

MARIA TERESA CORDEIRO CID BASTOS

“Efeito do Metotrexato Sobre o Transporte Mitocondrial  
de Cálcio, a Lançadeira Malato-Aspartato e Alguns  
Metabólitos de Células Hela”

Tese apresentada ao Departamento de Bio-  
química da Universidade Federal do Paraná,  
para obtenção do título de Mestre em Bio-  
química.

CURITIBA

1989

Tese orientada pelas Professoras  
Dra. MARIA LÚCIA WAMBIER KLÜPPEL  
e Dra. MARIA BENIGNA MARTINELLI  
DE OLIVEIRA.

## AGRADECIMENTOS

Às Professoras Dra. MARIA LÚCIA WAMBIER KLÜPPEL e Dra. MARIA BENIGNA MARTINELLI DE OLIVEIRA, pela orientação, dedicação, apoio e amizade.

Ao Professor Dr. ANNIBAL DE PAIVA CAMPELLO, pela leitura e sugestões apresentadas.

Aos amigos do laboratório de Oxidações Biológicas, pelo apoio e convivência estimulantes.

Aos Professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica, pela amizade.

À minha irmã e meu cunhado, pelo carinho e hospitalidade.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro (Proc. 401113/87-6 e 403583/88-8).

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

## SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
RESUMO .....	ix
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
I.1 Revisão sobre metotrexato .....	1
I.1.1. Propriedades químicas .....	1
I.1.2. Mecanismo de ação .....	1
I.1.3. Farmacologia bioquímica .....	4
I.1.4. Indicações clínicas, resgate e resistência.	7
I.1.5 Citotoxicidade e efeitos tóxicos gerais .....	8
I.2 Transporte mitocondrial de cálcio .....	11
I.3 Transporte de equivalentes redutores para as mitocôndrias .....	13
I.4 Objetivos .....	13
<b>II. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
II.1. Reagentes .....	16
II.2. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato	16
II.3. Cultivo e colheita celular .....	17
II.3.1. Esterilização de materiais e soluções .....	17
II.3.2. Caracterização e manutenção das células ...	17
II.3.3. Cultivo e colheita de células HeLa .....	18
II.4. Dosagem de proteína .....	19
II.5. Determinação do consumo de oxigênio .....	19
II.6. Obtenção das razões RC e ADP/O .....	19
II.7. Ação do malonato e do MTX sobre a velocidade de respiratória .....	19
II.8. Ação do MTX sobre a malonato-desidrogenase mitocondrial .....	20
II.9. Ação do MTX, arsenito, malonato e amino-oxi acetato sobre a malato-desidrogenase purifi cada (EC .1.1.1.37). .....	20
II.10. Ação do MTX, arsenito, malonato e amino-oxi acetato sobre a glutamato-aspartato amino- transferase putificada (EC .2.6.1.1). .....	21
II.11. Ação do MTX, malonato, arsenito e amino-oxi acetato sobre o sistema enzimático MDH/GOT.	21
II.12. Medidas de captação e efluxo de cálcio ....	23

II.13.	Cálculo de viabilidade celular .....	24
II.14.	Incubação para dosagem de metabólitos de células HeLa .....	24
II.15.	Extração dos metabólitos de células HeLa ..	24
II.16.	Determinação de $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .....	25
II.17.	Dosagem de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ .....	27
II.18.	Determinação de ATP .....	27
II.19.	Determinação de ADP e piruvato .....	29
II.20.	Determinação de lactato .....	29
II.21.	Estudo da lançadeira malato-aspartato em células HeLa .....	30
III.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
III.1.	Ação do MTX sobre o transporte mitocondrial de cálcio .....	31
III.2.	Avaliação da lançadeira malato-aspartato em mitocôndrias isoladas de fígado de rato ...	33
III.2.1.	Introdução .....	33
III.2.2.	Ação do arsenito e malonato sobre as enzimas MDH e GOT .....	33
III.2.3.	Inibição do ciclo de Krebs pelo malonato ..	37
III.2.4.	Inibição do consumo de oxigênio pelo MTX na presença de malonato e malato .....	37
III.2.5.	Efeito do MTX sobre a malato-desidrogenase e a glutamato-aspartato aminotransferase purificadas, e o sistema reconstituído MDH/GOT	37
III.2.6.	Ação do MTX sobre a MDH mitocondrial .....	41
III.3.	Avaliação da lançadeira malato-aspartato em células HeLa .....	46
III.3.1.	Introdução .....	46
III.3.2.	Inibição da via glicolítica .....	47
III.3.3.	Uso do amino-oxiacetato .....	47
III.3.4.	Estudo da lançadeira malato-aspartato .....	47
III.4.	Ação do MTX sobre os níveis de alguns metabólitos em células HeLa .....	55
IV.	<b>DISCUSSÃO FINAL</b> .....	58
V.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	62
VI.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	- ácido
ADH	- álcool-desidrogenase
ADP	- difosfato de adenosina
ATP	- trifosfato de adenosina
ATPase	- adenosina-trifosfatase
BSA	- soro-albumina bovina
CoA	- coenzima A
C.R.	- cadeia respiratória
DAMPA	- ácido 2,4-diamino-N <sup>10</sup> metilpteróico
DCPIP	- diclorofenol-indofenol
DHF	- di-hidrofolato
DHFR	- di-hidrofolato-redutase
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DNPH	- dinitrofenil-hidrazina
EDTA	- ácido etileno-diaminotetra-acético
EGTA	- ácido etilenoglicol-bis ( $\beta$ amino-etiléter) N,N-tetra-acético
FAD	- flavina adenina dinucleotídeo
FCCP	- carbonilcianeto - p - trifluorometoxifenil hidrazona
GOT	- glutamato-aspartato aminotransferase
$\alpha$ -GPDH	- $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase
G 6 PDH	- glucose-6-fosfato desidrogenase
GTP	- trifosfato de guanosina
HEPES	- N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-ácido etanosulfônico
HK	- hexoquinase
ICDH	- isocitrato-desidrogenase
$\alpha$ -KGDH	- $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase
LDH	- lactato-desidrogenase
MDH	- malato-desidrogenase
min	- minutos
MMI	- membrana mitocondrial interna
MTX	- metotrexato
NAD <sup>+</sup>	- nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP <sup>+</sup>	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
7-OH-MTX	- 7-hidroxi-metotrexato
PABA	- ácido para-aminobenzóico
PBS	- solução salina tamponada
PDH	- piruvato-desidrogenase

Pi	- fosfato inorgânico
PK	- piruvato-quinase
PMTS	- fenazina metasulfato
PPi	- pirosfato inorgânico
RC	- controle respiratório
RNA	- ácido ribonucleico
THF	- tetrahydrofolato
TRIS	- tris (hidroximetil) aminometano
TS	- timidilato sintetase
U	- unidades

## R E S U M O

Estudou-se o efeito do MTX sobre o transporte mitocondrial de cálcio, usando-se mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Em concentrações entre 0,4 e 1,6  $\mu\text{moles}$  de  $\text{MTX}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial, observou-se redução do influxo e aumento do efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , progressivos, de até 20%.

Ao ser avaliada a ação da droga sobre a lançadeira malato-aspartato, notou-se que a oxidação do malato, em mitocôndrias intactas de fígado de rato, foi 30% inibida durante os estados III e IV, em concentrações de MTX acima de 0,5  $\mu\text{moles}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. Os sistemas enzimáticos MDH/GOT e MDH purificada, foram 100% inibidos em concentrações de 0,5mM e 0,34mM de MTX, respectivamente. A MDH mitocondrial, na presença de FCCP e rotenona, mostrou-se 100% inibida pela droga em concentrações acima de 0,35  $\mu\text{moles}$  de  $\text{MTX}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.

Em células HeLa, a lançadeira malato-aspartato foi avaliada através do acúmulo de piruvato, proveniente da oxidação de lactato adicionado, na presença de inibidores da via glicolítica (fluoreto) e do ciclo de Krebs (malonato). O acúmulo de piruvato foi totalmente inibido pelo amino-oxiacetato, e 73% inibido na presença de rotenona, comprovando que células HeLa usam preferencialmente a lançadeira malato-aspartato para o transporte de equivalentes redutores para as mitocôndrias. O MTX (0,4mM) inibiu o acúmulo de piruvato em 44%, devido à sua ação sobre as enzimas LDH e MDH.

Incubando-se por 30 minutos células HeLa com MTX (0,4mM), na presença de 1mM de glucose, notou-se, em relação ao controle sem droga: acúmulo de ADP e diminuição de ATP, de 20%, com aumento da relação ADP/ATP; acúmulo de  $\text{NAD}^+$  e decréscimo de NADH de 15%, com diminuição da razão  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ ; decréscimo de NADPH, de 14%, com redução da razão  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ ; acúmulo de 26% de piruvato, e decréscimo de 33% na produção de lactato, com diminuição da razão lactato/piruvato.

## I - INTRODUÇÃO

### I.1. REVISÃO SOBRE METOTREXATO

#### I. 1.1. PROPRIEDADES QUÍMICAS

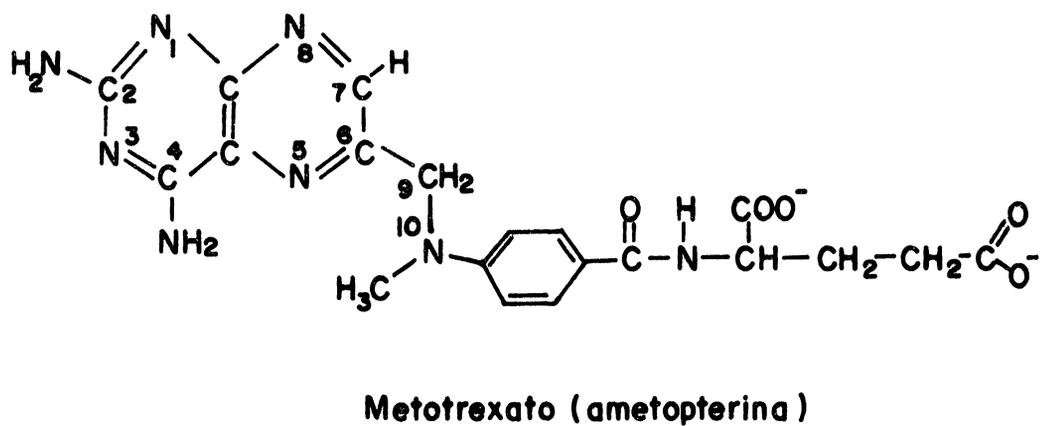
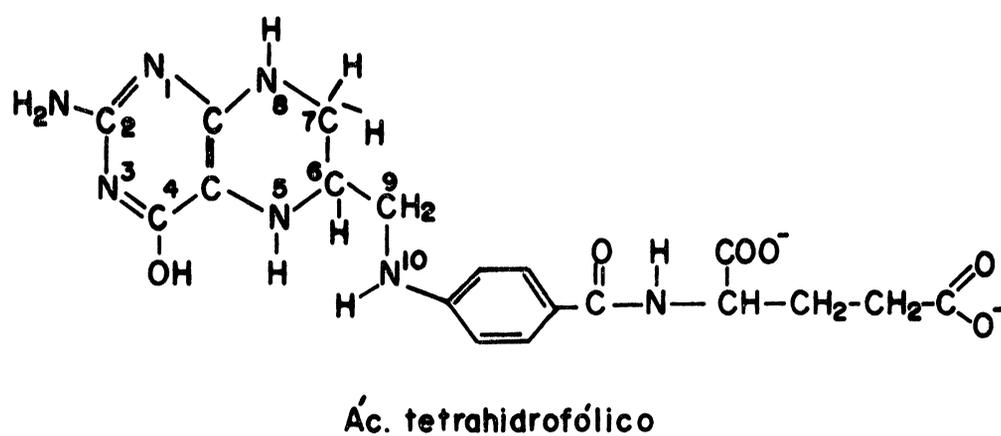
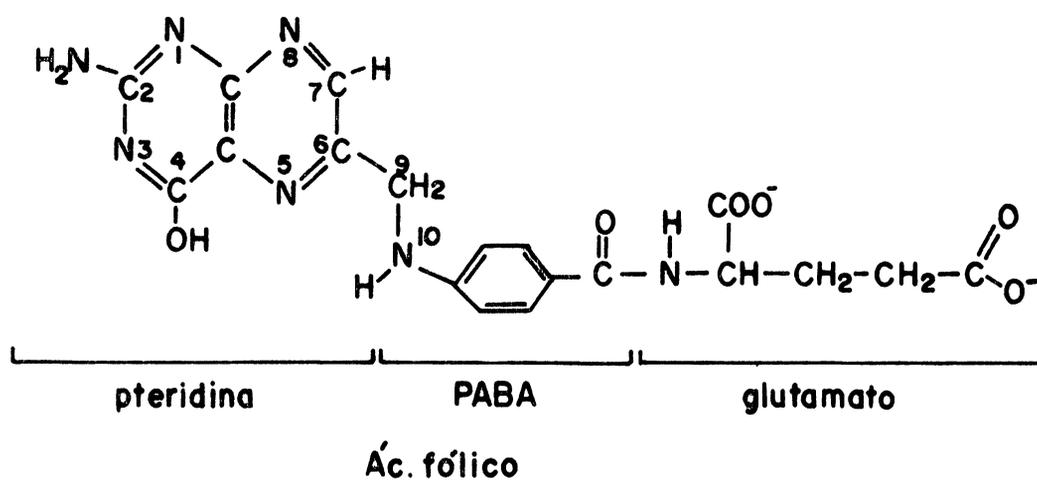
O metotrexato, ácido N-(p-|(2,4-diamino-6-pteridinil)metilamino|benzoil|glutâmico, é um análogo estrutural do ácido fólico, do qual difere essencialmente pela substituição do grupo 4-oxo pelo grupo 4-amino. Apresenta também um radical metila na posição N<sub>10</sub>, sendo que esta diferença parece ter pouco efeito na ligação com a enzima dihidrofolato redutase (Roberts, 1978). É um composto alaranjado, microcristalino, com peso molecular de 454,5. Em pH fisiológico, é solúvel em água e praticamente insolúvel em solventes orgânicos. Os dois grupos carboxílicos da porção glutâmica conferem-lhe propriedades ácidas, com pKa = 4,84 e 5,51. O aminogruppo do anel pteridínico é fracamente básico (Lippens, 1984) (Esquema 1).

#### I.1.2. MECANISMO DE AÇÃO

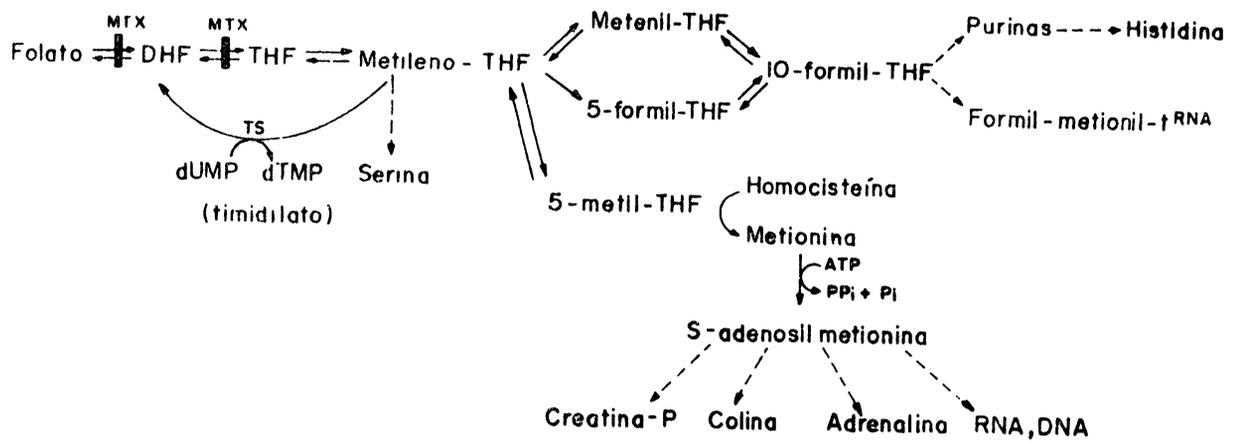
O MTX inibe a redução do dihidrofolato a tetrahydrofolato, ligando-se à enzima DHFR com uma afinidade dez mil vezes maior que a do verdadeiro substrato, sendo então um inibidor competitivo. Desta forma, causa uma depleção do "pool" de derivados do tetrahydrofolato, que são coenzimas necessárias para as reações de transferência de um carbono na síntese de timidilatos, de metionina e da síntese "de novo" de purinas. Ocorre então, inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas (Roberts, 1978)(Esquema 2).

Na ligação do MTX à enzima DHFR, o grupo carboxílico do resíduo Asp<sub>27</sub> da enzima forma uma ponte salina com o grupo N-4 amino do MTX, o qual se encontra protonado. Este par conserva-se ionizado mesmo em pH acima de 10. Esta ponte não se forma na ligação da enzima com o verdadeiro substrato, pois este não se encontra protonado (Taira et al., 1987). Na formação do complexo ternário enzima-MTX-NADPH, nota-se que a ligação da coenzima reduzida à enzima tem um efeito sinérgico sobre a ligação do MTX (Stone e Morrison, 1986).

Após a formação do complexo ternário, ocorre uma etapa



ESQUEMA 1 - Estruturas do ácido fólico, ácido tetrahidrofólico e metotrexato.



ESQUEMA 2 - Derivados do tetrahidrofolato como transportadores de um carbono em reações de biossíntese.

lenta, correspondente a uma mudança conformacional do complexo (Roberts, 1978), para a qual é essencial a porção p-aminobenzoil glutâmica do MTX. Essa mudança conformacional consiste na rotação de  $180^\circ$  da cadeia aromática ao redor do eixo C<sub>6</sub>-C<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>, levando à formação de um complexo de ligação forte (Taira et al., 1987). Concluiu-se que, na ligação do MTX à enzima, ocorre uma etapa rápida de formação do complexo ternário, seguida de uma isomerização lenta, caracterizando o MTX como inibidor de ligação forte e lenta (Williams et al., 1979). (Esquema 3).

### 1.1.3. FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA

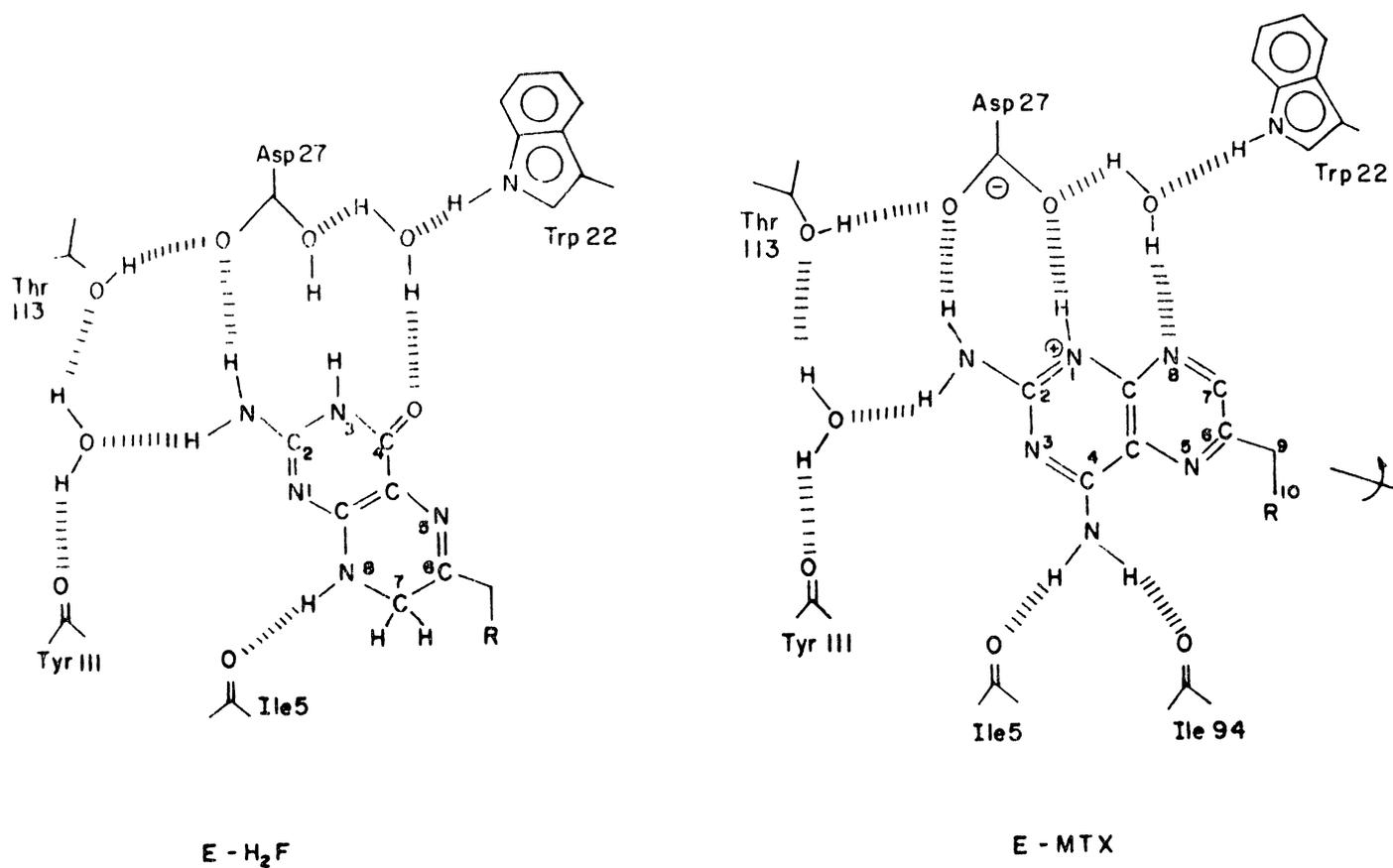
Após administração oral ou parenteral de MTX, a droga é distribuída aos tecidos por via sanguínea, apresentando maiores concentrações nos rins, fígado e intestinos. Quantidades apreciáveis de MTX localizam-se no tecido conjuntivo e na pele, sendo que o encéfalo e a medula espinhal apresentam os menores níveis da droga (Lippens, 1984).

Se o paciente apresentar acúmulo de líquido no terceiro espaço (derrame pleural, pericárdico ou ascite), este pode agir como depósito da droga, aumentando o seu tempo de ação e, conseqüentemente, sua toxicidade (Tattersall et al., 1975).

O MTX entra nas células por um sistema transportador de alta afinidade, saturável, com  $K_t = 5 \mu\text{M}$  e  $V_{\text{max}} = 5 \text{ nmol/g}$  de peso seco de células/min (Goldman, 1975a). O ácido 5-formil tetrahidrofólico e o ácido fólico competem com o MTX pelo carreador. O MTX utiliza então o sistema transportador dos folatos reduzidos naturalmente existentes, uma vez que a afinidade do ácido fólico pelo carreador é bem menor que a dos dois outros compostos, sugerindo a existência de um outro carreador diferente, específico para o ácido fólico. O influxo de MTX é um processo dependente de energia por ocorrer contra o potencial eletroquímico da membrana plasmática, mas não é prontamente afetado por venenos metabólicos. É inibido pelo para-cloro mercúrio benzoato, demonstrando a importância de grupos sulfidrílicos livres no carreador.

Quando a droga se eleva a níveis plasmáticos muito altos, de  $10^{-4}$  a  $10^{-3} \text{ M}$ , penetra na célula também por difusão passiva, ou por um mecanismo de baixa afinidade e alta capacidade (Bender, 1975; Dembo et al., 1984).

A albumina causa uma diminuição do influxo do MTX, provavelmente por ligar-se à droga, impedindo-a de interagir com o car-



ESQUEMA 3 - Prováveis interações de pontes de hidrogênio entre a DHFR e MTX ou dihidrofolato. O MTX adota uma conformação que é rodada 180° em relação ao substrato (H<sub>2</sub>F).

reador (Goldman, 1971).

Uma vez dentro da célula, a maior parte da droga é encontrada no citoplasma, embora quantidades apreciáveis de MTX se localizem nas frações nuclear e mitocondrial (Lippens, 1984).

No citoplasma, o MTX livre liga-se prontamente à enzima DHFR. Para haver inibição completa da síntese de tetrahidrofolatos, são necessárias concentrações acima de  $6\mu\text{M}$  (Goldman, 1975a) que, além de saturarem os sítios intracelulares de alta afinidade, asseguram a manutenção de algum MTX livre na célula, necessário para inibição efetiva da síntese de DNA, RNA e proteínas (Bender, 1975).

O MTX é glutamilado pela célula através da ação da enzima folilpoliglutamato sintetase, que cataliza normalmente a formação de poliglutamatos do ácido fólico (Galivan, 1984). A glutamilação do MTX é estimulada quando há pequena reserva celular de folato, quando a célula está se dividindo ou quando é exposta à ação da insulina (Nimec & Galivan, 1988). A transformação do MTX em derivados poliglutamilados resulta na formação de metabólitos ativos, que aumentam os níveis intracelulares e o tempo de ação da droga, uma vez que os derivados poliglutamilados com 3 a 5 resíduos de glutamato são relativamente conservados no interior da célula continuando a saturar os sítios de ligação intracelulares (Curt et al., 1985).

O MTX intracelular livre pode reagir com o carreador no lado interno da membrana plasmática, produzindo o efluxo que se torna crescente (Goldman, 1971). A liberação da droga pela célula é dependente de energia, prontamente inibida na presença de venenos metabólicos e estimulada por agentes adrenérgicos (Gewirtz et al., 1985).

O MTX captado pelo fígado sofre metabolização parcial pela enzima aldeído-oxidase, produzindo o 7-OH-MTX, que é menos ativo que o MTX na inibição da DHFR e 3 a 5 vezes menos solúvel em pH ácido (Lippens, 1984). Ambos são excretados pela bile, alcançando o intestino, de onde são em grande parte reabsorvidos para o sangue, fazendo o ciclo entero-hepático. Na luz intestinal pode-se formar o DAMPA, ácido 2,4 diamino-N-metilpteróico, outro metabólito do MTX que deriva da ação da carboxipeptidase bacteriana. Este é também menos solúvel em água que o MTX (Donehower, 1980).

Pequenas quantidades de MTX perdem-se na fezes, mas a principal via de eliminação da droga é por excreção renal, tanto por

filtração glomerular quanto por secreção tubular (Lippens, 1984).

Quando são administradas altas doses da droga, podem-se precipitar cristais de MTX nos túbulos renais devido à acidez urinária, causando necrose tubular e, conseqüentemente, insuficiência renal (Lippens, 1984). A presença de 7-OH-MTX e DAMPA, pela sua baixa solubidade em pH ácido, contribui para a maior ou menor gravidade destas alterações (Donehower, 1980). Para contornar este efeito colateral da droga, tem sido usado um esquema de alcalinização intensiva da urina, com administração de bicarbonato e hidratação forçada (Lippens, 1984). O maior fluxo renal é necessário nas primeiras 6 horas após administração da droga e deve ser controlado para diagnóstico precoce de qualquer disfunção renal (Sasaki et al., 1984), evitando dessa forma também o risco de mielossupressão por excesso de dosagem de MTX (Tattersall et al., 1975).

#### 1.1.4. INDICAÇÕES CLÍNICAS, RESGATE E RESISTÊNCIA

O MTX é o antimetabólito mais amplamente usado na quimioterapia do câncer, demonstrando atividade antineoplásica importante sobre osteossarcoma, coriocarcinoma, leucemia aguda, câncer de mama, câncer da cabeça e pescoço e carcinoma de pequenas células do pulmão (Curt et al, 1985), além de micose fungóide (linfoma cutâneo de células T). É usado ainda no tratamento de formas graves de psoríase, sarcoidose e de doenças reumatológicas.

A concentração de MTX necessária para inibir a síntese de DNA é de 6  $\mu\text{M}$  (Goldman, 1975). No entanto, esquemas atuais de tratamento preconizam doses que geram concentrações de  $10^{-4}\text{M}$  no plasma, necessárias para prolongar a inibição máxima da síntese de DNA por períodos maiores de tempo (Sirotnak & Donsbach, 1974), e para evitar o aparecimento de células resistentes à droga (Bertino, 1979).

Para se usar o esquema de altas doses por pequenos intervalos de tempo, sem que haja um aumento intolerável dos efeitos tóxicos da droga sobre as células normais, tornou-se necessário o uso do leucovorim (5-formil tetrahidrofolato) como agente "resgatador" da droga. O leucovorim age liberando a célula, por breves períodos de tempo, da ação do MTX; aumentando os estoques corporais de tetrahidrofolato, recuperando as funções normais apesar da retenção de MTX, até que os níveis da droga no soro diminuam; e facilitando o clearance celular do MTX por antiporte. (Goldman). A adminis-

tração de leucovorim é iniciada quando os níveis de MTX são muito altos e terminada quando estes ainda poderiam ser citotóxicos (Roberts et al., 1979).

A sensibilidade da célula neoplásica ao MTX depende da manutenção de uma concentração intracelular de MTX livre, em excesso, para que não haja deslocamento da droga dos sítios de alta afinidade, frente aos folatos intracelulares. Para tanto, é necessário que a célula tenha capacidade de metabolizar a droga em derivados poliglutamilados. A resistência celular pode manifestar-se por incapacidade em formar esses derivados, por indução da síntese de DHFR, com conseqüente aumento dos sítios de ligação para a droga, ou por diminuição da atividade específica da enzima timidilato sintetase, que converte os tetrahidrofolatos em dihidrofolatos inativos. O transporte da droga parece não ser um fator limitante, responsável pela resistência (Curt et al., 1985).

#### I.1.5. CITOTOXICIDADE E EFEITOS TÓXICOS GERAIS

Alguns estudos realizados sobre a interação do MTX com a célula inteira evidenciaram alterações metabólicas que podem ajudar a esclarecer a razão para a eficácia da droga em esquemas de altas doses, notando-se inibição de outros processos além da síntese de DNA que, em função do tempo de exposição, podem ser letais à célula que não está se dividindo, apoiando a hipótese formulada por Goldman (1975a).

O MTX, na concentração  $10^{-4}M$ , inibe as desidrogenases glutâmica, láctica, málica e a glucose-6-fosfato desidrogenase, sendo as três primeiras  $NAD^+$  dependentes e a última  $NADP^+$  dependente. A mesma inibição é causada pelo ácido fólico, mas este não é tóxico, provavelmente por ser prontamente reduzido a tetrahidrofolato (Vogel et al., 1963).

Na concentração  $2 \times 10^{-6}M$ , e após 20 horas de incubação com células Ehrlich, o MTX inibe a glicólise, com depleção acentuada de ATP (Kaminskas e Nussey, 1978). Essas alterações sugerem que a morte por falta de purinas pode ser devida a um estado de depleção energética celular. Além disso, ocorre diminuição da captação e da taxa de fosforilação da glucose (Kaminskas, 1979), pelo menos em parte causadas pelo estado de depleção de ATP.

O consumo de oxigênio pelas células L1210 diminui na pre-

sença de MTX, em concentrações de  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M, compatíveis com as usadas na terapêutica. Este efeito observa-se após 3 horas de incubação com a droga. Ao fim de 24 horas, nota-se uma relação significativa entre a inibição do crescimento celular e a diminuição do consumo de oxigênio. As mitocôndrias isoladas de células L1210 sofrem uma diminuição da velocidade respiratória no estado III, com glutamato e malato como substratos, mas não com succinato (Kouamou et al., 1981).

Sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato, o MTX causa inibição do consumo de oxigênio durante o estado III, quando são usados substratos  $\text{NAD}^+$  dependentes. A ATPase sofre estímulo pela droga, somente em mitocôndrias intactas, refletindo um pequeno efeito desacoplador. O potencial de membrana diminui até 17% na presença de substratos  $\text{NAD}^+$  dependentes, e o "swelling" ativo é inibido nas mesmas condições. A citocromo c oxidase sofre inibição de até 13% e o citocromo b tem sua redução diminuída em até 40%, somente na presença de substratos  $\text{NAD}^+$  dependentes. Estas alterações refletem o efeito inibidor do MTX sobre desidrogenases  $\text{NAD}^+$  dependentes: piruvato (Gomes, 1988), malato, glutamato,  $\alpha$ -cetoglutarato e isocitrato desidrogenases. As enzimas FAD - dependentes, succinato e glicerol-fosfato desidrogenases, não são inibidas pela droga (Yamamoto, 1985; Yamamoto e cols, 1988).

Sobre o nível dos metabólitos intermediários do ciclo de Krebs, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, o MTX causa acúmulo de malato, citrato,  $\alpha$ -cetoglutarato, piruvato e aumento das razões ADP/ATP e  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , demonstrando a inibição parcial do ciclo de Krebs, devida à ação da droga sobre as desidrogenases  $\text{NAD}^+$ -dependentes mitocondriais (Gomes, 1988).

Sobre células HeLa, o MTX causa, segundo Oliveira (1986) e Oliveira et al. (1989): diminuição do poder redutor transmembrana plasmática e inibição da ejeção de prótons; reversão parcial do efeito Crabtree, com aumento da velocidade respiratória na presença de glucose, evidenciando uma inibição da via glicolítica ou um efeito desacoplador a nível mitocondrial; inibição das enzimas  $\text{NAD}^+$  dependentes gliceraldeído-3-fosfato e lactato desidrogenases, embora ocorra estímulo da primeira na concentração 0,4mM de MTX, com consequente acúmulo de dihidroxi-acetona fosfato, gliceraldeído-3-fosfato, fosfoenolpiruvato e piruvato, havendo diminuição da razão lactato/piruvato; e inibição da glucose-6-fosfato - desidrogenase, sugerindo uma possível ação do MTX sobre a via das pentoses.

Em fígado perfundido, o MTX causa estímulo da glicogenólise e do consumo de oxigênio, com diminuição da razão lactato/piruvato (Oliveira et al., 1986).

O MTX, administrado a ratos Wistar, durante 10 dias, na dose 350 $\mu$  g/kgxdia, induz o aparecimento de hepatomegalia e alterações gordurosas no fígado, e diminuição dos níveis sanguíneos de triacilgliceróis e colesterol. Os homogenatos do fígado desses ratos mostram aumento da atividade das enzimas palmitoil-CoA sintetase, glicerofosfato aciltransferase microssômica e carnitina palmitoil transferase mitocondrial, sugerindo um aumento da síntese e/ou diminuição da oxidação de ácidos graxos pela droga. Este efeito assemelha-se ao causado pela deficiência de ingestão de colina (Aarsaether et al., 1988), embora se altere com o estado nutricional do animal.

É evidente que a ação do MTX é ampla em termos de ciclo celular, deixando de atuar somente durante a fase S, dependente da atividade catalítica da DHFR, para agir também na fase G<sub>1</sub>, conforme sugerido por Goldman (1975a).

Concentrações de MTX extracelular entre 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-4</sup>M provocam inibição da síntese de DNA mais acentuada que da síntese de RNA, causando um crescimento desequilibrado núcleo-citoplasmático que finalmente leva à morte celular por incapacidade em sofrer mitose. As concentrações celulares de ATP e GTP decrescem, uma vez que a velocidade de consumo de ATP e GTP na síntese de RNA excede a da sua formação pela síntese "de novo" (Lippens, 1984). Os níveis de ATP diminuídos refletem também os efeitos inibitórios do MTX sobre a via glicolítica e o ciclo de Krebs, com conseqüente depleção energética celular. As conseqüências dessa depleção fazem-se notar na inibição da síntese proteica, glicólise, transporte de hexoses e outras reações dependentes de ATP.

A síntese de DNA e o metabolismo energético, em células tumorais, são mais sensíveis ao MTX do que em células normais, devido ao aumento das taxas anabólicas e maior capacidade proliferativa das células tumorais.

No entanto, as células normais de tecidos com metabolismo mais ativo ou maior proliferação também estão sujeitos a estes efeitos da droga, apresentando sinais de sofrimento e morte celular, que se traduzem nos efeitos tóxicos colaterais causados pelo MTX.

Assim, ocorre comprometimento de pele e mucosas, com infla-

mações e ulcerações, sendo mais afetada a mucosa intestinal, devido ao ciclo entero-hepático da droga. Pode ocorrer citotoxicidade para a medula óssea, com alterações celulares hematológicas, distúrbios hemorrágicos e imunossupressão. Podem ainda acontecer alterações hepáticas, com aparecimento de degeneração gordurosa, fibrose periportal, atrofia e cirrose; alterações pulmonares, levando a pneumonite crônica; distúrbios da função renal pelas características de solubilidade e excreção da droga; e alterações do aparelho genital, levando à infertilidade. Mais raramente podem ocorrer lesões do sistema nervoso central, causando cefaléias, paresias e convulsões.

Considerando as ações multissistêmicas do MTX, a nível bioquímico, e principalmente a inibição das desidrogenases  $\text{NAD}^+$ -dependentes do ciclo de Krebs, foi cogitada a possível ação da droga sobre sistemas de controle do metabolismo, como as concentrações mitocondrial e citossólica de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Com base na inibição de todas as desidrogenases  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  dependentes estudadas, pensou-se na possível alteração do transporte de equivalentes redutores do citossol para as mitocôndrias pelo MTX.

Assim, foi feita uma breve revisão sobre o transporte mitocondrial de cálcio e suas implicações, bem como sobre as principais vias de transporte de equivalentes redutores do citossol para as mitocôndrias.

## 1.2. TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE CÁLCIO

O transporte de íons  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias dá-se através de dois sistemas independentes: influxo e efluxo.

O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre por um carreador uniporte, a favor do gradiente eletroquímico, formado pelo transporte de elétrons pela cadeia respiratória e, então, dissipando esse potencial. É inibido especificamente pelo corante vermelho de rutênio. A velocidade do uniporte depende da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  externo.

O efluxo ocorre em troca de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{H}^+$ , dependendo do tecido, e a velocidade é constante em concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial próximas de  $10 \text{ nmoles.mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial (Nicholls, 1981).

Ultimamente, tem-se definido que o transporte de cálcio pela mitocôndria pode ter duas funções distintas, dependendo do te-

cido e da situação da célula: controlar os níveis mitocondriais, quando o  $\text{Ca}^{2+}$  citossólico se mantiver em concentrações inferiores a  $1 \mu\text{M}$ ; e controlar a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citossólico quando, em condições de sofrimento celular, ocorrer aumento do influxo de cálcio através da membrana plasmática, com conseqüente aumento da concentração citossólica de  $\text{Ca}^{2+}$  acima de  $5 \mu\text{M}$  (Denton & McCormack 1980; Hansford, 1985; Nicholls, 1981 e 1986; Carafoli, 1987).

Em condições fisiológicas, o controle da concentração intra mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo sistema de transporte mitocondrial permite um controle adicional da atividade das enzimas piruvato - desidrogenase, isocitrato desidrogenase e  $\alpha$ -cetogluturato - desidrogenase. Efetivamente, um aumento da concentração de cálcio livre ativa diretamente a isocitrato e a  $\alpha$ -cetogluturato - desidrogenase, além de ativar a fosfatase que converte a piruvato - desidrogenase inativa na enzima ativa (Denton & McCormack, 1980), deste modo aumentando a oxidação de substratos a nível do ciclo de Krebs e, conseqüentemente, estimulando a produção de ATP.

Assim, poderia ocorrer um controle hormonal da respiração, usando o cálcio como segundo mensageiro.

Por outro lado, em condições de sofrimento celular, tais como hipóxia e diminuição da perfusão celular, ocorre aumento da permeabilidade da membrana plasmática para os íons  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando a concentração citossólica a níveis perigosos para a célula. As mitocôndrias parecem ter, nestes casos, uma capacidade quase ilimitada de acumular cálcio. Esta qualidade é essencial para que não haja ativação das enzimas degradativas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfolipases e proteases (Fiskum & Cockrell, 1985) que finalmente levariam à morte celular.

Alguns tipos de células tumorais mostraram ter uma capacidade maior de acumular cálcio que as células normais, podendo tampunar um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citossólico sem apresentar sinais de desestruturação (Fiskum & Cockrell, 1985). Como alterações associadas, essas mitocôndrias de células neoplásicas apresentaram aumento dos níveis de  $\text{Mg}^{2+}$ , diminuição da atividade da fosfolipase  $\text{A}_2$  e aumento da concentração de colesterol nas membranas mitocondriais. Notou-se também maior atividade do translocador de efluxo em troca de  $\text{Na}^+$  em células de hepatoma, sendo que, em hepatócitos normais, o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  dá-se em troca de  $\text{H}^+$ .

Estas alterações permitiriam a sobrevivência de células altamente malignas em condições de hipóxia e hipoperfusão, que seriam fatais às células normais, mas que são comuns em tecidos neo-

plásticos de crescimento rápido (Goldman, 1975a).

### 1.3. TRANSPORTE DE EQUIVALENTES REDUTORES PARA AS MITOCÔNDRIAS

O NADH produzido no citossol, como resultado das reações oxidativas, precisa ser novamente oxidado, para manter o fluxo metabólico. Parte desse NADH é oxidado pelas mitocôndrias, através de complexos sistemas de transporte que transferem os equivalentes redutores na forma de intermediários metabólicos.

As principais vias de transporte de equivalentes redutores do citossol para as mitocôndrias são a lançadeira malato-aspartato e a glicerol-fosfato (Esquema 4).

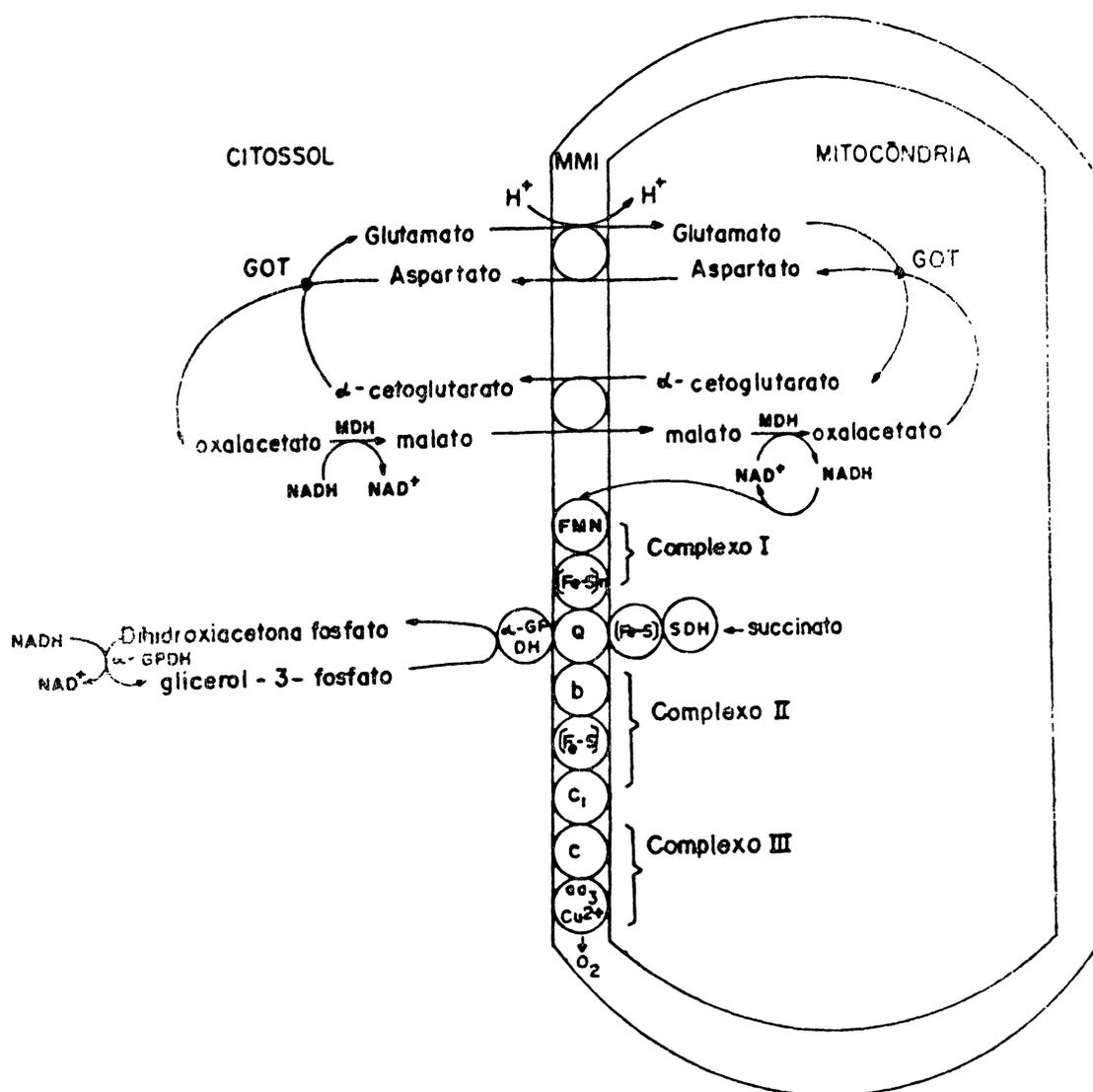
Em algumas linhagens de células neoplásicas estudadas (Dionisi et al., 1974; Greenhouse & Lehninger, 1976), a lançadeira malato-aspartato mostrou ser a preferencial e, por vezes, a única via de transporte de equivalentes redutores para as mitocôndrias. Esta lançadeira consiste num sistema composto por quatro enzimas (MDH e GOT citossólicas e MDH e GOT mitocondriais) e dois carreadores (glutamato-aspartato e malato- $\alpha$ -cetoglutarato) e está normalmente presente nas células hepáticas e cardíacas. É inibida pela rotenona e por aminó-oxiacetato, inibidor da GOT.

No músculo, os equivalentes redutores são transportados através do glicerol 3-fosfato: no citossol, a diidroxiacetona-fosfato é reduzida a glicerol 3-fosfato pela glicerol-3-fosfato-desidrogenase,  $\text{NAD}^+$ -dependente; o glicerol-3-fosfato é reoxidado a diidroxiacetona-fosfato pela glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial, que transfere os elétrons diretamente para o complexo II da cadeia respiratória. Conseqüentemente, esta lançadeira é insensível à rotenona.

Essas diferenças de sensibilidade das lançadeiras aos inibidores permitem que se determine qual a lançadeira que atua em determinado tipo de célula.

### 1.4. OBJETIVOS

O interesse atual sobre as ações do cálcio como segundo mensageiro intracelular, a capacidade mitocondrial em controlar os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz e no citossol, a ação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  como ativadores diretos das enzimas mitocondriais isocitrato e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenases, além de ativadores indiretos da piruvato desidrogenase (Denton e McCormack, 1980), sugerem uma possível ação do MTX sobre o transporte mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  como fator



ESQUEMA 4 - Representação dos sistemas das lançadeiras malato-aspartato e glicero-fosfato e suas relações com a cadeia respiratória.

coadjuvante na ação inibitória da droga sobre o ciclo de Krebs e a via glicolítica. Julgou-se então necessária uma avaliação experimental da ação do MTX sobre o transporte mitocondrial de cálcio.

Paralelamente, e tendo em vista a inibição do ciclo de Krebs pelo MTX, com conseqüente diminuição dos níveis de NADH e NADPH mitocondriais em relação às formas oxidadas (Gomes, 1988), faz-se necessária a avaliação da ação da droga sobre a lançadeira malato-aspartato, em células HeLa e num sistema reconstituído com mitocôndrias de fígado de rato, uma vez que esta é a principal via de transporte de equivalentes redutores do citossol para as mitocôndrias, em algumas linhagens tumorais estudadas (Dionisi, 1974; Greenhouse & Lehninger, 1976). É oportuno também determinar se essa via é preferencialmente usada pelas células HeLa.

As ações inibidoras do MTX sobre as desidrogenases da via glicolítica, via das pentoses e sobre o poder redutor transmembrana plasmática, associadas à inibição do ciclo de Krebs, deixam antever uma possível alteração dos níveis citossólicos de NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup>, NADPH, ADP e ATP, assim como de piruvato e lactato, justificando a sua determinação.

## II - MATERIAIS E MÉTODOS

### II.1. REAGENTES

Foram adquiridos da Sigma Chemical Co: glutamato, malato, oxalacetato,  $\alpha$ -cetoglutarato, aspartato, fosfoenolpiruvato, piruvato, isocitrato, NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup>, ADP, ATP, EGTA, EDTA, BSA, manitol, Hepes, antimicina-A, rotenona, ácido amino oxiacético, arsenazo III, vermelho de rutênio, azul de trypan, fenazina meta-sulfato, e as enzimas malato-desidrogenase 2350U/mg, glutamato-asparato aminotransferase 295U/mg, glutamato-desidrogenase 37 U/mg álcool-desidrogenase 220 U/mg de proteína, hexoquinase 16 U/mg, glucose-6-fosfato-desidrogenase 340 U/mg, lactato-desidrogenase 57 U/mg, piruvato-quinase 63 U/mg e isocitrato-desidrogenase 0,5 U/mg.

Foram obtidos da Merck do Brasil: Tris-base, bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio, fosfato ácido de potássio, fosfato dibásico de potássio, ácido clorídrico, ácido perclórico, cloreto de magnésio, hidróxido de sódio, cloreto de cálcio, etanol, succinato, malonato, fluoreto de sódio, diclorofenol-indofenol, lactato, glicina e hidrazina.

Hidróxido de sódio, arsenito de potássio e trietanolamina foram adquiridos da Carlo Erba do Brasil S/A.

Meio essencial mínimo de Eagle foi fornecido por Flow Laboratórios; soro fetal bovino, por Laborclin; sacarose, por Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas S.A.; cloreto de sódio, por J.T. Baker Chemical; e tripsina 1:250, por Difco.

Metotrexato foi adquirido da Cyanamid Química do Brasil, divisão Lederle.

FCCP foi gentilmente cedido por Dr. Armando Gómez Puyou.

### II.2. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas segundo o método de Voss et al (1961); ratos albinos da raça Wistar foram decapitados, seus fígados removidos, picados com tesoura e lavados

em meio de extração constituído de manitol 0,2M, sacarose 0,07M, TRIS 0,01M e EDTA 0,2 mM, pH 7,4, a 4°C. Foram então passados no homogeneizador de Van Potter Elvehjen, três vezes com o pistilo frouxo e duas vezes com o pistilo normal, em banho de gelo, sendo depois centrifugados a 800xg, em centrífuga refrigerada a 4°C. Desprezou-se o precipitado e o sobrenadante foi diluído em meio de extração e centrifugado a 7800xg, o sedimento foi ressuspenso no mesmo meio e centrifugado duas vezes a 5000xg. Ao sedimento final, correspondente à fração mitocondrial, foi adicionado meio de extração apenas suficiente para se obter uma concentração final próxima a 100 mg de proteína/ml.

### **11.3 - CULTIVO E COLHEITA CELULAR**

Os procedimentos de cultivo celular foram gentilmente realizados pela Dr<sup>a</sup> Ema Chandelier, da Secção de Cultivo Celular - TECPAR.

#### **11.3.1. ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS E SOLUÇÕES**

Todo o material de vidro usado nas culturas foi esterilizado a seco (150°C), por 6 horas. Rolhas e tampas foram esterilizadas em autoclave a 120°C e 1 atm, por 30 minutos, e depois colocadas a secar em estufa a 70°C.

A solução de bicarbonato de sódio e a solução salina tampoadada (PBS) foram esterilizadas em autoclave a 120°C e 1 atm, por 30 minutos, sendo então mantidas à temperatura ambiente e a 4°C, respectivamente.

A solução dispersante de células (solução de tripsina-veneno) foi esterilizada por filtração, usando-se filtros marca Millipore e membranas de 0,22 µm, sendo estocada a -20°C.

O meio de cultura essencial mínimo de Eagle foi reconstituído em água bidestilada e esterilizado por filtração em membranas de acetato de celulose de 142mm de diâmetro e poros de 1,2, 0,45 e 0,22 µm, em aparelho marca Millipore.

Todas as operações envolvendo o cultivo celular foram realizadas em fluxo laminar horizontal.

#### **11.3.2. CARACTERIZAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS**

Foram usadas células de linhagem HeLa, derivadas de carcinoma de colo de útero humano, procedentes da American Type Culture

Coleção e enviadas para a Secção de Cultivo Celular do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

As células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, em sistema constituído de meio essencial mínimo de Eagle, pH 7,4 (80% v/v), glicerol (10% v/v) e soro fetal bovino (10% v/v), contendo aproximadamente  $2 \times 10^6$  células por ml, em ampolas adequadas.

### II.3.3. CULTIVO E COLHEITA DE CÉLULAS HELA

Células HeLa foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle, soro fetal bovino (10% v/v) e solução de bicarbonato a 7,5% (p/v) suficiente para acertar o pH em 7,4, a 37°C, em garrafas de Roux, onde se desenvolvem na forma de monocamadas.

Os repiques foram realizados deslocando-se as células com solução de tripsina-verseno, constituída de: 136mM de NaCl; 5,4 mM de KCl; 5mM de glucose, 6,9mM de NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 g/l de tripsina 1:250; 0,5mM de EDTA; e vermelho de fenol, 0,2 mg %, preparada com água bidestilada.

Após o descolamento, as células foram ressuspensas em pequena quantidade de meio de cultivo, com o auxílio de pipeta equipada com pera de borracha, e foram então ressemeadas em concentrações aproximadas de  $2 \times 10^6$  células por garrafa de Roux. As culturas desenvolveram-se à temperatura de 37°C, e as monocamadas foram observadas diariamente em microscópio invertido, marca Olympus, modelo CKC, Bi-I, no TECPAR. As culturas tornam-se confluentes com 72 a 96 horas de crescimento, sendo então padronizado o tempo de 80 horas para a colheita.

Para colheita das células, estas foram submetidas à ação da solução de tripsina-verseno, até iniciar-se o descolamento. Então, desprezou-se a solução de tripsina, e ressuspenderam-se as células, com o auxílio de uma pipeta com pera de borracha, em PBS acrescida de 25 mg% de soroalbumina bovina, para protegê-las de eventual ação da tripsina residual. A solução salina tamponada (PBS) constituía-se de 8,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 136 mM de NaCl e 1,46 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, em água bidestilada, pH 7,4, 37°C.

Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada em centrífuga clínica por 40 segundos e as células precipitadas foram ressuspensas e centrifugadas mais duas vezes em PBS com BSA, sendo uma última lavagem feita na ausência de soro-albumina bovina.

O precipitado final foi ressuspenso em volume adequado de PBS e calculada a viabilidade celular.

#### II.4. DOSAGEM DE PROTEÍNA

A determinação da concentração proteica foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Lowry (1951), usando-se soro albumina bovina como padrão e determinando-se a absorvância em 700nm em espectrofotômetro Micronal.

#### II.5. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

De acordo com o método de Voss et al (1963), o consumo de oxigênio foi acompanhado em eletródio de oxigênio, modelo Rank Brothers (Cambridge, England), acoplado a um registrador Recti-Riter (Texas Instrument Incorporated).

O meio de reação era composto de tampão fosfato 5mM, Tris 10mM, EDTA 0,2mM, manitol 250mM, pH ajustado a 7,4 com HCl (Voss et al., 1961).

Na Câmara de reação foram introduzidos 2,0 ml de meio de reação, quantidades adequadas de proteína mitocondrial (2 a 4 mg), substrato oxidável na concentração 7,5 mM e ADP 0,25mM, mantendo-se a temperatura em 28°C. Considerou-se a solubilidade do oxigênio como sendo de 248  $\mu\text{M}$  a 28°C e 1atm. (Estabrook, 1967).

A velocidade respiratória foi calculada em nmoles de oxigênio consumido.  $\text{minuto}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína a partir do traçado obtido do registrador.

#### II.6. OBTENÇÃO DAS RAZÕES RC E ADP/O

A razão RC foi determinada dividindo-se a velocidade respiratória no estado III (na presença de ADP e substrato) pela velocidade respiratória no estado IV (após consumo do ADP adicionado) segundo Estabrook (1967) e Chance & Williams (1955).

O ADP/O foi calculado pela razão entre o número de moles de ADP adicionados à câmara de reação e o número de moles de átomos de oxigênio consumidos durante a fosforilação do mesmo ADP (Estabrook, 1967)

#### II.7. AÇÃO DO MALONATO E DO MTX SOBRE A VELOCIDADE RESPIRATÓRIA.

A inibição do ciclo de Krebs, pela ação do malonato sobre a

Para iniciar a reação, foi adicionado 0,35mM de oxalacetato e acompanhou-se o consumo de NADH através da diminuição da absorvância em espectrofotômetro de duplo feixe de onda, em 340 nm, tendo como referência tampão fosfato.

As faixas de concentração dos inibidores testados foram: MTX, de 0,017 a 0,667mM; malonato, arsenito e amino-oxiacetato, de 0,67 a 1,3 mM.

#### II.10. AÇÃO DO MTX, ARSENITO, MALONATO E AMINO-OXIACETATO SOBRE A GLUTAMATO-ASPARTATO AMINO TRANSFERASE PURIFICADA (E C. 2.6.1.1)

A atividade da glutamato-aspartato aminotransferase foi determinada de acordo com o método de Reitman e Frankel (1957), seguindo as reações:

Aspartato +  $\alpha$ -cetoglutarato  $\xrightarrow{\text{GOT}}$  oxalacetato + glutamato  
 oxalacetato + 2,4 dinitrofenilhidrazina  $\rightarrow$  azonã (alaranjado em pH alcalino).

O meio de reação era composto de: tampão fosfato 73,6mM, pH 7,4, aspartato 130mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 23mM e inibidores.

A reação foi iniciada com a adição de 5,6U de GOT, aos três minutos adicionou-se 0,45 mM de DNPH e, após 20 minutos, NaOH 0,33N. Determinou-se a absorvância a 505nm em espectrofotômetro Micronal, contra tubo branco, contendo os reagentes citados com exceção da enzima. A produção de oxalacetato foi determinada por comparação com curva padrão de piruvato (figura 1), uma vez que o oxalacetato produzido sofre descarboxilação espontânea, formando piruvato. (Reitman e Frankel, 1957).

As concentrações de inibidores usadas foram de: 0,01 a 0,5mM para o MTX; 0,25 a 3,0 mM para o amino-oxiacetato; 0,4 a 8mM para o arsenito de sódio; e 0,65 a 3,3 mM para o malonato.

#### II.11. AÇÃO DO MTX, MALONATO, ARSENITO E AMINO-OXIACETATO SOBRE O SISTEMA ENZIMÁTICO MDH/GOT

Avaliou-se simultaneamente a ação dos inibidores sobre as duas enzimas de acordo com Williamson e Corkey (1959), seguindo o sistema de reações:

$\alpha$ -cetoglutarato + aspartato  $\xrightarrow{\text{GOT}}$  glutamato + oxalacetato  
 oxalacetato + NADH + H<sup>+</sup>  $\xrightarrow{\text{MDH}}$  malato + NAD<sup>+</sup>.

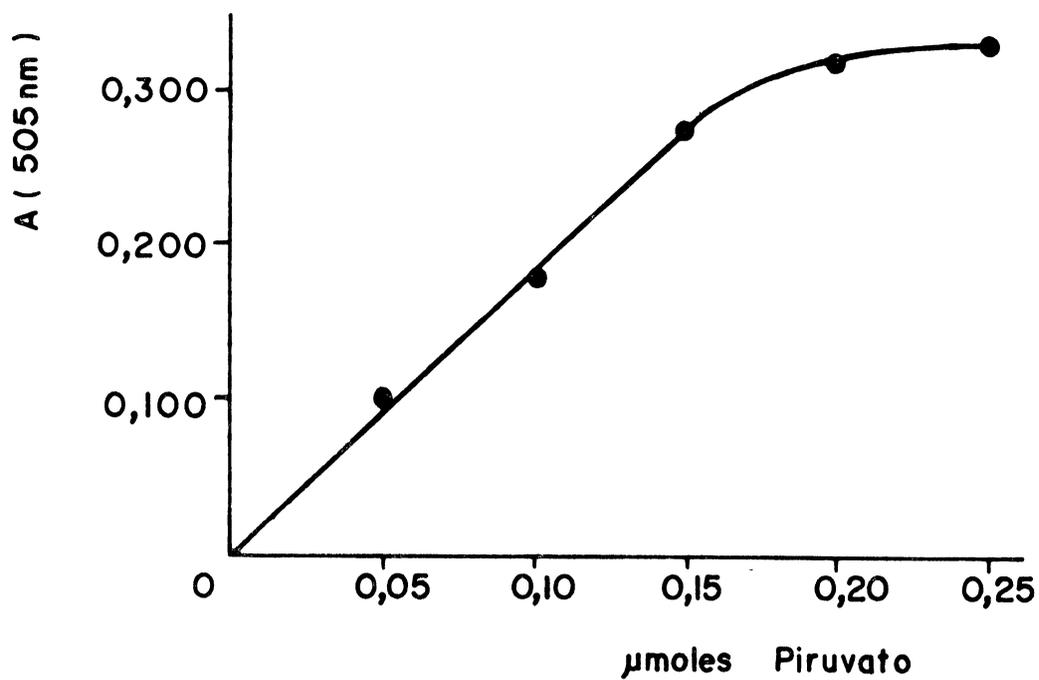


FIGURA 1 - Curva de calibração do piruvato para avaliação da atividade da glutamato-aspartato aminotransferase.

Sistema de reação: tampão fosfato 73,6 mM pH 7,4 , aspartato 130 mM,  $\alpha$  cetoglutarato 23 mM, piruvato nas quantidades indicadas, DNFH 0,45 mM e NaOH 0,33N.

Em volume final de 3 ml, adicionou-se tampão fosfato 0,1M pH7,4;  $\alpha$ -cetoglutarato 3,3mM; NADH 0,33mM; 1,2U de MDH (E C 1.1.1.1) 5,6U de GOT (E C 2.6.1.1), além dos inibidores a serem testados. As concentrações destes últimos variaram de 1 a 4 mM para o malonato, 0,67 a 1,3 mM para o aminooxiacetato, 2 a 8 mM para o arsenito e 0,03 a 0,8mM para o MTX.

As reações foram iniciadas com a adição de 1,66mM de aspartato e acompanhadas através da diminuição da absorbância a 340nm, em espectrofotômetro de duplo feixe de onda, tendo como referência todo o sistema com exceção do aspartato.

## II. 12. MEDIDAS DE CAPTAÇÃO E EFLUXO DE CÁLCIO

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas de acordo com o método de Voss et al. (1961), em meio de extração composto de manitol 0,2M, sacarose 0,07M, Tris 0,01M e EGTA 0,2mM, pH 7,4, sendo a última lavagem e a diluição final feitas com a mesma solução, mas sem EGTA.

Ao meio de reação, composto de 3 ml da solução manitol 125 mM, Hepes 10 mM, KCl 65mM e BSA 0.05%, pH 7,2, foi adicionado: fosfato inorgânico 0,33mM; arsenazo III 31  $\mu$ M; 2,2 mg de proteína mitocondrial; rotenona 4,2  $\mu$ M; e 17  $\mu$ M de  $\text{CaCl}_2$ . No tempo zero, adicionou-se succinato 5mM. A captação do cálcio pelas mitocôndrias foi acompanhada através do aumento de absorbância em espectrofotômetro de duplo feixe de onda, 675-685nm, acoplado a registrador.

Após finalizada a captação, foi acrescentado vermelho de rutênio 0,5 $\mu$ M, e acompanhado o efluxo de cálcio pela diminuição de absorbância, no mesmo comprimento de onda.

O mesmo experimento foi repetido na presença de MTX, variando a sua concentração entre 0,4 e 1,6  $\mu$ moles/mg de proteína mitocondrial, com e sem pré-incubação de 10 minutos das mitocôndrias com a droga.

O experimento acima descrito baseia-se no método de Scarpa (1979), no qual o arsenazo III sofre alteração de cor em função da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$ .

O vermelho de rutênio é um inibidor específico do carreador uniporte para o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitindo assim a determinação do efluxo de cálcio.

### II.13. CÁLCULO DA VIABILIDADE CELULAR

O cálculo da viabilidade celular, foi feito através da contagem das células em câmara de Neubauer usando-se 1 ml de suspensão celular para 0,1 ml de solução corante constituída de: azul de trypan 0,4% (p/v) em solução salina -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5mM, NaCl 140 mM, ácido benzóico 25 mg%, pH 7,4. Foi feita a observação em microscópio e calculada a viabilidade celular segundo a fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{células não coradas}}{\text{células coradas} + \text{não coradas}} \times 100$$

Foram usadas as suspensões celulares com índice de viabilidade celular acima de 90%.

O método acima baseia-se na descrição de Phillips (1973), segundo a qual as células viáveis não se deixam corar pelo azul de trypan.

### II.14. INCUBAÇÃO PARA DOSAGEM DE METABÓLITOS DE CÉLULAS HELA

Células HeLa, colhidas conforme descrito, ressuspensas em PBS de modo a obter uma concentração final próxima de 2,4 mg de proteína celular.  $\text{ml}^{-1}$  e deixadas em aeração com agitador magnético durante alguns minutos, divididas em dois frascos de reação: um para controle e outro para teste com MTX. A droga foi adicionada ao frasco-teste na concentração 0,4 mM e incubada durante 10 minutos, quando então se adicionou 1 mM de glucose a ambos os frascos. Imediatamente após, foram retiradas as alíquotas correspondentes ao tempo zero,  $t_0$ . Novas alíquotas foram retiradas 10 e 30 minutos após a adição de glucose, correspondente aos  $t_{10}$  e  $t_{30}$ , respectivamente.

A dosagem de proteína foi realizada segundo o método de Lowry já descrito.

### II. 15. EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DE CÉLULAS HELA

Nos tempos de incubação descritos nos experimentos, foram recolhidas alíquotas e divididas em extratos ácidos ou alcalinos, conforme o metabólito a ser dosado.

Extrato ácido - A extração ácida foi feita para posterior dosagem de  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ , ATP, ADP, piruvato e lactato. A alíquota foi adicionada a um tubo contendo HClO<sub>4</sub> e Hepes, de forma que a concentração final

destes fosse de 0,43M e 0,07M, respectivamente. Este tratamento destrói os NADH e NADPH presentes na alíquota, conforme descrito por Klingenberg (1974). O tubo foi mantido em banho de gelo e, então, seu conteúdo foi neutralizado com KOH 5N até o pH 6,5 a 7,5, sendo após centrifugado a 18000 x g durante 5 minutos.

O sobrenadante foi congelado a  $-15^{\circ}\text{C}$  por 12 horas, recentrifugado e finalmente usado para dosagem dos metabólitos.

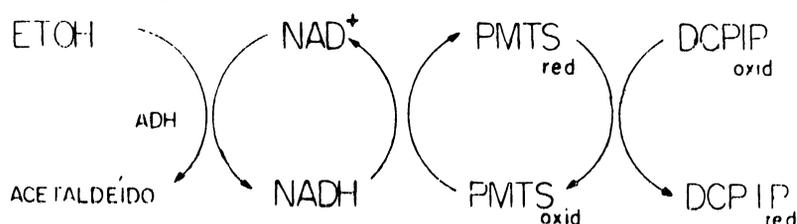
Extrato alcalino - A extração alcalina foi realizada para dosagem de NADH de NADPH. A alíquota foi adicionada a um tubo contendo KOH e HEPES, na concentração final correspondente a 0,357M e 0,07M, respectivamente, e colocada em banho-maria a  $90^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, o que destrói o  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  presentes na alíquota (Klingenberg, 1974). Logo após, foi posto em banho de gelo e neutralizado até pH de 6,5 a 7,5 com  $\text{HClO}_4$ , 11,4M.

O NADH e NADPH foram então oxidados: 6 unidades de glutamato desidrogenase (E C 1.4.1.3) foram adicionados e o sistema incubado à temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Em seguida, o extrato foi centrifugado a 18.000 x g por 5 min. e o sobrenadante foi congelado a  $-15^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Após este tempo, foi recentrifugado e usado para dosagem de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$ , que correspondem às quantidades de NADH e NADPH antes existentes.

## II.16. DETERMINAÇÃO DE $\text{NAD}^+/\text{NADH}$

Os níveis celulares totais de  $\text{NAD}^+$  e NADH foram determinados de acordo com o método amplificador descrito por Slater e Sawyer (1962), que tem sensibilidade para a dosagem dos nucleotídeos na faixa de concentração de  $3 \times 10^{-7}$  a  $10^{-9}\text{M}$ .



Foram incubados durante 30 minutos: diclorofenol-indofenol (DCPIP)  $39 \mu\text{M}$ , fenazina metasulfato (PMTS)  $3,2 \text{ mM}$ , etanol a 20% (v/v) quantidades adequadas de extratos ácidos ou alcalinos e tampão fosfato  $95\text{mM}$ , pH 7,4, num volume final de 1ml, ao qual se adicionaram 11 U. de álcool-desidrogenase.

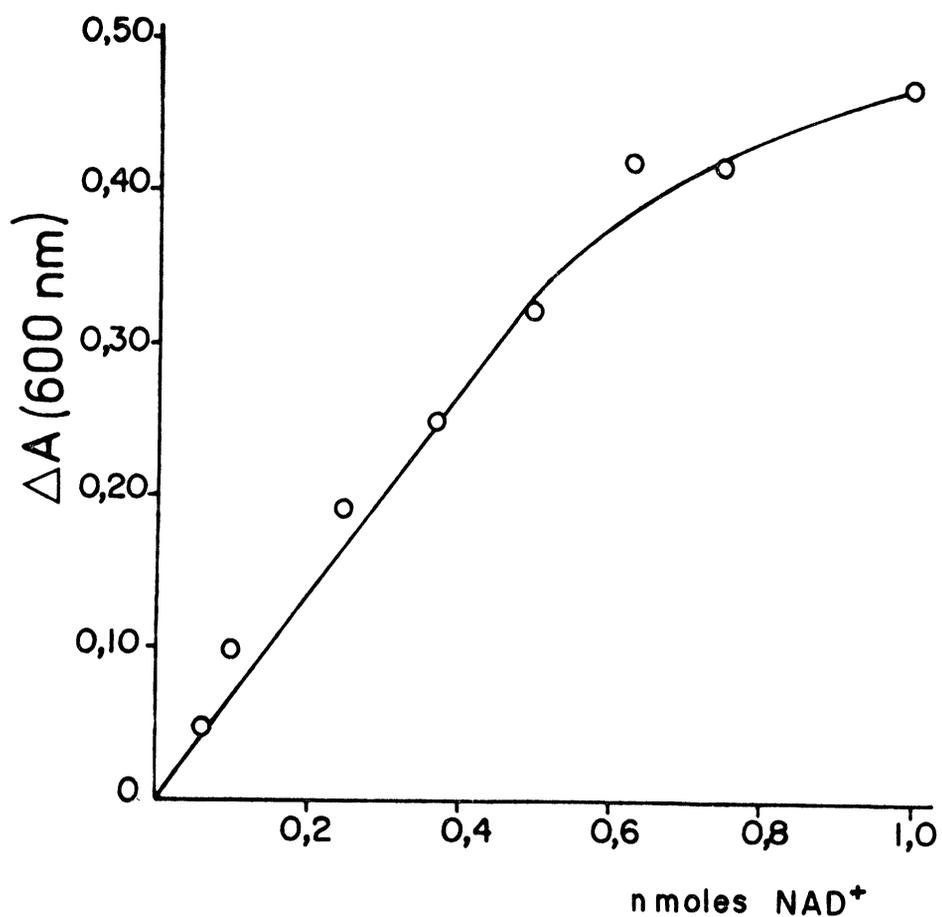


FIGURA 2 - Curva de calibração de NAD<sup>+</sup>.

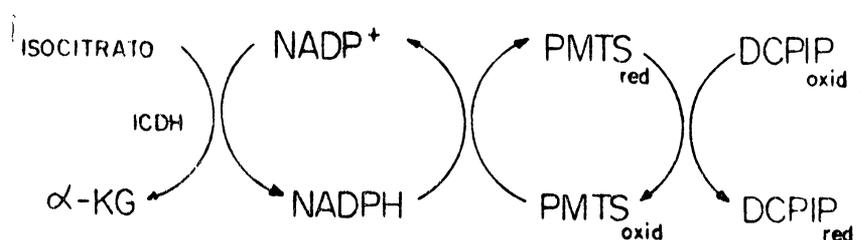
Sistema de reação: tampão fosfato 95 mM pH 7,4, DCPIP 39  $\mu$ M, PMTS 3,2 mM, etanol 20% (v/v), quantidades indicadas de NAD<sup>+</sup>, 11U de ADH, num volume final de 1 ml. Após 30 minutos de incubação foi avaliada a absorvância em relação a um tubo branco (sem enzima) em 600 nm.

Foi avaliada a absorvância do sistema, em relação ao tubo branco incubado nas mesmas condições, mas na ausência da enzima, em espectrofotômetro Micronal, 600 nm, e comparada com curva padrão de  $\text{NAD}^+$  (Figura 2).

Os resultados foram expressos em nmoles de  $\text{NAD}$  ou  $\text{NADH} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína celular, tendo em mente que a incubação com extrato ácido reflete os níveis de  $\text{NAD}^+$ , enquanto a incubação com extrato alcalino se refere aos níveis de  $\text{NADH}$ .

### II.17. DOSAGEM DE $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$

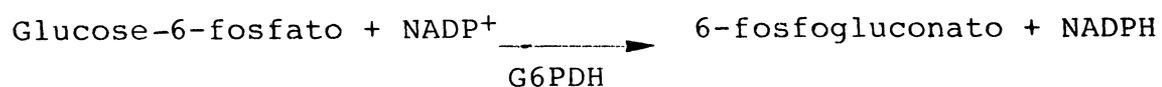
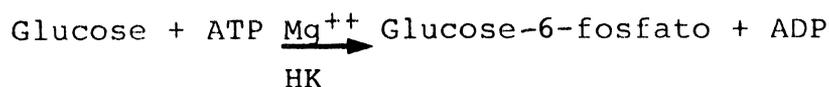
$\text{NADP}^+$  e  $\text{NADPH}$  foram dosados de acordo com o método de Slater e Sawyer (1962), usando isocitrato como substrato:



Para um volume final de 1 ml, foram adicionados  $31 \mu\text{M}$  de diclorofenol-indofenol (DCPIP),  $3,2 \text{ mM}$  de fenazinametasulfato (PMTS),  $9 \text{ mM}$  de isocitrato,  $0,15 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ , quantidades apropriadas de extratos ácidos ou alcalinos e tampão TRIS  $50 \text{ mM}$  pH  $8,0$ . Adicionou-se  $0,05 \text{ U}$  de isocitrato desidrogenase (ICDH) ( $1 \text{ mg}$  converte  $0,5 \mu\text{ mol}$  de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato por minuto, pH  $7,4$ ,  $37^\circ\text{C}$ ) e, após 30 minutos de incubação, determinou-se a densidade óptica do sistema em relação ao tubo branco, que continha os mesmos reagentes exceto a enzima. Usou-se espectrofotômetro Micronal,  $600 \text{ nm}$ . O resultado foi comparado com os valores de curva de calibração de  $\text{NADP}^+$  (Figura 3) e expresso em nmoles de  $\text{NADP}^+$  ou  $\text{NADPH} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

### II.18. DETERMINAÇÃO DE ATP

Foi realizada segundo o método de Williamson e Corkey (1969) usando o sistema de reações:



O desenvolvimento das reações foi acompanhado através do aumento da absorvância em espectrofotômetro de duplo feixe de onda,  $340 \text{ nm}$ .

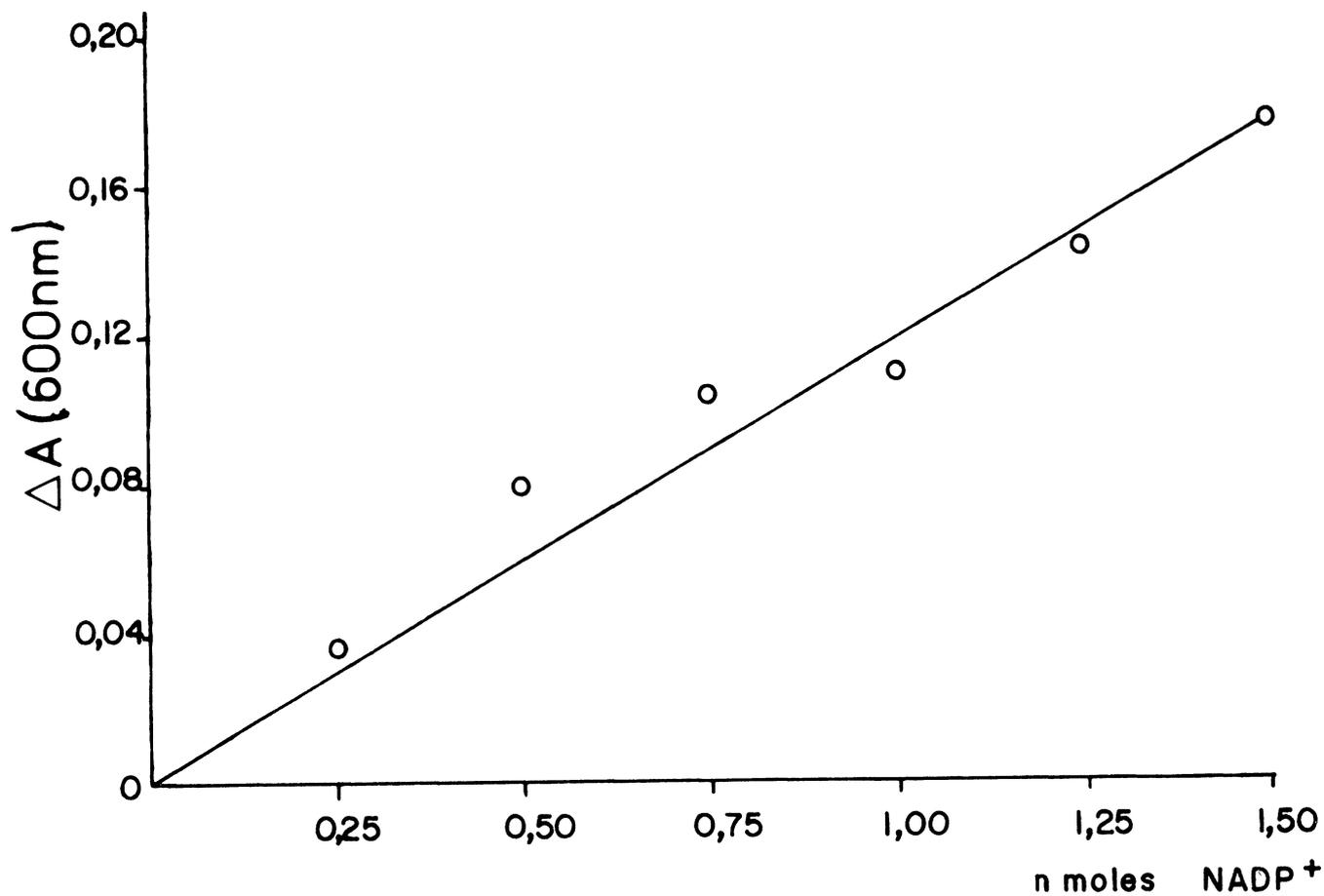


FIGURA 3 - Curva de calibração de NADP<sup>+</sup>.

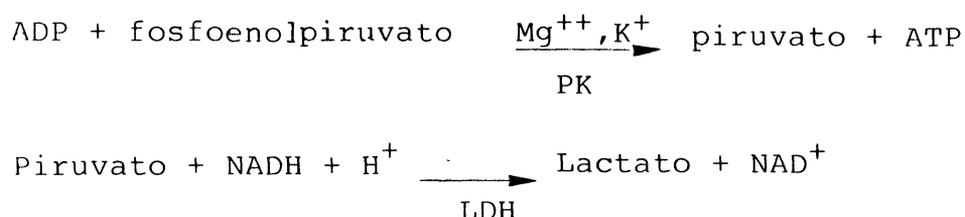
Sistema de reação: tampão tris 50 mM pH 8,0, DCPIP 31 $\mu$ M, PMTS 3,2 mM, isocitrato 9 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,15 mM, quantidades indicadas de NADP<sup>+</sup> e 0,05 U de ICDH num volume final de 1 ml. Após 30 minutos de incubação foi avaliada a absorvância em relação a um tubo branco (sem enzima) em 600nm.

O sistema de incubação constituía-se de: tampão trietanolamina 41,3mM pH 7,4;  $MgCl_2$  8,3mM; EDTA 4,1 mM; glucose 4,1 mM ; NADP+66  $\mu$ M; 3U de glucose 6-fosfato desidrogenase; e quantidades adequadas de extrato ácido, num volume final de 3ml. Foram então adicionados 0,325U de hexoquinase (HK) e após 15 minutos foi observada a absorbância em relação ao tudo branco, ao qual não foi adicionada hexoquinase.

O resultado foi comparado com o obtido com solução padrão de ATP, e expresso em nmoles ATP. $mg^{-1}$ de proteína celular.

#### 11.19. DETERMINAÇÃO DE ADP e PIRUVATO

Foi realizada de acordo com o método de Williamson e Corkey (1969), usando o sistema:



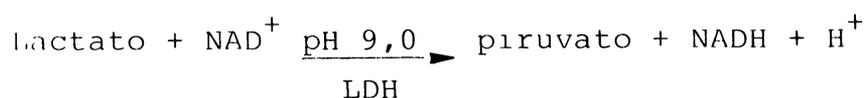
Foram incubados, durante 15 minutos: tampão fosfato de potássio 87 mM;  $MgCl_2$  1,7 mM; NADH 17  $\mu$ M; quantidades adequadas de extrato ácido; 21U de lactato-desidrogenase (LDH) e 24U de piruvato-quinase (PK) num volume final de 3 ml. A absorbância foi lida contra tubo branco, sem a enzima, em espectrofotômetro de duplo feixe de onda a 340 nm. O valor obtido foi comparado com padrão de piruvato e expresso em nmoles de piruvato. $mg^{-1}$  de proteína celular.

Adicionou-se então 1,7mM de fosfoenolpiruvato às cubetas do ensaio e do branco.

Foi determinado o novo valor de absorbância. Subtraindo o primeiro valor do segundo, obtém-se o valor correspondente à concentração de ADP, após comparação com solução padrão de ADP. Expressou-se o resultado em nmoles ADP. $mg^{-1}$ de proteína celular.

#### 11.20. DETERMINAÇÃO DE LACTATO

A dosagem de lactato foi realizada segundo o método de Horst (1965), acompanhando a reação:



Foram incubados durante 90 minutos: tampão glicina 0,41 M/hidrazina 0,16M pH9,0;  $\text{NAD}^+$  1,7mM; extrato ácido em quantidades apropriadas; e 14U de lactato-desidrogenase (LDH), num volume final de 3 ml. Após a incubação, determinou-se a absorvância do ensaio em relação ao tubo branco, na ausência de enzima, e comparado o valor com concentração padrão de lactato, em espectrofotômetro de duplo feixe de onda a 340 nm. Usou-se o tampão glicina 0,5M/hidrazina 0,2M como referência.

#### 11.21. ESTUDO DA LANÇADEIRA MALATO-ASPARTATO EM CÉLULA HeLa

A lançadeira malato-aspartato, nas células HeLa, intactas, foi avaliada segundo o método de Dionisi et al. (1974) e Greenhouse e Lehninger (1976), com algumas modificações. Neste método, é fornecido lactato como substrato e avaliada a produção de piruvato na presença e na ausência de inibidores da oxidação do piruvato formado, bem como de inibidores da produção do piruvato.

Células HeLa, colhidas conforme descrito, foram ressuspensas em PBS, de forma a se obter uma concentração próxima de 0,7mg de proteína celular.  $\text{ml}^{-1}$ , determinada pelo método de Lowry (1951). Foram aeradas sob agitação, por alguns minutos, e acrescidas de fluoreto de sódio 20mM, para haver inibição da via glicolítica. Então, a suspensão celular foi dividida em seis copos e em cada um foi realizada uma das seguintes adições: malonato 3mM; malonato 3mM e aminoxiacetato de sódio 0,2mM, metotrexato 0,4mM; malonato 3mM e rotenona 10  $\mu\text{M}$ ; antimicina A 27  $\mu\text{M}$ ; e um controle sem outros inibidores.

Os inibidores adicionados foram deixados em pré-incubação por 10 minutos, sempre sob agitação.

Em seguida, foi separada metade do conteúdo de cada copo, de modo a se obter um controle sem substrato e adicionado então 20mM de lactato de sódio, iniciando-se a contagem do tempo.

Imediatamente após a adição de lactato, foi retirada dos copos com lactato e dos copos controle, a alíquota referente ao tempo zero. Novas alíquotas foram retiradas após 10 minutos (tempo 10) e 30 minutos (tempo 30) da adição do substrato.

As alíquotas foram submetidas à extração ácida, de acordo com o método descrito anteriormente, para posterior dosagem do piruvato produzido e/ou consumido nas diversas incubações.

### III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### III.1. AÇÃO DO MTX SOBRE O TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE CÁLCIO

Além dos efeitos do MTX sobre as desidrogenases  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$ -dependentes, já demonstrados por Yamamoto (1985), Oliveira (1986) e Gomes (1988), procurou-se verificar se a atividade das enzimas  $\alpha$ -cetoglutarato, isocitrato e piruvato desidrogenases, dependentes de cálcio, não seria também afetada por uma interferência do MTX sobre o transporte mitocondrial de cálcio, tendo em vista a importância deste na regulação do ciclo de Krebs e seu papel protetor da célula, em condições de sofrimento celular.

Em concentrações de 0,4 a 1,6  $\mu\text{moles de MTX.mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial, a droga causa uma diminuição progressiva de até 20% do influxo mitocondrial de cálcio, e um aumento do efluxo de 20% na máxima concentração de MTX usado. Pré-incubação de 10 minutos do MTX com a preparação mitocondrial não modificou os resultados (Figura 4), que refletem a média de vinte e três experimentos efetuados.

Estes dados permitem concluir que o MTX causa, nas concentrações usadas na terapêutica, uma diminuição dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz. Este pode ser realmente um fator coadjuvante na inibição do ciclo de Krebs pela droga (Gomes, 1988), tendo em vista o aumento de atividade apresentado pelas desidrogenases do piruvato, do isocitrato e do  $\alpha$ -cetoglutarato, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (Denton & McCormack, 1980).

Além disso, e em consequência das alterações observadas nas mitocôndrias de células neoplásicas (Fiskum & Cockrell, 1985) o MTX poderia ainda reduzir a capacidade de tamponamento do  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias, em condições de sofrimento celular. Este efeito causaria então aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citossol, com consequente ativação das enzimas degradativas fosfolipases e proteases, causando morte celular por autólise da células neoplásicas hipóxicas e hipoperfundidas, que são comuns em tumores sólidos (Goldman, 1975).

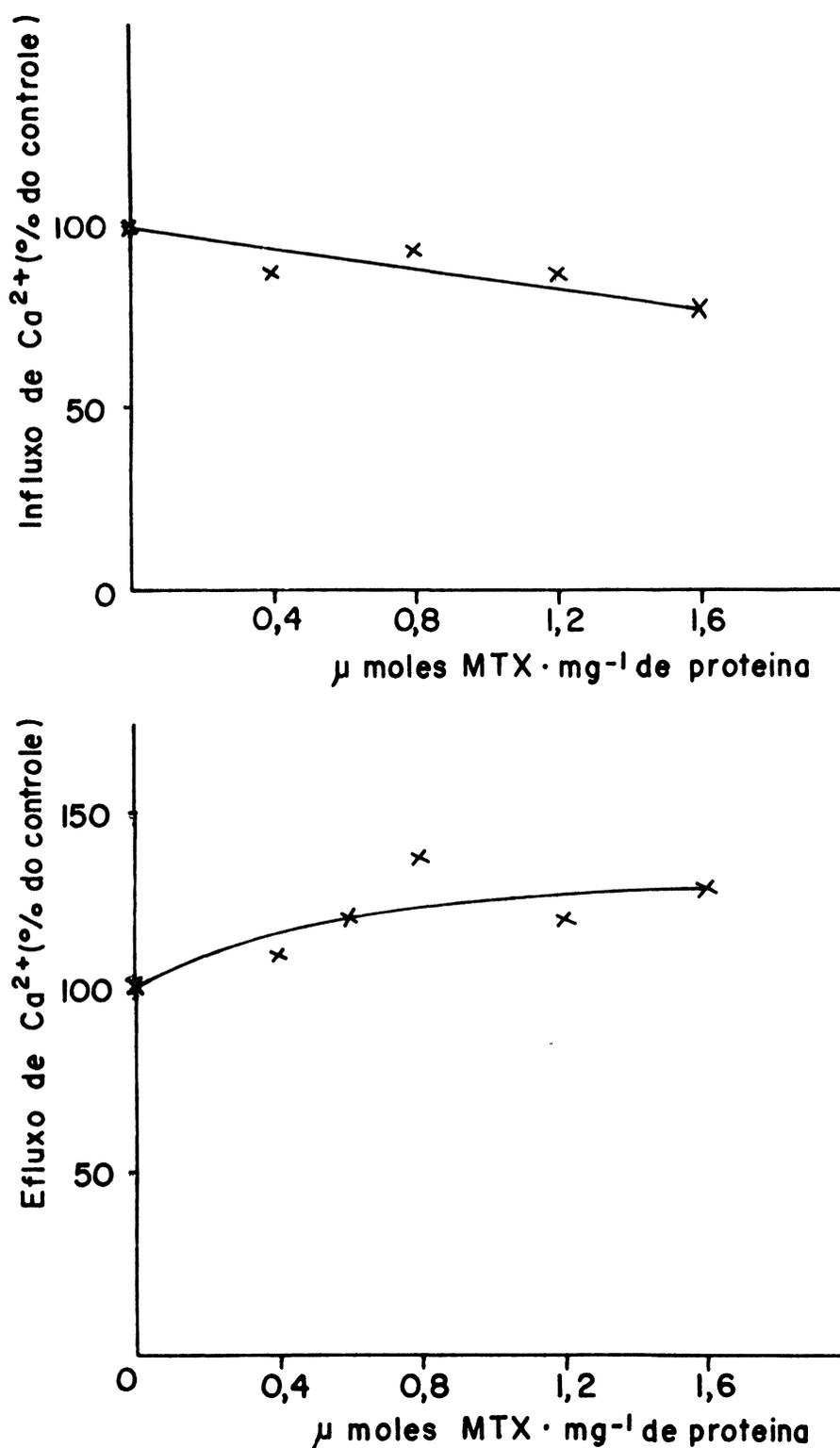


FIGURA 4 - Ação do metotrexato sobre o transporte mitocondrial de cálcio.

As velocidades relativas de captação e efluxo de cálcio foram determinadas em função da concentração de MTX, conforme descrito em Materiais e Métodos. Cada curva representa a média de 23 experimentos independentes.

100% corresponde a 170 nmoles de Cálcio captado.  $\text{min.}^{-1} \text{mg}^{-1}$  e a 24 nmoles de Cálcio ejetado.  $\text{min.}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

## III.2. AVALIAÇÃO DA LANÇADEIRA MALATO-ASPARTATO EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

### III.2.1. INTRODUÇÃO

Para testar o efeito do MTX sobre a lançadeira malato-aspartato, foram usadas mitocôndrias isoladas de fígado de rato como fonte de MDH e GOT mitocondriais e MDH e GOT purificadas, adquiridas comercialmente.

Para que a reoxidação de NADH pela MDH, medida através do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias, não sofresse interferência da oxidação de substratos endógenos, tornou-se necessário o uso de inibidores do ciclo de Krebs, após afastada uma possível ação indesejável destes inibidores sobre as enzimas MDH e GOT.

Para melhor avaliação dos resultados obtidos sobre a lançadeira malato-aspartato em mitocôndrias acopladas, foi estudada a ação do MTX sobre enzimas purificadas e mitocôndrias desacopladas.

Os resultados destes experimentos são detalhados a seguir.

### III.2.2. AÇÃO DO ARSENITO E MALONATO SOBRE AS ENZIMAS MDH E GOT

O arsenito inibe a piruvato-desidrogenase, desta forma inibindo o ciclo de Krebs por falta de acetil-CoA para realimentar o ciclo. Não sendo, no entanto, um inibidor específico, poderia interferir com a atividade das enzimas componentes da lançadeira malato-aspartato: malato-desidrogenase e glutamato-aspartato aminotransferase.

O arsenito mostrou ter uma ação importante sobre a GOT, desde que houvesse uma pré-incubação de 10 minutos do inibidor com a enzima. Neste caso, a inibição da transaminação atingiu 100% em concentrações de arsenito acima de 1,5mM (figura 5). A MDH sofreu inibição de 10% na presença de arsenito (figura 6).

Devido a esses efeitos do arsenito, optou-se pelo uso de outro inibidor do ciclo de Krebs, o malonato. Este é um análogo estrutural do succinato, inibindo a succinato desidrogenase competitivamente, podendo ser deslocado da enzima na presença de excesso do verdadeiro substrato.

Ao ser testado, o malonato não alterou a atividade da MDH e causou um pequeno estímulo da GOT, em concentrações menores que 2,5mM (figura 7).

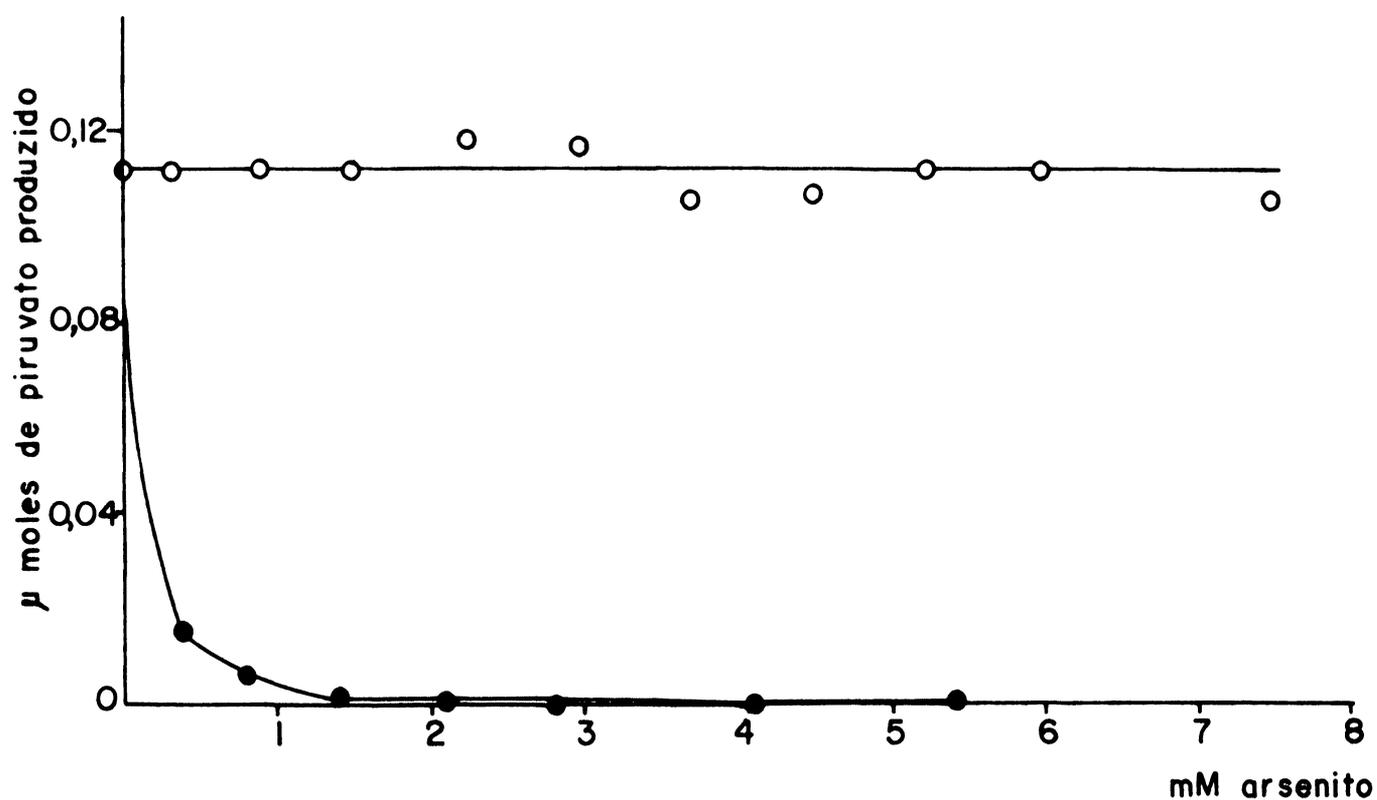


FIGURA 5 - Efeito do arsenito sobre a atividade da GOT.

O efeito do arsenito sobre a atividade da GOT foi avaliado conforme descrito em Materiais e Métodos, item II. 10.

○ : sistema sem pré-incubação com arsenito.

● : sistema pré-incubado 10 minutos com arsenito.

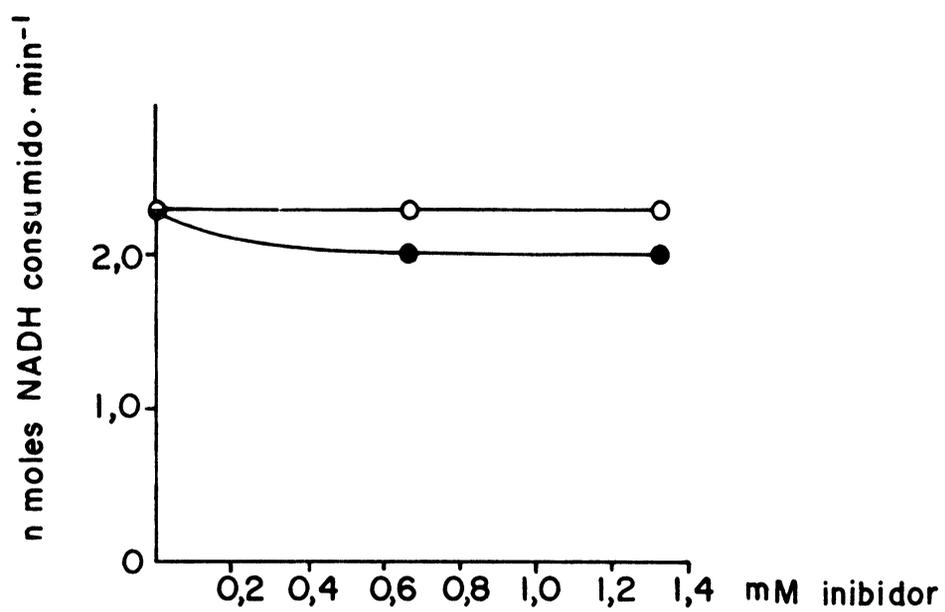


FIGURA 6 - Ação do arsenito e do malonato sobre a malato-desidrogenase.  
O efeito do arsenito e do malonato sobre a atividade da MDH foi avaliado conforme descrito em Materiais e Métodos, item II. 9.  
○ : malonato  
● : arsenito

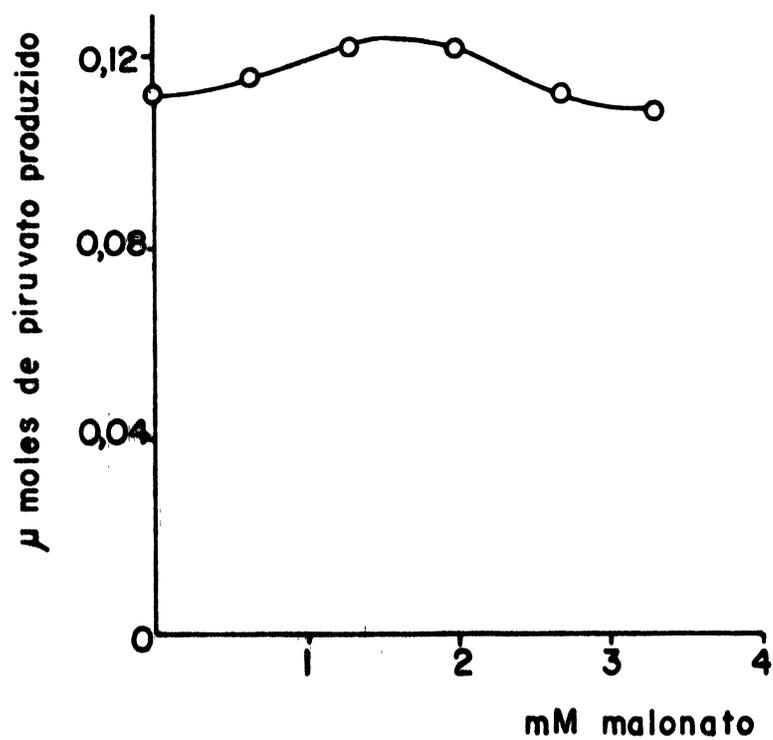


FIGURA 7 - Ação do malonato sobre a atividade da GOT.

O efeito do malonato sobre a atividade da GOT foi avaliado conforme descrito em Materiais e Métodos, item II. 10.

### III.2.3. INIBIÇÃO DO CICLO DE KREBS PELO MALONATO

Para inibir o ciclo de Krebs , diminuindo assim o consumo de oxigênio devido à oxidação de substratos endógenos, foi usado malonato.

Foi avaliada a capacidade inibitória do malonato sobre a velocidade respiratória, incubando-se a preparação mitocondrial com o inibidor, na presença de succinato (figura 8) e glutamato (figura 9), e acompanhando-se o consumo de oxigênio.

Observa-se que, na concentração 2,0mM, a inibição da respiração é máxima em todos os experimentos, embora não seja total. A respiração residual observada pode ser devida a três fatores: o efeito barreira exercido pela membrana mitocondrial interna que, criando um obstáculo à entrada do malonato, explica a menor e mais lenta inibição observada na incubação com mitocôndrias acopladas; atividade das restantes enzimas do ciclo de Krebs, a partir de outros substratos além do succinato, o que justifica a maior respiração residual na incubação com glutamato; e, finalmente, o aumento progressivo da concentração de succinato, levando ao deslocamento do inibidor e, conseqüentemente, à recuperação de parte da atividade catalítica da enzima.

### III.2.4. INIBIÇÃO NO CONSUMO DE OXIGÊNIO PELO MTX NA PRESENÇA DE MALONATO E MALATO

O MTX inibe parcialmente a oxidação do malato, na presença de malonato, em mitocôndrias acopladas, nos estados III e IV. Esta inibição é reflexo da ação da droga sobre a enzima malato desidrogenase (figura 10) e é um pouco mais acentuada durante o estado III, quando há maior demanda de NADH para a cadeia respiratória, estando a sua produção diminuída.

Sendo a malato desidrogenase uma das enzimas integrantes da lançadeira malato-aspartato, podemos esperar que o MTX cause uma diminuição da capacidade de transporte de equivalentes redutores do citossol para a mitocôndria.

### III.2.5. EFEITO DO MTX SOBRE A MALATO DESIDROGENASE E A GLUTAMATO-ASPARTATO AMINOTRANSFERASE PURIFICADAS E O SISTEMA RECONSTITUÍDO MDH/GOT.

Para avaliar experimentalmente o efeito do MTX sobre a lançadeira malato-aspartato, esta foi reconstituída usando-se o

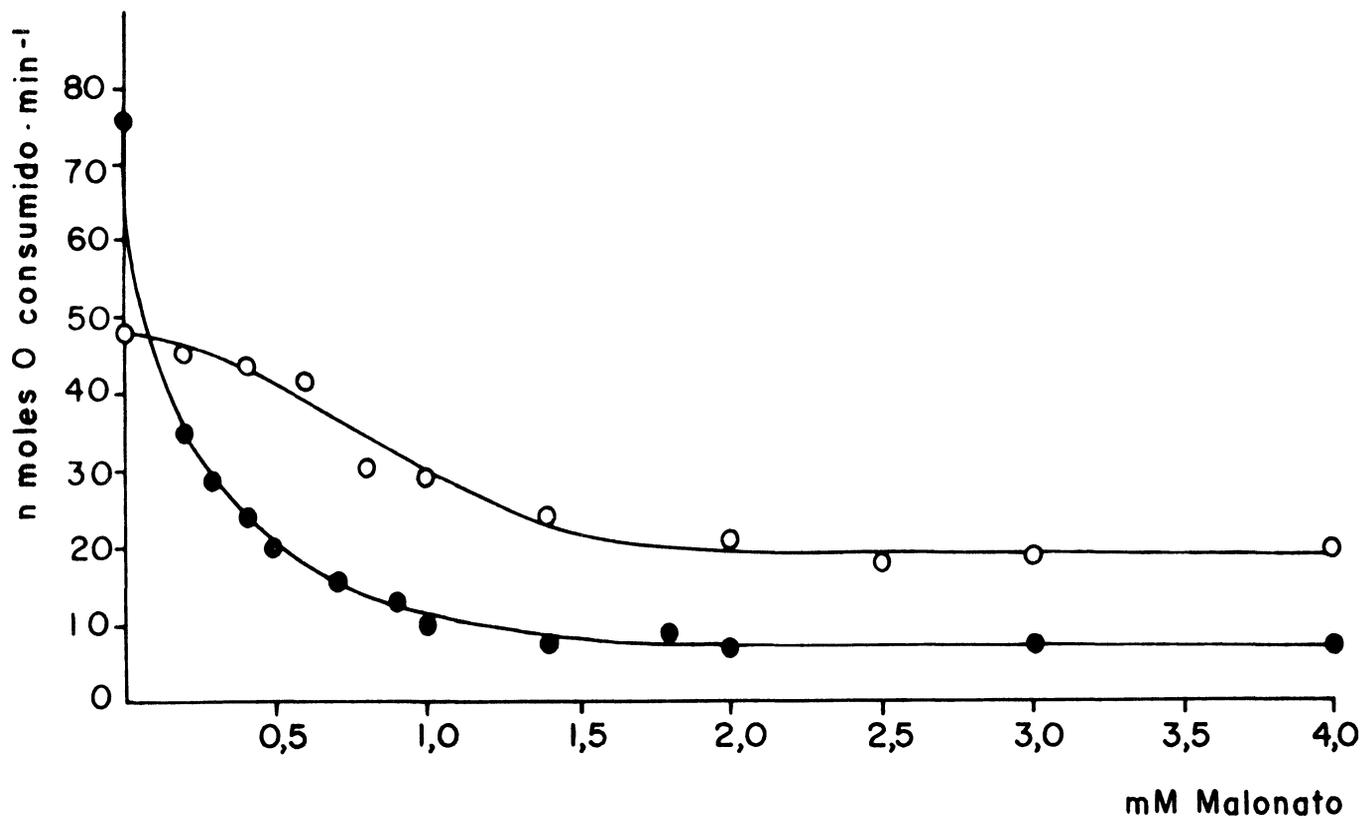


FIGURA 8 - Efeito do malonato sobre a velocidade respiratória na presença de succinato.

As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos, item II. 5.

○: velocidade respiratória no estado IV

●: velocidade respiratória de mitocôndria rompida por congelamento.

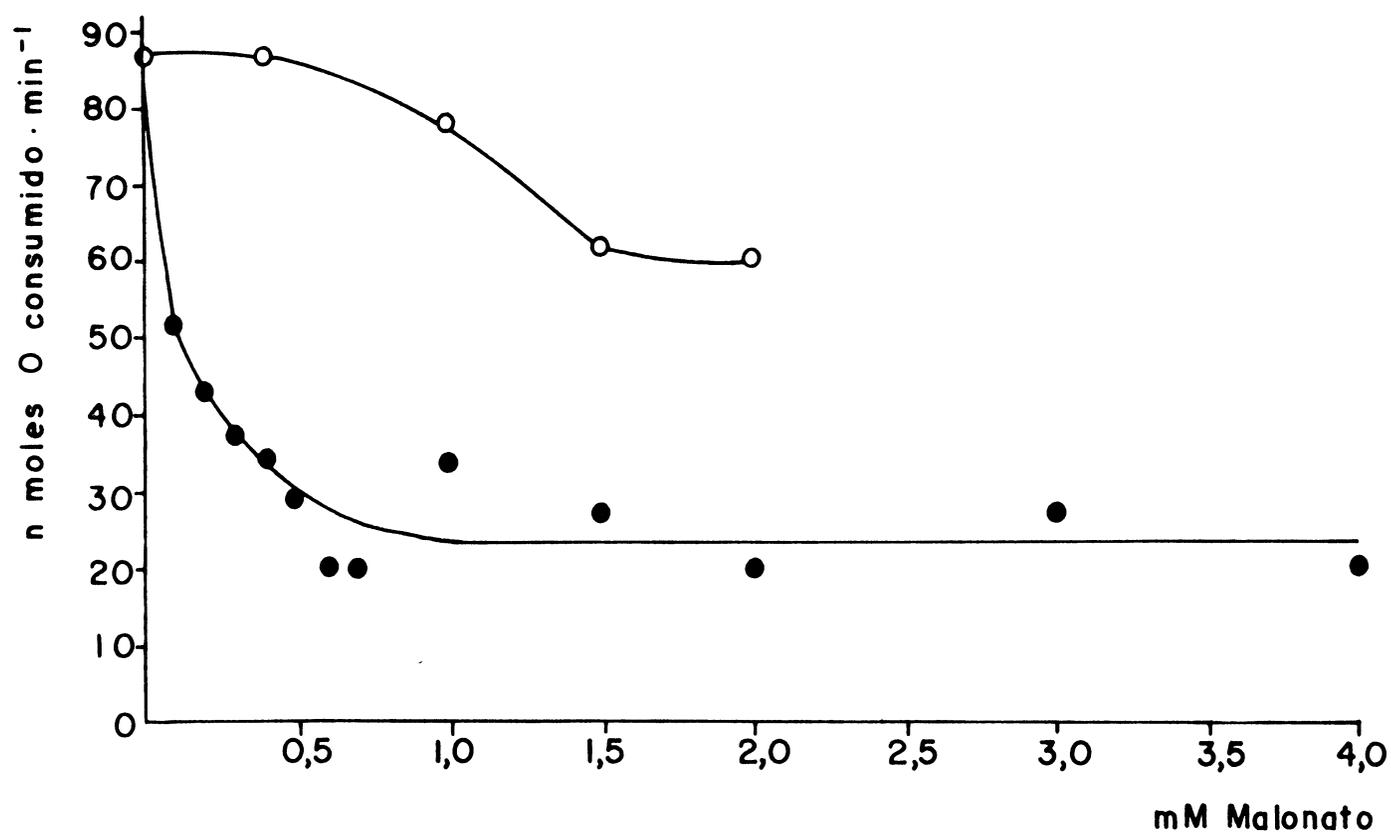


FIGURA 9 - Efeito do malonato sobre a velocidade respiratória na presença de glutamato.

As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos, item II. 5.

○ : velocidade respiratória no estado III

● : velocidade respiratória de mitocôndria rompida por congelamento.

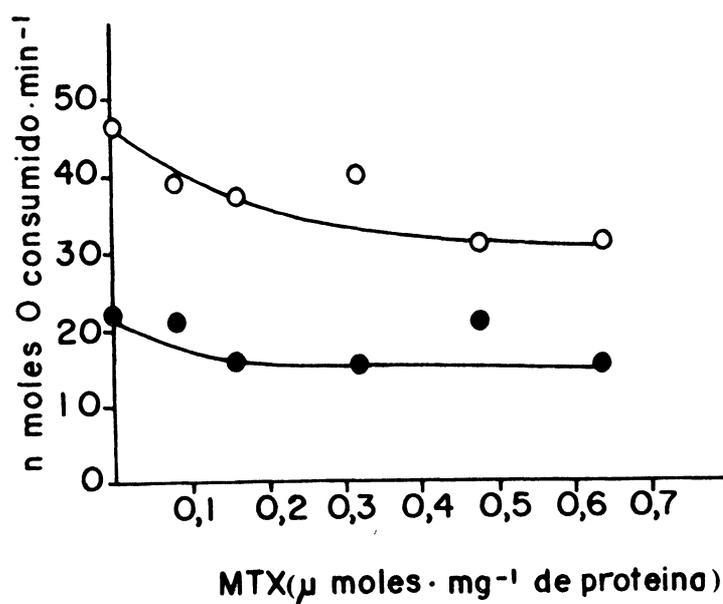


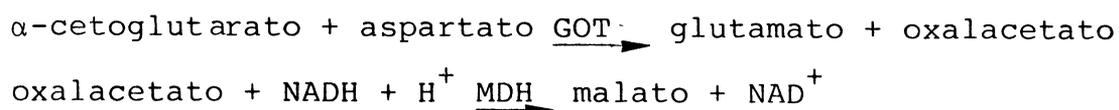
FIGURA 10- Efeito do metotrexato sobre a velocidade respiratória na presença de malato.

As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos, item II. 5.

○ : velocidade respiratória no estado III.

● : velocidade respiratória no estado IV.

seguinte sistema de reações, conforme descrito em Materiais e Métodos:



Acompanhando-se a diminuição de absorbância correspondente ao consumo de NADH, observa-se (figura 11) um pequeno estímulo inicial (0,03mM de MTX), seguido de inibição progressiva, que se torna total em concentrações de MTX superiores a 0,5 mM.

Para melhor avaliar e discutir este resultado, foi estudada a ação da droga sobre a malato desidrogenase e a glutamato-aspartato aminotransferase separadamente (figura 12 e 13).

A malato-desidrogenase sofre inibição progressiva pelo MTX atingindo 100% em concentrações da droga acima de 0,34mM.

A glutamato-aspartato aminotransferase apresenta um pequeno estímulo frente ao MTX, independente da concentração da droga e que seria aparentemente responsável pelo estímulo inicial observado na reconstituição do sistema de lançadeira (figura 11).

### III.2.6. AÇÃO DO MTX SOBRE A MDH MITOCONDRIAL

Mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram incubadas na presença do desacoplador FCCP, para haver oxidação de todo o NADH mitocondrial. Adicionando-se rotenona, para inibir a reoxidação do NADH posteriormente produzido, nota-se que a redução do  $\text{NAD}^+$  na presença de malato é inibida pelo MTX, de forma crescente e acompanhando o aumento de concentração da droga (figura 14).

Esta ação do MTX reflete a inibição da malato-desidrogenase mitocondrial, que atinge 100% em concentrações da droga correspondentes a  $0,35 \mu\text{moles.mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.

A atividade da MDH purificada e da MDH de mitocôndrias desacopladas pelo FCCP é 100% inibida pelo MTX. A inibição da respiração pelo MTX, na presença de malonato e usando malato como substrato, é de apenas 30%, e não de 100%, como se poderia esperar. A respiração residual observada pode ser atribuída à oxidação de substratos endógenos  $\text{NAD}^+$ -dependentes e ao efeito de barreira exercido pela membrana mitocondrial interna energizada, gerando níveis de MTX intramitocondrial abaixo dos esperados, com consequente inibição apenas parcial da MDH.

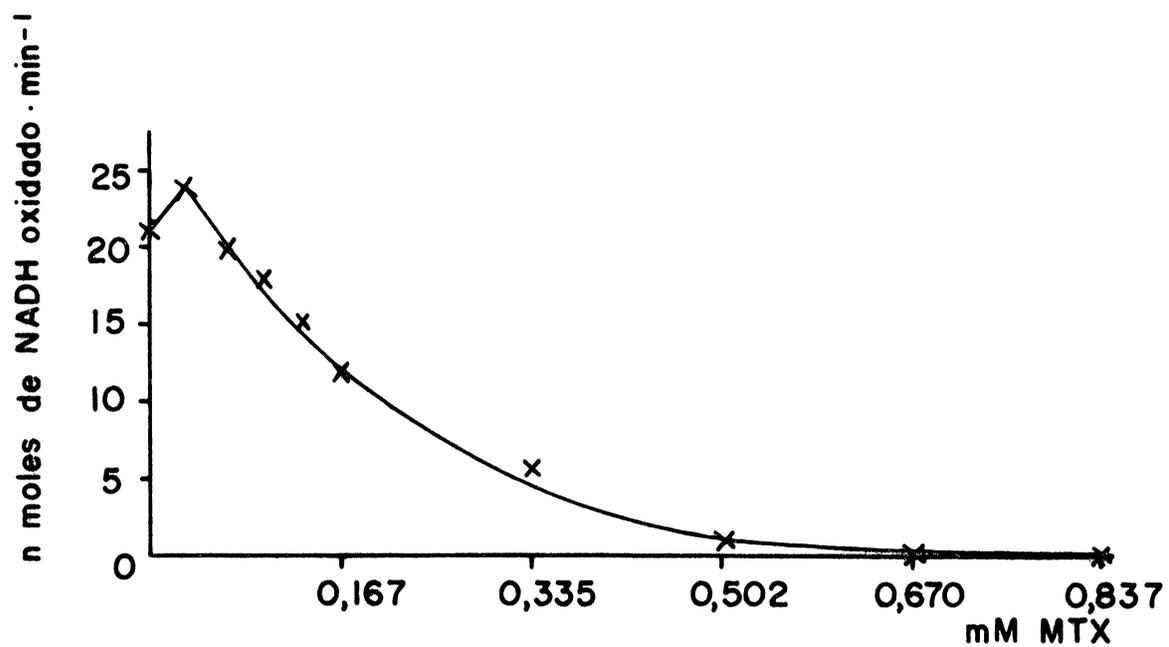


FIGURA 11 - Efeito do metotrexato sobre o sistema reconstituído da lançadeira malato-aspartato.

As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos, item II. 11.

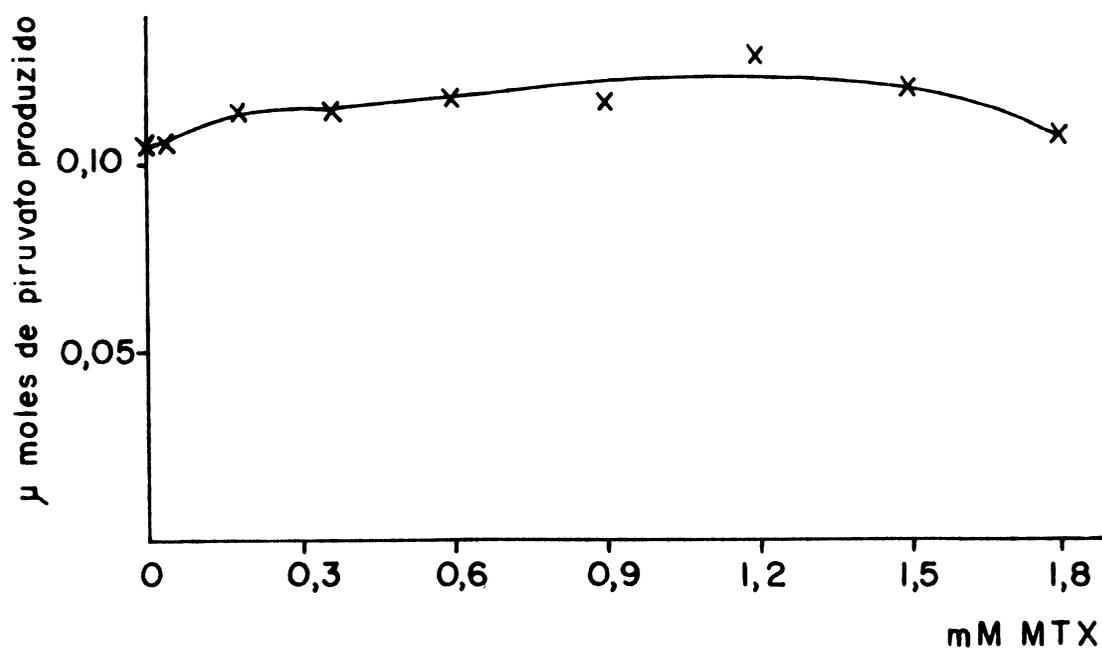


FIGURA 13 - Efeito do metotrexato sobre a glutamato-aspartato aminotransferase. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos, item II. 10.

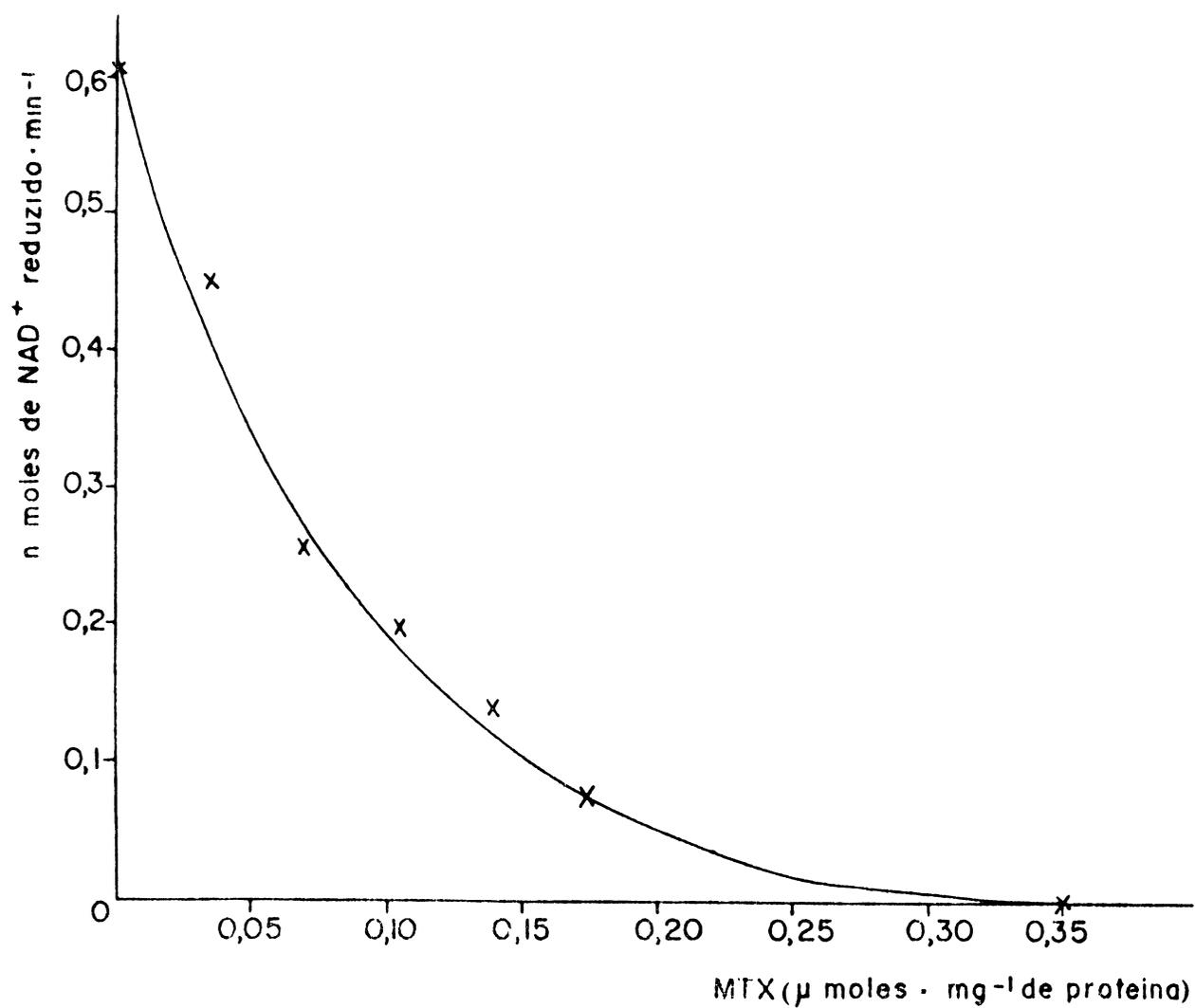


FIGURA 14 - Efeito do metotrexato sobre a malato-desidrogenase mitocondrial.  
As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos,  
item II. 8.

Os resultados acima apresentados permitem concluir que a droga causa efetivamente inibição da MDH nas concentrações comumente usadas na terapêutica.

Por conseguinte, a lançadeira malato-aspartato será inibida pelo MTX. A reoxidação mitocondrial do NADH citossólico, estando prejudicada, levará a um menor rendimento energético celular. Este efeito do MTX pode então estar relacionado à toxicidade geral apresentada pela droga, atingindo principalmente as células que utilizarem esta lançadeira para o transporte de equivalentes redutores do citossol.

Julgou-se então pertinente avaliar qual a via utilizada preferencialmente pelas células HeLa para o transporte de equivalentes redutores citossólicos e qual a ação do MTX sobre esse transporte nesta linhagem neoplásica.

### **III.3. AVALIAÇÃO DA LANÇADEIRA MALATO-ASPARTATO EM CÉLULAS HeLa.**

#### **III.3.1. INTRODUÇÃO**

O transporte de equivalentes redutores do citossol para as mitocôndrias, em algumas linhagens de células neoplásicas, foi avaliado por Dionisi (1974) e Greenhouse & Lehninger (1976).

Segundo estes autores, células de diferentes linhagens foram incubadas na presença de lactato, e avaliada a produção de piruvato. Relacionou-se a capacidade de acumular piruvato com o transporte de equivalentes redutores para as mitocôndrias: para que ocorresse acúmulo de piruvato no citossol, o NADH citossólico necessitaria ser reoxidado a nível mitocondrial, através de uma das lançadeiras — malato-aspartato ou glicerol-fosfato (esquema 4).

Usando inibidores da lançadeira malato-aspartato, os autores citados concluíram que as linhagens celulares neoplásicas estudadas utilizavam preferencialmente e, em alguns casos, exclusivamente, a lançadeira malato-aspartato para o transporte de equivalentes redutores para as mitocôndrias.

Ainda segundo esses trabalhos, o acúmulo de piruvato mostrou ser maior na presença de arsenito, que inibe a piruvato-desidrogenase, bloqueando a oxidação do piruvato pelo ciclo de Krebs. No entanto, este inibidor, devido aos seus efeitos sobre as enzimas integrantes da lançadeira malato-aspartato, demonstra-

dos anteriormente (figuras 5 e 6), não foi julgado adequado para os propósitos deste trabalho. Foi então usado o malonato como inibidor do ciclo de Krebs, na concentração de 3mM no meio de incubação das células HeLa, embora não se consiga inibição total do ciclo, devido à atividade residual das restantes enzimas a partir de substratos endógenos, como foi mostrado anteriormente (figuras 8, 9 e 10).

### III.3.2. INIBIÇÃO DA VIA GLICOLÍTICA

A incubação de células HeLa com lactato mostrou que o acúmulo de piruvato não era devido à ação da lactato-desidrogenase e das lançadeiras malato-aspartato ou glicerol-fosfato, pois ocorria mesmo na presença de cianeto 12mM, rotenona 16,7  $\mu$ M, que inibem a reoxidação do NADH produzido (figura 15). Então, deveria ser derivado da oxidação da glucose pela via glicolítica. Essa glucose seria derivada do glicogênio celular, uma vez que as células HeLa são células epiteliais.

Tornou-se então necessário o uso de um inibidor da via glicolítica. Considerando que o iodoacetato inibe, além da 3-fosfogliceraldeído-desidrogenase, também a MDH (Webb, 1963), optou-se pelo uso do fluoreto de sódio, inibidor da enolase.

### III.3.3. USO DO AMINO-OXIACETATO

Para o funcionamento da lançadeira malato-aspartato, é imprescindível a ocorrência de uma etapa de transaminação, catalisada pela GOT. Para comprovar a importância desta lançadeira no metabolismo de células HeLa, tornou-se necessária a sua inibição, permitindo desta forma avaliar se a lançadeira glicerol-fosfato é também operante nesta linhagem celular.

Para tal, foi usado amino-oxiacetato acima de 2,0mM, como inibidor específico da GOT, quando a enzima perde 100% de sua atividade (figura 16).

### III.3.4. ESTUDO DA LANÇADEIRA MALATO-ASPARTATO

Os experimentos, realizados na presença de 20mM de fluoreto de sódio, têm seus resultados mostrados nas figuras 17 e 18. Neles, determinou-se a variação da concentração de piruvato, proveniente da oxidação do lactato, desde o tempo 0, correspondente à adição de lactato, até 30 minutos após. Os valores apresentados mostram a diferença entre o piruvato encontrado aos

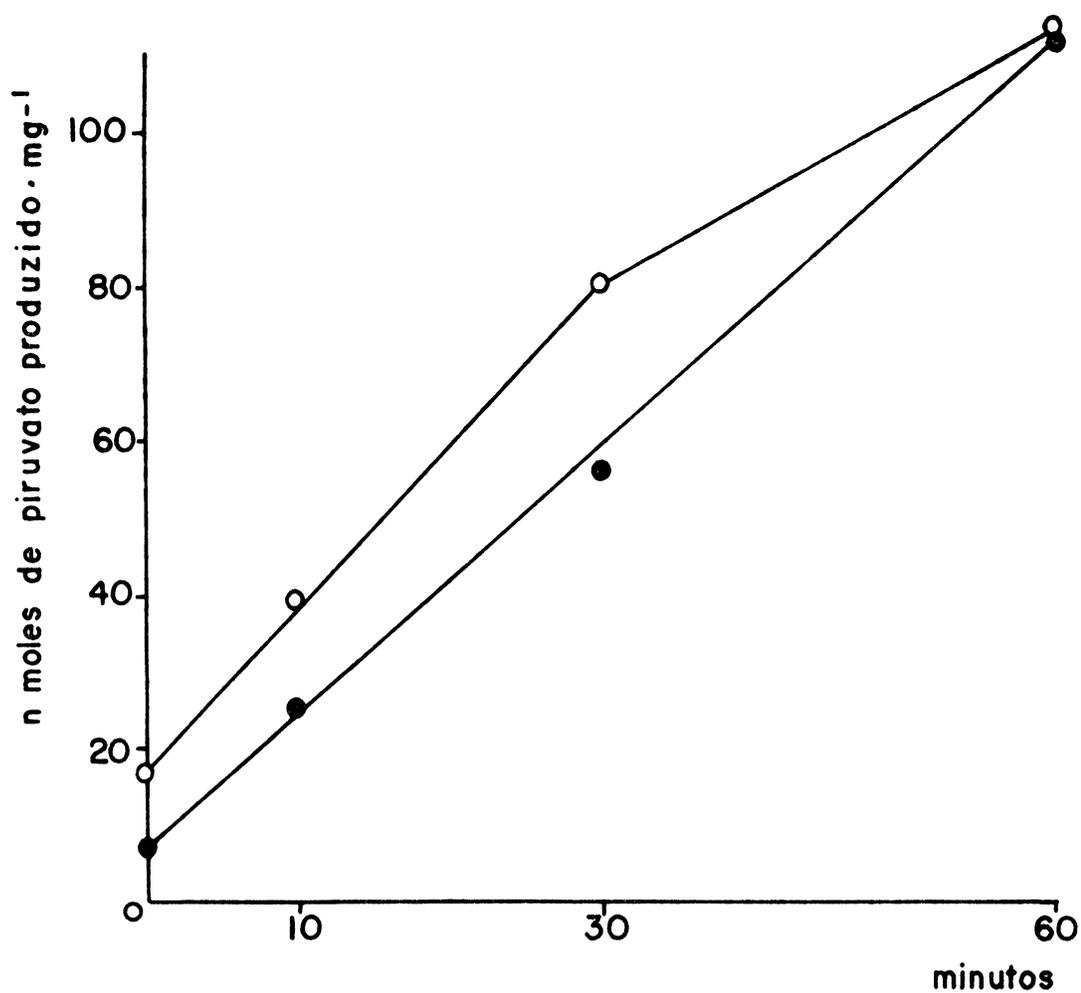


FIGURA 15- Efeito do cianeto e rotenona sobre a produção de piruvato em células HeLa, na ausência de inibidor da via glicolítica.

O sistema de incubação está descrito no item II. 21. O piruvato foi extraído de acordo com o item II. 15 e dosado conforme descrito no item II. 19 .

○: rotenona 16,7 μM

●: cianeto 12 mM.

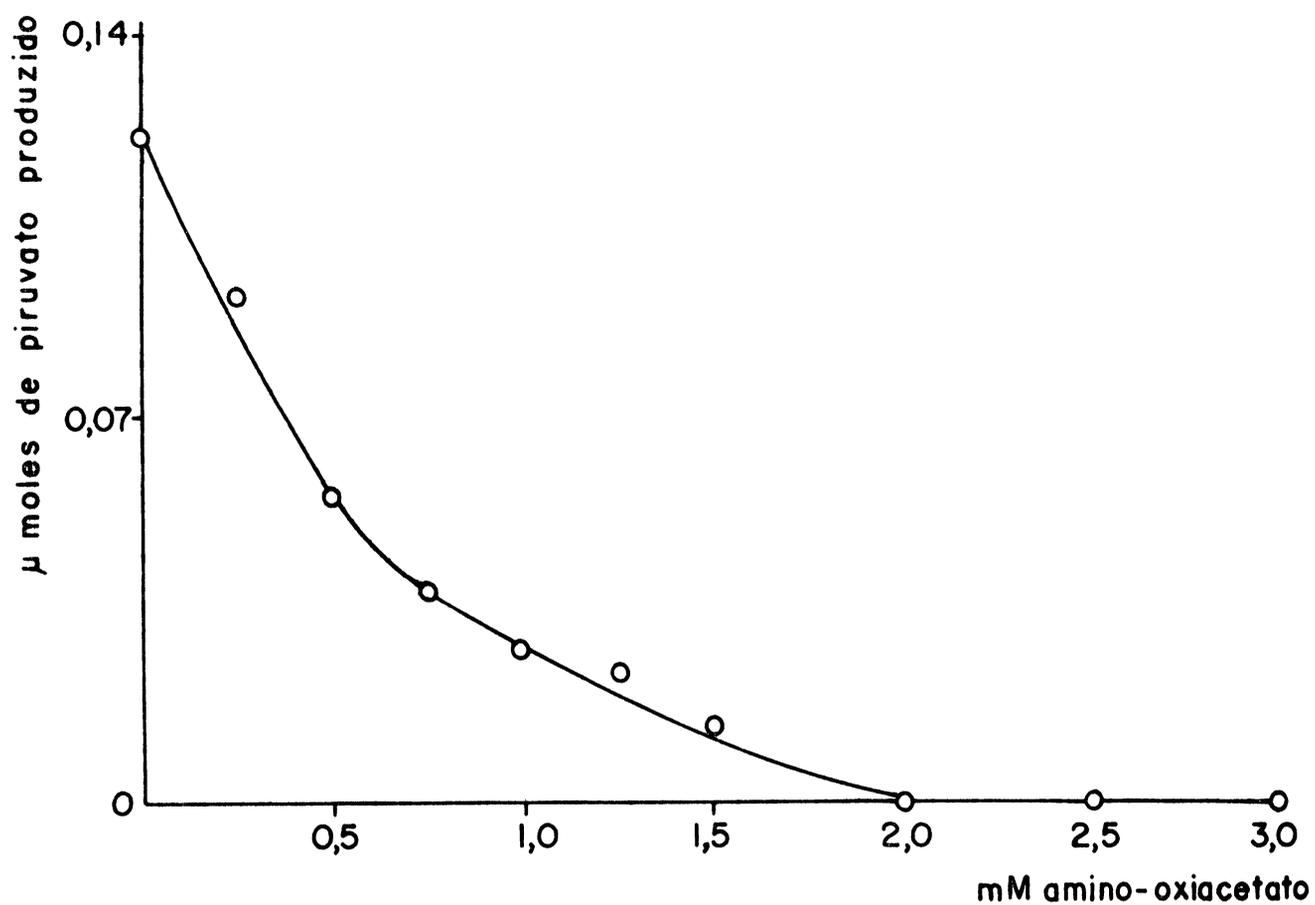


FIGURA 16 - Efeito do amino-oxiacetato sobre a glutamato-aspartato aminotransferase.

As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos, item 11. 10.

30 minutos e o presente no tempo 0.

Nota-se que o malonato inibe a oxidação, pelo ciclo de Krebs, do piruvato formado, permitindo que o piruvato se acumule 80% em relação ao controle, só com fluoreto.

Na presença de rotenona, a quantidade de piruvato acumulado diminui, atingindo 14% do controle, evidenciando o bloqueio da reoxidação do NADH produzido na oxidação do lactato a nível do complexo I da cadeia respiratória. Este resultado mostra que a reoxidação mitocondrial do NADH citossólico, em células HeLa, ocorre preferencialmente através da lançadeira malato-aspartato (esquema 5).

O efeito da adição de amino-oxiacetato é mais imediato, bloqueando a lançadeira malato-aspartato a nível da enzima GOT. Observa-se que não ocorre a produção de piruvato a partir de lactato, sendo que o piruvato endógeno passa a ser consumido pela célula, provavelmente através da atividade residual do ciclo de Krebs.

A antimicina-A, ao bloquear a cadeia respiratória a nível do complexo II, inibe ambas as lançadeiras para o transporte de equivalentes redutores (esquema 4), impedindo a produção de piruvato a partir de lactato e observando-se pequeno consumo do piruvato endógeno pelo ciclo de Krebs.

O metotrexato diminui a produção de piruvato em 54%, evidenciando a sua ação inibitória sobre a lançadeira malato-aspartato e sobre a enzima lactato-desidrogenase.

Estes resultados permitem concluir que as células HeLa usam a lançadeira malato-aspartato para o transporte de equivalentes redutores do citossol para as mitocôndrias, similarmente a outras linhagens neoplásicas descritas na literatura (Dionisi, 1974; Greenhouse & Lehninger, 1976). O MTX inibe a lançadeira, reduzindo a capacidade de transporte de equivalentes redutores para a mitocôndria e, conseqüentemente, causando uma depleção energética celular.

Mesmo que ocorra normalmente o transporte de pequena parte de equivalentes redutores citossólicos pela lançadeira glicerol-fosfato, esta também estaria inibida pela droga, por depender da ação da enzima glicerol-3-fosfato-desidrogenase citossólica, NAD<sup>+</sup>-dependente.

Uma outra opção de transporte dos equivalentes redutores para as mitocôndrias seria através do desvio malato-citrato (esquema 6). No entanto, por depender da malato-desidrogenase citossólica e mitocondrial, seria inibido pelo MTX na mesma forma que

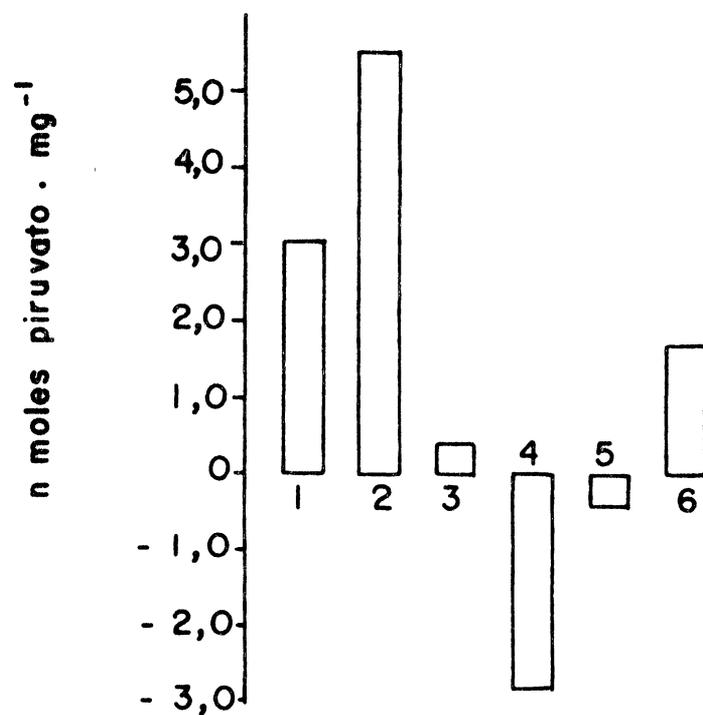


FIGURA . 17 - Estudo da lançadeira malato-aspartato em células HeLa, na presença de 20 mM de fluoreto de sódio.

O sistema de incubação está descrito no item II. 21. O piruvato foi extraído de acordo com o item II. 15 e dosado conforme descrito no item II. 19.

1: controle

2: malonato 3 mM

3: malonato 3 mM e rotenona 10  $\mu$ M

4: malonato 3 mM e amino-oxiacetato 0,2 mM

5: antimicina-A 27  $\mu$ M

6: metotrexato 0,4 mM.

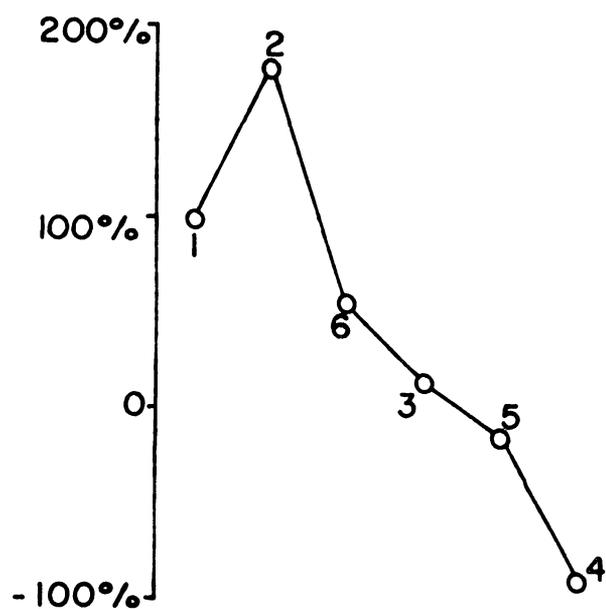
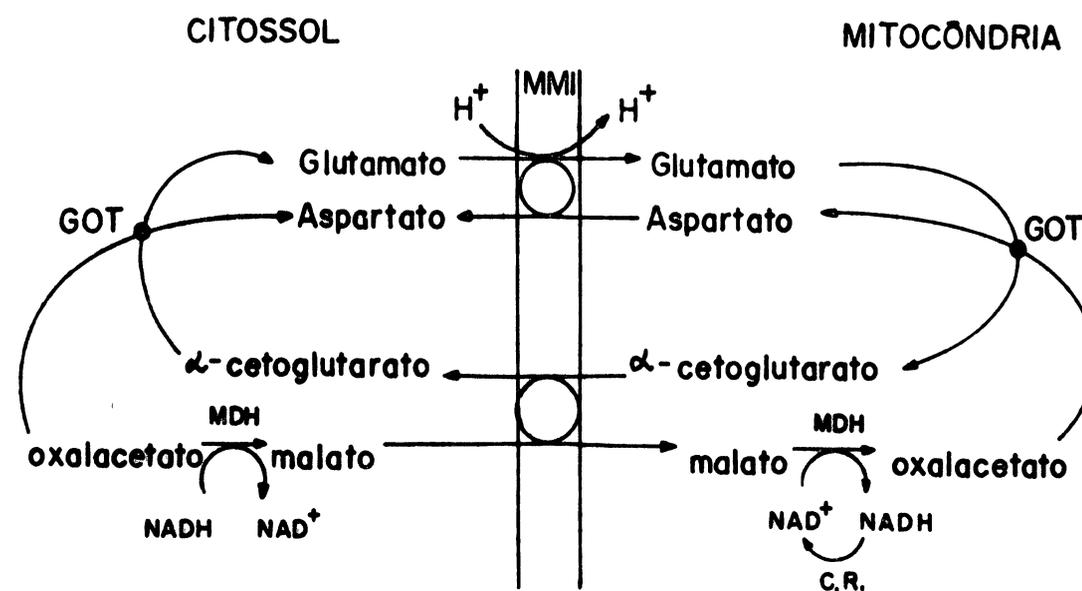
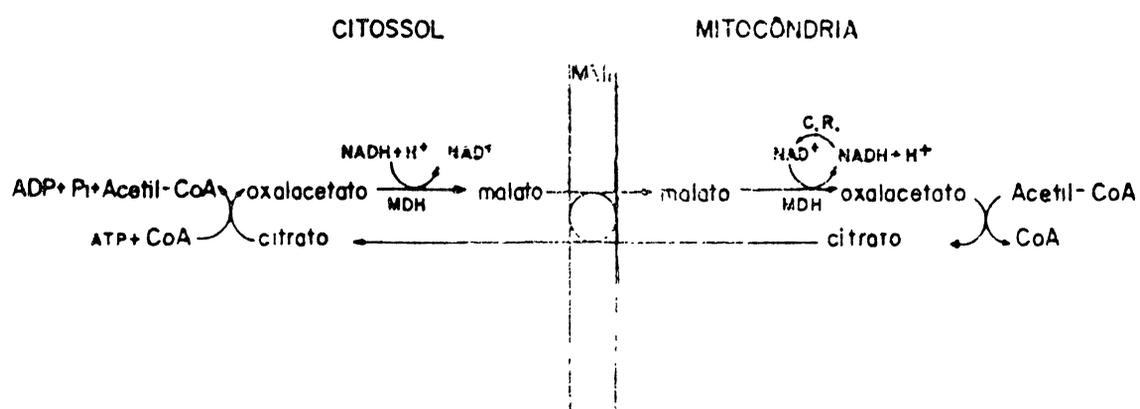


FIGURA 18 - Quantidade relativa de piruvato produzido ou consumido em células HeLa, na presença de diferentes inibidores. Os resultados foram obtidos da figura XVII.

1: controle  
2: malonato 3 mM  
3: malonato 3 mM e rotenona 10 μM  
4: malonato 3 mM e amino-oxiacetato 0,2 mM  
5: antimicina-A 27 μM  
6: metotrexato 0,4 mM.



ESQUEMA 5 - Representação do sistema da lançadeira malato-aspartato e sua relação com a cadeia respiratória.



ESQUEMA 6 - Representação do desvio malato-citrato e sua relação com a cadeia respiratória.

a lançadeira malato-aspartato e, como resultado final, haveria acúmulo das formas reduzidas dos nucleotídios da piridina, no citossol.

#### III.4. AÇÃO DO MTX SOBRE OS NÍVEIS DE ALGUNS METABÓLITOS EM CÉLULAS HeLa

Oliveira (1986), ao estudar a ação do MTX sobre a via glicolítica, em células HeLa, notou a ocorrência de aumento da relação piruvato/lactato, aos 10 minutos de adição de 1mM de glucose, correspondentes a 20 minutos de incubação das células com 0,4mM de MTX. Para melhor avaliar a inibição metabólica causada pela droga, tornou-se necessário aumentar o tempo de incubação das células com glucose para até 30 minutos, e avaliar as concentrações de  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NADPH}$ ,  $\text{ADP}$ ,  $\text{ATP}$ , lactato e piruvato, comparando com o experimento controle, realizado na ausência de MTX.

Observa-se que o MTX causa, a partir da adição do substrato, acúmulo de ADP e diminuição da concentração de ATP, que atinge 20% em 10 minutos, mantendo-se neste nível até 30 minutos de incubação com a glucose (fig.19).Gomes (1988) mostrou que a droga causa diminuição de até 10% na concentração de ATP, nas mitocôndrias, após 25 minutos da adição de substrato oxidativo. Conseqüentemente, a menor concentração de ATP na célula inteira reflete os efeitos inibitórios da droga sobre o metabolismo mitocondrial e a via glicolítica, enquanto há manutenção ou até aumento da utilização de ATP pela célula. Ocorre então alteração do equilíbrio entre a síntese e o consumo de ATP, com aumento da relação  $\text{ADP}/\text{ATP}$ .

O MTX causa 26% de acúmulo de piruvato, após 30 minutos da adição de glucose. Este resultado reflete a inibição da lactato-desidrogenase e do ciclo de Krebs pelo MTX.

Para melhor avaliar a inibição da lactato-desidrogenase no ambiente celular, foram avaliados os níveis de lactato produzido. Na presença de MTX, ocorre decréscimo de 33% na produção de lactato, confirmando a inibição da redução do piruvato a lactato.

O MTX causa ainda (figura 19) acúmulo de  $\text{NAD}^+$  e decréscimo de  $\text{NADH}$ , de aproximadamente 15%, refletindo o efeito inibidor da droga sobre as enzimas  $\text{NAD}^+$ -dependentes. Estes resultados são concordantes com os níveis de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADH}$  mitocondriais determinados por Gomes (1988), e podem refletir o efeito do MTX a nível mitocondrial, considerando que as dosagens em células HeLa são a somatória de todos os "pools" intracelulares. Efetivamente, o acú-

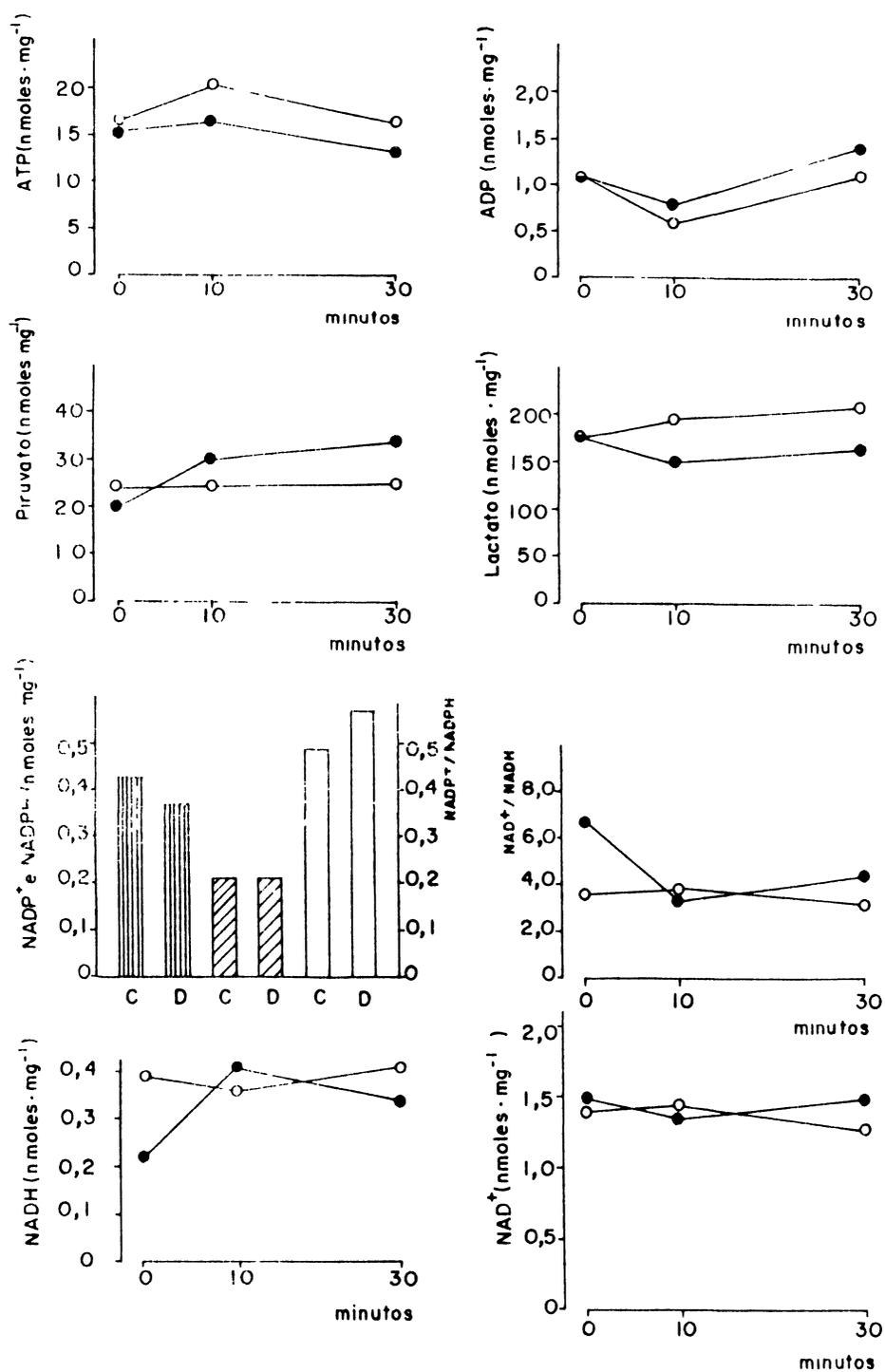


FIGURA 19- Efeito do metotrexato sobre alguns metabólitos, sobre as relações  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  em células HeLa. O sistema de incubação está descrito no item II. 14. Os metabólitos foram extraídos de acordo com o item II. 15 e dosados conforme descrito nos itens II. 16 a II. 20.

- : controle (C)
- : metotrexato 0,4 mM (D)
- ▨: NADPH
- ▧: NADP<sup>+</sup>
- : NADP<sup>+</sup>/NADPH

mulo de  $\text{NAD}^+$  nas mitocôndrias atinge 22%. A nível citossólico isoladamente, as concentrações de  $\text{NADH}$  estariam provavelmente aumentadas na presença da droga, graças à ação inibidora do MTX sobre as enzimas malato, lactato e glicerol-3-fosfato desidrogenases. O aumento da relação  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  a nível celular traduz então a somatória das inibições das desidrogenases  $\text{NAD}^+$ -dependentes pelo MTX na célula como um todo.

O  $\text{NADPH}$  conserva-se preferencialmente na forma reduzida, a nível celular, concordando com os valores determinados a nível mitocondrial (Gomes, 1988). As baixas concentrações intracelulares desta coenzima dificultaram a sua determinação, tendo sido calculada a média dos tempos 0,10 e 30, já que não ocorria aparentemente alteração dos níveis em função do tempo. Observa-se (figura 19) uma tendência à diminuição dos níveis celulares de  $\text{NADPH}$  na presença de MTX, com aumento da relação  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ . Este resultado acompanha o aumento da relação  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , mostrando a diminuição dos equivalentes redutores disponíveis para a cadeia respiratória e as reações de síntese dependentes de  $\text{NADH}$  e  $\text{NADPH}$ .

As coenzimas  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  concentram-se efetivamente nas mitocôndrias, apresentando-se em baixos níveis no citossol (Williamson & Corkey, 1979). Então, o estado de oxido-redução citossólico encontra-se encoberto pelas altas concentrações mitocondriais nas dosagens celulares totais apresentadas.

#### IV - DISCUSSÃO FINAL

O metotrexato tem sido usado como droga antineoplásica devido à sua analogia estrutural com o ácido fólico, o que o torna inibidor competitivo da enzima di-hidrofolato redutase. Causa uma depleção dos níveis intracelulares de folatos reduzidos, que são essenciais para a síntese de purinas, timidilato, metionina e serina (Roberts, 1978).

O MTX inibe, assim, a síntese de DNA, RNA e proteínas, o que o torna tóxico para as células neoplásicas, principalmente as que se encontram na fase "S" do ciclo celular, mas também para as células normais de tecidos altamente proliferativos.

Para evitar o aparecimento de resistência das células malignas à droga, têm-se usado altas doses de MTX, que se traduzem em concentrações plasmáticas na ordem de  $10^{-4}$ M. (Sirotnak & Donsbach, 1974). Nestas concentrações, o MTX afeta outras enzimas além da DHFR, nomeadamente as enzimas  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$ -dependentes, desidrogenases de glutamato, lactato, malato, glucose-6-fosfato (Vogel et al., 1963),  $\alpha$ -cetogluturato, isocitrato (Yamamoto, 1985), gliceraldeído-3-fosfato (Oliveira, 1986) e piruvato (Gomes, 1988).

A inibição das desidrogenases do piruvato, isocitrato,  $\alpha$ -cetogluturato e malato pelo MTX causa uma inibição parcial do ciclo de Krebs, com diminuição das razões ATP/ADP e NADH/ $\text{NAD}^+$  (Gomes, 1988). Para este efeito, além da ação direta do MTX sobre as desidrogenases, contribui a ação da droga sobre o transporte mitocondrial de cálcio, que neste trabalho mostrou diminuir o influxo e aumentar o efluxo, desta forma potencialmente reduzindo a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial. Sendo este íon ativador das enzimas isocitrato,  $\alpha$ -cetogluturato e piruvato desidrogenases, a redução na sua concentração mitocondrial inibe as enzimas citadas (Denton & McCormack, 1980). A nível mitocondrial, o MTX causa, conseqüentemente, depleção energética e da capacidade redutora.

A nível citossólico, na concentração  $4 \times 10^{-4}$ M, o MTX causa estímulo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e inibição da malato e lactato desidrogenases (Oliveira, 1986).

As células HeLa, como outras linhagens neoplásicas citadas na literatura (Dionisi et al, 1974; Greenhouse & Lehninger, 1976), usam preferencialmente a lançadeira malato-aspartato para o transporte de equivalentes redutores para a mitocôndria, o que foi mostrado neste trabalho. Estando inibidas a lançadeira malato-aspartato, dependente da malato-desidrogenase, a enzima lactato-desidrogenase e o poder redutor transmembrana plasmática (Oliveira et al, 1988), assim como o ciclo de Krebs (Gomes, 1988), esperar-se-ia um aumento da concentração de NADH no citossol, por bloqueio nas vias de oxidação do NADH produzido. O aumento da relação piruvato/lactato confirma esta hipótese, embora não fosse demonstrada através da dosagem do NADH e  $\text{NAD}^+$  celulares totais. Considerando que esta última medida traduz o somatório de todos os "pools" celulares destas coenzimas, o nível citoplasmático encontra mascarado pelo "pools" celulares restantes, como o mitocondrial, onde há acúmulo de  $\text{NAD}^+$  (Gomes, 1988).

O aumento do NADH citossólico reduziria a atividade da via glicolítica, por falta de  $\text{NAD}^+$  necessário à ação catalítica da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Realmente, esta inibição da via glicolítica foi observada em células HeLa por Oliveira (1986).

Por outro lado, a piruvato-quinase do tipo  $\text{M}_2$ , presente nas células HeLa, sofre inibição pela redução dos níveis de frutose-1,6-difosfato (Eigenbrodt & Glossman, 1980), e por aumento da concentração citoplasmática de cálcio (Ochs, 1988). O MTX causa diminuição da concentração de frutose-1,6-difosfato (Oliveira, 1986) e, potencialmente, aumento da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ , devido à sua ação sobre o transporte mitocondrial de cálcio, visto neste trabalho. Então, a inibição da piruvato-quinase, aliada à possível inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, podem ser os fatores responsáveis pela reversão parcial do efeito Crabtree, observado em células HeLa (Oliveira, 1986). Com isso, a produção de ATP por fosforilação a nível de substrato fica diminuída.

Em termos gerais, a célula incubada com a droga, por 30 minutos, nas concentrações citadas anteriormente, apresenta redução da sua capacidade de transferência energética, com diminuição dos níveis de ATP e menor capacidade redutora, com diminuição das relações  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  e  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ .

Conclui-se que, nos esquemas de tratamento usuais, em que a droga atinge os níveis citados e neles permanece por várias horas, as consequências em termos energéticos para as células podem se

agravar e, desta forma, causar lesões irreversíveis, levando à morte celular por depleção energética, antes que os efeitos sobre a síntese de DNA, RNA e proteínas se tornem letais. Efetivamente, os tumores sólidos apresentam um grande número de células na fase  $G_1$ , hipóxicas e hipoperfundidas (Goldman, 1975), que se ressentiriam mais da depleção energética que da falta transitória de folatos reduzidos. Além disso, estas células estariam mais sujeitas à ação do MTX sobre o transporte mitocondrial de cálcio, pois as células em condições de sofrimento têm sua permeabilidade de membrana plasmática aumentada para o cálcio (Fiskum & Cockrell, 1985). Se as mitocôndrias tiverem a capacidade de tamponamento de cálcio alterada, por redução do influxo e aumento do efluxo, como acontece por ação do MTX, o aumento citossólico dos níveis de  $Ca^{2+}$  pode tornar-se tóxico para a célula, ao ativar as enzimas degradativas fosfolipases e proteases (Fiskum & Cockrell, 1985). Resta ainda determinar se o efeito do MTX sobre o transporte de  $Ca^{2+}$  se restringe às mitocôndrias, ou se há interferência sobre os sistemas de membrana plasmática e de retículo endoplasmático.

A ação citotóxica do MTX se amplia, desta forma, em termos do ciclo celular, atingindo não somente as células na fase S, devido à inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, mas também as fases restantes, por carência energética e redutora, necessárias para o metabolismo celular normal. Ampliando ainda mais este efeito, o MTX provavelmente inibe as desidrogenases  $NAD^+$  e  $NADP^+$  dependentes, de outras vias ainda não estudadas, tais como síntese e oxidação dos ácidos graxos e via das pentoses.

A menor produção de ATP, por ter sua velocidade de formação diminuída pela inibição da via glicolítica, ciclo de Krebs, transporte de equivalentes redutores citossólicos e síntese "de novo," sendo que seu consumo não é inibido, leva finalmente à inibição da síntese proteica, glicólise, transporte de hexoses, reações de fosforilação e outras reações dependentes de ATP.

As ações da droga sobre a capacidade redutora e os níveis de ATP levariam à depleção energética e redução do crescimento celular, que podem causar alterações irreversíveis e letais nas células de metabolismo mais ativo.

Sobre o metabolismo dos ácidos graxos, o MTX aparentemente favorece o processo de síntese em relação à oxidação, causando o aparecimento de degeneração gordurosa no fígado, como efeito colateral indesejável. Para tal contribuem, aparentemente, o aumento de

atividade das reações catalisadas pela acil-CoA sintetase, glicero-fosfato acil-transferase microssômica e carnitina palmitoil transferase mitocondrial, observada por Aarsaether et al. (1988). Além desses efeitos, os níveis aumentados de citrato, causados pela inibição do ciclo de Krebs (Gomes, 1988), aliados ao aumento da concentração de NADH citossólico e di-hidroxi-acetona fosfato, possivelmente causam um aumento da síntese de lipídios no fígado. No entanto, na síntese de ácidos graxos há a participação de duas etapas redutoras,  $\text{NADP}^+$ -dependentes, a nível das enzimas 3-cetoacil redutase e enoil-redutase, que se esperaria fossem inibidas pelo MTX, a exemplo das restantes enzimas  $\text{NADP}^+$ - dependentes estudadas. Assim, esta via necessitará posterior avaliação, para melhor entendimento e controle dos efeitos colaterais tóxicos causados pela droga.

## V - CONCLUSÕES

O MTX inibe o influxo mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  e aumenta o efluxo, em 20%, desta forma causando redução dos níveis mitocondriais de cálcio, com conseqüente inibição das enzimas isocitrato,  $\alpha$ -cetoglutarato e piruvato desidrogenases. Este efeito contribui para a inibição do ciclo de Krebs pelo MTX, observado por Gomes (1988), e possivelmente para a citotoxicidade por redução da capacidade de tamponamento do  $\text{Ca}^{2+}$  citossólico, patologicamente elevado em células em sofrimento.

A lançadeira malato-aspartato, de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, é inibida pelo MTX, devido à ação da droga sobre a MDH mitocondrial, havendo então redução da capacidade de transporte de equivalentes redutores do citossol para as mitocôndrias.

As células HeLa, a exemplo de outras linhagens neoplásicas descritas na literatura, utilizam a lançadeira malato-aspartato para o transporte de equivalentes redutores, e esta lançadeira mostrou-se 46% inibida na presença da droga.

O MTX causou ainda aumento das relações  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ,  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e  $\text{ADP}/\text{ATP}$ , além de acúmulo de piruvato e redução dos níveis de lactato, em células HeLa incubadas com glucose.

Estes efeitos do MTX vêm trazer novo reforço às evidências de que a droga tem uma ação múltipla sobre o metabolismo celular, e que as diminuições da capacidade energética, da capacidade redutora e do transporte de equivalentes redutores são fatores importantes na citotoxicidade apresentada pelo MTX, por finalmente inibirem a atividade das diversas vias metabólicas dependentes de ATP, NADH e NADPH.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARSAETHER, N.; BERG, R. K.; AARSLAND, A.; SVARDAL, A. and VELAND P.M. Effect of methotrexate on long-chain fatty acid metabolism in liver of rats fed a standard or a defined, choline deficient diet. Biochim. Biophys. Acta, 958: 70-80, 1988.
- ATLANTE, A; MORENO, G.; PASSARELA, S. and SALET, C. Hematoporphyrin derivative (photofrin II) photosensitization of isolated mitochondria: impairment of anion translocation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 141:584-590, 1986.
- BENDER, R.A. Membrane transport of methotrexate (NSC-740) in human neoplastic cells. Cancer Chemoth. Rep., 6:73-82, 1975.
- BERTINO, J.R. Toward improved selectivity in cancer chemotherapy. The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. Cancer Res., 39: 293.304, 1979.
- BIRDSALL, B; BURGEN, A. S. V. and ROBERTS. G. C. K. Binding of coenzyme analogues to Lactobacillus casei dihydrofolate reductase: binary and ternary complexes. Biochemistry, 19: 3723-3731, 1981.
- CARAFOLI, E. Intracellular Calcium homeostasis. Ann. Rev. Biochem., 56: 395-433, 1987.
- CHANCE, B. and WILLIAMS, G.R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. Nature, 175:1120-1121, 1955.
- CURT, G. A.; JOLIVET, J.; CARNEY, D.N.; BAILEY, B.D.; DRAKE, J.C. CLENDENINN, N.J. and CHABNER, B.A. Determinants of the sensitivity of human small-cell lung cancer cell lines to methotrexate. J.Clin. Invest., 76:1323-1329, 1985.
- DEMBO, M.; SIROTNAK, F.M. and MOCCIO, D.M. Effects of metabolic deprivation on methotrexate transport in L1210 leukemia cells further evidence for separate influx and efflux systems with different energetic requirements. J. Membr. Biol., 78:9-17, 1984.
- DENTON, M.D. and McCORMACK, J.G. On the role of calcium trans-

- aspartate shuttle in various tumor types. Cancer. Res., 36: 1932-1936, 1976.
- HANSFORD, R.G. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 102: 1-72, 1985.
- HORORST. H.J. L(+) Lactate determination with lactic dehydrogenase and DPN. In: BERGMEYER, H.V. Meth. Enzymatic Analysis New York & London, A.P. 1965. 1064 p.p. 266-270.
- KAMINSKAS, E. and NUSSEY. A.C. Effects of methotrexate and of environmental factors on glycolysis and metabolic energy state in cultured Ehrlich ascites carcinoma cells. Cancer. Res., 38: 2989-2996, 1978.
- KAMINSKAS, E. Inhibition of sugar uptake by methotrexate in cultured Ehrlich ascites carcinoma cells. Cancer. Res., 39: 908-995, 1979.
- KLINGENBERG, M. Nicotinamide-adenine dinucleotides (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, NADH, NADPH). Spectrophotometric and fluorimetric methods. In: BERGMEYER, H.V. Meth. Enzymatic Analyses, 4: 2045-2059; 1974.
- KOUAMOOU, J.; TRENTESAUX, C.; DESOIZE, B.; CARPENTIER Y. and JARDILLIER, J.C. Effects du méthotrexate sur la consommation d'oxygène des cellules L1210 et de leurs mitochondries isolées. C.R. Acad Sc. Paris, 292: 485-490, 1981.
- LIPPENS, R.J.J. Methotrexate I. Pharmacology and pharmacokinetics. The Am.J. Pediatr. Hematology/oncology, 6: 379-412, 1984.
- LOWRY. O.H.; ROSEBROUGH, H.J.; FARR, A.C.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275. 1951.
- NICHOLLS, D. Some recent advances in mitochondrial calcium transport. Trends Biochem. Sci., 13: 36-38, 1981.
- NICHOLLS, D.G. Intracellular calcium homeostasis. Br. Med. Bull., 42: 353-358, 1986.
- NIMEC, Z. and GALIVAN, J. Regulatory aspects of the glutamylation of methotrexate in cultured hepatoma cells. Arch. Biochem. Biophys., 226: 671-680, 1988.
- OCHS, R. Does calcium regulate pyruvate kinase? Trends Biochem. Sci. 13: 1 - 2, 1988.
- OLIVEIRA, M.B.M. Estudos dos efeitos do metotrexato sobre alguns

- parâmetros metabólicos em células HeLa e em fígado perfundido. Curitiba , 1986. 107p. Tese, Doutorado, Universidade Federal do Paraná.
- OLIVEIRA, M.B.M. ISHII E.L.; YAMAMOTO N.S.; BRACHT, A.M.; KELMER; CAMPELLO, A.P.; KLÜPPEL, M.L.W. and BRACHT, A. Methotrexate increases glycogenolysis in the intact rat liver. Res Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 53: 173-181, 1986.
- OLIVEIRA, M.B.M.; CAMPELLO, A.P. and KLÜPPEL, M.L.W. Methotrexate studies on the cellular metabolism. III; Effect on the transplasma-membrane redox activity and on ferricyanide-induced extrusion by HeLa cells. Cell Biochem. Funct., no prelo, 1989.
- PHILLIPS, H. J. Dye exclusion tests for cell viability. In: KRUSE, Jr. P.F. and PATTERSON, Jr. M.K. ed. Tissue Culture methods and applicattions. New York A.P., 1973, 868. p. 406-408.
- REITMAN, S. & FRANKEL, S.A. colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Pathol. 28: 56-63, 19657.
- ROBERTS, G.C.K. Origins of specificity in the binding of small molecules to dihydrofolate reductase. In: Ciba Foundation Symposium 60 (new series). Molecular Interactions and Activity in Proteins, 1978, Excerpta Medica. Amsterdam-Oxford-New York 279p p. 89-104.
- ROBERTS, D.; KIDD, W; PRATT, C.B.; PECK, C. and GRINNEL, J. Serum levels of methotrexate by the ligant-binding assay after "high-dose" therapy for osteosarcoma. Cancer, 44: 881-890, 1979.
- SASAKI, K. TANAKA, J. and FUJIMOTO, T. Theoretically required urinay flow during high-dose methotrexate infusioun. Cancer chemother. Pharmacol., 13: 9-13, 1984.
- SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicadores. In: FLEISCHER S. and PACKER, L. eds. Meth. Ezymol.: Biomembranes, bioenergetics: biogenesis of mitochondria organization and transport. New York, A.P. 1979. V. LVI. p. 301-358
- SIROTNAK, F.M. and DONSBACH, R.C. The intracellular concentration dependece of antifolate inhibition of DNA synthesis in L1210 Leukemia Cells. Cancer Res., 34: 3332-3340, 1974.
- SLATER, T.F. and SAWYER, B.A. colorimetric method for estimating the pyridine nucleotide contend of small amounts of animal tissue. Nature, 193: 454-456, 1962.
- SLATER, E.C. Application of inhibitors and uncouplers for a study

- of oxidative phosphorylation. In: ESTABROOK, R. W. and PULLMAN, M. E. eds. Meth. Enzymol: Oxidation and phosphorylation. New York A. P. 1967 V. X p. 48-57.
- STONE, S.R. and MORRISON, J. F. The pH dependence of the binding of dihydrofolate and substrate analogues to dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 745: 247-258, 1983.
- STONE, S.R. and MORRISON, J. F. Mechanism of inhibition of dihydrofolate reductases from bacterial and vertebrate sources by various classes of folate analogues. Biochim. Biophys. Acta, 869: 275-285, 1986.
- TAIRA, K.; FIERKE, C.A.; CHEN, J.T.; JOHNSON, K.A. and BENKOVIC, S.J. On interpreting the inhibition of and catalysis by dihydrofolate reductase. Trends Biochem. Sci., 12: 275-278, 1987.
- TATTERSALL, M.H.N.; PARKER, L.M.; PITMAN, S.W.; and FREI III, E. Clinical pharmacology of high-dose methotrexate (NSC-740). Cancer Chemoth. Rep., 6: 25-29, 1975.
- VOGEL, W.H.; SNYDER, R. and SCHULMAN, M.P. The inhibition of dihydrogenases by folic acid and several of its analogs. Biochem. Biophys. Res. Commun., 10: 97-101, 1963.
- VOSS, D.O.; CAMPELLO, A.P. and BACILA, M. The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 4: 48-51, 1961.
- VOSS, D.O.; COWLES, J.C. and BACILA, M. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. Anal. Biochem., 6: 211-222, 1963.
- WEBB, J.L. Malonate. In: Enzyme and metabolic inhibitors. New York, A. P., 1966. V. 2, cap.1, p.1-244.
- WEBB, J.L. Iodoacetate and Iodoacetamide. In: Enzyme and metabolic inhibitors. New York, A.P., 1966. V.3. cap.1, p.1-283.
- WILLIAMS, J.W., MORRISON, J.F. and DUGGLEBY, R.G. Methotrexate, a high-affinity pseudosubstrate of dihydrofolate reductase. Biochemistry, 18: 2567-2573, 1979.
- WILLIAMSON, J.R. and CORKEY, B.E. Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorimetric enzyme methods. In: LOWENSTEIN, J.M. Meth. Enzymol.: Citric Acid

Cycle. New York, A.P., 1969. V.13, p.434-513.

WILLIAMSON, J.R. & CORKEY, B.E. Assay of citric acid cycle intermediates and related compounds. In: FLEISCHER, S. & PACKER, L. Meth. Enzymol. : Organelles and membranes. New York, A. P., 1979. V. 55., p. 200-222.

YAMAMOTO, N. S. Estudos Bioquímicos dos efeitos do metotrexato em mitocôndria. Curitiba, 1985. 63p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.

YAMAMOTO, N.S.; OLIVEIRA, M.B.M.; CAMPELLO, A.P.; and KLUPPEL, M. L.W. Methotrexate: studies on the cellular metabolism I. Effect on mitochondrial oxygen uptake and oxidative phosphorylation. Cell Biochem. Funct., 6: 61-66, 1988.