

ANITA TOEWS

ESTUDOS BIOQUÍMICOS SOBRE A AÇÃO DE 6-O-BENZOIL-3-DESOXI-3-FLUOR-
1,2-O-ISOPROPILIDENO - α -D-GLUCOFURANOSE NO METABOLISMO OXIDATIVO
DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDE
RAL DO PARANÁ PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOQUÍMICA,

CURITIBA

1980

Tese orientada pelo

Dr. Dinor O. Voss

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	05
2. MATERIAIS E MÉTODOS.	12
3. RESULTADOS	19
4. DISCUSSÃO	33
5. CONCLUSÃO.	37
6. SUMÁRIO.	38
7. AGRADECIMENTOS	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O átomo de fluor como componente de moléculas orgânicas, foi encontrado na natureza somente como fluor-acetato ou seus homólogos ω -fluorados, fluor oleato e fluor palmitato¹⁴.

Durante as décadas de cinquenta e sessenta houve grande interesse pelos derivados halogenados de compostos naturais, porque essas estruturas apresentam interessantes propriedades biológicas³.

Em 1959, PETERS e HALL³⁰, isolaram o ácido ω -fluor - cis - Δ - ácido octadecanoico da semente do *Dichapetalum toxicarium*. Observaram que esse ácido inibia o metabolismo do citrato em partículas de córtex renal de cobaia e era tóxico para ratos. Nesses compostos naturais, a substituição ocorria pela troca de um átomo de hidrogênio por outro de halogênio³. Porém, na suposição que efeitos similares poderiam ser obtidos, pela substituição de um grupo hidroxila por um átomo de halogênio, iniciaram-se as pesquisas no sentido de obter alguma informação. Constatou-se que essa sugestão era particularmente verdadeira para átomos de fluor e cloro³. Contudo, entre os derivados orgânicos halogenados, os que contêm fluor ocupam uma posição de destaque, devido as suas propriedades químicas e biológicas⁴.

Em 1933, GRIMM e colaboradores⁴, determinaram o calor de formação para a ligação C-F, encontrando um valor de 114 kilocalorias. Este alto teor de calor necessário para formar a ligação, contribui sem dúvida para a grande estabilidade dessa ligação, dificultando a sua clivagem pelos organismos em substâncias sintéticas.

Já em 1927, o fluoracetato foi patenteado como veneno para certos invertebrados e é presentemente usado como rodenticida. A sua ação tóxica para ratos apresenta muitos aspectos importantes, especialmente porque a molécula é pequena e porque a ligação C-F é estável, o que dificulta a ligação da mesma aos grupos sensíveis a fluor ou grupos SH das enzimas⁴.

Trabalhos importantes foram realizados com o fluoracetato, quanto a sua ação tóxica sobre o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e sobre enzimas.

KALNITSKY e BARRON²⁰ em um trabalho publicado em 1947, empregando dois diferentes tipos de células, a de levedura de padeiro e de *Corynebacterium creatinovorans*, tentaram elucidar o mecanismo de ação do monofluoracetato sobre o metabolismo de levedura e bactéria. Verificaram que quando o acetato era adicionado antes do fluoracetato não se observava a inibição e que a mesma era parcialmente revertida pela adição de mais acetato. Esse fato levou à sugestão que o fluoracetato era um inibidor competitivo.

Em 1947, BARTLETT e BARRON⁴, após intensivos estudos sobre o efeito do fluoracetato sobre enzimas, tecidos e oxidação do piruvato, lançaram a hipótese que o fluoracetato é inibidor competitivo para reações bioquímicas nas quais o acetato toma parte. Das enzimas testadas nenhuma foi sensível a fluoracetato. A estabilidade química da ligação C-F do fluoracetato, e sua insensibilidade sobre as enzimas isoladas estavam em forte contraste da poderosa inibição dessa substância sobre a oxidação do acetato em tecidos animais. Em fatias de tecido, durante a oxidação do piruvato e outros substratos, houve acúmulo de acetato.

Com a finalidade de comprovar e ampliar os estudos já realizados sobre a atividade tóxica do fluoracetato, em 1949, LIEBÉCQ e PETERS²³, realizaram estudos com homogeneizado de córtex renal de cobaia, sobre o ciclo dos ácidos tricarboxílico. Essa preparação se apresentava livre de substratos residuais oxidáveis e era reforçada com Mg^{++} e nucleotídeos de adenina. O fumarato e o citrato, os substratos empregados, eram rapidamente oxidados. Na presença de fluoracetato, citrato era acumulado durante a oxidação do fumarato, sem acúmulo de acetato. A ação do fluoracetato foi também estudada sobre outras enzimas do ciclo, como aconitase, fumarase e oxalosuccinato descarboxilase. Porém, não evidenciaram nenhuma atividade na presença desse inibidor.

LIEBÉCQ e PETERS²³, sugeriram que com preparações de rins de cobaia, o fluoracetato não é inibidor, porém, é transformado em outra substância, fluorcitrato, um potente inibidor da aconitase.

Após a descoberta que o ácido fluorcitrato inibia a aconitase, iniciou-se a procura de outros inibidores análogos. Muitos compostos biologicamente importantes foram sintetizados e seus efeitos estudados.

Durante a década de cinquenta, mais precisamente em 1952, Mc. DONALD e colaboradores ²⁵, iniciaram um estudo com cerca de 50 análogos da glucose. De todas substâncias estudadas a 2-desoxi-D-glucose (2DG) demonstrou ser a mais potente.

Assim, segundo CRAMER e WOODWARD ¹¹, a 2-desoxi- D- glucose (2DG), agindo como um análogo estrutural da glucose, inibe competitivamente uma enzima da parede celular de levedura sob condições anaeróbicas. Essa enzima é essencial para o transporte da glucose para dentro da célula. O efeito inibidor da 2DG sobre a fermentação em levedura era perdida pela remoção da parede celular.

Ficou constatado em fatias de tecido de carcinoma de rato da espécie Walker 256, que a 2DG inibe o metabolismo da glucose em células de tumor em cerca de 60% ¹¹.

KIPNIS e CORI ²¹, baseados no conhecimento que a glucose e outros análogos da glucose eram fosforilados pela hexoquinase, realizaram um estudo sobre a permeabilidade em tecidos e fosforilação da 2-desoxiglucose em diafragma de rato. Observaram que o produto formado era 2-desoxi-glucose-6-fosfato. Esse porém, não era metabolizado posteriormente a uma velocidade considerável e assim acumulava-se dentro da célula.

MELCHERS ²⁶, realizando estudos sobre o efeito da 2DG sobre o metabolismo de imunoglobulinas em células plasmáticas tumorais, verificou que a 2DG inibia a glicosilação das macromoléculas provavelmente por inibir competitivamente a enzima glucose-fosfato-isomerase.

A síntese de carboidratos monohalogenados em posições diferentes ao C-1, foi um empreendimento de grande interesse por parte dos biólogos, primeiramente como fonte de desoxi-açúcares biologicamente importantes e segundo como análogos de carboidratos, além da interconversão de derivados halogenados com epóxidos e açúcares insaturados ³.

Houve um particular interesse por compostos desoxifluorados que surgiu do conhecimento que a substituição dos átomos de hidrogênio ou grupos funcionais, tais como grupos hidroxilas, por átomos de fluor, podia causar uma alteração dramática na atividade biológica ¹³.

SCHMIDT et al.³⁶, em estudos realizados com açúcares fluorados (2-desoxi-2-fluor-D-glucose e 2-desoxi-2-fluor-D-manose), sobre as propriedades biológicas de diversos vírus encapsulados de diferentes grupos taxonômicos, demonstraram que ambas as substâncias eram potentes inibidores da síntese dos mesmos: foram empregados o vírus semliki de floresta, o vírus da peste de galinha crescidos em células de embrião de pinto e vírus de pseudohidrofobia presentes nas células de rins de coelho. Constataram que sua ação é predominantemente sobre o processo de glicosilação das proteínas virais.

Estudos bioquímicos revelaram que açúcares fluorados podem ser fosforilados pela hexoquinase e COE¹⁰ em estudos realizados sobre a inibição da glicólise em células de tumor ascítico, pré-incubada com 2-desoxi-2-fluor-D-glucose, constatou que a mesma e seus derivados inibem especificamente as etapas da hexoquinase e fosfofrutoquinase e que a inibição da hexoquinase era não competitiva.

BIELY et al.⁵, em um trabalho realizado sobre o efeito da 2-desoxi-2-fluor-D-glucose sobre o crescimento e metabolismo da glucose de *Saccharomyces cerevisiae*, verificou que a adição de 0,005-0,05% da droga fluorada em meio de 2% de glucose, resultava em redução da velocidade inicial de crescimento da cultura e após diversas horas, em interrupção total. Comprovaram que havia lise das células, como consequência da dissolução da parede celular.

BRUNT e TAYLOR, 1967⁷, estudando o efeito da 3-desoxi-3-fluor-D-glucose (3FG) em suspensões celulares de *Saccharomyces cerevisiae* latentes, constataram que a 3FG era oxidada por essas células, e cuja eficiência foi constatada corresponder à metade de oxidação da glucose.

Anteriormente já havia sido demonstrado por WOODWARD et al.⁴⁵, que a glucose adicionada a um meio tratado com 3FG, resultava na inibição da síntese de polissacarídeos.

Na presença da glucose a inibição da respiração monitorada com respirômetro de Warburg não era estatisticamente significativa. Contudo, quando a velocidade da respiração era determinada com eletródio de oxigênio, uma inibição acentuada porém transitória pode ser detectada. A incorporação da glucose e a síntese de polissacarídeos estavam, no entanto, consideravelmente inibidas. Em contrastes, a galactose apresentou uma acentuada inibição na respiração, sem alteração na

capacidade de incorporação desse açúcar. A síntese de polissacarídeos apresentou-se notavelmente estimulada ⁴⁵.

Na tentativa de localizar os possíveis sítios de ação da 3FG, os mesmos pesquisadores ⁴⁶, ampliando os seus estudos sobre os níveis de intermediários glicolíticos, nucleotídeos de adenina e fosfato inorgânico na presença da droga, em células latentes de *Saccharomyces cerevisiae*, constataram que havia uma queda na taxa de fosfato inorgânico. Uma vez que a degradação do glicogênio requer fosfato inorgânico para ambas as fosforilases (α -1-4-glucan: ortofosfato glucosiltransferase, EC 2.4.1.1) e triosefosfato desidrogenase/fosfoglicerato quinase (D-gliceraldeído-3-fosfato: NAD oxireductase (fosforilante), EC 1.2.1.12), a ligação de fosfato inorgânico nas células tratadas com 3FG provocava a redução na velocidade de degradação do glicogênio. Detectaram ainda um decréscimo nos níveis da UDPG (uridina difosfato glucose), PGAs (ácidos 2 e 3 fosfoglicéricos), ATP (adenosina 5'-trifosfato), fosfato inorgânico, e um aumento nas taxas de ADP (adenosina-5'-difosfato), G-1-P (glucose-1-fosfato), F-6-P (frutose-6-fostato). WOODWARD et al ⁴⁶ concluíram que a 3FG atuava parcialmente como captador de fosfato e portanto provocava um desvio no balanço energético da célula.

Estudos bioquímicos realizados por ROMANSCHIN et al. ³³, sobre o metabolismo de *Shistocerca gregária* e *Locusta migratória*, na presença de 3FG, fizeram a importante constatação que havia a formação de um metabólito tóxico que lembrava a síntese letal do fluorocitrato a partir do fluoracetato.

HELFERICH et al. ¹⁷, em 1937, empregando emulsina de amêndoas e β -D-glucosídeos com substituição da hidroxila do C-6, determinaram a atividade enzimática da β -glucosidase. Bem mais tarde, BARNETT et al. ², testaram diversas substâncias de uma série de galactoses, 6-desoxi-D-galactose, 6-desoxi-6-fluor-D-galactose, 6-desoxi-6-cloro-D-galactose, 6-desoxi-6-iodo-D-galactose, quanto ao transporte ativo em segmentos invertidos de intestino de hamster. Constataram, que a facilidade de transporte dessas substâncias para o interior das células, era dependente do grupo substituído no átomo de C-6, na seguinte ordenação: OH > F >> Cl, H > I.

O rompimento da ligação C-halogênio, especialmente F-C, é extremamente raro em sistemas biológicos. Contudo, BARNETT et al. ², durante a investigação do transporte de açúcares, acima citados, consta

taram a hidrólise enzimática da α -D-fluor-glucosil pela α -D-glucosidase intestinal e fungal. No estágio inicial da protonação o átomo de fluor aparece como radical alcóxi. Resultados idênticos foram obtidos com outras substâncias similares.

BLAKLEY e BOYER ⁶, em um estudo realizado sobre a fermentação da glucose e frutose em levedura na presença da 6-desoxi-6-fluor-D-glucose, verificaram que o açúcar derivado se apresentava como inibidor competitivo da utilização da D-glucose e D-frutose pela ação da hexoquinase e esse efeito era menos acentuado quando se usava extratos livres de células. Os autores concluíram que a 6FG é um inibidor competitivo do transporte da D-glucose através da membrana da célula.

Em intestino de mamíferos, a 6-desoxi-6-fluor-D-glucose e 6-desoxi-6-fluor-D-galactose são ativamente transportados e competem com a D-glucose pelo sítio transportador, assim diminuindo a velocidade de absorção da D-glucose. De maneira similar, em sistemas de transportes facilitados, a 6-desoxi-6-fluor-D-glucose, interfere no transporte da D-glucose em glóbulos vermelhos do sangue ^{3,32}. Um fenômeno mais complicado foi observado em diafragma de rato ³. A insulina é conhecida como sendo um hormônio que aumenta a velocidade de transporte da D-glucose para dentro da célula. Apesar da 6-desoxi-6-fluor-D-glucose (6FG) entrar nesse tecido de maneira facilitada, inibe, no entanto, a entrada da D-glucose, cuja penetração na célula deixa de ser estimulada pela insulina. Foi sugerido³, que isto se deve ao fato que o transporte facilitado em tais tecidos dependem de dois sítios:

- a) sítio sensível a insulina que não transporta 6FG.
- b) sítio normal que transportará esse composto.

METZGER et al. ²⁷, estudando o efeito da 6-desoxi-D-glucose e 6-desoxi-6-fluor-D-glucose sobre a glucose desidrogenase de fígado de rato, verificaram que essas substâncias eram substratos tão ativos quanto a D-glucose para essa enzima, cuja atividade não era dependente de grupos SH.

Os resultados das pesquisas científicas realizados com análogos de desoxi-açúcares fluorados ou não, levam a pressupor que muitas dessas substâncias atuam como pseudo-substratos em sistemas enzimáticos relacionados ao metabolismo celular. Substâncias tais como a 3FG, prevalecendo-se de fosfato inorgânico do meio, possivelmente para formar fosfato de 3FG, pode provocar um desvio no balanço energético

co da célula.

São poucos os resultados experimentais sobre as propriedades biológicas dos açúcares substituídos por fluor³⁶. A 2-desoxi-2-fluor-D-glucose pode inibir seletivamente a formação de glucan em levedura. Efeito similar foi observado com 2-desoxi-2-fluor-D-manose. No entanto pesquisas realizadas com 3FG sobre o metabolismo de *Schistocerca gregaria* e *Locusta migratória*, revelaram que havia a formação de um metabólito tóxico cuja ação lembrava a síntese letal do fluorocitrato³³. Presume-se que a grande estabilidade da ligação C-F seja o fator principal do aparecimento do mesmo.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de adquirir algumas informações sobre a ação do açúcar derivado 6-O-benzoil-3-desoxi-3-fluor-1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranose, (BDFIG), ao nível do metabolismo oxidativo de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO, PARA DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO.

As mitocôndrias de fígado de rato foram obtidas pelo método descrito por VOSS et al.⁴³, cujo meio de extração era constituído de D-manitol 0,200M, sacarose 0,075M, Tris (tris hidroximetil amino metano) 0,010M, EDTA (etileno diamino tetracetato de sódio) 0,200 mM. O pH foi ajustado para 7.4 com HCl 0.100N.

Ratos albinos da espécie Wistar, pertencentes ao Departamento de Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, foram decapitados com auxílio de uma guilhotina. Imediatamente seus fígados foram removidos e lavados com meio de extração e lavados com meio de extração gelado. A seguir foram cortados em pequenos fragmentos, em meio de extração mantido no gelo. Utilizando-se um homogeneizador de Van Potter Elvehjen³¹, esses pedaços de fígado recém cortados, foram triturados e suas células rompidas, liberando no meio o seu conteúdo. O homogeneizado foi centrifugado numa centrífuga refrigerada modelo Sorvall RC 2B, a 1000 x g por 10 minutos, cuja finalidade foi eliminar os constituintes celulares prescindíveis, como membranas, núcleos e restos celulares. O sedimento foi eliminado e o sobrenadante foi centrifugado a 10 000 x g, durante 10 minutos, a fim de sedimentar as mitocôndrias. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensão em meio de extração e recentrifugado a 8000 x g, por 10 minutos. A última operação foi repetida.

O sedimento obtido foi ressuspensão em meio de extração, a fim de obter entre 20 a 30 mg de proteínas.

2.2 - OBTENÇÃO DE MITOCÔNDRIAS PARA EXPERIMENTOS DE ALTERAÇÃO DE VOLUME MITOCONDRIAL.

O procedimento para extração de tais mitocôndrias de fígado segue o mesmo roteiro descrito anteriormente⁴³, utilizando-se o meio de extração segundo MUSTAFA et al.²⁸, com a seguinte composição: sacarose 0.33M, Tris-HCl 1.0mM e EDTA 1.0mM. Ajustado para pH 7.5 com HCl.

2.3 - OBTENÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS.

As mitocôndrias isoladas pelo método de VOSS et al.⁴³, foram congeladas durante 24 horas a -18°C . As mitocôndrias rompem por descongelamento, conservando em plena atividade todos os componentes da cadeia respiratória.

2.4 - DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO POR POLAROGRAFIA USANDO ELETRÓDIO DE OXIGÊNIO.

As variações na velocidade de consumo de oxigênio, foram analisadas como descrito por ESTABROOK¹², utilizando-se um eletrodo de oxigênio (Rank Brothers), a uma temperatura constante de 28°C .

O sistema de incubação continha 30 micromoles de substrato; α -cetoglutarato ou succinato; suspensão mitocondrial correspondente a 3,0 ou 1,5 mg de proteína respectivamente, 2,40 ml de meio de reação; ADP 0,5 micromoles.

O meio de reação empregado, descrito por VOSS et al.⁴³, tinha a seguinte composição: manitol (0,25M), tampão fosfato de potássio (5mM, pH 7,4), Tris (0,01M), EDTA (0,20 mM), KCl (0,01M).

De acordo com o método de CHANCE e WILLIAMS⁸, foi determinada a razão ADP:O. Consiste na relação entre o número de micromoles de ADP (Adenosina 5'-difosfato) adicionado ao sistema, por microatmos de oxigênio consumido no estado ativo da respiração (também designado estado III da respiração).

O coeficiente de controle respiratório (RC), consiste na razão entre a taxa respiratória com ADP (estado III), e a taxa respiratória após todo ADP ter sido consumido (estado IV).

A velocidade respiratória foi expressa em concentração micromolar de oxigênio consumido por segundo ($\mu\text{M O}_2/\text{seg}$), considerando a solubilidade do O_2 a 28°C , 240 μM segundo ESTABROOK¹².

2.5 - DETERMINAÇÃO MANOMÉTRICA DO CONSUMO DE OXIGÊNIO.

A velocidade de consumo de oxigênio, foi determinada com técnicas manométricas utilizando-se o respirômetro de Warburg, segundo

UMBREIT et al.⁴¹.

O α -cetogluturato e o succinato foram usados como substratos. O sistema era constituído de suspensão mitocondrial correspondente a 6,0 mg de proteína, substrato (100 μ moles), colocado inicialmente no apêndice lateral do frasco, 0,15 ml de KOH 20%, colocado no poço central do mesmo. O volume final foi de 2,85 ml, em meio de reação de VOSS et al.⁴³, a uma temperatura de 38°C. A fase gasosa empregada foi o ar atmosférico.

O sistema foi homogeneizado com 90 agitações por minuto. As leituras foram feitas em intervalos de 10 minutos nas três primeiras leituras e intervalos de 15 minutos nas duas últimas, durante 60 minutos.

Todos resultados foram expressos em microlitros de oxigênio consumido por minuto.

2.6 - ENSAIOS POLAROGRÁFICOS PARA O TESTE DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.

A atividade da NADH oxidase (NADH: oxigênio óxido redutase, E.C. 1.6.99.3), Succinato oxidase (Succinato: oxigênio oxidoreductase, EC 1.3.99.1) e Citocromo C oxidase (ferrocitocromo c: oxigênio oxidoreductase, EC 1.9.3.1), foram medidas polarograficamente, empregando mitocôndrias rompidas por congelamento (2,5 mg de proteína). A droga foi utilizada nas concentrações de 30 a 1200 μ moles/mg de proteína. As atividades enzimáticas foram expressas graficamente como percentagem de inibição observada em função da concentração da substância BDFIG (μ moles/mg de proteína). Esse método foi descrito por SINGER et al.³⁸.

A - Para determinação da atividade da NADH oxidase foi montado o seguinte sistema: tampão fosfato de potássio (50 mM) pH 7.4 ; proteína (2,5 mg): NADH (0,25 mM) como substrato. O volume total foi de 3,0 ml.

B - Para determinação da atividade de succinato oxidase foi montado o seguinte sistema: tampão fosfato de potássio (50 mM) pH 7,4 com EDTA (2 mM); proteína (2,5 mg); succinato (30 μ moles) foi usado como substrato. O volume final foi de 3,0 ml.

C - Para determinação da atividade da citocromo c oxidase , foi montado o seguinte sistema: tampão fosfato de potássio (50 mM) pH

7.4 com EDTA (2 mM); proteína (2,5 mg); TMPD (0,66 mM) + ascorbato (5 mM) foi usado como substrato. O volume final foi de 3,0 ml.

2.7 - ENSAIOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA O TESTE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Utilizando-se de um espectrofotômetro (Beckman DB) com a adaptação de um registrador, a atividade das enzimas da cadeia respiratória, NADH oxidase (NADH: oxigênio oxidoreductase, E.C. 1.6.99.3), Succinato desidrogenase (Succinato: Fenazina/metosulfato Oxido redutase, E.C. 1.3.99.1), NADH desidrogenase (NADH: ferricianeto oxidoreductase, E.C. 1.6.99.3), foram determinadas, seguindo a descrição de SINGER et al.³⁸. Com essa finalidade foram empregadas mitocôndrias de fígado de rato rompidas por congelamento.

A - CINÉTICA PARA NADH-OXIDASE (NADH: OXIGÊNIO OXIDOREDUCTASE, E.C. 1.6.99.3).

Com a finalidade de comprovar o efeito inibitório verificado na determinação polarográfica para NADH oxidase, a atividade da mesma também foi acompanhada espectrofotometricamente, a 340 nm. O ensaio foi realizado com 0,04 mg de proteína mitocondrial, 0,25 mM NADH em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4. O volume final foi de 1,0 ml. O meio de reação foi preaquecido a 30°C.

A reação foi iniciada pela adição da proteína, sendo o decréscimo da absorbância a 340 nm registrada. A partir do registro foi calculada a percentagem de inibição, representada graficamente como % de inibição enzimática versus concentração da droga (nmoles/mg de proteína).

B - CINÉTICA PARA NADH DESIDROGENASE (NADH: FERRICIANETO OXIDOREDUCTASE, E.C. 1.6.99.3).

O sistema de reação tinha a seguinte composição: tampão fosfato de potássio (50mM) pH 7,4; ferricianeto de potássio (concentração variável), que corresponde ao acceptor artificial de elétrons; KCN (1mM) e proteína 0,156 mg em um volume final de 1,0 ml. Foram montados diversos sistemas, com diferentes concentrações de ferricianeto - (0,6; 0,9; 1,2 e 1,5 μ M). A substância BDFIG foi usada nas concentrações de 1,92 e 3,85 μ Mol/mg de proteína. A seguir 0,25 mM de NADH foi acrescentado a cada sistema e o mesmo foi colocado no aparelho para

o registro.

A variação da absorvância (Δ .D.O) por minuto foi anotada em cada caso, a 420 nm. O resultado foi expresso graficamente como o inverso da Δ .D.O./min contra o inverso das concentrações de ferrocianeto em μ M. Esse método foi descrito por SINGER et al.³⁸.

C - SUCCINATO DESIDROGENASE (SUCCINATO:FENAZINAMETOSULFATO OXIDOREDUTASE, E.C. 1.3.99.1).

A atividade dessa enzima foi ensaiada, seguindo a redução do DCIP a 600 nm. O sistema foi constituído de 0,05 mg de proteína suspensas em tampão fosfato (50 mM) pH 7.4; succinato (20 mM). A substância BDFIG adicionada nas concentrações de: 0,6; 1,5; 3,0; 6,0; 9,0; e 12 mol/mg de proteína. Volume final igual a 1,0 ml. As cubetas foram incubadas durante 10 minutos a 30°C, para permitir que a enzima atinja sua completa atividade³⁹. PMS e DCIP foram adicionados ao sistema no tempo zero. O decréscimo da absorvância foi acompanhado em um espectrofotômetro Beckman DB. Calculada a percentagem de inibição plotou-se esses valores contra concentração da droga em μ moles/mg de proteína. Esse experimento foi realizado baseando-se no método de SINGER et al.³⁸.

2.8 - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE VOLUME MITOCONDRIAL EM CONDIÇÕES DE EQUILÍBRIO DINÂMICO.

O grau de "swelling" mitocondrial foi acompanhado em um espectrofotômetro AMINCO-CHANCE, a 540 nm, segundo método de MUSTAFA et al.²⁸, baseado na indução do "swelling" mitocondrial por energia proveniente do transporte de elétrons ou ATP.

Foram empregadas mitocôndrias de fígado de rato extraídas em meio já descrito. O meio de incubação tinha a seguinte composição: sacarose 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Tris-EDTA 0.3 mM. O pH foi acertado para 7,5, utilizando-se HCl 0,1 N.

O sistema constou de: suspensão mitocondrial (2,5 mg de proteína), meio de reação (qsp 3 ml) e droga (360 a 1440 nmoles/mg de proteína).

Outras adições: acetato (50 mM), glutamato (30 mM), ascorbato (5 mM)+ TMPD (20 mM), KCN (1 mM), rotenona (0,1 μ g/mg de protopina), antimicina A (0,1 μ g/mg de proteína).

A adição de acetato de sódio, (iniciador), facilita a permeabilidade de íons através da membrana interna. Após sua adição, há indução do "swelling" da mitocôndria, que em poucos minutos atinge o seu estado de equilíbrio. A adição de um inibidor específico para o substrato empregado, ocasiona a reversão do processo.

É um método simples e acessível para análise de "swelling" mitocondrial, sendo necessário a manutenção do pH 7,5.

O "swelling" foi medido como decréscimo da densidade ótica a 540 nm. O nível de densidade ótica inicial, foi considerado como 100% e o "swelling" foi relacionado com a diminuição da densidade ótica a partir do nível inicial. A velocidade de consumo de oxigênio foi acompanhado simultaneamente com eletrodo de oxigênio, pelo método polarográfico¹².

2.9 - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE VOLUME MITOCONDRIAL EM CONDIÇÕES DE OSCILAÇÃO AMORTECIDA.

As variações na respiração e volume das mitocôndrias foram analisadas segundo MUSTAFA et al.²⁸. A variação da absorbância foi medido a 575 nm. Os meios de extração e reação foram utilizados como descrito anteriormente²⁸, exceto que o pH do meio de reação foi ajustado para 8,2 ao invés de 7,5. As mitocôndrias nessas condições, sofrem variações de volume mitocondrial, oscilando como um oscilador harmônico amortecido. A partir do registro da variação da absorbância pode-se determinar os seguintes parâmetros segundo GOOCH et al.¹⁵, amplitude, corresponde a variação de absorbância registrada do pico à depressão ou depressão ao pico, e a relação entre as duas amplitudes subsequentes caracteriza o fator de amortecimento. Meio período corresponde ao tempo necessário para ir do pico à depressão ou depressão ao pico, apresentando uma certa constância nos seus valores. A diferença entre os registros obtidos no início da oscilação e no momento em que se observa total amortecimento é tida como valor de equilíbrio. Quando o gradiente iônico é dissipado devido a falta de fornecimento em energia, verifica-se nova diferença na absorbância, denominado relaxação.

2.10 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas foram dosadas pelo método de LOWRY et al.²⁴, empregando soro albumina bovina como padrão. As leituras da absorbância

foram feitas em espectrofotômetro a 700 nm.

2.11 - PRODUTOS QUÍMICOS

Todos os reagentes químicos usados neste trabalho foram "pro-analysis" ou de melhor grau disponível comercialmente. A substância BDFIG (6-O-benzoil-3-desoxi-3-fluor-1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranose), foi sintetizada no laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica da U.F.Pr.¹.

RELAÇÃO DAS ABREVIACÕES (SIGLAS) APRESENTADAS NO PRESENTE TRABALHO:

BDFIG	(6-O-benzoil-3-desoxi-3-fluor-1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranose)
Tris	(tris hidroximetil amino metano)
EDTA	(etileno diamino tetracetato de sódio)
α KG	(alfa-cetogluturato)
TMPD	(N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamino)
ADP	(Adenosina-5'-difosfato)
ATP	(Adenosina-5'-trifosfato)
NADH	(nicotinamida-adenina-dinucleotídeo difosfopiridina-nucleotídeo) na sua forma reduzida
NAD ⁺	(nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (difosfopiridina - nucleotídeo) na sua forma oxidada.
DCIP	(diclorofenolindofenol)
PMS	(fenazina metosulfato)
DNP	(2-4 -dinitrofenol)
2DG	(2-desoxi-D-glucose)
3FG	(3-desoxi-3-fluor-D-glucose)
UDPG	(uridina difosfato glucose)
PGAs	(ácidos 2 e 3 fosfoglicéricos)
G-1-P	(glucose-1-fosfato)
F-6-P	(frutose-6-fosfato)
6FG	(6-desoxi-6-fluor-D-glucose)

RESULTADOS

RESULTADOS

1 - EFEITO DA SUBSTÂNCIA BDFIG SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO EM MITOCONDRIAS DE FÍGADO DE RATO ANALISADA POLAROGRAFICAMENTE.

a - Usando-se α -cetoglutarato como substrato.

Utilizando-se o método polarográfico para monitorar o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas pelo método descrito por VOSS et al.⁴³, observou-se que utilizando α -cetoglutarato como fornecedor de elétrons para cadeia respiratória e concentrações crescentes da substância BDFIG havia um decréscimo bastante acentuado na maioria dos parâmetros respiratórios analisados (Tabela I), notadamente a razão ADP:O e controle respiratório (RC). Esses resultados sugerem que a substância BDFIG ocasiona uma diminuição na capacidade fosforilativa, bem como uma inibição no estado II da respiração (Tabela III).

b - Usando-se o succinato como substrato.

Utilizando-se o succinato como substrato, observa-se um aumento na respiração mitocondrial (Estado II), como função de concentrações crescentes da substância BDFIG (Tabela II). Os parâmetros oxidativos de ADP:O e RC apresentam-se levemente diminuídos, sem no entanto apresentarem diferenças marcantes.

Esses resultados indicam que a substância BDFIG estimula o consumo de oxigênio mitocondrial quando o succinato é utilizado como fornecedor de elétrons para os segmentos da cadeia respiratória (Tabela III). A fosforilação oxidativa associada ao succinato parece não ser afetada.

TABELA I - EFEITO DA SUBSTÂNCIA BDFIG SOBRE OS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS DE MITOCÔNCRIAS DE FÍGADO DE RATO, USANDO α -CETOGLUTARATO COMO SUBSTRATO.

PARÂMETROS	T R A T A M E N T O				
	NORMAL	(BDFIG) nmoles /mg de proteína			
		300	600	800	1600
Estado II	0,23	0,17	0,16	0,15	0,16
Estado III	0,70	0,40	0,40	0,32	0,40
Estado IV	0,24	0,28	0,28	0,25	0,29
ADP:O	2,97	2,10	1,60	1,93	1,60
RC	2,93	1,47	1,35	1,25	1,35
Veloc. resp. após DNP	0,64	0,55	0,53	0,55	0,53

O α -cetogluturato foi usado como substrato (30 μ moles). O sistema consistiu de uma suspensão mitocondrial de 3,0 mg de proteína em 2,40 ml de meio de reação⁴³. ADP (0,5 μ moles) DNP (2-4-dinitrofenol, $2,5 \times 10^{-3}$ μ M). Temperatura 28°C. A velocidade de consumo de oxigênio foi expresso em μ M de O₂/seg. Os valores de ADP:O e RC são adimensionais.

TABELA II - EFEITO DA SUBSTÂNCIA BDFIG SOBRE OS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO, USANDO O SUCCINATO COMO SUBSTRATO.

PARÂMETROS	T R A T A M E N T O		
	NORMAL	(BDFIG) 600	800
Estado II	0,24	0,36	0,40
Estado III	0,82	0,67	0,72
Estado IV	0,32	0,32	0,36
ADP:O	2,13	1,65	1,70
RC	2,55	2,02	2,00
Veloc.resp. após DNP	0,64	0,64	0,68

O succinato foi usado como substrato (30 μ moles). O sistema constou de uma suspensão mitocondrial de 1,5 mg de proteína em 2,40 ml de meio de reação⁴³. ADP (0,5 μ moles). DNP (2-4-dinitrofenol, $2,5 \times 10^{-3}$ μ M). Temperatura 28°C. A velocidade de consumo de oxigênio foi expressa em μ M de O₂/seg. Os valores de ADP:O e RC são adimensionais.

TABELA III - EFEITO DA SUBSTÂNCIA BDFIG SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO II DA RESPIRAÇÃO EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO POR POLAROGRAFIA.

SUBSTRATOS	μM de O_2/seg	% estímulo	% inibição
α -cetogluturato	0,24	-	-
α -cetogluturato + BDFIG	0,15	-	38
Succinato	0,24	-	-
Succinato + BDFIG	0,40	67	-

Percentual de variação da respiração mitocondrial (Estado II) por tratamentos de mitocôndria com 800 nmoles de BDFIG/mg de proteína pré-incubado no sistema. Dados analisados a partir dos valores experimentais das Tabelas I e II.

2 - CONSUMO DE OXIGÊNIO MEDIDAS MANOMETRICAMENTE POR RESPIROMETRIA DE WARBURG.

a - Usando-se α -cetogluturato como substrato.

Analisando-se a respiração mitocondrial com período de tempo mais longos e usando α -cetogluturato como substrato, observa-se uma marcante inibição na capacidade respiratória da mitocôndria como função de concentrações crescentes da substância BDFIG. Para concentrações de substância de 400 η moles/mg de proteína mitocondrial, observa-se uma inibição de 49% na respiração, após uma hora de incubação, (Tabela IV).

b - Usando-se succinato como substrato.

Contrariamente, utilizando-se do succinato como substrato, observa-se um estímulo na respiração como função de concentrações crescentes da substância BDFIG. Para concentração da droga de 400 η moles/mg de proteína mitocondrial, observa-se um estímulo de 61% na respiração após uma hora de incubação (Tabela IV).

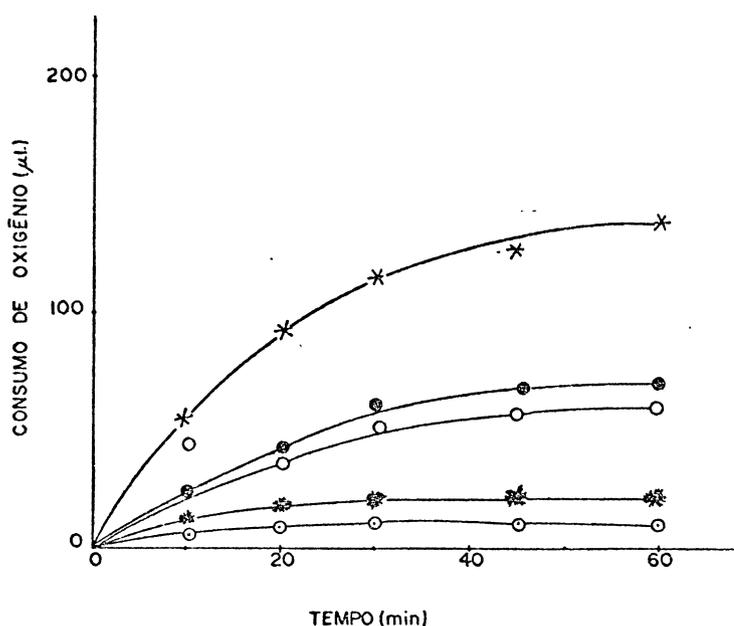


Figura 1 - Efeito da substância BDFIG sobre a velocidade de consumo de oxigênio por respirometria de Warburg.

Sistema constituído por meio de reação⁴³, (6mg de proteína) α -cetoglutarato (100 μ moles), 0,15 ml de KOH 20% no poço central do frasco, volume final: 2,85 ml, temperatura 38°C. Fase gasosa: ar atmosférico. Agitações/minuto = 100. Resultados foram expressos em μ litros de oxigênio consumido por minuto.

- * - Endógeno
- ⊙ - Endógeno + BDFIG (400 nmoles/mg de proteína)
- * - α -cetoglutarato normal
- - α -cetoglutarato + BDFIG (200 nmoles/mg de proteína)
- - α -cetoglutarato + BDFIG (400 nmoles/mg de proteína).

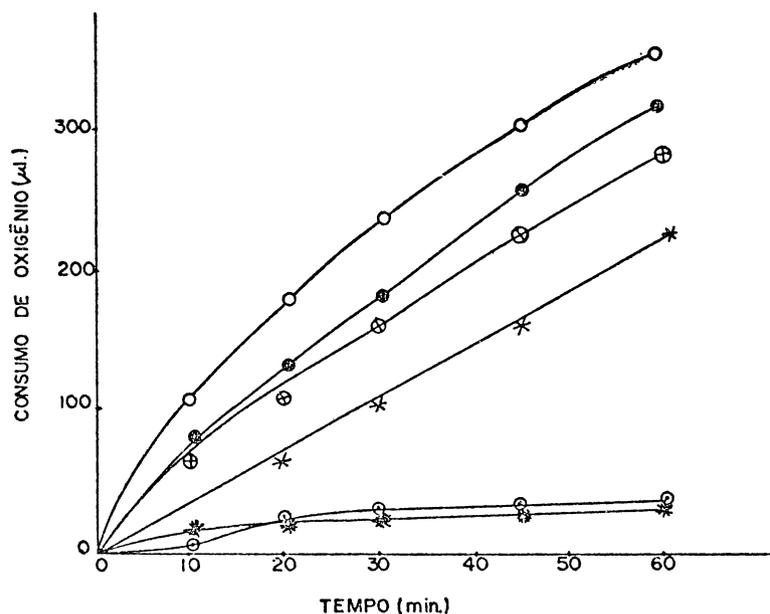


Figura 2 - Efeito da substância BDFIG sobre a velocidade de consumo de oxigênio por respirometria de Warburg.

Sistema constituído por: meio de reação⁴³, (6 mg de proteína), succinato (100 μmoles), 0,15 ml de KOH 20% no poço central do frasco, volume final: 2,85 ml, temperatura 38°C. Fase gasosa: ar atmosférico. Agitações/minuto = 100. Resultados foram expressos em μlitros de oxigênio consumido por minuto.

- * - Endógeno
- ⊙ - Endógeno + BDFIG (400 μmoles/mg de proteína)
- * - Succinato normal
- ⊕ - Succinato + BDFIG (50 μmoles/mg de proteína)
- - Succinato + BDFIG (100 μmoles/mg de proteína)
- - Succinato + BDFIG (400 μmoles/mg de proteína)

TABELA IV - EFEITO DA SUBSTÂNCIA SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO POR MITOCONDRIAS DE FÍGADO DE RATO POR MANOMETRIA DE WARBURG.

TRATAMENTO	$\mu\text{l}/60 \text{ min}$	% estímulo	% inibição
Controle	20	-	-
Controle + BDFIG	08	-	40
α -cetogluturato	136	-	-
α -cetogluturato + BDFIG	67	-	49
Succinato	224	-	-
Succinato + BDFIG	361	61	-

A velocidade respiratória foi expressa em ($\mu\text{l O}_2/60 \text{ min}$) para o tratamento correspondente a concentração da substância de 400 $\eta\text{moles / mg}$ de proteína mitocondrial conforme os valores experimentais extraídos das figuras 1 e 2.

3 - EFEITO DA SUBSTÂNCIA BDFIG SOBRE ATIVIDADE DE ENZIMA DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.

Os ensaios de atividade enzimática para enzimas associada a cadeia de transporte de elétrons, foram analisadas tanto polarograficamente quanto espectrofotometricamente. As enzimas mitocondriais, NADH desidrogenase, succinato desidrogenase, succinato oxidase e citocromo c oxidase, não apresentaram nenhuma diferença na atividade como função do tratamento com a BDFIG. Porém, a NADH oxidase, medida tanto polarograficamente como espectrofotometricamente, apresentou acentuada inibição, como ilustrado na Figura 3. Esses resultados são coerentes com a inibição de consumo de oxigênio quando se utilizou o α -cetogluratato como fornecedor de elétrons para cadeia respiratória.

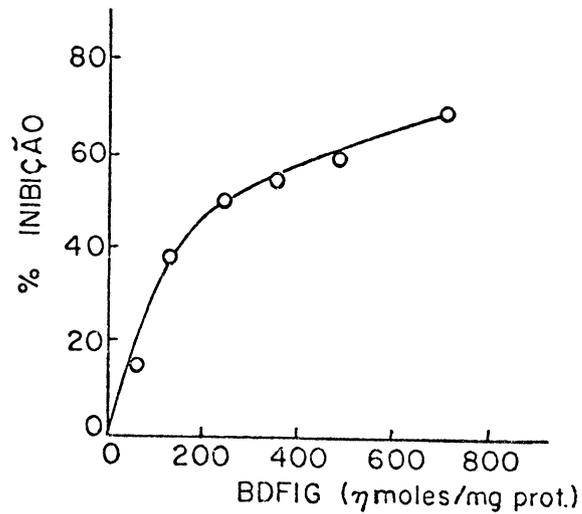


Figura 3 - Efeito da substância BDFIG, sobre a NADH OXIDASE, medida polarograficamente, utilizando-se mitocôndrias lisadas por congelamento.

Sistema: Tampão fosfato 50mM (3 ml), 2.5 mg de proteína.
Temperatura de 30°C.

Detalhes em Material e Métodos.

4 - ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DE VOLUME E RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM CONDIÇÕES DE EQUILÍBRIO DINÂMICO PARA MITOCÔNCRIAS TRATADAS COM EDTA.

A alteração de volume mitocondrial, analisadas segundo MUSTAFA et al.²⁸, está ilustrada na Figura 4. Utilizando-se de vários substratos para o fornecimento de elétrons em diferentes segmentos da cadeia respiratória, observa-se claramente que concentrações crescentes da substância BDFIG (Figuras 4B e 4C) alteram o volume mitocondrial quando em presença de substrato NAD-dependente, quando comparado com o normal (Figura 4A). Fornecendo-se elétrons para a cadeia respiratória via succinato e ascorbato não se observa nenhum efeito pela presença da substância BDFIG.

5 - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ALTERAÇÃO DE VOLUME MITOCONDRIAL EM CONDIÇÕES DE ESTADO OSCILATÓRIO.

A alteração de volume mitocondrial analisada segundo MUSTAFA et al.²⁸, está ilustrada na Figura 5. Utilizando-se o glutamato como substrato, observa-se uma abolição da oscilação mitocondrial em função de concentrações crescentes da BDFIG. Os parâmetros oscilatórios analisados segundo GOOCH e PACKER¹⁵, estão relacionados na Tabela V. Observa-se uma abolição gradual no meio período, período médio e fator de amortecimento. Um aumento nos valores de equilíbrio e relaxamento. O valor da amplitude inicial permanece inalterada.

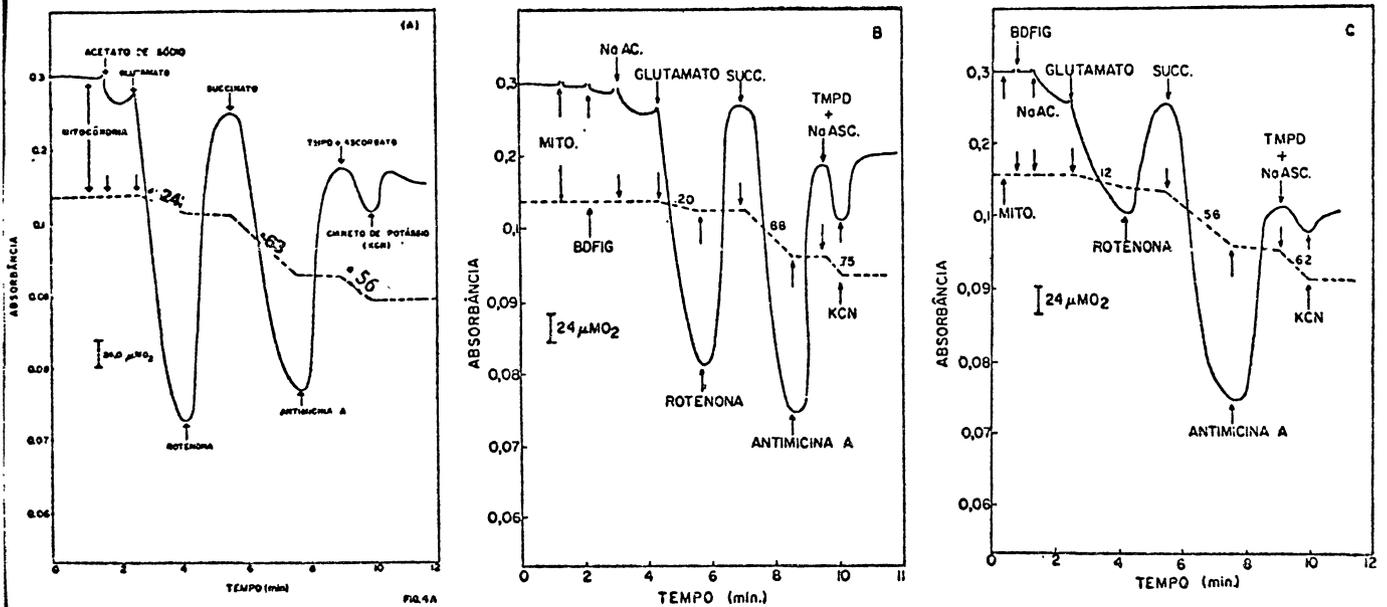


Figura 4 - EFEITO DA SUBSTÂNCIA BDFIG SOBRE A ALTERAÇÃO DE VOLUME EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO.

Sistema: O meio de suspensão continha sacarose (100 mM) ; TRIS-EDTA (0,3 mM) e 2,5 mg de proteínas em 3,0 ml de solução.

Adições: a - Substratos na forma de sais de sódio: acetato (50 mM), glutamato (10 mM), succinato (5 mM), ascorbato (5 mM).

b - Inibidores: rotenona (0,1 μ g/mg de proteína), antimicina A (0,1 μ g/mg de proteína), KCN (1mM).

A variação de volume mitocondrial foi monitorada espectrofotometricamente pela variação da absorbância a 540 nm. O consumo de oxigênio foi avaliado polarograficamente como μ M de O_2 /seg. A substância BDFIG foi pré-incubada no sistema antes da adição do iniciador.

A - Controle

B - BDFIG (0,72 μ moles/mg de proteína)

C - BDFIG (1,44 μ moles/mg de proteína)

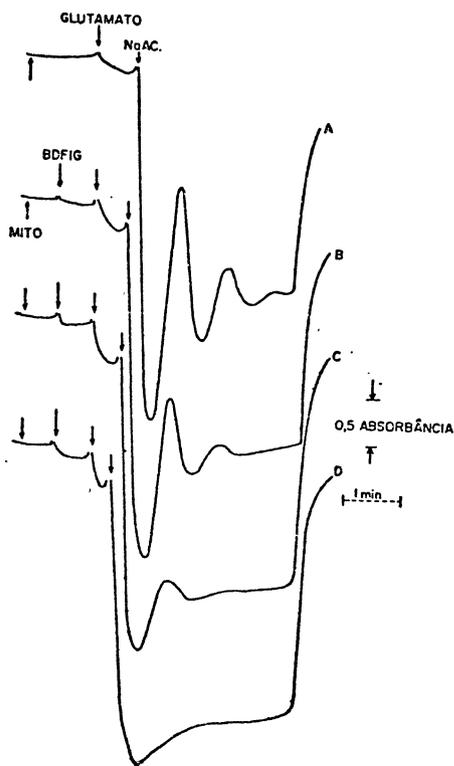


Figura 5 - EFEITO DA SUBSTÂNCIA BDFIG SOBRE A VARIAÇÃO DO VOLUME MITOCONDRIAL EM CONDIÇÕES DE OSCILAÇÃO AMORTECIDA EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO.

Sistema: O meio de suspensão continha sacarose (100 mM) , TRIS-HCl, (10 mM), pH 8.2, TRIS-EDTA (0,3mM) e 2,5 mg de proteína mitocondrial em 3,0 ml de solução.

Adições: Glutamato de sódio (0,06 mM), acetato de sódio (50mM).

A variação de volume mitocondrial foi monitorada espectrofotometricamente pela variação da absorbância a 575 nm. A substância BDFIG foi pré-incubada no sistema antes da adição do iniciador.

- A - Controle
- B - BDFIG (240 nmoles/mg de proteína)
- C - BDFIG (360 nmoles/mg de proteína)
- D - BDFIG (480 nmoles/mg de proteína)

TABELA V - VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESTADO OSCILATÓRIO MITOCONDRI-
AL PROMOVIDO POR GLUTAMATO EM FUNÇÃO DE CONCENTRAÇÕES CRES-
CENTES DA SUBSTÂNCIA BDFIG.

PARÂMETROS	T R A T A M E N T O S			
	NORMAL	(BDFIG) nmoles / mg de proteína		
		240	360	480
AMPLITUDE	0,30	0,31	0,29	0,27
MEIO PERÍODO	0,022	0,021	0,013	abolido
PERÍODO MÉDIO	0,045	0,050	0,054	abolido
FATOR DE AMOR- TECIMENTO	3,30	5,40	5,35	abolido
EQUILÍBRIO	0,18	0,21	0,21	0,23
RELAXAÇÃO	0,15	0,18	0,20	0,22

Os valores apresentados acima foram extraídos da Figura 5. Baseado nos cálculos dos parâmetros convencionais para o estudo da oscilatória, segundo GOOCH e PACKER¹⁵, foi montada uma tabela cujos valores em unidades de comprimento (cm) foram transformadas em suas correspondentes unidades em densidade ótica.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

No presente trabalho, utilizando-se de mitocôndrias de fígado de rato, observou-se que concentrações crescentes da substância BDFIG, inibia progressivamente a respiração mitocondrial, utilizando-se o substrato NAD-dependente, α -cetogluturato, como fornecedor de elétrons para cadeia respiratória (Figura 1). A capacidade fosforilativa associada ao substrato NAD-dependente, também é acentuadamente inibida (Tabela I), analisados pelos parâmetros ADP:O e controle respiratório (RC).

A oscilação de volume mitocondrial analisada espectrofotometricamente em sistemas provocado por energia proveniente do transporte de elétrons (Figura 5), é acentuadamente reduzida quando se utiliza o substrato NAD-dependente (glutamato) como fornecedor de elétrons.

No caso da utilização de um substrato FAD-dependente (succinato), observou-se que a respiração mitocondrial era acentuadamente estimulada (Tabela IV). A velocidade respiratória do estado III e estado IV não são significativamente alterados (Tabela II). A capacidade fosforilativa associada ao succinato também não é significativamente afetada.

A alteração de volume mitocondrial em condições de equilíbrio dinâmico provocado por transporte de elétrons, não sofre alteração com a utilização de substratos, succinato ou ascorbato na presença da droga (Figura 4).

A análise de sistemas enzimáticos mitocondriais monitoradas na ausência e presença da droga, indicaram que a droga BDFIG atua seletivamente sobre a NADH OXIDASE inibindo o complexo I da cadeia respiratória à semelhança de amital e rotenona⁹. Foi constatado por VIANNA et al.⁴² que extratos alcoólicos de raízes de *Derris negrensis*, incluindo a rotenona como um dos componentes, e com tratamentos realizados "in vivo" e "in vitro" em camundongos, inibiam a oxidação e fosforilação oxidativa do glutamato em mitocôndrias de fígado de rato, e estimulavam a oxidação com succinato. O "swelling" in

duzido pela adição do glutamato era revertido pelo extrato alcoólico da mesma maneira que a rotenona. A substância BDFIG reverte o "swelling" provocado pelo glutamato de maneira análoga a rotenona. Demonstra, no entanto, ser menos eficiente no processo, indicando que a rotenona é mais específica como inibidora, que a substância BDFIG. Em um trabalho realizado por SILVEIRA et al.³⁷, sobre a ação da rotenona e oxidação do succinato em mitocôndrias de coração de rato foi observado que a rotenona aumentava a atividade de oxidação do succinato, embora não evidenciasse atividade sobre a desidrogenase succínica e malato desidrogenase. A aspartato amino transferase foi inibida, somente cerca de 14% e constataram uma apreciável diminuição no nível de oxaloacetato. O resultado experimental, com a substância BDFIG sobre a desidrogenase succínica, não evidenciou atividade nenhuma, embora a respiração se apresentasse acentuadamente, estimulada com succinato. Ensaio sobre a NADH OXIDASE, revelaram uma acentuada inibição na presença da substância BDFIG, inibindo o complexo I da cadeia respiratória. Este fato conduz à sugestão, que a BDFIG poderia ocasionar uma diminuição no nível de oxaloacetato intramitocondrial.

O oxaloacetato é conhecido, como um dos mais potentes inibidores competitivos da desidrogenase succínica. O valor da KI é de 4,5 μM e também liga-se à enzima de maneira pseudo-irreversível a uma razão molar de 1:1. O mecanismo de ação de diversos substratos sobre a desidrogenase succínica na presença e ausência da rotenona foram discutidos com base nos dados obtidos. O estímulo verificado pela presença de α -cetogluturato e glutamato não são influenciados pela presença da rotenona. O α -cetogluturato e malato removem o oxaloacetato pela troca de carreadores dicarboxilados. O glutamato remove o oxaloacetato por transaminação¹⁹.

O mecanismo regulador para desidrogenase succínica em mitocôndrias intactas ainda não é bem compreendida. Vários autores sugeriram^{19,37} que o efeito causado pela rotenona está localizada entre a NADH desidrogenase e CoQ e que a inibição de substratos NAD dependentes estimula a oxidação do succinato, provavelmente, por impedir a reoxidação da NADH pela cadeia respiratória, por mecanismo de "feed back" por diminuição do nível de oxaloacetato. Resultados semelhantes foram obtidos por KLÜPPEL et al.²² com tratamentos de mitocôndrias de coração de rato com maleato de perexilina. Outros autores^{34,37}, com tratamentos de iproveratril e propanolol em mitocôndrias de coração de rato, obtiveram resultados análogos. Na presença dessas substâncias, nenhuma atividade sobre a desidrogenase succíni-

ca pode ser detectada. A bem conhecida reação malato \longrightarrow oxaloacetato, é dependente da razão NADH/NAD. Um inibidor para NADH OXIDASE, impede a reoxidação do NADH produzido pelo próprio ciclo, favorecendo dessa maneira a formação de malato as custas de oxaloacetato, invertendo o curso da reação.

Desacopladores em baixa concentração alteram as trocas oscilatórias mitocondriais em condições de oscilação amortecida. Os resultados experimentais ilustrados na Tabela V, não sugerem que a substância BDFIG possa atuar à semelhança de desacopladores. Segundo alguns autores^{2,40}, a interação de desacopladores com liposomos fosfolipídicos e bicamadas manifestam-se pelo aumento do "swelling" devido ao aumento da permeabilidade da membrana para H^+ . Para GOOCH e PACKER¹⁵, a presença de desacopladores mitocondriais deveriam aumentar a amplitude e o fator de amortecimento, enquanto que o período médio deveria decrescer. Esses resultados são coerentes com o propósito que desacopladores aumentam a permeabilidade passiva aos H^+ . Observou-se, no entanto, uma gradual diminuição nas amplitudes, como função do aumento crescente da concentração da BDFIG. A presença de 480 nmoles/mg de proteína da substância BDFIG, aboliu completamente o fator de amortecimento e período médio. Esse fato leva a sugerir que a substância em estudo possa atuar sobre a membrana mitocondrial, ou pela alteração de sua elasticidade provocando o rompimento da mesma ou, talvez, por uma mudança configuracional, alterando a permeabilidade para íons. Os resultados experimentais da Figura 4, evidenciam que não houve rompimento da membrana, considerando que ainda ocorreu o "swelling" mesmo com tratamento da mitocôndria com a substância BDFIG. Segundo GOOCH e PACKER¹⁵ a relaxação indica a variação nos parâmetros medidos que ocorre quando o gradiente iônico é dissipado de repente, que na maioria dos casos ocorre quando a mitocôndria perde o seu suprimento em energia, tais como quando inibidores são aplicados ou quando o oxigênio do meio foi consumido totalmente. Da Tabela V, houve um aumento de 46,6% no valor da relaxação, quando a substância BDFIG foi usada na concentração de 480 nmoles/mg de proteína. Esse resultado leva a supor que o gradiente iônico foi alterado.

Os resultados obtidos no presente trabalho, sugerem que a substância BDFIG possa atuar a nível de membrana mitocondrial induzindo uma modificação configuracional que poderia ocasionar uma alteração nas propriedades das flavoproteínas.

Apesar das experimentações realizadas fica difícil estabelecer se o mecanismo da ação da substância BDFIG manifestada pelo

estímulo na oxidação do succinato e inibição da oxidação do NADH é de fato de responsabilidade de alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

- 1 - A substância BDFIG inibe a respiração dos substratos NAD-dependentes (α -cetogluturato) e estimula a respiração do succinato.
- 2 - A substância BDFIG inibe os parâmetros oxidativos ADP:O e RC na presença de um substrato NAD-dependente (α -cetogluturato) e na presença de um substrato FAD-dependente (succinato) os mesmos não sofrem alterações apreciáveis.
- 3 - A análise de sistemas enzimáticos mitocondriais na presença da substância BDFIG revelou-se ativa somente para NADH OXIDASE inibindo o complexo I à semelhança de amital e rotenona.
- 4 - A substância BDFIG reduz a oscilação de volume mitocondrial em condições de estado de equilíbrio dinâmico, na presença de glutamato, sem provocar alterações na presença de succinato e ascorbato.
- 5 - A substância BDFIG aboliu a oscilação mitocondrial em função de concentrações crescentes da substância BDFIG em condições de estado oscilatório.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Utilizando-se de técnicas polarográficas convencionais para medida da respiração e fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, observou-se um decréscimo na oxidação do α -cetogluturato e uma diminuição da razão dos parâmetros oxidativos RC e ADP:O.

No caso da utilização do succinato como fornecedor de elétrons, observou-se que a respiração mitocondrial era significativamente estimulada. A velocidade respiratória do estado III e estado IV não eram afetados significativamente, nem a sua capacidade fosforilativa.

Utilizando-se a respirometria de Warburg para medida do consumo de oxigênio, observou-se que a oxidação do succinato era estimulada e a do α -cetogluturato inibida, pelo tratamento da mitocôndria com a substância BDFIG.

A alteração do volume mitocondrial em estado de equilíbrio dinâmico sofreu acentuada abolição quando se utilizou o substrato NAD-dependente (glutamato) como fornecedor de elétrons. Nenhum efeito foi observado com succinato ou ascorbato na presença da substância BDFIG.

Evidências que a BDFIG atua seletivamente sobre a NADH OXIDASE foram demonstrada pela análise espectrofotométrica e polarográfica da atividade da enzima.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

- Pela orientação, pela amizade e apoio durante o desenvolvimento desta tese, meus sinceros agradecimentos:

Ao Doutor Dinor O. Voss

Ao Doutor Annibal P. Campello

- Ao Doutor Aguinaldo José do Nascimento, pela sincera amizade e pela colaboração durante a elaboração do presente trabalho.
- À Doutora Glaci Terezinha Zancan, pelo apoio, compreensão e atenção recebido.
- Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.
- À FINEP pelo auxílio financeiro.
- Aos colegas e amigos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, um especial agradecimento pelo carinho, amizade, incentivo e colaboração que nunca faltaram.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVAREZ, M.; DUARTE, J.H.; CAMPELLO, A.P. Sugar derivatives and liver mitochondria. 1-Effect of methyl-3-5-di-O-benzyl-2-cloro-2-deoxy-D-arabinofuranoside. Res. Commun. Chem. Path. Pharm., 24: 181-195, 1979.
2. BAKKER, E.P.; VAN DEN HEUVEL, E.J.; WIECHMANN, A.H.C.A.; VAN DAM, K. A comparison between the effectiveness of uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria and in different artificial membrane systems. Biochem. Biophys. Acta., 292: 78-87, 1973.
3. BARNETT, J.E.G. Halogenated Carbohydrates. In: ADVANCES in Carbohydrate Chemistry. New York and London, Academic Press, 1967. V. 22, p. 177-227.
4. BARTLETT, G.R. & BARRON, E.S.G. Hypothesis of Bartlett and Barron. The effect of fluoroacetate on enzymes and tissue metabolism. Its use for the study of oxidative pathway of piruvate metabolism. J. Biol. Chem., 170: 67-82, 1947.
5. BIELY, P.; KOVARIK, J.; BAUER, S. Lysis of *Saccharomyces cerevisiae* with 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose an inhibitor of cell wall glucan synthesis. J. Bacteriol., 115: 1108-1120, 1973.
6. BLANKLEY, E.R. & BOYER, P.D. The effect of 6-deoxy-6-fluoro-D-glucose on yeast fermentation and on hexokinase. Biochem. Biophys. Acta., 16: 676-582, 1955.
7. BRUNT, R.V. & TAYLOR, N.F. The metabolism of 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. 105:41c-43c, 1967.
8. CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. Nature, 175: 1120-1121, 1955.
9. CHANCE, B. & HOLLUNGER, G. Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria. 1-Effects of amital, thiopental, rotonona, progesterona and methylene glycol. J. Biol. Chem. 238:418-431, 1963.

10. COE, E.L. Inhibition of glycolysis in ascites tumor cells pre-incubated with 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. Biochem. Biophys. Acta., 264: 319-327, 1972.
11. CRAMER, F.G. & WOODWARD, G.E. 2-deoxy-D-glucose as an antagonist of glucose in yeast fermentation. J. Frank. Inst., 253: 354-360, 1952.
12. ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. In: METHODS in Enzymology. New York, Academic Press, 1967. V.10, p.41-47.
13. FOSTER, A.B., HEMS, R.; WEBBER, J.M. Fluorinated carbohydrates, part 1. 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose. Carbohydr.Res., 5: 292-301, 1967.
14. GOLDMAN, P. The enzymatic cleavage of carbon-fluorine bond in fluoroacetate. J. Biol. Chem., 240 (8): 3434-3438, 1965.
15. GOOCH, V.D. & PACKER, L. Oscillatory systems in mitochondria. Biochem. Biophys. Acta, 346: 245-260, 1974.
16. GRIMM, H.G. & WOLF, H. In: BARTLETT, G.R. & BARRON, E.S.G. The effect of fluoroacetate on enzymes and tissue metabolism. Its use for the study of the oxidative pathway of pyruvate metabolism. J. Biol. Chem., 170: 67-82, 1947.
17. HELFERICH, B.; GRUNLER, S.; GNUCHTEL, A. Uber Emulsin. XXX-Die Fermentative Spaltung von 6-Halohydrin- β -D-Glucosiden und verwandten Verbindungen. Z. Physiol. Chem., 248: 85-95, 1937.
18. HEREDIA, C.F.; SOLS, A.; DELA FUENTE, G. Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. Eur. J. Biochem., 5: 321-329, 1968.
19. HILLAR, M.; LOTT, V.; LENNOX, B. Correlation of the effects of citric acid cycle metabolites on succinate oxidation by rat liver mitochondria and submitochondrial particles. Bioenergetics, 7: 1-16, 1975.
20. KALNITSKY, G. & BARRON, G.E.S. The effect of fluoroacetate on metabolism of yeast and bacteria. J. Biol. Chem., 170: 63-95, 1947.

21. KIPNIS, D.M. & CORI, C.F. Studies of tissue permeability. The penetration and phosphorylation of 2-deoxyglucose in rat diaphragm. J. Biol. Chem., 234: 171-177, 1958.
22. KLÜPPEL, M.L.W.; LOPES, L.C.V.; SILVEIRA, O.; CAMPELLO, A.P. Possible mechanism of action of perhexiline on heart mitochondria. Biochem. Pharmacol., 25: 2383-2386, 1976.
23. LIEBÉCQ, C. & PETERS, R.A. The toxicity of fluoroacetate and the tricarboxylic acid cycle. Biochem. Biophys. Acta., 3:215-230, 1949.
24. LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
25. Mc DONALD, E. Notes from the biochemical research foundation. The future of cancer research. J. Frank. Inst., 253: 283-288, 1952.
26. MELCHERS, F. Biosynthesis intracellular transport and secretion of immunoglobulins. Effect of 2-deoxy-D-glucose in tumor plasma cells producing and secreting immunoglobulin. Biochemistry, 12: 1471-1476, 1973.
27. METZGER, R.P.; WILCOX, S.S.; WICK, A.N. Studies with rat liver glucose dehydrogenase. J. Biol. Chem., 239, 1769-1772, 1963.
28. MUSTAFA, M.G.; UTSUMI, K.; PACKER, L. Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. Biochem. Biophys. Res. Commun., 24: 381-386, 1966.
29. PETERS, R.A. & HALL, R.J. Further observations upon the toxic principles of *Dichapetalum toxicarium*. Biochem. Pharmacol., 2: 25-36, 1959.
30. PETERS, R.A.; HALL, R.J.; WARD, P.F.V.; SHEPPARD, N. The chemical nature of the toxic compounds containing fluorine in seeds of *Dichapetalum toxicarium*. Biochem. J., 77: 17-23, 1960.
31. POTTER, V.R. & ELVEHJEN, C.A. A modified method for the study of tissue oxidation. J. Biol. Chem., 114; 495-504, 1936.

32. RENNER, E.D.; PLAGEMANN, P.G.W.; BERNLOHR, R.W. Permeation of glucose by simple and facilitated diffusion by Novikoff rat hepatoma cells in suspension culture and its relationship to glucose metabolism. J. Biol. Chem., 247: 5775-5776, 1972.
33. ROMANSCHIN, A.; TAYLOR, N.F.; SMITH, D.A.; LOPES, D. The metabolism of 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose by *Locusta migratoria* and *Shistocerca gregaria*. Can. J. Biochem., 55: 369-375, 1976.
34. SAKURADA, A.; SILVEIRA, O.; WAMBIER, M.L.; BRANDÃO, D., CAMPELLO, A.P. Regulation of succinic dehydrogenase activity of heart mitochondria by antiarrhythmic drugs. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 11 (1). 89-97, 1975.
35. SCHMIDT, M.F.G.; SCHWARZ, R.T.; SCOLTISSEK, C. Nucleoside diphosphate derivatives of 2-deoxy-D-glucose in animal cells. Eur. J. Biochem. 49: 237-247, 1974.
36. SCHMIDT, M.F.G.; SCHWARZ, R.T.; LUDWIG, H. Fluoro sugars inhibit biological properties of different enveloped viruses. J. Virol., 18: 819-823, 1976.
37. SILVEIRA, O.; KLÜPPEL, M.L.W.; ODEBRECHT, S.; CAMPELLO, A.P. Effects of rotenona on succinate oxidation by isolated heart mitochondria. Arq. Biol. Tecnol., 21: 9-12, 1978.
38. SINGER, T.P. Determination of the activity of succinate, NADH, Choline and α -glycerophosphate dehydrogenases. In: METHODS in Biochemical Analysis. New York, Wiley, J. 1974, v. 22 p. 123-175.
39. SOMLO, M. Induction des lactico-cytochrome c reductase (D-ETL-) de la levure aerobie par les lectates (D-ETL-). Biochem. Biophys. Acta., 97: 183-201, 1965.
40. TERADA, H. Some biochemical and physicochemical properties of the potent uncoupler SF 6847 (3,5-di-ter-butyl-4-hydroxybenzylidenemalonitrile). Biochem. Biophys. Acta., 387: 519-532, 1975.
41. UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.M.; STAUFFER, J.F. Constant volume manometry of Warburg, In: MANOMETRIC and Biochemical Techniques.

5º ed. Minneapolis. Burgess Publishing Co. pp. 1-19, 1972.

42. VIANNA, C.H.M.; ODEBRECHT, S.; CAMPELLO, A.P. Ação tóxica de extratos de *Derris Negrensis* (Timbó) "in vivo" "in vitro". Arq. Biol. Tecnol., 22: 95-110, 1979.
43. VOSS, D.O.; CAMPELLO, A.P.; BACILA, M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 4: 48-51, 1961.
44. WOODWARD, G.E. & CRAMER, F.B. The future cancer research. 2-deoxy-D-glucose as an inhibitor of anaerobic glycolysis in tumor tissue. J. Frank. Inst., 253: 259-260, 1952.
45. WOODWARD, S., TAYLOR, N.F.; BRUNT, R.V. Effect of 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose on *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J., 114: 445-447, 1969.
46. WOODWARD, B.; TAYLOR, N.F.; BRUNT, R.V. Effect of 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose on glycolytic intermediates and adenina nucleotides in resting cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Pharmacol., 20 : 1071-1077, 1971.