das concentrações de pico na terapia humana, conforme a

Tabela 1. Além do ácido mefenâmico, também o ácido meclofenâmico foi testado sobre o metabolismo celular. **Brass** e **Garrity** (1985a) demonstraram que o ácido meclofenâmico, o ibuprofen e a indometacina, todos anti-inflamatórios, ativam a glicogenólise em hepatócitos isolados, efeito similar àquele encontrado para o ácido mefenâmico. Tanto os experimentos de **Suzuki-Kemmelmeier** e **Bracht** (1989), como também os de **Brass** e **Garrity** (1985a), foram realizados com baixas concentrações de albumina no meio extracelular. Isto é, evidentemente, um fator que dificulta a extrapolação dos dados para o organismo inteiro, já que as drogas estão em grande parte ligadas às proteínas plasmáticas, conforme se pode ver na Tabela 1. Seria interessante que futuros experimentos levassem em conta também esta variável.

Uma propriedade do ácido niflúmico que tem sido recentemente objeto de vários trabalhos é a sua capacidade de inibir canais e carreadores de íons. O ácido niflúmico, em concentrações na faixa μM, inibe a troca de Cl^- e HCO_3^- em eritrócitos e tem sido ferramenta útil no estudo do mecanismo de ação do carreador de ânions inorgânicos (**Falke** e **Chan**, 1986a; **Falke** e **Chan**, 1986b). Esta ação do ácido niflúmico como inibidor de canais e carreadores de íons estende-se a uma grande variedade de tecidos e sistemas. Assim, por exemplo, em células de músculo liso o ácido niflúmico inibe os fluxos de cloreto ativados por cálcio (**Pacaud** *et al.*, 1989); em células vermelhas falciformes, o ácido niflúmico foi capaz de inibir o fluxo de cátions induzido por deoxigenação (**Joiner**, 1987); na bexiga urinária, o ácido niflúmico reduziu a magnitude da repolarização da membrana basolateral, o que foi atribuído a uma ação sobre o transporte de ânions (**Donaldson** *et al.*, 1989); na membrana do nódulo de Ranvier

de rãs, o ácido niflúmico parece influir nos canais de sódio (**Lonski** *et al.*, 1989); a abertura de canais de cloreto (τ-aminobutirato[GABA]-dependentes), aumentada por Cl^-, Br^- ou I^-, é diminuída por ácido niflúmico na faixa de 30 a 150 μM (**Evoniuk** e **Skolnick**, 1988); e, em eritrócitos, o ácido niflúmico e outros anti-inflamatórios inibem o transporte de sulfato (**Scuteri** *et al.*, 1987), que é feito pelo mesmo carreador responsável pela troca Cl^--HCO_3^-. Este último efeito tem interesse no que tange ao fígado por causa do sulfato. Não há no fígado troca de cloreto-bicarbonato na membrana plasmática, ao menos na face que separa os hepatócitos dos sinusóides (**Bracht** *et al.*, 1981). O transportador de ânions no fígado é essencialmente um translocador de sulfato, sendo a permeação do cloreto muito lenta enquanto que o bicarbonato permeia a membrana na forma de CO_2 (**Bracht** *et al.*, 1981). O sulfato é necessário para a biotransformação de drogas e uma inibição do transporte desse ânion poderia prejudicar a biotransformação do próprio ácido niflúmico. Seria necessário, no entanto, um grau muito elevado de inibição, pois a troca de sulfato entre os espaços celular e extracelular é bastante rápida (**Bracht** *et al.*, 1981).

1.3. Metabolização e espaço de distribuição do ácido niflúmico e compostos relacionados

A metabolização do ácido niflúmico e de todos os ácidos fenâmicos em geral não se afasta muito dos padrões gerais já bem estabelecidos. Em linhas gerais, pode-se dizer que predominam os produtos de conjugação, principalmente com ácido glicurônico (**Scherrer**, 1985), mas provavelmente também com sulfato (**Glasson**

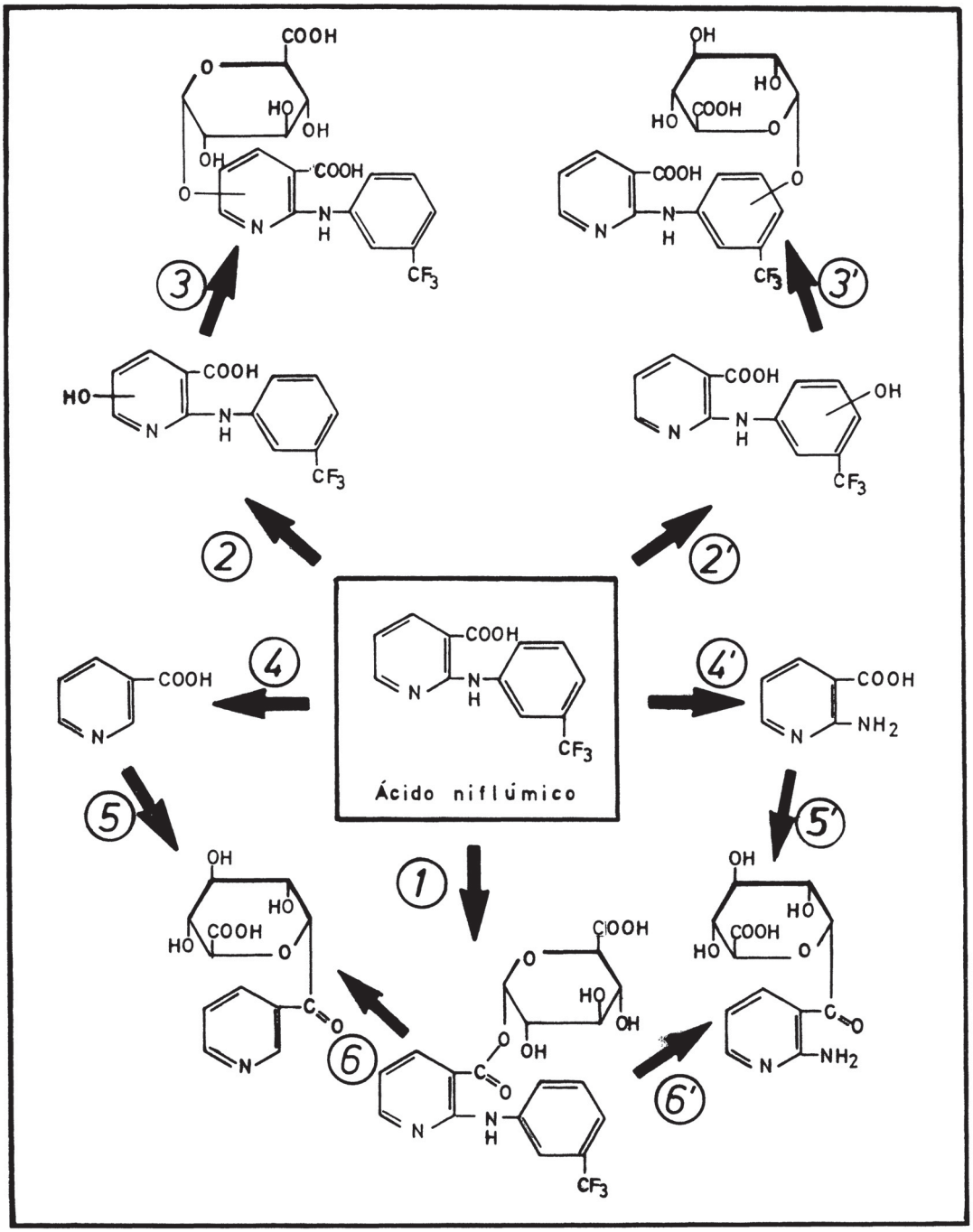

Figura 2. ***Vias de metabolização e produtos de metabolização do ácido niflúmico.*** De acordo com dados apresentados por **Glasson** *et al.* (1969) e **Scherrer** (1985).

et al., 1969). Pode ocorrer também uma quebra da molécula de um ou do outro lado do nitrogênio que liga os dois aneis. A Figura 2 esquematiza parte dos resultados obtidos por **Glasson** *et al.* (1969) num detalhado estudo sobre a distribuição, excreção, metabolismo e localização do ácido niflúmico em ratos e camundongos. De acordo com esses autores pode haver: conjugação da carboxila com ácido glicurônico ou com sulfato (via 1 na Figura 2); hidroxilação dos anéis aromáticos (2 e 2´), seguida de conjugação com ácido glicurônico ou sulfato (3 e 3´); separação dos dois anéis produzindo ou ácido nicotínico ou ácido *p*-amino-nicotínico (4 e 4´), os quais acabam em sua maior parte também conjugados com glicuronato ou sulfato (5 e 5´); a separação dos dois anéis pode ocorrer também após a conjugação da carboxila com glicuronato ou sulfato (6 e 6´); finalmente, pode também haver descarboxilação, com produção de CO_2. A detecção desse último produto foi possível graças à utilização de ácido niflúmico marcado com ^{14}C na carboxila (**Glasson** *et al.*, 1969). A descarboxilação é um processo bastante lento e apenas 5% da radioatividade injetada nos ratos foi recuperada como $^{14}CO_2$ após um período de 12 horas. Um exame dos dados obtidos entre 3 e 12 horas após a injeção do ácido niflúmico marcado revela que a proporção de ácido nicotínico e de ácido *p*-aminonicotínico e derivados conjugados na urina aumenta com o tempo. Isto indica que a separação dos anéis pode ocorrer mesmo depois de já ter havido hidroxilações e conjugações. Três horas após a injeção, 10% do material radioativo na urina são produtos de separação dos anéis aromáticos, conjugados ou não; 87% são produtos conjugados; e, apenas 2% são produtos hidroxilados sem conjugação. Após 12 horas a proporção de produtos resultantes da separação dos anéis

sobe para 27%. É altamente provável que num tempo anterior às 3 horas após a injeção a proporção de metabólitos conjugados sem separação dos anéis aromáticos tenha uma predominância ainda maior. Esta predominância dos produtos conjugados favorece a extração e a análise da droga não metabolizada, já que os conjugados tem baixa afinidade por solventes apolares como, por exemplo, o acetato de etila (**Titus** *et al.*, 1971).

A conjugação de ácido glicurônico com a carboxila, formando uma ligação ester, é uma particularidade interessante de todos os ácidos fenâmicos (**Scherrer**, 1974). De início duvidou-se da existência desse metabólito, mas a incubação de extratos da urina de ratos tratados com ácido niflúmico em meio contendo suco digestivo de *Helix pomatia* mais arilsulfatase resultou na produção de ácido niflúmico livre, não-hidroxilado, o que prova a existência daquele conjugado (**Glasson** *et al.*, 1969). De qualquer forma, a conjugação tanto de sulfato como de glicuronato com a carboxila é um processo lento comparado com a conjugação com hidroxilas ligadas a anéis aromáticos. A hidroxilação de anéis aromáticos, por outro lado, é também em geral um processo mais lento do que a conjugação (**Mandel**, 1971). Isto explica a absoluta predominância de conjugados entre os metabólitos dos ácidos fenâmicos em geral, pois a hidroxilação é fator limitante, a não ser que as oxidases de função mista sejam ativadas por tratamento prévio do animal com fenobarbital, por exemplo (**Thurman** e **Kauffman**, 1980). De fato, a velocidade de conjugação de diversas drogas foi ativada em várias vezes por tratamento prévio dos animais com fenobarbital (**Thurman** e **Kauffman**, 1980). Por isto, é de se esperar que a metabolização do ácido niflúmico seja mais lenta do que a de um composto com anéis aromáticos hidroxilados,

como por exemplo, o acetaminofeno (**Itinose** *et al.*, 1989).

Glasson *et al.* (1969) estudaram também a distribuição do [^{14}C]ácido niflúmico nos diversos órgãos do rato. A radioatividade distribui-se por todo o corpo, porém desigualmente. No cérebro a concentração é pequena, enquanto que o fígado é o órgão onde há maior concentração. Os dados de **Glasson** *et al.* (1969) são suficientemente completos de modo a permitir o cálculo da razão das concentrações da radioatividade no fígado e no sangue (razão F/S). Assumindo que no rato a razão do volume aquoso do fígado para o volume aquoso do sangue seja de 0,66, os valores de F/S a 1, 3 e 6 horas após a injeção de [^{14}C]ácido niflúmico são 1,3, 2,5 e 1,93, respectivamente. Isto significa que a concentração de radioatividade no fígado é maior que no sangue. Considerando que o ácido niflúmico está predominantemente ligado a proteínas plasmáticas este dado é surpreendente, pois a ligação extracelular deveria deslocar o equilíbrio para o lado externo, o que ocorre por exemplo com ácidos graxos. A concentração intracelular de palmitato, por exemplo, é menos de um décimo da concentração extracelular quando a albumina está presente em concentrações fisiológicas (**Cooper** *et al.*, 1987; **Bracht** *et al.*, 1990). É verdade que a radioatividade total não representa apenas ácido niflúmico, já que no fígado ocorre a metabolização. **Glasson** *et al.* (1969) inclusive explicaram a maior concentração da radioatividade no fígado como consequência da metabolização. Porém, a metabolização por conjugação visa justamente tornar mais solúveis as drogas e assim acelerar a sua eliminação. Assim, não se deve esperar *a priori* uma concentração muito grande de metabólitos conjugados no fígado. De fato, experimentos realizados por **Doi-Sakuno** *et al.* (1989) com [^{35}S]paracetamol-

sulfato indicam que o espaço intracelular aparente desse metabólito do paracetamol é bem menor do que o espaço extracelular, isto é, o composto conjugado tende a ser eliminado para o espaço extracelular, sendo a constante de velocidade para o efluxo bem maior do que a de influxo. Por isto, é provável que o fígado tenha capacidade de concentrar o ácido niflúmico intracelularmente. **Suzuki-Kemmelmeier** e **Bracht** (1989) concluíram que o ácido mefenâmico também pode ser concentrado intracelularmente no fígado perfundido. Assim sendo, esse é um aspecto que diz respeito aos ácidos fenâmicos e seus derivados de um modo geral e merece, certamente, ser investigado. Estudar o espaço de distribuição do ácido niflúmico implicará também em estudar o seu transporte através da membrana celular, já que se trata aí de aspectos intimamente relacionados.

1.4. O fígado perfundido isoladamente como modelo experimental para o estudo do metabolismo

Os dados apresentados acima sobre o ácido niflúmico e os anti-inflamatórios em geral permitem levantar várias questões que só podem ser respondidas experimentalmente. A possibilidade de um trabalho experimental, por outro lado, levanta a questão do modelo experimental a ser utilizado. O metabolismo, seja no fígado ou em outros órgãos, pode ser estudado em modelos experimentais de complexidades distintas. No caso mais simples, pode-se estudar uma enzima isolada. Os dados assim obtidos, no entanto, não permitem dizer muito, principalmente quando se trata de regulação, pois não é possível imitar com perfeição a situação no meio intracelular, já que em geral há um grande número de co-

fatores e coenzimas participando, cujas concentrações não são conhecidas. Um modelo mais complexo são organelas isoladas, mitocôndrias por exemplo. Se o processo de isolamento for eficiente, os sistemas enzimáticos estarão razoavelmente conservados, permitindo estudar muitos aspectos do metabolismo e sua regulação (**Voss** *et al.*, 1961). De fato, organelas isoladas foram e continuam sendo muito úteis para estudar mecanismos, regulação do metabolismo ou o efeito de medicamentos. O maior problema das organelas isoladas são as vias metabólicas que se subdividem em vários compartimentos (neoglicogênese, por exemplo). Neste caso, uma organela isolada representará, necessariamente apenas uma parte destas vias. Essa desvantagem pode ser eliminada com a utilização de células intactas isoladas. No caso de células que mesmo no organismo se apresentam isoladas (eritrócitos, por exemplo) ou para seres unicelulares (bactérias e protozoários, por exemplo) este é o melhor sistema *in vitro* que pode existir. É possivel também isolar células daqueles tecidos nos quais elas normalmente estão agrupadas e unidas entre si. Assim, pode-se isolar hepatócitos do tecido hepático com conservação da maior parte das funções vitais (**Berry** e **Friend**, 1969). Muitos métodos foram desenvolvidos para o isolamento de células. Em geral utilizam-se enzimas que atacam as estruturas que mantém unidas as células (colagenase, por exemplo), permitindo assim a sua separação. Células intactas contém, naturalmente, todas as enzimas, coenzimas, cofatores e estruturas necessárias ao funcionamento, o que faz delas um sistema experimental bastante confiável. Pode-se também fazer cultivo de células, o que é muito utilizado para células tumorais. As desvantagens das células isoladas de tecidos

residem basicamente em três pontos: (a) no processo de isolamento, as estruturas da superfície são alteradas; isto tem importância quando aquilo que vai ser investigado depende desta estrutura, como é o caso do transporte ou da ação de hormônios que atuam através de receptores; (b) a polaridade funcional das células (por exemplo, o lado sinusoidal e biliar dos hepatócitos) é perdida; a superfície em contato com o meio externo aumenta, mas não a quantidade de receptores ou proteínas de transporte que em geral se redistribuem na superfície da célula, que tende a assumir uma forma esférica; (c) é mais difícil estabelecer estados estacionários (*steady-state*), já que os experimentos são em geral feitos em incubações fechadas, cujas condições se alteram no decorrer do tempo (acúmulo de metabólitos).

A utilização de órgãos inteiros em perfusão elimina várias das desvantagens das células isoladas. Num órgão perfundido as estruturas intercelulares estão conservadas, como também a polaridade e, sobretudo, a eventual heterogeneidade funcional das células. No fígado as células da região periportal são metabolicamente diferentes das células da região perivenosa. As concentrações de substratos, hormônios e drogas podem ser variadas no líquido de perfusão de acordo com as necessidades. Se for feita perfusão no sistema aberto, fica relativamente fácil chegar a um estado estacionário. Extrapolações para as condições *in vivo* são frequentemente possíveis. Uma desvantagem do órgão em perfusão reside na sua complexidade e custo. Experimentos de perfusão são, em geral, mais trabalhosos e mais caros do que experimentos com células isoladas.

Um órgão perfundido continua sendo um sistema *in vitro*, e portanto, quando se trata de fenômenos resultantes da interação

de vários órgãos ou que estão sob controle neural, a extrapolação para a situação *in vivo* exige redobrada cautela. O organismo inteiro é naturalmente o objetivo final de todos os estudos. Sua complexidade, no entanto, é muitas vezes desencorajadora, o que torna os sistemas experimentais, desde a enzima isolada até o órgão inteiro, recursos indispensáveis para a obtenção de uma boa visão daquilo que ocorre no organismo inteiro.

Perfusões de fígado foram realizadas pela primeira vez a partir de 1902 com o objetivo de estudar metabolismo (**Embden e Glässner**, 1902, *apud* Zwiebel, 1990; **Embden** e **Kraus**, 1912). Naquela época eram utilizados preferencialmente fígados de cães e gatos. Somente com a utilização do fígado de ratos, propiciando uma redução de volume e portanto dos custos, é que a aplicação do método ganhou realmente impulso. As primeiras perfusões de fígado de rato foram feitas por **Corey** e **Britton** (1941) e por **Trowell** (1941). Melhoramentos foram introduzidos posteriormente por **Brauer** *et al.* (1951) e **Miller** *et al.*, (1951). O meio de perfusão era sangue heparinizado de ratos, o que exigia o sacrifício de um rato como doador do fígado e dezenas de outros para fornecer o meio de perfusão. Uma vantagem decisiva foi o meio semi-sintético de perfusão, formado por eritrócitos de boi e albumina de soro bovino, além de sais. Esse meio foi descrito pela primeira vez por **Schimassek** (1962). Ele torna a perfusão menos dependente da influência de hormônios e outros fatores sanguíneos e permite uma melhor padronização dos experimentos. A solução de eletrólitos que ganhou a preferência quase universal foi o tampão de **Krebs** e **Henseleit** (1932), cuja concentração de sais corresponde mais ou menos àquela do soro.

A presença de eritrócitos no meio de perfusão — cuja função

é a de transportar o oxigênio necessário à respiração celular — acabou revelando-se prejudicial para a interpretação de dados sobre metabolismo, pois aquelas células também tem atividade metabólica. Por isso, houve tentativas de reduzir a concentração dos eritrócitos ou de utilizar eritrócitos envelhecidos, cujo metabolismo já é lento, mas que ainda tem hemoglobina com boa capacidade de ligar oxigênio (**Hems** *et al.*, 1966). Um outro problema a ser resolvido era a deterioração progressiva do meio de perfusão com o tempo, já que universalmente se adotava um sistema recirculante de perfusão. Era muito difícil obter condições exatamente definidas. Para eliminar este problema, **Exton** e **Park** (1967) introduziram o sistema não recirculante de perfusão, o qual é muito vantajoso, pois permite definir com exatidão as condições oferecidas ao órgão. O sistema não-recirculante, porém, só podia ser utilizado em experimentos de curta duração, pois sem recirculação, a quantidade de eritrócitos e albumina necessária é muito grande.

A perfusão não-recirculante dependia pois de um método que permitisse a utilização de um meio totalmente sintético. **Scholz** e **Bücher** (1965) já haviam mostrado em 1965 que era possível manter as funções hepáticas com um sistema livre de hemoglobina. O meio de perfusão deve ser saturado com uma atmosfera de 95% de oxigênio e o fluxo através do órgão deve ser elevado para valores em torno de 4 ml · min^{-1} · g^{-1} (*in vivo*, cerca de 1 ml · min^{-1} · g^{-1}). Pré-condição técnica para esse método eram oxigenadores eficientes, como os oxigenadores de membrana por exemplo (**Scholz** *et al.*, 1973), que propiciam quase 100% de saturação do líquido de perfusão. Foi também demonstrado que, mesmo sem albumina no líquido de perfusão, a microcirculação hepática era mantida por

períodos superiores a três horas, suficiente para a maior parte dos experimentos.

Nos anos de 1972 a 1973 o grupo em torno de Bücher e Scholz descreveu então um sistema no qual o fígado de rato podia ser perfundido com meio livre de hemoglobina, no modo não-recirculante, sem prejuízos para a sua atividade metabólica (**Bücher** *et al.*, 1972; **Scholz** *et al.*, 1973). Comparado com experimentos *in vivo* ou com experimentos de perfusão com sangue esse modelo é certamente menos fisiológico, mas, (a) a integridade morfológica do órgão é mantida, (b) as condições experimentais podem ser definidas com bastante precisão, (c) e graças à grande velocidade do fluxo, os metabólitos que se formam e que podem deixar a célula são rapidamente lavados, não havendo pois o acúmulo de metabólitos que poderiam tornar menos definidas as condições experimentais. O método tem hoje utilização universal. Na Universidade de Maringá, a metodologia foi introduzida no período entre 1983 e 1984 (**Kelmer-Bracht** *et al.*, 1984). Outros detalhes do método serão descritos em *Materiais e Métodos*.

No fígado em perfusão podem ser medidas várias vias metabólicas, como por exemplo, a neoglicogênese, a glicólise, a glicogenólise, o consumo de oxigênio, a cetogênese, a captação de ácidos graxos, a frutólise, o metabolismo do glicerol, a biotransformação de drogas e assim por diante (**Kelmer-Bracht** *et al.*, 1984). Neste trabalho serão mostrados vários experimentos em que essas vias foram avaliadas. Pode-se também medir transporte através da membrana plasmática e espaços, aparentes ou reais, de distribuição, embora isso exija uma técnica muito especial, a ser discutida no próximo ítem.

1.5. O estudo de fenômenos de transporte no fígado perfundido

Conforme mencionado acima, o espaço de distribuição do ácido niflúmico e a permeabilidade da membrana celular das células hepáticas a esse composto parecem ser questões que merecem uma abordagem experimental. No fígado perfundido esses aspectos podem ser estudados através de uma técnica que se convencionou chamar de **técnica da diluição de indicadores múltiplos** (*multiple-indicator dilution technique*; **Meier** e **Zierler**, 1954). Basicamente, a técnica consiste na injeção única (*impulse input*) ou na infusão contínua (*step input*), no sangue ou perfusado arterial, de várias substâncias. Em geral, pelo menos uma referência e a substância em estudo, frequentemente marcadas com isótopos radioativos, são injetadas ou infundidas simultaneamente. No lado venoso o efluente é fracionado em microfrações e as curvas são analisadas. A forma das curvas reflete os eventos a que as substâncias estiveram submetidas. Para obter dados quantitativos, não se pode prescindir de modelos matemáticos que descrevam as curvas. Um dos modelos mais utilizados até o presente é o de Goresky (**Goresky**, 1963; **Goresky** *et al.*, 1970; **Goresky** *et al.*, 1973). Embora proposto originalmente para o fígado de cão **in vivo** (**Goresky**, 1963), este modelo também tem sido usado com sucesso no fígado de rato em perfusão isolada (**Bracht** *et al.*, 1980), permitindo a investigação do transporte de lactato (**Schwab** *et al.*, 1979), íons inorgânicos (**Bracht** *et al.*, 1981), glicose (**Ishii** *et al.*, 1987) e ácidos graxos (**Bracht** *et al.*, 1990; **Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992). O modelo de Goresky (1963) consiste, na verdade, numa superposição

de dois modelos: (1) o primeiro modelo descreve os eventos ao longo de um único sinusóide com suas células adjacentes; e, (2) depois, insere-se a equação resultante num segundo modelo que soma todos os sinusóides do órgão. Isto é necessário, pois os sinusóides do fígado tem tempos de trânsito diferentes. O modelo de Goresky pode, portanto, ser considerado como um **modelo espaço-distribuído com tempos de trânsito variáveis** (**Goresky** *et al.*, 1970).

1.6. Objetivos do trabalho

O objetivo geral deste trabalho, conforme já explicado no início desta *Introdução*, é o de estudar algumas das relações do ácido niflúmico com o tecido hepático. Para atingir este objetivo geral, os seguintes aspectos particulares serão investigados:

1. **Ligação do ácido niflúmico à albumina.** Estudar a ligação do ácido niflúmico à albumina é um pré-requisito para a correta interpretação dos resultados obtidos nos demais experimentos. O estudo da ligação terá que ser eminentemente quantitativo, isto é, será necessário determinar parâmetros de ligação (constante de dissociação), que permitam calcular a concentração de ácido niflúmico livre e ligado para qualquer combinação de concentrações de ácido niflúmico e da albumina.

2. **Efeitos metabólicos da droga.** Vários parâmetros metabólicos poderão ser investigados, particularmente aqueles vinculados de alguma forma com o metabolismo energético, já que este parece ser particularmente afetado pelo ácido niflúmico. O

modelo experimental deverá ser o fígado perfundido, onde as concentrações da droga, da albumina e dos substratos poderão ser variadas de acordo com as necessidades de cada protocolo experimental. Os seguintes parâmetros deverão ser medidos: glicólise, glicogenólise, neoglicogênese a partir de vários substratos (piruvato, frutose, glicerol), frutólise, metabolismo do glicerol, consumo de oxigênio e outros parâmetros relacionados. Deverão ser analisadas possíveis correlações entre o efeito e as concentrações livre e total do ácido niflúmico.

3. **Transporte e espaço de distribuição do ácido niflúmico.** O transporte e, sobretudo, o espaço de distribuição são questões ainda em aberto não só para os ácidos fenâmicos e derivados, como também para os anti-inflamatórios não esteróides em geral. No caso do presente trabalho isto será feito para o ácido niflúmico através do método da diluição de indicadores múltiplos. Antes de tudo será necessário encontrar um método prático de extração da droga não metabolizada. As medidas simultâneas de transporte e metabolização deverão permitir comparações entre a velocidade de transporte e metabolização. Além disso, o estudo do transporte permitirá calcular o perfil de concentração da droga ao longo dos sinusóides.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A albumina de soro bovino, essencialmente livre de ácidos graxos, o ácido niflúmico e todas as enzimas e coenzimas utilizadas nas dosagens enzimáticas foram adquiridos da Sigma Chemical Company. A [^{3}H]água foi adquirida da New England Nuclear (NET-001C, 25 mCi/g). A [^{131}I]albumina foi adquirida da Comissão Nacional de Energia Nuclear. Substratos, sais do líquido de perfusão, solventes e outros reagentes foram adquiridos da Merck, J. T. Baker, Carlo Erba e Reagen. Os tubos de diálise foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

2.2. Animais

Ratos machos albinos Wistar (250 g) foram utilizados nos experimentos. Os animais foram alimentados com ração balanceada *Purina* e recebiam água *ad libitum*. Em muitos experimentos os ratos foram submetidos a jejum prévio de 24 horas. Para remoção cirúrgica do fígado, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Thionembutal (50 mg/kg de peso corporal).

2.3. O líquido de perfusão

O líquido de perfusão foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (**Krebs** e **Henseleit**, 1932) com pH 7,4 quando saturado com mistura de oxigênio:dióxido de carbono (95:5%). O líquido

continha também albumina bovina em concentrações até 300 µM. A composição salina do tampão é a seguinte: NaCl, 115 mM; $NaHCO_3$, 25 mM; KCl, 5,8 mM; $NaSO_4$, 1,2 mM; $MgCl_2$, 1,18 mM; NaH_2PO_4, 1,2 mM; e $CaCl_2$, 2,5 mM. Substratos (piruvato, frutose, glicerol) e ácido niflúmico eram também dissolvidos no líquido de perfusão, nas concentrações desejadas.

2.4. A perfusão do fígado

A técnica de perfusão descrita por **Scholz** *et al.* (1973) foi utilizada. O desenho da Figura 3 ilustra as principais partes do sistema de perfusão. Ele é formado por duas bombas peristálticas (7 e 3 na Figura 3), um oxigenador de membrana (2) e pela câmara do fígado (1). A este sistema estão ainda acoplados um microeletrodo de platina (13) com polarógrafo (6) um registrador potenciométrico (4), um banho-maria com bomba de circulação externa do líquido (10), um cilindro contendo a mistura carbogênica (O_2: CO_2/95:5) (8) e uma bomba de infusão (5). As partes essenciais desse sistema foram construídas nas oficinas da Universidade Estadual de Maringá (**Kelmer-Bracht** *et al.*, 1984).

O oxigenador de membrana é formado por um cilindro de alumínio ao redor do qual estão enrolados tubos de borracha silicone de parede fina (0,25 mm) e com comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostatizada pelo banho-maria com bomba de circulação externa. O cilindro de alumínio está separado do meio ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de O_2 e CO_2, nas proporções de 95:5.

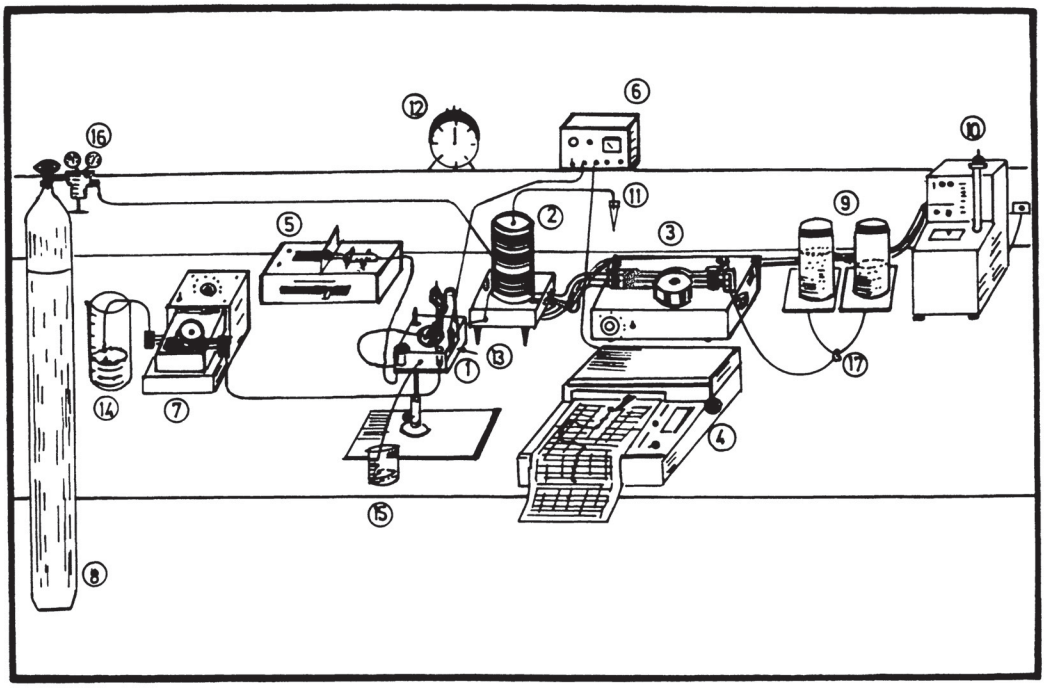

Figura 3. ***Representação semi-esquemática do sistema de perfusão do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade de Maringá.*** Os componentes estão numerados: (1) câmara do fígado mostrando a posição do fígado isolado e em perfusão; (2) oxigenador de membrana com aquecimento simultâneo; (3) bomba peristáltica para o líquido arterial; (4) registrador potenciométrico; (5) bomba de infusão conectada à câmara do fígado; (6) polarógrafo conectado ao registrador; (7) bomba peristáltica para o perfusado venoso; (8) cilindro contendo a mistura carbogênica; (9) reservatórios do líquido de perfusão; (10) banho termostatizado com bomba de circulação externa, conectado ao oxigenador; (11) testemunho do fluxo de gás pelo oxigenador; (12) cronômetro; (13) eletrodo de platina e prata (eletrodo de oxigênio), conectado ao polarógrafo; (14) reservatório para o perfusado venoso; (15) coleta do para-fluxo (vazamento) e fluxo biliar; (16) válvula para regular o fluxo de gás; (17) torneira para troca de líquido de perfusão.

A câmara do fígado, de acrílico transparente, contém um capta-bolhas — dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado —, uma câmara para coleta de amostras e um dispositivo de inserção e fixação do eletrodo de platina.

O líquido de perfusão é impulsionado pela primeira bomba peristáltica em direção ao oxigenador. Neste local ocorre simultaneamente a oxigenação e o aquecimento para 37°C. A dissolução do CO_2 também diminui o pH de 7,6 para 7,4. O líquido segue para a câmara do fígado, entra no órgão pela veia porta e deixa-o pela veia hepática, sendo coletado pela cânula inserida na veia cava. Após passagem pelo microeletrodo de platina e após a coleta de amostras o líquido remanescente é sugado pela segunda bomba peristáltica para ser descartado. Substratos e drogas podem ser infundidos no líquido entrante através da bomba peristáltica ou diretamente dissolvidos no líquido de perfusão, sendo que a troca dos reservatórios pode ser feita através de uma torneira.

Para remoção cirúrgica do fígado, o rato foi previamente anestesiado com **Thionembutal**^{R} (50 mg/kg). O abdômen foi aberto, o tecido conjuntivo que cerca o fígado foi seccionado. O estômago foi separado do esôfago, a veia esplênica foi fechada e a veia porta canulada sob fluxo baixo (entre 5 e 10 ml por minuto). Isto leva ao completo dessangramento do fígado. Após fechamento e seccionamento distal da veia cava inferior, o tórax foi aberto, tendo-se cortado o diafragma e as costelas para exposição completa do coração. O fluxo foi aumentado para 20 ml por minuto e a veia hepática foi canulada através da veia cava superior. A seguir o fígado foi removido cortando-se por baixo do diafragma. Após a remoção o órgão foi colocado na câmara do fígado. O fluxo através do órgão foi ajustado para valores que permitissem oxigenação adequada (entre 4 e 5 ml por minuto por grama de fígado), o que pode ser avaliado a partir da concentração venosa de oxigênio (nunca inferior a 0,15 mM).

Ao final dos experimentos o fígado foi removido do aparelho

e pesado, após eliminação do tecido conjuntivo (peso úmido).

2.5. Experimentos para avaliação dos efeitos metabólicos do ácido niflúmico

Nos experimentos de avaliação dos efeitos metabólicos do ácido niflúmico, a droga foi infundida simultaneamente com substratos (piruvato, frutose, glicerol) ou outras substâncias com efeitos metabólicos (cianeto, por exemplo). Também a concentração de albumina foi variada. Quando se pretendia estudar especificamente o catabolismo do glicogênio a droga foi infundida sem infusão simultânea de substratos. Em relação aos substratos procurou-se atingir condições de estado estacionário (*steady-state*), com base na estabilização do consumo de oxigênio. As concentrações do ácido niflúmico, substratos, albumina ou outras drogas, bem como o tempo de início e término da infusão, sempre estão indicados nos gráficos que mostram os resultados dos experimentos.

2.6. Experimentos de diluição de indicadores múltiplos

Os experimentos de diluição de indicadores múltiplos realizados neste trabalho foram do tipo de infusão contínua (*step input*; **Meier** e **Zierler**, 1954). A mistura infundida continha [^{3}H]água, ácido niflúmico e albumina de soro bovino (livre de ácidos graxos) em concentrações variáveis. Todas essas substâncias foram dissolvidas diretamente no líquido de perfusão. A concentração do ácido niflúmico variou entre 10 e 1000 µM; e a de albumina bovina entre 5 e 150 µM. A velocidade de infusão da

água triciada foi de 1 µCi por minuto. Durante os primeiros 90 segundos após o início da infusão da mistura as amostras eram coletadas num coletor de microfrações especialmente construído. Este coletor de frações permitia coletar amostras entre 0,5 e 2,0 segundos. Após os 90 segundos iniciais a coleta era feita manualmente a intervalos entre 15 e 120 segundos, dependendo das necessidades específicas do experimento.

As frações coletadas eram divididas em três alíquotas. Uma delas era pipetada em frascos de cintilação para determinação da radioatividade. A segunda alíquota era utilizada para determinação da absorbância total a 287 nm, que é o pico de absorção do ácido niflúmico. Da terceira alíquota, finalmente, era feita a extração do ácido niflúmico.

O ácido niflúmico era extraído com igual volume de acetato de etila. Após a adição do acetato de etila à amostra do perfusado a mistura era agitada vigorosamente em agitador mecânico por cerca de 60 segundos. Após descanso de cerca de uma hora, o sobrenadante era cuidadosamente pipetado em cubeta de quartzo para leitura no espectrofotômetro a 287 nm. O mesmo procedimento era adotado com amostras do líquido infundido (amostras do arterial). A concentração venosa era calculada com base na absorbância do arterial, cuja concentração era conhecida. Nas condições da extração com acetato de etila, 85% do ácido niflúmico era extraído.

2.7. **Analítica**

2.7.1. *Dosagens enzimáticas*

Dosagens enzimáticas foram utilizadas para quantificar a

produção de lactato, piruvato e glicose. A lactato desidrogenase foi usada para dosar lactato e piruvato (**Gutmann** e **Wahlefeld**, 1974; **Czok** e **Lamprecht**, 1974). O método utilizado era espectrofotométrico, medindo-se variações na concentração de NADH a 340 nm. A glicose foi dosada com hexoquinase e glicose 6-fosfato desidrogenase (**Bergmeyer** *et al.*, 1974), medindo-se o aparecimento do NADPH a 340 nm.

2.7.2. *Dosagens colorimétricas*

Nos casos em que a concentração era suficientemente elevada, a glicose pôde ser dosada colorimetricamente pela técnica da o-toluidina (**Dubowski**, 1962).

2.7.3. *Determinação do consumo de oxigênio*

A concentração venosa de oxigênio foi medida polarograficamente através de um eletrodo de platina combinado com um eletrodo de prata/cloreto (**Kelmer-Bracht** *et al.*, 1984). As variações na concentração venosa de oxigênio foram registradas e a velocidade de consumo (V_{O2}) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$V_{O2} = \frac{(C_a - C_v) \cdot F}{P} \qquad [1]$$

C_v é a concentração venosa de oxigênio (µmol/ml) e C_a é a concentração arterial. Esta última é constante e igual a 0,86 µmol/ml a 37°C para a concentração salina do tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (**Clark**, 1956). F é o fluxo através do órgão em ml/min e P o peso úmido do fígado em gramas. Calculado desta

forma o consumo de oxigênio fica expresso como μmol · min^{-1} · (grama de peso úmido do fígado)$^{-1}$.

2.7.4. *Medidas de radioatividade*

A radioatividade foi medida por cintilação líquida, utilizando um cintilador de três canais Beckman LS 6800. Para amostras com baixa concentração de proteína o líquido de cintilação era formado por tolueno/etanol (2/1) contendo 5 g/l de PPO (2,5-difeniloxazol) e 0,15 g/l de POPOP [2,2´-*p*-fenileno-bis(5-feniloxazol)]. Correções de eficiência de contagem, quando necessárias, foram feitas utilizando a técnica do padrão interno (**Kobayashi** e **Maudsley**, 1974).

2.7.5. *Dosagem espectrofotométrica do ácido niflúmico*

O ácido niflúmico absorve fortemente no ultra-violeta. A Figura 4 mostra um espectro do composto em acetato de etila. Há um pico em torno de 287 nm e outro, bem menos intenso, em torno de 340 nm. Pode-se utilizar esta absorção na faixa do ultra-violeta para dosagem do composto. Se não houver interferências, não há necessidade de purificação. Em experimentos de diálise (ver ítem 2.8) não há interferências e as medidas podem ser diretas. No perfusado venoso há duas fontes de interferência: a albumina e outras proteínas liberadas pelo fígado (**Zwiebel**, 1990) e os produtos de metabolização. O ácido niflúmico pode ser extraído com acetato de etila. Quando em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato, 85% do ácido niflúmico é extraído. Nos procedimentos de extração, portanto, será sempre necessário fazer a extração

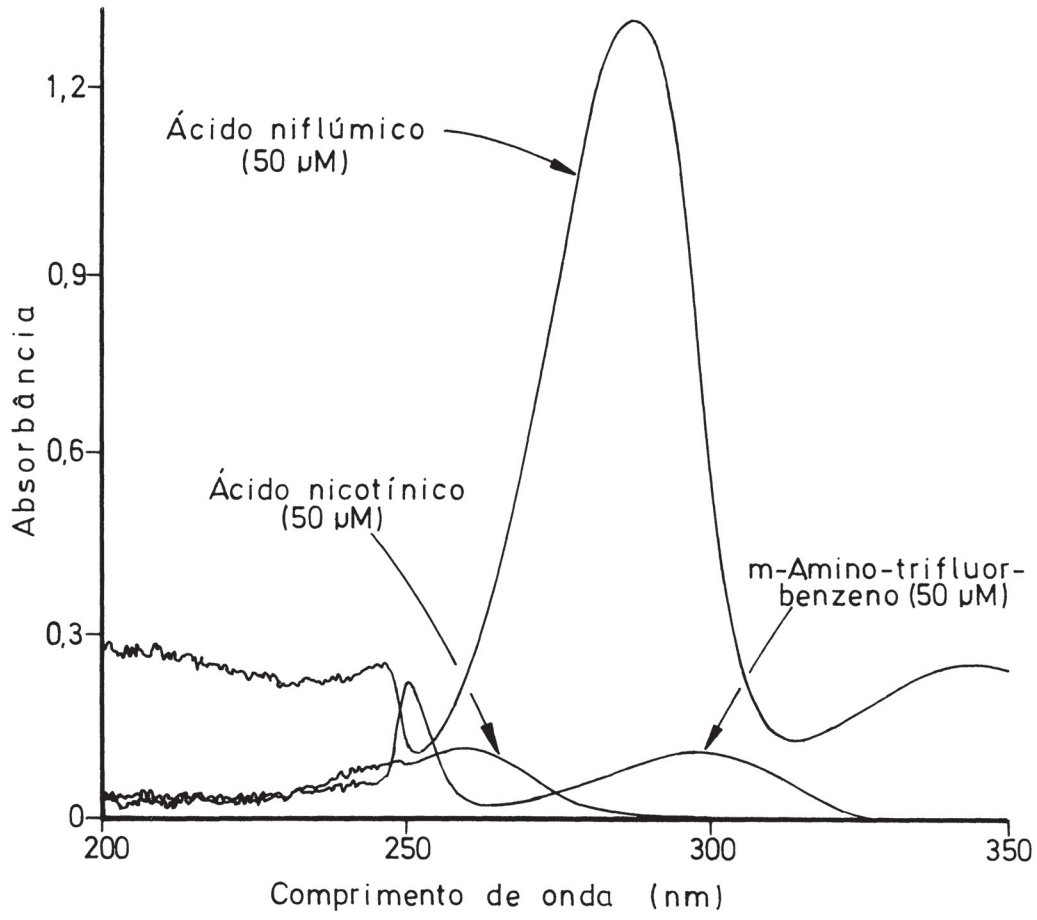

Figura 4. ***Espectros de absorção do ácido niflúmico em acetato de etila e de duas estruturas derivadas.*** Os espectros foram traçados com um espectrofotômetro *Graphicord* (Shimadzu Co., Japão). As concentrações são equimolares. O solvente foi sempre acetato de etila.

de um padrão para calcular um *fator de recuperação*. As proteínas e os metabólitos conjugados com glicuronato e sulfato não são extraídos por acetato de etila (**Titus** *et al.*, 1971). Os conjugados com glicuronato e sulfato são de longe os principais.

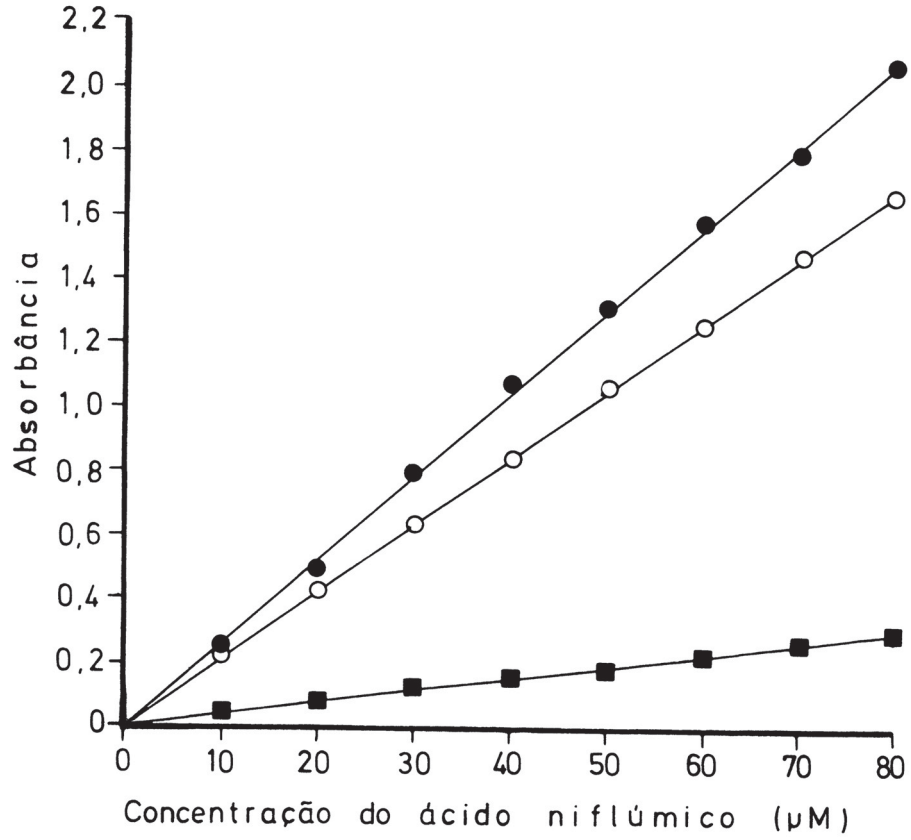

Figura 5. ***Absorbância do ácido niflúmico em diversos comprimentos de onda e sob diversas condições em função da concentração.*** Num espectrofotômetro *Graphicord* (Shimadzu Co., Japão) foram medidas: (a) as absorbâncias a 287 nm com ácido niflúmico em acetato de etila (●——●); (b) as absorbâncias a 280 nm com ácido niflúmico em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) (o——o); e, (c) as absorbâncias a 340 nm com ácido niflúmico em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) (■——■).

Poderão ser eventualmente extraídos os produtos das reações 4 e 4´ da Figura 2. No entanto, estas substâncias perfazem uma percentagem muito pequena dos produtos e além disto, a união dos anéis parece ser essencial para a forte absorbância em torno de

287 nm. O ácido nicotínico, por exemplo, praticamente não absorve a 287 nm. O *m*-amino-trifluorbenzeno absorve mais, porém, a concentração de estruturas semelhantes nos extratos nunca será equimolar com a de ácido niflúmico, mas pelo menos 10 vezes menor. Assim sendo, não se pode esperar uma interferência significativa. A única interferência que resta seriam os produtos hidroxilados sem conjugação, os quais, no entanto, também perfazem uma parcela muito pequena. Dificilmente o erro de dosagem a 287 nm no extrato de acetato de etila superará a margem de 2,5%. A extração com acetato de etila é prática, pois nos estudos de diluição com indicadores múltiplos será necessário processar um grande número de amostras repetidas vezes, o que inviabiliza a utilização de processos de purificação muito trabalhosos.

A linearidade entre absorbância e concentração está demonstrada na Figura 5 para as condições e comprimentos de onda utilizados neste trabalho. Em acetato de etila, a 287 nm e num espectrofotômetro *Graphicord* (Shimadzu Co., Japão) a linearidade se mantém pelo menos até uma absorbância igual a 2,1. O coeficiente de extinção molar a 287 nm em acetato de etila (ϵ_{287}), avaliado pela inclinação da reta da Figura 5, é igual a $2{,}61 \cdot 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$. Em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) o coeficiente de extinção molar a 280 nm (ϵ_{280}) é igual a $2{,}15 \cdot 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$. As dosagens enzimáticas de metabólitos realizadas neste trabalho requerem em geral medidas a 340 nm. Por isto, rotineiramente, foi necessário subtrair a absorbância do ácido niflúmico a 340 nm. Neste comprimento de onda o coeficiente de extinção molar do ácido niflúmico em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato é igual a $3{,}67 \cdot 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (ϵ_{340}).

2.8. Ligação do ácido niflúmico à albumina bovina

A técnica utilizada foi a da diálise de equilíbrio, medindo-se a concentração do ácido niflúmico livre espectrofotometricamente a 280 nm. Tubos de diálise de celulose, com diâmetro de 2,1 cm e comprimento de 10 cm, foram preenchidos com 10 ml de tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), contendo ácido niflúmico na concentração desejada (entre 0,01 a 5,0 mM). Os tubos foram incubados a 37°C em 15 ml de tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo albumina de soro bovino, livre de ácidos graxos, na concentração de 0,15 mM e ácido niflúmico em concentração idêntica à do tubo de diálise. O equilíbrio é atingido em menos de 10 horas. A concentração de ácido niflúmico nos tubos de diálise, *i.e.*, no compartimento que não continha albumina, foi medida após 15 horas de incubação. A quantidade de ácido niflúmico ligada à albumina de soro bovino foi calculada pela seguinte relação:

$$\alpha = \frac{Q_t}{Alb} - \frac{Q_l}{Alb} = \frac{Q_t}{Alb} - \frac{A_{280} \cdot V_t}{\epsilon_{280} \cdot f \cdot Alb} \qquad [2]$$

Na equação [2], α representa mol de ácido niflúmico ligado por mol de albumina; Q_t é a quantidade total de ácido niflúmico presente no sistema de incubação (mol); Q_l é a quantidade livre presente no equilíbrio (mol); Alb representa a quantidade de albumina presente no sistema de incubação (mol); V_t é o volume total da incubação (tubo de diálise mais líquido externo, litros); A_{280} é a absorbância medida a 280 nm; f representa o caminho ótico (cm); e, ϵ_{280} é o coeficiente de extinção molar do ácido niflúmico a 280 nm em tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato ($2,15 \cdot 10^4$ M^{-1}

cm^{-1}). Ligação inespecífica às paredes dos tubos de diálise foi desprezível, conforme revelado por experimentos controle nos quais a albumina foi omitida do meio de incubação. Também não há necessidade de correções devido à presença de duas formas, aniônica e não aniônica, do ácido niflúmico, pois o pK_a (4,0) é baixo comparado com o pH do meio de incubação (**Scherrer**, 1985).

2.9. Métodos numéricos e estatísticos

2.9.1. *Apresentação dos dados*

Naqueles casos em que os experimentos de perfusão foram repetidos ao menos três vezes com exatamente o mesmo protocolo (programação das infusões), incluindo o esquema de pipetagem, os gráficos mostram os valores médios obtidos. Quando o protocolo não foi exatamente o mesmo, ou ainda, quando o esquema de pipetagem não foi idêntico, os gráficos mostram resultados representativos de em geral três experimentos, excepcionalmente de apenas dois experimentos. As velocidades de produção ou consumo de metabólitos pelo fígado foram expressas como $\mu mol \cdot minuto^{-1} \cdot (grama\ de\ peso\ úmido\ do\ fígado)^{-1}$. Os dados dos experimentos de diluição de indicadores múltiplos foram normalizados como fração do arterial. Desta forma o valor limite para uma substância não transformada pelo fígado é a unidade (**Meier** e **Zierler**, 1954). Se for transformada, o valor limite é inferior à unidade.

2.9.2. *A concentração livre de ácido niflúmico*

A concentração da forma livre do ácido niflúmico no perfu-

sado (fração não ligada à albumina) foi calculada usando um algoritmo proposto por **Abumrad** *et al.* (1981). As constantes de dissociação determinadas no presente trabalho foram utilizadas (**Kelmer-Bracht** *et al.*, 1990). O algoritmo pode ser expresso como:

$$C_o = C_f + P_o \frac{\sum_{i=1}^{n} i\Gamma_i C_f^i}{1 + \sum_{i=1}^{n} \Gamma_i C_f^i} \qquad [3]$$

Na equação [3], C_o é a concentração total de ácido niflúmico (livre mais ligado), P_o é a concentração total de albumina (livre mais complexada), C_f a concentração livre de ácido niflúmico e n é o número de sítios de ligação. Γ_i é igual a $\prod_{j=1}^{i} 1/K_j$, sendo K_j as constantes de dissociação K_1, K_2, ... etc. dos complexos albumina-ácido niflúmico. A determinação de C_f foi feita através de um programa escrito em **Turbo-Basic** no *Laboratório de Metabolismo Hepático* da Universidade de Maringá. O programa permite a introdução de valores progressivamente mais aprimorados de C_f até que a diferença entre os valores calculado e experimental de C_o seja mínima.

2.9.3. *Ajuste de curvas e outros procedimentos numéricos e estatísticos*

O ajuste da equação [6] — constantes de dissociação do complexo albumina-ácido niflúmico do modelo de Scatchard (K1, K2, etc.; página 53) — e da equação [11] (página 105) aos respectivos dados experimentais foi feito através do método dos mínimos quadrados (**Björck** e **Dahlquist**, 1972). Nos dois casos

foram utilizados programas em linguagem **Turbo-Basic**, escritos pelo Dr. Adelar Bracht da Universidade de Maringá. Os dois programas são executáveis em qualquer computador da linha PC, de preferência equipado com co-processador aritmético. Os dois ajustes são do tipo não-linear iterativo. Estimativas preliminares dos parâmetros devem ser introduzidas inicialmente. A cada iteração estas estimativas preliminares são aprimoradas, até que a soma dos quadrados das diferenças entre os dados experimentais e os calculados se torne mínima (**Björck** e **Dahlquist**, 1972). Principalmente no caso da equação [11], não há convergência se as estimativas preliminares não forem bastante próximas das ótimas. Por isto, os dois programas permitem fazer simulações, com análise gráfica, para verificar se as estimativas introduzidas estão próximas das ótimas em cada caso.

No caso da equação [11], há necessidade de interpolar entre os pontos da curva da água triciada. Estas interpolações foram feitas utilizando uma função *spline* modificada (**Björck** e **Dahlquist**, 1972). No caso ainda da equação [11], a derivada primeira da curva da água [$Q'_{água}(t')$] foi calculada pelo método das diferenças finitas, obtendo-se os pontos intermediários aos experimentais por interpolação. As integrais foram calculadas pela regra do trapézio (**Björck** e **Dahlquist**, 1972).

As constantes de dissociação dos complexos albumina-ácido niflúmico do modelo sequencial de **Fletcher** *et al.* (1970) foram também calculadas através de um programa escrito em **Turbo-Basic** pelo Dr. Adelar Bracht . Para este cálculo foram utilizadas as fórmulas desenvolvidas por **Fletcher** *et al.* (1970), as quais permitem calcular as constantes de equilíbrio individuais a partir das constantes de dissociação obtidas de acordo com o

modelo de Scatchard:

$$C_1 = \sum_{i1=1}^{n} \phi_{i1}$$

$$C_2 = \sum_{i1=1}^{n-1} \sum_{i2=i1+1}^{n} \phi_{i1}\phi_{i2} \qquad [4]$$

$$C_2 = \sum_{i1=1}^{n-2} \sum_{i2=i1+1}^{n-1} \sum_{i3=i2+1}^{n} \phi_{i1}\phi_{i2}\phi_{i3}$$

$$\vdots \qquad\qquad \vdots$$

$$C_p = \sum_{i1=1}^{n-p+1} \cdots \sum_{ip=ip-1+1}^{n} \phi_{i1}\phi_{i2} \cdots \phi_{ip}, \qquad 1 \leq p \leq n$$

O símbolo n é o número de sítios de ligação enquanto que ϕ_{ip} é o inverso das constantes de dissociação do modelo de Scatchard. A constante de dissociação K_{a1} do modelo sequencial é igual a $1/C_1$. As demais constantes, em termos gerais, são dadas por:

$$K_{p+1} = \frac{C_p}{C_{p+1}}, \quad p = 1,2, \ldots, n - 1 \qquad [5]$$

Testes de significância estatística foram feitos utilizando o programa **Primer Versão 1.0.** (*McGraw-Hill, 1988*). Foram aplicados o teste **t** de Student e o teste **t** pareado (**Brandt**, 1975). Sempre que o teste foi aplicado o valor de ***p***, probabilidade de que uma diferença seja devida ao acaso, é dado no texto. Análises de correlação foram feitas utilizando o método usual de mínimos quadrados (**Brandt**, 1975).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. A ligação do ácido niflúmico à albumina

O estudo da ligação do ácido niflúmico à albumina do soro deve preceder os outros experimentos. Se for possível determinar neste estudo os parâmetros de ligação, deverá ser também possível calcular as concentrações livre e ligada de ácido niflúmico para qualquer combinação de concentrações da proteína e da droga. O ideal seria poder utilizar albumina de soro de rato, já que os estudos metabólicos e de transporte serão feitos com esta espécie. Em termos práticos, e principalmente por motivos financeiros, porém, a utilização de albumina de soro de rato em estudos de perfusão é proibitiva. Tem-se utilizado, tradicionalmente, albumina de soro bovino (**Scholz** e **Bücher**, 1965). Isto é válido, desde que a função da proteína seja apenas a de ligar extracelularmente um determinado composto. Neste trabalho, a ligação do ácido niflúmico à albumina de soro bovino foi realizada com o auxílio da técnica de diálise de equilíbrio, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. A albumina bovina utilizada era livre de ácidos graxos.

As Figuras 6 e 7 mostram os resultados obtidos em 78 experimentos de diálise, nos quais a concentração da albumina era de 150 μM e a concentração do ácido niflúmico foi variada entre 10 μM e 5 mM. Nas duas Figuras a quantidade de ácido niflúmico ligada (em mol) por mol de albumina (α) está representada contra a concentração livre de ácido niflúmico após o equilíbrio. Na Figura 6, a concentração está em escala linear e na Figura 7 em

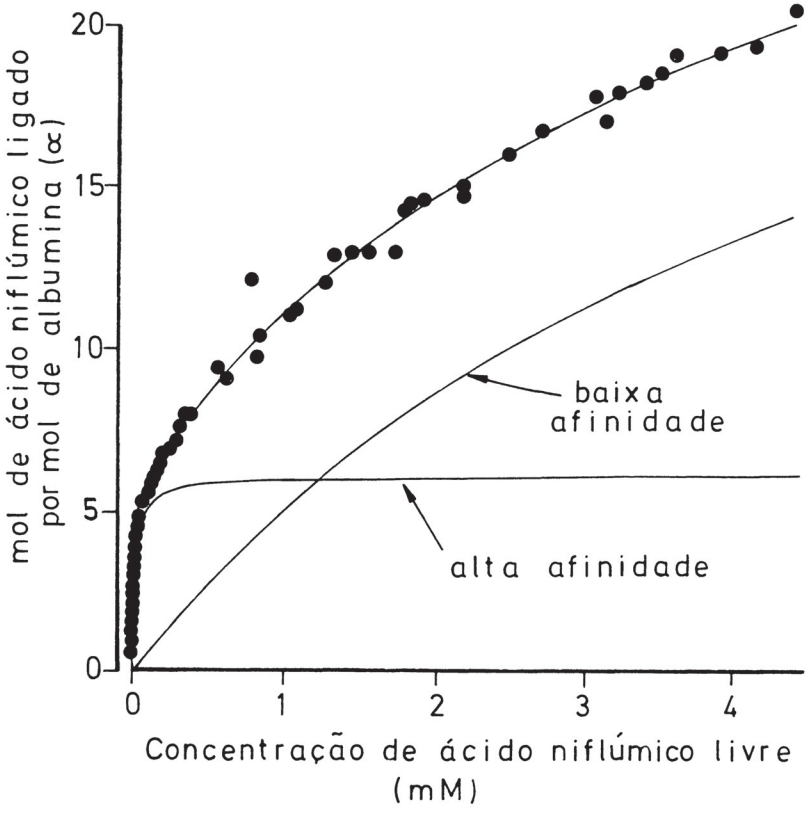

Figura 6. ***Ligação do ácido niflúmico à albumina de soro bovino.*** A quantidade de ácido niflúmico ligado por mol de albumina está representada contra a concentração (mM) de ácido niflúmico livre (não ligado) no equilíbrio. Os 78 pontos experimentais foram obtidos por diálise de equilíbrio e determinação espectrofotométrica a 280 nm das concentrações livres de ácido niflúmico (ϵ_{280} = 2,15 · 10^4 M^{-1} cm^{-1} em solução aquosa a pH 7,4), conforme descrito em *Materiais e Métodos*. A linha contínua através dos pontos experimentais foi calculada de acordo com o modelo de Scatchard número 5 da Tabela 3. A resolução da curva teórica nos sítios de alta e baixa afinidade também está representada.

escala logarítmica. O valor máximo de α foi 20,5 mol de ácido niflúmico por mol de albumina, medido com uma concentração livre de ácido niflúmico de 4,4 mM. Pela forma da curva na Figura 6 pode-se deduzir que valores ainda maiores de α poderiam ser medidos em concentrações maiores da droga, isto é, a inclinação da curva ainda está longe de zero. Porém, a precisão das medidas torna-se cada vez menor à medida que se aumenta a concentração

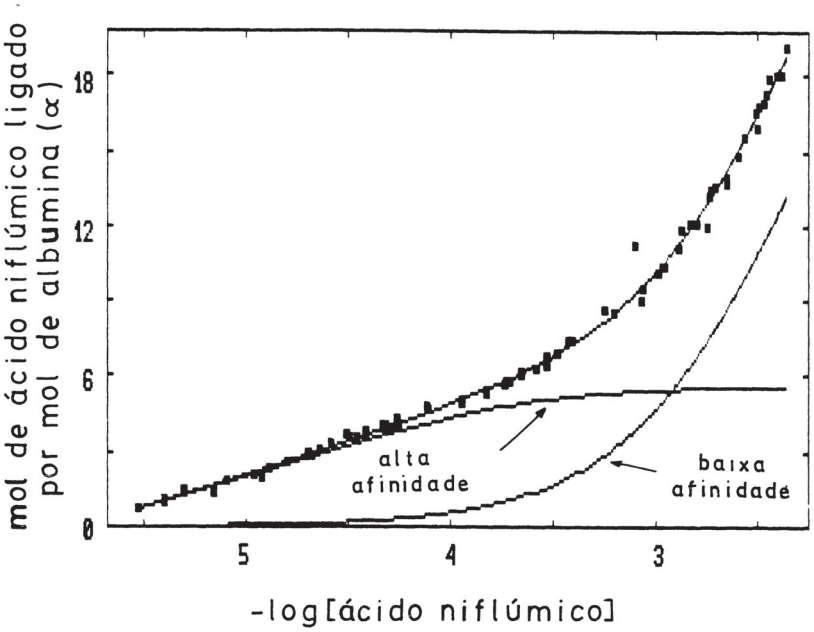

Figura 7. ***Ácido niflúmico ligado por mol de albumina contra o logaritmo da concentração de ácido niflúmico livre.*** Os mesmos dados da Figura 6 estão agora representados em função do logaritmo negativo da concentração molar de ácido niflúmico livre. A linha continua ligando os pontos foi calculada de acordo com o modelo de Scatchard número 5 da Tabela 3. A resolução da curva teórica nos sítios de alta e de baixa afinidade também está representada.

do ácido niflúmico, já que a quantidade ligada é tirada da diferença entre a quantidade total e a quantidade livre (ver *Materiais e Métodos*). Por isto, não é aconselhável aumentar ainda mais a concentração, principalmente porque a faixa de maior interesse é a de baixa concentração. A ligação de mais de 20 mol de ácido niflúmico por mol de albumina já permite dizer que essa proteína deve ter um grande número de sítios de ligação para o ácido niflúmico.

A curva da Figura 7 é semelhante àquelas obtidas com ácidos graxos (**Fletcher** *et al.*, 1970; **Spector** *et al.*, 1971), e por isto, deve ser possível analisá-la através do modelo de Scatchard. Este modelo agrupa os sítios de ligação em classes com constantes de dissociação médias (**Fletcher** *et al.*, 1970). Isto pode ser descrito pela seguinte equação:

$$\alpha = \sum_{i=1}^{m} N_i \frac{C_f}{K_i + C_f} \qquad [6]$$

Na equação [6], m é o número de classes de sítios de ligação, N_i é o número de sítios da classe i, K_i é a constante de dissociação para aquela classe e C_f é a concentração de ligante livre, no presente caso o ácido niflúmico. A equação [6] foi ajustada aos dados experimentais empregando o método dos mínimos-quadrados, utilizando um programa escrito em **Turbo-Basic**.

O melhor modelo com duas classes de sítios de ligação que descreve os dados experimentais é um modelo com seis sítios de alta afinidade e 30 sítios de baixa afinidade. Este é o modelo 1 da Tabela 3. Esta Tabela mostra valores das constantes de dissociação, o respectivo erro padrão e a variância do ajuste entre teoria e experimento, *i. e.*, a somatória do quadrado dos desvios

TABELA 3

Modelos de Scatchard para a análise da ligação do ácido niflúmico à albumina bovina. As constantes de dissociação (K_1, K_2, K_3 e K_4) foram obtidas ajustando os modelos de Scatchard (Equação [6]) a 78 pontos experimentais, utilizando o método dos mínimos quadrados, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. A variância é o quadrado médio da diferença entre os valores experimentais e estimados. Os números entre parênteses são os erros padrões dos parâmetros.

Modelo	Classes de sítios	N_1	K_1 (μM) (erro padrão)	N_2	K_2 (μM) (erro padrão)	N_3	K_3 (mM) (erro padrão)	N_4	K_4 (mM) (erro padrão)	Variância
1	2	8	22,50±0,4	30	5040±480					0,134
2	3	1	2,53±0,29	5	31.4±2,5	30	5.01±0,62			0,123
3	3	5	15,10±0,1	1	186±76	30	4,97±1,05			0,117
4	3	2	5,68±0,29	4	41±6,8	30	5,00±0,64			0,119
5	3	4	12,30±0,1	2	86,1±21,3	30	4,98±0,93			0,116
6	3	3	8,41±0,27	3	55,8±52,6	30	4,99±0,65			0,117
7	4	2	9,74±0,78	2	10,7±0,9	2	0,0931±0,0174	30	4,98±0,63	0,119

entre os valores experimentais e calculados dividida pelo número de graus de liberdade. O número de graus de liberdade é igual ao número de pontos experimentais (78) menos o número de parâmetros. O erro padrão é uma medida da precisão com que o parâmetro pode ser determinado e a variância é uma medida do desvio médio dos pontos calculados a partir dos dados experimentais (**Wilkinson**, 1961). A variância do modelo 1 na Tabela 3 é igual a 0,134. Nenhum outro modelo de duas classes de sítios de ligação com variância menor foi encontrado. A variância diminuiu, no entanto, quando a classe de sítios de ligação de alta afinidade foi

resolvida em duas ou três classes (modelos 2-7 da Tabela 3). O modelo que melhor descreve os dados deverá ser aquele com a menor variância e com os menores erros padrões para os diversos parâmetros, segundo um critério frequentemente seguido (**Plowman**, 1972). Com base nisto deve-se concluir que o modelo 5 é o que melhor descreve os dados. Ele tem a menor variância, e os erros padrões dos parâmetros estão entre os mais baixos. No modelo 6, por exemplo, K_1 e K_2 apresentam erros padrões grandes quando comparados com os modelos 3 e 5, sendo o erro de K_2 praticamente igual ao próprio valor do parâmetro. Para os modelos 3 e 5, os erros padrões são similares em termos relativos, mas o modelo 5 tem a menor variância. Deve-se notar que uma maior resolução dos sítios de alta afinidade em três ou mais classes não leva a uma diminuição da variância, sugerindo uma crescente incapacidade do procedimento de ajuste em resolver mais classes dos dados disponíveis. Cumpre notar também, que o valor médio da constante de dissociação para os sítios de baixa afinidade foi praticamente o mesmo para cada um dos modelos, não se afastando nunca muito de 5 mM.

As Figuras 6 e 7 oferecem também a possibilidade de comparar teoria e experimento. A linha que une os pontos foi calculada de acordo com o modelo 5. Esta linha calculada corre junto aos pontos experimentais sem desvios sistemáticos nos extremos, mesmo na representação logarítmica da Figura 7, a qual amplia sobremaneira a faixa de baixa concentração. A concordância entre teoria e experimento é, portanto, bastante boa. As Figuras 6 e 7 mostram também a resolução da curva teórica nos seus sítios de alta (N_1 e N_2) e baixa afinidade (N_3). Os sítios de alta afinidade já começam a saturar com concentrações de ácido

niflúmico livre em torno de 0,1 mM. Em concentrações de ácido niflúmico livre abaixo de 0,1 mM, por outro lado, os sítios de baixa afinidade não chegam a dar uma contribuição significativa.

Fletcher *et al.* (1970) analisaram as interações entre macromoléculas e ligantes em termos de um modelo de equilíbrio em etapas que permite a determinação das constantes de equilíbrio individuais ao invés de agrupá-las em classes com constantes de dissociação médias. Este modelo tem sido aplicado ao estudo da ligação de ácidos graxos de cadeia longa à albumina (**Spector** *et al.*, 1971; **Brodersen** *et al.*, 1989). A equação que descreve o modelo é matematicamente equivalente àquela do modelo de Scatchard:

$$\alpha = \sum_{i=1}^{n} \frac{C_f}{K_i + C_f} \qquad [7]$$

Na equação [7] n é o número de sítios de ligação e K_i as constantes de dissociação. A equação [7] é precisamente a forma da equação [6], do modelo de Scatchard, com cada N_i igual a 1,0. As constantes de dissociação do modelo de Fletcher podem ser calculadas, desde que sejam conhecidas as constantes de dissociação do modelo de Scatchard. A Tabela 4 relaciona os valores das nove primeiras constantes de dissociação calculadas a partir do modelo 5 de Scatchard da Tabela 3, utilizando o formulário desenvolvido por **Fletcher** *et al.* (1970; ver *Materiais e Métodos*). Junto com os valores para o ácido niflúmico, estão relacionadas também as constantes de dissociação encontradas na literatura para vários ácidos graxos. Do grande número de dados disponíveis foram selecionados os dados do octanoato (**Ashbrook**, *et al.*, 1972), palmitato e oleato (**Spector** *et al.*, 1971).

As constantes de dissociação para os complexos do ácido niflúmico com a albumina estão na faixa entre 10^{-6} e 10^{-3} M. A partir de K_{a7}, todos os valores são iguais. **Spector** *et al.* (1971) utilizaram os valores calculados através da equação [6] como estimativas preliminares para um ajuste fino dos parâmetros. No caso dos nossos experimentos com o ácido niflúmico isto não se

TABELA 4

Comparação das constantes de equilíbrio para a ligação do ácido niflúmico e vários ácidos graxos de cadeia média e longa à albumina de soro bovino. Os valores para o ácido niflúmico foram calculados a partir do modelo de Scatchard número 5 da Tabela 3 com o auxílio da equação [6]. As constantes foram ordenadas em ordem crescente de afinidade dos sítios de ligação. Todas elas foram medidas a 37°C, em meio salino semelhante ao meio de incubação utilizado nesse trabalho e a pH 7,4.

Constante	Ácido niflúmico	Octanoato[a]	Palmitato[b]	Oleato[b]
	M			
K_{a1}	$2,82 \cdot 10^{-6}$	$2,94 \cdot 10^{-5}$	$3,00 \cdot 10^{-8}$	$6,10 \cdot 10^{-8}$
K_{a2}	$1,69 \cdot 10^{-5}$	$1,03 \cdot 10^{-4}$	$1,33 \cdot 10^{-7}$	$3,38 \cdot 10^{-7}$
K_{a3}	$1,79 \cdot 10^{-5}$	$2,22 \cdot 10^{-4}$	$2,72 \cdot 10^{-7}$	$5,65 \cdot 10^{-7}$
K_{a4}	$2,28 \cdot 10^{-5}$	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$8,15 \cdot 10^{-7}$	$2,89 \cdot 10^{-6}$
K_{a5}	$8,76 \cdot 10^{-5}$	$7,14 \cdot 10^{-4}$	$1,81 \cdot 10^{-6}$	$4,74 \cdot 10^{-6}$
K_{a6}	$9,82 \cdot 10^{-5}$	$8,62 \cdot 10^{-4}$	$1,89 \cdot 10^{-6}$	$2,30 \cdot 10^{-5}$
K_{a7}	$4,98 \cdot 10^{-3}$	$1,36 \cdot 10^{-3}$	$8,64 \cdot 10^{-6}$	$2,34 \cdot 10^{-5}$
K_{a8}	$4,98 \cdot 10^{-3}$	$2,27 \cdot 10^{-3}$	$4,05 \cdot 10^{-5}$	$3,06 \cdot 10^{-5}$
K_{a9}	$4,98 \cdot 10^{-3}$	$6,06 \cdot 10^{-3}$	-	$4,31 \cdot 10^{-5}$

[a]**Ashbrook** *et al.* (1972).
[b]**Spector** *et al.* (1971).

revelou possível, por causa do grande número de sítios de ligação com baixa afinidade, o que impediu convergência nos procedimentos numéricos adotados. Deve-se acrescentar aqui, que os dados de **Spector** *et al.* (1971) com ácidos graxos não atingem valores além de 8 mol de ácido ligado por mol de albumina. Com os ácidos graxos, naturalmente, há o problema da solubilidade, que não permite aumentar muito a concentração dessas substâncias. Porém, como os próprios autores reconhecem, é possível que também para os ácidos graxos haja um número maior de sítios de ligação. É comum chegar-se a altos valores de α em estudos de ligação, o que já ocorreu nos estudos pioneiros de **Klotz** *et al.* (1946), os quais chegaram a medir experimentalmente a ligação de 15 mol de laranja de metila por mol de albumina bovina. Para citar mais um exemplo, **Albengres** *et al.* (1982) ao medirem a ligação do benoxaprofeno (também um anti-inflamatório) à albumina, encontraram duas classes de sítios: $N_1 = 3$ com constante de dissociação igual a $3{,}07 \cdot 10^{-6}$ M e $N_2 = 16$ com constante de dissociação igual a $4{,}76 \cdot 10^{-4}$ M.

Comparação dos parâmetros de ligação do ácido niflúmico com os dos ácidos graxos da Tabela 4 revela que a afinidade da albumina pelo ácido niflúmico é bem menor do que a afinidade pelos ácidos graxos de cadeia longa. Os sítios de maior afinidade pelo palmitato e o oleato tem constantes de dissociação da ordem de 10^{-8} M, enquanto o sítio com maior afinidade pelo ácido niflúmico tem uma constante de dissociação da ordem de 10^{-6} M. Esta diferença ocorre também para os demais sítios de ligação. O quadro muda de figura quando se compara o ácido niflúmico com octanoato, um ácido graxo de cadeia média. Neste caso, claramente, o ácido niflúmico liga mais fortemente.

Saturação total da albumina com ácido niflúmico poderá torná-la significativamente mais pesada. De fato, a albumina tem um peso molecular em torno de $6,6 \cdot 10^4$ Daltons. O peso molecular do ácido niflúmico é igual a 282 Daltons e se a albumina estiver completamente saturada com ligante, o que teoricamente deverá ocorrer com um valor de α igual a 36, o peso molecular do complexo será significativamente maior que o da proteína isolada, isto é, de $7,61 \cdot 10^4$ Daltons.

Segundo dados da literatura, o ácido niflúmico no plasma está em grande parte ligado a proteínas plasmáticas, principalmente albumina (ver Tabela 1, *Introdução*). Com as constantes de dissociação obtidas neste trabalho, pode-se calcular a fração ligada do ácido niflúmico para qualquer combinação de concentrações de albumina e da droga, utilizando para isso o algoritmo de **Abumrad** *et al.* (1981) (ver equação [3]). Para uma concentração de ácido niflúmico igual a 0,3 mM (média das concentrações de pico da Tabela 1) e de albumina igual a 0,45 mM (concentração fisiológica) o grau de ligação calculado é de 98%. Isto está dentro da faixa de valores experimentais obtidos *in vivo*. Deve-se salientar, no entanto, que este valor foi calculado pressupondo a ausência de outras proteínas ligantes, por um lado, e sobretudo também a ausência de competidores do ácido niflúmico pelos seus sítios de ligação nas diversas proteínas. De qualquer forma, a determinação das frações livre e ligada de ácido niflúmico para quaisquer condições de concentração de albumina e da droga foi muito útil no planejamento e na interpretação dos experimentos descritos mais adiante.

3.2. Efeitos do ácido niflúmico sobre o metabolismo hepático

Serão descritos a seguir os experimentos realizados com o intuito de verificar quais são os efeitos do ácido niflúmico sobre algumas vias metabólicas básicas no fígado, especialmente aquelas ligadas mais diretamente ao metabolismo energético.

3.2.1. *Efeitos sobre o catabolismo do glicogênio e sobre o consumo de oxigênio*

Fígados de ratos alimentados possuem altos níveis de glicogênio e quando perfundidos isoladamente passam a fazer glicogenólise e glicólise (**Scholz** e **Bücher**, 1965). Ao perfundir com meio livre de substratos pode-se medir a liberação de glicose mais lactato e piruvato como indicadores da glicogenólise (glicose + ½[lactato + piruvato]) e da glicólise (lactato + piruvato), já que a atividade da piruvato desidrogenase, nas baixas concentrações intracelulares de piruvato observadas nessas condições, é muito baixa (**Kimmig** *et al.*, 1983). O consumo de oxigênio pelo fígado, que nestas condições costuma situar-se entre 2 e 3 $\mu mol \cdot minuto^{-1} \cdot (grama\ de\ peso\ úmido\ do\ fígado)^{-1}$, deriva em grande parte da oxidação de ácidos graxos endógenos e muito pouco da oxidação de piruvato (**Scholz** e **Bücher**, 1965).

A Figura 8 mostra os resultados médios de experimentos nos quais fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato sem adição de albumina. Após um período de pré-perfusão, que perfaz geralmente 20 ou 25 minutos e durante o qual o consumo de oxigênio, glicólise e glicogenólise atingem um estado estacionário, começou a coleta de amostras do

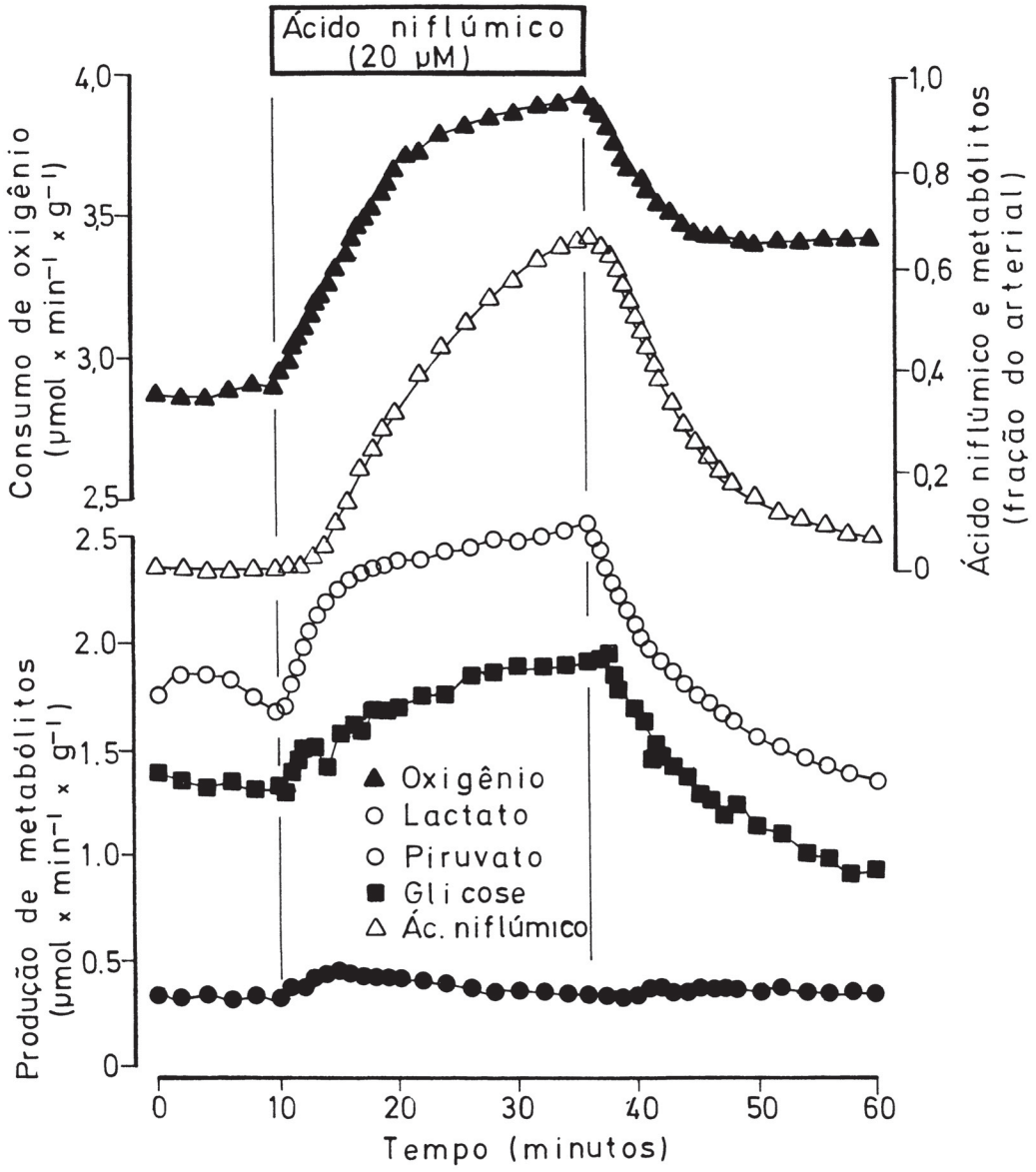

Figura 8. ***Efeito do ácido niflúmico 20 µM sobre fluxos metabólicos no fígado de ratos alimentados.*** Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com Tampão Krebs/Henseleit-Bicarbonato, pH 7,4, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Amostras foram coletadas para a dosagem de glicose, lactato, piruvato e do ácido niflúmico mais metabólitos. O consumo de oxigênio foi seguido polarograficamente. O tempo de infusão de ácido niflúmico (entre 10 e 36 minutos) está indicado pela barra horizontal. Os dados são a média de três experimentos com idêntico esquema de pipetagem.

perfusado para a dosagem de metabólitos. O consumo de oxigênio foi monitorado polarograficamente de modo contínuo. Dez minutos após o início da coleta das amostras começou a infusão de ácido niflúmico 20 μM, sempre na ausência de albumina. A Figura 8 revela que o ácido niflúmico aumenta (1) o consumo de oxigênio, (2) a liberação de glicose e (3) a liberação de lactato. Cada um

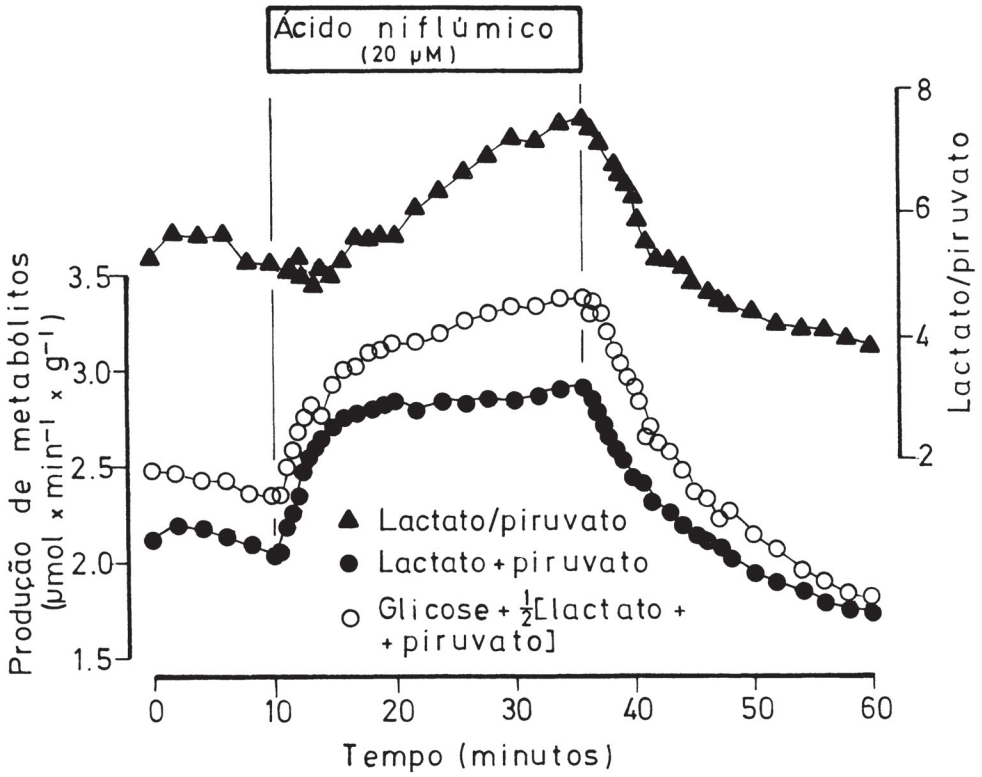

Figura 9. ***Efeito do ácido niflúmico 20 μM sobre parâmetros derivados dos dados experimentais mostrados na Figura 8.*** A razão lactato/piruvato (indicador redox do sistema NAD+-NADH citosólico), a soma lactato + piruvato (indicador da glicólise) e a soma glicose + ½[lactato+piruvato] (indicador da glicogenólise) foram calculadas a partir dos dados experimentais já mostrados na Figura 8.

desses três parâmetros começa a aumentar após a introdução do ácido niflúmico e 26 minutos depois ainda mostra alguma tendência ascendente. A liberação de piruvato, por outro lado, é apenas ligeira e transitoriamente afetada. Quando a infusão de ácido niflúmico é interrompida, aos 36 minutos, o consumo de oxigênio, a liberação de glicose e de lactato diminuem novamente. Os efeitos são em princípio reversíveis, embora não haja um retorno exato às condições originais. De fato, as liberações de glicose e de lactato retornam a níveis inferiores àqueles do início do experimento e o consumo de oxigênio permanece em níveis um pouco superiores. Em relação à glicose e ao lactato esses níveis menores podem refletir uma diminuição já significativa da concentração de glicogênio, já que a glicogenólise esteve bastante ativada durante o período de infusão de ácido niflúmico. A Figura 9, aliás, mostra alguns parâmetros derivados dos dados experimentais da Figura 8, incluindo a glicogenólise, que é dada com grande aproximação pela soma glicose + ½[lactato+piruvato], conforme mostrado por **Kimmig** *et al.* (1983). A Figura 9 mostra também uma ativação da glicólise, principalmente por causa do aumento na produção de lactato e um aumento na razão lactato/piruvato. Esta razão é um indicador para o potencial redox da dupla NAD^+-NADH citosólica (**Sies**, 1982). Pode-se concluir, portanto, que sob a influência do ácido niflúmico o potencial redox dessa dupla se torna mais negativo.

A Figura 8 também mostra a variação da concentração do ácido niflúmico mais os seus produtos de metabolização no perfusado venoso, expressa como fração da concentração arterial. Conforme especificado em *Materiais e Métodos*, o ácido niflúmico e provavelmente os seus produtos de conjugação, podem ser medidos

espectrofotometricamente na faixa do ultravioleta. Os dados na Figura 8 resultam de medidas feitas a 340 nm. Medidas a 280 nm (não mostradas) resultam em curvas praticamente iguais às obtidas a 340 nm. Os dados não são rigorosamente quantitativos, pois os produtos de metabolização podem ter coeficientes de extinção molar diferentes do coeficiente da substância mãe. Porém, nesta fase dos experimentos, o perfil de saída aproximado já é suficiente para lançar algumas indagações acerca das interações do ácido niflúmico com as células hepáticas. O que salta à vista na Figura 8 é o fato de que a concentração venosa do ácido niflúmico mais metabólitos aumenta muito lentamente. Da maneira como o sistema de perfusão está construído, a concentração arterial é estabelecida em menos de 30 segundos após o efetivo início da infusão. Quer dizer, em menos de 30 segundos a concentração arterial de ácido niflúmico já deveria ser 20 μM. Substâncias como, por exemplo a sacarose, glicose e o lactato (**Bracht** *et al.*, 1980; **Ishii** *et al.*, 1987) já atingem um platô no perfusado venoso entre 30 e 60 segundos após o início da infusão. Mesmo substâncias lipofílicas como os ácidos graxos palmitato e octanoato (**Bracht** *et al.*, 1990; **Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992), não levam mais de 2 minutos para atingir o platô. Trata-se de um comportamento pouco comum, possivelmente relacionado com o transporte e a distribuição da droga.

A Figura 8 mostra o efeito de uma única concentração de ácido niflúmico. Já a Figura 10 mostra os resultados médios de 7 experimentos com idênticos esquemas de pipetagem e de infusão, nos quais a concentração de ácido niflúmico foi aumentada em etapas: 10, 20, 50 e 100 μM. Como o perfusado continha albumina 4,5 μM a concentração portal de ácido niflúmico livre é menor que

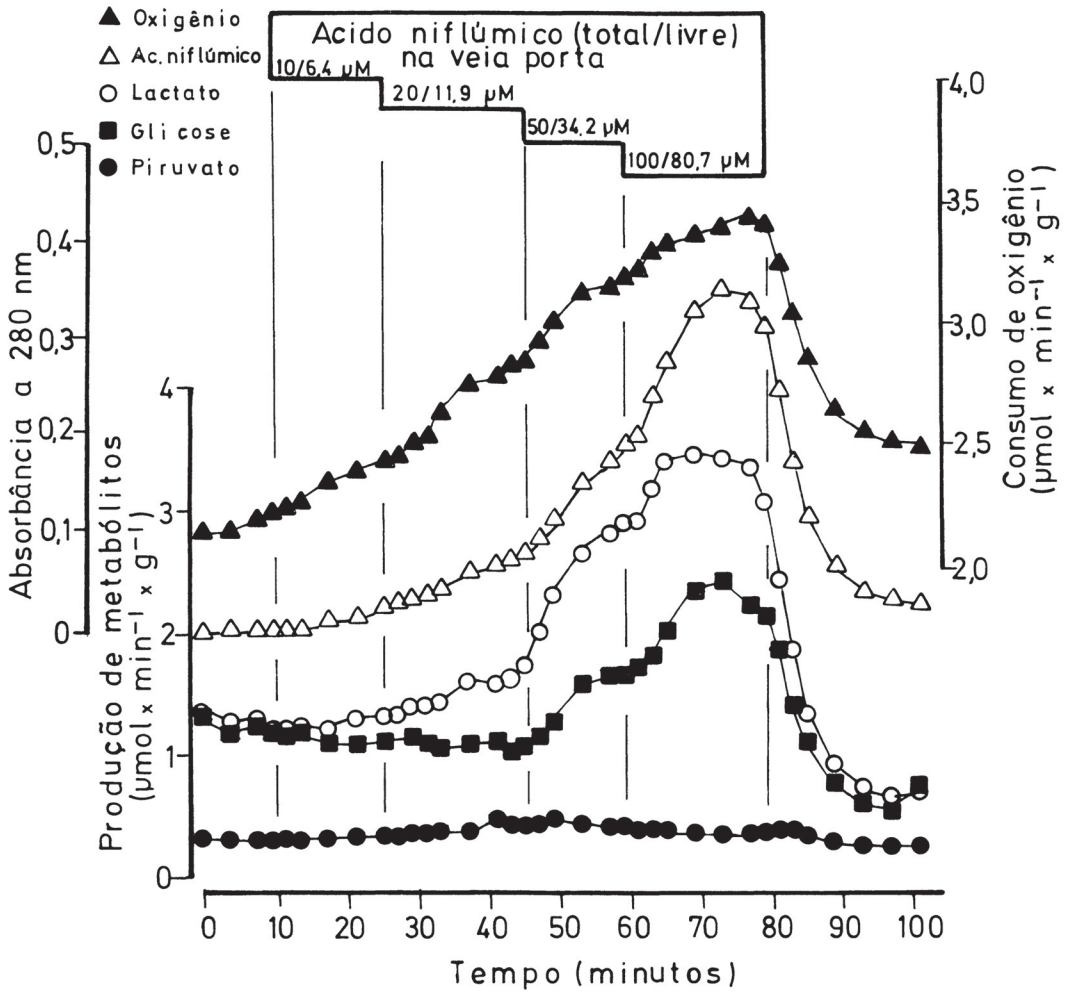

Figura 10. ***Titulação do catabolismo do glicogênio e do consumo de oxigênio pelo ácido niflúmico.*** Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com Tampão Krebs/Henseleit-Bicarbonato, pH 7,4 e contendo albumina 4,5 µM, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Amostras foram coletadas para a dosagem de glicose, lactato, piruvato e do ácido niflúmico mais metabólitos. O consumo de oxigênio foi seguido polarograficamente. A concentração de ácido niflúmico foi aumentada em etapas, conforme indicado pelas barras horizontais. Os pontos experimentais são a média de 7 experimentos com idêntico esquema de pipetagem.

a total. O valor exato da concentração portal livre (não-ligada) está indicado no topo da Figura 10, ao lado da concentração total. Os experimentos foram feitos também com fígados de ratos alimentados, e os parâmetros medidos foram os mesmos dos experimentos da Figura 8: produções de glicose, lactato e piruvato e consumo de oxigênio, além da absorbância a 280 nm como indicativo para a concentração venosa do ácido niflúmico e seus metabólitos.

A primeira conclusão geral que se pode tirar da Figura 10 é que ela confirma os resultados da Figura 8, isto é, a respiração, a liberação de glicose e a liberação de lactato são ativados. O grau dos efeitos varia com a concentração. O parâmetro mais sensível parece ser o consumo de oxigênio. Com ácido niflúmico portal total 10 μM, o que corresponde a apenas 6,4 μM na forma livre, o consumo de oxigênio já apresenta ativação significativa (p = 0,047; teste t pareado). Os demais parâmetros não respondem a esta concentração. A cada acréscimo na concentração o efeito sobre o consumo de oxigênio aumenta, ao menos dentro da faixa investigada. A produção de lactato começa a responder na passagem de ácido niflúmico livre de 6,4 para 11,9 μM (p = 0,016); e a de glicose na passagem de 11,9 para 34,2 μM (p = 0,033). A produção de piruvato, por outro lado, não se altera significativamente, mesmo na mais alta concentração de ácido niflúmico. A absorbância a 280 nm, finalmente, mostra para cada aumento na concentração o mesmo padrão já verificado nos experimentos anteriores.

Na titulação da Figura 10 a concentração da albumina foi constante e igual a 4,5 μM. É de se esperar, *a priori*, que a albumina tenha um efeito negativo sobre a ação do ácido niflúmico, já que aumentos na concentração dessa proteína reduzem a

concentração livre da droga. As Figuras 11 e 12 permitem um exame desta questão. A Figura 11 mostra os resultados médios de experimentos nos quais o ácido niflúmico 50 μM foi infundido na presença de albumina 37,5 μM. Conforme se pode verificar, ao comparar os efeitos do ácido niflúmico 50 μM na Figura 10 (albumina 4,5 μM) com os da Figura 11, a albumina realmente reduz os efeitos do ácido niflúmico. Por exemplo, na Figura 10, ácido niflúmico 50 μM produz um aumento de aproximadamente 1,6 μmol · min^{-1} · g^{-1} na produção de lactato; na Figura 11, o aumento é de apenas 0,4 μmol · min^{-1} · g^{-1}. Algo semelhante se poderia dizer em relação aos demais parâmetros. A Figura 12 resume os resultados médios dos experimentos da Figura 11 e de mais dois semelhantes nos quais a concentração total de ácido niflúmico na veia porta foi sempre a mesma (50 μM), mas a concentração de albumina foi variada. Desta forma obteve-se diferentes concentrações de ácido niflúmico portal livre. A Figura 12 mostra o efeito sobre o consumo de oxigênio (Figura 12A) e sobre a glicogenólise (Figura 12B). A concentração total foi a mesma, os efeitos diferentes. Isto se traduz numa ausência de correlação entre os efeitos e a concentração total. Claramente, por outro lado, os efeitos aumentam com os aumentos na concentração livre. Uma questão que pode ser abordada experimentalmente diz respeito à natureza do aumento no consumo de oxigênio provocado pelo ácido niflúmico. O consumo de oxigênio pelo fígado perfundido deve-se, basicamente, a dois sistemas (**Scholz** e **Bücher**, 1965): (1) a cadeia respiratória mitocondrial, que contribui com a maior parte; e, (2) o sistema de oxidases, principalmente as oxidases de função mista. A cadeia respiratória pode ser bloqueada por vários inibidores, como o cianeto, por exemplo. A Figura 13

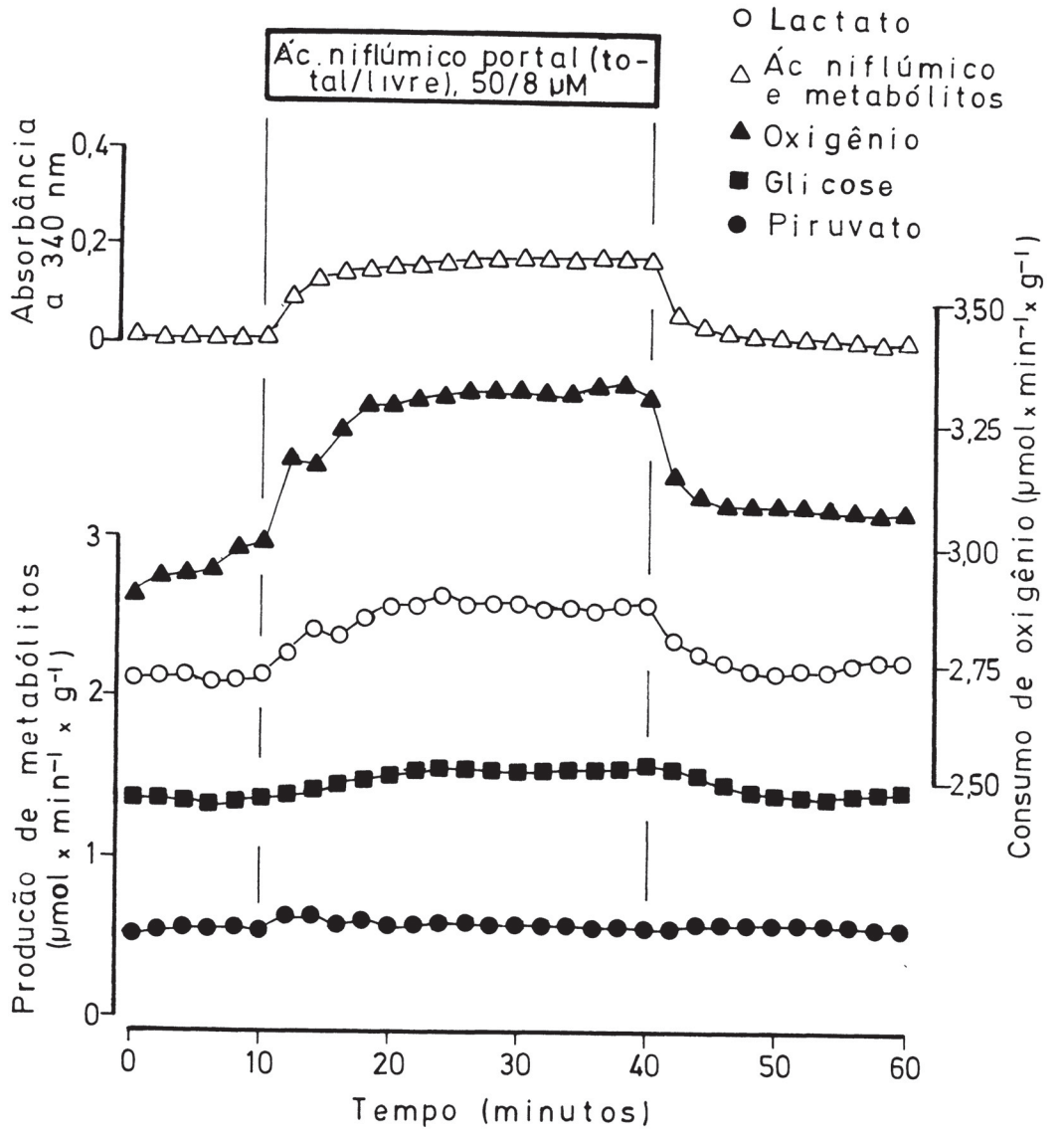

Figura 11. ***Efeito do ácido niflúmico 50 µM sobre o consumo de oxigênio e o catabolismo do glicogênio na presença de albumina 37,5 µM.*** Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) e contendo albumina 37,5 µM. Acido niflúmico 50 µM foi infundido entre 10 e 40 minutos. Amostras foram coletadas para medir lactato, piruvato glicose e ácido niflúmico mais metabólitos. O oxigênio foi medido polarograficamente. Os pontos representam a média de três experimentos.

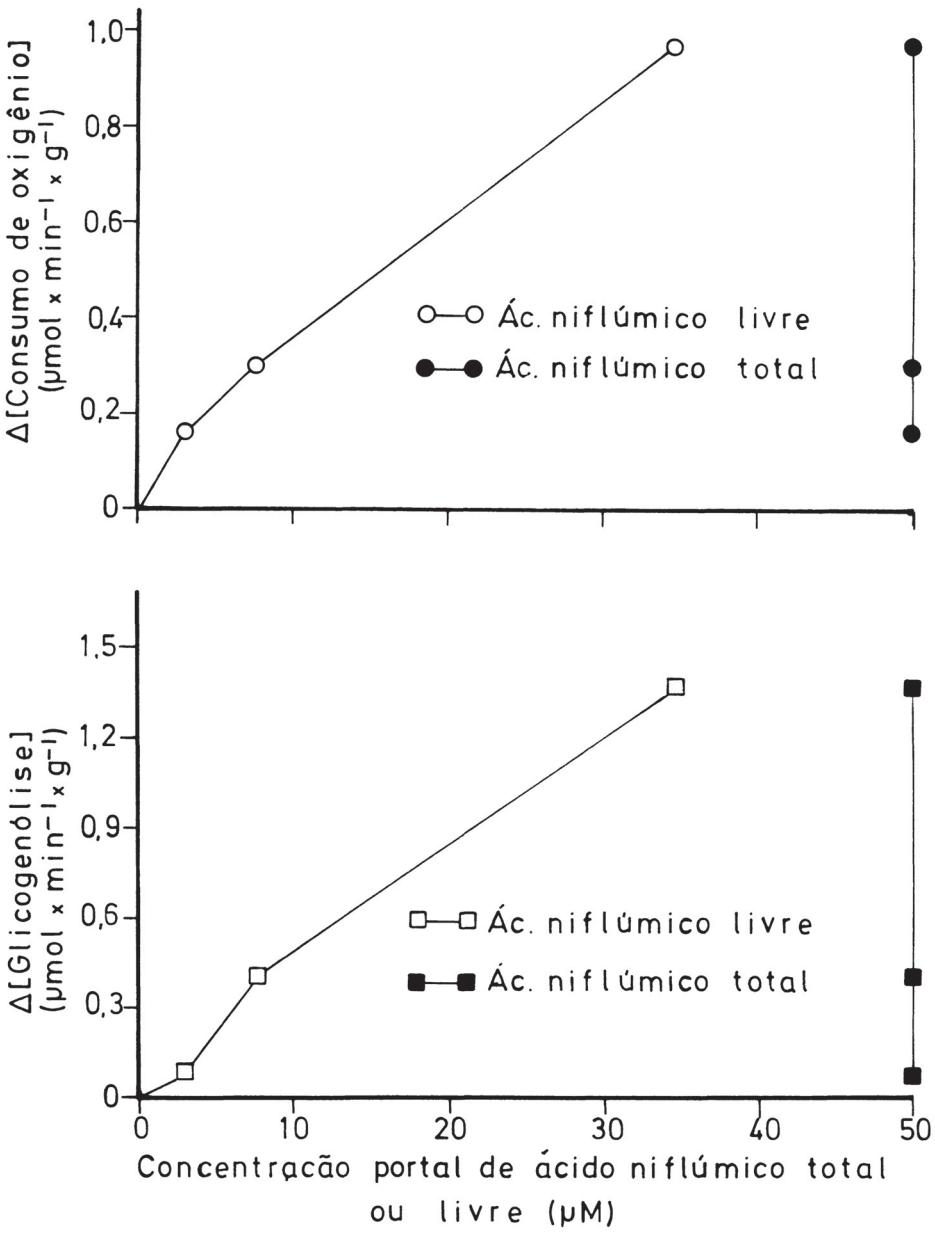

Figura 12. ***Incrementos no consumo de oxigênio (A) e na glicogenólise (B) em função da concentração livre e total de ácido niflúmico.*** Os dados foram obtidos de experimentos semelhantes aos da Figura 11, nos quais a concentração total de ácido niflúmico portal foi igual a 50 μM e a de albumina foi de 4,5, 37,5 ou 150 μM. A glicogenólise foi calculada como produção de glicose + ½[produção de lactato + piruvato]. Cada ponto é a média de três experimentos de perfusão.

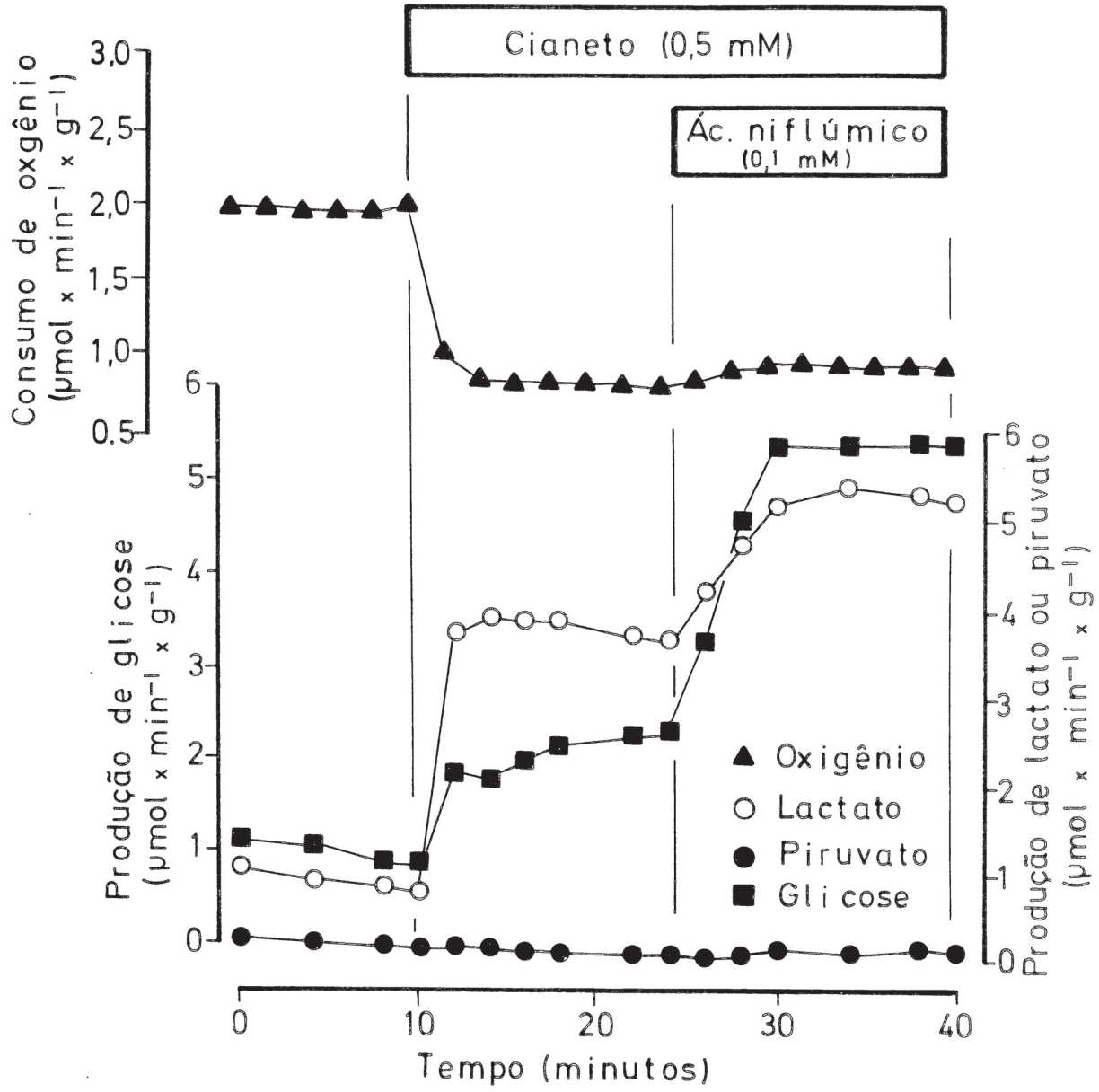

Figura 13. ***Efeito do ácido niflúmico sobre o consumo de oxigênio e o catabolismo do glicogênio na presença de cianeto 0,5 mM.*** O fígado de um rato alimentado foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4). Cianeto de sódio 0,5 mM foi infundido aos 10-40 minutos e ácido niflúmico 100 µM aos 24-40 minutos. Amostras foram coletadas para medir lactato, piruvato e glicose. O oxigênio foi medido polarograficamente. Experimento representativo de uma série de três.

mostra que a infusão de cianeto 0,5 mM produz um rápido e grande decréscimo no consumo de oxigênio, um aumento na produção de lactato e um aumento na liberação de glicose, fato já bem conhecido na literatura especializada (**Scholz** e **Bücher**, 1965; **Kelmer-Bracht** *et al.*, 1984). A infusão de ácido niflúmico 100 µM agora tem um efeito muito pequeno sobre o consumo de oxigênio, embora a produção de lactato e a produção de glicose ainda sofram uma ativação adicional bastante significativa. Isto demonstra que a ativação do consumo de oxigênio é de natureza predominantemente mitocondrial. As oxidases de função mista, portanto, parecem estar pouco ativas na presença de ácido niflúmico, em que pese o fato de que devem estar contribuindo para a metabolização da droga (**Thurman** e **Kauffman**, 1980; **Orrenius** e **Sies**, 1982). Isto seria compatível com uma hidroxilação muito lenta do ácido niflúmico.

A inibição do consumo de oxigênio pelo cianeto se dá de forma direta, isto é, por um bloqueio da cadeia respiratória. Uma ação indireta sobre a cadeia respiratória, no entanto, não deveria impedir a ação da droga. O atractilosídeo, por exemplo, também inibe a respiração mitocondrial, mas apenas aquela ligada à fosforilação do ADP citosólico, já que essa substância inibe o translocador de ADP/ATP da membrana interna das mitocôndrias (**Klingenberg** e **Heldt**, 1982). A Figura 14 mostra um experimento representativo com atractilosídeo, no qual esse composto foi infundido numa concentração de 43 µM. O atractilosídeo também aumenta a produção de lactato, além de inibir o consumo de oxigênio (**Ishii** e **Bracht**, 1986). A infusão de ácido niflúmico, no entanto, provoca grande ativação no consumo de oxigênio, apesar de a fosforilação do ADP citosólico estar em sua maior parte

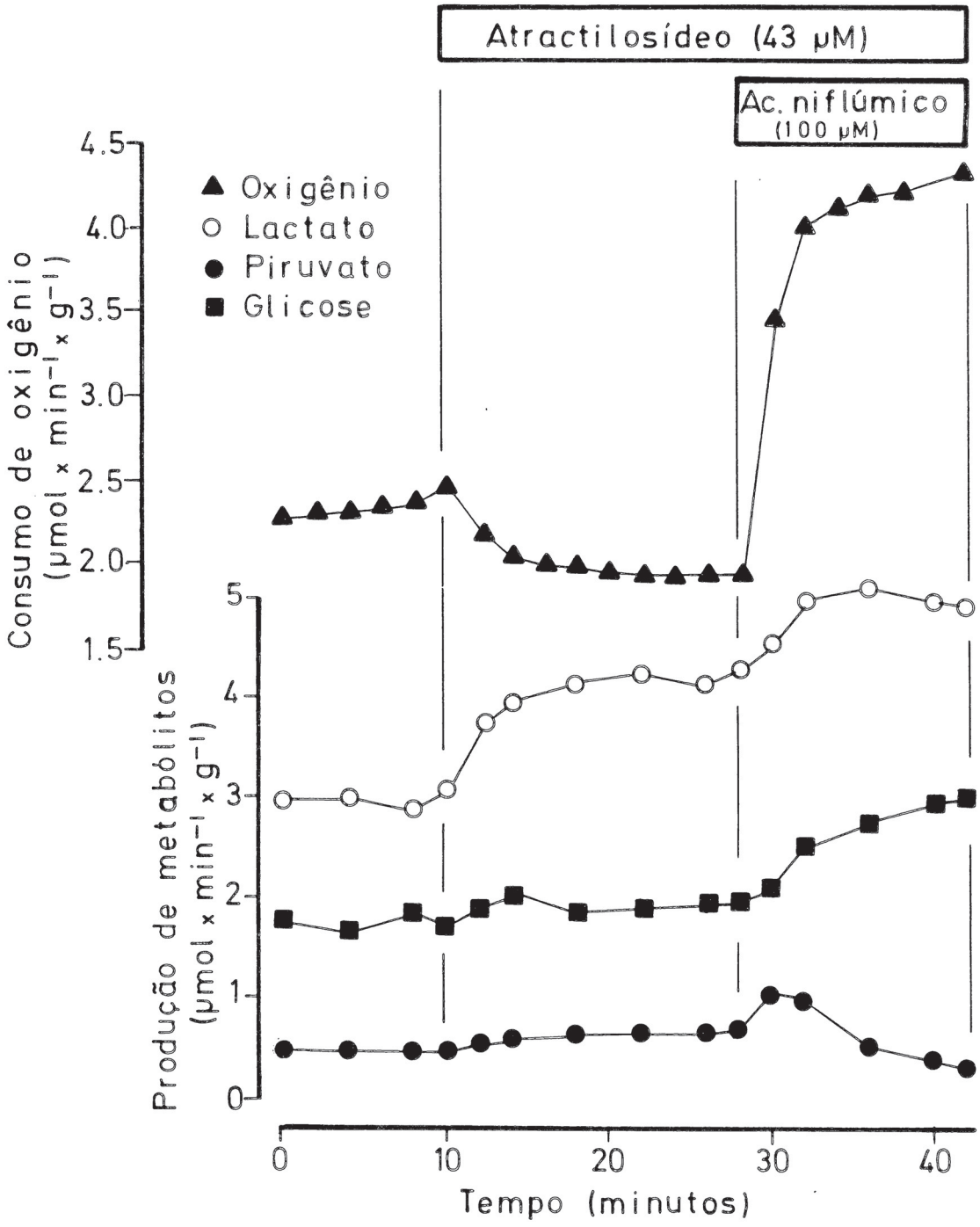

Figura 14. ***Efeito do ácido niflúmico sobre o consumo de oxigênio e o catabolismo do glicogênio na presença de atractilosídeo 43 μM.*** O fígado de um rato alimentado foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4). Atractilosídeo 43 μM (na forma de atractilato de sódio) foi infundido a 10-42 minutos. Acido niflúmico 100 μM foi infundido a 28-42 minutos, conforme indicado pela barra horizontal. Amostras foram coletadas para medir lactato, piruvato e glicose. O oxigênio foi medido polarograficamente. Experimento representativo de uma série de três.

inibida. Isto demonstra que a ativação da respiração pelo ácido niflúmico independe da fosforilação do ADP citosólico.

Com a oligomicina pode-se bloquear a ATP-sintase (ATP-ase mitocondrial) e com isto a respiração acoplada à síntese de ATP (**DePierre e Ernster**, 1977). A respiração acoplada estando inibida pode ser restaurada por desacoplamento da cadeia respiratória. Diferentemente do atractilosídeo, a oligomicina bloqueia a fosforilação tanto do ADP citosólico como também do mitocondrial. O experimento com oligomicina e ácido niflúmico está mostrado na Figura 15. A oligomicina inibe a respiração e ativa a produção de lactato e a glicogenólise, de modo semelhante ao atractilosídeo. O efeito sobre o consumo de oxigênio não é maior que aquele observado com o atractilosídeo, provavelmente porque num fígado perfundido sem substratos para biossíntese a demanda intramitocondrial de ATP seja muito pequena em comparação com a demanda citosólica. O ácido niflúmico, também neste caso, ativa a respiração inibida por oligomicina, a exemplo do que já fizera com a respiração inibida por atractilosídeo. Portanto, apenas um bloqueio direto da cadeia respiratória pode impedir a ação do ácido niflúmico, fato que é compatível com uma ação desacopladora.

3.2.2. *Efeito do ácido niflúmico sobre a neoglicogênese a partir de piruvato e parâmetros relacionados*

Decréscimo na geração de ATP prejudica os processos que dependem estritamente de energia metabólica, o que significa que o ácido niflúmico deveria inibir esses processos. Por este motivo foram realizados experimentos nos quais a neoglicogênese foi

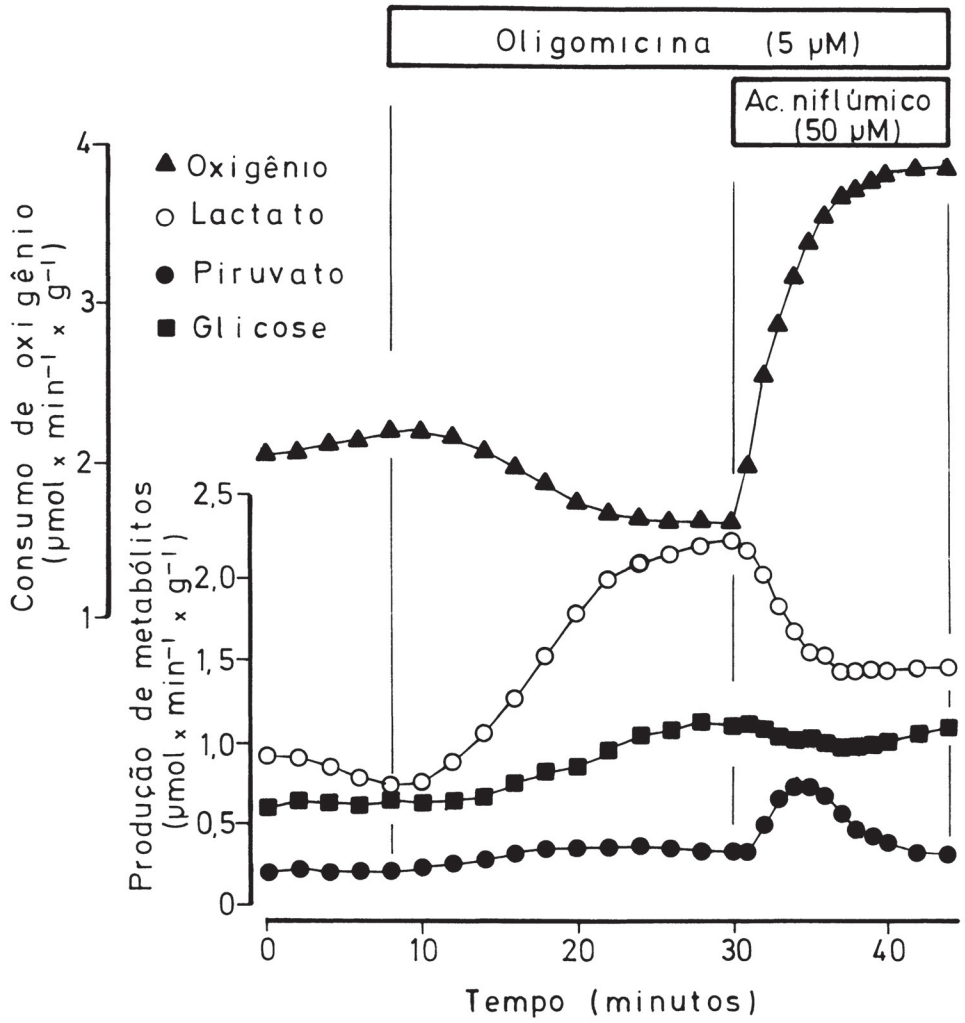

Figura 15. ***Efeito do ácido niflúmico sobre o consumo de oxigênio e o catabolismo do glicogênio na presença de oligomicina 5 μM.*** O fígado de um rato alimentado foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4). Oligomicina 5 μM foi infundida a 10-40 minutos. Acido niflúmico 100 μM foi infundido a 28-40 minutos, conforme indicado pela barra horizontal. Amostras foram coletadas para medir lactato, piruvato e glicose. O oxigênio foi medido polarograficamente. Experimento representativo de dois experimentos.

medida sob diversas condições, já que esse processo é dependente da geração de nucleotídeos trifosfato. Medir a neoglicogênese no fígado perfundido com interferência mínima do catabolismo do glicogênio pode ser conseguido com fígados retirados de animais em jejum. Um jejum de 24 horas é suficiente para reduzir o catabolismo do glicogênio a valores muito pequenos (**Ishii** *et al.*, 1987). Aumento no tempo de jejum não produz melhoria significativa, já que o fígado resiste a uma depleção total do glicogênio (**Bazotte** *et al.*, 1990). A taxa de liberação de glicose é praticamente igual à taxa de neoglicogênese se o líquido de perfusão não contiver glicose numa concentração superior a 5,0 mM, já que em baixas concentrações de glicose não há praticamente síntese de glicogênio (**Itinose** *et al.*, 1989). O piruvato é um substrato neoglicogênico que ocupa uma posição central, para ele convergindo o lactato e também vários aminoácidos, inclusive o mais abundante deles, a alanina. Por isto, os primeiros experimentos foram realizados com aquele substrato. A Figura 16 mostra os resultados médios de experimentos nos quais a concentração de ácido niflúmico foi aumentada por etapas entre 10 e 100 μM na presença de piruvato 5 mM. Foram medidos quatro parâmetros: consumo de oxigênio, produção de lactato, produção de glicose e a absorbância devida ao ácido niflúmico e seus metabólitos, desta vez medida a 340 nm. Foram efetuadas também medidas antes da infusão de piruvato, as quais mostram que é pequena a taxa de liberação de glicose e lactato, neste caso provenientes do glicogênio residual. A infusão de piruvato provoca um rápido aumento no consumo de oxigênio e na liberação de lactato; aumenta também muito a liberação de glicose, porém o incremento se dá mais lentamente.

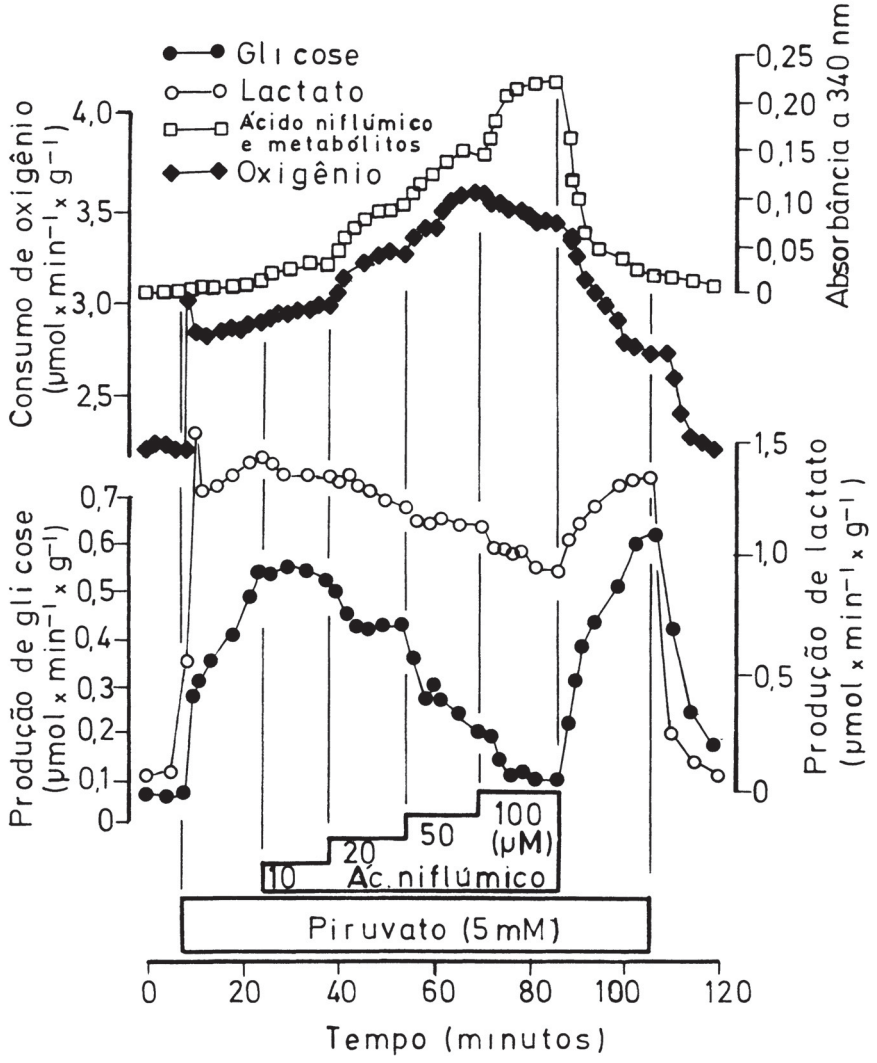

Figura 16. ***Efeito de várias concentrações de ácido niflúmico sobre a neoglicogênese a partir de piruvato exógeno.*** Fígados de ratos submetidos a jejum prévio de 24 horas foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), contendo albumina 4,5 µM. Piruvato 5 mM foi infundido entre 8 e 120 minutos. A infusão de ácido niflúmico foi iniciada aos 22 minutos, com aumentos sucessivos da concentração (10, 20, 50 e 100 µM), conforme indicado pelas barras verticais. As concentrações livres de ácido niflúmico foram, respectivamente 6,4, 11,9, 34,2 e 80,7 µM. Os pontos experimentais são a média de 4 experimentos com idêntico protocolo experimental.

Estudos anteriores revelaram que o fígado é capaz de sustentar altos níveis de neoglicogênese por duas horas ou mais (**Zwiebel**, 1990). A infusão de ácido niflúmico em concentrações crescentes afeta todos os parâmetros, mais acentuadamente a produção de glicose. Acido niflúmico 10 µM (6,4 µM livre) é inócuo; a partir de 20 µM (11,9 µM livre), no entanto, a neoglicogênese passa a ser inibida. Cada aumento produz uma nítida inibição adicional. Com 100 µM (80,7 µM livre) a taxa de liberação de glicose está reduzida a um valor pouco abaixo de 0,1 µmol · min^{-1} · g^{-1}. Observe-se aqui que isto é exatamente o oposto do que ocorre com a liberação de glicose proveniente de glicogênio (*i.e.*, da glicogenólise), a qual é ativada (veja Figura 8 e subsequentes). O consumo de oxigênio, por outro lado, é ativado, mesmo já estando em níveis altos depois da introdução de piruvato. A combinação de eventos, ativação no consumo de oxigênio mais inibição de um processo biossintético estritamente dependente de energia metabólica como a neoglicogênese, é uma indicação bastante forte de que essa ativação do consumo de oxigênio é, na verdade, prejudicial e não benéfica. Esta combinação de eventos é exatamente a esperada para o caso de desacoplamento da fosforilação. Observação que merece ser destacada ainda em relação à neoglicogênese é a reversão total desse parâmetro após a interrupção da infusão do ácido niflúmico. O processo de biossíntese da glicose a partir de piruvato é bastante complexo, havendo inclusive compartimentalização. Qualquer fator que danifique a célula irreversivelmente pode afetar o processo. No entanto, isto não ocorre com o ácido niflúmico: basta retirá-lo do líquido de perfusão que a neoglicogênese volta a ocorrer com a mesma intensidade de antes da infusão.

A produção de lactato é o parâmetro menos afetado pelo ácido niflúmico. Há uma certa inibição nas concentrações maiores, porém, não muito acentuada. Deve-se aqui comparar novamente este efeito com aquele observado quando o lactato provinha do catabolismo do glicogênio. Neste último caso (ver Figuras 8 e seguintes), a produção do metabólito era aumentada pelo ácido niflúmico. Nos experimentos da Figura 16, onde o lactato provém diretamente da redução do piruvato, há uma diminuição. Esta redução consome equivalentes redutores (na forma de NADH), cuja produção no citosol está bastante reduzida pois a glicólise e a via das pentoses são mínimas em face da parca disponibilidade de substrato. A maior parte dos equivalentes redutores necessários deve provir das mitocôndrias, onde eles se fazem cada vez mais necessários à medida que aumenta a concentração de ácido niflúmico, já que o consumo de oxigênio aumenta. Assim sendo, é possível que a redução na produção de lactato se deva a uma menor disponibilidade de equivalentes redutores no citossol.

A Figura 17 mostra os resultados médios de experimentos de neoglicogênese a partir de piruvato nos quais as concentrações de ácido niflúmico total (livre mais ligado) (200 μM) e piruvato (5 mM) foram mantidas constantes, tendo-se variado a concentração da albumina no líquido de perfusão. As concentrações de albumina foram sucessivamente 300, 150, 38,5 e 4,5 μM, o que leva a concentrações portais de ácido niflúmico livre de 5,1, 8,25, 42,5 e 176,0 μM, respectivamente. O experimento da Figura 17 é útil para investigar a possível correlação dos efeitos com a concentração total ou livre. O estado metabólico dos animais e os parâmetros medidos foram os mesmos dos experimentos da Figura 16. Fica claro que à medida que a concentração de albumina diminui os

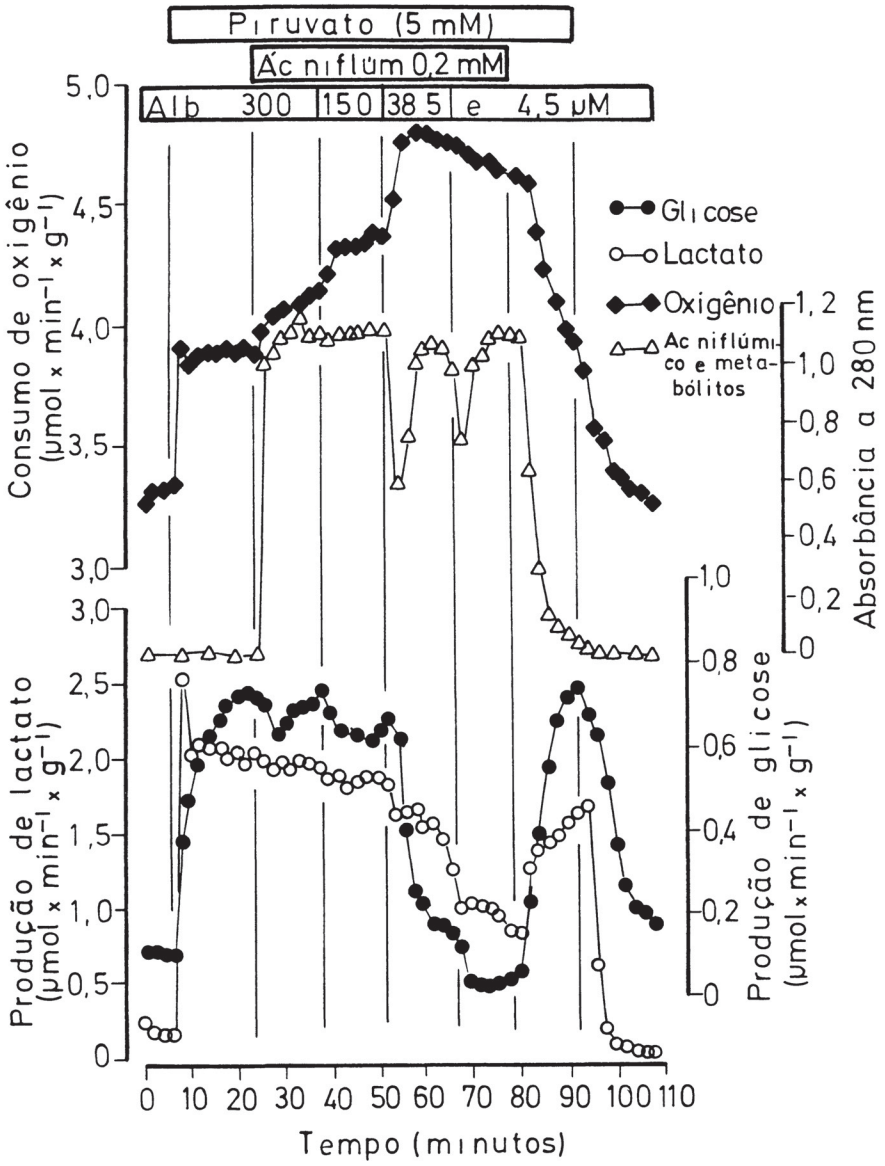

Figura 17. ***Efeito da albumina sobre a inibição da neoglicogênese pelo ácido niflúmico.*** Fígados de ratos submetidos a jejum de 24 horas foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), contendo inicialmente albumina 300 µM. A concentração de albumina foi diminuída em etapas, conforme indicado nas barras horizontais. Piruvato 5 mM foi infundido entre 8 e 92 minutos; e o ácido niflúmico 200 µM entre 24 e 78 minutos. Os pontos são a média de 3 experimentos. As concentrações livres de ácido niflúmico foram, 5,1, 8,25, 42,5 e 176,0 µM, respectivamente.

parâmetros metabólicos são alterados: a neoglicogênese e a produção de lactato são inibidas e o consumo de oxigênio é ativado. Ativação no consumo de oxigênio já é bem visível mesmo com albumina 300 μM (p = 0,031); a neoglicogênese praticamente não é inibida nesta concentração. Há um grande salto tanto no consumo de oxigênio como na neoglicogênese na passagem de albumina 150 para 38,5 μM, resultado de um salto também na concentração de ácido niflúmico livre (8,25 para 42,5 μM). Com albumina 4,5 μM a inibição da neoglicogênese é praticamente total. O consumo de oxigênio diminui um pouco, provavelmente devido à alta concentração de ácido niflúmico livre (176 μM), já que experimentos com mitocôndrias isoladas demonstraram que concentrações muito altas podem ser inibitórias (**Ishii**, 1982). Pelo que se pode inferir dos experimentos da Figura 17, o efeito inibidor sobre a neoglicogênese correlaciona com a concentração da forma livre, o que já foi mostrado anteriormente também para a glicogenólise e o consumo de oxigênio (ver Figura 12). A Figura 18 permite analisar melhor a relação entre a neoglicogênese e a concentração portal da forma livre do ácido niflúmico. Na Figura 18A, a neoglicogênese, expressa como fração do controle (*i.e.*, ausência de ácido niflúmico) está representada contra a concentração livre de ácido niflúmico. Os dados foram obtidos dos experimentos com albumina fixa e ácido niflúmico variável (Figura 16) e dos experimentos com albumina variável e ácido niflúmico fixo (Figura 17). Se a inibição correlaciona incondicionalmente com a concentração da forma livre, independentemente de como ela foi estabelecida, então os valores obtidos em cada uma das duas séries experimentais deveriam ser superponíveis. A Figura 18A sugere que este é realmente o caso. Para uma análise de

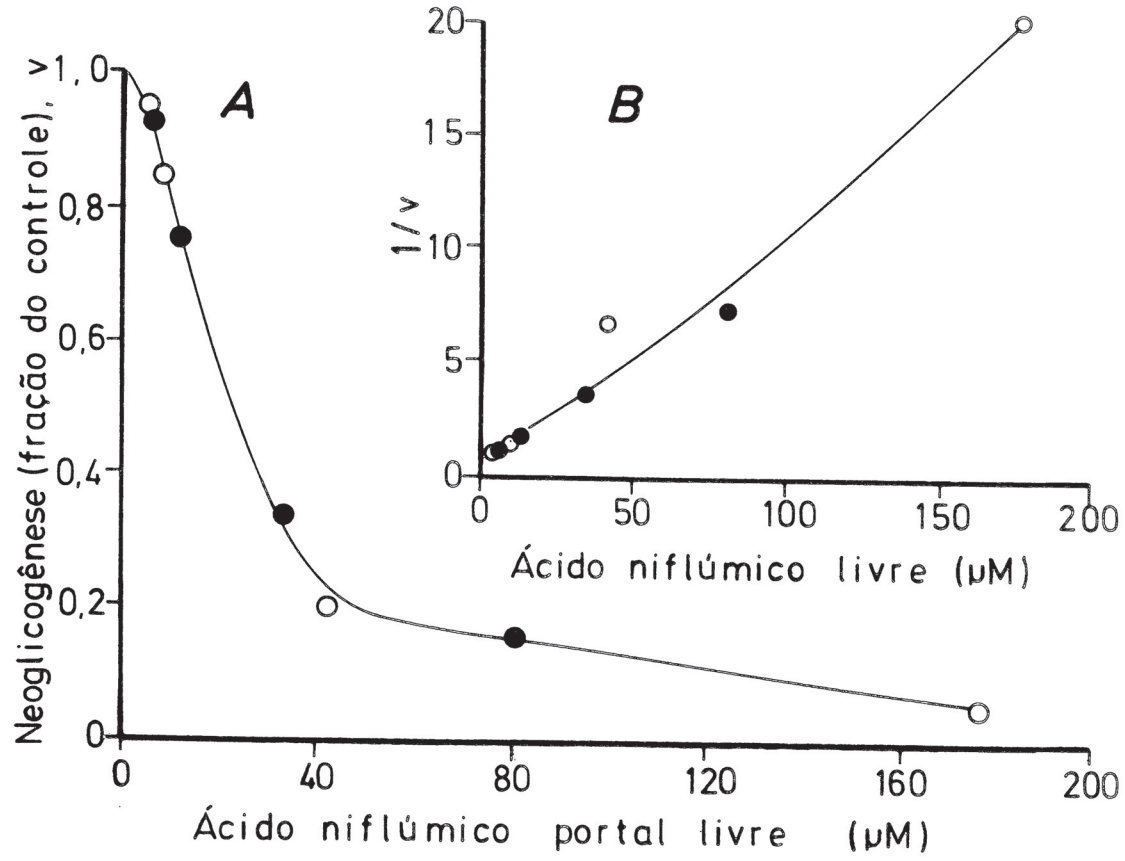

Figura 18. ***A neoglicogênese em função da concentração portal livre do ácido niflúmico.*** As velocidades de neoglicogênese (v), na presença de várias concentrações de ácido niflúmico foram expressas como fração do controle (neoglicogênese na ausência de ácido niflúmico). Em (**A**), os valores médios dos experimentos da Figura 16 (albumina constante e ácido niflúmico variável, ●——●) e da Figura 17 (albumina variável e ácido niflúmico constante, o——o) estão representados contra a concentração portal livre. Em (**B**), os inversos das velocidades relativas de neoglicogênese (1/v) estão representados contra a concentração. Neste último, a linha contínua é a linha de regressão de mínimos quadrados, calculada como $y = 0,87 + 0,054x + 0,00031x^2$. O coeficiente de correlação (r) foi igual a 0,996.

regressão a representação do inverso da atividade neoglicogênica contra a concentração é mais apropriada. Isto foi feito na Figura 18B. A relação é parabólica e uma equação do segundo grau foi ajustada aos dados (veja legenda da Figura 18). A correlação é boa, o coeficiente de correlação (r) sendo igual a 0,996. Com base nesta curva de regressão, pode-se esperar 50% de inibição da neoglicogênese (a partir de piruvato 5,0 mM) com ácido niflúmico portal livre igual a 18,82 μM.

As variações observadas na Figura 17 poderiam ser devidas, em parte ao menos, à própria albumina, ou a impurezas na amostra utilizada. É verdade que nos experimentos utilizou-se sempre albumina que o fornecedor alega ser essencialmente livre de ácidos graxos, porém, pode haver outras impurezas como, por exemplo, hormônios com efeitos metabólicos pronunciados. Por isto foi realizado o experimento mostrado na Figura 19. Neste experimento de perfusão a neoglicogênese a partir de piruvato foi medida durante uma hora na presença de concentrações progressivamente menores de albumina entre 300 e 4,5 μM. Foram medidos a produção de glicose, a produção de lactato e o consumo de oxigênio. As variações na concentração de albumina não produziram nenhuma alteração significativa nos fluxos metabólicos. A neoglicogênese mostra uma leve tendência em aumentar em função do tempo, fato já conhecido desde que se começou a investigar o fígado perfundido e que ocorre mesmo na ausência de albumina (**Zwiebel**, 1990). Este mesmo fenômeno, aliás, pode ser observado também nos experimentos com ácido niflúmico. Pode-se verificar nas Figuras 16 e 17 que a taxa de produção de glicose após o término da infusão de ácido niflúmico é sempre um pouco maior do que aquela atingida antes da infusão do inibidor.

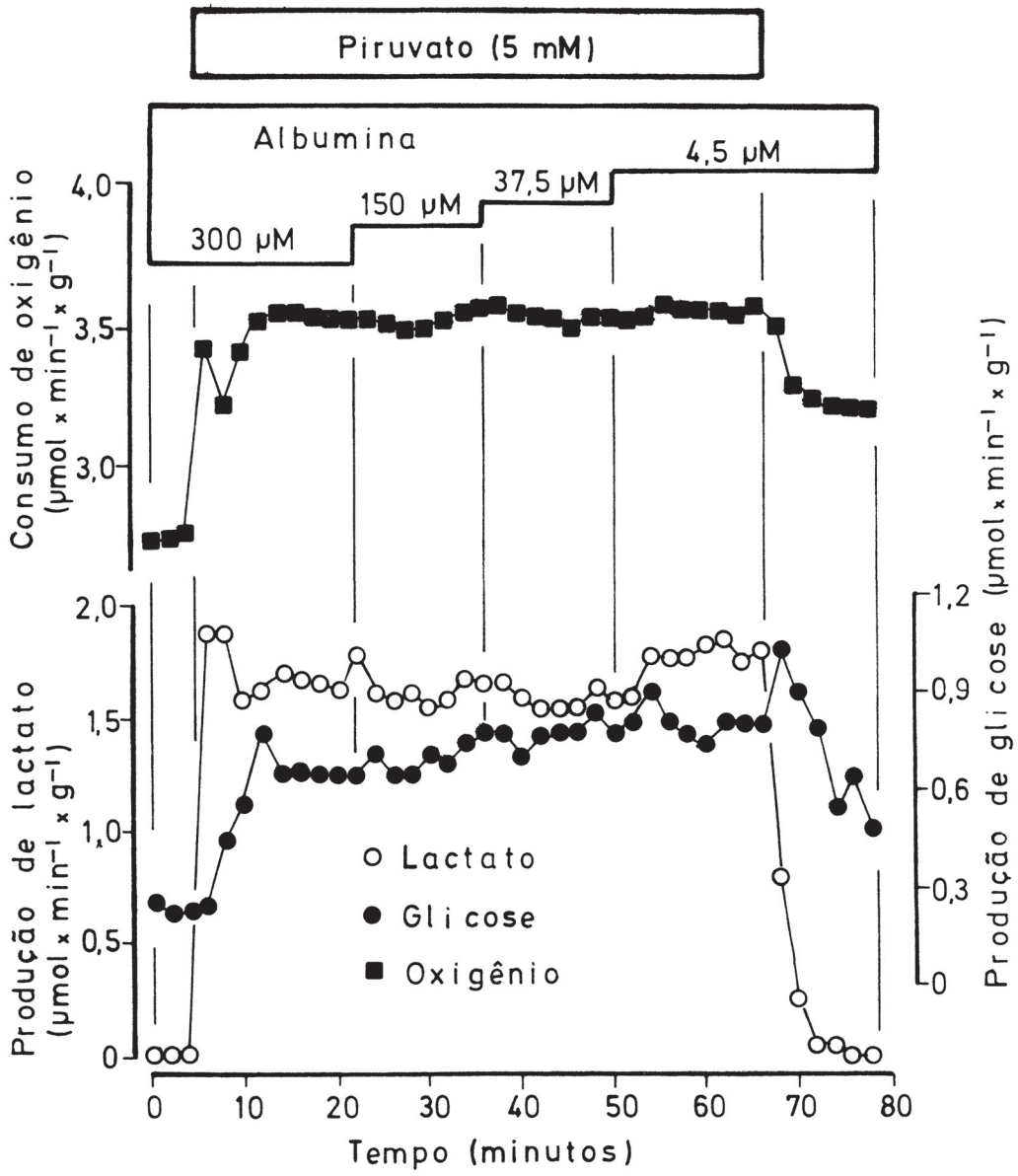

Figura 19. ***Neoglicogênese a partir de piruvato com várias concentrações de albumina.*** O fígado de um rato em jejum de 24 horas foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), contendo inicialmente albumina 0,3 mM. Piruvato 5 mM foi infundido no intervalo entre 6 e 66 minutos. A concentração de albumina foi sendo diminuída em etapas, conforme indicado pelas barras horizontais, passando sucessivamente de 0,3 mM para 0,15 mM, para 37,5 µM e, finalmente, para 4,5 µM. Amostras foram coletadas para a dosagem de glicose e lactato. O oxigênio foi medido polarograficamente.

Convém fazer ainda um retorno à Figura 17 para comentar um fenômeno relativo ao ácido niflúmico que ainda não foi descrito nos parágrafos anteriores. Conforme sempre foi feito rotineiramente em todos os experimentos em que se investigou o efeito do ácido niflúmico sobre o metabolismo, a absorbância do perfusado venoso no ultra-violeta foi monitorada, excluindo-se a absorbância devida à albumina. Esta absorbância a 280 nm, como já comentado, deve-se basicamente à soma do acido niflúmico e seus metabólitos. Uma análise dos valores de absorbância a 280 nm na Figura 17 revela que com o início da infusão de ácido niflúmico, numa concentração alta de albumina (300 μM), a absorbância sobe mais rapidamente aos valores de estado estacionário do que naqueles experimentos feitos com baixas concentrações de albumina (compare com a Figura 8, por exemplo). Além disto, quando da passagem de albumina 150 para 38,5 μM e de 38,5 para 4,5 μM há, em cada caso, um pronunciado decréscimo transitório na absorbância, com posterior retorno aos valores de estado estacionário. Não há nenhuma pausa na infusão de ácido niflúmico, cuja concentração foi mantida rigorosamente constante no perfusado portal. Assim sendo, a observação dá a entender que com o decréscimo súbito na concentração de albumina, uma certa quantidade adicional de ácido niflúmico foi sequestrada no espaço intracelular, provocando um decréscimo de concentração no perfusado venoso. Na passagem de 300 para 150 μM a quantidade extra de ácido niflúmico que entra nas células pode ser muito pequena para ser detectada. Estas observações são coerentes com a interpretação dada até agora aos dados de absorbância a 280 ou 340 nm no perfusado venoso, isto é, de que o tecido hepático acumula ácido niflúmico. Porém, como se trata de dados semi-

quantitativos, esta questão será abordada mais adiante com maior rigor.

3.2.3. *Efeito do ácido niflúmico sobre o metabolismo do glicerol*

As figuras 20 a 22 apresentam os resultados de uma série de experimentos em que o efeito do ácido niflúmico sobre o metabolismo do glicerol foi investigado. O metabolismo do glicerol pode ser informativo no que tange ao mecanismo de ação do ácido niflúmico porque a metabolização desse substrato leva, simultaneamente, a vias catabólicas (oxidação a lactato) e anabólicas (produção de glicose e síntese de triacilglicerídeos). Se for correta a interpretação dada até agora aos resultados obtidos com ácido niflúmico, a produção de ácido lático devida ao glicerol deveria ser ativada; e a produção de glicose deveria ser inibida.

A Figura 20 apresenta os resultados representativos de uma série de três experimentos semelhantes nos quais a infusão de ácido niflúmico foi precedida por um longo período de infusão (25 minutos) de glicerol 5,0 mM. A exemplo dos experimentos com piruvato, também neste caso os fígados foram retirados de animais em jejum prévio de 24 horas, sempre com o objetivo de reduzir a um mínimo o catabolismo do glicogênio. Uma característica importante do glicerol é a ausência de liberação de piruvato. Neste sentido, o glicerol é semelhante ao etanol (**Thurman** e **Scholz**, 1977), que também reduz a um mínimo a liberação de piruvato. Isto ocorre porque tanto o etanol como o glicerol levam a um grande aumento na razão NADH/NAD^+ citossólica, o primeiro

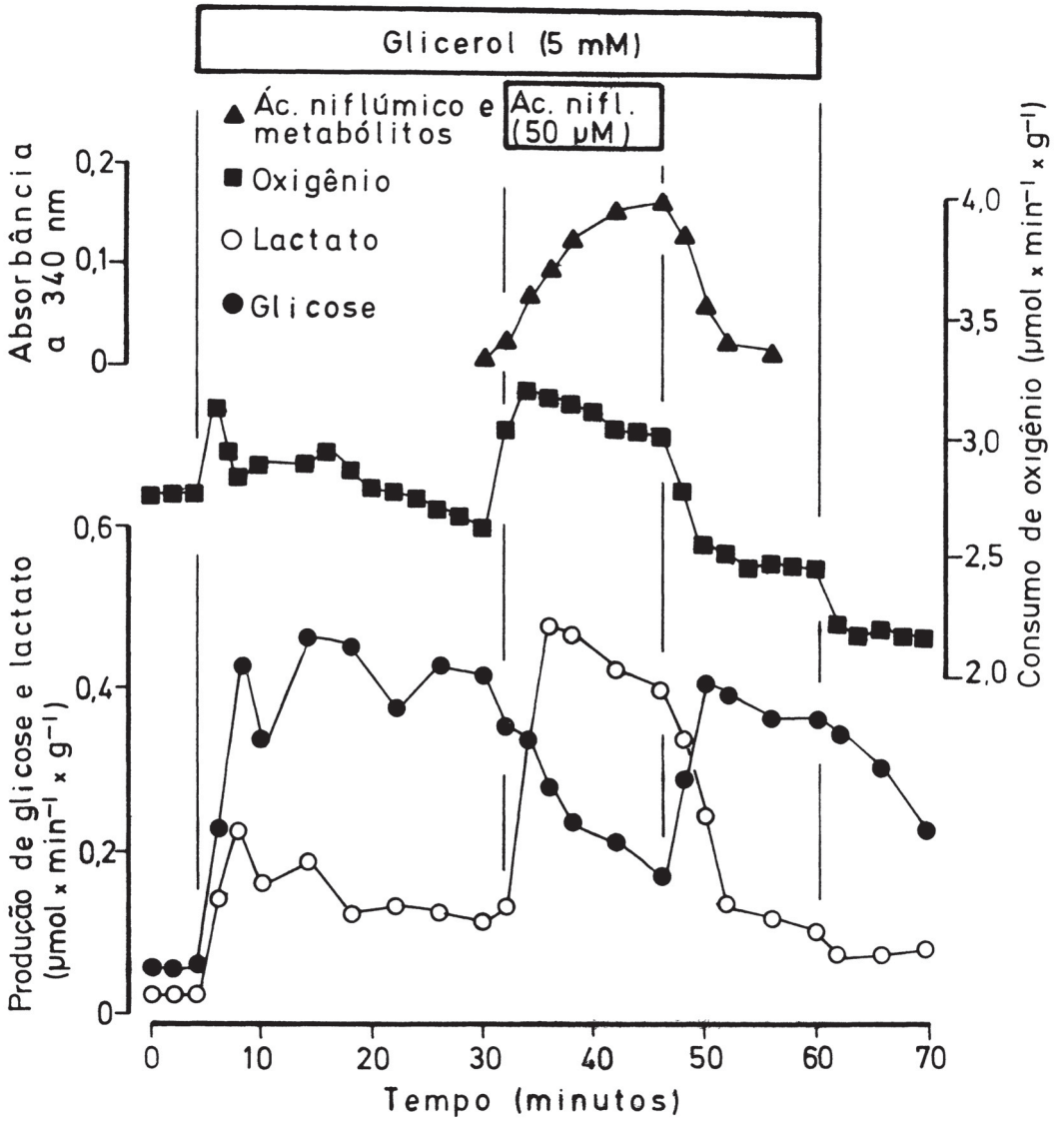

Figura 20. ***Efeito do ácido niflúmico sobre o metabolismo do glicerol no fígado de rato em perfusão.*** O fígado de um rato em jejum de 24 horas foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), contendo albumina 4,5 µM. Glicerol 5 mM foi infundido entre 6 e 60 minutos de perfusão. O ácido niflúmico 50 µM (livre 34,2 µM) foi infundido entre 32 e 46 minutos. Amostras foram coletadas para as dosagens de lactato e glicose; o oxigênio foi medido polarograficamente. Experimento representativo de uma série de três.

graças ao sistema álcool desidrogenase-aldeído desidrogenase e o segundo graças à glicerol 3-fosfato desidrogenase. Por isto, não se pode medir piruvato, mas apenas o lactato como produto da transformação das trioses-fosfato provenientes do metabolismo do glicerol. Uma outra parte, bem maior aliás, dessas trioses-fosfato é transformada em glicose. É o que revela a Figura 20: a infusão de glicerol provoca um aumento pequeno na produção de lactato e um aumento muito maior na produção de glicose. Em termos de unidades de triose (*i.e.*, unidades C3), a produção de glicose é mais ou menos 4 vezes maior. O consumo de oxigênio, por outro lado, é muito pouco afetado: há um aumento transitório que não se sustenta. O ácido niflúmico, quando introduzido entre 32 e 46 minutos, afeta todos estes parâmetros: o consumo de oxigênio é aumentado, a produção de glicose é inibida e a produção de lactato é aumentada. Esses fenômenos são todos reversíveis.

Todos os efeitos observados na Figura 20 podem ser vistos novamente na Figura 21, apenas com um protocolo experimental diferente. Nos experimentos da Figura 21 a infusão de ácido niflúmico precedeu a infusão de glicerol. Este tipo de protocolo experimental permite verificar a contribuição do catabolismo do glicogênio remanescente. Como se pode verificar, esta contribuição é mínima: não há nenhum aumento na liberação de glicose antes da infusão de glicerol e apenas um pequeno aumento na produção de lactato. O consumo de oxigênio, no entanto, sofre o aumento usual, observação que revela, mais uma vez, que os efeitos do ácido niflúmico são primordialmente o resultado de uma ação sobre o metabolismo oxidativo mitocondrial. Com a infusão de glicerol, aos 20 minutos, todos os parâmetros são alterados mais uma vez: aumentam consumo de oxigênio, produção de

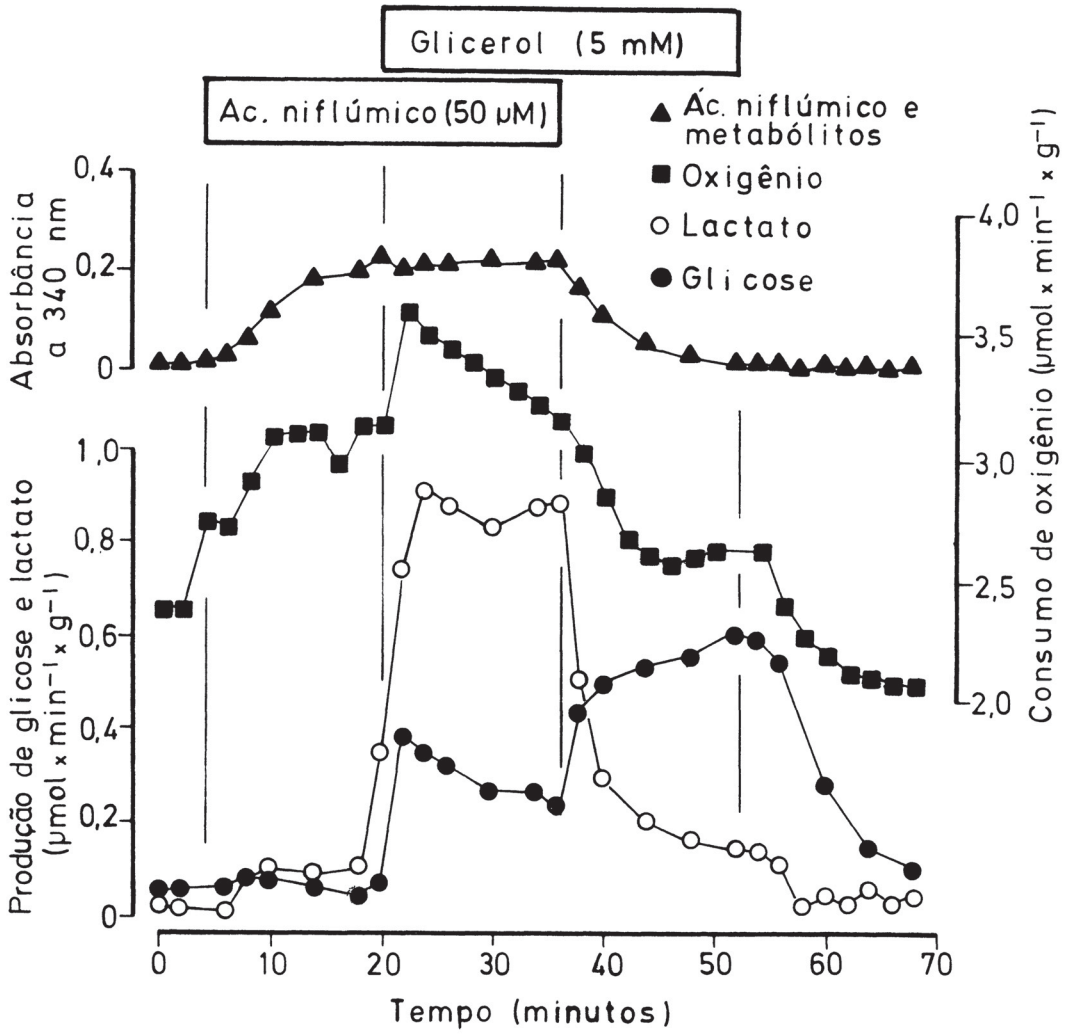

Figura 21. ***Metabolismo do glicerol no fígado de rato em perfusão na presença de ácido niflúmico 50 µM.*** Fígados de ratos em jejum de 24 horas foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), contendo albumina 4,5 µM. Acido niflúmico 50 µM (livre 34,2 µM) foi infundido entre 6 e 36 minutos. Glicerol 5 mM foi infundido entre 20 e 52 minutos. Amostras foram coletadas para as dosagens de lactato e glicose; o oxigênio foi medido polarograficamente. Média de três experimentos.

glicose e produção de lactato. A retirada do ácido niflúmico aos 36 minutos provoca novo aumento na produção de glicose, o que mostra que a via estava inibida. A produção de lactato, por outro lado, retorna a níveis bem baixos. Em relação ao consumo de oxigênio, nota-se um rápido decréscimo adicional, em que pese o fato de que já há uma tendência lenta de queda na presença de glicerol, fenômeno aliás observável também no experimento da Figura 20.

A Figura 22 mostra uma titulação do metabolismo do glicerol pelo ácido niflúmico semelhante àquela feita com o metabolismo do piruvato (Figura 16). O ácido niflúmico foi variado na faixa entre 10 e 100 μM. A concentração de 10 μM (6,4 μM livre) não provoca quase que alteração nenhuma. Com 20 μM (11,9 μM livre) há um decréscimo grande na produção de glicose, mas apenas pequena alteração na produção de lactato. Um salto na produção de lactato ocorre quando o ácido niflúmico é aumentado para 50 μM (34,2 μM livre). Estranhamente a produção de glicose não sofre inibição adicional na passagem de 20 para 50 μM, antes pelo contrário, ela é até um pouco maior. A causa pode estar num balanço energético levemente mais favorável no citosol, causado pelo grande aumento na produção de lactato. Deve-se lembrar que a transformação de glicerol em lactato gera um lucro líquido de 1,0 mol de ATP por mol de lactato produzido. Assim, pode ser que o decréscimo na fosforilação, que ocorre na passagem de 20 para 50 μM, seja compensado pelo grande aumento na produção de ATP citosólico. De qualquer forma, com ácido niflúmico 100 μM (80,7 μM livre), na última etapa da titulação, a síntese de glicose é completamente abolida. A produção de lactato sofre um aumento transitório e cai posteriormente. A interrupção da infusão da droga, finalmente,

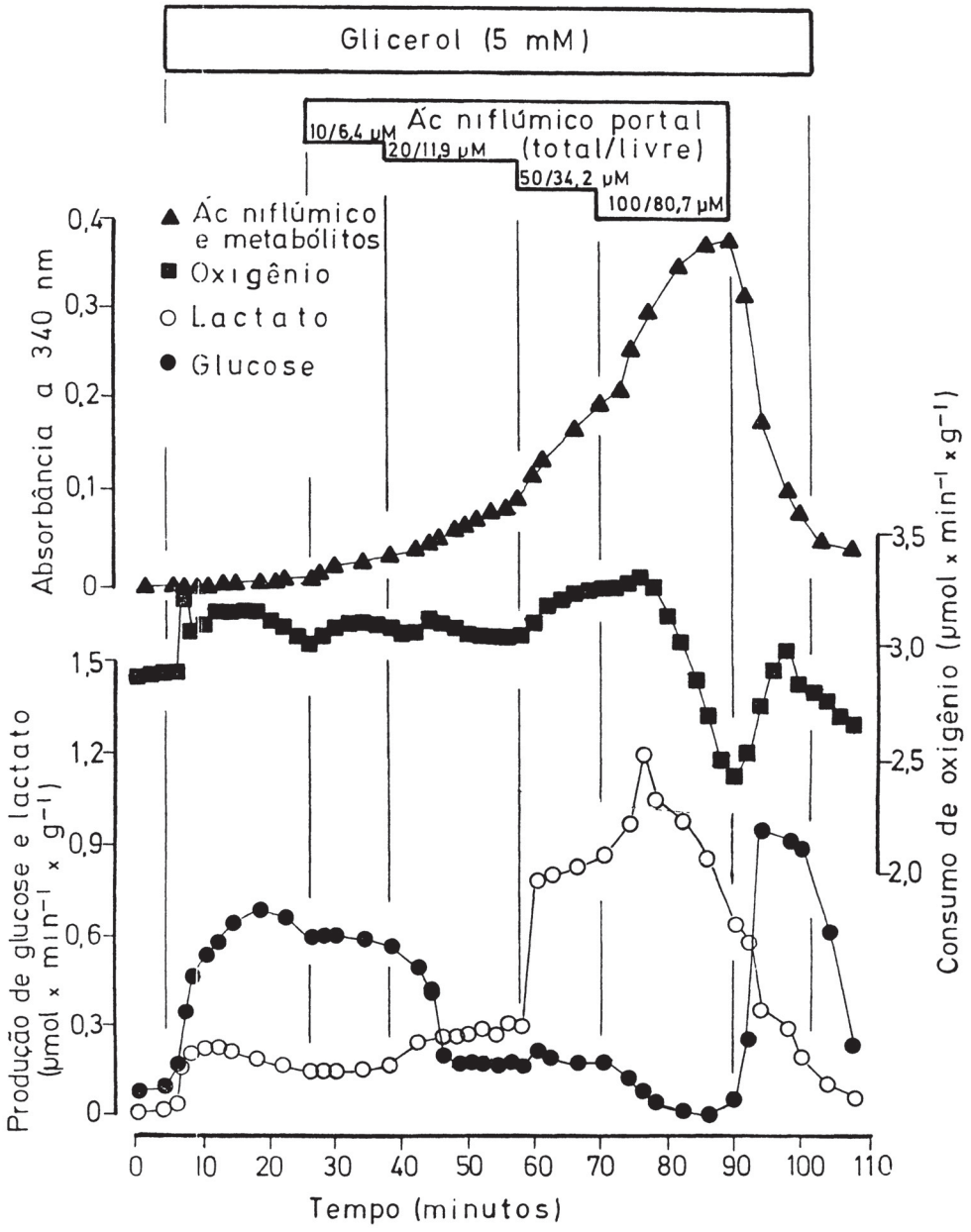

Figura 22. ***Titulação do metabolismo do glicerol com ácido niflúmico.*** Fígados de ratos em jejum de 24 horas foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) contendo albumina 4,5 µM. Glicerol 5 mM foi infundido entre 6 e 112 minutos e ácido niflúmico entre 26 e 90 minutos, nas concentrações indicadas. Média de três experimentos.

eleva os níveis de produção de glicose e diminui a produção de lactato. Deve-se notar ainda que o comportamento do consumo de oxigênio é um pouco estranho quando a concentração de ácido niflúmico atinge 100 µM. Após uma fase de retardo o consumo decresce rapidamente, sem estabilizar antes do fim da infusão do ácido niflúmico. Após o encerramento da infusão o consumo de oxigênio sobe novamente. Uma tendência de diminuir o consumo de oxigênio na passagem de uma concentração mais baixa para outra mais alta na faixa entre 100 e 200 µM foi observada também nos experimentos com piruvato, conforme pode ser visto nas Figuras 16 e 17. No caso do glicerol, no entanto, este fenômeno é bem mais evidente e pronunciado, sendo que não há dados disponíveis para uma interpretação.

Em linhas gerais pode-se dizer que, no tocante ao metabolismo do glicerol, o ácido niflúmico ativa processos catabólicos que levam à síntese citosólica de ATP e que ele inibe processos anabólicos, como a produção de glicose. Estes dados, em que pesem alguns detalhes de difícil interpretação, concordam com a interpretação dada até agora a todas as alterações metabólicas causadas pelo ácido niflúmico.

3.2.4. *Efeito do ácido niflúmico sobre o metabolismo da frutose*

Outro substrato cujo metabolismo consiste em processos catabólicos e anabólicos é a frutose (**Ishii** *et al.*, 1987; **Suzuki-Kemmelmeier** e **Bracht**, 1989). Este açúcar pode ser transformado em glicose (biossíntese) ou degradado a lactato e piruvato, processo

chamado de frutólise, mas que aproveita boa parte da via glicolítica (**Dietz**, 1978). A frutólise produz boa parte da energia necessária para a síntese de glicose. Por isto, a síntese de glicose a partir de frutose depende menos ainda da cadeia respiratória do que no caso do glicerol. Concentrações idênticas de ácido niflúmico deveriam, consequentemente, ser menos efetivas sobre a neoglicogênese a partir de frutose do que sobre a neoglicogênese a partir de piruvato. Isto tudo se a ação da droga realmente estiver concentrada na cadeia respiratória. A Figura 23 mostra os resultados médios de três experimentos nos quais o metabolismo da frutose 10 mM foi titulado com ácido niflúmico total entre 16 e 100 μM (livre entre 8,39 a 73,0 μM). Como já foi feito nos experimentos com piruvato e glicerol, os fígados são de animais em jejum prévio de 24 horas, para minimizar o catabolismo do glicogênio. A infusão de frutose provoca aumento imediato no consumo de oxigênio e nas produções de glicose, lactato e piruvato. A introdução do ácido niflúmico produz os efeitos esperados: a produção de glicose é inibida e o consumo de oxigênio é ativado, embora este último efeito somente seja observável nas maiores concentrações. A produção de lactato, por outro lado, é aumentada até à concentração de 52 μM. Na passagem desta última concentração para 100 μM há uma queda relativa, porém, os níveis de produção continuam elevados, bem acima dos níveis basais (sem ácido niflúmico). A produção de piruvato é sempre menor durante a infusão de ácido niflúmico. Todos os efeitos são reversíveis. O grau máximo de inibição da produção de glicose é aproximadamente igual a 61%. No caso do piruvato e do glicerol chegou-se a valores próximos de 90% na mesma faixa de concentrações. Portanto, a síntese de glicose a partir de frutose realmente é

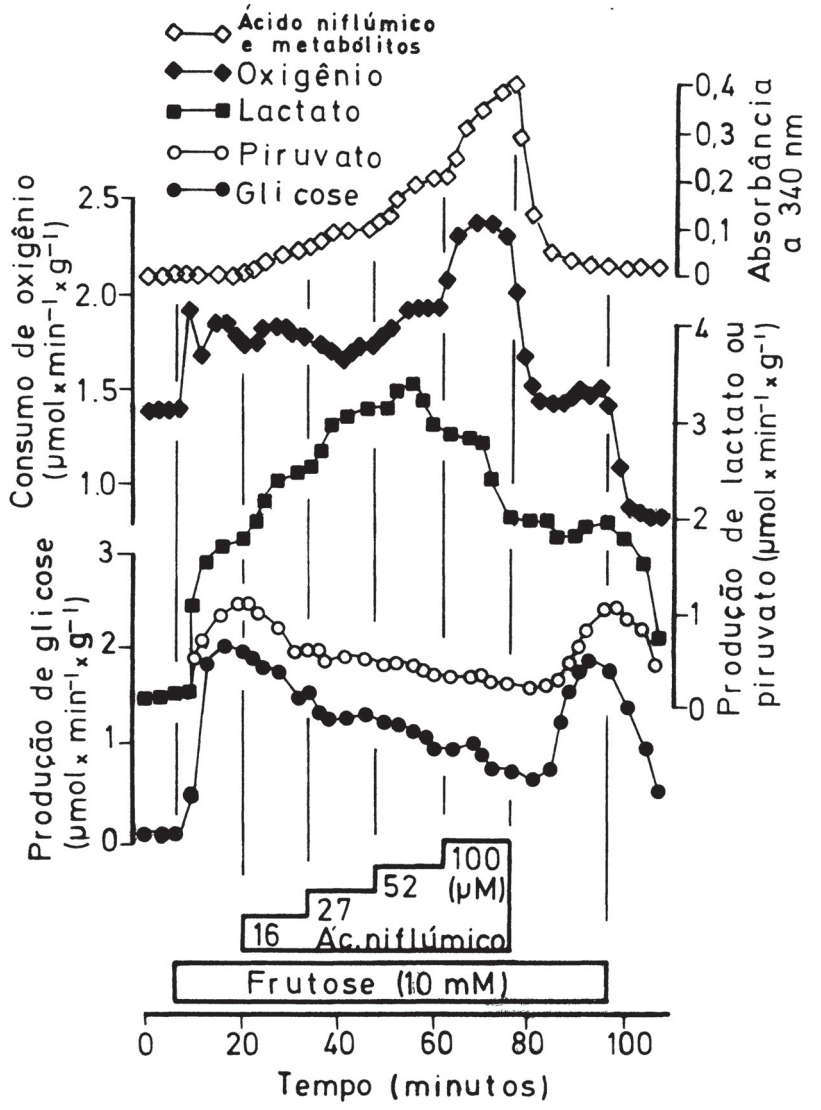

Figura 23. ***Efeito do ácido niflúmico sobre o metabolismo da frutose.*** Fígados de ratos em jejum de 24 horas foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), contendo albumina 5,8 µM. Frutose 10 mM foi infundida entre 8 e 98 minutos. O ácido niflúmico foi infundido entre 20 e 78 minutos, nas concentrações indicadas na barra horizontal. As concentrações livres foram 8,39, 13,56, 30,06 e 73,0 µM, respectivamente. Amostras foram coletadas para a dosagem de metabólitos. O oxigênio foi medido polarograficamente. Cada ponto é a média de três experimentos com idêntico protocolo experimental.

menos sensível ao ácido niflúmico do que a mesma síntese a partir de piruvato. E é bem provável que isto se deva à fosforilação citosólica a nível de substrato, isto é, à frutólise. De fato, como revela a Figura 23, a produção de lactato + piruvato na presença de ácido niflúmico atinge até 3,5 μmol · min^{-1} · g^{-1} e nunca é inferior a 2,5 μmol · min^{-1} ·g^{-1}. Isto significa que pelo menos 2,5 μmol de ATP são produzidos citosolicamente por minuto por grama, o que é suficiente para transformar 1,25 μmol de frutose · min^{-1} · g^{-1} em glicose. Embora haja também fosforilação de ADP no citosol a partir de glicerol, ela é bem menos intensa do que na presença de frutose. Claramente, portanto, a célula está bem menos desprovida de nucleotídeos trifosfato na presença de frutose do que na presença de glicerol e sobretudo de piruvato. O que explica o menor grau de inibição sobre a produção de glicose a partir de frutose. Por outro lado, os dados obtidos nos experimentos com frutose encaixam-se bastante bem na interpretação dada até agora aos efeitos do ácido niflúmico sobre o metabolismo.

3.3. O espaço de distribuição, transporte e ligação intracelular do ácido niflúmico

As medidas de absorbância do perfusado a 280 ou 340 nm, realizados rotineiramente nos experimentos em que os fluxos metabólicos foram medidos — e que refletem muito provavelmente a concentração venosa do ácido niflúmico mais os seus produtos de metabolização — sugerem que o tecido hepático tem alta afinidade

pelo ácido niflúmico. Por isto vale à pena investir trabalho experimental no estudo do (a) espaço de distribuição, (b) do transporte e (c) da possível ligação intracelular desse composto. Os dados obtidos com o ácido niflúmico poderão dar uma idéia também acerca do comportamento dos demais ácidos fenâmicos, dada a grande semelhança estrutural entre eles (ver Figura 1).

3.3.1. *Curvas de diluição do ácido niflúmico em resposta a infusões contínuas*

O transporte e o espaço de distribuição do ácido niflúmico podem ser medidos no fígado inteiro pela técnica da diluição de indicadores múltiplos. Nesses experimentos, a substância em estudo é infundida (ou injetada) simultaneamente com um ou mais indicadores. No caso do ácido niflúmico o indicador utilizado foi a água triciada ([^{3}H]H_2O). O perfusado foi fracionado em frações entre 0,5 segundo e 2 minutos logo após o início da infusão e o ácido niflúmico e a água triciada medidos. O ácido niflúmico foi extraído com acetato de etila para eliminar os produtos de metabolização, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. As Figuras 24 a 26 mostram uma série de curvas típicas obtidas sob várias condições. Na Figura 24, a albumina esteve ausente do líquido de perfusão e a concentração portal de ácido niflúmico foi variada entre 10 e 1000 μM em vários experimentos. A água triciada foi sempre infundida simultaneamente, mas para maior clareza apenas uma curva está sendo mostrada. De qualquer forma elas são todas bastante parecidas. Todas as curvas foram normalizadas, quer dizer, a concentração venosa foi dividida pela concentração portal. A curva da [^{3}H]água aproxima-se rapidamente

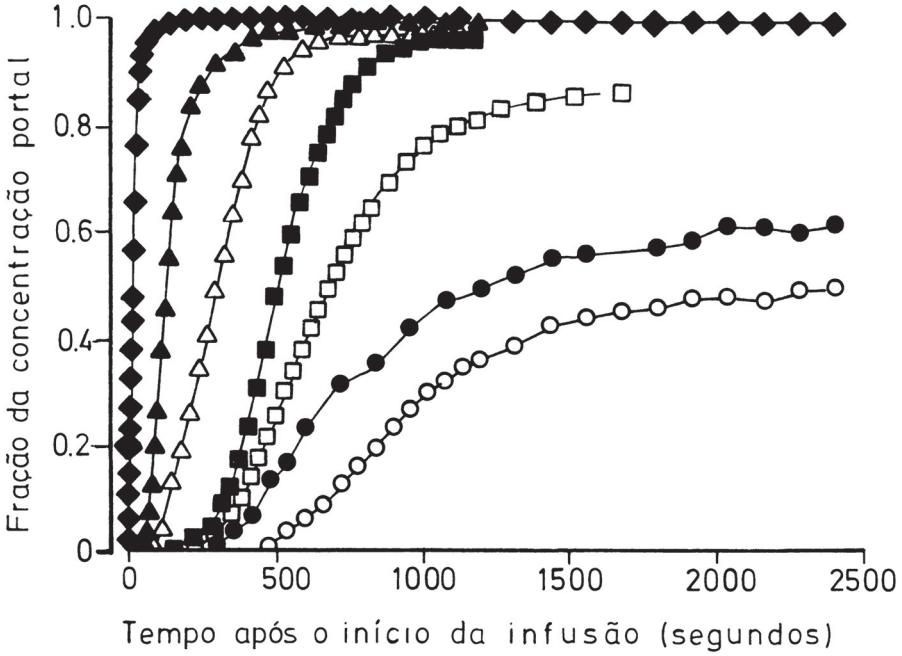

Figura 24. ***Experimentos de diluição de indicadores múltiplos com diferentes concentrações de ácido niflúmico na ausência de albumina.*** Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4). Acido niflúmico (diversas concentrações) e água triciada (2,3 μCi/min) foram infundidos simultaneamente. O perfusado venoso foi fracionado em frações entre 0,5 segundo e 1 minuto. A água triciada foi contada num cintilador para amostras líquidas. O ácido niflúmico foi extraído com acetato de etila e dosado espectrofotometricamente a 287 nm. As frações do arterial que apareceram no perfusado venoso foram representadas contra o tempo após o início da infusão. Apenas uma curva da água triciada está representada (◆——◆). As concentrações portais de ácido niflúmico foram as seguintes: 1 mM, ▲——▲; 200 μM, △——△; 100 μM, ■——■; 50 μM, □——□; 20 μM, ●——●; e 10 μM, o——o.

da unidade, o que significa ausência de transformação metabólica significativa. Na faixa entre 10 e 1000 μM, o ácido niflúmico é retardado em relação à [^{3}H]água, o que significa um alto espaço, aparente ou real, de distribuição para a droga. O espaço extra de distribuição, real ou aparente, do ácido niflúmico em relação ao espaço aquoso é proporcional à área entre a curva da [^{3}H]água e a curva do ácido niflúmico (**Meier** e **Zierler**, 1954). A 10 μM, o ácido niflúmico aparece no perfusado venoso a 480 segundos após o início da infusão, enquanto que a [^{3}H]água aparece a 2-3 segundos. A medida que a concentração portal é aumentada, no entanto, o retardamento do ácido niflúmico diminui progressivamente. Esse comportamento do ácido niflúmico já era esperado com base nas medidas de absorbância total a 280 ou 340 nm (ácido niflúmico mais produtos) nos experimentos sobre os efeitos metabólicos da droga. Em baixas concentrações, a fração venosa/portal do ácido niflúmico aproxima-se assintoticamente de valores de estado estacionário bem abaixo da unidade, fato que reflete a transformação metabólica. A medida que a concentração é aumentada, a fração transformada sob condições de estado estacionário diminui. Para concentrações portais acima de 100 μM, a fração transformada é muito pequena e não pode mais ser determinada com precisão.

Como a albumina esteve ausente na série de experimentos na Figura 24, somente ácido niflúmico livre (*i.e.*, não-ligado) estava presente no espaço extracelular. Na série de experimentos mostrados na Figura 25, a concentração portal livre de ácido niflúmico foi mantida constante e igual a 20 μM, enquanto que a concentração total foi variada na faixa entre 20 e 176,68 μM. Conseguiu-se isto com uma variação simultânea das concentrações da

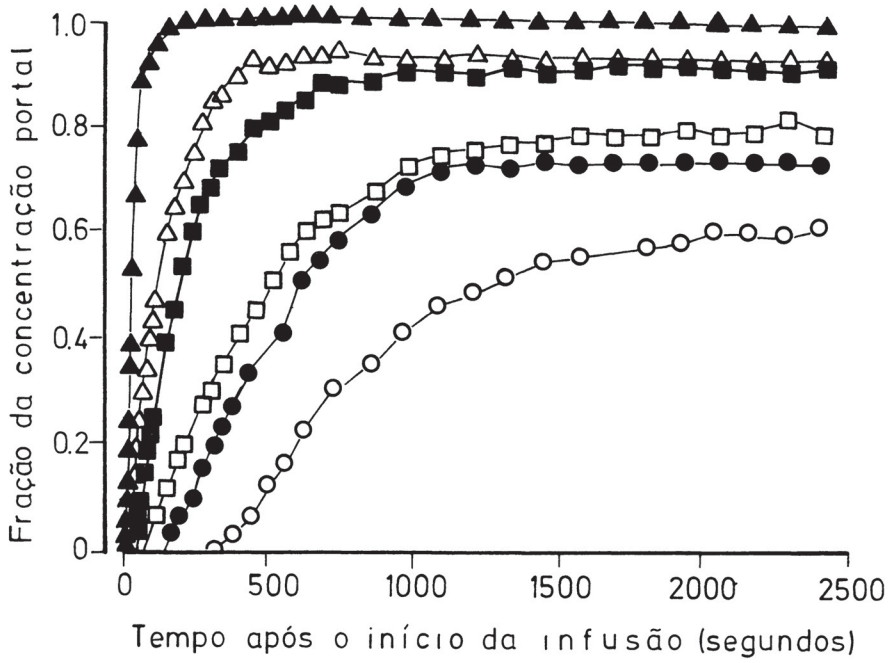

Figura 25. ***Experimentos de diluição de indicadores múltiplos com concentrações variáveis de ácido niflúmico e albumina, mas com idênticas concentrações de ácido niflúmico livre na veia porta.*** Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) contendo albumina em diferentes concentrações. Acido niflúmico (diversas concentrações) e água triciada foram infundidos simultaneamente. As concentrações de albumina e ácido niflúmico foram fixadas de modo a manter constante e igual a 20 μM a concentração portal de ácido niflúmico livre. O perfusado venoso foi fracionado em frações entre 0,5 segundo e 1 minuto. A água triciada foi contada num cintilador para amostras líquidas. O ácido niflúmico foi extraído com acetato de etila e dosado espectrofotometricamente a 287 nm. As frações do arterial que apareceram no perfusado venoso foram representadas contra o tempo após o início da infusão. Apenas uma curva da água triciada está representada (▲——▲). As concentrações portais de albumina e ácido niflúmico foram as seguintes: ausência de albumina e ácido niflúmico 20 μM, o——o; albumina 5 μM e ácido niflúmico 35,5 μM, ●——●; albumina 10 μM e ácido niflúmico 51,3 μM, □——□; albumina 20 μM e ácido niflúmico 81,5 μM, ■——■; e albumina 50 μM e ácido niflúmico 176 μM, △——△.

albumina (até 50 μM). Para calcular as proporções, utilizou-se as constantes de dissociação determinadas anteriormente e o algoritmo de **Abumrad** *et al.* (1981), *i.e.*, a equação [3]. A Figura 25 revela que o espaço de distribuição do ácido niflúmico diminui à medida que a concentração total aumenta. A fração transformada também decresce. Todas as curvas do ácido niflúmico na Figura 25 estão situadas à direita da curva da [^{3}H]água, mesmo com albumina 50 μM e ácido niflúmico 176,68 μM, quando o grau de ligação é igual a 90%.

A Figura 26 mostra o resultado de um experimento representativo no qual a influência do octanoato sobre o comportamento do ácido niflúmico foi estudado. Octanoato, um ácido graxo de cadéia média, é mais solúvel em água do que ácidos graxos de cadeia longa e pode ser infundido na ausência de albumina. A exclusão da albumina é importante, pois além dela mesma influir no espaço de distribuição, há ainda a possibilidade de o ácido graxo e o ácido niflúmico influirem mutuamente na ligação à proteína. Isto tornaria a interpretação dos resultados bem mais difícil. A Figura 26 revela que octanoato 0,5 mM diminui tanto o espaço de distribuição como também a fração transformada, pois na sua presença a curva do ácido niflúmico está deslocada para a esquerda e para cima em relação ao controle. A ação do octanoato não pôde ser aumentada elevando a sua concentração.

3.3.2. *Análise matemática das curvas de diluição do ácido niflúmico*

Pode-se assumir, como uma primeira hipótese ao menos, que os eventos que ocorrem no fígado durante a infusão de ácido niflú-

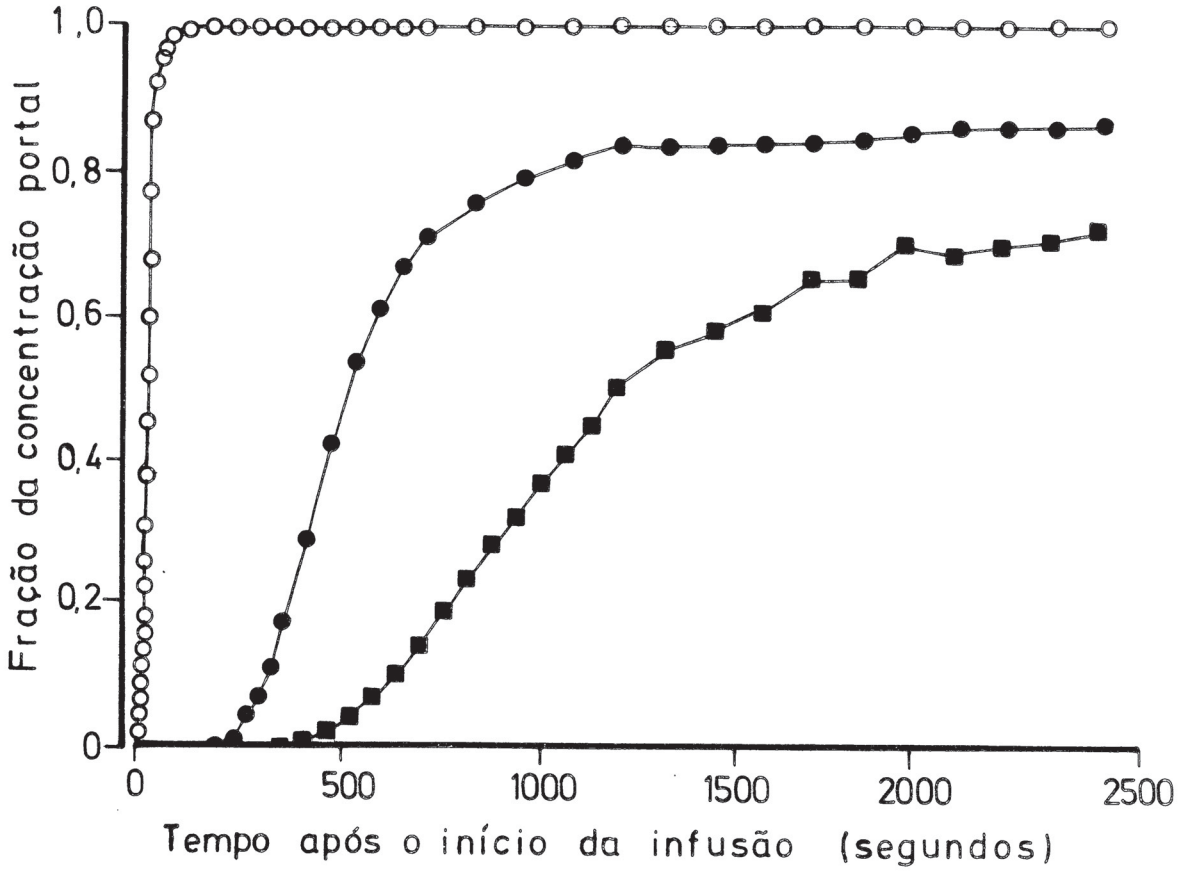

Figura 26. ***Efeito do octanoato sobre a curva de diluição do ácido niflúmico.*** Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) na ausência de albumina. Acido niflúmico (20 μM) e água triciada foram infundidos simultaneamente na ausência (■——■) ou na presença de octanoato 0,5 mM (●——●). O perfusado venoso foi fracionado em frações entre 0,5 segundo e 1 minuto. A água triciada (o——o) foi contada num cintilador para amostras líquidas. O ácido niflúmico foi extraído com acetato de etila e dosado espectrofotometricamente a 287 nm. As frações do arterial que apareceram no perfusado venoso foram representadas contra o tempo após o início da infusão.

mico são similares aos que ocorrem durante a infusão de outras substâncias lipofílicas tais como, palmitato (**Goresky** *et al.*, 1978; **Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992), octanoato (**Bracht** *et al.*, 1990) e monoálcoois (**Goresky** *et al.*, 1983). A Figura 27 mostra uma adaptação de um esquema que foi previamente usado para

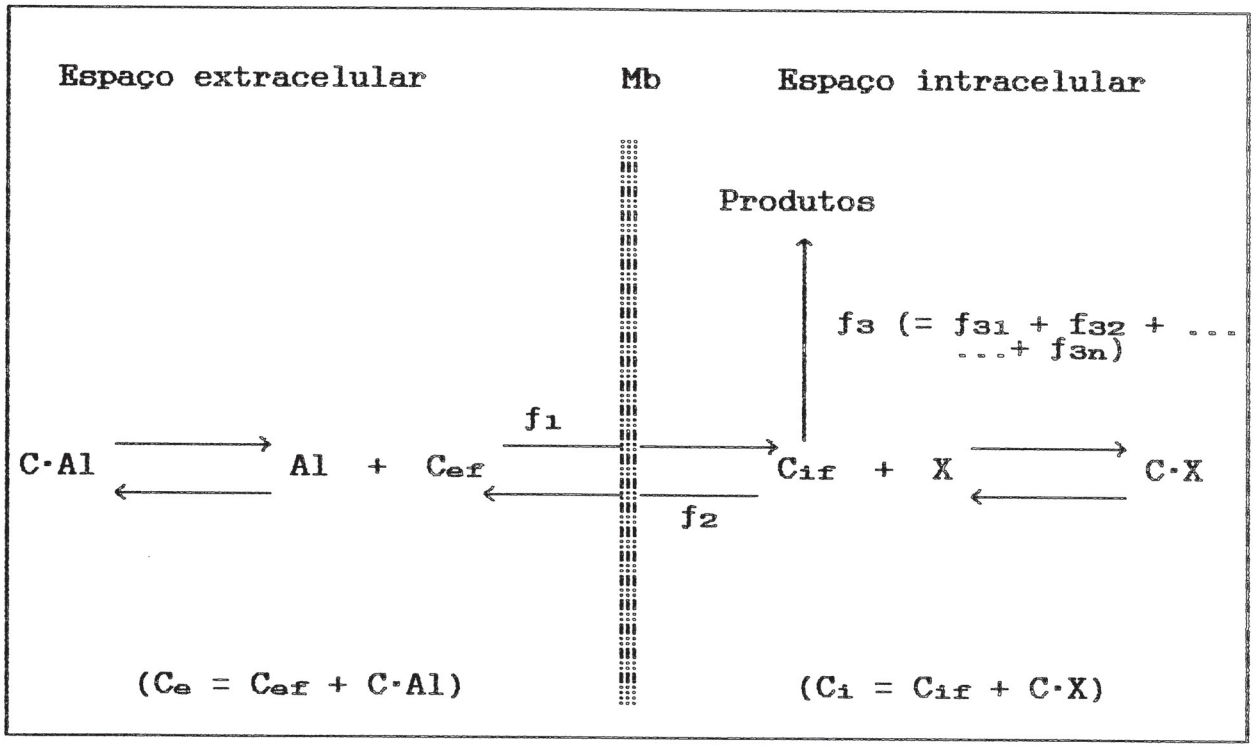

Figura 27. ***Representação esquemática dos possíveis eventos que ocorrem durante a infusão de ácido niflúmico no fígado.*** O ácido niflúmico pode existir na forma livre (não-ligada) tanto no espaço extracelular (C_{ef}) como no espaço intracelular (C_{if}). A forma livre é o substrato para as enzimas intracelulares responsáveis pela biotransformação. Todas as constantes de velocidade para biotransformação, *i.e.*, f_{31}, f_{32}, ... f_{3n}, são somadas como f_3. Essas constantes de velocidade são de pseudo primeira ordem. A forma livre permeia a membrana celular (Mb) nas duas direções, sendo f_1 e f_2 as constantes de velocidade. Extracelularmente, o ácido niflúmico liga reversivelmente à albumina (Al). No espaço intracelular a droga liga a componentes intracelulares (X). No caso de distribuição limitada pelo fluxo, as parâmetros de velocidade para permeação, f_1 e f_2, e as velocidades de dissociação dos complexos tendem ao infinito.

descrever o transporte e o metabolismo de palmitato no fígado em perfusão (**Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992). Os eventos esquematizados na Figura 27 são o mínimo que se pode esperar para ânions lipofílicos que se ligam à albumina (**Tiribelli** *et al.*, 1990). De acordo com o esquema, o ácido niflúmico liga-se à albumina (Al) no espaço extracelular formando o complexo C·Al e complexos de ordem superior. Assume-se que a droga também se liga intracelularmente a proteínas ou membranas (X) formando o complexo C·X e possivelmente também complexos de ordem superior. A ligação intracelular de substâncias lipofílicas é um fenômeno bem documentado (**Cooper** *et al.*, 1987; **Tiribelli** *et al.*, 1990). As formas livres extra- e intracelulares, C_{ef} e C_{if} respectivamente, permeiam a membrana celular (Mb) nas duas direções, sendo f_1 e f_2 as respectivas constantes de velocidade. As formas livres são constantemente regeneradas pela dissociação dos complexos. Uma análise matemática dos dados obtidos com ácido niflúmico pode ser feita através do modelo espaço-distribuído com tempos de trânsito sinusoidais variáveis proposto por Goresky e colaboradores (**Goresky**, 1963; **Goresky** *et al.*, 1970). Este modelo tem provado sua utilidade também no estudo do transporte de substâncias lipofílicas como palmitato (**Goresky** *et al.*, 1978; **Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992), octanoato (**Bracht** *et al.*, 1990) e monoálcoois (**Goresky** *et al.*, 1983). Quando analisado nos termos desse modelo, as formas e as posições das curvas do ácido niflúmico em relação às da [^{3}H]água sugerem fortemente uma distribuição limitada pelo fluxo para a droga. Isto quer dizer, que todas as constantes de velocidade, exceto f_3, tendem ao infinito e não podem ser determinadas. Distribuição limitada pelo fluxo pressupõe equilíbrio entre os espaços intra- e extracelular

em qualquer ponto ao longo dos sinusóides (**Goresky** *et al.*, 1983). Este tipo de comportamento é sugerido pelo fato das curvas do ácido niflúmico aparecerem sempre retardadas e inteiramente deslocadas para a direita em relação às curvas da [^{3}H]água. Sabe-se que a água sofre distribuição dependente do fluxo no fígado (**Goresky**, 1963). Curvas de diluição de substâncias tais como palmitato, cuja distribuição não é limitada pelo fluxo, correm, especialmente no início, à esquerda da curva da água triciada (**Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992).

Para estas considerações qualitativas convém procurar algum apoio quantitativo. Considere-se, por isto, uma substância cuja distribuição hepática, num dado espaço, é limitada pelo fluxo e que sofre transformação metabólica irreversível neste espaço. Foi demonstrado, teórica e experimentalmente, que a resposta do fígado a um pulso (injeção única) de tal substância (Q´[t]) pode ser descrita pela equação abaixo (**Goresky**, 1964; **Goresky** *et al.*, 1970; **Goresky** *et al.*, 1983):

$$Q'(t) = f(t)\cdot\exp[-k_3(t - t_o)] \qquad [8]$$

Na equação [8] t representa o tempo após a injeção, t_o o tempo de trânsito pelos grandes vasos (mais o sistema de tubos antes e depois do fígado até o ponto de coleta das amostras) e k_3 a constante de metabolização. A função f(t) representa a distribuição de frequência dos tempos de trânsito pelos sinusóides. Esta distribuição de frequência pode ser obtida experimentalmente injetando simultaneamente uma referência que ocupe o mesmo espaço que a substância em estudo, mas que não seja metabolizada. No caso da sulfobromoftaleína, que é removida irreversivelmente do espaço

extracelular, a referência adequada é uma substância que se distribua no espaço extracelular (albumina, por exemplo; **Goresky**, 1964). Para o etanol, a referência adequada é a água triciada, que se distribui de modo limitado pelo fluxo em todo o espaço aquoso do fígado (**Goresky** *et al.*, 1983).

A equação [8] descreve a resposta a um pulso (injeção única). No caso da infusão contínua, a resposta é a integral da equação [8] (**Meier** e **Zierler**, 1954; **Goresky** *et al.*, 1970):

$$Q(t) = \int_{t_0}^{t} f(t)\cdot\exp[-k_3(t - t_0)]\,dt \qquad [9]$$

A função de distribuição de frequência de tempos de trânsito f(t) pode ser obtida tomando a derivada primeira da curva de diluição de uma substância que ocupe o mesmo espaço que a substância metabolizada e que tenha sido infundida simultaneamente. Isto pode revelar-se impossível, especialmente quando o espaço de distribuição da substância em estudo, como parece ser o caso do ácido niflúmico, varia com a concentração. Uma referência adequada, no entanto, pode ser gerada a partir da curva de diluição de outro indicador que também sofra distribuição limitada pelo fluxo. Foi demonstrado que as curvas de diluição resultantes de um pulso (injeção única) de substâncias que se distribuem de modo limitado pelo fluxo relacionam-se umas com as outras por apenas uma razão de espaços (**Goresky** *et al.*, 1970). Se (1 + Φ) é esta razão de espaços, a curva de diluição da água triciada resultante de um pulso (injeção única), ou a derivada primeira da curva de diluição obtida numa infusão contínua ($Q'_{água}[t]$), pode ser transformada como segue (**Goresky** *et al.*, 1970; **Bracht** *et al.*, 1981):

$$Q'_n(t) = f(t) = \frac{1}{1 + \Phi} Q'_{água}\left[\frac{(t - t_o)}{1 + \Phi} + t_o\right] \quad [10]$$

A curva transformada da água triciada, $Q'_n(t)$, pode ser obtida alterando a escala de tempo (corrigida por t_o) e a amplitude pelo mesmo fator $(1 + \Phi)$. A substituição do valor de $f(t)$ na equação [9] resulta na expressão que, teoricamente, descreve o comportamento do ácido niflúmico:

$$Q_{nif}(t) = \int_{to}^{t} \frac{1}{1 + \Phi} Q'_{água}\left[\frac{(t - t_o)}{1 + \Phi} + t_o\right] \cdot \exp[-k_3(t - t_o)]\, dt \quad [11]$$

Na equação [11], $Q_{nif}(t)$ é a curva de diluição do ácido niflúmico, expressa como fração do arterial como nas Figuras 24-26. A soma $(1 + \Phi)$ representa a razão do espaço aparente do ácido niflúmico para espaço aquoso do fígado. Por "espaço aparente" entenda-se aqui a sua definição já clássica aplicada ao fígado em perfusão isolada: o espaço aparente do ácido niflúmico seria o volume de perfusado (tampão Krebs/Henseleit) necessário para dissolver a mesma quantidade de ácido niflúmico retida no fígado em determinadas condições (**Gibaldi** e **Perrier**, 1982). Quando Φ é zero, o espaço de distribuição do ácido niflúmico é igual ao espaço aquoso. O parâmetro Φ é, portanto, a razão do espaço extra do ácido niflúmico para o espaço aquoso. Em termos mais rigorosos, o termo $\frac{1}{1 + \Phi} Q'_{água}\left[\frac{(t-t_o)}{(1+\Phi)} + t_o\right]$ é a derivada primeira da curva de diluição da [^{3}H]água no tempo $t' = [(t-t_o)/(1+\Phi) + t_o]$, dividi-

da pelo fator 1+Φ. A constante de velocidade mensurável, k_3, é uma constante composta, de pseudo primeira ordem, que pode ser definida como o produto da constante de velocidade de biotransformação do ácido niflúmico livre com a fração de ácido niflúmico livre no espaço intracelular, *i.e.*, $k_3 = f_3 \cdot (C_{1f}/C_1)$, C_1 sendo a concentração intracelular total, livre mais ligada, referida ao espaço aquoso intracelular (ver Figura 27). A constante de velocidade f_3 é a somatória de todas as constantes de velocidade das reações individuais de biotransformação, as quais por seu turno, são funções dos parâmetros cinéticos dos sistemas enzimáticos pertinentes (**Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992).

Os parâmetros Φ, k_3 e t_o podem ser determinados ajustando a equação [11] às curvas experimentais do ácido niflúmico por um método não-linear de mínimos quadrados, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Isto foi feito para um grande número de experimentos. Em geral, boa concordância foi encontrada entre teoria e experimento, significando que a passagem do ácido niflúmico através da membrana celular, bem como a dissociação dos complexos com a albumina, é realmente muito rápida a ponto de ser limitada apenas pelo fluxo. A Figura 28 mostra um exemplo e ilustra alguns aspectos dos cálculos. Os dados experimentais mostrados na Figura 28 foram obtidos com albumina 5 μM e ácido niflúmico 35,5 μM no perfusado portal. Na Figura 28A, os pontos experimentais (●——●) são comparados com a curva teórica (——), calculada com os valores otimizados de Φ, k_3 e t_o. Se k_3 é colocado como igual a zero, a curva calculada com os valores otimizados de Φ e t_o representa a curva da referência apropriada para o ácido niflúmico, conforme definido acima. Esta curva (---) está muito próxima da curva do ácido niflúmico no início, mas

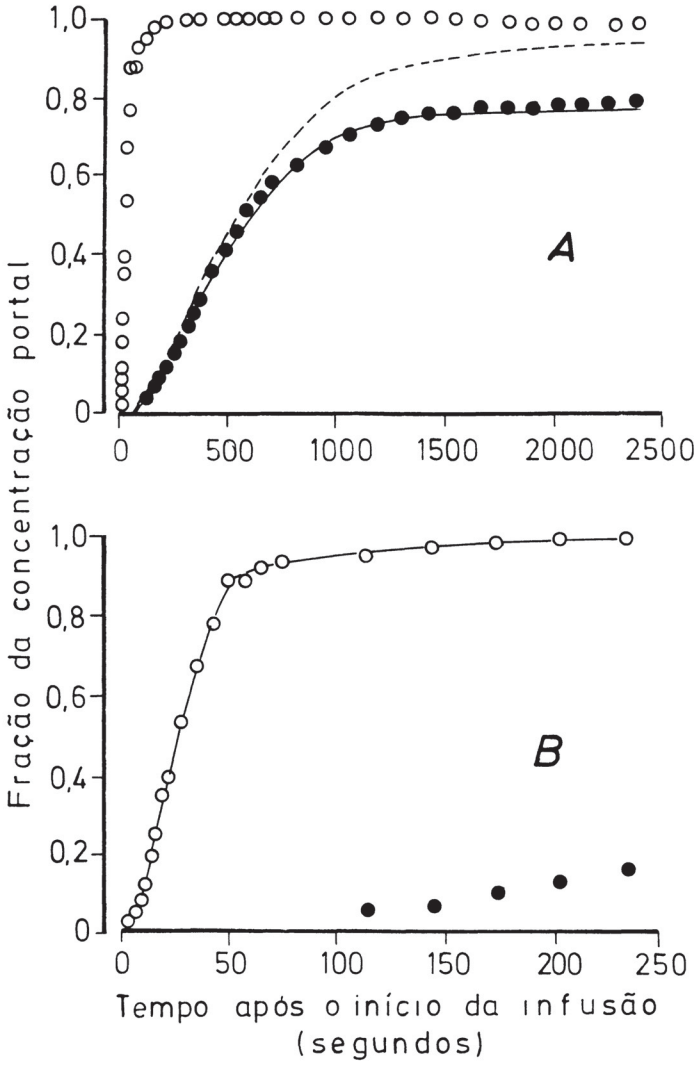

Figura 28. ***Ajuste da equação [11] aos dados experimentais.*** As condições experimentais foram ácido niflúmico 35,5 μM e albumina 5 μM. Estão representados os dados experimentais da [^{3}H]água (o——o) e do ácido niflúmico (●——●). A curva contínua no gráfico **A** (——) foi calculada com valores otimizados dos parâmetros: t_o = 3,578 segundos; k_3 = 3,21 · 10^{-4} segundo^{-1}; e Φ = 22,38 ml do espaço aparente extra do ácido niflúmico/espaço aquoso. O coeficiente de correlação foi igual a 0,998. A curva tracejada no gráfico **A** (----) foi calculada com os mesmos valores dos parâmetros, mas com k_3 = 0. A curva contínua no gráfico **B** foi calculada com Φ e k_3 iguais a zero e com t_o = 3,578 segundos.

afasta-se dela progressivamente em função do tempo e tende assintoticamente para a unidade. A Figura 28B mostra a curva da [^{3}H]água e os primeiros pontos da curva do ácido niflúmico com escala do tempo muito expandida comparado com a Figura 28A. A linha contínua ligando os pontos experimentais da [^{3}H]água foi calculada com o valor otimizado de t_o, mas com Φ e k_3 iguais a zero. A concordância entre os pontos experimentais e a curva calculada evidencia apenas a correção dos procedimentos numéricos utilizados, pois se Φ e k_3 são nulos, a curva transformada da [^{3}H]água terá que resultar exatamente na própria curva da [^{3}H]água, a menos que haja erros nas derivações, integrações e interpolações numéricas realizadas. Esta precaução foi tomada na avaliação de cada experimento.

3.3.3. *Espaços de distribuição e transformação metabólica*

Nas Figuras 29 e 30, os parâmetros obtidos ajustando a equação [11] aos dados experimentais, $1+\Phi$ e k_3, foram representados em função da concentração portal do ácido niflúmico. A Figura 29 mostra os dados da série de experimentos nos quais a concentração portal do ácido niflúmico foi variada na ausência da albumina (Figura 24); e, a Figura 30 ilustra a série de experimentos realizados com concentração fixa de ácido niflúmico livre (Figura 25). Além de Φ e k_3, as Figuras 29 e 30 também mostram as velocidades de transformação metabólica, calculadas a partir da diferença porto-venosa sob condições de estado estacionário e expressas como $nmol \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$. Todos os dados experimentais são a média de no mínimo 3 e no máximo 7 experimentos.

Na ausência de albumina circulante, as razões do espaço do

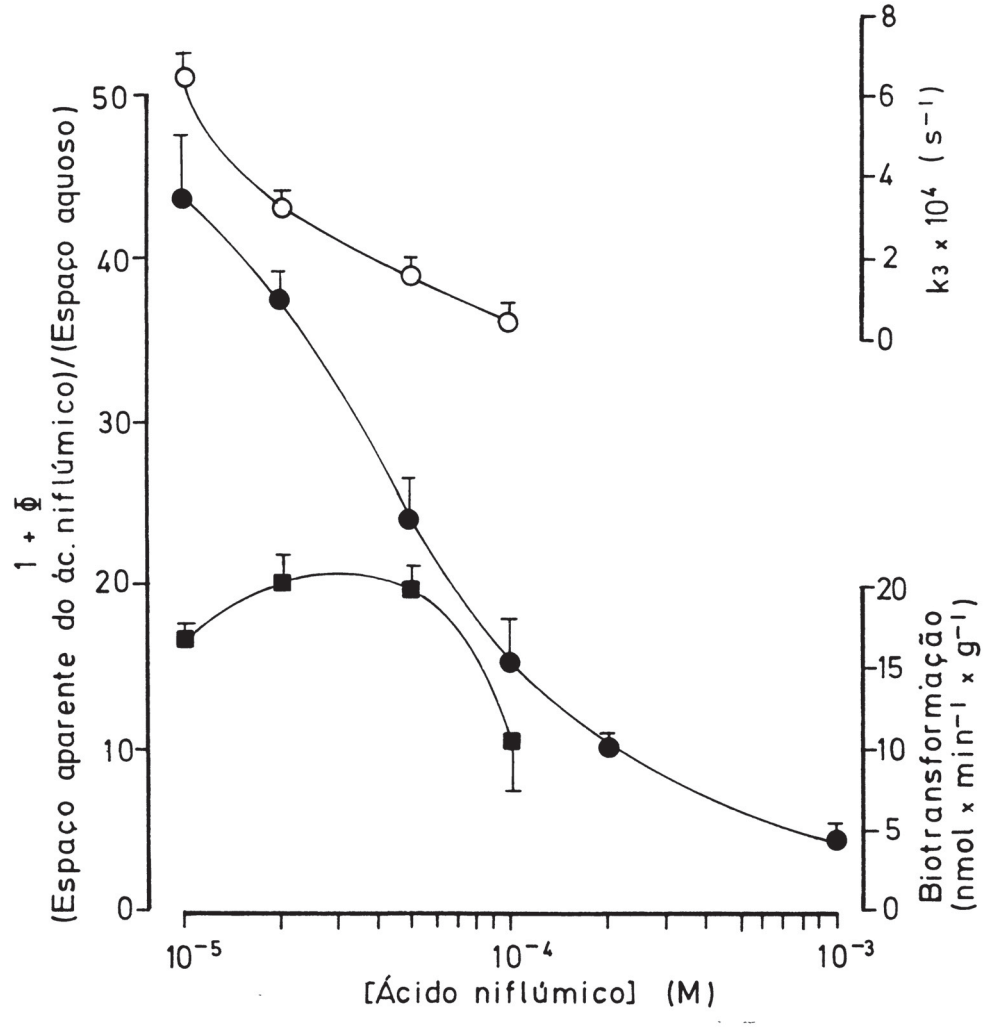

Figura 29. ***Parâmetros derivados de experimentos de diluição de indicadores múltiplos com concentrações variáveis de ácido niflúmico e sem albumina no líquido de perfusão.*** Os parâmetros Φ e k_3 foram obtidos fazendo um ajuste de mínimos quadrados da equação [11] aos dados de experimentos do tipo mostrados na Figura 24. A velocidade de biotransformação foi calculada da diferença porto-venosa de estado estacionário. Legendas: 1 + Φ, ●——●; k_3, o——o; e velocidade de biotransformação, ■——■. Cada ponto é a média de 3-7 experimentos; as barras horizontais são os erros padrões das médias.

ácido niflúmico para o da água (1+Φ) são muito altas em baixas concentrações da droga (Figura 29). Para o ácido niflúmico 10 μM na veia porta a razão é igual a 43,5±4,7 (n=5). No entanto, a razão decresce progressivamente com concentrações crescentes. A 1,0 mM seu valor está reduzido para 4,37±0,6 (n=3). A constante de velocidade para transformação metabólica (k_B) também decresce com o aumento na concentração. Para concentrações acima de 100 μM ela não pode mais ser determinada. Mesmo a 100 μM o erro padrão da média é quase igual ao próprio valor. Esse decréscimo nos valores da constante de velocidade em função dos aumentos na concentração são esperados por causa da provável saturação dos sistemas enzimáticos responsáveis pela transformação metabólica (**Thurman** e **Kauffman**, 1980). Que isto é realmente o caso é revelado pelas velocidades de metabolização calculadas independentemente e também mostradas na Figura 29. Uma análise dessa curva indica, no entanto, que além da saturação, uma espécie de inibição por substrato se manifesta. Na faixa entre 50 e 100 μM a velocidade de biotransformação decresce. Nos experimentos feitos em concentrações acima de 100 μM esta tendência se mantém, e embora não se possa dizer com precisão o valor, pode-se dizer ao menos que ele não é maior do que aquele encontrado a 100 μM. O valor máximo de velocidade de biotransformação, medido a 50 μM, é igual a 19,6± 1,5 nmol · min^{-1} · g^{-1} (n=4). O fenômeno semelhante a uma inibição por substrato é provavelmente devido aos efeitos metabólicos da droga, *i.e.*, à inibição da fosforilação oxidativa já demonstrada e discutida anteriormente, já que as reações de conjugação são dependentes de energia (**Thurman** e **Kauffman**, 1980; **Aw** e **Jones**, 1982). Isto é corroborado pelo fato do octanoato, um desacoplador nas altas concentrações utilizadas (**Scholz** *et al.*,

1984), também diminuir a velocidade de metabolização da droga (compare 20 μM na Figura 24 com a curva da Figura 26). Existe também a possibilidade de que o ácido niflúmico, a exemplo do que faz em eritrócitos (**Scuteri** *et al.*, 1987), iniba o transporte de sulfato. Se esta inibição for muito forte, ela pode reduzir a disponibilidade intracelular de sulfato para conjugação.

A Figura 30 mostra os parâmetros calculados para a série de experimentos com ácido niflúmico portal livre constante. São mostrados também os graus de ligação da droga à albumina do líquido de perfusão. A razão de espaços 1+Φ diminui progressivamente à medida que o grau de ligação aumenta de zero para 90%. Com 90% de ligação, no entanto, a razão de espaços ainda é igual a 5,1±0,7 (n=3). As velocidades de biotransformação mudam muito pouco. Há uma tendência ascendente, mas sem significância estatística, como revelado por uma análise da variância (p = 0,096). A constante de velocidade para biotransformação também apresenta pequenas variações, mas estatisticamente elas não são significativas (p = 0,075).

Conforme mostra a Figura 26 o octanoato influi na curva de diluição do ácido niflúmico. Em termos quantitativos, o octanoato 0,5 mM reduziu o parâmetro 1+Φ de 37,66±1,47 (controle com ácido niflúmico 20 μM) para 18,3±1,3, uma redução, portanto, de 51,4%.

3.3.4. *Concentrações intra- e extracelulares*

A concentração intracelular do ácido niflúmico (C_i) pode ser determinada a partir de Φ e da concentração extracelular (C_e). Uma expressão relacionando C_i e Φ pode ser derivada das relações já conhecidas entre (1) tempos de trânsito (**Meier** e **Zierler**,

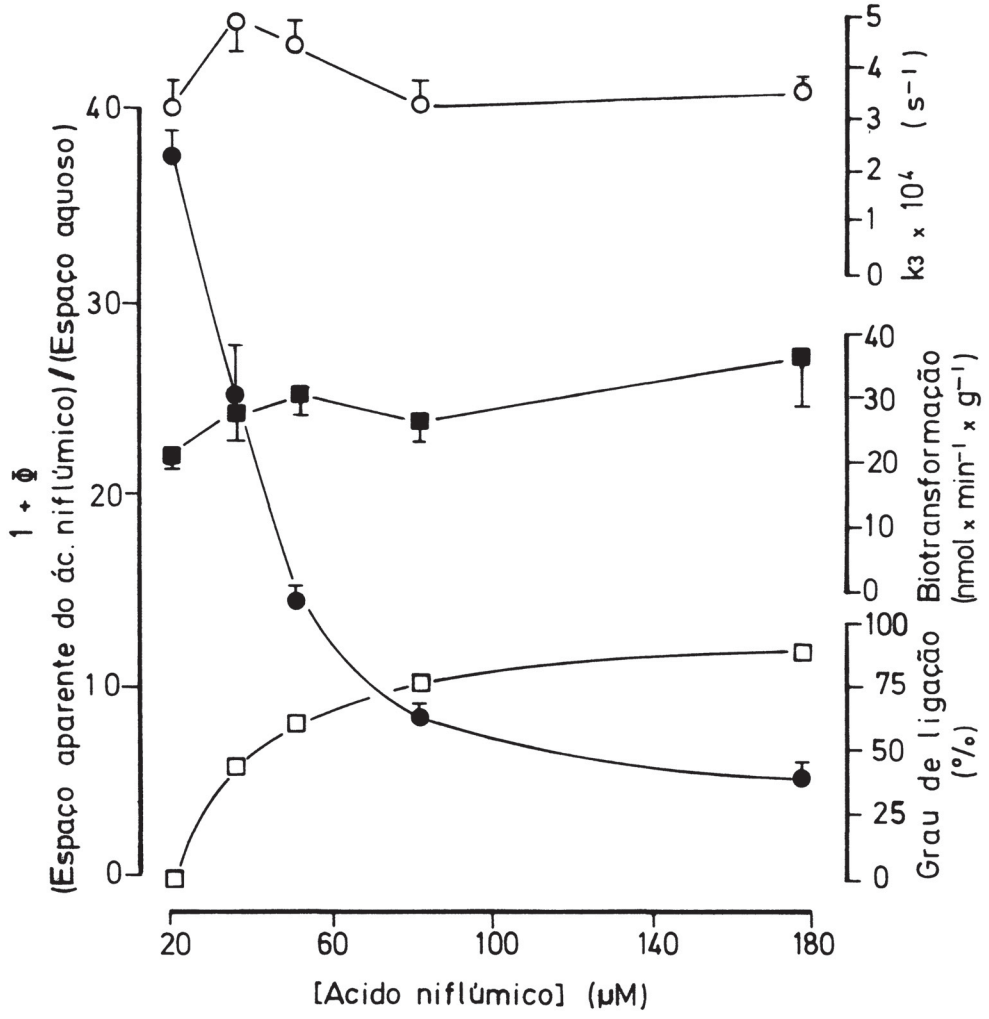

Figura 30. ***Parâmetros derivados de experimentos de diluição de indicadores múltiplos com concentrações variáveis de ácido niflúmico e albumina de modo a manter constante a concentração portal de ácido niflúmico não-ligado (20 μM).*** Os parâmetros Φ e k_3 foram obtidos fazendo um ajuste de mínimos quadrados da equação [11] aos dados de experimentos do tipo mostrados na Figura 25. A velocidade de biotransformação foi calculada da diferença porto-venosa de estado estacionário. Legendas: 1 + Φ, ●——●; k_3, o——o; velocidade de biotransformação, ■——■; grau de ligação do ácido niflúmico no perfusado, □——□. Cada ponto é a média de 3-4 experimentos; as barras são os erros padrões das médias.

1954), (2) constantes de velocidade (**Ishii** *et al.*, 1987) e razões de espaços (**Goresky** *et al.*, 1983). O parâmetro (1+Φ) também pode ser escrito em termos da razão entre o tempo médio de trânsito de uma referência apropriada para o ácido niflúmico (curva transformada da água), $\bar{t}_n$, e o tempo de trânsito da água triciada, $\bar{t}_w$ (**Meier** e **Zierler**, 1954):

$$\frac{\bar{t}_n}{\bar{t}_w} = 1 + \Phi \qquad [12]$$

Os tempos de trânsito são considerados corrigidos para o tempo de trânsito nos grandes vasos e nos tubos da aparelhagem de perfusão (t_o). A razão do espaço aquoso intracelular para o espaço extracelular, θ', pode ser definida como (**Bracht** *et al.*, 1980):

$$\frac{\bar{t}_w - \bar{t}_r}{\bar{t}_r} = \theta' \qquad [13]$$

Na equação [10], $\bar{t}_r$ é o tempo de trânsito de um indicador para o espaço extracelular, como por exemplo [^{14}C]sacarose (**Bracht** *et al.*, 1980). Adicionalmente, a seguinte relação entre as constantes de velocidade para influxo e efluxo e os tempos de trânsito foi demonstrada como sendo válida (**Bracht** *et al.*, 1981; **Ishii** *et al.*, 1987):

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{\bar{t}_n - \bar{t}_r}{\bar{t}_w - \bar{t}_r} \qquad [14]$$

Na equação [11], k_1 e k_2 são constantes de velocidade compostas, de pseudo primeira ordem, para o influxo e o efluxo, respectivamente. Por analogia com k_3, elas são iguais $f_1 \cdot (C_{ef}/C_e)$

e $f_2 \cdot (C_{1f}/C_1)$, respectivamente (veja Figura 26). As equações [12] a [14] podem agora ser combinadas e resolvidas para k_1/k_2. Fazendo isto, obtém-se:

$$\frac{k_1}{k_2} = 1 + \Phi + \Phi/\theta' \qquad [15]$$

É fácil de deduzir da equação [15] que $k_1 = k_2$ quando $\Phi = 0$, *i. e.*, o espaço aparente do ácido niflúmico é igual ao espaço aquoso quando $k_1 = k_2$. Deve-se notar também que $\Phi > 0$ somente é possível quando k_1 é maior que k_2. A razão k_1/k_2, por outro lado, corresponde a C_1/C_e no equilíbrio (**Ishii** *et al.*, 1987; **Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992). Consequentemente, pode-se escrever também:

$$C_1 = C_e \cdot (1 + \Phi + \Phi/\theta') \qquad [16]$$

A concentração intracelular total de equilíbrio, C_1, pode portanto ser calculada desde que Φ, θ' e Ce sejam conhecidos. Como a permeação é muito rápida comparada com a biotransformação parece razoável assumir que condições de equilíbrio ou quase-equilíbrio predominam entre os espaços intra- e extracelular ao longo dos sinusóides, já que para condições de não-equilíbrio a relação válida é (**Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992):

$$C_1 = \frac{k_1}{k_2 + k_3} C_e \qquad [17]$$

Como no caso do ácido niflúmico $k_2 >> k_3$, chega-se às relações acima.

A concentração extracelular, evidentemente, decresce ao

longo dos sinusóides a menos que o metabolismo seja muito pequeno, como por exemplo com ácido niflúmico portal 1 mM. Quando um gradiente de concentração existe ao longo do sinusóide, como por exemplo com ácido niflúmico portal 10 μM, somente um valor médio pode ser determinado para C_e. Evidentemente, a utilização de valores médios para C_e nos cálculos conduz também a valores médios para C_i. Isto tudo pode produzir algumas distorções, os erros sendo mais pronunciados quando as diferenças porto-venosas são altas. A esse respeito, **Goresky** *et al.* (1983) propuseram uma média logarítmica para C_e, que é válida desde que a diferença porto-venosa não seja muito alta. É necessário acrescentar que, a C_i calculada através da equação [16] estará referida ao espaço aquoso intracelular. Isto, no entanto, não significa que a droga esteja presente somente como soluto livre no meio aquoso da célula.

A validade da equação [16] e dos postulados que levaram à sua dedução pode ser testada de maneira simples. C_i deveria aumentar à medida que C_e é aumentado na série experimental realizada na ausência de albumina no perfusado (Figuras 24 e 29), mas C_i não deveria variar quando C_e é aumentado nos experimentos nos quais a concentração portal livre de ácido niflúmico foi mantida constante (Figuras 25 e 30). Isto é uma consequência do fato de que apenas a forma livre, não-ligada a proteínas, permeia a membrana celular e da suposição de condições de equilíbrio. Para realizar este teste C_i foi calculada dos diversos valores de Φ e C_e determinados previamente e representado contra C_e na Figura 31A, este último parâmetro em escala logarítmica. Para o parâmetro θ', o valor médio de 1,5 foi utilizado, conforme determinado previamente no Laboratório de Metabolismo Hepático

(**Ishii** *et al.*, 1987). A Figura 31A mostra que quando não há albumina no meio de perfusão (●——●), C_i aumenta com C_e, sendo o primeiro parâmetro sempre maior que o segundo. Num extremo, quando C_e é igual a 6,8 μM, C_i é 483±54 μM. Isto significa um enorme gradiente, aparente ou real, de concentração, C_i/C_e sendo igual a 71,03. Confirma-se a hipótese levantada na *Introdução*, isto é, de que o fígado possui capacidade de concentrar o ácido niflúmico. No outro extremo, com C_e igual a 1,0 mM, C_i é 6,6±1,0 mM e a razão C_i/C_e reduz-se para 6,6. Isto significa que C_i satura à medida que C_e aumenta, um fenômeno que a representação semi-logarítmica da Figura 31A não deixa perceber tão facilmente. Para a série de experimentos nos quais a concentração portal livre de ácido niflúmico foi mantida constante (o——o), por outro lado, C_i é praticamente o mesmo para os diversos valores de C_e (p no teste t de Student é sempre maior que 0,05), o valor médio sendo igual a 1,18±0,058 mM. Este achado confirma a validade das suposições feitas para chegar à equação [16]. Deve-se notar que, em termos rigorosos, as concentrações portais constantes de ácido niflúmico livre não significam concentrações livres constantes ao longo de todo o sinusóide porque a transformação metabólica produz um gradiente ao longo do sinusóide. Este gradiente, no entanto, não é muito pronunciado, conforme revelado pela Figura 31B. Neste gráfico, o valor médio de C_{ef} (concentração livre extracelular) — calculado de acordo com **Goresky** *et al.* (1983) a partir das concentrações livres portal e venosa e assumindo equilíbrio na ligação à albumina — está representado contra a concentração portal total de ácido niflúmico. A concentração portal de ácido niflúmico livre é igual a 20 μM, conforme já mencionado anteriormente para esta série experimental. A

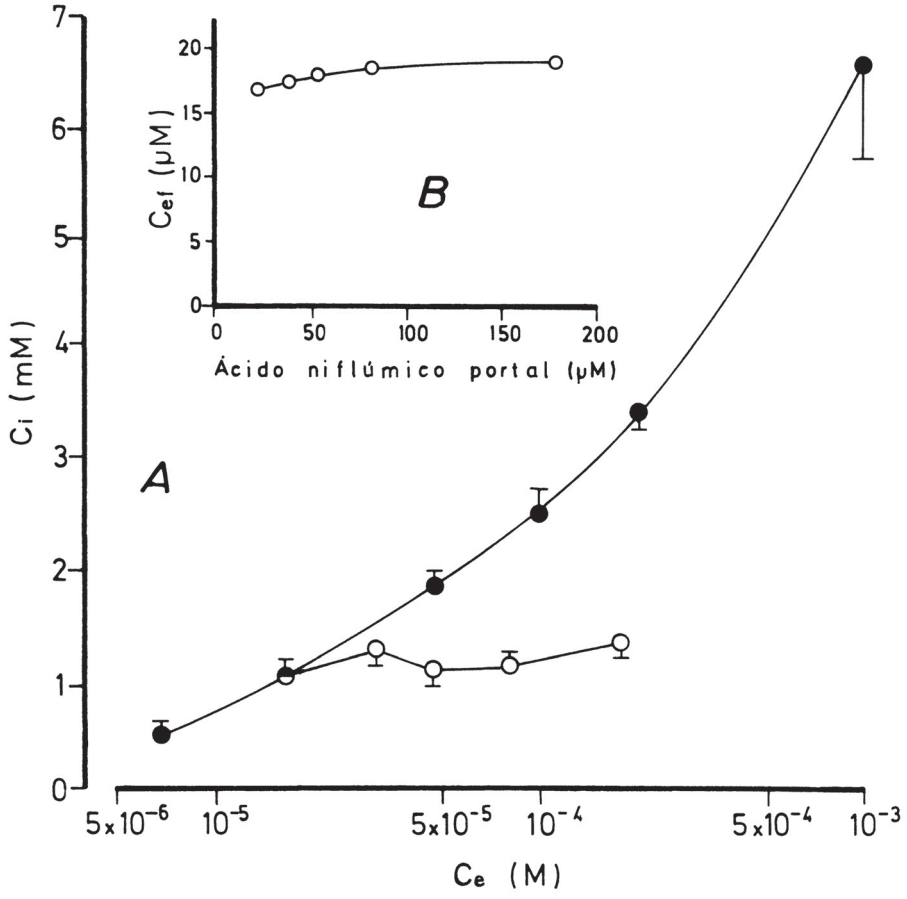

Figura 31. ***Concentração intracelular total de ácido niflúmico (C_i) em função da concentração extracelular média total (C_e, A) e concentração extracelular média livre (C_{ef}) em função da concentração portal total (B).*** C_i foi calculado empregando a equação [16]. C_e é a média logarítmica das concentrações portal e venosa de acordo com **Goresky** *et al.* (1983). C_e está representado numa escala logarítmica. Duas séries de experimentos estão representadas: a série na qual a concentração do ácido niflúmico foi variada na ausência de albumina (●——●); e, a série na qual as concentrações de ácido niflúmico e da albumina foram variadas simultaneamente sem alteração da concentração portal de ácido niflúmico livre (o——o). Para esta última série o gráfico B relaciona a concentração extracelular média livre (C_{ef}) com a concentração total portal.

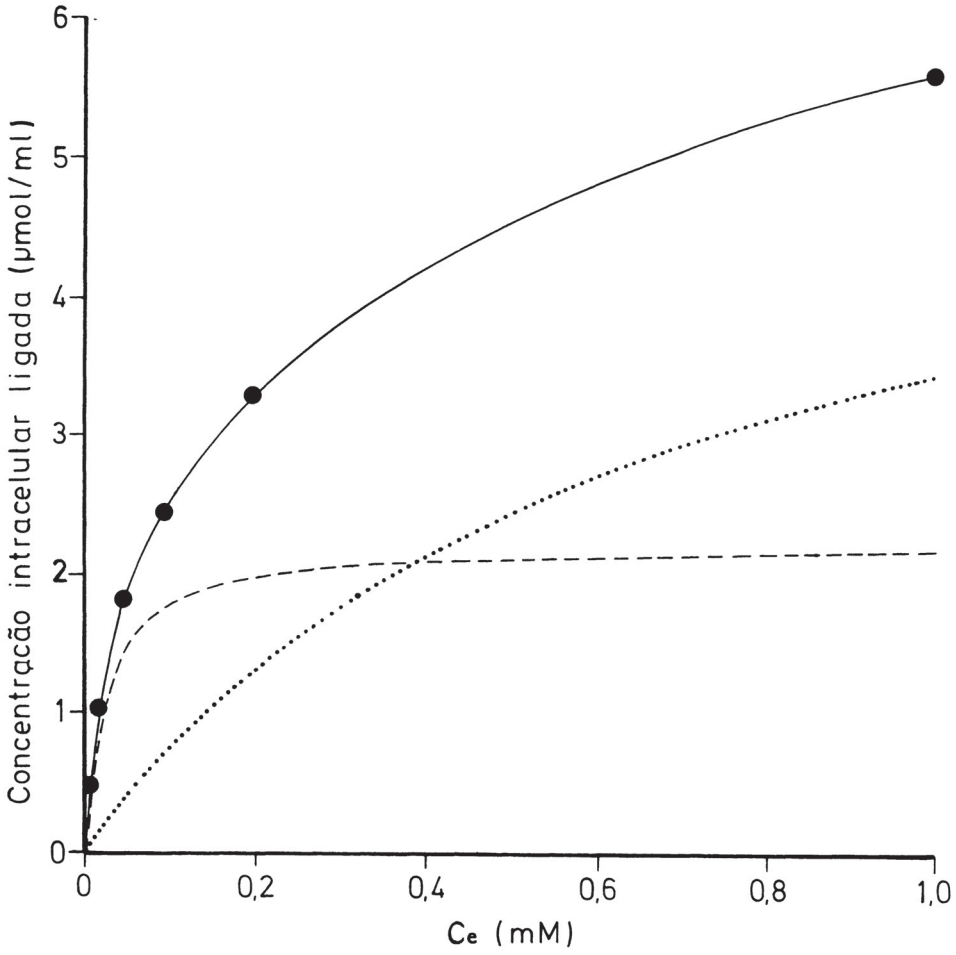

Figura 32. ***Acido niflúmico ligado intracelularmente em função da concentração extracelular da série de experimentos nos quais a concentração do ácido niflúmico foi variada na ausência de albumina.*** O ácido niflúmico ligado intracelularmente foi tomado como (C_i - C_{ef}), C_{ef} sendo igual a C_e na ausência de albumina e assumindo que $C_{if} = C_{ef}$. Maiores detalhes podem ser obtidos no texto. A linha contínua (———) representa o ajuste de mínimos quadrados da equação de Scatchard (equação [4]). No cálculo foram utilizados os parâmetros otimizados constantes da Tabela 5. A linha tracejada (----) representa a curva de ligação aos sítios de alta afinidade e a linha pontilhada (····) representa a curva de ligação dos sítios de baixa afinidade.

concentração livre média (C_{ef}), no entanto, desvia deste valor, a discrepância sendo maior nas concentrações totais menores, conforme revelado pela Figura 31B. A diferença entre os extremos, no entanto, alcança apenas 10%. Esta é uma diferença pequena que não pode ser detectada nos valores calculados de C_i porque as variações esperadas são menores do que o erros experimentais.

3.3.5. *O ácido niflúmico ligado intracelularmente*

Os altos valores de C_i/C_e indicam um gradiente de concentração verdadeiro apenas se f_1 for maior do que f_2, isto é, se o transporte de ácido niflúmico for concentrativo. Há dois argumentos fortes contra esta possibilidade. Em primeiro lugar, a troca do ácido niflúmico entre os espaços intra- e extracelulares é extremamente rápida, conforme revelado pela distribuição limitada pelo fluxo da droga. É impossível para a célula manter um sistema de transporte ativo deste tipo com energia metabólica. Um fígado de rato perfundido com meio livre de substratos exógenos produz entre 7 e 8 μmol de ATP · min^{-1} · g^{-1}. Isto está muito abaixo do que seria necessário. Um bom exemplo para comparações é a velocidade de troca de glicose no fígado de rato. Com glicose 1,0 mM no perfusado — isto para se tomar uma concentração com a qual foram também feitos experimentos com ácido niflúmico — a velocidade de transporte de glicose é igual a 9,26 μmol · min^{-1} · g^{-1} (**Ishii** *et al.*, 1987). A distribuição de glicose, no entanto, está muito longe de ser limitada pelo fluxo. Em segundo lugar, não parece haver dúvidas que o ácido niflúmico realmente diminui a fosforilação oxidativa. Esta ação já é bem pronunciada a 10-20 μM e, portanto, a produção de ATP é

certamente muito menor do que 7-8 μmol · min^{-1} · g^{-1}. Um sistema concentrativo, necessariamente dependente de energia, pode ser portanto descartado. As altas razões C_i/C_e, consequentemente, devem ser causadas pela alta capacidade intracelular de ligação nas condições de nossos experimentos. Se a ligação intracelular é o fator predominante na geração dos altos valores de C_i/C_e, no entanto, deveria ser possível analisá-la pelos métodos clássicos, basicamente aqueles já utilizados no estudo da ligação do ácido niflúmico à albumina (**Fletcher** *et al.*, 1970). Se $f_1 = f_2$, conforme esperado para permeação equilibrativa, então $C_{if} = C_{ef}$, *i.e.*, a concentração intracelular livre é igual à concentração extracelular livre. A concentração ligada pode então ser calculada como igual a $(C_i - C_{ef})$. A representação de $(C_i - C_{ef})$ contra C_{ef} corresponde à clássica isoterma de ligação (**Fletcher** *et al.*, 1970). $(C_i - C_{ef})$ deveria ser uma função saturável de C_{ef} $(=C_{if})$. Os resultados dos cálculos estão representados na Figura 32 para aqueles dados obtidos na ausência de albumina, para os quais evidentemente $C_e = C_{ef}$. Claramente, os pontos experimentais descrevem uma curva de saturação. A clássica equação do modelo de Scatchard (equação [6]) foi ajustada a esta curva por um método não linear de mínimos quadrados. Conforme revela a Figura 32, um modelo de duas classes de sítios de ligação descreve muito bem a curva experimental (——). Os parâmetros obtidos do ajuste constam da Tabela 5. Como os componentes intracelulares aos quais o ácido niflúmico se liga são desconhecidos, não se pode saber o número de sítios por mol do agente ligante. Por isto os números de sítios de ligação de cada classe estão expressos em μmol/ml de espaço intracelular. As constantes de dissociação estão expressas em μM. Os sítios de

TABELA 5

Parâmetros obtidos do ajuste de um modelo de Scatchard com duas classes de sítios de ligação aos dados experimentais na Figura 32. Os dados experimentais foram obtidos conforme descrito no texto e na legenda da Figura 31. Um ajuste não-linear de mínimos-quadrados foi utilizado para ajustar a equação de Scatchard (equação [6]) aos dados experimentais. O número de sítios de ligação de cada classe está expresso como µmol/ml de espaço aquoso intracelular e a constante de dissociação em µM. Os erros padrões dos parâmetros ajustados também são mostrados.

Classe de sitio de ligação	N_1 (±erro padrão) (µmol/ml)	K_1 (±erro padrão) (µM)
1	2,21±0,03	26,10±0,69
2	5,96±0,67	721,90±229,0

alta afinidade têm uma capacidade de ligação menor (2,21 µmol/ml) do que os sítios de baixa afinidade (5,96 µmol/ml). A resolução da isoterma de ligação nas suas classes também é mostrada na Figura 32, o que possibilita uma comparação da contribuição de cada classe em toda a faixa de concentração. Pode-se ver que, na concentração de 200 µM os sítios de alta afinidade (-----) estão completamente saturados, enquanto que os de baixa afinidade estão longe da saturação (·····).

Pode-se agora fazer uma comparação entre a capacidade ligante no meio extracelular e no meio intracelular para o rato. Supondo que todos os sítios de alta afinidade estão ocupados, o que pode ocorrer em concentrações plasmáticas de ácido niflúmico em torno de 0,2 mM (ver Tabela 1), a concentração intracelular

ligada seria de 2,27 µmol por ml. No meio extracelular, se a concentração de albumina for igual a 0,45 µmol/ml como no rato, a concentração ligada de ácido niflúmico será igual a 0,45 µmol/ml vezes o número de sítios de ligação de alta afinidade, isto é 0,45 · 6 igual a 2,7 µmol/ml (ver Tabela 3). No entanto, uma comparação das constantes de dissociação dos sítios de baixa afinidade da albumina (4,98 mM) com as do espaço intracelular (0,72 mM) revela que estes últimos sítios têm afinidade aproximadamente sete vezes maior. Assim sendo, deverá haver muito mais ligação a sítios de baixa afinidade no espaço intracelular do que no espaço extracelular. Se apenas 20% desses sítios estiverem ocupados, a concentração ligada intracelular já atinge 3,36 µmol/ml. Todos esses dados, em que pesem as dificuldades de extrapolação para as condições *in vivo* devido, por exemplo, à competição pelos sítios de ligação com outras substâncias, concordam bastante bem com os dados de **Glasson** *et al.* (1969) sobre a distribuição de ácido niflúmico entre o fígado e o sangue. Conforme mencionado na *Introdução*, a concentração de radioatividade proveniente de [^{14}C]ácido niflúmico no espaço aquoso hepático foi sempre superior à concentração no sangue (**Glasson** *et al.*, 1969). Assim, esse fenômeno não se deve apenas ao fato de o ácido niflúmico ser metabolizado no fígado e sim também, devido à capacidade de ligação da droga apresentada pelas células hepáticas.

4. DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÕES

4.1. O ácido niflúmico como ligante da albumina

O estudo sobre a ligação do ácido niflúmico à albumina foi feito com um objetivo de ordem prática bem definido. Pretendia-se obter os parâmetros de ligação que permitissem calcular as concentrações livre e ligada do ácido niflúmico. Isto, por sua vez, deveria permitir o planejamento de experimentos nos quais as concentrações livre e ligada pudessem ser variadas de acordo com as necessidades específicas de cada protocolo experimental. Pode-se dizer que este objetivo foi atingido. Tanto nos estudos sobre transporte, como também nos estudos sobre os efeitos metabólicos, o conhecimento do grau de ligação para cada condição específica foi de grande utilidade. No que tange aos estudos de transporte pode-se dizer, inclusive, que eles nem poderiam ter sido feitos sem o conhecimento das concentrações livre e ligada do ácido niflúmico.

Não foi feito nenhum experimento para investigar a natureza e os grupos envolvidos nas interações do ácido niflúmico com a albumina, embora estudos com esses objetivos sejam cada vez mais frequentes. Uma questão frequentemente abordada, por exemplo, é se há competição entre as diversas drogas ou entre as drogas e os metabólitos plasmáticos lipofílicos, como por exemplo, os ácidos graxos, questão que também interessa ao ácido niflúmico e derivados. Segundo **Kaneo** *et al.* (1981), os diversos anti-inflamatórios não-esteróides competem entre si. O naproxeno, por exemplo, foi deslocado da albumina por vários anti-inflamatórios

na seguinte ordem decrescente: ácido flufenâmico ≥ flurbiprofen > indometacina > fenilbutazona >> ácido salicílico. Da série, o ácido flufenâmico é um análogo estrutural do ácido niflúmico. De acordo com a Tabela I, ambos apresentam grau semelhante de ligação a proteínas plasmáticas. É possível que o ácido niflúmico ligue, em parte ao menos, aos mesmos sítios na albumina aos quais ligam os demais anti-inflamatórios não-esteróides. Esses sítios parecem coincidir em parte com os sítios de ligação dos ácidos graxos, pois de acordo com **Kaneo** *et al.* (1981) ácidos graxos são também capazes de deslocar o naproxeno, sendo que a capacidade aumenta com o comprimento da cadeia até aos 12 carbonos, decrescendo depois gradativamente. Ao que tudo indica, a ligação dos ácidos **N**-fenilantranílicos (ácidos fenâmicos incluídos) à albumina de soro bovino é governada principalmente por forças hidrofóbicas, provavelmente por interações de Van der Waals entre a fenila e uma área hidrofóbica na proteína. Essas conclusões foram expressas por **Sharples** (1982), ao examinar o efeito de substituintes no grau de ligação dos ácidos **N**-fenilantranílicos à albumina.

4.2. Os efeitos metabólicos

Os efeitos metabólicos do ácido niflúmico observados neste trabalho parecem resultar, predominantemente, da ação que aquele composto exerce sobre o metabolismo mitocondrial, *i.e.*, os efeitos metabólicos são compatíveis com um desacoplamento da fosforilação oxidativa. As observações que apoiam esta conclusão são as seguintes:

(1) O ácido niflúmico aumenta o consumo de oxigênio quando infundido, na presença ou ausência de substratos. Este aumento no consumo de oxigênio se dá a nível da cadeia respiratória, pois pode ser bloqueado totalmente por cianeto. Este fenômeno é comum aos desacopladores em geral (**Soboll** *et al.*, 1984; **Scholz** *et al.*, 1984). Pode haver um decréscimo no consumo de oxigênio em concentrações mais altas, porém, isto também foi observado com mitocôndrias isoladas (**Ishii**, 1982).

(2) Simultaneamente ao aumento do consumo de oxigênio, a síntese de glicose a partir de piruvato, glicerol e frutose é inibida. Esses processos são dependentes de energia e a sua inibição demonstra que o aumento no consumo de oxigênio não é produtivo em termos de síntese de ATP, fato compatível com desacoplamento da fosforilação oxidativa (**Soboll** *et al.*, 1978; **Soboll** *et al.*, 1984).

(3) Associada ainda ao aumento do consumo de oxigênio, há uma ativação de processos citosólicos e anaeróbicos de fosforilação de ADP. Isto ocorre tanto quando o ponto de partida da glicólise é glicose 6-fosfato originada de glicogênio endógeno, como também quando os substratos são frutose (frutólise) ou glicerol. No caso dos aumentos da glicólise ou frutólise há também aumentos nas razões lactato/piruvato. É fato sabido que estes fenômenos são também uma característica de todos os inibidores da fosforilação oxidativa (**Soboll** *et al.*, 1978; **Conaglen** *et al.*, 1984; **Ishii** e **Bracht**, 1986).

(4) Contrariamente à síntese de glicose (neoglicogênese), a sua liberação como resultado da degradação do glicogênio (glicogenólise) é ativada, fenômeno este também comum a inibidores da fosforilação oxidativa, embora o mecanismo ainda não tenha

sido esclarecido (**Soboll** *et al.*, 1978; **Conaglen** *et al.*, 1984; **Ishii** e **Bracht**, 1986). Possivelmente trata-se de uma ativação da fosforilase b (**Conaglen** *et al.*, 1984), causada por alterações nas concentrações de AMP e ATP (**Baron** *et al.*, 1989).

(5) A inibição da síntese de glicose é menor quando há processos citosólicos de fosforilação operando simultaneamente ao processo de síntese (com glicerol e frutose como precursores) em comparação com as condições nas quais a fosforilação oxidativa é a única fonte de nucleotídeos trifosfato (com piruvato como precursor). Com glicerol como substrato, há inclusive uma diminuição, mesmo que pequena, do grau de inibição da síntese de glicose, coincidente com um salto na produção de lactato. Estes fenômenos são compatíveis com uma inibição da síntese de glicose em consequência de um decréscimo na disponibilidade de nucleotídeos trifosfato.

De todos os fenômenos arrolados acima, o argumento mais forte em apoio a uma ação do ácido niflúmico sobre o metabolismo mitocondrial, é a combinação dos efeitos (1) aumento no consumo de oxigênio na cadeia respiratória e (2) inibição da neoglicogênese. Esta combinação de eventos, que também foi encontrada para o ácido mefenâmico (**Suzuki-Kemmelmeier** e **Bracht**, 1989), parece ser uma característica de desacopladores da fosforilação oxidativa (**Soboll** *et al.*, 1978; **Ishii** e **Bracht**, 1986).

Uma ação metabólica devido à inibição da prostaglandina sintetase não foi detectada neste trabalho. A inibição dessa enzima poderia levar a uma inibição da glicogenólise, principalmente se estimulada por hormônios. Não foram feitos experimentos para averiguar isto neste trabalho, porém, **Brass** e **Garrity** (1985a) não encontraram nenhum efeito de anti-inflamatórios

sobre a ação do glucagon e da adrenalina. Como os anti-inflamatórios investigados por **Brass** e **Garrity** (1985a), entre os quais está incluído o ácido meclofenâmico, também ativam a glicogenólise, não parecem promissoras hipóteses sobre uma eventual ação negativa do ácido niflúmico sobre a glicogenólise ativada por hormônios. Isto ainda é reforçado pelas observações mais recentes de **Nascimento** (1992) que, realizando experimentos com o naproxeno, um anti-inflamatório que não tem efeito desacoplador, não detectou nenhuma inibição da glicogenólise, embora esse composto também tenha uma ação inibidora sobre a prostaglandina sintetase como os demais anti-inflamatórios. **Brass** e **Garrity** (1985a) sugeriram que os anti-inflamatórios não-esteróides poderiam ativar a glicogenólise através de uma inibição do transporte ativo de Ca^{2+}, o qual é necessário para manter baixas as concentrações intracelulares. Uma elevação da concentração de Ca^{2+} no citosol parece ocorrer em decorrência da ação de vários hormônios (**Altin** e **Bygrave**, 1985) e também do metotrexato, uma droga anti-câncer (**Yamamoto** *et al.*, 1992). **Suzuki-Kemmelmeier** e **Bracht** (1989) consideraram compatíveis com os seus achados aquela possibilidade, de vez que uma inibição da fosforilação oxidativa acaba afetando sistemas de transporte ativos. **Nascimento** *et al.*, (1993) no entanto, não encontraram nenhuma diferença na ação do ácido niflúmico e do diclofenaco sobre a glicogenólise na presença e na ausência de Ca^{2+} no meio de perfusão, mesmo que as células hepáticas tenham sido depletadas do Ca^{2+} endógeno por sucessivos pulsos de fenilefrina. Não parece, portanto, que o cálcio esteja envolvido, já que a sua presença é dispensável.

Os efeitos do ácido niflúmico parecem correlacionar com a

concentração livre (não-ligada) do composto. Considerando a forma livre apenas, a sua ação metabólica ocorre em concentrações relativamente baixas: com ácido niflúmico livre em torno de 5 e 6 µM já se pode observar ativação do consumo de oxigênio. Neste particular o ácido niflúmico é muito mais potente que o ácido mefenâmico (**Suzuki-Kemmelmeier** e **Bracht**, 1989) e o diclofenaco (**Nascimento** *et al.*, 1993), por exemplo. Os experimentos de **Suzuki-Kemmelmeier** e **Bracht** (1989) foram feitos na faixa de concentrações entre 0,1 e 1,0 mM e com albumina 4,5 µM. A concentração livre era também alta, pois o ácido mefenâmico liga muito menos às proteínas plasmáticas do que o ácido niflúmico (ver *Tabela 1*). **Nascimento** *et al.* (1993) observaram efeitos metabólicos com diclofenaco 500 µM não muito superiores àqueles obtidos com ácido niflúmico 50 µM, uma concentração 10 vezes menor. Estritamente como desacoplador da fosforilação oxidativa no fígado, o ácido niflúmico é comparável ao 2,4-dinitrofenol (**Soboll** *et al.*, 1978), mas inferior à carbonilcianeto *p*-trifluor-metoxifenil-hidrazona (FCCP; **Soboll** *et al.*, 1984).

Pode-se utilizar os dados da *Tabela 1* para alguns cálculos. Os níveis plasmáticos máximos em humanos variam entre 240 e 360 µM; e os graus de ligação às proteínas plasmáticas entre 82 e 98%. Com estes extremos pode-se esperar concentrações livres plasmáticas máximas entre 4,8 e 64,8 µM. A faixa é ampla e 64,8 µM é uma concentração alta na qual o metabolismo celular estará muito prejudicado. Porém, esses valores são máximos, isto é, atingidos somente durante um certo período de tempo. Na maior parte do tempo devem ser menores. Além disto, os efeitos da droga são reversíveis, o que deve minimizar os danos. De qualquer forma, é altamente provável que os efeitos metabólicos observados

neste trabalho para condições *in vitro* possam ocorrer também em muitas condições *in vivo*.

4.3. O transporte e o espaço de distribuição

Convém relacionar os principais resultados obtidos em relação ao transporte e espaço de distribuição:

(1) O comportamento do ácido niflúmico no fígado em perfusão isolada pode ser descrito pelo modelo espaço-distribuído com tempos de trânsito variáveis de Goresky (**Goresky** *et al.*, 1970).

(2) O ácido niflúmico permeia a membrana celular nas duas direções com velocidade muito alta e a sua distribuição no espaço celular é limitada pelo fluxo; ao menos a 37°C, as velocidades de influxo ou efluxo não podem ser medidas.

(3) A dissociação do complexo ácido niflúmico-albumina também ocorre com velocidade muito grande, pois mesmo com 90% de ligação a distribuição ainda é dependente do fluxo.

(4) O espaço aparente do ácido niflúmico no fígado depende da concentração e chega a ser 43,5 vezes maior do que o espaço aquoso para uma concentração portal da droga igual a 10 μM; mesmo com 90% de ligação no meio extracelular, o espaço aparente do ácido niflúmico ainda é 5,1 vezes maior que o espaço aquoso.

(5) O altos espaços aparentes do ácido niflúmico refletem as grandes concentrações intracelulares; a razão das concentrações intra- para extracelular (C_i/C_e) atinge 71,0 com ácido niflúmico portal igual a 10 μM e na ausência de albumina.

(6) As altas concentrações intracelulares não parecem resultar de transporte concentrativo, mas sim de ligação a

componentes intracelulares.

(7) A ligação intracelular pôde ser analisada através da equação de Scatchard, com duas classes de sítios de ligação, um com alta afinidade e outro com baixa afinidade.

(8) A transformação metabólica (captação líquida) do ácido niflúmico depende da concentração livre.

Alguns dos ítens relacionados acima merecem ainda alguns comentários adicionais.

Foi possível analisar o comportamento do ácido niflúmico em termos do modelo de Goresky (**Goresky** *et al.*, 1970). Que o modelo é válido, já foi provado com razoável número de substâncias. Entre elas estão tanto substâncias hidrofílicas, como a galactose (**Goresky** *et al.*, 1973), glicose (**Ishii** *et al.*, 1987), lactato (**Bracht** *et al.*, 1980) e íons inorgânicos (**Bracht** *et al.*, 1981) como também substâncias lipofílicas, tais como palmitato (**Goresky** *et al.*, 1978; **Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992), álcoois monohidroxílicos (**Goresky** *et al.*, 1983) e octanoato (**Bracht** *et al.*, 1990). O presente estudo difere, no entanto, dos demais trabalhos em um aspecto importante. Ao invés de utilizar a técnica da injeção única da mistura contendo substância teste e referências (experimentos de pulso, *impulse input*; **Goresky** *et al.*, 1970) optou-se pela técnica da infusão contínua (*step input*; **Goresky** *et al.*, 1970). O motivo de se optar pela técnica da infusão contínua é que o ácido niflúmico não está disponível no mercado na forma marcada (por exemplo [^{14}C]ácido niflúmico). Assim sendo, foi necessário medir o composto espectrofotometricamente. Medidas espectrofotometricas são bem mais problemáticas para experimentos de pulso, pois nesses há uma variação muito aguda da concentração venosa em função do tempo (a curva apresenta um pico máximo que

pode ser muito agudo), o que leva à necessidade de vários esquemas de diluição. Com isto, o cálculo da recuperação do total injetado fica sujeito a erros, pois, além do mais, o material injetado estará concentrado num volume muito pequeno e pequenos erros na aferição deste volume podem resultar em diferenças apreciáveis. Isto é grave, pois a fração recuperada é importante. No caso da infusão contínua, as diluições necessárias são menores e a recuperação é calculada em função da concentração portal, que também pode ser extraída e diluída na mesma proporção das amostras venosas. Como precisão é importante, a infusão contínua nos pareceu, portanto, a técnica mais adequada. Embora a infusão contínua e a injeção única sejam equivalentes (a primeira é a integral da segunda; **Meier** e **Zierler**, 1954; **Goresky** *et al.*, 1973), não foi encontrado na literatura nenhum estudo experimental análogo ao do presente trabalho.

O ideal seria ter feito, mesmo nos experimentos de infusão contínua, a infusão de ácido niflúmico marcado como traçador após estabelecer condições de estado estacionário com as diversas concentrações de ácido niflúmico não marcado. O modo de proceder adotado nesse trabalho, por isto mesmo, pode produzir algumas distorções: os valores de Φ e k_3 medidos representam um valor médio entre o maior e o menor gradiente de concentração entre o lado portal e o lado venoso que ocorre durante cada experimento. Esse gradiente deve ser maior no início e menor no final do experimento (**Goresky** *et al.*, 1983). Estas distorções não devem ser muito pronunciadas, no entanto, pois se fossem, dificilmente a equação [11] ajustaria tão bem como ajustou a praticamente todas as curvas experimentais, sendo que o coeficiente de correlação nunca foi inferior 0,97. Além disto, os valores dos

parâmetros são bastante coerentes entre si. Por exemplo, na série experimental feita na ausência de albumina os valores de k_3 diminuem continuamente (Figura 29), o que é coerente com uma saturação da biotransformação e mesmo com a aparente inibição por substrato (**Goresky** *et al.*, 1973; **Bracht** *et al.*, 1981). No caso da série experimental em que a concentração portal livre foi constante, a biotransformação praticamente não variou e, coerentemente, os valores de k_3 medidos também não mostraram variação estatisticamente significativa (Figura 30). Deve-se lembrar que as velocidades de biotransformação são válidas para condições de estado estacionário e foram calculadas apenas da diferença porto-venosa, independentemente portanto, de qualquer parâmetro extraído do modelo de Goresky. A melhor demonstração de coerência, no entanto, é o fato de que a concentração intracelular (C_1) praticamente não variou quando a concentração portal extracelular livre foi mantida constante (Figura 31). No cálculo de C_1 estão embutidos todos os valores de Φ obtidos nas diversas condições experimentais. Se esses valores estivessem muito distorcidos, os valores de C_1 deveriam variar de acordo com esta distorção.

Distribuição limitada pelo fluxo para uma substância lipofílica como o ácido niflúmico não é, em princípio ao menos, um fato surpreendente. Em relação a isto o ácido niflúmico assemelha-se, por exemplo, aos álcoois primários cuja distribuição no fígado também é limitada pelo fluxo, conforme demonstrado por **Goresky** *et al.* (1983). Nem todas as substâncias lipossolúveis, no entanto, sofrem distribuição limitada pelo fluxo. A troca de palmitato, um ácido graxo de cadeia longa, não é limitada pelo fluxo, mesmo quando a concentração de albumina é

muito baixa (**Bracht** *et al.*, 1990; **Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992). Uma posição intermediária é ocupada pelo octanoato, um ácido graxo de cadeia média. A sua distribuição no fígado torna-se limitada pelo fluxo quando o grau de ligação à albumina é baixo (**Bracht** *et al.*, 1990; **Constantin** *et al.*, 1989).

Há uma outra similaridade entre os álcoois primários e o ácido niflúmico: o propanol, assim como o butanol e o pentanol, têm espaços aparentes maiores do que o espaço aquoso no fígado. **Goresky** *et al.* (1983) encontraram valores de $1+\Phi$ entre 2 e 2,5 para estas substâncias. Para os álcoois primários, os valores de $1+\Phi$ não dependem da albumina, pois esses compostos não se apresentam ligados no espaço extracelular. O espaço aparente do octanoato, no entanto, varia com a concentração da albumina e também com sua própria concentração. Para concentrações bem baixas de albumina (4 μM), **Bracht** *et al.* (1990) encontraram um valor de 2,95 para o parâmetro $1+\Phi$. Salta à vista que esses valores de $1+\Phi$ dos álcoois primários e do octanoato são muito menores do que aqueles encontrados para o ácido niflúmico, especialmente quando não há albumina no meio de perfusão. Parece não haver paralelos na literatura no tocante ao grande espaço aparente de distribuição do ácido niflúmico no fígado.

Os grandes espaços aparentes de distribuição dos álcoois primários puderam ser reduzidos essencialmente ao espaço aquoso quando altas concentrações de etanol foram infundidas simultataneamente. Por causa desta observação, **Goresky** *et al.* (1983) propuseram o "espaço compartilhado com a enzima" (*shared enzymic space*) para os álcoois primários, resultante da ligação desses compostos à álcool desidrogenase. No caso do ácido niflúmico, não há dados que permitam dizer exatamente onde o composto liga in-

tracelularmente. Pode-se dizer apenas que os sítios de ligação podem ser classificados em pelo menos duas classes no que tange à afinidade média. Isto não significa, porém, que haja apenas dois tipos de sítios de ligação. Pode haver mais de dois tipos de sítios de ligação, mas com afinidades muito próximas, de modo que não seja possível distinguí-los com os dados disponíveis. Com os dados que existem na literatura sobre a ligação intracelular de ânions lipofílicos pode-se, no entanto, aventar duas possibilidades para a ligação intracelular do ácido niflúmico: (a) o composto poderia estar ligando a proteínas intracelulares cuja função específica é a de ligar ânions lipofílicos; e/ou (b) o composto poderia também ligar a membranas intracelulares.

Sabe-se há bastante tempo que existem proteínas no citossol com a função específica de ligar substâncias lipofílicas. A proteína Z foi a primeira destas proteínas a ser descrita (**Mishkin** *et al.*, 1972). Estes autores isolaram uma fração do tecido hepático à qual chamaram de "fração proteína Z". Posteriormente, outras proteínas com a propriedade de ligar ácidos graxos e outros ânions orgânicos foram descritas e isoladas por vários autores. **Trulzsch** e **Arias** (1981) isolaram três frações com diferentes pHı´s da assim chamada "fração proteína Z". Eles atribuíram às três um peso molecular de 12.500 Daltons. **Ockner** e **Manning** (1982) isolaram, pouco tempo depois, uma proteína que chamaram de proteína ligante de ácidos graxos (FABP, *fatty-acid binding protein*), cujas propriedades (capacidade de ligação, peso molecular, etc.) são muito semelhantes àquelas da proteína Z de **Trulzsch** e **Arias** (1981). Além destas duas foram ainda isoladas outras proteínas tais como a proteína banda C (**Billheimer** e **Gaylor**, 1980), a proteína

ligante do corante azo amino (**Ketterer** *et al.*, 1976) e outras. A idéia que predomina atualmente é a de que se trata basicamente da mesma proteína ou de porções dela. As diferenças seriam consequência dos diferentes métodos de purificação (**Storch** *et al.*, 1989). Entre as modificações que poderiam ocorrer durante a purificação, por exemplo, haveria a dissociação em subunidades. A sua concentração intracelular estaria em torno de 0,1 mM e a sua função básica seria a de um agente solubilizador de substâncias lipofílicas, principalmente ânions (**Tipping** e **Ketterer**, 1981). A sua especificidade é ampla, pois a ela ligam-se ácidos graxos, os diversos acil-coenzima A, a bilirrubina, corantes orgânicos (ânions orgânicos em geral), etc. Compreensivelmente, a maior parte dos estudos feitos até agora teve como objeto os ácidos graxos. Acredita-se geralmente que drogas aniônicas lipofílicas ligam a essa proteína (**Tiribelli** *et al.*, 1990). No caso do ácido niflúmico há alguma evidência experimental de que esse composto também liga nessa proteína: o octanoato diminui significativamente o seu espaço aparente. Seria interessante utilizar ácidos graxos de cadeia mais longa, pois a afinidade da proteína ligante por eles é maior (**Mishkin** *et al.*, 1972). Porém, a necessidade de incluir a albumina no meio de perfusão, devido à parca solubilidade desses compostos, pode produzir resultados ambíguos. De qualquer forma, uma resposta definitiva sobre esta questão pode ser obtida isolando-se a proteína e fazendo-se os correspondentes estudos de ligação. Isto, porém, está além do escopo deste trabalho.

A probabilidade de que certa fração do ácido niflúmico esteja ligada a lipídeos, principalmente às membranas, é também grande. Segundo **Cooper** *et al.* (1987), uma considerável fração dos

ácidos graxos está ligada aos lipídeos das membranas. É possível que o mesmo ocorra com o ácido niflúmico. Isto é tanto mais provável quando se leva em conta o efeito desacoplador do composto. A compostos com esse tipo de efeito se atribui em geral solubilidade em membranas (**Hanstein**, 1976). Em acordo com isto está também o fato de que o ácido niflúmico pode ser extraído de soluções aquosas a pH 7,4 (onde praticamente existe apenas a forma ionizada) por acetato de etila, solvente de baixa constante dielétrica (**Titus**, 1971).

Recorde-se aqui novamente as observações de **Glasson** *et al.* (1969) sobre a grande concentração de radioatividade no fígado de ratos após a injeção de [^{14}C]ácido niflúmico. Em *Resultados e Discussão* já foram feitos cálculos demonstrando que a capacidade de ligação intracelular é plenamente comparável à da albumina presente em concentrações fisiológicas. **Glasson** *et al.* (1969) deram a entender que as suas observações se deviam principalmente à metabolização. É evidente que a quebra/transformação de uma molécula em outras exerce um papel de agente multiplicador quando se está medindo radioatividade total. Como a passagem do ácido niflúmico através da membrana celular é muito rápida, qualquer molécula transformada é imediatamente reposta. Se a saída dos produtos de metabolização, muito pouco solúveis em lipídeos, for mais lenta pode haver um certo aumento na soma de ácido niflúmico + produtos, que era o que **Glasson** *et al.* (1969) mediram. Porém, isto tem seus limites, ainda mais que a velocidade de metabolização do ácido niflúmico é relativamenmte baixa se comparada com outras drogas (**Itinose** *et al.*, 1989). Os resultados deste trabalho sugerem, portanto, que a elevada concentração de radioatividade no fígado observada por aqueles

autores é consequência, principalmente, de um alto grau de ligação interna, o que não deve ocorrer na maioria dos outros tecidos. O tecido nervoso, por exemplo, parece ter afinidade mínima pelo ácido niflúmico (**Glasson** *et al.*, 1969). O tecido sinovial, no entanto, parece ter também alta afinidade pelo composto. É o que indicam medidas das concentrações no plasma e no tecido sinovial feitas após administração de ácido niflúmico a adultos humanos. Essas medidas revelaram uma razão tecido sinovial/plasma igual a 1,27 (**Dorfmann** *et al.*, 1987), que é um valor alto, considerando o elevado grau de ligação à albumina no plasma.

Nos últimos anos, uma série de questões relativas aos fatores que determinam a captação líquida pelo fígado de substâncias ligadas à albumina, basicamente ácidos graxos e drogas lipofílicas, têm sido levantadas por vários autores (**Tiribelli** *et al.*, 1990). Foi mostrado que a cinética da captação líquida dessas substâncias nem sempre está de acordo com os conceitos clássicos da farmacodinâmica, *i.e.*, que a forma livre do ligante está em equilíbrio com a forma ligada e que a velocidade de captação é determinada pela concentração do ligante livre. No caso do palmitato, por exemplo, a correlação entre o influxo e a concentração livre não é incondicional, pois mesmo quando a concentração livre permanece essencialmente constante, o influxo varia (**Ferraresi-Filho** *et al.*, 1992). O mesmo fenômeno foi observado com oleato (**Weisiger** *et al.*, 1981), taurocolato (**Forker** e **Luxon**, 1981) e rosa de bengala (**Forker** e **Luxon**, 1983). Esse fato levou, no passado, à proposição de que poderia existir na membrana celular um receptor para os complexos albumina-ligante, o qual catalisaria a sua dissociação. Essa idéia já foi

abandonada, pois as evidências experimentais apontam em outra direção (**Tiribelli** *et al.*, 1990). É mais provável que a falta de correlação incondicional com a concentração da forma livre se deva a uma complexa mistura de fatores, tais como, limitação do influxo pela velocidade de dissociação do complexo, limitação do influxo pela difusão através de uma camada não-agitada (*unstirred layer*) na superfície, etc. (**Tiribelli** *et al.*, 1990). No caso do ácido niflúmico, no entanto, nenhum desses fatores parece ser importante: a dissociação do complexo com a albumina é certamente muito rápida e não há nenhuma indicação de limitação da distribuição pela difusão através de eventuais camadas não-agitadas. Além de tudo isto, a velocidade de captação praticamente não varia quando se aumenta a concentração portal total sem alterar a concentração portal livre, conforme mostrado pela Figura 30. A pequena tendência ascendente observada na representação das velocidades de biotransformação contra a concentração portal total, pode ser atribuída à pequena variação que também sofre C_{ef}, que é a concentração livre média ao longo do sinusóide (ver Figura 31). Esta pequena variação é causada pelo decréscimo na fração que é captada quando se aumenta a concentração portal total. Por isto, pode-se dizer que o comportamento do ácido niflúmico no tocante à passagem através da membrana plasmática e no tocante à captação líquida está essencialmente de acordo com os conceitos clássicos da farmacocinética (**Gibaldi** e **Perrier**, 1982): a ligação no meio extra- e intracelular está em equilíbrio e a captação líquida depende basicamente da concentração da forma livre. Aliás, não é apenas a captação líquida que depende da concentração da forma livre: também os efeitos metabólicos dependem da concentração dessa forma, conforme foi demonstrado

principalmente para a neoglicogênese a partir de piruvato. No tocante a isto, portanto, a correlação dos efeitos metabólicos com a concentração livre harmoniza bastante bem com os dados de biotransformação.

Uma outra questão que surge é se o ácido niflúmico pode ser encarado como uma substância modelo para o comportamento de outros anti-inflamatórios não-esteróides. Estruturalmente, o ácido niflúmico é muito semelhante a vários outros compostos com atividade anti-inflamatória, conforme já mencionado na *Introdução* e como pode ser verificado na Figura 1. A lista, porém, é bem maior do que aquela da Figura 1 (**Scherrer**, 1985). Pelo menos no caso do ácido mefenâmico já foi demonstrado experimentalmente que o seu comportamento deve ser semelhante ao do ácido niflúmico. **Suzuki-Kemmelmeier** e **Bracht** (1989) mediram rotineiramente as curvas de diluição do ácido mefenâmico em experimentos nos quais os efeitos metabólicos desse anti-inflamatório foram investigados no fígado perfundido. Dessas curvas pode-se deduzir distribuição dependente do fluxo bem como um grande espaço intracelular para o ácido mefenâmico. O espaço aparente do ácido mefenâmico 1,0 mM é aproximadamente 5 vezes o da água, valor muito parecido com aquele obtido para o ácido niflúmico neste trabalho. É verdade que os resultados de **Suzuki-Kemmmelmeier** e **Bracht** (1989) são aproximados porque a droga não foi extraída do perfusado como neste trabalho. Porém, ficou patente também neste trabalho em relação ao ácido niflúmico que as medidas de concentração total (droga mais metabólitos) já revelam as características essenciais do transporte e distribuição, mesmo que os números obtidos não sejam rigorosamente corretos. Consequentemente, considerando (a) as similaridades estruturais dos derivados do ácido

antranílico com atividade anti-inflamatória, (b) a sua atividade metabólica similar, que de certa forma enfatiza esta similaridade estrutural, e (c) os dados disponíveis sobre dois deles (ácidos niflúmico e mefenâmico), é bastante provável que a distribuição limitada pelo fluxo e o alto grau de ligação intracelular no fígado sejam características comuns a todos os membros da família dos ácidos fenâmicos e seus análogos.

5. BIBLIOGRAFIA

Abumrad, N. A., Perkins, R. C., Park, J. H. e Park, C. R. — Mechanism of long-chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *Journal of Biological Chemistry 256:*9183-9191, 1981.

Albengres, E., Urien, S., Kusmierek, J. e Tillement, J. P. — Benoxaprofen: plasma binding and binding interactions with some drugs and endogenous compounds. *European Journal of Rheumatology and Inflammation 5*:87-97, 1982.

Altin, J. C. e Bygrave, F. L. — The Ca^{2+} mobilizing actions of vasopressin an angiotensin differ from those of the α-adrenergic agonist phenylephrine in the perfused rat liver. *Biochemical Journal 232*:911-917, 1985.

Ashbrook, J. D., Spector, A. A. e **Fletcher, J. E.** — Medium chain fatty acid binding to human plasma albumin. *Journal of Biological Chemistry 247:*7038-7042, 1972.

Aw, T. Y. e Jones, D. P. — Secondary bioenergetic hypoxia. Inhibition of sulfation and glucuronidation reactions in isolated hepatocytes at low O_2 concentrations. *Journal of Biological Chemistry 257*:8997-9004, 1982.

Baron, C., González, J. F., Mateo, P. L. e Cortijo, M. — Thermodynamic analysis of the activation of glycogen phosphorylase b over a range of temepratures. *Journal of Biological Chemistry 264*:12872-12878, 1989.

Bazotte, R. B., Constantin, J., Hell, N. S. e Bracht, A. — Hepatic metabolism of meal-fed rats: studies in vivo and in the isolated perfused liver. *Physiology & Behavior 48*:247-253, 1990.

Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Schmidt, F., e Stork, H. — D-Glucose determination with hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer, H. U. (editor). *Methods of Enzymatic Analysis.* Academic Press,Inc., New York, vol. 3, pp.1196-1201, 1974.

Berry, M. N. e Friend, D. S. — High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *Journal of Cell Biology 43*:506-520, 1969.

Billheimer, J. T. e Gaylor, J. L. — Cytosolic modulators of activities of microsomal enzyme of cholesterol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry 255*:8128-8135, 1980.

Björck, A. e Dahlquist, G. — *Numerische Methoden.* R. Oldenburg Verlag, Munich, 1972.

Boissier, J. R., Fichelle-Pagny, J. e Horakova, Z. — Dérivés phénylaminonicotiniques anti-inflammatoires. *Thérapie 22:*157-168, 1967.

Bracht, A., Schwab, A. J. e Scholz, R. — Untersuchung von Flußgeschwindigkeiten in der isolierten perfundierten Rattenleber durch Pulsmarkierung mit radioaktiven Substraten und mathematischer Analyse der Auswaschkinetiken. *Hoppe-Seyler´s Zeitschrift für Physiologische Chemie 361*:357-377, 1980.

Bracht, A., Kelmer-Bracht, A., Schwab, A. J. e Scholz, R. — Transport of inorganic anions in the perfused rat liver. *European Journal of Biochemistry 114*:471-479, 1981.

Bracht, A., Ferraresi-Filho, O., Schwab, A. J., Ferraresi, M. de L., Ishii-Iwamoto, E. L. e Constantin, J. — Role of membrane transport and enzymatic sequestration in hepatic fatty acid utilization. In: Jacob, A. (editor). *Trends in Biomembranes & Bioenergetics, 1.* Council of Scientific Research Integration, Trivandrum, India, pp. 99-109, 1990.

Brandt, S. — *Daten Analyse.* Bibliographisches Institut, AG, Mannheim, 1975.

Brass, E. P. e Garrity, M. J. — Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on glycogenolysis in isolated hepatocytes. *British Journal of Pharmacology 86:*491-496, 1985a

Brass, E. P. e Garrity, M. J. — Effect of E-series prostaglandins on cyclic AMP-dependent and -independent hormone-stimulated glycogenolysis in hepatocytes. *Diabetes 34:*291-294, 1985b.

Brauer, R. W., Pessotti, R. L. e Pizzolato, P. — Isolated rat liver preparation. Bile production and other basic properties. *Proceedings of the Society for Experimental Biology (New York) 78*:174-181, 1951.

Brodersen, R., Vorum, H., Skriver, E. e Pedersen, A. O. — Serum albumin binding of palmitate and stearate. Multiple binding theory for insoluble ligands. *European Journal of Biochemistry 182:*19-25, 1989.

Bücher, Th., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O. e Sies, H. — State of oxidation-reduction and state of binding in the cytosolic NADH-system as disclosed by equilibration with extracellular lactate/pyruvate in hemoglobin-free perfused rat liver. *European Journal of Biochemistry 27:*301-317, 1972.

Cannoni, M., Sambuc, R., San Marco, J. L., Auquier, P., Gorget, C. e Chiarelli, P. — Comparative study of the efficacy and tolerance of prednisolone versus niflumic acid in the treatment of acute sinusitis in adults. *Annales d´Oto-laryngologie et de Chirurgie Cervico-faciale. 107*:276-281, 1990.

Chance, B. e Williams, G. R. — A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature 175*:1120-1121, 1955

Clark, L. C. — Monitoring and control of blood O_2 tension. *Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs 2*:41-49, 1956.

Conaglen, J. V., Malthus, R. S., Redshaw-Loten, J. C. e Sneyd, J. G. T. — The action of anoxia and cyanide on glycogen breakdown in the liver of gsd/gsd rats. *European Journal of Biochemistry 145*:323- 327, 1984.

Constantin, J., Souza, M. G., Ferraresi, O., Ferraresi, M. L., Ishii-Iwamoto, E. L. e Bracht, A. — Octanoate transport in the isolated, perfused rat liver. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research 22*:145-149, 1989.

Cooper, R., Noy, N. e Zakim, D. — A physical-chemical model for cellular uptake of fatty acids: prediction of intracellular pool sizes. *Biochemistry 26*:5890-5896, 1987.

Corey, E. L. e Britton, S. W. — Glycogen levels in the isolated liver perfused with cortico-adrenal extract, insulin and other preparations. *American Journal of Physiology 131*:783-789, 1941.

Czok, R., e Lamprecht, W. — Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: Bergmeyer, H. U. (editor). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, Inc., New York, vol. 3, pp. 1446-1451, 1974.

Dell, H. D., Fiedler, J. Jacobi, H. e Waesche, B. — On the biochemistry and pharmacokinetics of etofenamate studies in man. *Arzneimittel Forschung 27*:1322-1325, 1977.

DePierre, J. W. e Ernster, L. — Enzyme topology of intracellular membrane. *Annual Review of Biochemistry 6*:20-262, 1977.

Dietz, H. G. — *Temperaturabhängigkeit von Stoffwechselgrössen in der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber*. Tese de doutorado, Munique, 1978.

Doi-Sakuno, M. L., Itinose, A. M. e Bracht, A. — A permeabilidade da membrana celular dos hepatócitos aos produtos de conjugação de drogas. Estudos com o [^{35}S]paracetamol-sulfato. *IV Semana de Estudos de Biologia da Universidade Estadual de Maringá*; Resumos, p. 26, 1989.

Donaldson, P. J., Chen, L. K. e Lewis, S. A. — Effects of serosal anion composition on the permeability properties of rabbit urinary bladder. *American Journal of Physiology 256*:F1125-F1134, 1989.

Dorfmann, H., Gendron, A. e Duchenne, P. — Determination of the concentrations of niflumic acid in the plasma and in synovial tissue following repeated administration of capsules. *Révue de Rhumatisme et des Maladies Ostearticulaires 54*:339-341, 1987.

Dreiser, R. E., Charlot, J., Lopez, A. e Ditisheim, A. — Clinical evaluation of niflumic acid gel in the treatment of uncomplicated ankle sprains. *Current Medical Research and Opinion 12*:93-99, 1990.

Dubowski, K. M. — An o-toluidine method for body fluid glucose determination. *Clinical Chemistry 8:*215-235, 1962.

Duteil, L., Quille, C., Poncet, M., Ortonne, J. P. e Czernielewski, J. — Objective assessment of topical corticosteroids and non-steroidal anti-inflammatory drugs in methyl-nicotinate-induced skin inflammation. *Clinical and Experimental Dermatology 15*:195-199, 1990.

Embden, E. e Kraus, F. — Über Milchsäurebildung in der künstlich durchströmten Leber. *Biochemische Zeitschrift 45*:1-17, 1912.

Evoniuk, G. e Skolnick, P. — Picrate and niflumate block anion modulation of radioligand binding to the gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex. *Molecular Pharmacology 34*:837-842, 1988.

Exton, J. H. e Park, C. R. — Control of gluconeogenesis in liver. I. General features of gluconeogenesis in the perfused livers of rats. *Journal of Biological Chemistry 242:*2622-2636, 1967.

Falke, J. J. e Chan, S. I. — Molecular mechanism of band 3 inhibitors. 2. Channel blockers. *Biochemistry 25*:7895-7898, 1986a.

Falke, J. J. e Chan, S. I. — Molecular mechanism of band 3 inhibitors. 3. Translocation inhibitors. *Biochemistry 25*:7899-7906, 1986b.

Ferraresi-Filho, O., Ferraresi, M. L., Constantin, J., Ishii-Iwamoto, E. L., Schwab, A. J. e Bracht, A. — Transport and metabolism of palmitate in the rat liver. Net flux and unidirectional fluxes across the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta 1103:*239-249, 1992.

Fletcher, J. E., Spector A. A. e Ashbrook, J. D. — Analysis of macromolecule-ligand binding by determination of stepwise equilibrium constants. *Biochemistry 9:*4580-4587, 1970.

Florentin, I., Maral, J., de Souza, M., Berardet, M., Hertz, F. e Cloarec, A. — Modulation of immune responses in mice by oral administration of niflumic acid. *International Journal of Immunopharmacology 11*:173-183, 1989.

Flower, R., Gryglewski, R., Herbaczyńska-Cedro, K., e Vane, J. R. — Effects of antiinflammatory drugs on prostaglandin synthesis. *Nature (London), New Biology 238*:104-106, 1972.

Forker, E. L., e Luxon, B. A. — Albumin helps mediate removal of taurocholate by rat liver. *Journal of Clinical Investigation 67*:1517-1522, 1981.

Forker, E. L. e Luxon, B. A. — Albumin-mediated transport of rose bengal by perfused rat liver: kinetics of the reaction at the cell surface. *Journal of Clinical Investigation 72*:1764-1771, 1983.

Gibaldi, M. e Perrier, D. — *Pharmacokinetics*. Marcel Dekker, Inc., New York e Basel, 1982.

Glasson, B., Benakis, A. e Strolin-Benedetti, M. — Distribution, excretion, metabolism and localization of a new anti-inflammatory drug: niflumic acid, labelled with ^{14}C. *Biochemical Pharmacology 18*:633-643, 1969.

Glazko, A. J., Chang, T., Borondy, P. E., Dill, W. A., Young, R., e Croskey, L. — Metabolic disposition of meclofenamic acid (Meclomen) in laboratory animals and in man. *Current Therapeutic Research 23*:22-41, 1978.

Goresky, C. A. — Initial distribution and rate of uptake of sulphobromophtalein in the liver. *American Journal of Physiology 207*:13-26, 1964.

Goresky, C. A., Ziegler, W. H. e Bach, G. G. — Capillary exchange modelling. Barrier-limited and flow-limited distribution. *Circulation Research 27*:739-764, 1970.

Goresky, C. A., Bach, G. G. e Nadeau, B. E. — On the uptake of materials by the intact liver. The transport and net removal of galactose. *Journal of Clinical Investigation 52*:991-1009, 1973.

Goresky, C. A., Daly, D. S., Mishkin, S. e Arias, I. M. — Uptake of labeled palmitate by the intact liver: role of intracellular binding sites. *American Journal of Physiology 234*:E542-E553, 1978.

Goresky, C. A., Gordon, E. R. e Bach, G. G. — Uptake of monohydric alcohols by liver: demonstration of a shared enzymic space. *American Journal of Physiology 244*:G198-G214, 1983.

Gutmann, J. e Wahlefeld, A. W. — L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: Bergemeyer, H. U. (editor). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, Inc., New York, vol. 3, pp. 1464-1468, 1974.

Ham, E. A., Cirillo, V. J., Zanetti, M., Shen, T. Y. e Kuehl, F. A., Jr. — In: Ramwell, P. W. e Pharriss, B. B. (editores). *Prostaglandins in Cellular Biology*. Plenum Press, New York, pp. 345-352, 1972.

Hanstein, W. G. — Uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta 456*:129-148, 1976.

Hems, R., Ross, B. D., Berry, M. N. e Krebs, H. A. — Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochemical Journal 101*:284-292, 1966.

Illel, B., Schaefer, H., Wepierre, J. e Doucet, O. — Follicles play an important role in percutaneous absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences 80*:424-427, 1991.

Ishii, E. L. — *Efeito do ácido niflúmico sobre o metabolismo oxidativo de mitocôndrias de fígado de rato*. Trabalho de especialização, Maringá, 1982.

Ishii, E. L. e Bracht, A. — Stevioside, the sweet glycoside of Stevia rebaudiana, inhibits the action of atractyloside in the isolated perfused rat liver. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 53*:79-91, 1986.

Ishii, E. L., Schwab, A. J. e Bracht, A. — Inhibition of monosaccharide transport in the intact rat liver by stevioside. *Biochemical Pharmacology 36*:1417-1433, 1987.

Itinose, A. M., Doi-Sakuno, M. L. e Bracht, A. — Metabolic effects of acetaminophen. Studies in the isolated perfused rat liver. *Cell Biochemistry and Function 7*:263-273, 1989.

Joiner, C. H. — Studies on the mechanism of passive cation fluxes activated by deoxygenation of sickle cells. *Progresses in Clinical and Biological Research 240*:229-235, 1987.

Kaneo, Y., Sento, C., Kinoshita, R. e Kato, Y. — Protein binding of nonsteroidal antiinflammatory drugs. V. Effects of various drugs on the binding of naproxen to bovine serum albumin. *Acta Pharmacologica Sueca 18*:45-54, 1981.

Kelmer-Bracht, A. M., Ishii, E. L., Andrade, P. V. M. e Bracht, A. — Construction of a liver perfusion apparatus for studies on metabolic regulation and mechanisms of drug action. *Arquivos de Biologia e Tecnologia 27*:419-438, 1984.

Kelmer-Bracht, A. M., Ishii-Iwamoto, E. L. e Bracht, A. — Binding of the anti-inflammatory drug niflumic acid to bovine serum albumin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research 23*:789-794, 1990.

Ketterer, B., Tipping, E., Hackney, J. F., e Beale, D. — A low molecular weight protein from rat liver that resembles ligandin in its binding properties. *Biochemical Journal 155:*511-521, 1976.

Kimmig, R., Mauch, T. J., Kerzl, W., Schwabe, U. e Scholz, R. — Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver. 1. Kinetics of the inhibitory effect on glycolysis and the stimulatory effect on glycogenolysis. *European Journal of Biochemistry 136:*609-616, 1983.

Klingenberg, M. e Heldt, H. W. — The ADP/ATP translocation in mitochondria and its role in intracellular compartmentation. In: Sies, H. (editor) — *Metabolic Compartmentation*, Academic Press, London, p. 101-122, 1982.

Klotz, I. M., Walker, F. M. e Pivan, R. B. — The binding of organic ions by proteins. *Journal of the American Chemical Society 68:*1486-1490, 1946.

Kobayashi, Y. e Maudsley, D. V. — *Biological Applications of Liquid Scintillation Counting*. Academic Press, Inc., New York, 1974.

Krebs, H. A. e Henseleit, K. — Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 210*:33-66, 1932.

Lonski, A. V., Krutetskaia, Z. I. e Roshchina, N. G. — Effect of niflumic acid on the components of inactivation of the sodium channels of the Ranvier node membrane. *Fiziologicheskii Zhurnal SSSR 75*:327-333, 1989.

Mandel, H. G. — Pathways of drug biotransformation: biochemical conjugations. In: La Du, B. N., Mandel, H. G. e Way, E. L. (editores). *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 149-186, 1971.

McDougall, P., Markham, A., Cameron, I. e Sweetman, A. J. — The mechanism of inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by the non-steroidal anti-inflammatory agent diflunisal. *Biochemical Pharmacology 32:*2595-2598, 1983.

Meier, P. e Zierler, K. L. — On the theory of the indicator dilution method for measurement of blood flow and volume. *Journal of Applied Physiology 6*:731-744, 1954.

Miller, L. L., Bly, C. G., Watson, M. L. e Bale, W. F. — The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. A direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-ϵ-^{14}C. *Journal of Experimental Medicine 94*:431-453, 1951.

Miller, J. D., Ganguli, S. e Sperling, M. A. — Prostaglandin synthesis inhibitors impair hepatic glucose production in response to glucagon and epinephrine stimulation. *Diabetes 32*: 439-444, 1983.

Missika, P., Ouvrard, Coudert, de Mello, Duran, Durivaux, Gass, Hirigoyen, Jeandot e Terrestri — Multicenter study of the anti-inflammatory and analgesic effects of niflumic acid with antibiotics, used preoperatively in dentistry. *Information Dentaire 72*:1907-1910, 1990.

Mishkin, S., Stein, L., Gatmaitan, Z. e Arias, I. M. — The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins: binding to Z protein in liver and other tissues of the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications 47*:997-1003, 1972.

Miyabara, J. J. e Karler, R. — Effect of salicylates on oxidative phosphorylation and respiration of mitochondrial fragments. *Biochemical Journal 97*:194-198, 1965.

Moreau, X., Cottineau, C., Cocaud, J., Rod, B. e Granry, J. C. — Perioperative analgesia in the surgery of peripheral veins. *Cahiers d´Anesthésiologie 38*:403-407, 1990.

Nascimento, E. A. — *O papel do cálcio na ação do naproxeno e de outros anti-inflamatórios sobre o catabolismo do glicogênio em hepatócitos*. Tese de Mestrado, Maringá, 1992.

Nascimento, E. A., Kelmer-Bracht, A. M., Bracht, A. e **Ishii-Iwamoto, E. L.** — Activation of hepatic glycogenolysis by non-steroidal anti-inflammatories is independent of Ca^{2+}. *Pharmacology Communications* (no prelo), 1993.

Ockner, R. K. e Manning, J. A. — Fatty acid binding protein. Isolation from rat liver, characterization, and immunochemical quantification. *Journal of Biological Chemistry 257*:7872-7878, 1982.

Orrenius, S. e Sies, H. — Compartmentation of detoxication reactions. In: Sies, H. (editor) — *Metabolic Compartmentation*, Academic Press, London, p.485-520, 1982.

Pacaud, P., Loirand, G., Lavie, J. L. e Mironneau, J. — Calcium activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflüger´s Archiv European Journal of Physiology 413*: 629-636, 1989.

Plowman, K. — *Enzyme Kinetics*. McGraw-Hill Book Co., New York, 1972.

Rommain, M., Brossard, C., Piron, M. A. e Smets, P. — A skin suction blister model in hairless rats: application to the study of anti-inflammatory and immunomodulatory drugs. *International Journal of Immunopharmacology 13*:379-384, 1991.

Sauvage, J. P., Ditisheim, A., Bessede, J. P. e David, N. — Double-blind, placebo-controlled, multi-centre trial of the efficacy and tolerance of niflumic acid ('Nifluril') capsules in the treatment of tonsillitis in adults. *Current Medical Research and Opinion 11*:631-637, 1990.

Scherrer, R. A. — Aryl- and Heteroarylcarboxylic acids. In: Scherrer, R. A. e Whitehouse, M. W. (editores). *Antiinflammatory Agents. Chemistry and Pharmacology, 1.* Academic Press, New York, pp.45-89, 1974.

Scherrer, R. A. — The fenamic acids. In: Rainsford, K. D. (editores). *Anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs.* Vol. II. CRC Press, Boca Raton, p. 65-85, 1985.

Schimassek, H. — Perfusion of isolated rat liver with a hemisynthetic medium and control of liver function. *Life Sciences 1:*629-634, 1962.

Scholz, R. e Bücher, T. — Hemoglobin-free perfusion of rat liver. In: Chance, B., Estabrook, R. W. e Williamson, J. R. (editores). *Control of Energy Metabolism.* Academic Press, New York, pp. 393-414, 1965.

Scholz, R., Hansen, W. e Thurman, R. G. — Interaction of mixed function oxidation with biosynthetic processes. 1. Inhibition of gluconeogenesis by aminopyrine in perfused rat liver. *European Journal of Biochemistry 38:*64-72, 1973.

Scholz, R., Schwabe, U. e Soboll, S. — Influence of fatty acids on energy metabolism. 1. Stimulation of oxygen consumption, ketogenesis and CO_2 production following addition of octanoate and oleate in perfused rat liver. *European Journal of Biochemistry 141*:223-230, 1984.

Schwab, A. J., Bracht, A. e Scholz, R. — Transport of D-lactate in perfused rat liver. *European Journal of Biochemistry 102*:537-547, 1979.

Scuteri, A., Raciti, R., Usumeci, S. e Romano, L. — Interazione di sostanze antiinfiammatorie con il trasporto del $^{35}SSO_4$ in globuli rossi. *Bolletino della Società Italiana di Biologia Sperimentale 63:*543-550, 1987.

Sharples, D. — Binding of N-phenylanthranilic acid derivatives to bovine serum albumin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology 34*:681-683, 1982.

Sies, H. — Nicotinamide nucleotide compartmentation. In: Sies, H. (editor) — *Metabolic Compartmentation*, Academic Press, London, p. 205-231, 1982.

Soboll, S., Scholz, R. e Heldt, H. W. — Subcellular metabolite concentrations. Dependence of mitochondrial and cytosolic ATP systems on the metabolic state of perfused rat liver. *European Journal of Biochemistry 87:*377-390, 1978.

Soboll, S., Grundel, S., Schwabe, U. e Scholz, R. — Influence of fatty acids on energy metabolism. 2. Kinetics of changes in metabolic rates and changes in subcellular adenine nucleotide contents and pH gradients following addition of octanoate and oleate in perfused rat liver. *European Journal of Biochemistry 141*:231-236, 1984.

Spector, A. A., Fletcher, J. E. e Ashbrook, J. D. — Analysis of long-chain free fatty acid binding to bovine serum albumin by determination of stepwise equilibrium constants. *Biochemistry 10:* 3229-3232, 1971.

Storch, J., Bass, N. M. e Kleinfeld, A. M. — Studies of the fatty acid-binding site of rat liver fatty acid-binding protein using fluorescent fatty acids. *Journal of Biological Chemistry 264*:8708-8713, 1989.

Suzuki-Kemmelmeier, F. e Bracht, A. — Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug mefenamic acid on energy metabolism in the perfused rat liver. *Biochemical Pharmacology 38:* 823-830, 1989.

Thurman, R. G. e Kauffman, F. C. — Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes. *Pharmacological Reviews 31:*229-250, 1980.

Thurman, R. G. e Scholz, R. — Interaction of glycolysis and respiration in perfused rat liver. Changes in oxygen uptake following the addition of ethanol. *European Journal of Biochemistry 75*:13-21, 1977.

Tipping, E., e Ketterer, B.— The influence of soluble binding proteins on lipophile transport and metabolism in hepatocytes. *Biochemical Journal 195*:441-452, 1981.

Tiribelli, C., Lunazzi, G. C., e Sottocasa, G. L. — Biochemical and molecular aspects of the hepatic uptake of organic anions. *Biochimica et Biophysica Acta 1031:*261-275, 1990.

Titus, E. O. — Isolation procedures — Liquid extraction and isolation techniques. In: La Du, B. N., Mandel, H. G. e Way, E. L. (editores). *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition.* The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 419-436, 1971.

Trowell, O. A. — Urea formation in the isolated perfused liver liver of the rat. *Journal of Physiology 100*:432-458, 1941.

Trulzsch, D. e Arias, I. M. — Z protein: isolation and characterization of multiple forms in rat liver cytosol. *Archives of Biochemistry and Biophysics 209*:433-440, 1981.

Vane, J. R. — Prostaglandins and aspirin-like drugs. In: Maxwell, R. A. e Acheson, G. H. (editores). *Cellular Mechanisms*, volume 5, Proceedings of the Fifth International Congress on Pharmacology, Karger, Basel, pp. 353-378, 1973.

Verbruggen, G., Veys, E. M., Malfait, A. M., Schatteman, L., Wieme, N., Nimmegeers, J., Ge, M. G. e Broddelez, C. — Proteoglycan metabolism in isolated chondrocytes from human cartilage. Influence of niflumic acid. *Clinical Rheumatology 9*:32-41, 1990.

Voss, D. O., Campello, J. C. e Bacila, M. — The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications 4*:48-51, 1961.

Watnick, A. S., Taber, R. L. e Tabachnick, I. I. — Antiinflammatory and analgesic properties of clonixin [2-(2-methyl-3-chloroanilino)nicotinic acid]. *Archives for International Pharmacodynamics and Therapeutics 190*:78-90, 1971.

Weisiger, R. A., Gollan, J. L., Ockner, R. K. — Receptor for albumin on the liver cell may mediate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances. *Science 211:*1048-1050, 1981.

Wilkinson, G. N. — Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochemical Journal 80:*324-332, 1961.

Winder, C. V., Wax, J., Scott, L., Scherrer, R. A., Jones, E. M. e Short, F. W. — Anti-inflammatory, antipyretic and antinociceptive properties of N-(2,3-xyly) anthranilic acid (mefenamic acid). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 138:*1405-1413, 1962.

Winder, C. V., Wax, J., Serrano, B., Jones, E. M. e McPhee, M. L. — Anti-inflammatory and antipyretic properties of N-(α,α,α-trifluoro-m-tolyl) anthranilic acid (Cl-440; flufenamic acid). *Arthritis and Rheumatism 6:*36-47, 1963.

Yamamoto, N. S., Ishii-Iwamoto, E. L. e Bracht, A. — Activation of glycogenolysis by methotrexate. Influence of calcium and inhibitors of hormone action. *Biochemical Pharmacology* (no prelo), 1992.

Zwiebel, F. M. — *Der mitochondriale Monocarboxylat-Translocator. Seine Regulation und Bedeutung für den Intermediärstoffwechsel untersucht an der isolierten, nicht-rezirkulierend, hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber.* Tese de doutorado, Munique, 1990.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e em especial ao meu esposo pelo incentivo e pela paciência que teve comigo durante todo o período.