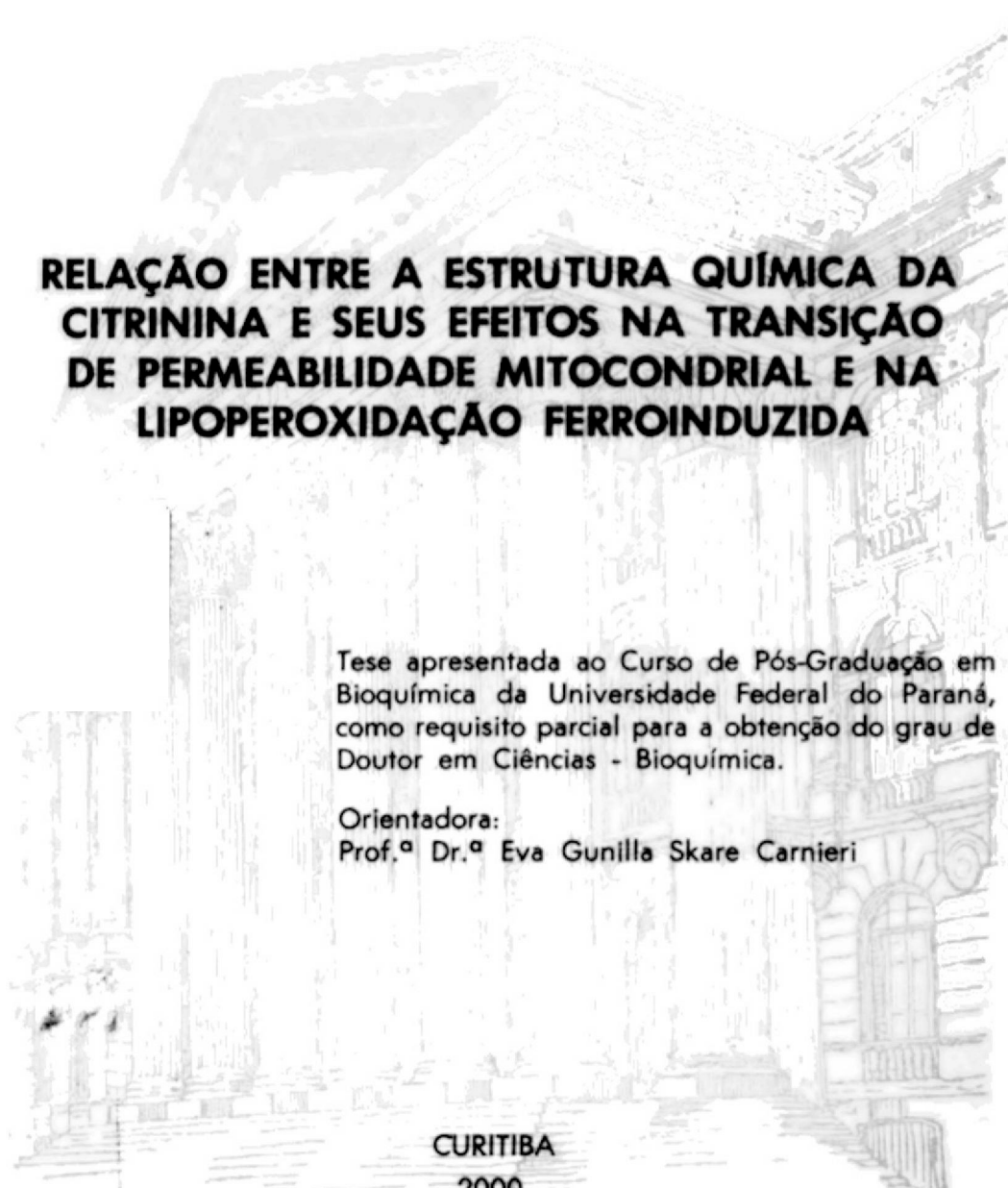


ENEIDA JANISCKI DA LOZZO



**RELAÇÃO ENTRE A ESTRUTURA QUÍMICA DA  
CITRININA E SEUS EFEITOS NA TRANSIÇÃO  
DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL E NA  
LIPOPEROXIDAÇÃO FERROINDUZIDA**

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

Orientadora:  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Eva Gunilla Skare Carnieri

CURITIBA  
2000

**ENEIDA JANISCKI DA LOZZO**

**RELAÇÃO ENTRE A ESTRUTURA QUÍMICA DA  
CITRININA E SEUS EFEITOS NA TRANSIÇÃO  
DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL E NA  
LIPOPEROXIDAÇÃO FERROINDUZIDA**

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

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eva Gunilla Skare Carnieri

**CURITIBA  
2000**

**Orientadora: Prof. Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri**


**Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira**

**Relação entre estrutura química da citrinina e seus efeitos na  
transição de permeabilidade mitocondrial e na lipoperoxidação  
ferro-induzida**

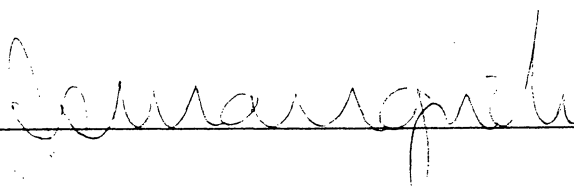
por

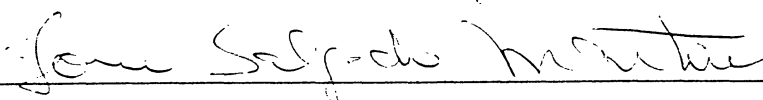
**Eneida Janiscki Da Lozzo**

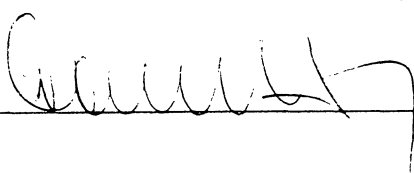
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Bioquímica, curso de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora formada pelos professores:

Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri 

Dra. Maria Eliane Merlin Rocha 

Dr. Antônio Sálvio Mangrich 

Dra. Ione Salgado Martins 

Dr. Carlos Curti 

Curitiba, 8 de junho de 2000.



O estudo profuso não ensina discernimento;...isto é sabedoria, entender o pensamento como aquilo que rege o mundo em toda parte.

Heraclito, ap. 536 a C.

Ao Narciso pela compreensão e carinho;

À Letícia, que nestes seus primeiros 5 anos vivenciou a ausência e iluminou o meu caminho;

À minha mãe pela sua imensurável dedicação;

Ao meu pai pelo incentivo e apoio;

À quem está chegando, .... esperança.

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri, pela sua orientação, pelo seu exemplo de coragem e por sua amizade.

À Prof. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, pela sua orientação, compreensão e apoio irrestrito nos momentos difíceis.

À Prof. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha por suas valiosas sugestões científicas e pela sua colaboração efetiva durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Sálvio Mangrich (Departamento de Química UFPR) por seu exemplo científico e realização dos experimentos de EPR.

Ao Prof. Dr. Márcio Chimelli (Departamento de Farmácia UFPR) pela realização da fotografia da eletroforese.

À Prof. Angela Cristina Leal Badaró e da técnica de laboratório Waleska Pereira (Departamento de Farmácia UFPR) pela realização dos espectros de infravermelho.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Bioquímica UFPR, pelo proveitoso convívio científico.

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Bioquímica, pela oportunidade concedida.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, especialmente a Priscila Ianzen dos Santos pela sua valiosa colaboração na realização da fase experimental deste trabalho e principalmente pela sua amizade.

Às bibliotecárias Izabella Fernandes, Mariza Kampfert, Ruth Lobo do Santos e Telma T. Assis, por sua permanente colaboração.

Aos colegas do laboratório de oxidações biológicas: Andréa Mariante, André Mariano, Fabiana P. Mansani, Fabiane Fortes, Fábio Andrighetto, Guilhermina R. Noletto; Luiz

Fernando Pereira, Silvia Maria S. Cadenas; Regina Maria Babiak, Welington Braguini pelo apoio e convívio carinhoso que amenizou as longas jornadas de trabalho.

Aos colegas do curso de pós graduação: Ana Maria A. Carneiro Leão, Clarice Aoki Osaku, Eliana B. Carneiro, Fabíola R. Stevan, Giseli Klassen, Janyce Akemi Sugui, Marcos Pessati, Maria Lúcia Ishida, Patrícia Maria Stuelp, Renato Bochicchio, Ruth Schadeck e à Prof. Dra. Joana Léa Gunter pelo apoio e amizade.

Ao Dr. Everson A. Buchi e a Dra Dorly de Freitas Bucchi: encontrar vocês foi de fundamental importância para a concretização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
	<b>LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS</b> .....	xiii
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	xiv
	<b>RESUMO</b> .....	xv
	<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1	Micotoxinas: alguns aspectos sanitários e econômicos.....	01
1.2	Micotoxicoses.....	03
1.3	Citrinina.....	06
1.3.1	Ocorrência da citrinina.....	06
1.3.2	Propriedades físico-químicas.....	08
1.3.3	Efeitos biológicos da citrinina.....	12
1.3.3.1	Atividade antibiótica.....	12
1.3.3.2	Toxicidade da citrinina.....	12
1.3.3.3	Efeitos da citrinina sobre o metabolismo celular e mitocondrial.....	16
1.4	Transição de permeabilidade mitocondrial.....	20
1.5	Lipoperoxidação ferro-induzida.....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
3.1	Reagentes.....	28
3.2	Preparo da solução de citrinina.....	28
3.3	Animais.....	29
3.4	Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	29

3.5	Determinação do consumo de O <sub>2</sub> por mitocôndrias isoladas e cálculo do coeficiente de controle respiratório.....	30
3.6	Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ).....	30
3.7	Determinação de inchamento mitocondrial.....	32
3.7.1	Determinação do inchamento mitocondrial em mitocôndrias desenergizadas.....	32
3.7.2	Determinação do inchamento mitocondrial em mitocôndrias energizadas.....	32
3.8	Eletroforese de proteínas mitocondriais em gel de poliacrilamida contendo SDS.....	33
3.9	Dosagem de grupos sulfidrílicos de membrana mitocondrial.....	34
3.10	Interação da citrinina com membranas artificiais.....	35
3.10.1	Preparo dos liposomas de dimiristoilfosfatidil-colina (DMPC).....	35
3.10.2	Incorporação das sondas fluorescentes.....	35
3.10.3	Fluorimetria.....	36
3.11	Interação entre citrinina e íons ferro.....	40
3.11.1	Estudos espectrofotométricos da ligação da citrinina com íons ferro.....	40
3.11.1.1	Espectro de absorção da citrinina na presença de íons ferro.....	40
3.11.1.2	Ensaio da ferrozina.....	40
3.11.1.3	Estudo de EPR.....	40
3.12	Interferência da citrinina sobre os estados de redução/oxidação de ferro.....	41
3.12.1	Ensaio da <i>o</i> -fenantrolina .....	41
3.12.2	Consumo de O <sub>2</sub> .....	42
3.13	Efeito da citrinina na mobilização de ferro da ferritina.....	42
3.13.1	Preparo da solução da ferritina.....	42
3.13.2	Liberação de ferro da ferritina.....	42
3.14	Interação entre citrinina e peróxido de hidrogênio.....	43

3.14.1	Dosagem de peróxido de hidrogênio.....	43
3.14.2	Espectro de absorção da citrinina na região UV após incubação com peróxido de hidrogênio.....	44
3.14.3	Espectro de absorção da citrinina na região de IV após incubação com peróxido de hidrogênio.....	44
3.15	Reatividade entre citrinina e o radical livre difenilpicrilhidrazil (DPPH).....	45
3.16	Espectroscopia deEPR da citrinina com os produtos de degradação do DMPO.....	45
3.17	Determinação da concentração de proteínas.....	46
3.18	Análise Estatística.....	46
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
4.1	Citrinina e a transição de permeabilidade mitocondrial.....	47
4.1.1	Efeito de agentes protetores de processos oxidativos sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca <sup>2+</sup> e citrinina em mitocôndrias desenergizadas.....	47
4.1.2	Eletroforese de proteínas de membrana mitocondrial após incubação com Ca <sup>2+</sup> e citrinina.....	52
4.1.3	Efeito da CsA sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca <sup>2+</sup> e citrinina.....	54
4.1.4	Importância dos níveis de exposição de grupos sulfidrílicos de proteínas de membrana mitocondrial na transição de permeabilidade induzida por citrinina.....	59
4.2	Interação da citrinina com a bicamada fosfolipídica.....	66

4.2.1	Efeito da citrinina sobre a polarização de fluorescência das sondas 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno-ácido propiônico (DPH-PA) incorporadas em liposomas de dimiristoilfosfatidil-colina (DMPC).....	66
4.3	Propriedades químicas relacionadas com a inibição da lipoperoxidação ferro-induzida pela citrinina.....	76
4.3.1	Interação da citrinina com o radical livre DPPH.....	76
4.3.2	Caracterização do complexo ferro-citrinina.....	79
4.3.3	Efeito da citrinina sobre a oxidação de $Fe^{2+}$ e redução de $Fe^{3+}$ .....	84
4.3.4	Dosagem de $H_2O_2$ e determinações espectrais da citrinina após sua incubação com $H_2O_2$ .....	88
4.3.5	Determinação da liberação de ferro da ferritina pela citrinina e pelo produto de reação citrinina/ $H_2O_2$ .....	102
5	<b>DISCUSSÃO FINAL</b> .....	105
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	111
	<b>ANEXO</b>	
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	112



## LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química da citrinina.....	8
2	Conformações da citrinina propostas por KOVÁČ et al.,1961.....	9
3	Estrutura da citrinina quando solubilizada em solvente orgânico.....	10
4	Estrutura de diastereoisômeros da citrinina em solução aquosa e pH fisiológico.....	10
5	Estrutura de derivados da citrinina substituintes na posição-1.....	11
6	Curva de calibração para cálculo do potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ).....	31
7	Efeito de diferentes concentrações de $Ca^{2+}$ e citrinina sobre a velocidade e extensão do inchamento mitocondrial.....	48
8	Efeito do DTT, BHT e catalase no inchamento mitocondrial induzido por $Ca^{2+}$ e citrinina.....	51
9	Eletroforese de proteínas de membrana mitocondrial.....	53
10	Efeito da CsA e ATP-Mg <sup>2+</sup> no inchamento mitocondrial induzido por $Ca^{2+}$ e citrinina.....	55
11	Efeito da CsA sobre o colapso do potencial elétrico de membrana induzido por $Ca^{2+}$ e citrinina.....	58
12	Efeito da citrinina sobre a dosagem de grupamentos sulfidrílicos de proteínas de membrana mitocondrial.....	62
13	Efeito da NEM e Mersalil sobre o inchamento mitocondrial causado por $Ca^{2+}$ e citrinina.....	63
14	Efeito da citrinina sobre o inchamento mitocondrial causado por $Ca^{2+}$ na presença de Pi.....	65

15 A	Efeitos da citrinina (0,02 mmol.L <sup>-1</sup> ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH.....	69
15 B	Efeitos da citrinina (0,5 mmol.L <sup>-1</sup> ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH.....	70
15 C	Efeitos da citrinina (0,75 mmol.L <sup>-1</sup> ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH.....	71
16 A	Efeitos da citrinina (0,02 mmol.L <sup>-1</sup> ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH-PA.....	73
16 B	Efeitos da citrinina (0,5 mmol.L <sup>-1</sup> ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH-PA.....	74
16 C	Efeitos da citrinina (0,75 mmol.L <sup>-1</sup> ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH-PA.....	75
17	Efeito da citrinina sobre o radical livre DPPH.....	78
18	Espectro de absorção da citrinina na presença de íons Fe <sup>3+</sup> e Fe <sup>2+</sup> .....	81
19	Efeito da citrinina sobre a formação do complexo Fe <sup>2+</sup> -ferrozina.....	82
20	Efeito da citrinina sobre o espectro de EPR do íon Fe <sup>3+</sup> .....	83
21	Efeito da citrinina, EDTA e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre a oxidação de Fe <sup>2+</sup> .....	86
22	Efeito de agentes redutores sobre Fe <sup>3+</sup> -EDTA e Fe <sup>3+</sup> -citrinina.....	87
23	Dosagem de peróxido de hidrogênio.....	89
24 A	Espectro da citrinina na região do UV/VIS na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	92
24 B	Espectro da citrinina na região do UV/VIS após incubação com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	93
25 A	Espectro na região do IV da citrinina.....	96
25 B	Espectro na região do IV da citrinina após incubação com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	97
26 A	Espectro de EPR experimental.....	100
26 B	Espectro de EPR simulado.....	100

27	Efeito da citrinina e do produto da reação citrinina e $H_2O_2$ sobre a liberação de ferro da ferritina.....	103
----	--	-----

## LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS

<b>Esquema 1</b>	Representação esquemática das medições de polarização de fluorescência (P).....	39
<b>Esquema 2</b>	Reações propostas para a oxidação dos produtos do DMPO pela citrinina.....	101
<b>Tabela 1</b>	Efeito da citrinina e do produto da reação citrinina mais H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre a liberação de ferro da ferritina.....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	- absorbância
BHK-21	- Baby Hamster Kidney cell
BHT	- butilhidroxitolueno
BSA	- albumina de sorobovino
Cit	- citrulina
CsA	- ciclosporina A
DIDS	- ácido 4,4' -diisotiocianatostilbene - 2,2' -dissulfônico
DL 50	- dose que causa morte em 50 % dos animais tratados
DMPC	- dimiristoil-fosfatidilcolina
DMPO	- 5,5-dimetil-1-pirrolina- <i>N</i> -óxido
DMSO	- dimetilsulfóxido
DPH	- 1,6-difenil-1,3,5 - hexatrieno
DPH-PA	- 3-[p-(6-fenil)-1,3,5 - hexatrieno]-fenil-ácido propiônico
DPPH	- difenilpicrilhidrazil
DTNB	- 5,5' - ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
DTT	- ditioneitol
EDTA	- ácido etileno diamino tetracético
EGTA	- ácido etileno glicol bis (éter 2-amino-etil) N,N,N',N' tetracético
EPR	- espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica
FCCP	- carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona
Hepes	- N - (2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
HPLC	- cromatografia líquida de alta resolução
IV	-infravermelho
MPT	-transição de permeabilidade mitocondrial

NEM	- n- etilmaleimida
P	- polarização
Pi	- fosfato inorgânico
RMN	- espectrometria de ressonância magnética nuclear
Suc	- succinato
TCA	- ácido tricloroacético
Tm	- temperatura média de transição termotrópica de fase
Tris	- tris (hidroximetil) amino metano
$\Delta P/\Delta T$	- diferença do grau de polarização em função da diferença de temperatura
$\Delta\psi$	- potencial elétrico de membrana
UV/VIS	ultravioleta/visível

## RESUMO

Este trabalho procurou relacionar as propriedades químicas da micotoxina citrinina com algumas de suas atividades biológicas, como a sua ação sobre a transição de permeabilidade mitocondrial, e a sua capacidade de inibir a lipoperoxidação ferro-induzida. O objetivo deste estudo foi de contribuir para o conhecimento dos mecanismos pelos quais a micotoxina pode levar ao dano e morte celular. Foi demonstrado que a citrinina age indutora de transição de permeabilidade mitocondrial de forma  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente. A proteção deste fenômeno conferida por CsA e ATP, indicam que o mesmo ocorre devido a formação de poro, e a falta de proteção por DTT, BHT e catalase, bem como a ausência de formação de agregados proteicos de alta massa molar, sugerem que processos oxidativos severos não estão envolvidos no dano celular causado pela citrinina. A micotoxina interfere nos níveis de exposição de grupos  $-\text{SH}$  de proteínas de membrana mitocondrial, após a incubação das organelas com  $\text{Ca}^{2+}$ , sugerindo o envolvimento destes grupamentos na indução de transição de permeabilidade pela citrinina. Por outro lado, observou-se um efeito protetor da MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e Pi, por concentrações baixas de citrinina ( $10 - 25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), caracterizando a dualidade de efeitos da micotoxina (indutora de MPT em altas concentrações e protetora em baixas concentrações), tornando possível a sua comparação com a ação de um reagente sulfidrílico hidrofóbico monofuncional, a *N*-etilmaleimida (NEM). Realmente, a citrinina demonstrou alterar a fluidez de membrana agindo numa região mais hidrofóbicas de bicamadas lipídicas sintéticas. Esta inserção da micotoxina em regiões mais hidrofóbicas da membrana pode ser, também, uma propriedade importante na sua ação protetora da lipoperoxidação ferro-induzida. Além disso, a capacidade da citrinina quelar  $\text{Fe}^{3+}$ , formando um complexo redox inerte, e a sua reatividade com peróxido de hidrogênio, demonstradas neste estudo, são requisitos que justificam a sua ação inibidora sobre processos oxidativos. Apesar de tal ação protetora, não foi observada nesta molécula a capacidade de doar elétrons para o radical livre estável DPPH, que justificasse uma ação sequestradora de radicais livres. Devido sua capacidade de interação com  $\text{Fe}^{3+}$  a possibilidade da citrinina liberar  $\text{Fe}^{3+}$  da ferritina foi verificada. A citrinina não liberou o  $\text{Fe}^{3+}$  da ferritina, porém o seu produto de reação com peróxido de hidrogênio sim. Este resultado sugeriu haver uma diferença entre as capacidades redutoras das duas moléculas, uma vez que a liberação do  $\text{Fe}^{3+}$  do centro da proteína, normalmente, envolve um processo de redução a  $\text{Fe}^{2+}$ .

## ABSTRACT

This work searches the relationship between the chemical properties of the micotoxine citrinin and some of its biological activities, such as its action on the mitochondrial permeability transition, and its ability of inhibiting iron-induced lipoperoxidation. The objective of this work was to contribute for the knowledge of the mechanisms by which the micotoxine leads to cellular damage and death. It was demonstrated that citrinin acts as an inducer of  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial permeability transition. The protection of this phenomenon conferred by cyclosporin A (CsA) and ATP indicates that this occurs due to the formation of a pore, and the lack of protection by dithiothreitol (DTT), butylhydroxitoluene (BHT) and catalase, as well as the absence of formations of high molecular weight protein aggregates, suggest that severe oxidation processes are not involved in the cellular damage caused by citrinin. The micotoxin interferes at the levels of exposition of -SH groups of mitochondrial-membrane proteins, after incubation of organelles with  $\text{Ca}^{2+}$ , which suggests the involvement of such groups in the induction of permeability transition by citrinin. On the other hand, we have observed a protective effect of MPT induced by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Pi}$ , by low concentrations of citrinin (10 - 25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), characterizing the duality of effects of the micotoxine (inducer of MPT in high concentrations and protective in low concentrations). This makes possible its comparison with the action of a monofunctional hydrophobic thiol reactant, which is N-ethylmaleimide (NEM). Citrinin was actually able of altering the fluidity of membrane acting in a more hydrophobic region of bilayer synthetic lipids. This insertion might also be an important property of the protective action of iron-induced lipoperoxidation. In addition, citrinin capacity of quelating  $\text{Fe}^{3+}$ , forming an inert redox complex, and its reactivity with hydrogen peroxide, demonstrated in this study, are requirements that justify its inhibitory action on oxidative processes. Despite such a protective action, it was not observed in this molecule the capacity of donating electrons to the stable free radical 1,1-diphenyl-2-picril-hydrazil (DPPH), which might have justified a free-radical trapping action. Due to its capacity of interacting with  $\text{Fe}^{3+}$ , the possibility of its releasing  $\text{Fe}^{3+}$  from ferritin was verified. Citrinin did not release  $\text{Fe}^{3+}$  from ferritin, which occurred with its reaction product and hydrogen peroxide. This result suggests there is a difference between the reduction capacity of the molecules, since the release of  $\text{Fe}^{3+}$  from the protein center usually involves a process of reduction to  $\text{Fe}^{2+}$ .



## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Micotoxinas: alguns aspectos sanitários e econômicos**

Projeções para o ano de 2025 indicam que a média de produção de cereais deve aumentar cerca de 80% sobre a média de 1990 para suprir a demanda mundial de alimentos, portanto, a segurança dos alimentos tem motivado amplos debates. Enquanto vários pesquisadores consideram a biotecnologia dos alimentos transgênicos uma fonte de soluções, outros a tratam como uma ameaça e alertam para a necessidade imediata em se estabelecer medidas sistemáticas para garantir a qualidade dos alimentos no novo milênio (MUGABE, 1999; SERAGELDIN, 1999). Contudo, para sustentar o desenvolvimento da agricultura e pecuária e garantir a segurança dos alimentos e da saúde pública será necessário, além do desenvolvimento e aplicação da biotecnologia, uma política de investimentos em saúde e educação rural, desenvolvimento de condições sanitárias e de transporte, bem como pesquisas de alta qualidade (SERAGELDIN, 1999).

A segurança dos alimentos não é uma preocupação recente (ABELSON & HINES, 1999). A natureza patogênica de certas espécies de fungos tem sido observada desde o início da agricultura. Os fungos contaminantes podem produzir uma grande diversidade de metabólitos tóxicos, as micotoxinas, que representam uma séria ameaça a saúde humana e animal (APSIMON, 1994).

Os cereais, as sementes oleaginosas e seus produtos são os componentes essenciais da dieta humana e animal. A infecção fúngica dos grãos pode ocorrer no campo, durante o transporte e na estocagem. O crescimento fúngico não caracteriza necessariamente a presença de micotoxinas, porque nem todas as espécies a produzem, todavia sua presença sempre implica em uma perda da qualidade nutricional do grão e uma queda no seu valor de mercado (OMINSKI *et al.*, 1994).

Alguns parâmetros determinam a produção das micotoxinas pelos fungos nos grãos, como por exemplo: umidade, temperatura, tempo, integridade do grão, níveis de oxigênio e dióxido de carbono, composição do substrato, abundância fúngica, prevalência das cepas produtoras de micotoxinas, quantidade de esporos, interações microbianas e vetores invertebrados. Em condições naturais estes parâmetros interagem constantemente, determinando o crescimento fúngico e produção de micotoxinas, principalmente, durante a estocagem dos grãos.

No Brasil as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento de fungos e como o controle sanitário durante a produção, transporte e principalmente no armazenamento dos grãos é deficiente, as contaminações por micotoxinas assumem proporções por vezes alarmantes e são responsáveis por grandes prejuízos às criações de suínos (UNIVERSIDADE DO CAMPO, 1999) e aves (KRABBE, 1999). Contudo, o país ainda não possui um diagnóstico estatístico preciso sobre a extensão e importância destas contaminações e prejuízos.

Segundo estimativas da FAO (Food and Agriculture Organization, EUA), a contaminação de grãos pelas micotoxinas pode chegar a 25% da produção anual mundial, representando um grande impacto econômico por perdas diretas ou indiretas. As perdas diretas estão relacionadas à diminuição de produção e qualidade dos grãos, aumento da incidência de doenças e diminuição da capacidade reprodutora dos rebanhos contaminados. As perdas indiretas ocorrem devido ao aumento do custo de produção associado a pesquisas de suprimentos contra a contaminação, processos de descontaminação e aumento do consumo de produtos veterinários (CHARMLEY *et al.*, 1994).

Determinar a natureza e extensão dos resíduos tóxicos na cadeia alimentar é importante para avaliar o perigo potencial que representam para a saúde pública. É necessário, portanto, o entendimento integrado da toxicologia e segurança biológica das

toxinas ingeridas, para fazer uma avaliação racional dos riscos do consumo de produtos originados dos animais expostos a micotoxinas (PRELUSKY, 1994 ).

## 1.2 Micotoxicoses

A ocorrência, ou a suspeita, de doenças relacionadas com micotoxinas é reconhecida de longa data. A natureza, duração da exposição e a concentração das micotoxinas nos alimentos, bem como o estado de saúde e sensibilidade do organismo contaminado determina o desenvolvimento de micotoxicoses agudas ou crônicas, em alguns casos podendo levar à morte (PRELUSKY *et al.*, 1994 , KUIPER-GOODMAN, 1994).

A dificuldade em se estabelecer a etiologia das micotoxicoses reside no fato das micotoxinas normalmente ocorrerem em concentrações muito baixas nos alimentos, expressas em partes por bilhão (ppb ou  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou partes por milhão (ppm ou  $\text{mg kg}^{-1}$ ). (SMITH & MOSS, 1985 a, b). Os métodos usualmente disponíveis nem sempre apresentam sensibilidade suficiente para uma análise precisa da sua presença nos alimentos (PRELUSKY *et al.*, 1994 ) ou nos tecidos e fluidos biológicos dos pacientes, dificultando assim o diagnóstico das micotoxicoses (KROGH, 1989). A exposição prolongada a concentrações muito baixas (ppb-ppm) de micotoxinas pode levar ao desenvolvimento de doenças crônicas; nestes casos, muitas vezes a quantidade de alimento contaminado é insuficiente para a extração de uma concentração detectável de micotoxina (PRELUSKY, 1994).

Câncer e hepatopatias são exemplos de patologias que têm sido relacionadas a contaminação por aflatoxinas (SMITH & MOSS, 1985 a; HSIEH, 1989; KROGH, 1989); quadros de nefropatias têm sido associados às micotoxinas citrinina (objeto de estudo deste trabalho) e ocratoxina A (KROGH *et al.*, 1970; KROGH, 1978; BEARDALL & MILLER, 1994) e muitas doenças infecciosas e neoplásicas podem ser decorrentes das disfunções

imunológicas ocasionadas por uma variedade de micotoxinas produzidas pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicilium* e *Fusarium* (PESTKA & BONDY, 1994). Todas estas doenças podem, também, ser relacionadas a muitas outras variedades de agentes causais. Portanto, torna-se difícil encontrar nas estatísticas hospitalares doenças identificadas como micotoxicoses (KROGH, 1989).

Em alguns casos a micotoxicose é diagnosticada somente devido ao caráter endêmico da doença. Um exemplo típico é a nefropatia endêmica dos Balcans, descrita pela primeira vez em 1950 na Bulgária, depois na Romênia e Yugoslávia, e que acometeu mais de 20.000 pessoas. Esta doença renal crônica foi inicialmente relacionada a uma etiologia genética, contudo, esta hipótese foi abandonada pela constatação do seu aparecimento em imigrantes após 20 anos de permanência na região e pela determinação da presença de citrinina e ocratoxina nos alimentos locais (BETINA, 1984 b; BEARDALL & MILLER, 1994). Estudos em animais reproduziram os efeitos nefrotóxicos destas micotoxinas, e sua presença natural em rações animais, também, determinaram o aparecimento dos sintomas renais e morte nos rebanhos (KROGH, 1978; ROSA *et al.*, 1985).

A grande diversidade de estruturas químicas das micotoxinas deve-se a existência de várias vias metabólicas para a biossíntese destes metabólitos secundários nos fungos (APSIMON, 1994). Por exemplo, para as 24 espécies do gênero *Fusarium* já encontram-se relacionadas na literatura características espectrais de mais de cem metabólitos secundários associados com o desenvolvimento de doenças em animais ou humanos (SAVARD & BLACKWELL, 1994). A ocorrência de diferentes micotoxinas em alimentos deve-se, também, a sua colonização por mais de uma espécie de fungos. Numa análise de cereais destinados a alimentação de rebanhos, na região de Bihar na Índia, encontrou-se contaminação predominante por aflatoxinas, juntamente com zearalerona, ocratoxina A e citrinina (RANJAN & SINHA, 1991). Assim, a toxicidade de um alimento contaminado não

pode ser estimada pela determinação da concentração de uma única micotoxina. Normalmente, a ocorrência de micotoxicoses está relacionada com a contaminação do alimento por mais de uma micotoxina, bem como por outros componentes que aumentam as propriedades tóxicas da mesma. Muito pouco é conhecido sobre as interações de diferentes metabólitos fúngicos no desenvolvimento das micotoxicoses. Análises das várias micotoxinas e um maior conhecimento dos seus potenciais de interação nas várias espécies animais são necessárias, para melhor compreender o desenvolvimento das micotoxicoses. O grande obstáculo no estudo das interações está em se isolar ou produzir estes metabólitos em grande quantidade para verificar a toxicidade individual antes de se realizar qualquer estudo de interação (PRELUSKY *et al.*, 1994 ).

Estabelecer uma relação entre a estrutura química e atividade biológica das micotoxinas isoladas, bem como o estudo do mecanismo molecular da toxicidade, são de grande interesse para a compreensão das causas e mecanismos fisiopatológicos das micotoxicoses. Outros fatores importantes seriam o monitoramento da exposição, avaliação dose-resposta com extrapolações da experimentação animal para humanos, estudos epidemiológicos e caracterização dos riscos (HSIEH, 1989). O tempo necessário para completar esta seqüência de eventos em relação a uma micotoxina, excede 10-20 anos (KROGH, 1989).

A caracterização dos efeitos bioquímicos das micotoxinas consiste em um dos itens de fundamental importância para a identificação da possível ameaça destes xenobióticos a saúde (MOULÉ, 1984, HSIEH, 1989). Muitas micotoxinas têm sido estudadas com relação aos seus efeitos sobre: o metabolismo de carboidratos e lipídeos; síntese de ácidos nucleicos e proteínas; interações com proteínas e DNA, avaliando a capacidade de induzir a mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade (SMITH & MOSS, 1985 c; BETINA, 1984 a; MOULÉ, 1984; DIRHEIMER, 1998). Os efeitos sobre o metabolismo celular

(WANG *et al.*, 1996; CHAGAS *et al.*, 1994; 1995 a, c), bem como sobre o metabolismo mitocondrial avaliando: a ação sobre a fosforilação oxidativa (CHAGAS *et al.*, 1992 a, b; 1995 b) e o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio induzindo a fenômenos de lipoperoxidação (RAHIMTULA *et al.*, 1988; OMAR *et al.*, 1990; HOELHER *et al.*, 1997), também foram estudados. Contudo, nenhuma das micotoxinas estudadas possui uma definição completa do mecanismo molecular primário da sua toxicidade, provavelmente, devido as inúmeras interrelações metabólicas existentes num determinado evento tóxico celular.

### **1.3 Citrinina**

#### **1.3.1 Ocorrência da Citrinina**

A citrinina é um metabólito fúngico secundário, produzido por 14 espécies de fungos do gênero *Penicillium* e 3 espécies do gênero *Aspergillus*, destacando-se as espécies *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niveus* (KROGH, 1978; BETINA, 1984 b). Existe muita especulação sobre as possíveis funções da produção dos metabólitos secundários pelos fungos. Um estudo recente em cepas de *Penicillium verrucosum* demonstrou que uma função benéfica da citrinina para o fungo, consiste em proteger os esporos da radiação solar criando condições favoráveis durante os processos iniciais de germinação (STORMER *et al.*, 1998).

Em geral, os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* são os principais produtores de toxinas em alimentos durante a sua estocagem (OMINSKI *et al.*, 1994). A ocorrência de citrinina e ocratoxina A em cereais destinados a alimentação animal tem desenvolvido nefropatia, principalmente em suínos e aves. Na Dinamarca, 57 % das amostras de alimentos provenientes de áreas com alta frequência de nefropatia micotóxica suína, apresentaram ocratoxina numa faixa de 28 a 27500  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . A citrinina estava presente em cerca de 10%

destas amostras, porém, na faixa de 160 a 2000  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . No Canadá, a análise de cereais destinados à alimentação animal, demonstrou a presença de ocratoxina A em 56 % das amostras e mais da metade destas apresentaram também citrinina. Os níveis de ocratoxina A variou entre 30 a 27.000  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  e o de citrinina entre 70 a 80.000  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  (KROGH, 1978).

Na Índia, análises em cereais, rações e misturas destinadas a alimentação de aves, porcos e gado, apresentaram altos níveis de fungos produtores de micotoxinas, entre eles o *Penicillium citrinum*, associados com duas espécies principais de insetos infectantes de grãos durante o armazenamento, *Sitophilus oryzae* Linn. (Coleoptera: Curculionidae) e *Tribolium castenarum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae), indicando serem os mesmos importantes vetores de contaminação para este fungo (SINHA & SINHA, 1991). A grande incidência de citrinina e outras micotoxinas como as aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A em alimentos nesta região da Índia deve-se a fatores ambientais e sócio-agronômicos (RANJAN & SINHA, 1991).

No Brasil, a ocorrência natural de nefropatia micotóxica suína, também, tem sido observada. Em surto ocorrido em criações de suínos em Petrópolis-RJ, a alimentação destes animais, por tempo indeterminado, com cevada contaminada por citrinina, numa concentração de 1000  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , ocasionou o aparecimento da doença (ROSA *et al.*, 1985).

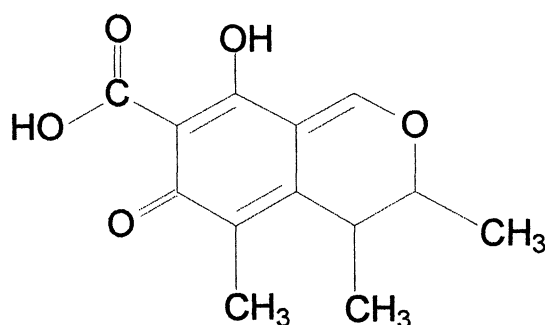
Está bem estabelecido que a contaminação humana por micotoxinas pode ocorrer de maneira direta ou indireta. A contaminação direta ocorre através do consumo de alimentos infectados pelos fungos produtores. Na Espanha, foi demonstrado que das 122 cepas de *Penicillium expansus* isoladas de maçãs utilizadas na produção de sucos, 45 foram capazes de produzir citrinina (VIÑAS *et al.*, 1993). A contaminação indireta ocorre através da ingestão de produtos de origem animal como ovos, leite, carne e derivados provenientes de animais contaminados (PRELUSKY, 1994). Para a detecção de baixas concentrações de citrinina (FRANCO *et al.*, 1996), bem como para a detecção simultânea de citrinina e

ocratoxina A em alimentos, técnicas têm sido aprimoradas (VASQUEZ *et al.*, 1996). Através de HPLC com detecção por fluorescência pode-se detectar a presença de citrinina em alimentos a uma concentração de  $2 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> (FRANCO *et al.*, 1996).

A semelhança estrutural e funcional entre as nefropatias agudas em suínos e aves ocasionadas pela contaminação por citrinina, com a disfunção renal humana evidenciada na nefropatia endêmica dos Balcans, indica que a exposição prolongada a pequenas concentrações desta micotoxina pode ser responsável por casos de insuficiência renal crônica em humanos (BETINA, 1984 b).

### 1.3.2 Propriedades físico-químicas

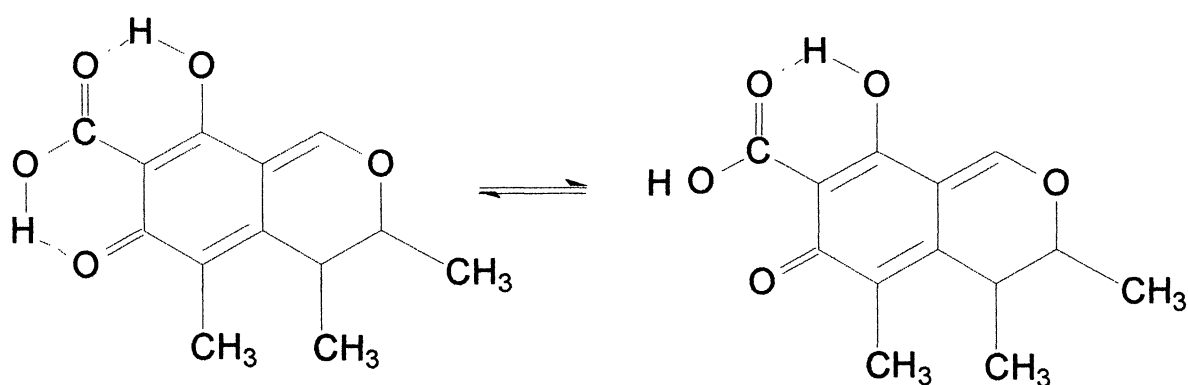
A estrutura química da citrinina, 3R-trans 4,6 dihidro 8-hidroxi 3,4,5-trimetil 6 oxo-3H-2-benzopiran 7- ácido carboxílico, está representada na figura 1. Sua biossíntese ocorre a partir do acetil coenzima A, intermediário comum do metabolismo fúngico primário (síntese de ácidos graxos) e secundário (síntese de policetídeos), portanto, é classificada como uma micotoxina derivada dos policetídeos (SMITH & MOSS, 1985 d), mais especificamente pela ciclização de um pentacetídeo (5 unidades de acetil) (BETINA, 1984 b).



**FIGURA 1. Estrutura química da citrinina.** FONTE: KOVÁČ *et al.*, 1961.

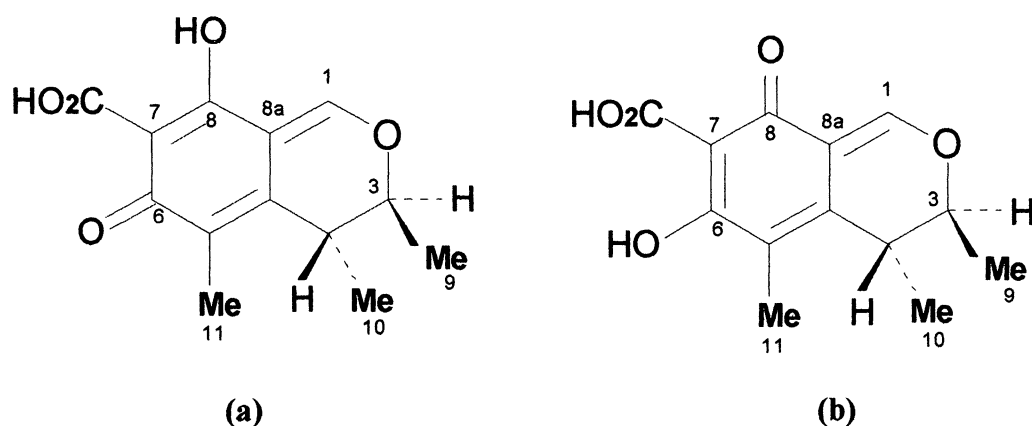


Possui massa molar de 250 Da, forma de agulhas prismáticas amarelas quando cristalizada, é opticamente ativa e possui ponto de fusão entre 170 e 171°C (KROGH *et al.*, 1970). Esta micotoxina é pouco solúvel em água, sendo solúvel em soluções diluídas de NaOH e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e em diversos solventes orgânicos polares. Quando dissolvida em soluções alcalinas (NaOH e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) é facilmente precipitada pela adição de ácidos. O espectro de absorção UV em solução de etanol possui absorção máxima em 222 ( $\epsilon$  22.280), 253 ( $\epsilon$  8.279) e 319 ( $\epsilon$  4.710) nm. Possui máximos de excitação e emissão de fluorescência em 336 e 521 nm respectivamente, em etanol (KROGH, 1978). O espectro de infravermelho da citrinina em pastilhas de NaCl, solubilizada em tetracloreto de carbono, apresenta máximos a 2.935, 2870, 1.685 e 1.640 cm<sup>-1</sup> e indica duas possíveis configurações com pontes de hidrogênio intramoleculares em equilíbrio (KOVÁČ *et al.*, 1961), como podem ser observadas na figura 2. Estas configurações foram confirmadas pela espectroscopia de <sup>1</sup>H R.M.N. (MATHIESON & WHALLEY, 1964).

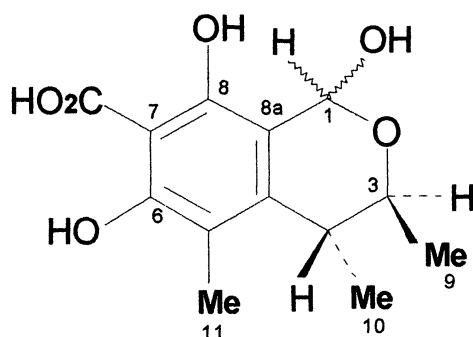


**FIGURA 2. Conformações da citrinina propostas por KOVÁČ *et al.*, 1961.**

Estudos espectroscópicos mais recentes de  $^1\text{H}$  - e  $^{13}\text{C}$  - R.M.N., realizados por BARBER *et al.* (1987), demonstraram que a citrinina, quando solubilizada em solvente orgânico, apresenta a estrutura metil-quinona (Figura 3 a), ou ainda pode interconverter-se em um tautômero (Figura 3 b). Contudo, em solução aquosa a pH fisiológico foi demonstrado que a citrinina aparece como uma mistura diastereoisomérica de hidratos (Figura 4), indicando a ocorrência de adição de água à estrutura (adição de Michael).

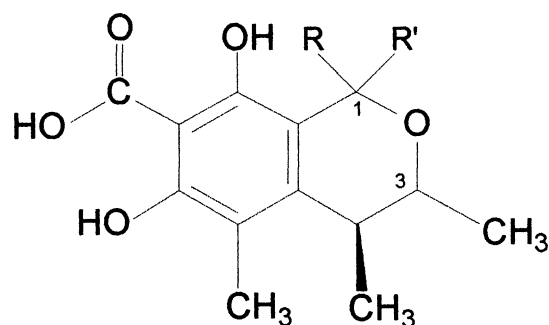


**FIGURA 3. Estrutura da citrinina quando solubilizada em solvente orgânico. FONTE: BARBER *et al.*, 1987.**



**FIGURA 4. Estrutura de diastereoisômeros da citrinina em solução aquosa e pH fisiológico. FONTE: BARBER *et al.*, 1987.**

Derivados sintéticos da citrinina normalmente apresentam substituição aril ou alquil na posição-1. A dihidrocitrinina (figura 5, R=H; R'=H), metildihidrocitrinina (figura 5, R=CH<sub>3</sub>; R'=H) e dimetildihidrocitrinina (figura 5, R=CH<sub>3</sub>; R'=CH<sub>3</sub>), são exemplos de derivados nos quais ocorre perda da atividade antibiótica descrita para a citrinina (WARREN *et al.*, 1957). O aquecimento da citrinina até 140 °C, por mais de 10 minutos, na presença de água, pode formar um produto de degradação, denominado citrinina H1, o qual apresenta citotoxicidade ainda mais elevada (TRIVERDI *et al.*, 1993).



**FIGURA 5. Estrutura de derivados da citrinina substituintes na posição -1. FONTE: WARREN *et al.*, 1957.**

### 1.3.3 Efeitos biológicos da citrinina

#### 1.3.3.1 Atividade antibiótica

Após seu isolamento em 1931, a citrinina foi estudada com o objetivo de ser utilizada como antibiótico, devido a sua atividade bacteriostática e bactericida para bactérias Gram-positivas, como o *Staphylococcus aureus* (TIMONIN, 1942). A atividade fungistática para uma grande variedade de fungos, inclusive para o *Penicillium citrinum*, com uma concentração inibitória mínima de 30-40 p.p.m., também foi demonstrada (ROBINSON & PARK, 1966). A inibição do crescimento das hifas de *Eremothecium ashbyi* pela citrinina, nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi atribuída a um aumento de permeabilidade de membrana celular (BETINA & BARÁTHOVÁ, 1968). HARAGUCHI *et al.*, (1987 a, 1989) descreveram uma atividade antifúngica da citrinina (0,1mmol.L<sup>-1</sup>) dependente de pH (maior em pH ácido) sobre *Saccharomyces cerevisiae*, que foi relacionada com inibição da respiração celular. Segundo os autores, a mitocôndria seria o principal sítio de localização subcelular de [<sup>14</sup>C]citrinina.

#### 1.3.3.2 Toxicidade da citrinina

Os efeitos tóxicos da citrinina, principalmente sua atividade nefrotóxica, impediram sua utilização terapêutica. Sua nefrotoxicidade foi demonstrada em várias espécies animais como: cães, camundongos, coelhos, ratos e suínos (KROGH *et al.*, 1970; JORDAN & CARLTON, 1977; GUPTA *et al.*, 1979 a; BERNDT & HAYES, 1982; BETINA, 1984 b; ROSA *et al.*, 1985; KREJCI *et al.*, 1996). A relação dose-resposta na indução da toxicidade aguda pela citrinina varia entre as espécies animais estudadas. A DL 50 encontrada para camundongos e coelhos é de 35 e 19 mg.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. As doses letais agudas

causaram em todas as espécies estudadas, inchamento dos rins e necrose tubular aguda (BETINA, 1984 b).

A absorção, distribuição e excreção da citrinina radioativa, quando administrada a ratos por via oral ( $30\text{mg.Kg}^{-1}$ ) foi estudada por DUNN *et al.* (1983 a). Os autores mostraram que a micotoxina é absorvida pela mucosa gastrointestinal uma hora após a sua administração. Estudos da distribuição da citrinina entre os tecidos, mostraram que rins, fígado, bexiga, sangue total, pulmões, traquéia e baço são preferencialmente atingidos nesta ordem e a eliminação é predominantemente urinária. Foi demonstrada *in vitro*, a ligação da citrinina à albumina sérica (DAMODARAN, 1977).

A nefropatia causada pela citrinina é determinada por sua ação direta sobre os rins, e não pela ação de seu metabólito (BERNDT & HAYES, 1982), nem como consequência de outras ações no organismo que afetariam indiretamente a função renal, como alteração da pressão arterial ou desidratação (KREJCI *et al.*, 1996). O transporte da citrinina pelo tecido renal cortical ocorre por um mecanismo de transporte de ânion orgânico e é essencial para a produção da nefrotoxicidade (BERNDT & HAYES, 1982).

Esta nefrotoxicidade caracteriza-se por importantes mudanças na função renal como: poliúria, glicosúria, proteinúria (KROGH *et al.*, 1970; GUPTA *et al.*, 1979 a; KREJCI *et al.*, 1996), e redução da excreção de Pi (KREJCI *et al.*, 1996), bem como por importantes modificações estruturais: necrose dos túbulos proximais, com dilatação destes túbulos e espessamento da membrana basal (KROGH *et al.*, 1970; GUPTA *et al.*, 1979 a; KREJCI *et al.*, 1996). Apesar da observação do desenvolvimento de tumores renais benignos em ratos tratados por 80 semanas com 1g de citrinina por Kg na dieta, considera-se que existem poucas evidências experimentais para a carcinogenicidade da citrinina (DIRHEIMER, 1998).

Alterações do metabolismo hepático também foram determinadas pela citrinina (KROGH *et al.*, 1970; GUPTA *et al.*, 1979 b). Estudos do efeito desta micotoxina sobre o

metabolismo hepático em camundongos adultos demonstraram que a administração intraperitoneal de 0,4 mg de citrinina por 10 g de peso corporal, uma vez por semana, durante seis semanas, determinou a necrose do tecido hepático acompanhada por um decréscimo de aproximadamente 34 % do conteúdo de glicogênio hepático e um aumento de quase 100% do nível de glucose sanguínea sugerindo um aumento da glicogenólise ou hiperatividade da adrenal (GUPTA *et al.*, 1979 b). Em situação experimental semelhante, utilizando diferentes concentrações de citrinina, GUPTA *et al.* (1986) observaram aumento do nível da glucose sanguínea, como também no rim e cérebro além do decréscimo do glicogênio hepático. Inibição das atividades das enzimas hexoquinase e ATPase e decréscimo das concentrações de lactato desidrogenase, ácido láctico e ácido pirúvico em vários tecidos, indicaram um decréscimo no metabolismo da glucose pela citrinina. Observou-se também, *in vitro*, que a citrinina (1 mmol.L<sup>-1</sup>) provoca uma inibição irreversível de cerca de 60% na atividade da glutamato desidrogenase de fígado bovino (RAMADOSS & MURKHERJEE, 1977).

A administração intraperitoneal de citrinina a camundongos albinos, nas concentrações de 20 e 40 mg/Kg de peso corporal durante 6 semanas, determinou cerca de 30% de redução na atividade específica da succinato desidrogenase de mitocôndrias extraídas de parênquima hepático e renal. Este estudo confirmou que tanto o rim quanto o fígado são atingidos pela citrinina e que podem apresentar modificações em seu metabolismo mesmo na ausência de alterações macroscópicas (MACHARETTI *et al.*, 1995).

Estudos *in vitro* demonstraram que a citrinina produz alterações bioquímicas em fatias de tecido renal (BERNDT *et al.*, 1984), em suspensões de túbulo renal proximal (ALEO *et al.*, 1991), em cultura de células renais (YONEYAMA & SHARMA, 1987, CHAGAS *et al.*, 1994; 1995 a), e em mitocôndrias isoladas de rim e fígado de ratos (HARAGUCHI *et al.*, 1987 b; HARAGUCHI *et al.*, 1989; CHAGAS *et al.*, 1992 a; 1992 b; 1995 b; 1995 c; DALOCE, 1995; RIBEIRO *et al.*, 1997).

Em fatias de tecido de córtex renal de rato, a velocidade de captação do cálcio foi avaliada na presença de citrinina e ocratoxina A. Foi demonstrado que estas micotoxinas após 5 minutos de incubação numa concentração mínima de  $10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>, aumentam significativamente o acúmulo de <sup>45</sup>Ca em tecido renal, sugerindo que este desequilíbrio possa estar envolvido no mecanismo de nefrotoxicidade da citrinina. Apesar do mecanismo envolvido não ter sido esclarecido, este estudo demonstrou que a ação direta da citrinina e não de seu metabólito, foi responsável pelo efeito observado (BERNDT *et al.*, 1984).

Em suspensão de túbulos renais de ratos tratados com citrinina observou-se uma redução dose e tempo-dependente na viabilidade celular, com a morte celular começando 1, 2, e 4 horas após a incubação das células com 500, 125-250, e 63  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> de citrinina respectivamente. Observou-se também um aumento de 30% no consumo basal de oxigênio após 30 minutos de exposição a 250  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> de citrinina. Estes efeitos foram considerados decorrentes da ação desta micotoxina sobre a função mitocondrial (ALEO *et al.*, 1991).

A avaliação da toxicidade da citrinina sobre as funções do sistema imunológico indicaram que camundongos recebendo injeções diárias, por via intra-peritoneal, de citrinina (0 – 3 mg/Kg) por 2 a 4 semanas, não apresentam diminuição da resposta imune. A cultura das células de baço destes camundongos, após 4 semanas de tratamento, apresentaram estímulo da blastogênese dos linfócitos e aumento da captação de <sup>3</sup>H-timidina, indicando que a micotoxina não suprime a síntese de DNA (REDDY *et al.*, 1988).

Em revisão recente (DIRHEIMER, 1998), a citrinina aparece como indutora de mutagenicidade em algumas bactérias, como o *Bacillus subtilis* quando testada a uma concentração de 20 e 100  $\mu$ g/disco. Porém em outras bactérias como em *E. coli*, por exemplo, a micotoxina causou uma única quebra no DNA a uma concentração de 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> e induziu reparo a uma concentração de 5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Contudo, em células eucarióticas, como *Saccharomyces cerevisiae*, hepatócitos, Chinese hamster V 79, nenhum

dos testes de mutagenicidade apresentou resultado positivo. A incubação direta de DNA e citrinina não demonstrou interação desta micotoxina com DNA (BARBER *et al.*, 1987). Alguns autores demonstraram, em *Saccharomyces cerevisiae*, inibição parcial da síntese de lipídeos, polissacarídeos, proteínas, RNA e DNA, na mesma condição experimental onde a presença de citrinina inibiu a respiração celular, sugerindo que um possível efeito da citrinina sobre a síntese de macromoléculas pode ser considerado como um efeito secundário da sua interferência no metabolismo energético (HARAGUCHI *et al.*, 1987 a).

### **1.3.3.3 Efeitos da citrinina sobre o metabolismo celular e mitocondrial**

Em cultura de células renais BHK-21 observou-se que 1 mmol.L<sup>-1</sup> de citrinina, após 10 horas de incubação, promove alteração da morfologia e propriedades de adesão celular, além da diminuição de 40% na viabilidade celular. A micrografia eletrônica de células incubadas neste mesmo período de tempo, porém com dose inferior de citrinina (0,1 mmol.L<sup>-1</sup>), demonstrou a formação de “blebs” de membrana plasmática, vacúolos indicativos de injúria celular, bem como acentuada alteração estrutural das mitocôndrias, com desaparecimento de cristas e inchamento das organelas (CHAGAS *et al.*, 1994). Uma avaliação dos efeitos da citrinina sobre o metabolismo energético nas células intactas, demonstrou uma inibição de cerca de 45% no consumo de oxigênio na presença de 1 mmol.L<sup>-1</sup> de citrinina. Em células permeabilizadas com digitonina e na presença de succinato e ADP, a velocidade respiratória foi reduzida cerca de 39%, indicando que esta micotoxina causa perturbações nas células BHK-21 devido a alterações na função mitocondrial (CHAGAS *et al.*, 1995). Os autores sugerem que a citrinina promove alterações bioquímicas relacionadas com membranas, possuindo capacidade de permear a membrana plasmática e acessar as mitocôndrias.



Foi verificado em mitocôndrias isoladas de fígado e córtex renal de rato, que a citrinina causa efeitos amplos sobre o metabolismo mitocondrial. Em mitocôndrias isoladas de córtex renal energizadas por succinato e na presença de um desacoplador da fosforilação oxidativa, demonstrou-se que a citrinina na concentração de  $1\text{mmol.L}^{-1}$ , inibe em 70 % a velocidade respiratória. A transferência de elétrons pela cadeia respiratória foi inibida na região do complexo I, mostrada pela sua grande ação inibitória, cerca de 90%, sobre a NADH oxidase e a ausência de efeito inibitório na atividade da succinato citocromo c redutase e succinato oxidase. Observou-se também que a citrinina ( $1\text{mmol.L}^{-1}$ ) causa inibição de 63% da  $\text{H}^+$ -ATPase de mitocôndria rompida ou de 87% da  $\text{H}^+$ -ATPase de mitocôndrias intactas porém, desacopladas com FCCP. O potencial elétrico transmembrana ( $\Delta\psi$ ) desenvolvido pela mitocôndria energizada e a despolarização após adição de ADP foram também inibidos de forma dose-dependente pela citrinina (CHAGAS *et al.*, 1992 a).

Em mitocôndrias hepáticas resultados similares foram obtidos, porém com menor percentual de inibição da fosforilação oxidativa. A observação de que a citrinina  $1\text{mmol.L}^{-1}$  inibe a atividade da succinato oxidase em 44%, bem como inibe as atividades das desidrogenases relacionadas com o metabolismo do malato (79%), glutamato (78%), 2-oxoglutarato (68%), somente quando as mitocôndrias apresentavam-se rompidas, sugere que a distribuição da droga na membrana mitocondrial intacta não é homogênea, sendo esta membrana provavelmente uma barreira de permeabilidade para a citrinina (CHAGAS *et al.*, 1992 b). Estes resultados em conjunto permitem prever uma diminuição do rendimento em ATP celular pela citrinina como um importante fator da sua toxicidade celular.

Os efeitos da citrinina sobre os parâmetros osmóticos da membrana mitocondrial interna também foram avaliados, com objetivo de verificar sua ação sobre a elasticidade e permeabilidade desta membrana, bem como avaliar a sua interferência sobre os processos geradores da força próton motriz. Utilizando-se a técnica de inchamento mitocondrial

dependente de energia, ou seja na presença de substrato oxidável, observou-se que a micotoxina determinou uma expressiva redução na amplitude do inchamento ocasionado pela captação de  $\text{Na}^+$ , sugerindo que há um comprometimento do potencial elétrico de membrana mitocondrial interna. A velocidade do inchamento e a amplitude da contração não foram afetadas pela citrinina, sugerindo que a elasticidade e a permeabilidade da membrana mitocondrial não foram modificadas. Contudo, a citrinina diminuiu a velocidade e amplitude do inchamento induzido por um substrato na presença do complexo valinomicina- $\text{K}^+$ , sugerindo que a mobilidade deste ionóforo na membrana mitocondrial interna foi modificada, indicando uma interferência desta micotoxina na fluidez da membrana. Os autores sugeriram que devido a grande lipossolubilidade da citrinina, uma alteração de fluidez poderia ser uma consequência da sua interação com a porção lipídica da membrana (CHAGAS *et al.*, 1995 b).

Devido a importância da homeostase intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  para a manutenção da integridade e viabilidade celular, o estudo da ação da citrinina sobre os sistemas mitocondriais de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  foi realizado por CHAGAS *et al.* (1995) e complementado por DALOCE (1995). Demonstrou-se que esta micotoxina apresentou um efeito marcante sobre o fluxo mitocondrial de cálcio. Concentrações crescentes de citrinina (0,1 a 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) promoveram uma diminuição progressiva na velocidade e capacidade total da captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ . Observou-se também uma inibição do influxo e estímulo do efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela micotoxina, sugerindo-se que este mecanismo leve ao decréscimo da concentração do íon na matriz mitocondrial (CHAGAS *et al.*, 1995 c). Foi proposto por DALOCE (1995) que a ação inibitória da citrinina sobre o metabolismo energético mitocondrial leva a um decréscimo do potencial elétrico de membrana, que seria responsável pela saída de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo reverso da via “uniporter” de entrada. Os resultados observados em mitocôndrias desenergizadas, permitiram a proposta de que o efluxo

mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  pela citrinina, também, pode ocorrer devido a um aumento inespecífico da permeabilidade da membrana (DALOCE, 1995). Este efeito juntamente com o aumento do inchamento mitocondrial, de maneira dose-dependente de citrinina e  $\text{Ca}^{2+}$  indicaram a ocorrência do fenômeno conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial (DALOCE, 1995). O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelo  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de um agente oxidante tem sido considerado um passo importante na indução de transição de permeabilidade mitocondrial, por um mecanismo envolvendo lipoperoxidação ou oxidação de proteínas de membrana (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Contudo, o mecanismo pelo qual a citrinina na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  induz a transição de permeabilidade mitocondrial não foi esclarecido.

Estudos dos efeitos da citrinina sobre a homeostase de espécies reativas de oxigênio demonstraram que a micotoxina aumenta a geração de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) pela cadeia respiratória mitocondrial. A incubação de partículas submitocondriais com citrinina 0,25 e 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  aumentou a produção do ânion superóxido de 0,49  $\text{nmol O}_2^{\bullet-}.\text{mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  para 0,8 e 0,9  $\text{nmol O}_2^{\bullet-}.\text{mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , respectivamente. Este efeito pode ser explicado pela ação inibitória da citrinina no nível do complexo I da cadeia respiratória. Além disso, esta micotoxina inibiu de maneira dose-dependente as atividades de algumas enzimas responsáveis pela manutenção das defesas antioxidantes celulares como a glutatona redutase e transidrogenase NADH/NADPH. Citrinina 0,25  $\text{mmol.L}^{-1}$  inibiu em torno de 70 % e 100 % a atividade da transidrogenase NADH/NADPH sustentada por succinato e ATP, respectivamente. A atividade da glutatona redutase mitocondrial foi inibida em 100% por citrinina 0,75  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Nenhum efeito foi verificado nas atividades das enzimas glutatona peroxidase, superóxido dismutase, catalase, glucose 6-fosfato e 6-fosfogluconato desidrogenases mesmo na presença de 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  de citrinina (RIBEIRO *et al.*, 1997).

Embora seja conhecido que o aumento do ânion superóxido estimule as reações de lipoperoxidação, não foi observado efeito estimulante sobre a lipoperoxidação induzida por ADP-Fe<sup>3+</sup> em mitocôndrias, partículas sub-mitocondriais e microsossomos, na presença de concentrações crescentes de citrinina (0,1-1mmol.L<sup>-1</sup>). Ao contrário, uma inibição desta lipoperoxidação foi observada, sendo revertida pela adição de Fe<sup>3+</sup> (RIBEIRO *et al.*, 1998).

Estes resultados apoiam aqueles observados por ALEO *et al.* (1991) em suspensões de túbulos renais proximais de ratos. Os autores descreveram que embora a lipoperoxidação tenha ocorrido durante a disfunção mitocondrial e morte celular consequentes ao tratamento com citrinina 0,25 mmol.L<sup>-1</sup>, o estresse oxidativo mediado por ferro não foi um fator causal no desenvolvimento da toxicidade. Tal conclusão foi possível a partir da observação de que o pré-tratamento com desferoxamina, um quelante de ferro, preveniu a lipoperoxidação ferro induzida mas não protegeu a morte celular induzida pela citrinina nos túbulos renais proximais. Assim, estes autores sugeriram que a lipoperoxidação observada nesta situação experimental seja uma consequência da morte celular e não o fator determinante.

Os mecanismos moleculares da inibição de lipoperoxidação ferro-induzida e da transição de permeabilidade mitocondrial induzidos pela citrinina ainda não foram esclarecidos, bem como suas interações com a bicamada fosfolipídica e o seu padrão de morte celular.

#### **1.4 Transição de Permeabilidade Mitocondrial**

A transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) caracterizada na década de 70, em mitocôndrias isoladas, foi definida como permeabilização da membrana mitocondrial interna a solutos de massa molar inferior a 1500 Da. Este fenômeno foi atribuído a abertura de um poro protéico na membrana devido ao acúmulo de Ca<sup>2+</sup> na matriz mitocondrial e foi evidenciado por um grande inchamento e desenergização mitocondrial. Ca<sup>2+</sup>, Pi e agentes

oxidantes foram considerados efetores da MPT, enquanto  $Mg^{2+}$ , nucleotídeos de adenina, baixo pH e alto potencial elétrico de membrana demonstraram proteger a indução do fenômeno (HUNTER *et al.*, 1976; HAWORTH & HUNTER, 1979; HUNTER & HAWORTH, 1979 a; b).

Segundo a teoria quimiosmótica (MITCHELL, 1961) qualquer alteração da permeabilidade mitocondrial causaria despolarização da membrana, desacoplamento da fosforilação oxidativa, liberação de íons intramitocondriais e metabólitos intermediários, bem como inchamento mitocondrial (NICHOLLS, 1982), todos estes fenômenos são também reconhecidamente característicos da MTP (ZORATTI & SZABÒ, 1995). Provavelmente devido a estas coincidências, a transição de permeabilidade mitocondrial sofreu certo ceticismo no meio científico durante muito tempo (LEMASTERS *et al.*, 1998).

Vários agentes indutores e protetores foram detectados, bem como várias hipóteses de mecanismos diferentes foram propostas para explicar a MPT em mitocôndrias isoladas. A necessidade do  $Ca^{2+}$  estar localizado internamente parece ser o único dogma para a ocorrência deste fenômeno e seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido (GUNTER & PFEIFFER, 1990; ZORATTI & SZABÒ, 1995).

A MPT foi considerada por muitos uma consequência de processos degenerativos da membrana mitocondrial. A produção de espécies reativas de oxigênio quando em presença de  $Ca^{2+}$  e determinados agentes indutores, pode levar a alterações da bicamada fosfolipídica tal como a lipoperoxidação (LE QUOC & LE QUOC, 1989; NEPOMUCENO *et al.*, 1991) ou a oxidação extensiva de proteínas inseridas na membrana, levando a formação de agregados protéicos de alta massa molar (FAGIAN *et al.*, 1990; CASTILHO *et al.*, 1994, 1995 a,b). Assim, uma das hipóteses possíveis para explicar o mecanismo que leva à MPT seria o dano oxidativo (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

Somente no fim da década de 80 foi encontrado um inibidor específico para a MPT, a ciclosporina A, um undecapeptídeo cíclico utilizado como agente imunossupressor e que bloqueou especificamente o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (HALESTRAP & DAVIDSON, 1990). A inibição por concentrações saturantes de CsA fortaleceu a hipótese da existência de um canal ou poro protéico na membrana sobre a hipótese da ocorrência de uma perturbação não específica da bicamada lipídica, como responsável pelo fenômeno. Esta hipótese foi confirmada quando, através de métodos eletrofisiológicos, foi identificado o canal de múltipla condutância (MCC) na membrana mitocondrial (PETRONILLI *et al.*, 1989). Este canal transportava solutos catiônicos e aniônicos com massa molar menor que 1500 Da, bem como era inibido por CsA, da mesma maneira que o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (SZABÒ & ZORATTI, 1991; SZABÒ *et al.*, 1992; ZORATTI & SZABÒ, 1995).

Confirmou-se que  $\text{Ca}^{2+}$ , Pi, despolarização de membrana e oxidação de tióis vicinais promovem uma abertura do poro, enquanto  $\text{Mg}^{2+}$ , nucleotídeos de adenina, pH ácido na matriz, e alto potencial de membrana favorecem o seu fechamento (BERNARDI *et al.*, 1992; NOVGORODOV *et al.*, 1992; 1994; PETRONILLI *et al.* 1993). A regulação da abertura do poro é complexa, e ainda não está totalmente esclarecida. Sabe-se que a ligação de metais divalentes a sítios internos ou externos da membrana mitocondrial, bem como a oxidação de alguns grupamentos sulfidrílicos específicos estão diretamente envolvidos na modulação do estado aberto ou fechado do poro sensível a CsA (BERNARDI *et al.*, 1993; COSTANTINI *et al.*, 1996; PETRONILLI *et al.*, 1994 ; ZORATTI & SZABÒ, 1995).

O fato de  $\text{Ca}^{2+}$  e Pi em concentrações fisiológicas serem capazes de desencadear a MPT, levou à procura de um significado fisiológico ou patofisiológico para o fenômeno. Atualmente a MPT é considerada como um evento central, coordenando a indução da apoptose (SKULACHEV, 1996) e pode estar relacionada ao desenvolvimento de doenças

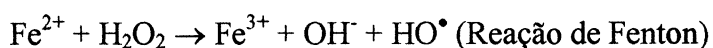
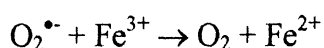
como o mal de Parkinson (CASSARINO *et al.*, 1999), bem como a indução de injúria celular por vários xenobióticos (BERNARDI *et al.*, 1998; HALESTRAP *et al.*, 1998; LEMASTERS *et al.*, 1998).

### 1.5 Lipoperoxidação ferro-induzida

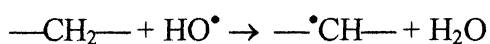
A peroxidação de membranas celulares mediada por radicais livres é uma via comum nos processos de envelhecimento (LENAZ, 1998) e no desenvolvimento de estados patológicos, seja induzidos por drogas (SCHNELLMANN, 1988; GRISHAM *et al.*, 1992; HOEHLER *et al.*, 1997) ou nos casos de injúria por isquemia/reoxigenação, entre outros (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

O ciclo redox do íon ferro produzindo espécies reativas de oxigênio é de fundamental importância na iniciação e propagação das reações de lipoperoxidação e tem sido extensivamente estudado (CARTER, 1971; BRAUGHER *et al.*, 1986; MINOTTI & AUST, 1987; FODOR & MARX, 1988; FUKUZAWA *et al.*, 1988; HAMAZAKI *et al.*, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; AUST *et al.*, 1990). Formas parcialmente reduzidas de dióxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o seu produto de dismutação, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), estão envolvidos na iniciação da lipoperoxidação (KELLOGG & FRIDOVICH, 1975; HASSAN & FRIDOVICH, 1979). Entretanto, está bem determinado em sistemas de lipoperoxidação *in vitro* que a relação absoluta de  $Fe^{3+}:Fe^{2+}$  determina o surgimento de um oxidante mais reativo (BRAUGHLER *et al.*, 1986; MINOTTI & AUST, 1987).

Segundo descrito por HALLIWELL & GUTTERIDGE (1990) a reação catalizada por ferro, conhecida como reação de Haber-Weiss, é descrita como a reação através da qual  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ , e ferro rapidamente produzem o radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ). A oxidação do  $Fe^{2+}$  por  $H_2O_2$ , é também conhecida como reação de Fenton.



Em um sistema de lipídios completamente livre de peróxidos, a iniciação da seqüência de peroxidação, em membranas ou em ácidos graxos poliinsaturados, corresponde ao ataque de alguma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupamento metileno ( $\text{—CH}_2\text{—}$ ). O radical hidroxila certamente é capaz de tal reação:



A peroxidação resultante pode ser inibida por enzimas que desdobram  $\text{H}_2\text{O}_2$  (catalase ou glutathione peroxidase contendo selênio), por sequestradores de  $\text{HO}^{\bullet}$  ou por agentes ligantes de ferro, capazes de prevenir sua participação nas reações de formação de radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Contudo, a habilidade intrínscica do  $\text{HO}^{\bullet}$  iniciar a lipoperoxidação de membranas tem sido muito questionada. Em alguns sistemas de lipoperoxidação ferro-induzida não ocorreu inibição do fenômeno após adição de sequestradores de  $\text{HO}^{\bullet}$ , apesar da sua presença ter sido detectada. Assim, existem propostas que a iniciação da lipoperoxidação ferro-induzida, ocorra através da ação de espécies reativas intermediárias a formação de  $\text{HO}^{\bullet}$ . Por exemplo, através de espécies ferril ( $\text{FeOH}^{3+}$  ou  $\text{FeO}^{2+}$ ), perferril ( $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^{\bullet-} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ ), ou ainda de um complexo triplo constituído de  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$ . (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999)

Alguns quelantes de ferro, tais como ADP ou EDTA são conhecidos por acelerar a reação de Haber-Weiss e a formação de  $\text{HO}^{\bullet}$  aumentando a velocidade de lipoperoxidação. O EDTA acelera a formação ferro-dependente de  $\text{HO}^{\bullet}$  por manter os íons ferro em solução, ou seja, prevenindo a sua precipitação em pH fisiológico, bem como por modificar o potencial redox destes íons no sentido de favorecer as reações com  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Outros quelantes de



ferro suprimem a geração de HO<sup>•</sup> a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ferro devido a formação de um complexo redox inerte, inibindo conseqüentemente a lipoperoxidação ferro-dependente. A desferoxamina, conhecida comercialmente como Desferal, é um quelante utilizado terapêuticamente nas intoxicações agudas por ferro e em outras situações patológicas onde haja uma sobrecarga deste íon. Alguns compostos fenólicos, como ácido salicílico, ácido 5-aminosalicílico (DINIS *et al.*, 1994) e flavonóides (FERRALI *et al.*, 1997; VAN ACKER *et al.* 1998; MITCHELL *et al.*, 1998) que apresentam em sua estrutura grupamentos carboxílicos (—CO<sub>2</sub>H) na posição *orto* em relação a grupamentos hidroxilas (—OH) promovem inibição da lipoperoxidação ferro-dependente devido a sua habilidade de quelar ferro ou sequestrar radicais livres.

Além da existência das defesas enzimáticas antioxidantes, a baixa disponibilidade de ferro “catalítico” *in vivo* é um importante fator de proteção, e é garantida pela ligação deste íon a proteínas específicas. Cerca de dois terços do ferro corporal é encontrado na hemoglobina, uma menor quantidade na mioglobina, várias enzimas e na transferrina e ferritina, proteínas de transporte e armazenamento de ferro, respectivamente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). A ferritina consiste em uma estrutura proteica, composta por 24 subunidades, e um núcleo mineral capaz de armazenar até 4500 íons ferro. O ferro pode ser removido da ferritina como Fe<sup>2+</sup> pela ação de vários agentes redutores, como tióis e flavinas reduzidas (JONES *et al.*, 1978; FUNK *et al.*, 1985), ascorbato (ROGINSKY *et al.*, 1997); vários xenobióticos (MONTEIRO & WINTERBOURN, 1989; PUNTARULO & CEDERBAUM, 1993; OTEIZA *et al.* 1995) e até mesmo pelo ânion radical superóxido (THOMAS *et al.*, 1985), representando um passo fundamental para a indução de lipoperoxidação. Portanto, apesar do organismo possuir mecanismos eficientes de manter o ferro não disponível para reações de Fenton *in vivo*, as próprias espécies reativas de oxigênio

( $O_2^{\bullet-}$ ) podem mobilizá-lo da ferritina ou alterar grupamentos heme de proteínas, liberando-o (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

As mitocôndrias são uma das maiores fontes intracelulares de espécies reativas de oxigênio. Cerca de 1-2 % do consumo de oxigênio mitocondrial total resulta na geração de radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), pelo vazamento de elétrons da cadeia respiratória a nível da NADH coenzima Q redutase, succinato coenzima Q redutase e coenzima  $QH_2$ -citocromo c redutase (complexos I, II, III). As estruturas mitocondriais são muito sensíveis as espécies reativas de oxigênio, podendo ocorrer oxidação de proteína e lipídeos e mutações no DNA mitocondrial. Como a produção de  $O_2^{\bullet-}$  é contínua e fisiológica, as mitocôndrias possuem um eficiente sistema antioxidante composto por superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione redutase, glutathione, NAD(P)H transidrogenase, NADH, vitaminas E e C (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

Em condições fisiológicas, o conteúdo mitocondrial de ferro é de aproximadamente 1,7 nmol/mg proteína, excluindo as ligações a proteínas heme e FeS (TANGERAS *et al.* 1980). Este ferro é quelado por substâncias tais como ADP, ATP, GTP e citrato. Estes complexos de ferro de baixo massa molar são capazes de iniciar a lipoperoxidação da membrana mitocondrial, principalmente, quando na presença de concentrações micromolares de íons  $Ca^{2+}$  (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Apesar do mecanismo ainda não estar totalmente esclarecido, sabe-se que o  $Ca^{2+}$  mobiliza  $Fe^{2+}$  intramitocondrial (MERRYFIELD & LARDY, 1982) e que o dano oxidativo causado por lipoperoxidação e oxidação de proteínas da membrana mitocondrial é potencializado quando na presença de  $Ca^{2+}$  (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

## 2 OBJETIVOS

Considerando a ocorrência da citrinina como contaminante de alimentos, o conhecimento detalhado do mecanismo pelo qual ocorre a sua toxicidade é relevante. A lipoperoxidação e a MTP estão envolvidos no mecanismo de ação de vários xenobióticos, sendo que a lipoperoxidação muitas vezes é o mecanismo que desencadeia a MTP. Considerando que a citrinina interfere nestes parâmetros, porém inibindo a lipoperoxidação ferro-induzida e estimulando a MTP, em efeitos aparentemente contraditórios, um aprofundamento desta questão é importante para esta micotoxina. Assim, o presente trabalho apresenta os seguintes objetivos específicos:

1 Investigar o mecanismo molecular pelo qual a citrinina induz a transição de permeabilidade mitocondrial e a possibilidade deste fenômeno estar envolvido no mecanismo de toxicidade celular desta micotoxina;

2. Analisar a interação da citrinina com a bicamada fosfolipídica;

3. Verificar as propriedades químicas responsáveis pela inibição da lipoperoxidação ferro-induzida pela citrinina.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

Citrinina, etanol absoluto,  $\text{CaCl}_2$ , KCl, NaCl, ácido ascórbico, cisteína, sulfato ferroso, diamida, valinomicina, catalase, manitol, succinato, rotenona, safranina O, ferrozina, *o*-fenantrolina, sulfonato de batofenantrolina, ferritina de baço de cavalo, Hepes, Tris, DTT, DPPH, EDTA, EGTA, BSA, BHT, FCCP, DMPO, HRPO, SDS, Acrilamida foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.). DMPO foi tratado com carvão ativado por filtração.

Os reagentes a seguir indicados foram adquiridos dos laboratórios: Ciclosporina A (Sandoz), sondas fluorescentes DPH e DPH-PA (Molecular Probes).

Outros reagentes utilizados possuíam grau analítico.

As soluções foram preparadas com água deionizada através de sistema purificador Millipore MiliQ.

#### 3.2 Preparo da solução de citrinina

A solução de citrinina foi preparada em etanol absoluto à concentração final de 40  $\text{mmol.L}^{-1}$ , exceto nos experimentos de polarização de fluorescência, onde foi diluída em DMSO.

### 3.3 Animais

Para o isolamento de mitocôndrias de fígado de rato foram utilizados ratos machos albinos Wistar, com peso aproximado de 250 g mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alimentados com dieta balanceada Purina® e água *ad libitum*. Para o isolamento das mitocôndrias de fígado os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas, permitindo-se água *ad libitum*.

### 3.4 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por VOSS *et al.* (1961), utilizando um meio de extração contendo: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, EGTA 1 mmol.L<sup>-1</sup> e BSA 0,1g%. Para a obtenção das mitocôndrias os animais foram sacrificados por decapitação. O fígado foi imediatamente retirado e imerso em meio de extração gelado. Após lavado, o órgão foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Van Potter Evelhjem, usando-se sucessivamente pistilo frouxo e normal. O material obtido foi centrifugado a 500 x g a 4°C em centrífuga Beckman Modelo J-21B durante 5 minutos, a fim de eliminar células ainda intactas, membranas e núcleos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 11.500 x g durante 10 minutos a 4°C. O precipitado obtido, constituído de mitocôndrias intactas foi lavado duas vezes e suspenso em meio de extração sem EGTA. As mitocôndrias obtidas foram ressuspensas em meio de extração à concentração de aproximadamente 20 mg de proteína por mililitro.

### 3.5 Determinação do consumo de O<sub>2</sub> por mitocôndrias isoladas e cálculo do coeficiente de controle respiratório

O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas foi monitorado polarograficamente com eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.) em oxígrafo Gilson. Os experimentos foram realizados em volume final de 1,4 mL, sob agitação em câmara fechada termostaticada a 30°C. O sistema de reação utilizado constituído de D-manitol 125 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, EGTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>, BSA 0,1 g%, foi suplementado com rotenona 5 μmol.L<sup>-1</sup>, Pi 1 mmol.L<sup>-1</sup>, ADP 0,05 mmol.L<sup>-1</sup>, succinato 2 mmol.L<sup>-1</sup> e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial.

As velocidades respiratórias foram expressas em nmol de O<sub>2</sub> consumidos.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína, considerando-se que a solubilidade do O<sub>2</sub> na água, a 30°C e 1 atm é de 235 μmol.L<sup>-1</sup> (ESTABROOK, 1967). O coeficiente de controle respiratório foi obtido da razão entre velocidade da respiração na presença de ADP (estado III) e a velocidade após o consumo de ADP (estado IV) (CHANCE & WILLIAMS, 1955).

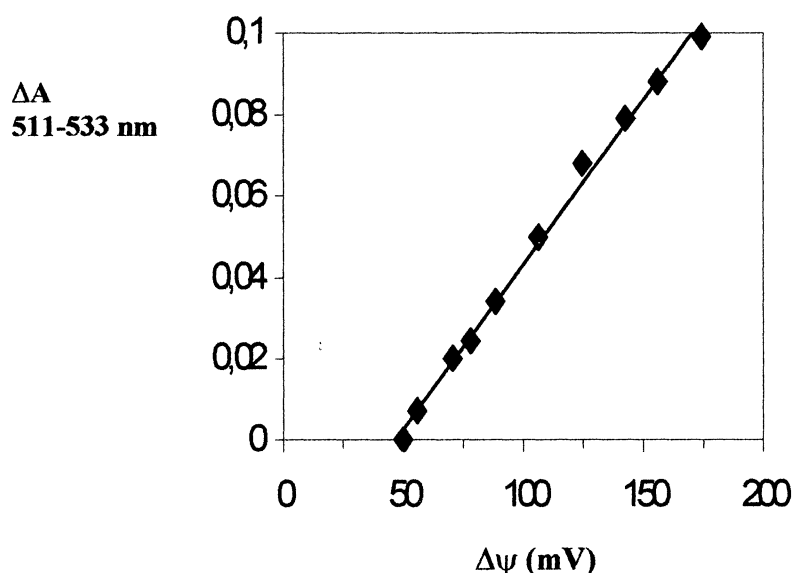
### 3.6 Determinação de potencial elétrico da membrana mitocondrial (Δψ)

O potencial elétrico de membrana (Δψ) foi determinado pela variação de absorbância promovida pela captação de Safranina O como descrito por AKERMAN & WIKSTRÖM (1976). A suspensão mitocondrial (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) foi incubada a 30°C em meio contendo: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, suplementado com Pi 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, safranina O 10 μmol.L<sup>-1</sup>, rotenona 5 μmol.L<sup>-1</sup>, em volume final de 3 mL. Quando necessário o meio foi suplementado também com Ca<sup>2+</sup> 10 μmol.L<sup>-1</sup>, citrinina 0,25 mmol.L<sup>-1</sup> e CsA 0,5 μmol.L<sup>-1</sup>. O potencial de membrana foi formado pela adição de succinato de sódio 3 mmol.L<sup>-1</sup>. As variações de absorbância a 511-533 nm foram medidas em espectrofotômetro Aminco-Chance Dual Wavelength/Double Beam, acoplado a registrador. Para determinar o

$\Delta\psi$  em cada situação experimental foram previamente elaboradas curvas de calibração conforme exemplificado na figura 5, onde mediu-se o potencial de membrana desenvolvido pela difusão de  $K^+$  na presença de valinomicina ( $0,12 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), de acordo com a metodologia descrita por AKERMAN & WIKSTRÖM (1976). O potencial foi calculado utilizando a equação de Nernst (equação 1), considerando  $K^+(\text{in})$   $120 \text{ mmol.L}^{-1}$ , conforme descrito por ROSSI & AZZONE (1969).

equação 1: Equação de Nernst

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



**Figura 6. Curva de Calibração para cálculo do Potencial de Membrana ( $\Delta\psi$ )**

Substrato: Succinato de sódio. As mudanças espectrais da Safranina O, expressas como  $\Delta A$ , estão relacionadas ao potencial de difusão de  $K^+$  (mV). Coeficiente de correlação da curva de 0,99.

### **3.7 Determinação de inchamento mitocondrial**

#### **3.7.1 Determinação do inchamento mitocondrial em mitocôndrias desenergizadas**

Os experimentos de inchamento mitocondrial em mitocôndrias desenergizadas foram realizados a 30°C acompanhando-se a variação da absorbância a 540 nm (BERNARDI *et al.* 1992) em espectrofotômetro Aminco-Chance Dual Wavelength/Split Beam, acoplado a registrador ou em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300. A suspensão mitocondrial (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) foi incubada a 30°C em meio contendo: D-manitol 125 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, KCl 65 mmol.L<sup>-1</sup>, BSA 0,1 g% e suplementado com FCCP 1µmol.L<sup>-1</sup> e Ca<sup>2+</sup> 250 ou 500 µmol.L<sup>-1</sup>. Em situações específicas foram adicionados: citrinina 0,5 ou 1 mmol.L<sup>-1</sup>, diamida 300µmol.L<sup>-1</sup>, DTT 1 mmol.L<sup>-1</sup>, BHT 10 µmol.L<sup>-1</sup>, catalase 1µmol.L<sup>-1</sup>, ATP-Mg<sup>2+</sup> 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, CsA 0,5 µmol.L<sup>-1</sup>, NEM 20 µmol.L<sup>-1</sup>, mersalil 20 µmol.L<sup>-1</sup>.

#### **3.7.2 Determinação do inchamento mitocondrial em mitocôndrias energizadas**

Os experimentos de inchamento mitocondrial em mitocôndrias energizadas foram realizados a 30°C acompanhando-se a variação da absorbância a 540 nm (BERNARDI *et al.* 1992) em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300. A suspensão mitocondrial (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) foi incubada a 30°C em meio contendo: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, rotenona 5µmol.L<sup>-1</sup>, succinato 3 mmol.L<sup>-1</sup> e suplementado com Ca<sup>2+</sup> 10 µmol.L<sup>-1</sup> e Pi 1,5 mmol.L<sup>-1</sup>. Citrinina foi adicionada nas concentrações de 10, 25 e 50 µmol.L<sup>-1</sup>.



### 3.8 Eletroforese de proteínas mitocondriais em gel de poliacrilamida contendo

#### SDS

A suspensão mitocondrial ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi incubada a  $30^\circ\text{C}$  em meio contendo: D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , tampão Hepes  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, FCCP  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Amostras desta preparação foram suplementadas em separado com: EGTA  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  e diamida  $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , diamida  $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  e DTT  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  e citrinina  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , citrinina  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  e DTT  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Após 20 minutos de incubação as amostras foram submetidas a 3 etapas sucessivas de congelamento-descongelamento para a liberação das proteínas da matriz mitocondrial de acordo como descrito por CASTILHO *et al.* (1995). As proteínas da membrana mitocondrial foram centrifugadas a  $7800 \times g$  por 2 minutos em centrífuga Microcentaur - Sanyo, lavadas com água destilada e centrifugadas novamente. O precipitado foi ressuspenso em aproximadamente  $0,2 \text{ mL}$  de meio contendo: tampão Tris-HCl  $62,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%. Após a dosagem de proteína,  $50 \text{ } \mu\text{g}$  de proteínas de cada amostra foram aplicadas ao gel de eletroforese com adição de azul de bromofenol 0,001% como corante marcador de corrida. A eletroforese foi realizada em SDS-PAGE em sistema descontinuo. O gel de corrida era composto de 10% de acrilamida e o gel de empacotamento 3,5%. O tampão de corrida foi preparado com Tris 3%, glicina 56%, SDS 1%, pH 8,3 (ajustado com glicina) e diluído 10 vezes na hora do uso. A voltagem foi 100V, 250 mA. O gel foi corado com solução de Comassie Blue R-250 0,1% (LAEMMLI, 1970).

### 3.9 Dosagem de grupos sulfidrílicos da membrana mitocondrial

A dosagem de grupos sulfidrílicos da membrana mitocondrial foi realizada como descrito por KOWALTOWSKI *et al.* (1996). A suspensão mitocondrial (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) foi incubada a 30°C em meio contendo: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, FCCP 1 μmol.L<sup>-1</sup>. Amostras desta preparação foram suplementadas em separado com: EGTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>; EGTA 1 mmol.L<sup>-1</sup> e citrinina 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>; Ca<sup>2+</sup> 500 μmol.L<sup>-1</sup>; Ca<sup>2+</sup> 500 μmol.L<sup>-1</sup> e citrinina 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>; Ca<sup>2+</sup> 500 μmol.L<sup>-1</sup> e DTT 2 mmol.L<sup>-1</sup>; Ca<sup>2+</sup> 500 μmol.L<sup>-1</sup>, DTT 2 mmol.L<sup>-1</sup> e citrinina 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>. Após 20 minutos de incubação a suspensão mitocondrial foi lavada duas vezes com meio de incubação para retirar o excesso de reagentes. Após três subseqüentes processos de congelamento-descongelamento para liberar as proteínas da matriz, a preparação foi centrifugada durante 2 minutos a 7800 x g em centrífuga Microcentaur – Sanyo. O precipitado foi tratado com TCA 6,5% e centrifugado nas mesmas condições durante 20 segundos para precipitar as proteínas. Este processo foi repetido duas vezes. O precipitado final foi suspenso em aproximadamente 100 μL de um meio contendo EDTA 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, Tris-HCl 500 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,8 e SDS 1%. 100 μg de proteína foi então adicionada a 1 mL da solução contendo DTNB 100 μmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> e Tris-HCl 500 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,3. A absorção foi medida a 412 nm usando-se cisteína como padrão.

### **3.10 Interação da citrinina com membranas artificiais**

#### **3.10.1 Preparo dos liposomas de dimiristoilfosfatidil-colina (DMPC)**

Os liposomas de DMPC foram preparados de acordo com a metodologia descrita por ANTUNES-MADEIRA *et al.* (1980), utilizando DMPC em concentração final de 345  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . O fosfolípido foi dissolvido em clorofórmio e o solvente foi evaporado, até a secura, em evaporador rotatório, a 25°C. O filme lipídico foi então hidratado com volume adequado de tampão Tris-maleato 10  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7, KCl 50  $\text{mmol.L}^{-1}$  e disperso por agitação manual, em banho a 30°C (7°C acima da temperatura de transição do fosfolípido).

A amostra foi agitada vigorosamente durante 1 minuto e submetida a ultrasonicação suave em banho de ultra-som (THORTON T 7), visando dispersar agregados e tornar homogênea a suspensão. O tempo de ultrasonicação foi controlado pela turbidez da suspensão a 600 nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U 2001 UV/VIS, até atingir uma absorbância de aproximadamente 0,2. Os liposomas preparados nestas condições são multilamelares (ANTUNES-MADEIRA *et al.* 1995).

#### **3.10.2 Incorporação das sondas fluorescentes**

Foram utilizadas duas sondas o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), que se localiza no interior hidrofóbico da membrana, e o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno-ácido propiônico (DPH-PA), que permanece ancorado à superfície da membrana. Estas sondas foram solubilizadas em tetrahidrofurano e dimetilformamida, respectivamente. Aliquotas de soluções concentradas das sondas foram injetadas, sob agitação vigorosa em vórtex, nas suspensões de liposomas (DMPC) previamente aquecidas a 30°C. A concentração final de sonda e o quociente sonda/lípido foram 1,73  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e 1/200 respectivamente, tanto na situação do DPH quanto do DPH-PA. As preparações de membranas já em presença das sondas foram incubadas no escuro, durante aproximadamente 15 horas, a 30°C. Ambas as sondas

incorporam-se rapidamente a membranas dos liposomas multilamelares, atingindo intensidade de fluorescência constante ao fim de 90 minutos de incubação (LENTZ *et al.*, 1976).

Para cada amostra (suspensão de membranas contendo sonda) foi preparado um controle sem sonda, contendo volume correspondente de tetrahydrofurano ou dimetilformamida e que sofreu tratamento igual ao da amostra. Estes controles foram utilizados na correção das medições fluorimétricas, para descontar a interferência da luz dispersa pelas partículas em suspensão (“light scattering”). As suspensões de membrana contendo as sondas foram incubadas na presença de citrinina preparada em DMSO, nas concentrações de 0,25, 0,5 e 0,75 mmol.L<sup>-1</sup>. Os controles com DMSO na presença das sondas também foram realizados.

### 3.10.3 Fluorimetria

As medidas fluorimétricas foram realizadas em fluorímetro AMINCO SPF 125, com células termostalizadas pela circulação de água a partir de banho de circulação (PHARMACIA) com controle de temperatura de 0,1°C.

Para as medições de polarização de fluorescência (P) foram montados dois polarizadores Polaroid: um, entre a amostra e o monocromador de excitação, para interceptar o feixe de excitação; outro, entre a amostra e o monocromador de emissão, para interceptar o feixe de emissão (analisador). A polarização de fluorescência foi determinada de acordo com o procedimento ilustrado no esquema 1.

A amostra foi excitada pelo componente vertical da luz monocromática e foram medidas as intensidades da luz emitida quando o analisador estava orientado paralela (I||) e perpendicularmente (I⊥) à direção de polarização da luz de excitação. As direções de polarização de I|| e I⊥ foram, respectivamente, as dos eixos Z e dos X. O índice de

polarização de fluorescência (P) foi calculado como recomendado por LITMAN & BARENHOLZ (1982), pelo quociente descrito na equação 2.

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} \quad (\text{equação 2})$$

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

$$G = \frac{I_{\perp}^*}{I_{||}^*} \quad (\text{equação 3})$$

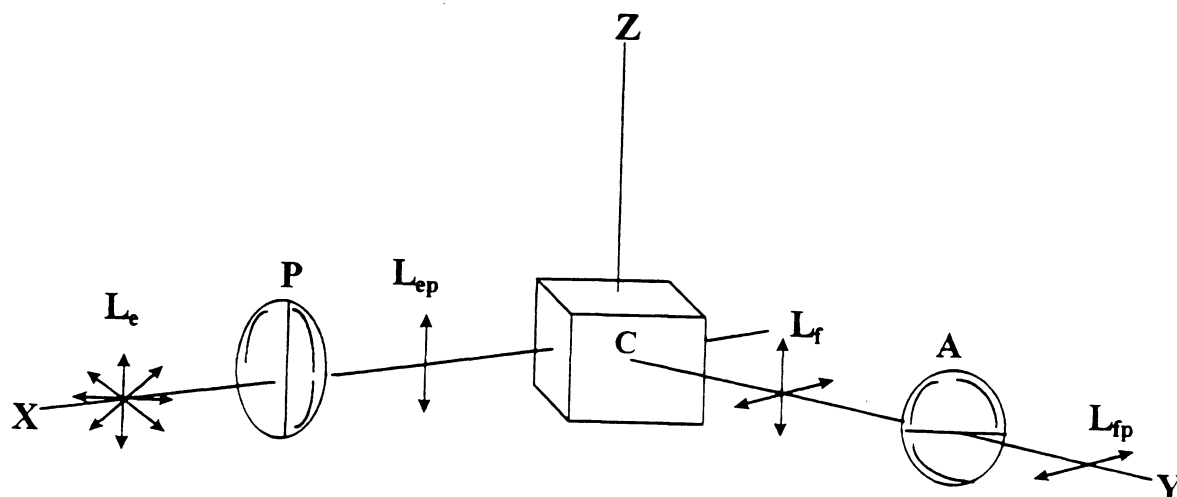
em que  $I_{\perp}^*$  e  $I_{||}^*$  correspondem às intensidades dos componentes vertical e horizontal da luz emitida quando o polarizador está orientado horizontalmente. A amostra excitada com o componente horizontal da luz proveniente do monocromador de excitação deveria produzir idênticos componentes vertical e horizontal da luz emitida, porque as probabilidades de reorientação das moléculas excitadas, durante o tempo de vida da excitação, são idênticas em todas as direções horizontal e vertical. A diferença dos componentes vertical e horizontal, depois de atravessarem o monocromador de emissão, deve-se à dispersão e, portanto, transmissão desigual desses componentes. O valor corrigido do índice de polarização visualizado na equação 4, é:

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp} G}{I_{||} + I_{\perp} G} \quad (\text{equação 4})$$

Deve-se salientar que a interferência da dispersão da luz pelas partículas em suspensão da amostra foi descontada de todas as intensidades de fluorescência medidas ( $I_{||}$ ,  $I_{\perp}$ ,  $I_{\perp}^*$ ,  $I_{||}^*$ ) subtraindo-se-lhes as correspondentes intensidades de luz emitida por um

controle branco (sem sonda), nas mesmas condições da amostra. Assim, para cada amostra, a determinação do índice de polarização exigiu 8 leituras independentes da quantidade de luz emitida nas diversas condições (LITMAN & BARENHOLZ, 1982).

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



**Esquema 1. Representação esquemática das medidas de polarização de fluorescência (P).** A luz monocromática de excitação ( $L_e$ ) ao passar pelo polarizador (P), orientado na vertical, dá lugar a um componente vertical da luz polarizada ( $L_{ep}$ ) que excita a amostra contida na célula C. A luz emitida ( $L_f$ ) ao passar pelo analisador (A) dá lugar a componentes da luz polarizada ( $L_{fp}$ ),  $I \parallel$  ou  $I \perp$ , conforme o analisador estiver colocado paralelamente ou a  $90^\circ$  à direção de polarização da luz de excitação. No processo, são preferencialmente excitadas as moléculas da amostra que se encontram alinhadas com o vetor eletromagnético do feixe polarizado de excitação. Estas moléculas, devido a difusão, vão depois orientar-se em várias direções no período de tempo do estado excitado e, por isso, é possível detectar na emissão componentes polarizados paralelamente ( $I \parallel$ ) e perpendicularmente ( $I \perp$ ) à excitação. Isto é, as moléculas excitadas vão reorientar-se em todas as direções do espaço e, assim, a fluorescência emitida é despolarizada. O grau de polarização reflete-se no decréscimo de  $I \perp$  e aumento de  $I \parallel$ . (Adaptado de VAN HOLDE, 1975).

### **3.11 Interação entre Citrinina e Íons Ferro**

#### **3.11.1 Estudos espectrofotométricos da ligação da citrinina com íons ferro**

##### **3.11.1.1 Espectro de absorção da citrinina na presença de íons ferro**

Todas as determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 UV/VIS equipado com impressora Epson LX 300. O espectro de absorção da citrinina  $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$  em solução de NaCl  $150 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,4, foi realizado entre 200 e 600 nm, utilizando cubeta de quartzo. A habilidade da citrinina em quelar íons ferro foi avaliada através das variações espectrais causadas pela adição de volumes específicos de soluções aquosas de  $\text{FeCl}_3$  ou  $\text{FeSO}_4$   $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , de forma a se obter uma relação final 1:1 de citrinina:ferro.

##### **3.11.1.2 Ensaio da ferrozina**

A ligação da citrinina a íon ferroso também foi avaliada através da formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina (CARTER, 1971). Citrinina  $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  foi incubada com  $\text{Fe}^{2+}$   $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (sulfato ferroso amoniacal) em acetato de amônio 5%, pH 6,9. A reação foi iniciada pela adição de ferrozina  $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  e, após equilíbrio (10 minutos), a absorbância foi determinada a 562 nm.

##### **3.11.2 Estudo de EPR**

Os experimentos envolvendo a metodologia de EPR foram realizados no Departamento de Química da UFPR com a colaboração do Prof. Dr. Antônio Sálvio Mangrich.

As espectroscopias de ressonância magnética eletrônica do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ :citrinina foram realizados adicionando-se sucessivamente concentrações crescentes de soluções alcoólicas de citrinina a soluções aquosas de  $\text{Fe}^{3+}$ . A relação álcool:água foi sempre mantida



constante. Os espectros foram obtidos utilizando-se as seguintes proporções entre citrinina:Fe<sup>3+</sup>: 0:1; 1:1; 1:2; 1:3.

Os espectros foram realizados a temperatura ambiente usando um espectrômetro Bruker ESP 300E operando a  $\nu \sim 9,5$  GHz com frequência de modulação de 100 KHz e potência das microondas de 20 mW. Softwares WINEPR<sup>®</sup> e Sinfonia<sup>®</sup> da Bruker Company foram usados para tratamento dos dados e simulação dos espectros, respectivamente.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada pelo sistema Millipore Milli-Q, ou soluções de água:álcool como solvente. As soluções foram analisadas usando-se célula “flat” de quartzo ou tubos de quartzo de 2mm de diâmetro (Wilmad Company).

### **3.12 Interferência da citrinina sobre os estados de redução/oxidação de ferro**

#### **3.12.1 Ensaio da *o*-fenantrolina**

A interferência da citrinina na redução do Fe<sup>3+</sup> ou auto-oxidação do Fe<sup>2+</sup> foi avaliada através da ligação preferencial do Fe<sup>2+</sup> pelo reagente *o*-fenantrolina com formação de um cromóforo com forte absorção em 510 nm (AUST *et al.* 1990). O sistema de reação em volume final de 1 mL era constituído por NaCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, FeCl<sub>3</sub> 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> ou FeSO<sub>4</sub> 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> e citrinina 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>. Após diferentes tempos de incubação a 25°C, adicionou-se *o*-fenantrolina 1 mmol.L<sup>-1</sup> e, após 10 minutos, a absorbância foi determinada a 510 nm. A quantidade de Fe<sup>3+</sup> reduzido ou Fe<sup>2+</sup> oxidado foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do quelato *o*-fenantrolina/ Fe<sup>2+</sup> de 11.100 mol<sup>-1</sup>.L. cm<sup>-1</sup> (AUST *et al.* 1990).

### 3.12.2 Consumo de O<sub>2</sub>

A autooxidação do íon ferroso na presença de citrinina também foi acompanhada através de determinações da utilização de O<sub>2</sub>. A interferência da citrinina na velocidade de auto-oxidação do íon ferroso foi, também, medida por monitoramento do consumo de oxigênio usando um eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instruments, OH) (HAMAZAKI *et al.*, 1989; TIEN *et al.*, 1982). A mistura de incubação para este estudo de auto-oxidação contendo tampão Hepes 5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, 28 °C. As concentrações utilizadas foram as mesmas descritas no ensaio de redução/oxidação de ferro utilizando o quelante *o*-fenantrolina.

### 3.13 Efeito da citrinina na mobilização de ferro da ferritina

#### 3.13.1 Preparo da solução de ferritina

O ferro fracamente ligado à ferritina de baço de cavalo (HoSF) foi removido pela incubação de uma alíquota de 0,5 mL da proteína com igual volume de tampão Tris-HCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, contendo NaCl 140 mmol.L<sup>-1</sup> e EDTA 10 mmol.L<sup>-1</sup> por uma hora em geladeira. Em seguida a ferritina foi purificada em coluna de Sephadex G-25, equilibrada com o mesmo tampão, porém sem EDTA. A preparação assim obtida foi mantida a temperatura de 4°C (OTEIZA *et al.*, 1995).

#### 3.13.2 Liberação de ferro da ferritina

A determinação da liberação de ferro da ferritina, foi realizada espectrofotometricamente segundo o método descrito por OTEIZA *et al.* (1995), variando-se as concentrações de citrinina e citrinina:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:5) submetidas a secagem em estufa a vácuo a 25°C, e ressuspensas em etanol. Utilizou-se ferritina de baço de cavalo (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>) em tampão Tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, contendo sulfonato de batofenantrolina 1 mmol.L<sup>-1</sup>.

A liberação de  $\text{Fe}^{2+}$  da ferritina foi acompanhada a 530 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , utilizando-se o coeficiente de extinção molar do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -batofenantolina de  $22.200 \text{ mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$  (AUST *et al.*, 1990).

### **3.14 Interação entre citrinina e peróxido de hidrogênio**

#### **3.14.1 Dosagem de peróxido de hidrogênio**

A dosagem do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi realizada segundo método descrito por PICK & KEISARI, (1980) e baseia-se na oxidação do vermelho de fenol pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediada pela peroxidase de raiz forte (HRPO), formando um composto que absorve em 610 nm após adição de NaOH. A linearidade do método apresenta-se até uma concentração de  $60 \text{ nmol.mL}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A solução tamponada de vermelho de fenol (PRS) era constituída por: NaCl  $140 \text{ mmol.L}^{-1}$ , tampão fosfato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7, vermelho de fenol  $0,28 \text{ mmol.L}^{-1}$  ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e HRPO  $10 \text{ U.mL}^{-1}$  ( $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O vermelho de fenol e HRPO foram adicionados ao tampão momentos antes da realização do experimento. Uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi preparada diluindo-se 1:10000 a solução estoque de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30% e a concentração desta solução foi determinada a partir do coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 230 nm ( $\epsilon_{230 \text{ nm}} = 81 \text{ mol}^{-1}\text{.L. cm}^{-1}$ ), e posteriormente ajustada para uma concentração de  $1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ . A curva de calibração foi efetuada adicionando-se concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre 10 - 60  $\text{ nmol.mL}^{-1}$  a PRS, obtendo-se um volume final de 1 mL. Após 5 minutos de incubação a  $25^\circ\text{C}$ , adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de NaOH  $1\text{mol.L}^{-1}$  e realizou-se a leitura a 610 nm contra um branco em que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi omitido contendo somente 1 mL PRS e 10  $\mu\text{L}$  NaOH. As soluções de citrinina (50 e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foram incubadas diretamente com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 e 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e imediatamente submetidas a reação com PRS como descrito para a curva de calibração. Controles com álcool (solvente da citrinina) mais  $\text{H}_2\text{O}_2$  e com citrinina sem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram realizados.

### **3.14.2 Espectro de absorção da citrinina na região UV após incubação com peróxido de hidrogênio**

Uma solução hidroalcoólica de citrinina  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , com uma relação água:álcool igual a 400:1 foi preparada e utilizada para a realização do espectro de absorção na faixa de 200 a 600 nm. A esta acrescentou-se volumes específicos de uma solução 20 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de forma a se obter concentrações finais em  $\text{H}_2\text{O}_2$  variando entre 0,2 e  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Os respectivos espectros foram obtidos imediatamente após cada adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Uma outra amostra foi preparada através da mistura da citrinina com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1:5), com posterior agitação durante 12 horas. Esta mistura foi seca em estufa a vácuo a  $25^\circ\text{C}$ , garantindo-se a retirada do peróxido de hidrogênio. Após, a amostra foi reconstituída em etanol de forma a obter-se a mesma concentração inicial de citrinina. Procedeu-se, então, a espectrometria de UV nas mesmas condições mencionadas anteriormente no item 3.12.1.1. Controles na presença somente de álcool foram também realizados.

### **3.14.3 Espectro de absorção da citrinina na região de IV após incubação com peróxido de hidrogênio**

Os experimentos envolvendo a espectrofotometria de infravermelho foram realizados no laboratório de Química Farmacêutica e Controle de Qualidade I do Departamento de Farmácia – UFPR com a colaboração da Profa. Angela Cristina Leal Badaró e da técnica de laboratório Waleska Pereira.

Os espectros de infravermelho da citrinina e do seu produto de reação com  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram realizados em células de NaCl em espectrofotômetro FTIR 8300 Shimadzu, e obtidos por transformada de Fourier. Uma amostra contendo o produto de reação da citrinina (3,5 mg) com  $\text{H}_2\text{O}_2$  em concentrações finais de  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ , respectivamente, foi preparada. Usou-se, portanto, uma relação citrinina: $\text{H}_2\text{O}_2$  de 1:5. As amostras de citrinina

(3,5 mg) em etanol e o produto da reação descrita acima foram completamente secas em estufa a vácuo a uma temperatura aproximada de 25°C e, posteriormente, diluídas com quantidades iguais de clorofórmio e submetidas a espectrofotometria de infravermelho.

### **3.15 Reatividade entre citrinina e o radical livre difenilpicrilhidrazil (DPPH)**

A reatividade da citrinina com o radical livre estável DPPH foi determinada através das medidas de alteração de absorvância a 517 nm, de acordo com o método descrito por BLOIS (1958). O sistema de reação era constituído de 1 mL de tampão acetato 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 5,5, 1 mL de etanol e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH e suplementado com concentrações crescentes de citrinina até 100 µmol.L<sup>-1</sup>. Após 5 minutos o decréscimo da absorvância foi medido. Concentrações adequadas de agentes redutores como ácido ascórbico e cisteína foram utilizados nos experimentos controle.

### **3.16 Espectroscopia de EPR da interação da citrinina com os produtos de degradação do DMPO**

Uma solução aquosa de DMPO foi previamente tratada com carvão ativado e filtrada através de membrana milipore 0,22 µm. A concentração da solução, após o tratamento, foi determinada a partir do coeficiente de extinção molar do DMPO a 234 nm ( $\epsilon = 7700 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (FINKELSTEIN *et al.*, 1980) e, posteriormente, ajustada para uma concentração de 40 mmol.L<sup>-1</sup> em etanol. Os espectros de EPR das soluções alcólicas de DMPO 40 mmol.L<sup>-1</sup>, recente e envelhecida por dois meses, ou de DMPO (40 mmol.L<sup>-1</sup>):citrinina (40 mmol.L<sup>-1</sup>) na proporção 1:1 foram realizados em tubos de quartzo de 2 mm de diâmetro (Wilmad Company), em temperatura ambiente usando um espectrômetro Bruker ESP 300E operando a  $\nu \sim 9,5 \text{ GHz}$  com frequência de modulação de 100 KHz e potência das

microondas de 20 mW. Softwares WINEPR<sup>®</sup> e Sinfonia<sup>®</sup> da Bruker Company foram usados para tratamento dos dados e simulação dos espectros, respectivamente.

### **3.17 Determinação da concentração de proteínas**

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

### **3.18 Análise Estatística**

Os dados experimentais foram descritos como sendo a média dos valores  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes. O coeficiente de variação de Pearson (C.V.) foi utilizado para verificar a homogeneidade dos dados obtidos, levando-se em consideração as médias cujo C. V. era abaixo de 10%. A avaliação estatística foi desenvolvida com o uso da análise de variância concomitante ao teste Tukey para a comparação das médias. O nível de significância usado foi  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

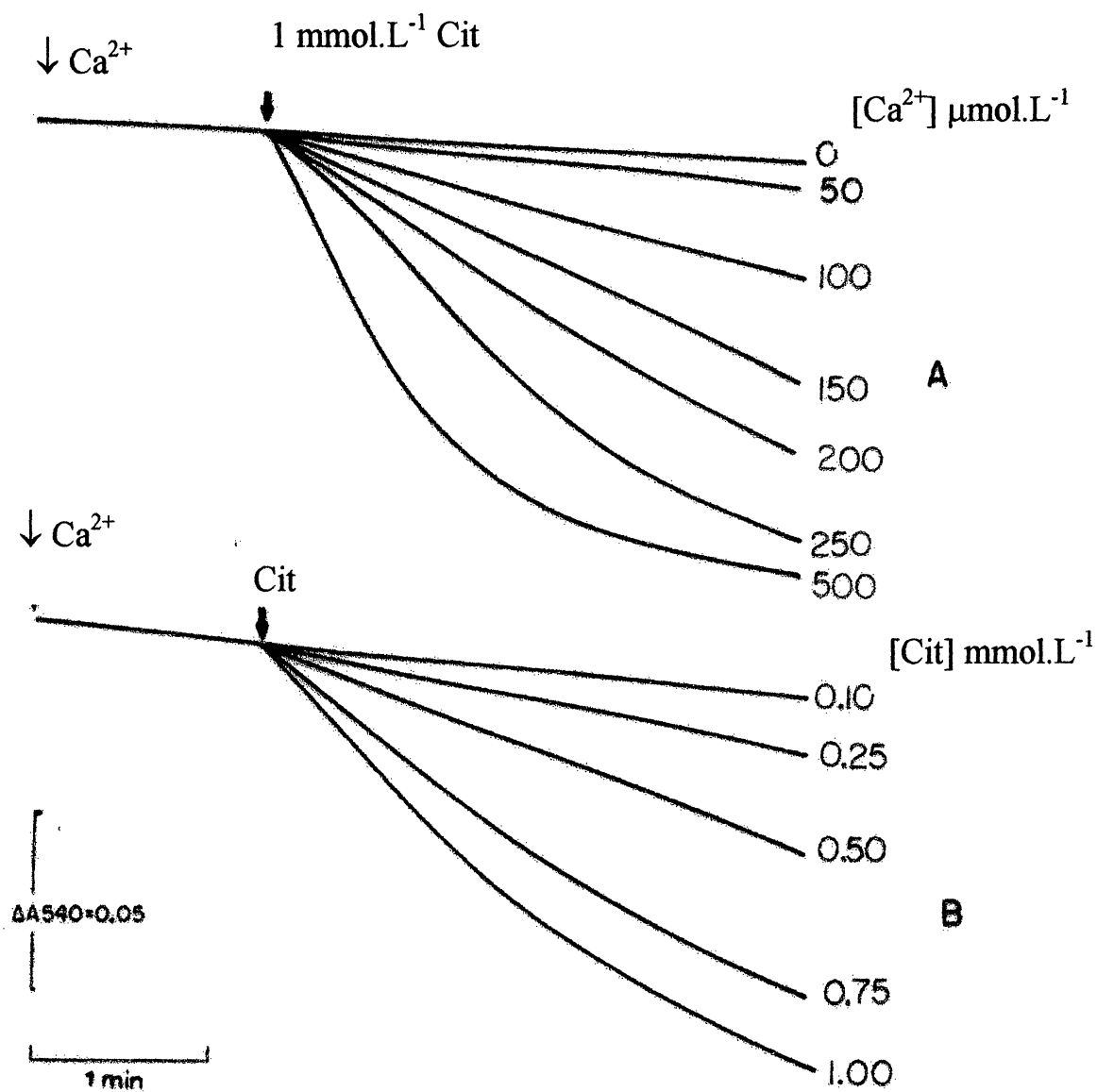
### 4.1 Citrinina e a transição de permeabilidade mitocondrial

#### 4.1.1 Efeito de agentes protetores de processos oxidativos sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por $\text{Ca}^{2+}$ e citrinina em mitocôndrias desenergizadas.

Considerando os resultados descritos por CHAGAS *et al.* (1995) mostrando a interferência da citrinina sobre os fluxos mitocondriais de cálcio, inibindo o influxo e estimulando o efluxo, e os resultados de DALOCE (1995) sugerindo que a micotoxina induz o fenômeno da MTP, um aprofundamento desta questão tornou-se relevante.

A função do  $\text{Ca}^{2+}$  na indução da MTP ainda não está completamente esclarecida; contudo, o envolvimento deste íon em processos oxidativos de lipídeos e proteínas da membrana mitocondrial, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, é reconhecido (VERCESI *et al.*, 1997; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). A indução da MTP, devido a presença de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias desenergizadas, tem sido observada pela incubação das organelas em presença de altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e de um agente oxidante. Esta condição experimental é interessante porque o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , nas mitocôndrias desenergizadas, ocorre devido a um gradiente de concentração sendo independente do potencial elétrico de membrana (CASTILHO *et al.*, 1995 b).

A figura 7 (A, B) mostra o efeito que a citrinina promove em presença de diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio, quando o parâmetro analisado foi o inchamento mitocondrial. Na figura 7 A, em que variou-se a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (50 a 500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) mantendo-se fixa a concentração de citrinina (1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ), verificou-se que tanto a velocidade quanto a extensão deste inchamento aumentaram. Vale destacar que as adições de



**Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de  $Ca^{2+}$  e citrinina sobre a velocidade e extensão do inchamento mitocondrial**

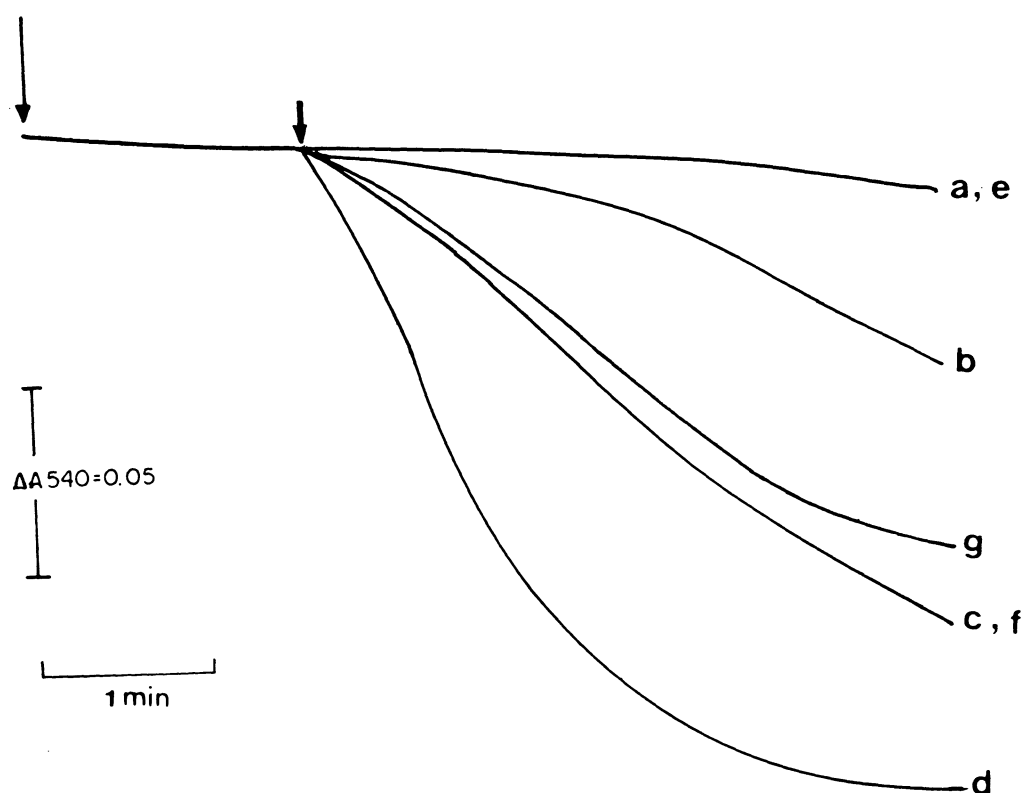
Mitocôndrias de fígado de rato ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram incubadas em meio contendo: D manitol -  $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, KCl  $65 \text{ mmol.L}^{-1}$ , BSA 0,1 g% e FCCP  $1 \text{ μmol.L}^{-1}$ . Em A, citrinina  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  foi adicionada a mitocôndrias pré-incubadas com diferentes concentrações de  $Ca^{2+}$ . Em B, as mitocôndrias pré-incubadas na presença de  $Ca^{2+}$   $250 \text{ μmol.L}^{-1}$  foram adicionadas diferentes concentrações de citrinina como indicado na figura.



citrinina na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  não induz o inchamento mitocondrial. Estes resultados mostram que a citrinina causa um aumento  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, permitindo a penetração do suporte osmótico (Manitol/KCl) ao interior da matriz. Na figura 7 B, em que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  foi mantida a  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e utilizou-se citrinina em concentrações variando de 0,1 a  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , a dependência da concentração da citrinina no processo, pode também ser observada. Estes resultados, que reproduzem aqueles mostrados por DALOCE (1995), mostram a clara interdependência de  $\text{Ca}^{2+}$  e citrinina para ocorrer o fenômeno.

Com a finalidade de verificar a possibilidade da permeabilização mitocondrial por  $\text{Ca}^{2+}$  e citrinina ocorrer por dano oxidativo, alguns conhecidos agentes indutores e protetores da MTP foram utilizados em experimentos de inchamento de mitocôndrias desenergizadas. A possibilidade da ocorrência de oxidação de grupos sulfidrílicos de proteínas de membrana, foi verificada através da comparação entre os efeitos da citrinina com os da diamida, um agente indutor de MTP, cujo mecanismo envolve a oxidação dos grupamentos sulfidrílicos. O ditioneitol (DTT), um redutor de dissulfeto capaz de proteger a MTP induzida pela oxidação de grupos sulfidrílicos, também foi utilizado. Os resultados estão apresentados na figura 8. O traçado (a) desta figura mostra que a citrinina ( $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) ou diamida ( $300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  não promove o inchamento mitocondrial. O traçado (b) e (c) mostram o inchamento mitocondrial induzido por diamida e citrinina, respectivamente, quando na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). A presença de DTT ( $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), na preparação mitocondrial suplementada com  $\text{Ca}^{2+}$  e diamida, impediu a ocorrência do fenômeno (figura 8, traçado e), como seria de se esperar frente a ação oxidante da diamida (FAGIAN *et al.*, 1990). Contudo, o traçado (d) desta figura mostra que o DTT não impediu o inchamento induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  e citrinina, pelo contrário, estimulou. Este resultado demonstra que no fenômeno desencadeado por  $\text{Ca}^{2+}$  e citrinina não há o envolvimento de oxidação extensiva de

grupos sulfidrílicos. Os traçados (f) e (g) mostram resultados de experimentos desenvolvidos respectivamente na presença de catalase ( $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), enzima que decompõe  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e de BHT ( $10\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), um antioxidante inibidor de lipoperoxidação. Verifica-se que ambos os agentes não impediram a MTP induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e citrinina, sugerindo que  $\text{H}_2\text{O}_2$  e espécies reativas de oxigênio e, por conseguinte, a lipoperoxidação, não estão envolvidos nesta ação da citrinina.



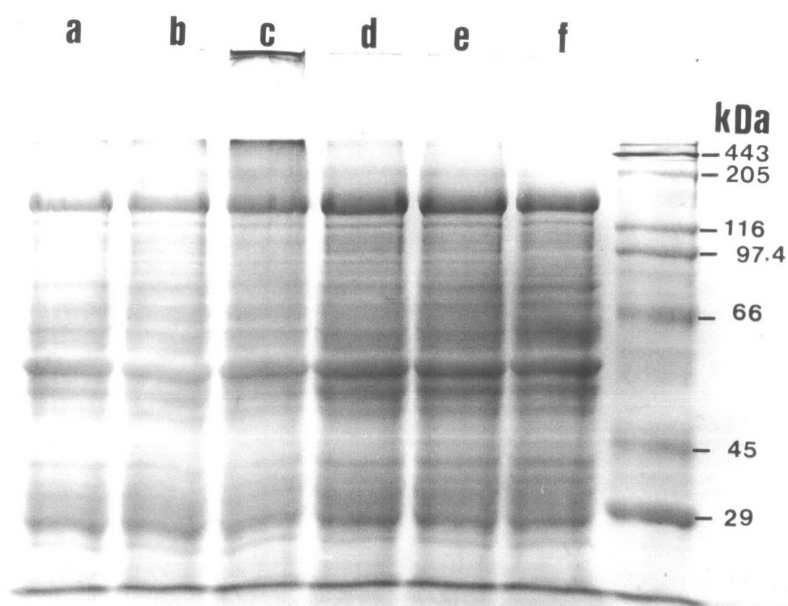
**Figura 8. Efeito do DTT, BHT e catalase no inchamento mitocondrial induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  e citrinina.**

Mitocôndrias de fígado de rato ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram incubadas em meio contendo D-manitol  $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, KCl  $65 \text{ mmol.L}^{-1}$ , BSA  $0,1 \text{ g\%}$  e FCCP  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , suplementado com: (a) citrinina  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  ou diamida  $300 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , (b)  $\text{Ca}^{2+}$   $250 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  e diamida  $300 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , (c)  $\text{Ca}^{2+}$   $250 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  e citrinina  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A primeira seta ( $\downarrow$ ) representa a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  e a segunda a adição de diamida ou citrinina. Os traços (d) e (e) representam a mesma situação de (c) e (b) na presença de DTT  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , respectivamente. Os traços (g) e (f) representam a mesma situação de (c) na presença de BHT  $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (g) e catalase  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  (f). Todos os traçados são representativos de, no mínimo, 5 experimentos independentes.

#### 4.1.2 Eletroforese de proteínas de membrana mitocondrial após incubação com $\text{Ca}^{2+}$ e citrinina

Considerando que a oxidação de grupos sulfidrílicos de proteínas de membrana causada por  $\text{Ca}^{2+}$  e diamida leva à formação de agregados proteicos de alta massa molar que podem ser visualizados na origem de um gel de eletroforese (FAGIAN *et al.*, 1990), foram realizados experimentos de eletroforese com o objetivo de confirmar os resultados dos experimentos de inchamento mitocondrial. A figura 9 apresenta a eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas de membrana mitocondrial, após as organelas terem sido incubadas com  $\text{Ca}^{2+}$  e diamida ou  $\text{Ca}^{2+}$  e citrinina, na presença ou ausência do DTT. As colunas (a) e (b) representam experimentos controle em que as mitocôndrias foram incubadas na presença de EGTA ( $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) e  $\text{Ca}^{2+}$  ( $500 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), respectivamente. Nestas duas condições não se observa a formação de agregados de alta massa molar, o que confirma dados da literatura (FAGIAN *et al.*, 1990). Na coluna (c), verifica-se a formação de agregado proteico pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $500 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e diamida ( $500 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). A presença de DTT ( $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) impediu a formação deste agregado, conforme se observa na coluna (d). A ausência de agregado proteico na eletroforese de proteínas de membrana pela incubação com  $\text{Ca}^{2+}$  ( $500 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e citrinina ( $500 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), conforme mostrado na coluna (e), confirma que não ocorre oxidação extensiva de proteínas na transição de permeabilidade mitocondrial induzida por esta micotoxina.

Todos estes resultados indicam que a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  mais citrinina, nas condições experimentais utilizadas, não envolve dano oxidativo. Além disso, a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  a sítios específicos da membrana mitocondrial, levando a abertura de um poro de transição de permeabilidade é outra hipótese possível para a indução do fenômeno (BERNARDI *et al.*, 1992; 1993) e esta possibilidade será avaliada nos próximos experimentos.



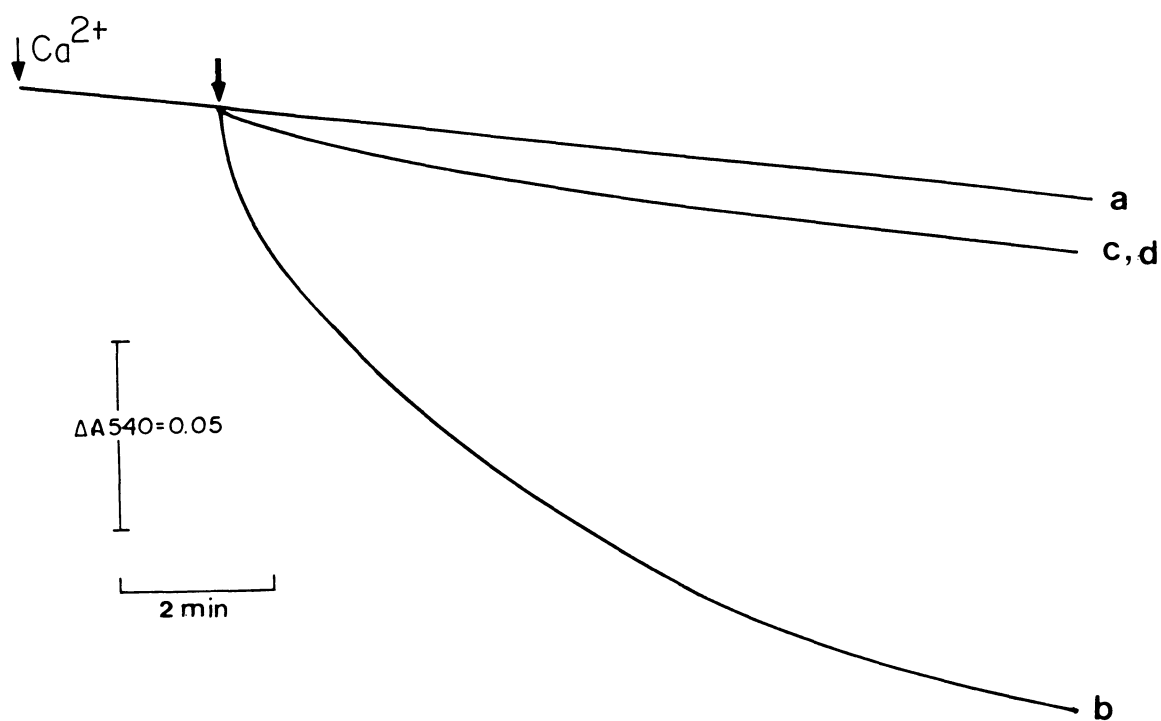
**Figura 9. Eletroforese de proteínas de membrana mitocondrial**

Mitocôndrias de fígado de rato ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram incubadas em meio contendo: D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , Hepes  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, suplementado com (a) EGTA  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , (b)  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , (c)  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e diamida  $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , (d)  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , diamida  $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e DTT  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , (e)  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e citrinina  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , (f)  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , citrinina  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  e DTT  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Após 20 minutos de incubação a  $30^\circ\text{C}$ , amostras de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteínas foram aplicadas a um gel de corrida contendo 10% de acrilamida. A figura é representativa de 5 experimentos independentes.

#### 4.1.3 Efeito da CsA sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por $\text{Ca}^{2+}$ e citrinina

Inibidores da transição de permeabilidade mitocondrial como ATP-Mg<sup>2+</sup> e ciclosporina A (CsA) são comumente usados para demonstrar o envolvimento de um poro protéico no fenômeno (ZORATI & SZABÓ 1995). Neste trabalho estes reagentes protetores foram utilizados. Os resultados estão apresentados na figura 10. O traçado (a) desta figura mostra o experimento controle na presença somente de  $\text{Ca}^{2+}$  (250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Como esperado, a presença somente do íon não leva ao inchamento mitocondrial. O traçado (b) desta figura mostra o acentuado inchamento mitocondrial induzido pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  (250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e citrinina (1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). Os traçados (c) e (d) foram obtidos nas mesmas condições do traçado (b), porém na presença de CsA (0,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e ATP-Mg<sup>2+</sup> (0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ ), respectivamente. Verifica-se que a presença destes agentes protegeu completamente a organela do inchamento mitocondrial provocado por citrinina, sugerindo a formação do poro nas condições experimentais utilizadas.

Estudos relacionados com a modulação do poro indicam que um baixo potencial elétrico de membrana favorece a sua abertura (PETRONILLI *et al.*, 1993; 1994). Nos experimentos mostrados neste trabalho, as mitocôndrias estavam desenergizadas, condição dada pela ausência de substrato e presença do protonóforo FCCP. Sob estas condições os potenciais de membrana, inclusive o potencial de Donnan estão colapsados (CHERNYAK *et al.* 1995) estando, portanto, favorecido o estado aberto do poro (PETRONILLI *et al.*, 1993; 1994). Porém, utilizando mitocôndrias energizadas, o colapso do potencial elétrico ( $\Delta\Psi$ ) da membrana mitocondrial pode indicar a ocorrência de um processo específico de abertura do poro de MTP induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  mais um agente indutor.



**Figura 10. Efeito da CsA e ATP-Mg<sup>2+</sup> no inchamento mitocondrial induzido por Ca<sup>2+</sup> e citrinina**

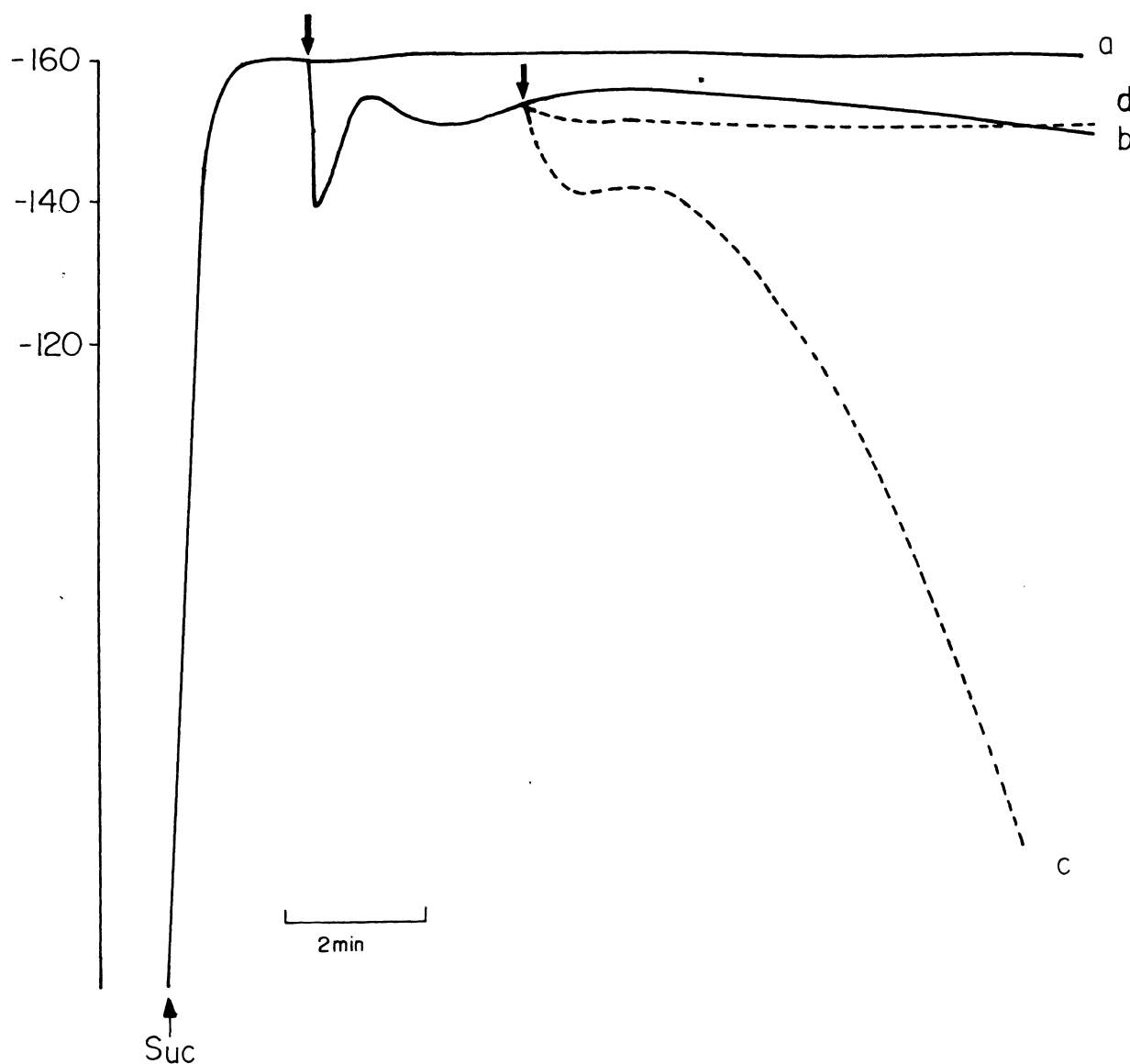
Mitocôndrias de fígado de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas nas mesmas condições descritas na figura 7. O traçado (a) representa a presença somente de  $\text{Ca}^{2+}$  250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , (b) citrinina 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  adicionada após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  como indicado pela seta ( $\downarrow$ ). O traçado (c) representa a adição de CsA 0,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e o traçado (d) a adição de ATP 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  antes da adição de citrinina 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Todos os traçados são representativos de, no mínimo, 5 experimentos independentes.

CHAGAS *et al.*, (1992) demonstraram que a pré-incubação da citrinina ( $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) com mitocôndrias de fígado de rato, energizadas com succinato, não afeta acentuadamente a formação do  $\Delta\Psi$ , causando apenas uma queda aproximada de 5%, em relação ao controle realizado na ausência da micotoxina. Na figura 11 pode-se observar a formação do potencial elétrico por mitocôndrias isoladas de fígado de rato após a adição de succinato. No traçado (a) desta figura verifica-se que a adição de citrinina ( $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) não altera o  $\Delta\Psi$ . O traçado (b) mostra que a adição somente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), provoca uma queda transitória do potencial elétrico como esperado e que é consequência de sua entrada pelo carreador “uniporter”. Uma vez atingido o estado de equilíbrio do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  o potencial é recuperado. O traçado (c) mostra a queda acentuada do potencial elétrico induzida pela adição de citrinina ( $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) após a captação do  $\text{Ca}^{2+}$ . Portanto, a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias criou um ambiente propício a uma despolarização total pela citrinina, a qual foi totalmente impedida pela presença de CsA ( $0,5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), como pode ser verificado a partir da observação do traçado (d). Este resultado confirma a necessidade de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial para a indução da transição de permeabilidade pela citrinina e indica que ela realmente ocorre por um mecanismo sensível a CsA, sugerindo, portanto, a formação do poro. Porém, o fato do efeito da citrinina não ser impedido por DTT, como mostrado na figura 8, indica que o mecanismo de sua ação é bastante peculiar, posto que não foram encontrados exemplos de ação idêntica entre os agentes conhecidos como indutores de MTP.

Apesar de ainda não estar totalmente definida a natureza e a regulação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, PETRONILLI *et al.*, (1994) propõem que o potencial elétrico da membrana mitocondrial, por um mecanismo sensível a voltagem, regula este poro, bem como é modulado pelo estado redox de ditióis. Desta forma, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio pode oxidar grupos sulfidrílicos específicos, induzindo a abertura do poro de transição de permeabilidade, porém nestes casos a proteção



por BHT, catalase e DTT, ocorre além daquela proteção conferida por CSA. Entretanto, existem evidências de que na ausência de espécies reativas de oxigênio, a MTP pode ser induzida por reagentes ditióis tais como ácido 4,4'-diisotiocianatostilbene-2,2'-dissulfônico (DIDS) que é  $\text{Ca}^{2+}$  dependente (BERNARDES *et al.*, 1994). Segundo KOWALTOWSKI & VERCESI (1999) a habilidade do  $\text{Ca}^{2+}$  em mobilizar grupos sulfidrílicos de proteína mitocondrial estimularia sua reatividade com DIDS. Esta alteração de permeabilidade induzida pelo DIDS envolve a produção de ligações ditióis cruzadas ocorrendo formação de agregados proteicos e, portanto, neste aspecto sua ação difere daquela da citrinina. Embora, mostrado neste trabalho que a transição de permeabilidade induzida pela citrinina não envolve a formação de agregados proteicos (figura 9), o fato do DTT causar um aumento da velocidade e da extensão do inchamento mitocondrial (Figura 7) induzido por citrinina, pode sugerir que o nível de exposição desses grupamentos seja, também, importante para a indução do fenômeno pela citrinina.



**Figura 11. Efeito da CsA sobre o colapso do potencial elétrico de membrana induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  e citrinina.**

Mitocôndrias de fígado de rato ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram adicionadas em um meio contendo: D-manitol  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , Hepes  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,2, rotenona  $5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  e succinato  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  (Suc) e Pi  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ . O potencial de membrana foi avaliado pela presença de safranina O  $10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  em presença de: (a) citrinina  $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$  e (b)  $\text{Ca}^{2+}$   $10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ , como indicado pela seta. As linhas tracejadas representam a adição de citrinina após a captação do  $\text{Ca}^{2+}$ , (c) citrinina  $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ , (d) citrinina  $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$  na presença de CsA  $0,5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

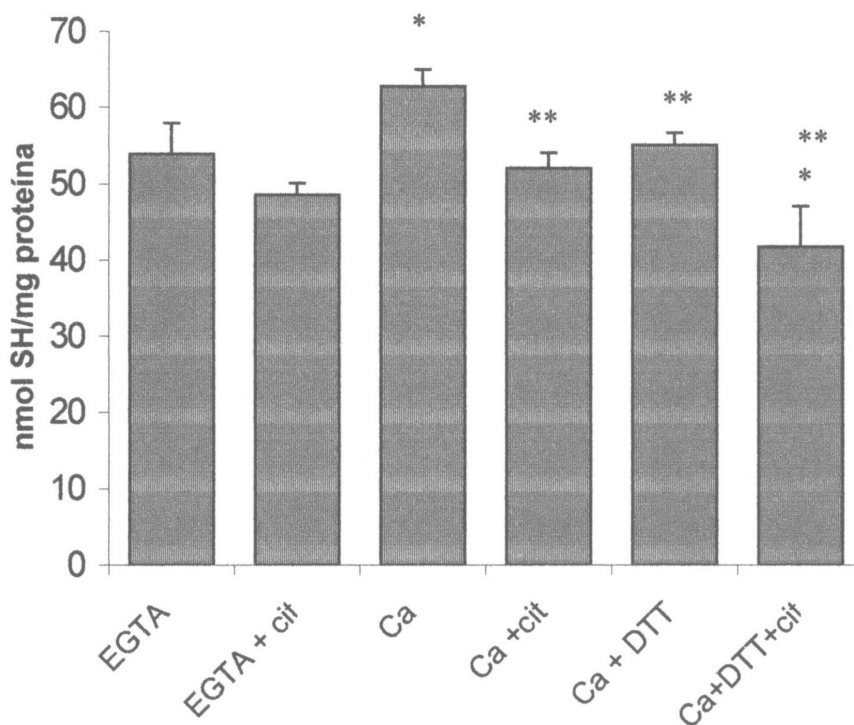
#### **4.1.4 Importância dos níveis de exposição de grupos sulfidrílicos de proteínas de membrana mitocondrial na transição de permeabilidade induzida por citrinina**

KOWALTOWSKI *et al.* (1997) observaram, em mitocôndrias desenergizadas, que o  $\text{Ca}^{2+}$  induz alterações na reatividade de grupos sulfidrílicos, provavelmente por ligar-se a sítios na membrana mitocondrial interna promovendo extensiva alteração na conformação das proteínas de membrana resultando na mudança da localização dos grupos sulfidrílicos. Com a finalidade de verificar a reatividade desses frente a citrinina, foram desenvolvidos experimentos em que a dosagem dos grupos sulfidrílicos de proteínas de membrana mitocondrial foi realizada após incubação da organela em condições desenergizadas, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , DTT e citrinina. Os experimentos controles incluíram a adição de EGTA. Os resultados estão apresentados na figura 12. A situação do controle foi realizada na presença de EGTA, a adição de citrinina ( $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) sobre esta situação não exerceu efeito estatisticamente significativo, quanto ao nível de exposição de grupos sulfidrílicos. A presença de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), promoveu um aumento de 17% do nível de exposição de grupos sulfidrílicos mitocondriais quando comparado com EGTA ( $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). Este aumento embora discreto, foi estatisticamente significativo. Verifica-se ainda que esta exposição dos grupos sulfidrílicos mitocondriais causado pelo  $\text{Ca}^{2+}$  não foi visualizada na presença de DTT ( $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) ou de citrinina ( $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). Quando DTT e citrinina foram adicionados juntos, a dosagem de grupos sulfidrílicos foi inferior aquela obtida nas demais situações contendo  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes resultados permitem algumas especulações. Considerando que o DTT reduz as ligações dissulfeto e mantém os pares ditióis no estado reduzido por sua interação direta a estes grupamentos, a diminuição do nível de grupos sulfidrílicos observada neste experimento poderia ser explicada pela ligação deste reagente aos grupos expostos pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . O mesmo raciocínio poderia ser utilizado para explicar a ação da citrinina; contudo, a possibilidade da citrinina oxidar estes grupamentos, ou ainda a possibilidade destes dois

reagentes impedirem a interação do  $\text{Ca}^{2+}$  nos sítios da membrana que levam ao aumento da exposição de -SH também não pode ser descartada. As proteínas estão inseridas tanto em regiões mais hidrofóbicas quanto nas regiões hidrofílicas da membrana e a interação destes reagentes com a bicamada lipídica pode influenciar na exposição dos grupos sulfidrílicos. É importante destacar que, sendo a citrinina lipossolúvel, a proposta de sua interação em regiões hidrofóbicas é pertinente.

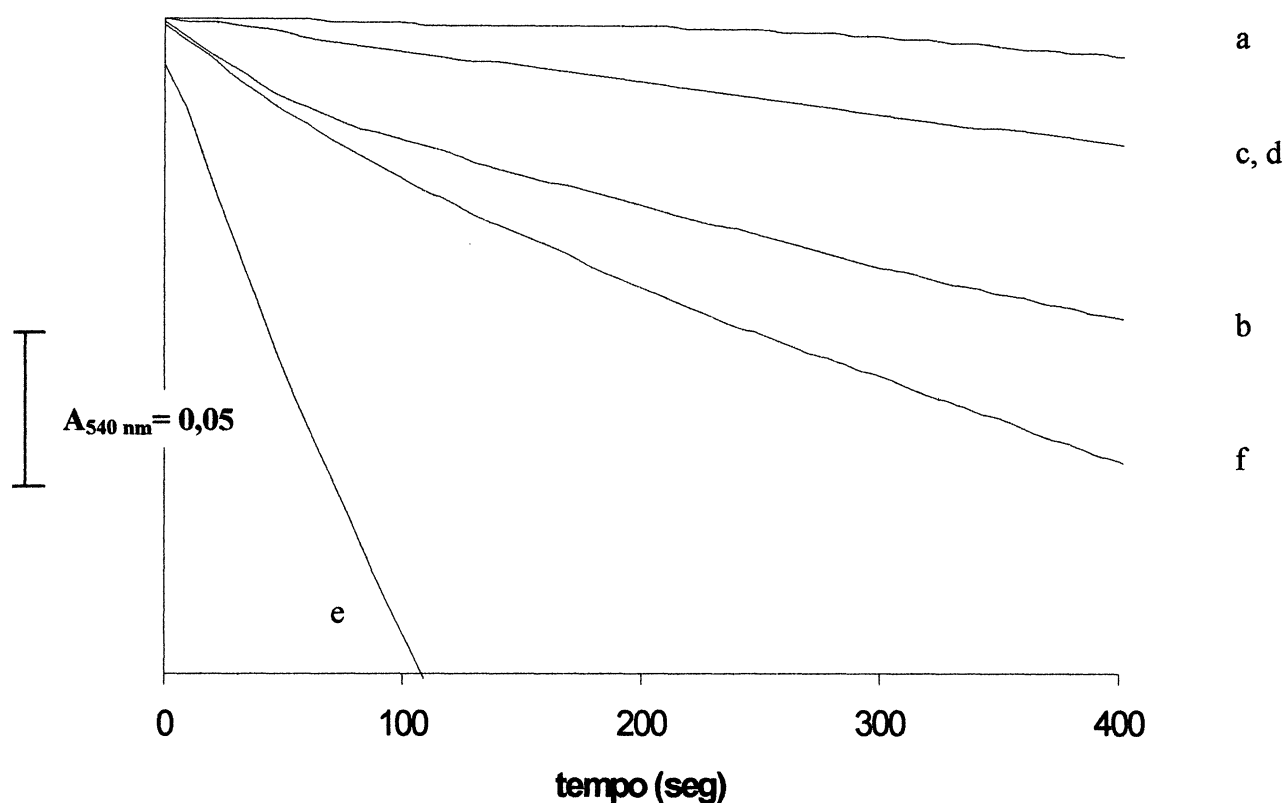
Reagentes capazes de interagir com grupos sulfidrílicos de regiões hidrofóbicas, como a *N*-etilmaleimida (NEM), e hidrofílicas como o mersalil, são conhecidos protetores de transição de permeabilidade, quando em baixas concentrações (PETRONILLI *et al.*, 1994; KOWALTOWSKI *et al.*, 1997). Considerando os resultados mostrados na figura 12 em que a citrinina alterou a exposição de grupos sulfidrílicos induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , experimentos de inchamento mitocondrial, utilizando NEM e mersalil seriam úteis, com a finalidade de explorar se o efeito da micotoxina direciona-se a alteração de grupos sulfidrílicos em alguma região específica da bicamada. Os resultados de tais experimentos estão mostrados na figura 13, onde o traçado (a) representa o controle onde adicionou-se apenas o  $\text{Ca}^{2+}$  ( $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). A ausência de inchamento era esperada nesta condição posto que nenhum agente indutor foi adicionado. O traçado (b) desta figura mostra a adição de citrinina ( $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) na suspensão mitocondrial previamente incubada com  $\text{Ca}^{2+}$  ( $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Neste caso um acentuado inchamento da organela foi observado, confirmando as observações anteriores deste trabalho. Os traçados (c) e (d) desta figura são representativos de experimentos em que as mitocôndrias pré-incubadas com  $\text{Ca}^{2+}$  ( $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foram tratadas com NEM ou mersalil ( $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  para ambos os reagentes). Observa-se que a presença desses reagentes não induz inchamento extensivo das organelas. Em contraste, os traçados (e) e (f) mostram que quando a citrinina está presente no sistema  $\text{Ca}^{2+}$ , a adição de NEM (traçado e) ou de mersalil (traçado f), o efeito da citrinina é potencializado sendo mais drástico quando na

presença de NEM. Estes resultados são singulares porque nestas concentrações NEM e mersalil são usados como agentes de proteção, o que não foi observado neste trabalho. Por outro lado, embora os resultados indiquem o provável envolvimento de grupos sulfidrílicos no efeito da citrinina, não é possível até aqui concluir se estes seriam de regiões mais hidrofóbicas ou hidrofílicas, posto que o inchamento observado foi importante na presença dos dois reagentes, embora mais drástico com NEM, que interage, como já mencionado, nas regiões mais hidrofóbicas da membrana. Portanto, experimentos de interação da micotoxina com a bicamada lipídica seriam relevantes para esclarecer esta questão.



**Figura 12 . Efeito da citrinina sobre dosagem de grupamentos sulfidrílicos de proteínas de membrana mitocondrial.**

Mitocôndrias de fígado de rato ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram incubadas nas mesmas condições descritas na figura 7. As adições indicadas na figura tiveram as seguintes concentrações: EGTA  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$   $500 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ , citrinina  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , DTT  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Os valores representam a média de três experimentos  $\pm$  S.D. \* Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) do controle (EGTA). \*\* Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) da condição na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .



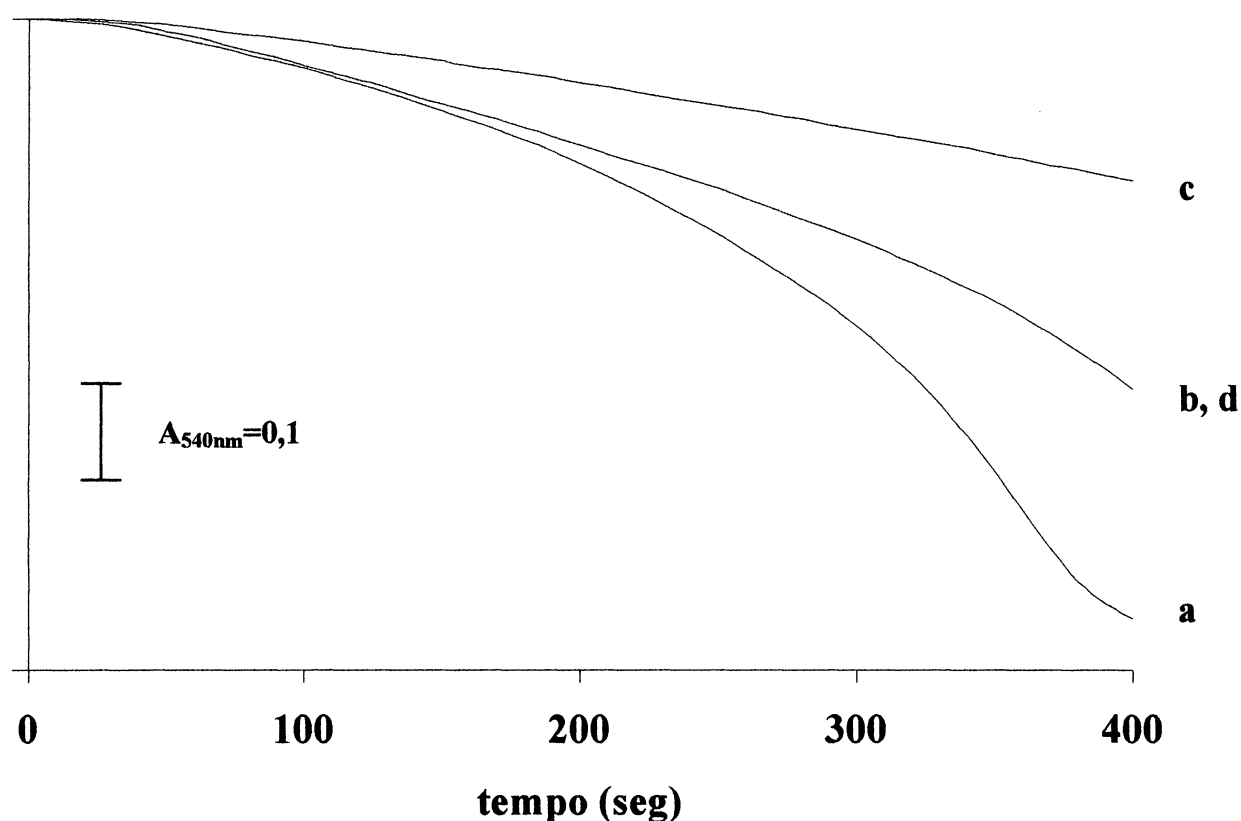
**Figura 13. Efeito da NEM e Mersalil sobre o inchamento mitocondrial causado por  $\text{Ca}^{2+}$  mais citrinina.**

Mitocôndrias de fígado de rato foram incubadas nas mesmas condições descritas na figura 7, suplementado com  $\text{Ca}^{2+}$  500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (a). O traçado (b) representa o inchamento mitocondrial causado pela adição de citrinina 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  sobre a suspensão mitocondrial pré-incubada por 2 minutos com  $\text{Ca}^{2+}$  500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os reagentes sulfidrílicos Mersalil 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e NEM 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  foram adicionados, respectivamente, a suspensão mitocondrial juntamente com  $\text{Ca}^{2+}$  500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  obtendo-se o traçado (c) e (d). Os traçados (e) e (f) representam a mesma situação que (c) com adição de citrinina 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  após 2 minutos de pré-incubação Mersalil e  $\text{Ca}^{2+}$  (f) e NEM e  $\text{Ca}^{2+}$  (e). Todos os traçados são representativos de, no mínimo, 5 experimentos independentes.

Considerando a dualidade dos efeitos da NEM em relação a transição de permeabilidade mitocondrial, isto é, um efeito protetor em baixas concentrações (abaixo de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e um efeito indutor em altas concentrações (PETRONILLI *et al.*, 1994; ZORATTI & SZABÒ, 1995; COSTANTINI *et al.*, 1998), uma ação sinérgica poderia ocorrer na transição de permeabilidade, na presença de um composto com um mecanismo de ação semelhante. Como a citrinina demonstrou induzir transição de permeabilidade mitocondrial em concentrações variando de  $0,1$  a  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  (DALOCE, 1995), poder-se-ia supor a possibilidade da micotoxina atuar como um agente protetor em concentrações mais baixas. Esta possibilidade foi verificada em experimentos de inchamento mitocondrial em que este foi induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  e Pi, utilizando-se mitocôndrias energizadas pelo substrato. Esta condição experimental é interessante porque o Pi constitui-se no desencadeante da MTP, evitando-se o uso concomitante de outros agentes indutores e, neste caso, o efeito de baixas concentrações de citrinina pode ser observado.

A figura 14 mostra o resultado de experimentos em que o inchamento mitocondrial em condição energizada foi induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e Pi ( $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). O traçado a da figura 14 é representativo da condição controle e é semelhante ao descrito por KOWALTOWSKI *et al.* (1996). Os traçados (b) e (c) desta figura foram obtidos na presença de citrinina ( $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e ( $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), respectivamente. Verifica-se que, dentro desta faixa de concentração, a citrinina inibiu o inchamento mitocondrial de maneira dose dependente. Entretanto, a adição de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de citrinina não foi mais eficiente do que a proteção conferida pela concentração de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  da micotoxina. Como a citrinina, nestas concentrações, não possui efeito sobre a bioenergética mitocondrial (dados não mostrados), a dualidade de efeitos da citrinina, como indutora de MTP em altas concentrações e protetora em baixas concentrações, fica caracterizada.





**Figura 14. Efeito da citrinina sobre o inchamento mitocondrial causado por  $Ca^{2+}$  na presença de Pi.**

Mitocôndrias de fígado de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, rotenona 5 µmol.L<sup>-1</sup> e succinato 3 mmol.L<sup>-1</sup> suplementados com  $Ca^{2+}$  10µmol.L<sup>-1</sup> e Pi 1,5 mmol.L<sup>-1</sup> em todos os traçados. (a) sem adição de citrinina. Nos traçados (b), (c) e (d) citrinina, nas concentrações 10 µmol.L<sup>-1</sup>, 25µmol.L<sup>-1</sup> e 50 µmol.L<sup>-1</sup> foi adicionada, respectivamente, sempre antes da adição de  $Ca^{2+}$  e Pi. Todos os traçados são representativos de, no mínimo, 5 experimentos independentes.

## **4.2 Interação da citrinina com a bicamada fosfolipídica**

### **4.2.1 Efeito da citrinina sobre a polarização de fluorescência das sondas 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno-ácido propiônico (DPH-PA) incorporadas em lipossomas de dimiristoil-fosfatidil colina (DMPC)**

Compostos lipossolúveis distribuem-se em regiões hidrofóbicas de membranas ou em sítios proteicos nela inseridos, podendo afetar funções como a difusão lateral de proteínas, a qual é importante para o acoplamento de unidades catalíticas de enzimas bem como para a ligação de íons bivalentes na superfície da membrana (GOLDSTEIN, 1984). Além disso, é bem conhecido que a interação com a bicamada lipídica é de fundamental importância para que alguns fenóis, como os flavonóides exerçam sua capacidade protetora na lipoperoxidação (SAIJA *et al.* 1995).

Considerando as evidências de que a citrinina pode interagir em regiões da bicamada lipídica, modificando a reatividade de grupos sulfidrílicos, dependente de  $Ca^{2+}$ , nas proteínas nela inseridas, experimentos que permitissem avaliar a interação da micotoxina na bicamada lipídica sem a interferência das proteínas seriam relevantes. Com tal finalidade uma avaliação da interação da citrinina com membranas artificiais foi realizada, utilizando lipossomas multilamelares constituídos de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC). Perturbações na organização da bicamada lipídica podem ser induzidas por variação de temperatura, bem como por vários agentes químicos levando a alterações do perfil de transição da cadeia acil. A transição do lipídeo, por ação da temperatura, envolve a passagem do estado gel para o líquido cristalino. Durante a fase gel, as cadeias acil estão em forma altamente ordenada. Tal organização exige que todas as ligações carbono-carbono (C-C) estejam na conformação trans. Já no estado de líquido cristalino, algumas ligações C-C estão na conformação “gauche” (JAIN & WU, 1977).

A medida da polarização de fluorescência (P) emitida por sondas localizadas em diferentes regiões da membrana reflete a mobilidade destas sondas no ambiente hidrofóbico. As sondas imobilizadas numa membrana rígida e excitadas por luz polarizada emitem fluorescência que é polarizada paralela ou perpendicularmente a luz excitante. Um decréscimo na polarização de fluorescência desta sonda é uma medida de desordem da bicamada onde a mesma está inserida (GOLDSTEIN, 1984). As sondas utilizadas neste trabalho foram a 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e seu derivado 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno-ácido propiônico (DPH-PA). A sonda DPH fica localizada numa região mais hidrofóbica da membrana, enquanto a sonda DPH-PA fica ancorada próxima à região polar da bicamada devido ao seu grupamento ácido propiônico. Desta forma, informações sobre regiões diferentes da bicamada podem ser obtidas a partir de P, isto é, um alto grau de polarização (P) representa uma alta ordem estrutural ou uma baixa fluidez de membrana.

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

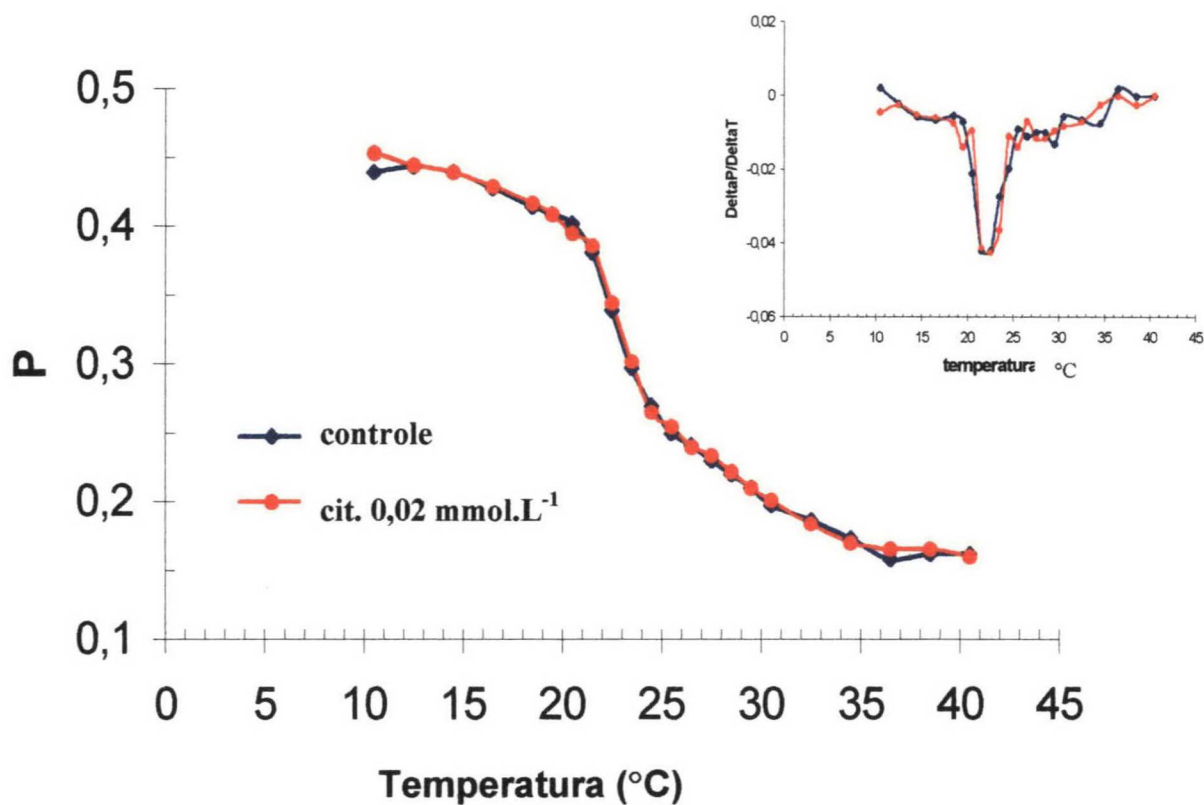
- a) a conformação “gauche” entre as ligações C-C é mais provável quanto mais afastado está o carbono do grupo carboxil em direção ao final metil do ácido graxo. Tanto acima como abaixo da temperatura média de transição ( $T_m$ ) a porção da cadeia hidrocarbonada próxima do centro da bicamada é mais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

- c) a forma da transição térmica de fase resulta da interação altamente cooperativa entre as moléculas de lipídeo. Portanto, o tamanho da unidade cooperativa que sofre transição é regulado pela interação na região C<sub>1</sub> e C<sub>9</sub> das cadeia acil;
- d) quando o perfil de transição de fase de uma bicamada lipídica é modificado por um aditivo, isto significa que o aditivo perturba a organização da bicamada. O tipo de perturbação é indicado pela forma do perfil de transição.

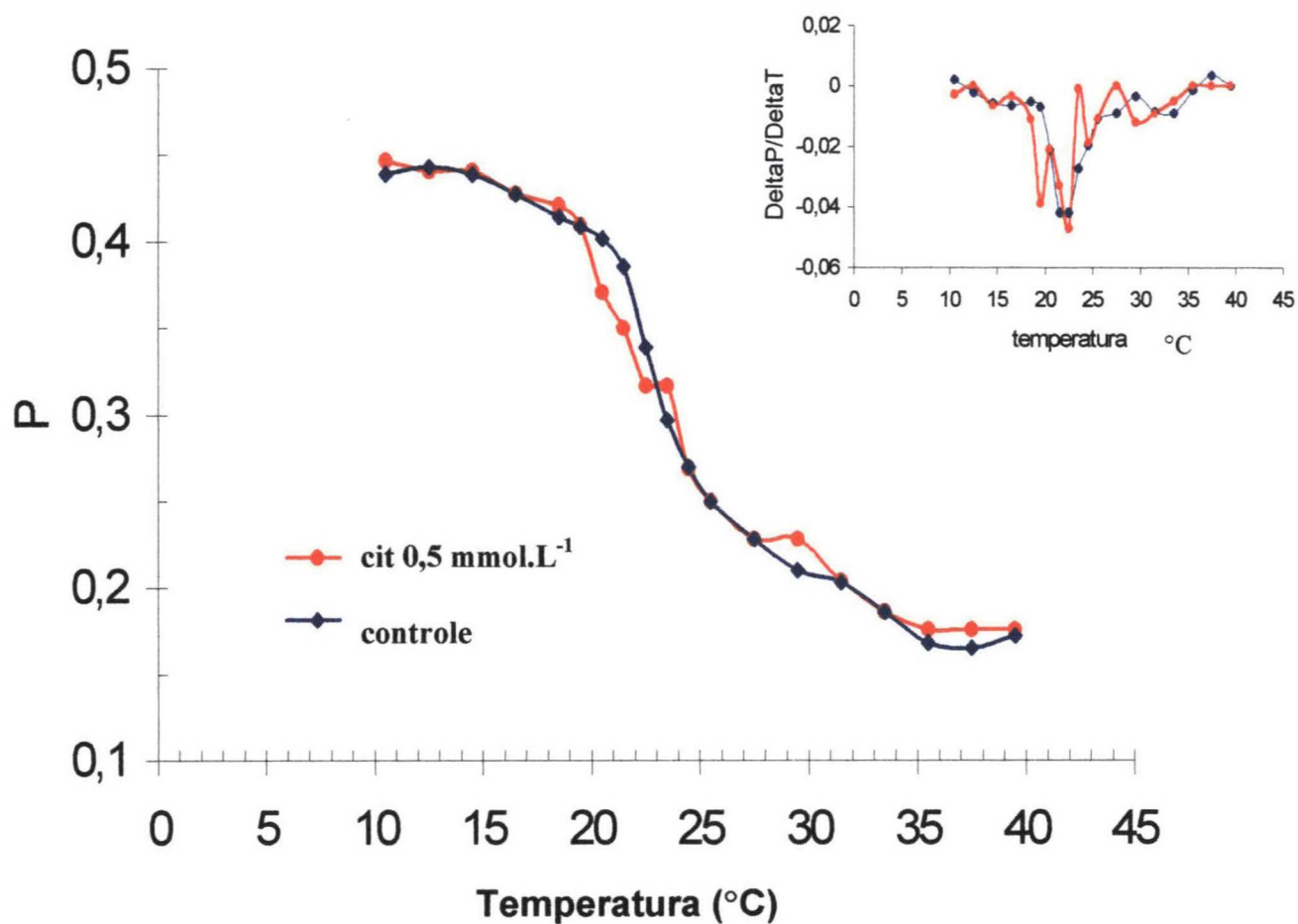
Neste estudo, o traçado da transição de fase, dependente da temperatura, será denominado de perfil termotrópico.

A figura 15 mostra o perfil termotrópico obtido quando as preparações contendo a sonda DPH, foram tratadas com citrinina (0,02 – 0,75 mmol.L<sup>-1</sup>). A temperatura média de transição de fase (T<sub>m</sub>), determinada para esta sonda, nos experimentos controle (ausência de citrinina), foi estimada em 23,5 °C, valor semelhante ao descrito por outros autores que utilizaram esta mesma metodologia (ANTUNES-MADEIRA *et al.*, 1991; 1995). Esta T<sub>m</sub> corresponde à temperatura na qual os fosfolipídeos passam do estado de gel para o de líquido-cristalino. Abaixo da T<sub>m</sub> as cadeias acil dos ácidos graxos estão empacotadas de forma ordenada, o que restringe o movimento das sondas, resultando em altos valores de P. Acima da T<sub>m</sub> as cadeias acil dos ácidos graxos estão desordenadas e possuem uma maior liberdade de movimento, permitindo, assim, que as sondas também se movimentem com maior facilidade, o que resulta em valores mais baixos de P.

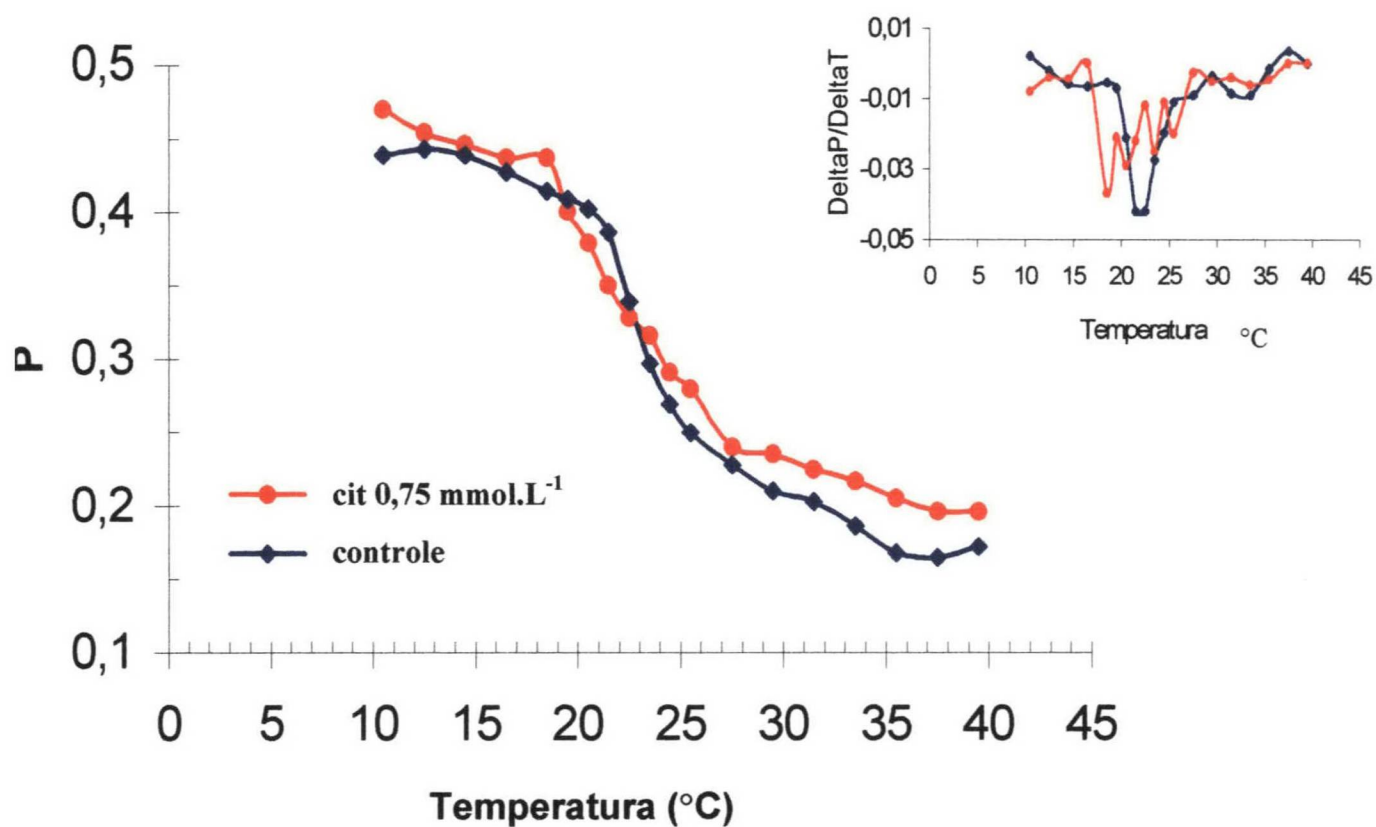
Como pode ser observado na figura 15 (A), a incorporação de citrinina 20 µmol.L<sup>-1</sup> não modificou os valores de P, nem o perfil termotrópico dos lipossomas de DMPC-DPH. O efeito de concentrações maiores de citrinina como 0,5 e 0,75 mmol.L<sup>-1</sup>, pode ser observado nas figuras 15 (B) e (C) respectivamente.



**FIGURA 15 A.** Efeitos da citrinina ( $0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH. O encarte representa a polarização diferencial do DPH ( $\Delta P/\Delta T$ ) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 3. 10. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.



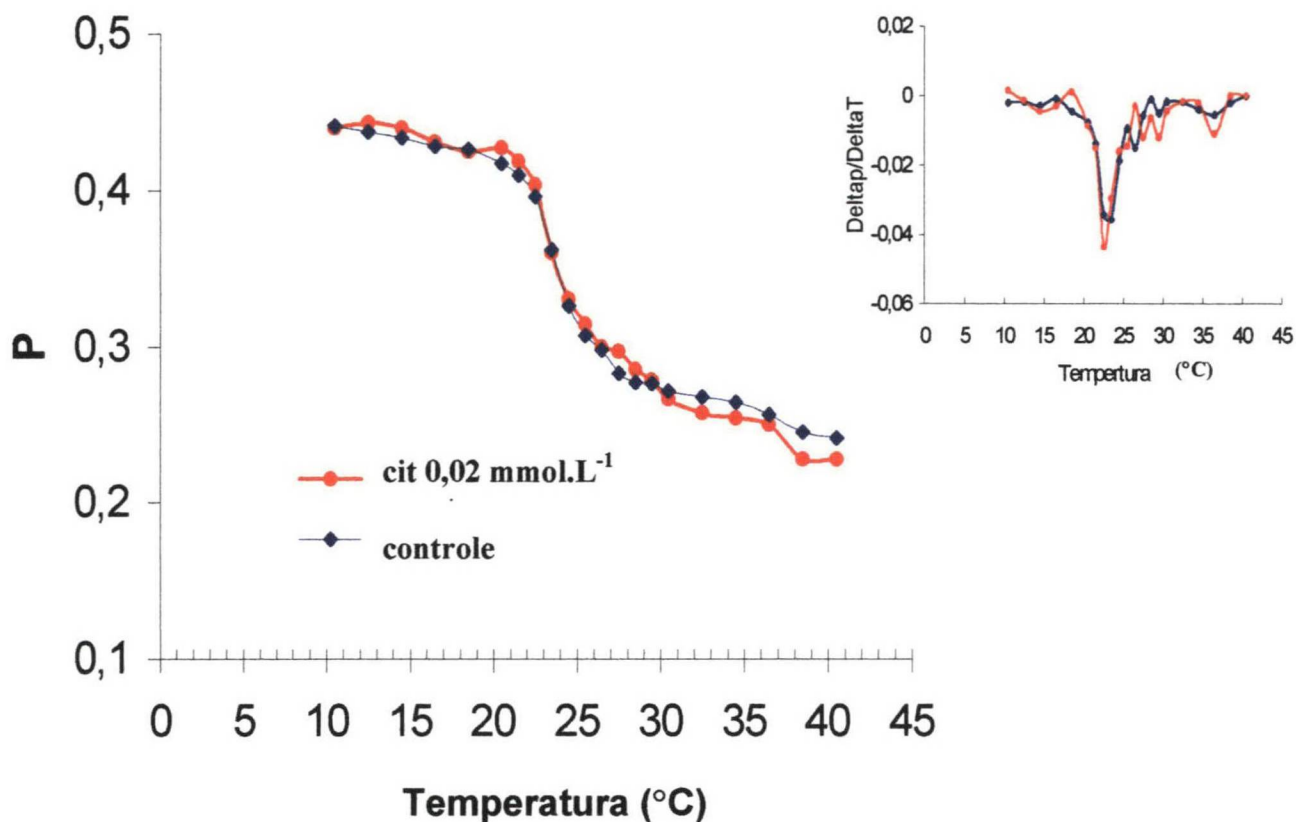
**FIGURA 15 B** Efeitos da citrinina ( $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH. O encarte representa a polarização diferencial do DPH ( $\Delta P/\Delta T$ ) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, ítem 3.10. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.



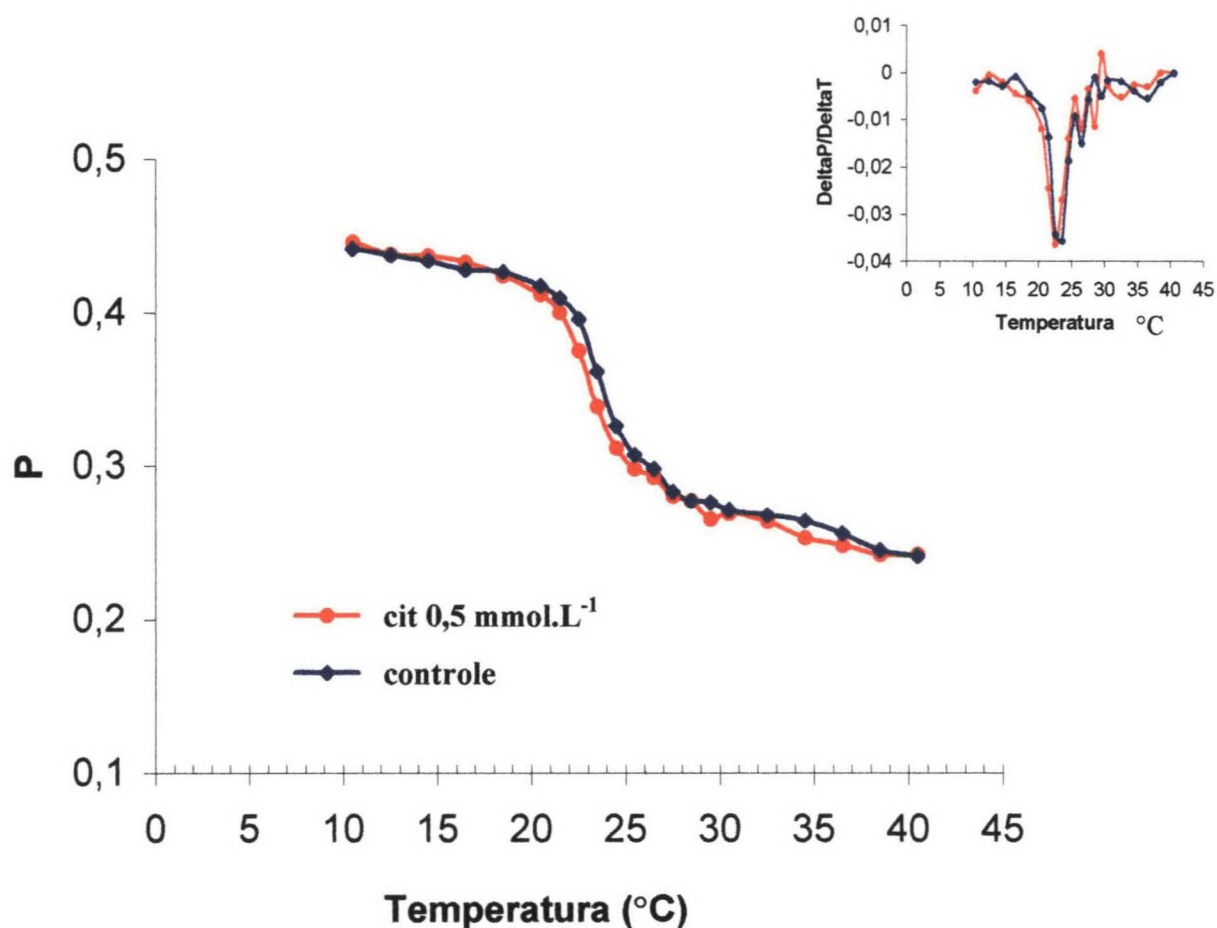
**FIGURA 15 C.** Efeitos da citrinina ( $0,75 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH. O encarte representa a polarização diferencial do DPH ( $\Delta P/\Delta T$ ) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, ítem 3.10. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

Verifica-se que nas concentrações  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  (figura 15 B), embora não se tenha observado alteração no valor da  $T_m$ , o perfil termotrópico altera-se pela presença da micotoxina. Esta alteração foi evidente nas temperaturas abaixo da  $T_m$  sugerindo que a micotoxina desorganize as estruturas no estado de gel, conforme observado pela diminuição dos valores de  $P$ . Além disso, o perfil termotrópico sugere uma antecipação do início da fase de transição. Outra evidência favorável aos aspectos aqui discutidos pode ser inferido a partir da observação do gráfico obtido pelo cálculo de  $\Delta P/\Delta T$  (encarte) onde os múltiplos picos observados quando a citrinina está presente indicariam que a preparação lipossomal tornou-se menos homogênea. Na concentração de  $0,75 \text{ mM}$  de citrinina (figura 15 C), a modificação do perfil termotrópico torna-se mais evidente. Considerando as características da sonda utilizada, marcadora na região mais hidrofóbica da membrana, um aumento dos valores de  $P$  acima da  $T_m$  indica um efeito condensante da citrinina nesta região, diminuindo a mobilidade da sonda DPH. As mesmas concentrações de citrinina não interferiram em nenhum dos parâmetros avaliados nos lipossomas DMPC com a sonda DPH-PA (figura 16 A-C), indicando não haver alteração significativa na região mais hidrofílica da cadeia acil pela incorporação da citrinina, nas concentrações indicadas. Este resultado sugere que a citrinina altera a fluidez de membranas agindo numa região mais hidrofóbica das bicamadas lipídicas. A interação da citrinina na região hidrofóbica da cadeia acil poderia interferir na função das proteínas constitutivas de membrana, embora a possibilidade de uma interação direta com proteínas hidrofóbicas não possa ser descartada. Assim, tanto o efeito indutor de transição de permeabilidade por altas concentrações de citrinina quanto o efeito protetor em baixas concentrações, pode envolver a inserção de citrinina nas regiões hidrofóbicas da membrana. Os resultados aqui demonstrados fortalecem a proposição de que os resultados obtidos na indução da MTP por citrinina e NEM, já discutidos e mostrados na figura 13, sejam consequência da interação da micotoxina nas regiões mais hidrofóbicas.

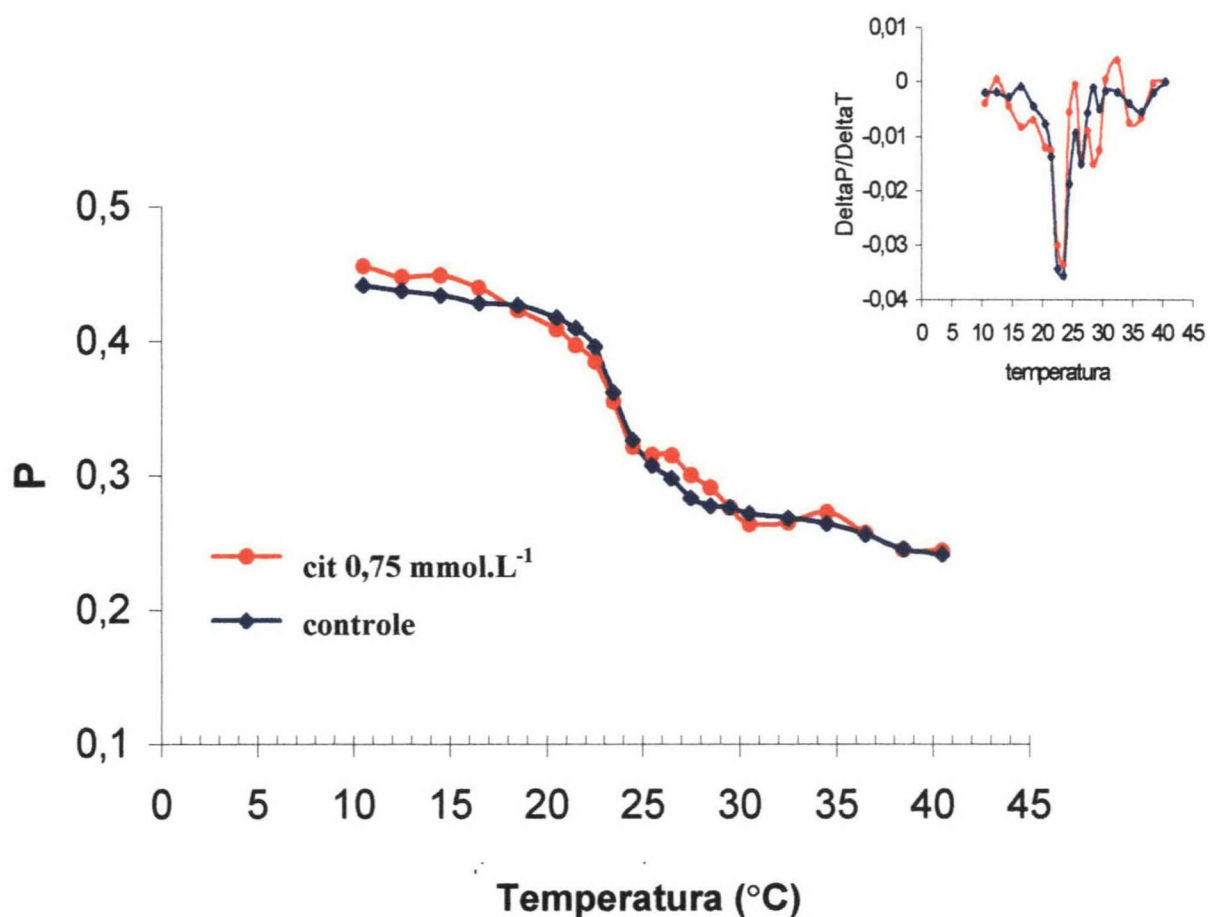




**FIGURA 16 A.** Efeitos da citrinina ( $0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH-PA. O encarte representa a polarização diferencial do DPH-PA ( $\Delta P/\Delta T$ ) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, ítem 3.10. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.



**FIGURA 16 B.** Efeitos da citrínina ( $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência (P) de DPH-PA. O encarte representa a polarização diferencial do DPH-PA ( $\Delta P/\Delta T$ ) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, item 3.10. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.



**FIGURA 16 C.** Efeitos da citrinina ( $0,75 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) na transição termotrópica de fase de bicamadas de DMPC, determinado por polarização de fluorescência ( $P$ ) de DPH-PA. O encarte representa a polarização diferencial do DPH-PA ( $\Delta P/\Delta T$ ) em função da temperatura. As condições experimentais estão descritas na seção de Materiais e Métodos, ítem 3.10. Os valores representam o perfil de quatro experimentos independentes.

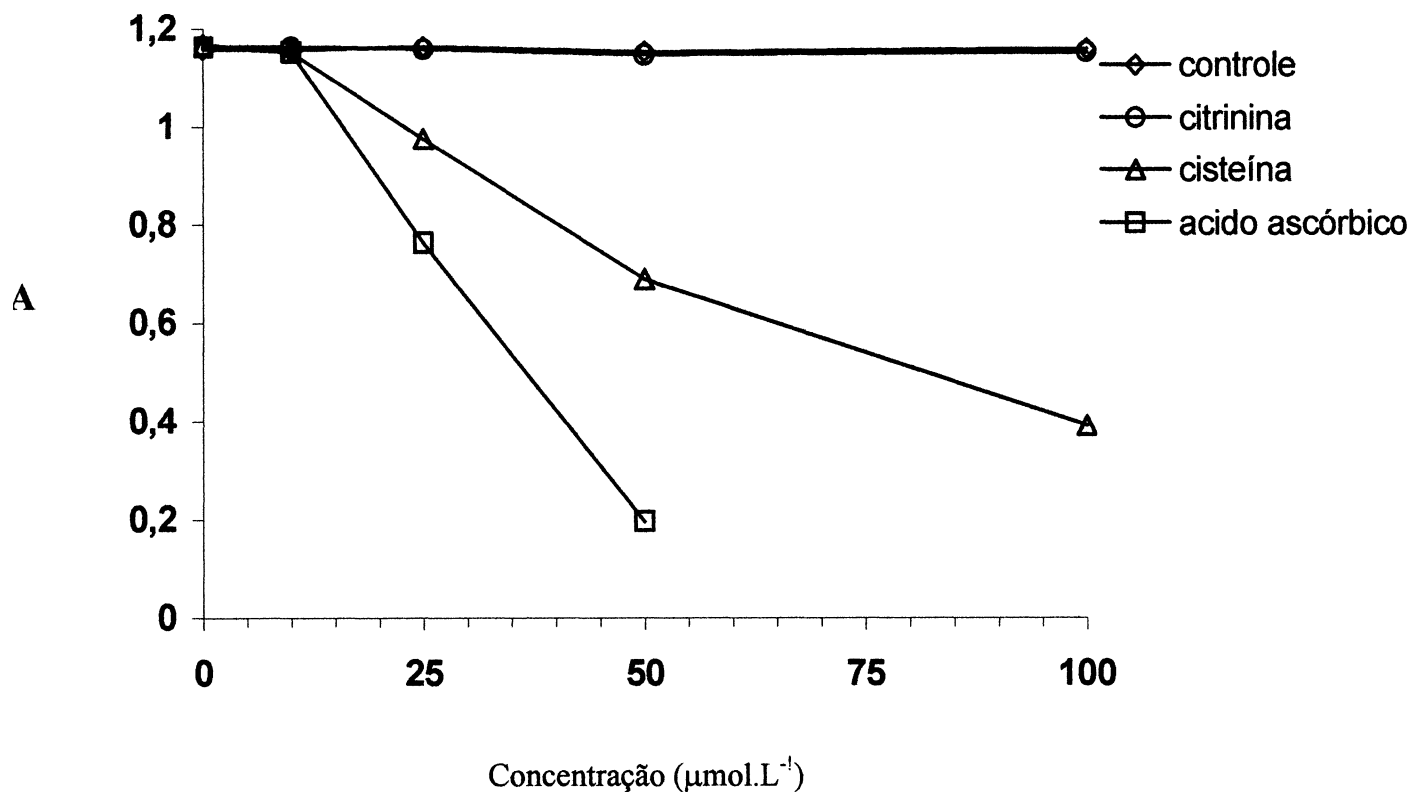
### **4.3 Propriedades químicas relacionadas com a inibição da lipoperoxidação ferro-induzida pela citrinina**

#### **4.3.1 Interação da citrinina com o radical livre DPPH**

Os resultados obtidos nos experimentos anteriores mostraram uma interação da citrinina com regiões mais hidrofóbicas da membrana. Neste efeito de interação com a bicamada lipídica, as características estruturais de uma substância são importantes na manifestação de propriedades interferentes em processos oxidativos, por exemplo, durante a lipoperoxidação ou manifestação da MPT, estimulando-as ou protegendo-as. Neste aspecto, pode-se citar compostos fenólicos, tais como os flavonóides, que agem como antioxidantes e apresentam penetração na bicamada lipídica. Em adição, a habilidade destes compostos em quelar ferro e doar átomos de hidrogênio, dos seus grupamentos hidroxilas, para os radicais livres (MOREL, 1993; SAIJA *et al.*, 1995; FERRALI *et al.*, 1997; VAN ACKER *et al.*, 1998) constituem mecanismos importantes para a inibição de reações de lipoperoxidação ferro-induzida, bem como para a inibição da MPT pelos flavonóides (SANTOS *et al.*, 1998).

Quanto a esta questão um importante efeito protetor sobre a lipoperoxidação ferro-induzida foi relatado para a citrinina (RIBEIRO *et al.*, 1998). Assim um aprofundamento desta questão era necessário, face aos efeitos da micotoxina sobre a MPT, mostrados neste trabalho, ora como um indutor da MPT (figuras 7, 8, 10 e 13), ora como protetor (figura 14) em função da condição experimental. A citrinina é classificada quimicamente como uma quinona (GEIGER, 1946; HARAGUCHI *et al.*, 1989; SCOTT, 1994), e como tal poderia participar de reações envolvendo radicais livres, doando ou recebendo elétrons. A possibilidade da citrinina atuar como doadora de elétrons, foi avaliada através da análise da sua interação com o radical livre estável difenilpicrilhidrazil (DPPH). O DPPH pode aceitar um elétron ou um radical hidrogênio convertendo-se em uma molécula diamagnética estável (BLOIS, 1958). Devido ao seu elétron desemparelhado, o DPPH possui uma absorção forte

em 517 nm, a qual decresce estequiometricamente em relação ao número de elétrons captados (BLOIS, 1958). A mudança de absorvância produzida nesta reação é muito usada para avaliar a habilidade de moléculas agirem como “sequestradoras” de radical, como a cisteína e o ácido ascórbico livre (DINIS *et al.*, 1994), os quais foram utilizados, neste trabalho, como controle positivo e para uma comparação dos efeitos da citrinina. Os resultados de tais experimentos estão mostrados na figura 17. Nesta figura a redução do DPPH por crescentes concentrações de ácido ascórbico e cisteína, é visualizada como decréscimo da sua absorvância a 517 nm. A citrinina não reagiu com DPPH em concentrações até  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , demonstrando que não possui a propriedade de doar elétrons ao radical livre.



**Figura 17. Efeito da citrulina sobre o radical livre DPPH**

A redução do DPPH foi avaliada pelo decréscimo da absorvância a 517 nm, como função da concentração de citrulina e antioxidantes conhecidos (cisteína e ascorbato). O sistema de reação contendo 1 ml de tampão acetato  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 5,5, 1 ml de etanol, e 0,5 ml de solução etanólica de DPPH  $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os valores de absorvância (A) foram obtidos após 5 min. da reação.

### 4.3.2 Caracterização do complexo ferro-citrinina

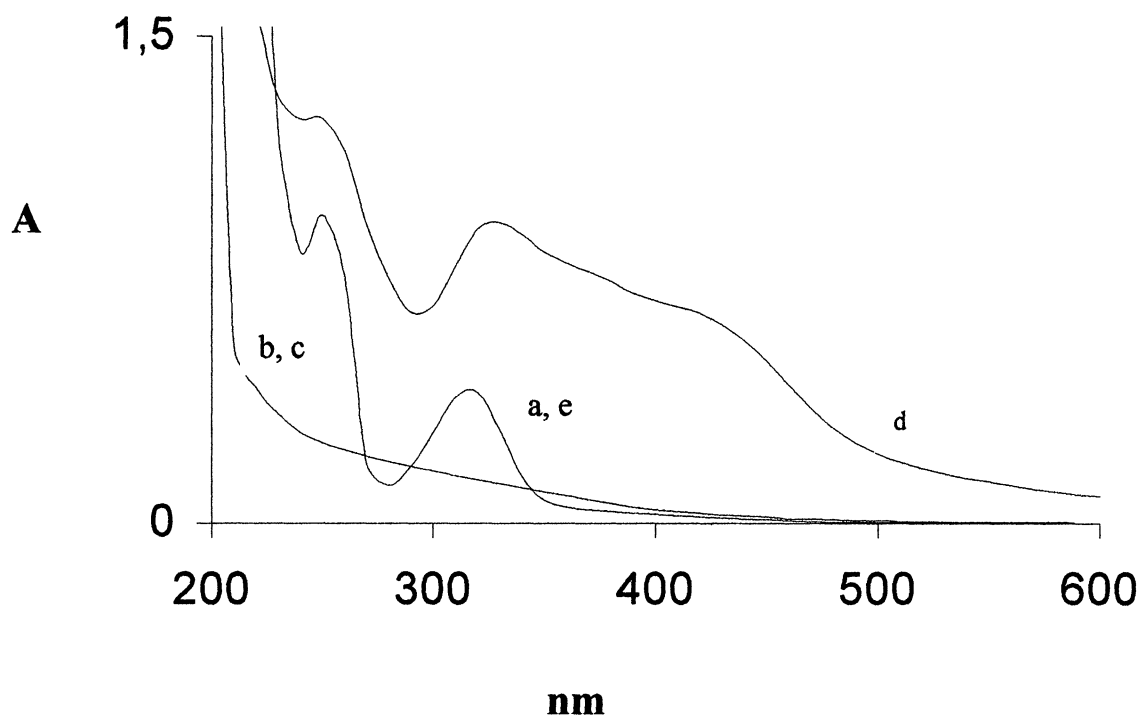
Os resultados dos experimentos anteriores excluíram a possibilidade da citrinina interagir com radicais livres, doando elétrons. Considerando que as condições experimentais descritas por RIBEIRO *et al.* (1998) envolveram íons ferro ( $\text{ADP}/\text{FeCl}_3$ ) na indução da lipoperoxidação, e ainda, que o efeito inibidor da citrinina sobre este fenômeno foi revertido pela adição de  $\text{Fe}^{3+}$ , a hipótese de uma interação entre a micotoxina e estes íons foi avaliada neste trabalho. A abordagem experimental envolveu análises espectrofotométricas e de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

A habilidade da citrinina em quelar ferro foi inicialmente avaliada através das modificações em seu espectro de absorção entre 200 e 600 nm, na ausência e presença de  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ . O traçado (a) da figura 18 mostra o espectro da citrinina com picos de absorção máxima em 222, 253 e 319 nm, característicos desta micotoxina (KROGH, 1978). Deve-se enfatizar que tanto  $\text{Fe}^{2+}$  quanto  $\text{Fe}^{3+}$  em solução, não possuem absorção nesta faixa de comprimentos de onda, conforme pode ser observado nos traçados (b) e (c) desta figura. Quando  $\text{Fe}^{3+}$  foi adicionado a solução contendo citrinina, um novo cromógeno foi rapidamente produzido, conforme pode ser observado a partir do aumento da absorbância entre 319 a 500 nm, visualizado no traçado (d). Este cromógeno deve ser consequência da formação de um complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -citrinina. O traçado (e) mostra que nenhuma modificação espectral foi induzida pela adição  $\text{Fe}^{2+}$  a solução de citrinina, sugerindo que a micotoxina quela  $\text{Fe}^{3+}$  diretamente. Ressalta-se que o espectro da citrinina na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  não modificou-se no decorrer de 20 minutos, indicando também que a citrinina não oxida o  $\text{Fe}^{2+}$ . A fim de melhor avaliar a interação da citrinina com íons ferro, particularmente com  $\text{Fe}^{2+}$ , experimentos na presença de agentes complexantes preferencialmente de  $\text{Fe}^{2+}$  seriam úteis. Neste trabalho utilizou-se a ferrozina, um conhecido agente de complexação do  $\text{Fe}^{2+}$  (DINIS *et al.* 1994) usado para ensaios de competição. O complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina forma um

cromógeno com absorção em 562 nm, que é proporcional à concentração do complexo. A presença de agentes capazes de competir pela ligação do  $\text{Fe}^{2+}$ , diminui a concentração do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina que pode ser registrada. Nos experimentos mostrados na figura 19, o EDTA, um reagente que promove a rápida oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (TIEN *et al.*, 1982), foi incluído como um controle positivo. A presença de citrinina não interfere na formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina, como pode ser concluído a partir da observação dos valores de A; similares na presença ou ausência de citrinina. Este resultado tanto exclui uma interação de alta afinidade da citrinina com o íon ferroso, quanto a possibilidade de que a micotoxina possa, a exemplo do EDTA oxidar o  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ .

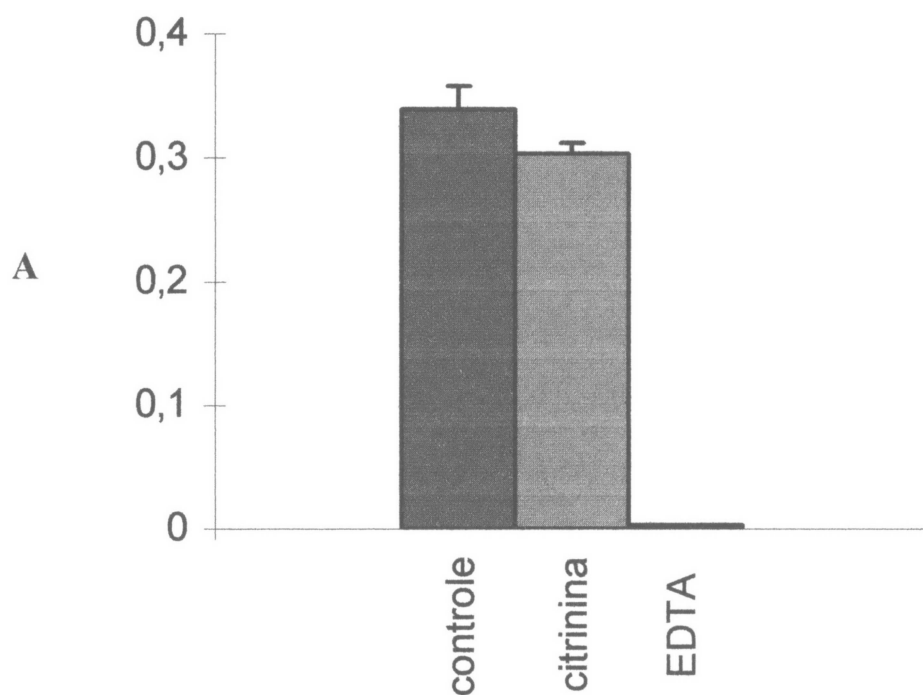
Considerando a importância da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) na determinação de complexos de  $\text{Fe}^{3+}$  em soluções aquosas (BRYSON, 1978) e as evidências de que a citrinina pode interagir de forma específica com este íon, estudos de EPR foram desenvolvidos. Para a perfeita compreensão dos resultados obtidos nesses estudos, deve-se saber que íons  $\text{Fe}^{3+}$  hidratados apresentam um espectro de EPR característico com uma única linha muito larga e com amplitude relativamente baixa. A largura de linha pode ser consideravelmente diminuída e a amplitude aumentada pela mudança no ambiente do íon por complexação. A largura de linha ( $\Delta H_{pp}$ ) da absorção de  $\text{Fe}^{3+}$  apresentou 2500 G, situação que pode ser observada no traçado (a) da figura 20. Com a adição de concentrações crescentes de citrinina na solução de  $\text{Fe}^{3+}$  a fim de se obter relações de  $[\text{Fe}^{3+}]:[\text{citrinina}]$  iguais a 1:1, 1:2 ou 1:3, ocorreu uma diminuição progressiva na largura de linha para 450 G (Figura 20 b), 340 G (Figura 20 c) e 256 G (Figure 20 d) respectivamente. O encarte na Figura 20 mostra uma relação linear da relação de concentração  $[\text{citrinina}]:[\text{Fe}^{3+}]$  e o logaritmo da diminuição da largura de linha ( $\log \Delta H_{pp}$ ). Estes resultados indicam que a citrinina age como um ligante de íons  $\text{Fe}^{3+}$  formando complexos  $[\text{Fe}^{3+}]:[\text{citrinina}]$  iguais a 1:1, 1:2 ou 1:3.





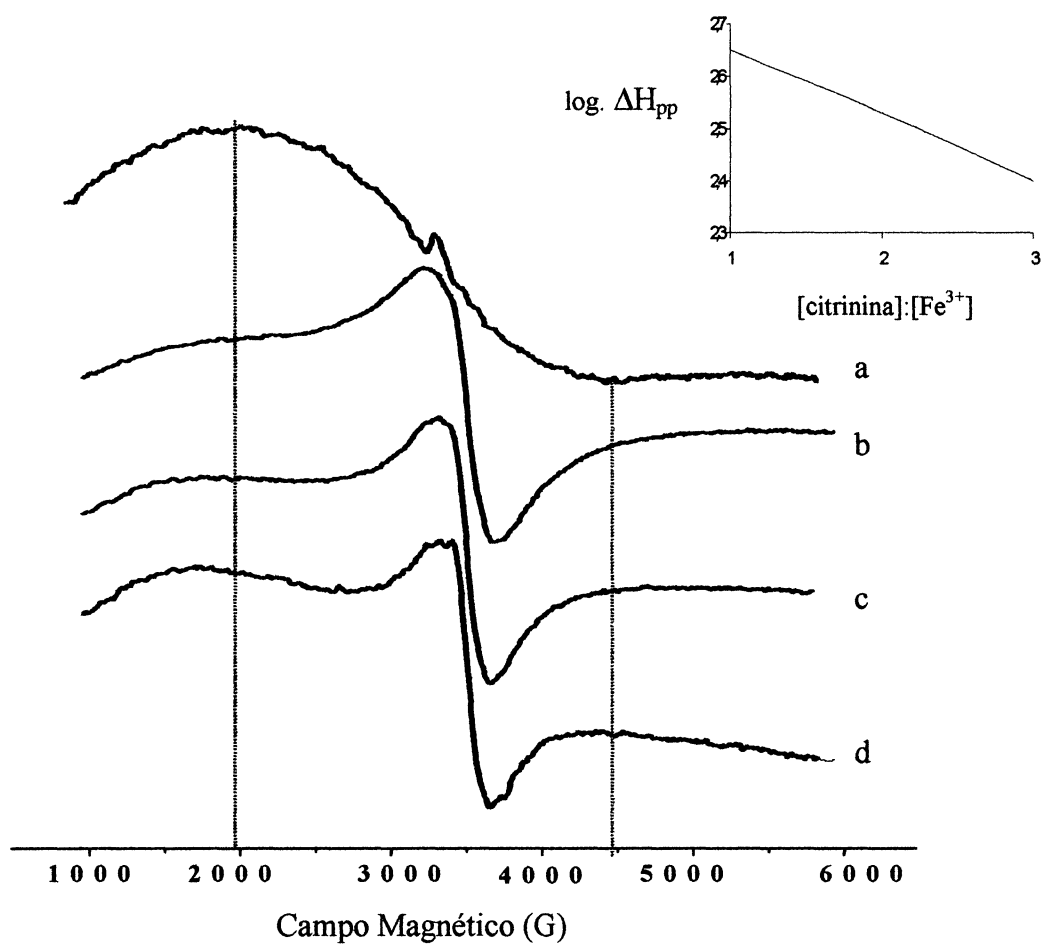
**Figura 18. Espectro de absorção da citrinina na presença dos íons  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$**

Os espectros foram realizados em solução de  $\text{NaCl}$   $150 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH}$  7,4 e representam: (a) citrinina  $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ , (b)  $\text{FeSO}_4$   $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$  e (c)  $\text{FeCl}_3$   $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A curva (d) representa a adição de  $\text{Fe}^{3+}$  e (e) adição de  $\text{Fe}^{2+}$  sobre citrinina.



**Figura 19 . Efeito da citrinina sobre a formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina**

A formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina na ausência (controle) e presença da citrinina foi avaliada a 562 nm em meio contendo acetato de amônio 5%, pH 6,9, sulfato ferroso amoniacal  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , ferrozina, citrinina e EDTA na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os valores representam a média  $\pm$  SD de três experimentos individuais.



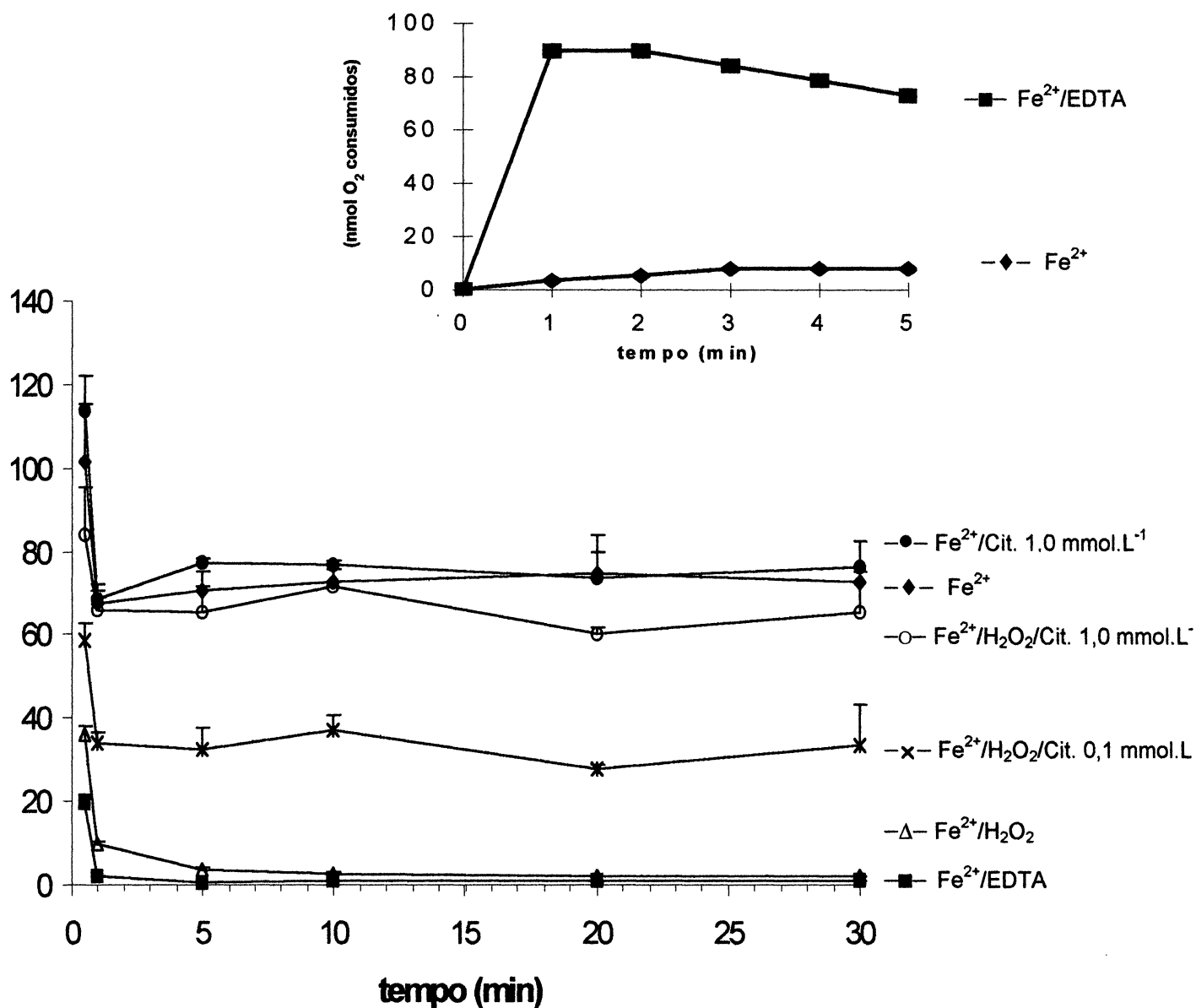
**Figura 20. Efeito da citrinina sobre o espectro de EPR do íon  $\text{Fe}^{3+}$**

O espectro (a) corresponde a uma solução aquosa de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$   $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Os espectros (b), (c) e (d) representam adição de solução aquosa de citrinina  $10$ ,  $20$  e  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$  sobre  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$   $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , respectivamente. A relação água:álcool foi mantida  $1:3$  em todos os espectros. Encarte: Plote do logaritmo de  $\Delta H_{pp}$  vs. relação  $[\text{citrinina}]:[\text{Fe}^{3+}]$ .

### 4.3.3 Efeito da citrinina sobre a oxidação de $\text{Fe}^{2+}$ e redução de $\text{Fe}^{3+}$

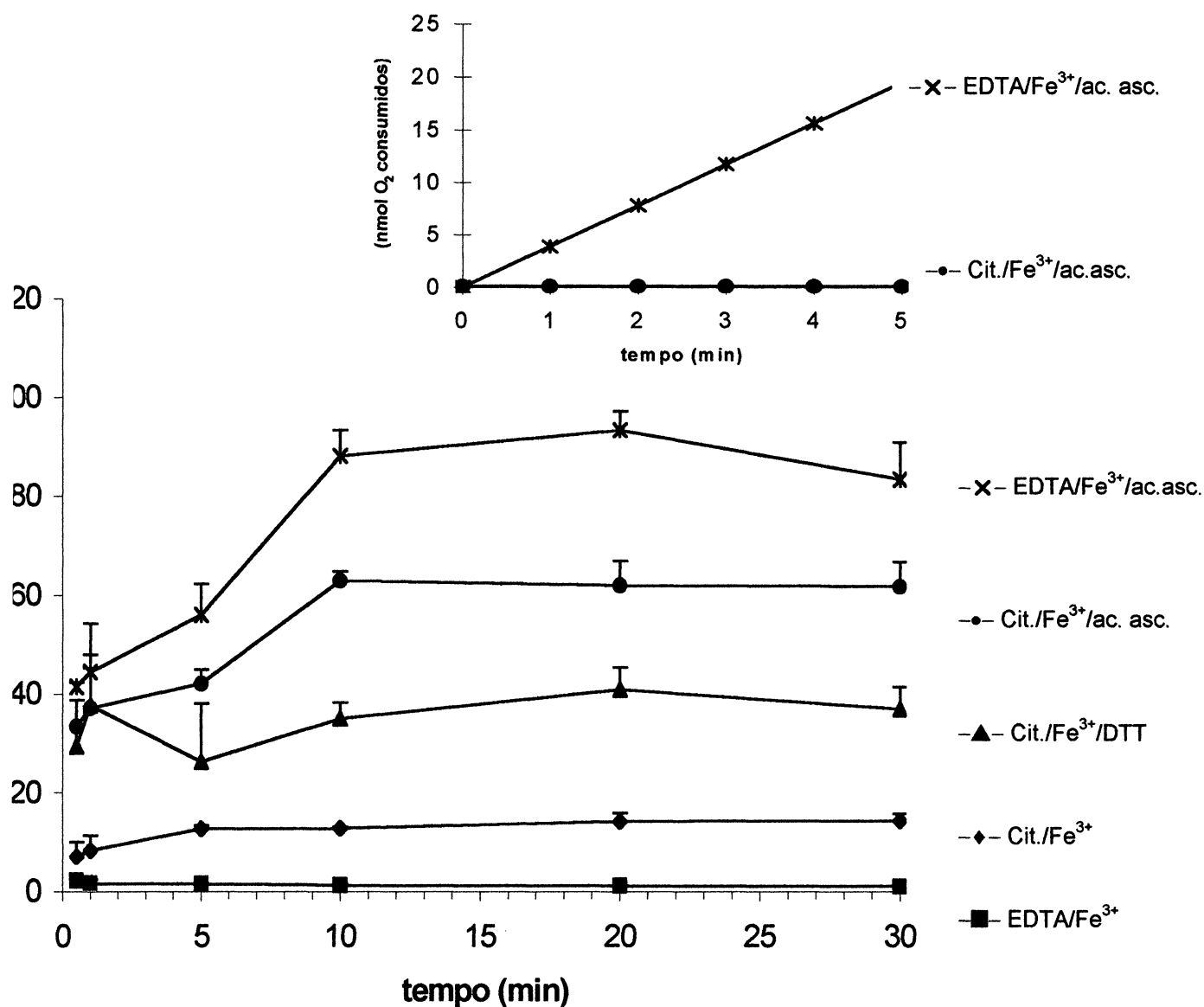
A velocidade e extensão da oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  e redução de  $\text{Fe}^{3+}$  foram avaliadas por espectrofotometria do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -o-fenantrolina (Figuras 21 e 22) e através da medida do consumo de oxigênio (encarte na Figura 21 e 22). De acordo com TIEN *et al.* (1982), próximo a pH 7,0 a velocidade de auto-oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  livre em solução de NaCl é muito lenta. Nestas condições, a quelação do  $\text{Fe}^{2+}$  por EDTA causa um grande aumento na velocidade de auto-oxidação deste íon, bem como a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (MINOTTI & AUST, 1987). Considerando que o oxigênio dissolvido é utilizado como um oxidante na auto-oxidação dos quelatos de  $\text{Fe}^{2+}$ , medidas de consumo de oxigênio são usadas como ferramentas para monitorar este fenômeno. A figura 21 mostra a rápida oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e EDTA, ambos na concentração de  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A citrinina em concentrações de  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  ou  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  não afetou a velocidade de auto-oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$ , mas inibiu de forma dose dependente a velocidade de oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O encarte na Figure 21 mostra que um rápido consumo de oxigênio ocorre devido a auto-oxidação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA. A Figura 22 mostra a redução dos complexos  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA e  $\text{Fe}^{3+}$ -citrinina por ácido ascórbico e DTT. Comparando aos experimentos controle ( $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA) a adição de ácido ascórbico  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  ao complexo resulta na redução do  $\text{Fe}^{3+}$  que é acompanhada por um concomitante consumo de  $\text{O}_2$  mostrado no encarte desta figura. Este consumo de  $\text{O}_2$  é resultante da auto-oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  formado no processo. A adição de ácido ascórbico ao complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -citrinina também promoveu redução do  $\text{Fe}^{3+}$ , porém sem consumo de  $\text{O}_2$ , reforçando o observado no experimento anterior em que a citrinina não alterou a velocidade de auto-oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$ . O agente redutor DTT não causou a redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA (não mostrado), porém, o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -citrinina foi reduzido por DTT (figura 22). Isto sugere que a ligação  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA é mais forte que  $\text{Fe}^{3+}$ -citrinina. Em conjunto, os resultados mostram que a citrinina atua como um ligante

de íons  $\text{Fe}^{3+}$  formando complexo redox inerte, o que justificaria os resultados de RIBEIRO *et al.* (1998) referentes a inibição da lipoperoxidação ferro-induzida.



**Figura 21. Efeito da citrinina, EDTA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a oxidação de Fe<sup>2+</sup>.**

O sistema de incubação era composto de NaCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7.4), FeSO<sub>4</sub> 0.1 mmol.L<sup>-1</sup>, citrinina 1.0 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0.2 mmol.L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mmol.L<sup>-1</sup>. As reações foram iniciadas pela adição de Fe<sup>2+</sup>. Nos tempos indicados foi adicionada *o*-fenantrolina 1 mmol.L<sup>-1</sup> às amostras após 10 min a 25 °C foi realizada leitura a 530 nm. As concentrações de Fe<sup>2+</sup> foram calculadas como descrito em Materiais e Métodos. Encarte: O consumo de oxigênio foi medido com um eletrodo em solução de Hepes 5 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7.4, 28 °C) contendo reagentes com as mesmas concentrações usadas no ensaio com *o*-fenantrolina.



**Figura 22 . Efeito de agentes redutores sobre Fe<sup>3+</sup>-EDTA e Fe<sup>3+</sup>-citrinina.**

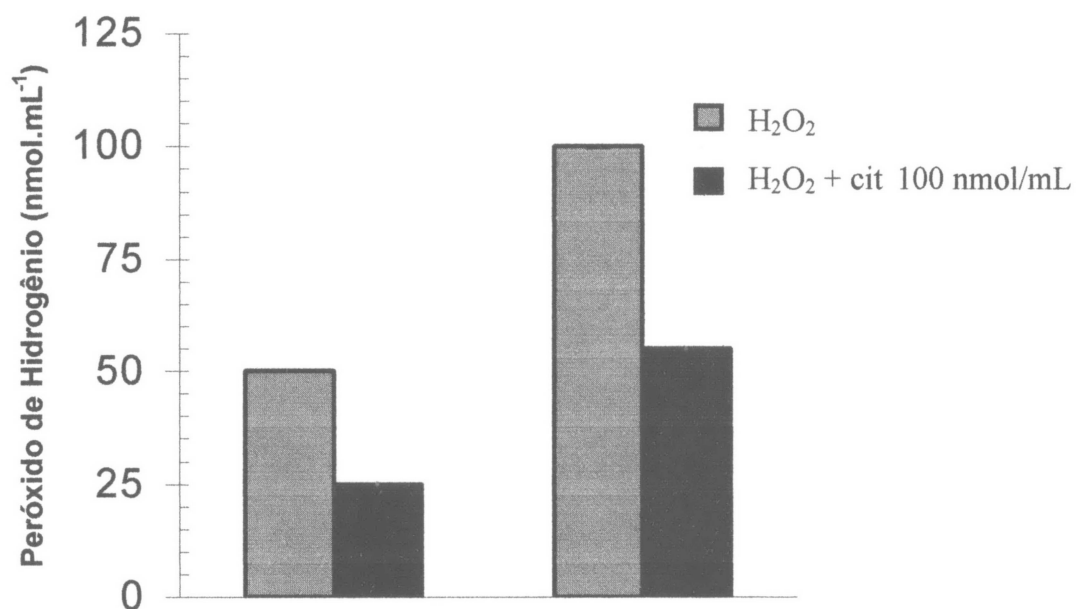
Ácido ascórbico 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ou DTT 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  foram adicionados a soluções contendo NaCl 150  $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7.4) e citrinina 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  mais Fe<sup>3+</sup> 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ou EDTA 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  mais Fe<sup>3+</sup> 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . A redução de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> foi quantificada usando a reação com a *o*-fenantrolina como descrito na figura anterior. Encarte: O consumo de oxigênio foi medido com eletrodo seguindo a adição de ácido ascórbico 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  a uma solução de Hepes 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7.4, 28°C) contendo as mesmas concentrações de reagentes.

#### 4.3.4 Dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e determinações espectrais da citrinina após sua incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Considerando a importância da reação de Fenton nos processos de lipoperoxidação, e os resultados mostrando que a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não promove oxidação de Fe<sup>2+</sup> na presença de citrinina, um aprofundamento desta questão é relevante. O impedimento desta oxidação pela presença de citrinina (Figura 21) não pode ser justificado por uma ligação do íon a micotoxina, uma vez que foi demonstrada a pouca afinidade da citrinina por íon ferroso (Figuras 18-20), muito menos por uma capacidade redutora da citrinina sobre o íon férrico. Uma outra possibilidade para explicar esta inibição seria a ocorrência de uma reação entre a citrinina e o peróxido de hidrogênio. Vale destacar os resultados de FOULER *et al.* (1994) demonstrando que a citrinina em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> perde sua atividade tóxica sobre células HeLa, sugerindo que a micotoxina seja detoxificada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Com o objetivo de confirmar uma possível reatividade entre a citrinina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram realizados experimentos de dosagem de peróxido de hidrogênio na presença de citrinina, e de espectrofotometria de ultravioleta e infravermelho da citrinina após sua incubação com peróxido de hidrogênio.

Os resultados apresentados na figura 23 foram obtidos após a incubação de citrinina 100 nmol/mL com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 ou 100 nmol.mL<sup>-1</sup>, isto é em uma relação 2:1 e 1:1 de citrinina: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Verifica-se que a citrinina promoveu a diminuição dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cerca de 50%. Vale destacar que em situações onde a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era inferior a 50 nmoles/mL, suas dosagens não foram afetadas pela incubação com citrinina 100 nmol.mL<sup>-1</sup>. Com a intenção de verificar a formação de um produto da reação ocorrida entre citrinina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, determinações espectrofotométricas na região do ultravioleta (figura 24 A e B) e do infravermelho (figura 25 A e B) foram realizadas.



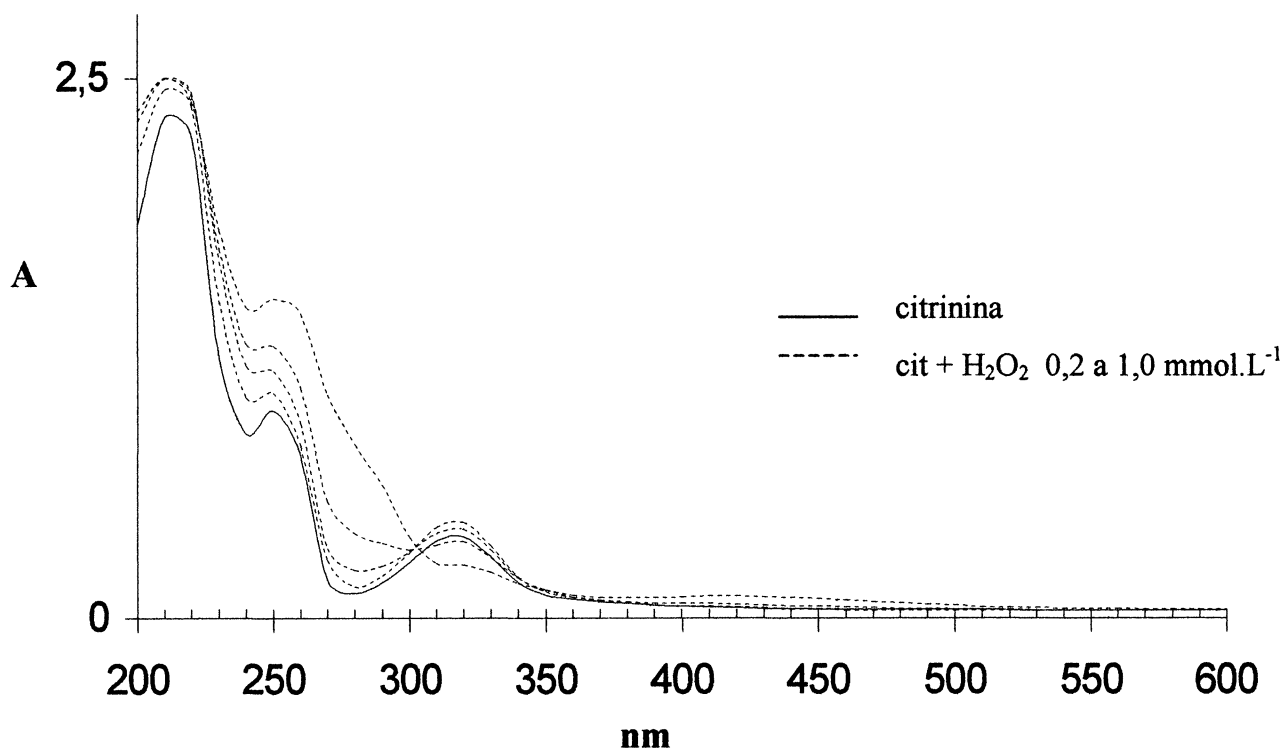


**Figura 23. Dosagem de Peróxido de Hidrogênio**

A dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 e 100 nmol.mL<sup>-1</sup> na ausência e presença de citrinina 100 nmol.mL<sup>-1</sup> foi realizada a 610 nm em meio contendo solução tamponada de vermelho de fenol, NaCl 140 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão fosfato 10 mmol.L<sup>-1</sup>, vermelho de fenol 0,28 mmol.L<sup>-1</sup> (0,1g.L<sup>-1</sup>) e HRPO 10 U.mL<sup>-1</sup>.

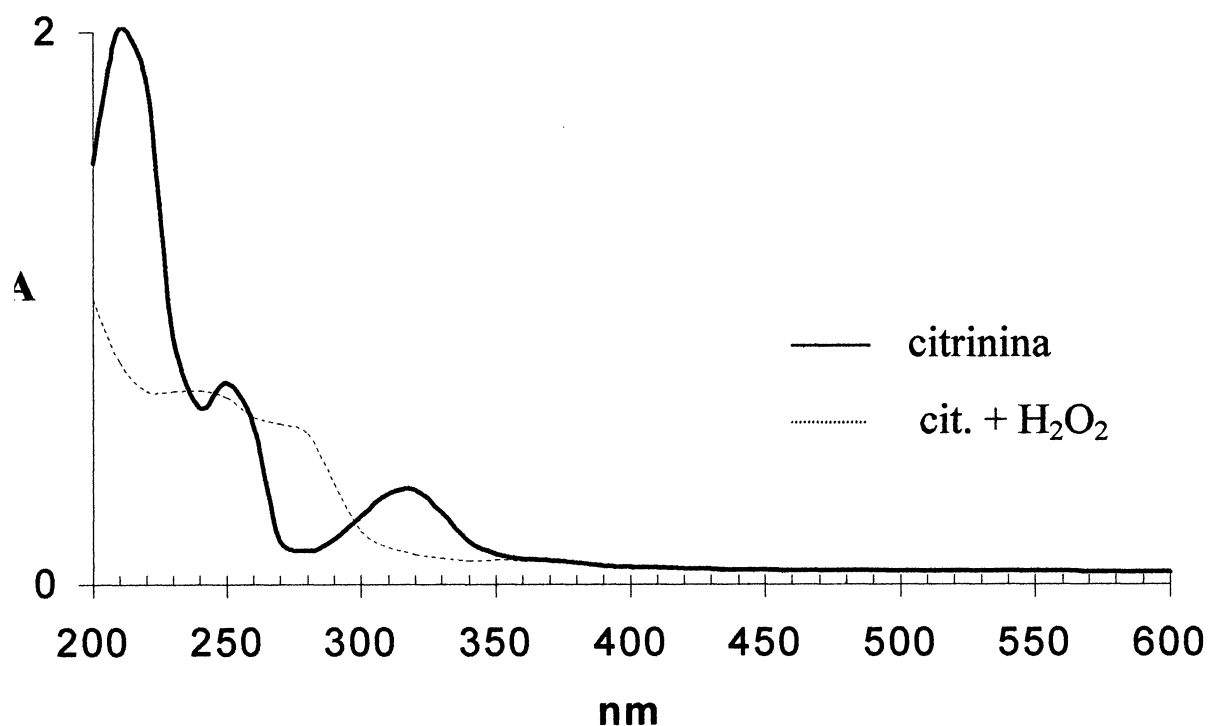
A figura 24 A mostra o espectro da citrinina na região UV/VIS, na presença e ausência (controle) de  $H_2O_2$ . A absorção da luz na região do ultravioleta e do visível depende da estrutura eletrônica da molécula. A posição da absorção corresponde ao comprimento de onda da radiação cuja energia é igual à necessária para que ocorra a transição eletrônica. A região do ultravioleta próximo que se estende de 200 a 380 nm é especialmente interessante, pois nesta região ocorrem as transições eletrônicas dos sistemas conjugados. Assim qualquer grupo funcional com ligação dupla (carboxila, carbonila) ou tripla, provoca fortes bandas de absorção na região do ultravioleta próximo quando estão conjugados com outros grupos (SILVERSTEIN *et al.* 1987). Os picos característicos para a citrinina, com absorções fortes em 222 e 253 nm ( $\epsilon$  8.279), e sua fraca absorção a 319 nm ( $\epsilon$  4.710), resultam do grupo funcional cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada (SILVERSTEIN *et al.* 1987). O espectro de absorção U.V. da citrinina 0,1 mM, foi realizado na ausência e presença de concentrações crescentes de  $H_2O_2$ , variando entre 0,2 e 1 mM, ocorrendo correspondente modificação espectral (Figura 24 A). A modificação basicamente consiste num desaparecimento da absorção a 319 nm com um aumento de absorção numa faixa entre 240 e 280 nm aproximadamente. Considerando que o peróxido de hidrogênio apresenta absorção na região de 230 nm (PICK & KEISARI, 1980), uma mistura de citrinina: $H_2O_2$ , 1:5, foi dessecada e reconstituída em etanol e o espectro correspondente a esta amostra foi desenvolvido. Os resultados apresentados na figura 24 (B) mostra a ausência de absorção a 319nm e um aumento na faixa compreendida entre 240 até 280 nm. Considerando que a  $H_2O_2$  foi excluída do sistema por evaporação, os resultados aqui mostrados indicam realmente uma modificação na distribuição eletrônica da citrinina após sua incubação com  $H_2O_2$ . Embora até aqui não seja conhecida a alteração estrutural ocorrida, a comparação com dados da literatura pode ser útil na explicação deste resultado.

Alguns derivados sintéticos da citrinina compreendem substituição no C-1, como a adição de -H na dihidrocitrinina implicando na aromatização do anel e redução do grupamento cetona para um grupamento hidroxila. Portanto, uma análise do espectro de compostos aromáticos, como o benzeno, pode ajudar a compreender as modificações causadas pelo  $H_2O_2$  na molécula de citrinina. O benzeno apresenta uma banda larga de absorção contendo picos múltiplos (estrutura fina) na região do ultravioleta próximo entre 230 e 270 nm, o pico mais intenso é observado a 230 nm. A substituição no anel com grupos auxocrômicos, como -OH, desloca as absorções para comprimentos de ondas maiores e perda da estrutura fina. Portanto, a reação da citrinina com  $H_2O_2$  pode levar a uma estrutura com distribuição semelhante a que se esperaria encontrar para a dihidrocitrinina (figura 5, R=H; R'=H), um dos produtos de redução de citrinina. Desta forma, espectros realizados na região do infravermelho poderiam dar melhor subsídios para esta questão.



**Figura 24 A. Espectro da citrinina na região do UV/VIS na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

O espectro da citrinina (0,1 mmol.L<sup>-1</sup>) na região do UV/VIS foi realizado em solução aquosa, na ausência (—) e presença (----) de concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As linhas tracejadas representam adições consecutivas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>, com a concentração final no meio variando de 0,2 a 1 mmol.L<sup>-1</sup>.



**Figura 24 B. Espectro da citrinina na região do UV/VIS após incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

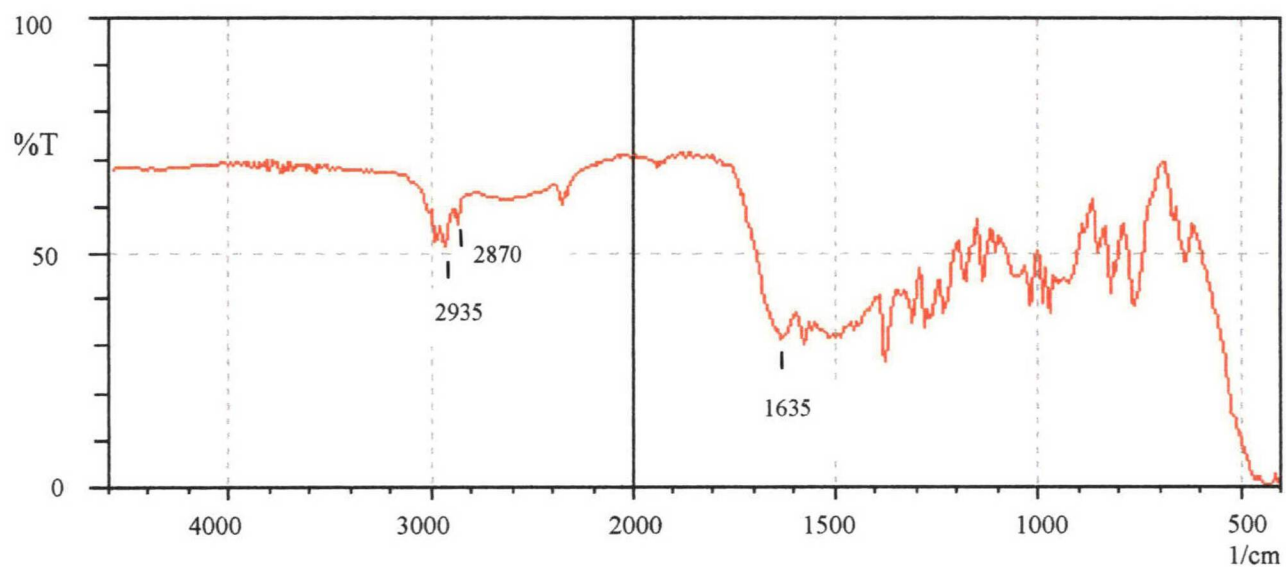
Os espectros da citrinina (—) e da citrinina após incubação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (----), foram realizados em solução aquosa. O apresentado em linha tracejada corresponde a uma amostra de citrinina:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em uma proporção 1:5, após a retirada do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por um processo de secagem em estufa à vácuo e reconstituição do produto em etanol.

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. A porção situada entre  $4.000$  e  $666\text{ cm}^{-1}$  ( $2,5$  a  $15\text{ }\mu\text{m}$ ) é a mais utilizada no auxílio à identificação de compostos orgânicos, nesta região podem ser observadas bandas de vibração-rotação molecular. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos. Embora o espectro no infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença destas bandas que permite a obtenção de informações estruturais, através de exame do espectro e da consulta a tabelas (SILVERSTEIN *et al.*, 1987).

O espectro de infra vermelho da citrinina pode ser observado na figura 25 A, este espectro é semelhante aquele determinado por KOVÁČ e colaboradores (1961). SILVERSTEIN *et al.* (1987) afirmam que as bandas de deformação axial de C=O dos ácidos carboxílicos são consideravelmente mais intensas do que as bandas de deformação axial de C=O cetônico, e que estes grupamentos livres absorvem próximo a  $1760\text{ cm}^{-1}$ . Já os grupamentos hidroxila livres determinam uma absorção intensa na região  $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  característica da distensão O-H.

Portanto, a existência de um grupamento carboxílico na molécula de citrinina determinaria uma absorção na região de  $1.700\text{ cm}^{-1}$ , se este grupamento não estivesse envolvido em uma ou duas pontes de hidrogênio intramoleculares (Figura 2) (KOVÁČ *et al.* 1961). A formação de ponte de hidrogênio interna reduz a frequência da absorção de deformação axial da carbonila (SILVERSTEIN *et al.*, 1987); na molécula de citrinina, esta absorção ocorre em  $1.635\text{ cm}^{-1}$ . Como os dois grupamentos -OH estão envolvidos em interação por ponte de hidrogênio, a banda correspondente a deformação axial de O-H, na

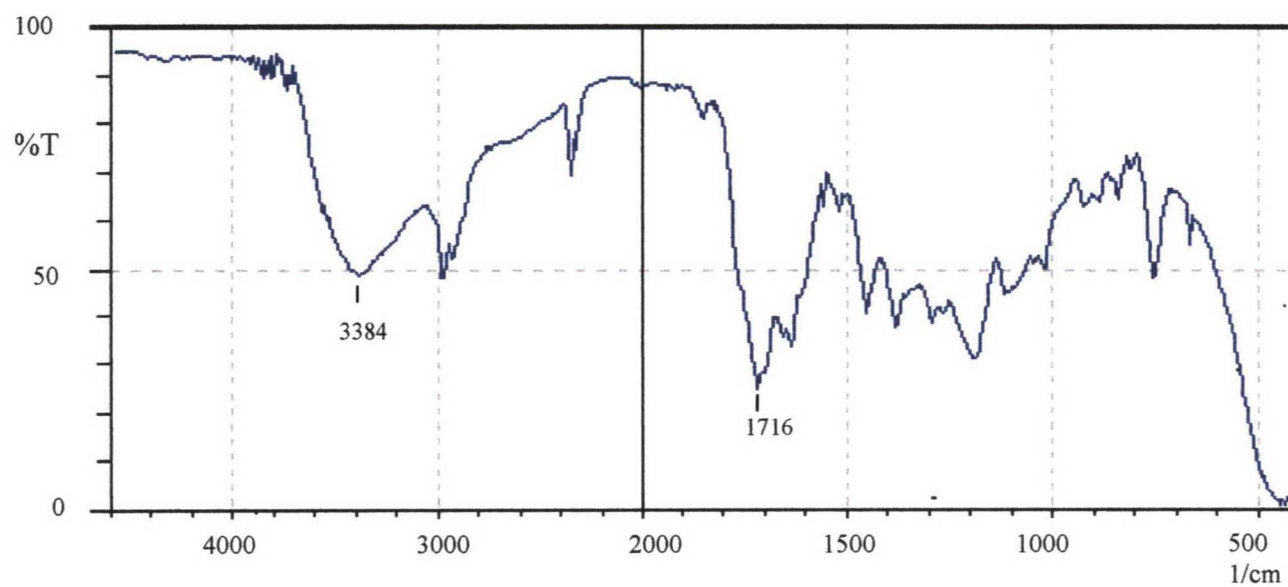
região 3200-3600, também não é observada. As absorções em 2.935, 2870 observadas no espectro da citrinina são correspondentes aos grupamentos  $-CH_3$ . No produto citrinina/ $H_2O_2$  não há uma modificação espectral muito intensa (figura 25 B), no entanto aparece uma banda em  $1716\text{ cm}^{-1}$ , característica de  $C=O$  livre, e uma banda intensa na região 3200-3600, característica de distensão OH. Isto sugere que, aparentemente, as pontes de hidrogênio intramoleculares são desfavorecidas após a reação com  $H_2O_2$ .



**Figura 25 A. Espectro na região do IV da citrinina**

O espectro IV foi realizado em pastilha de NaCl. A amostra corresponde a uma solução de citrinina em etanol submetida a um processo de secagem em estufa à vácuo e reconstituída em clorofórmio.





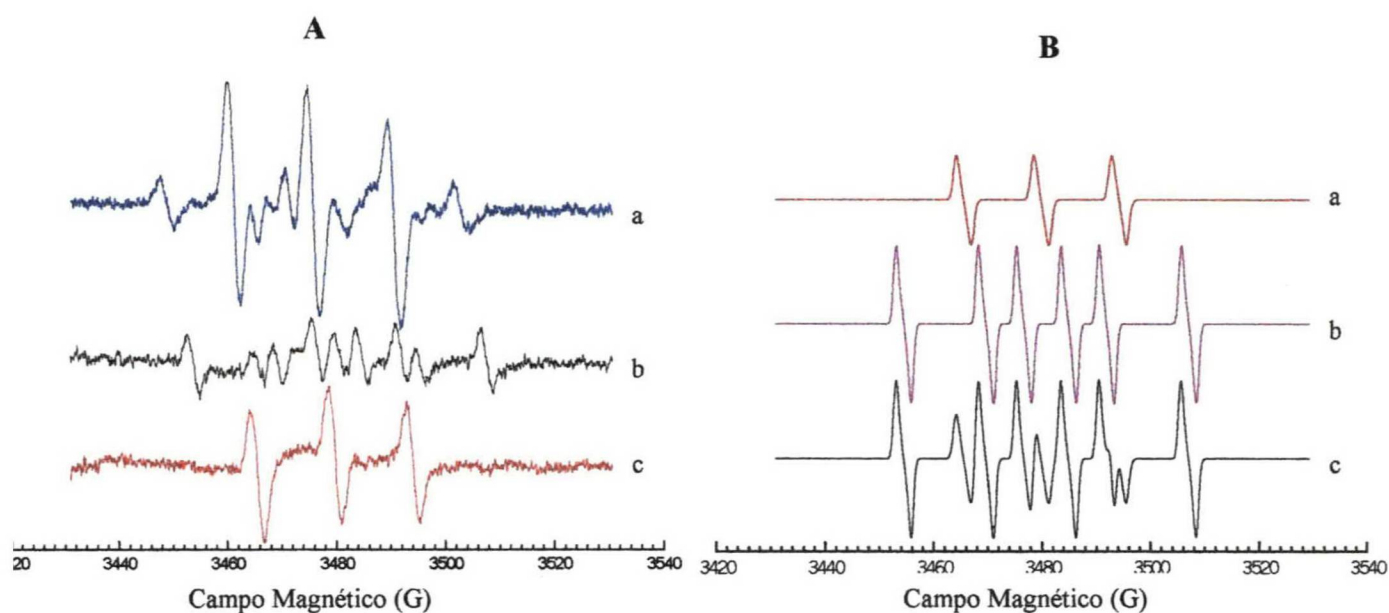
**Figura 25 B. Espectro na região do IV da citrinina após incubação com  $H_2O_2$**

O espectro de IV foi realizado em pastilha de NaCl. A amostra corresponde ao produto da incubação da citrinina:  $H_2O_2$ , em uma proporção 1:5, após a retirada do  $H_2O_2$  por um processo de secagem em estufa à vácuo e reconstituição do produto em clorofórmio.

Vale destacar que apesar de ainda serem necessárias outras determinações para se identificar a estrutura deste produto, estes experimentos indicam uma reatividade entre a citrinina e  $H_2O_2$ , sendo que esta reação pode ser de importância fundamental na proteção da lipoperoxidação ferro-induzida pela citrinina, uma vez que  $H_2O_2$  é necessário para a ocorrência da reação de Fenton.

Com o objetivo de melhor compreender a interferência da citrinina na química de Fenton, foram idealizados experimentos visando a produção de  $OH^\bullet$  através da reação entre  $Fe^{2+}$  e  $H_2O_2$ , na presença de citrinina. A produção deste radical poderia ser acompanhada através de um captador de spin o 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido (DMPO) utilizando-se a técnica de EPR. Contudo, os experimentos utilizando DMPO, não tiveram sucesso nas condições vigentes no laboratório, devido ao fato desta substância ser muito suscetível a decomposição pela luz, íon férrico contaminante, oxigênio e outros fatores. Os espectros (A) e (B) da figura 26 foram obtidos a partir de soluções aquosas de DMPO, recente e envelhecida dois meses, respectivamente. Dados da literatura confirmam que os sinais obtidos nestes espectros são característicos de alguns dos produtos de decomposição do DMPO (FINKELSTEIN *et al.*, 1980) os quais apresentaram as respectivas constantes de acoplamento hiperfinas a)  $a_N = 15,2$  G;  $a_H = 22,2$  G, b)  $a_N = 14,3$  G (figura 26 A). O espectro com sinais  $a_N = 15,2$  G e  $a_H = 22,2$  G corresponde ao produto de oxidação de um dímero de DMPO (FINKELSTEIN *et al.*, 1980) e o espectro com sinal  $a_N = 14,3$  G foi atribuído ao produto de oxidação final o 2-carboxy-DMPO-OH (BONNET *et al.*, 1959) (figura 26 B). Estes espectros podem ser visualizados separadamente nos simulados da figura 26 (B) em que (a) e (b) correspondem a 2-carboxi-DMPO e dímeros de DMPO, respectivamente. Quando a citrinina foi adicionada à solução de DMPO, somente o sinal de EPR correspondente ao espectro  $a_N = 14,3$  G foi observado, espectro (c) da figura 26 A. Este resultado, apesar de ser proveniente de um artefato, permite a proposição que a citrinina atue

como um acceptor de elétron somente para o produto com  $a_N = 15,2$  G,  $a_H = 22,2$  G, provavelmente, transformando-se em dihidrocitrinina (esquema 2). Neste aspecto é importante enfatizar que a dihidrocitrinina foi detectada como produto de redução da citrinina pela cadeia respiratória mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* e que, segundo os autores, esta redução ocorre de maneira irreversível (HARAGUCHI *et al.*, 1989).



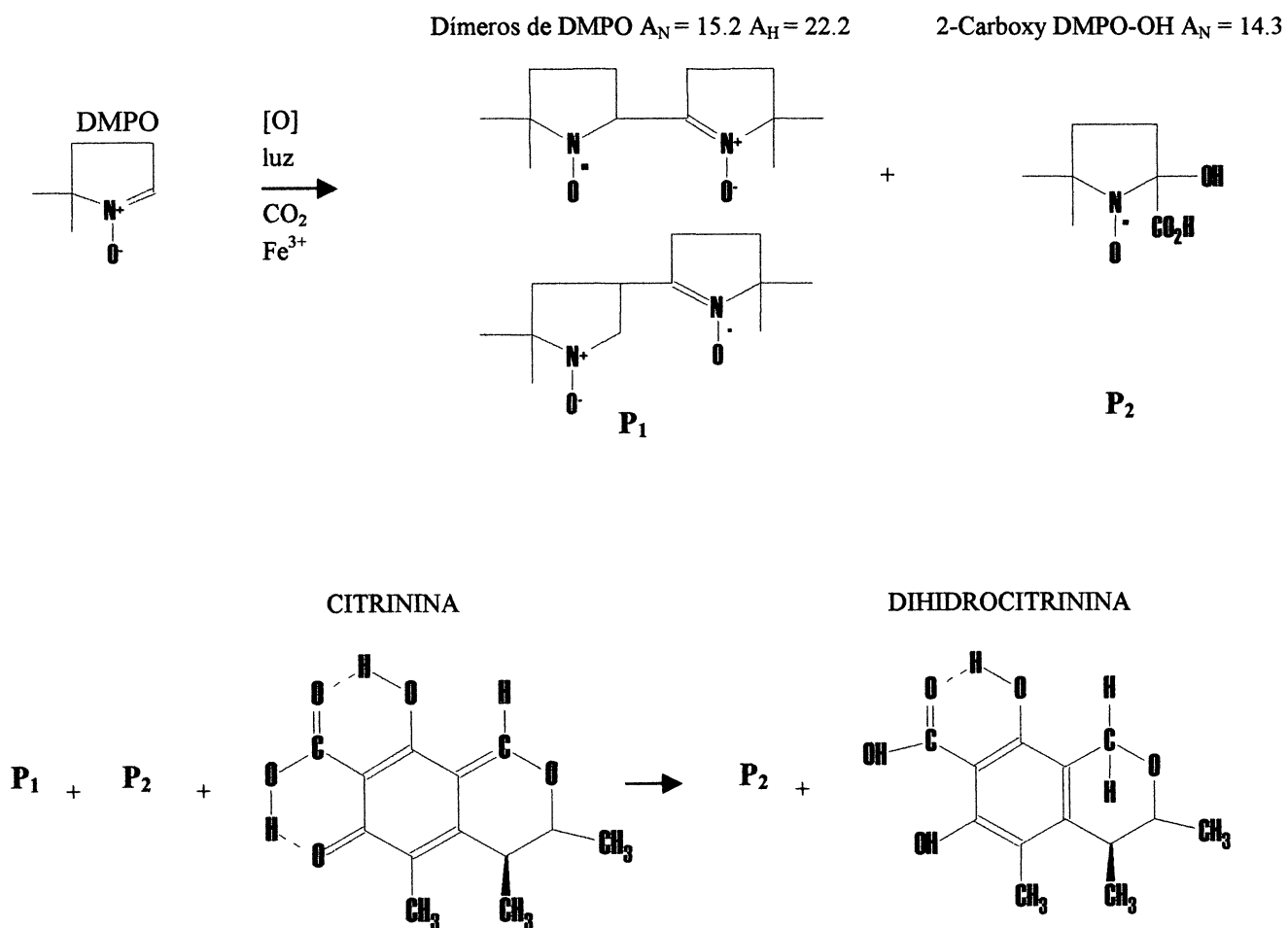
**Figura 26. Espectros de EPR**

**(A) Espectros experimentais, sendo:**

- (a) de solução aquosa recém preparada de DMPO ( $P_1 + P_2$ ),
- (b) de solução aquosa de DMPO envelhecida (dois meses) ( $P_1 + P_2$ ),
- (c) de solução aquosa de DMPO (B) após adição de solução alcóolica de citrinina ( $P_2$ ),

**(B) Espectros simulados, sendo:**

- (a) do 2-carboxi -DMPO-OH ( $P_2$ ),  $A_N = 14.3$ ,
- (b) dos produtos dímeros de DMPO ( $P_1$ ),  $A_N = 15.2$ ,  $A_H = 22.2$ .
- (c) adição de (A) e (B) espectro de EPR simulado dos produtos ( $P_1 + P_2$ ).

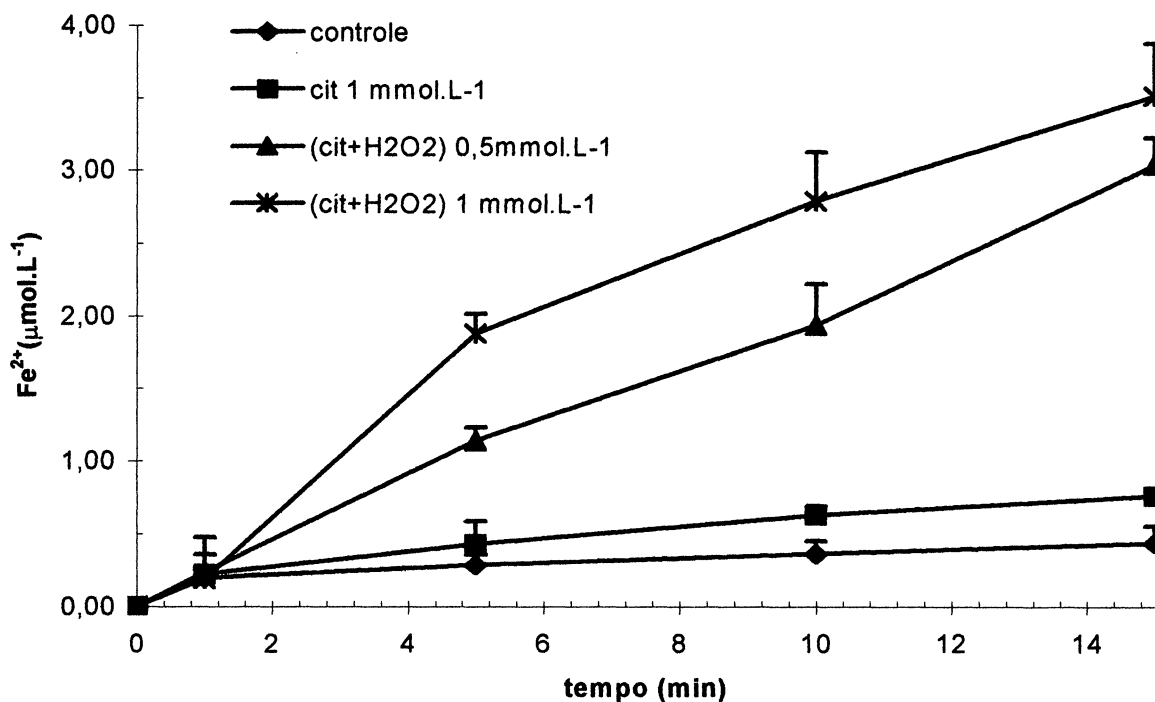


**Esquema 2. Reações propostas para a oxidação dos produtos do DMPO pela citrinina**

#### 4.3.5 Determinação da liberação de ferro da ferritina pela citrinina e pelo produto da reação citrinina/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Considerando os resultados até aqui mostrados indicando a interação da citrinina com Fe<sup>3+</sup> e o fato que este íon na célula fica armazenado como parte do núcleo mineral da ferritina, uma avaliação do efeito da citrinina e/ou do produto de sua reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frente a ferritina é relevante. A mobilização do ferro da ferritina *in vitro* pode ocorrer por quelação direta do Fe<sup>3+</sup> ou pela redução do Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. Alguns estudos sugerem que a ferritina, em presença de um xenobiótico é capaz de promover a liberação de ferro desta proteína, e desta forma atua *in vivo* como uma fonte de ferro para promover lipoperoxidação (THOMAS *et al.* 1985). A figura 27 mostra o efeito da citrinina e do produto da reação citrinina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a liberação de ferro da ferritina. Verifica-se que a citrinina na concentração de 1 mmol.L<sup>-1</sup> não foi capaz de deslocar ferro da ferritina, posto que o perfil do gráfico é semelhante ao do controle. Contudo, o produto da reação citrinina:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:5), após evaporação e reconstituição em etanol, numa concentração correspondente de 0,25, 0,5 e 1 mmol.L<sup>-1</sup> induziu a liberação de ferro da ferritina de uma maneira dose dependente. A tabela 1 resume os dados desta figura, mostrando que ocorre a liberação de 3,5 µmol.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> da ferritina pelo produto da reação citrinina: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, enquanto apenas 0,7 µmol.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> foram liberados pela citrinina 1 mmol.L<sup>-1</sup> após 15 minutos de reação.

Sendo assim, estes resultados mostram que o produto gerado pela reação entre citrinina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possui uma capacidade maior de indução da liberação de ferro da ferritina que a própria citrinina. Ao mesmo tempo, estes resultados indicam a existência de uma diferença no mecanismo de ação entre a citrinina e o produto da sua reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que é possivelmente a dihidrocitrinina. Esta diferença está provavelmente relacionada à capacidade redutora destas duas moléculas.



**Figura 27. Efeito da citrinina e do produto da reação citrinina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a liberação de ferro da ferritina.**

A liberação de ferro da ferritina foi observada seguindo-se o aumento da absorbância a 530 nm devido a quelação de Fe<sup>2+</sup> por sulfonato de batofenantrolina. O cálculo de Fe<sup>2+</sup> liberado foi realizado através do coeficiente de extinção molar do complexo,  $\epsilon = 22,14 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ . O sistema de reação era composto de sulfonato de batofenantrolina 1 mmol.L<sup>-1</sup>, ferritina de baço de cavalo 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4. A liberação de Fe<sup>2+</sup> foi acompanhada após a adição de citrinina 1 mmol.L<sup>-1</sup> e adição do produto entre citrinina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:5) nas concentrações 0,5 e 1 mmol.L<sup>-1</sup>. Os resultados estão expressos em µmol.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> liberado da ferritina em 15 minutos a 25 °C e representam a média  $\pm$  SD de determinações em triplicata.

**Tabela 1. Efeito da citrinina e do produto da reação citrinina mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a liberação de ferro da ferritina.**

Tratamento	Fe <sup>2+</sup> liberado (μmol.L <sup>-1</sup> )
Controle	0,4±0,12
Cit. 1 mmol.L <sup>-1</sup>	0,7±0,04
(Cit.+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 0,25 mmol.L <sup>-1</sup>	2,0±0,10
(Cit.+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 0,5 mmol.L <sup>-1</sup>	3,0±0,18
(Cit.+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 1 mmol.L <sup>-1</sup>	3,5±0,36

A liberação de ferro da ferritina foi observada seguindo-se o aumento da absorvância a 530 nm devido a quelação de Fe<sup>2+</sup> por sulfonato de batofenantrolina. O cálculo da quantidade de Fe<sup>2+</sup> liberado foi realizado através do coeficiente de extinção molar do complexo,  $\epsilon = 22,14 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . O sistema de reação continha sulfonato de batofenantrolina 1 mmol.L<sup>-1</sup>, ferritina de baço de cavalo 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, citrinina e seu produto entre citrinina:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:5) nas concentrações indicadas. Os resultados estão expressos em μmol.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> liberado da ferritina em 15 minutos a 25 °C e representam a média ± SD de determinações em triplicata.



## 5. DISCUSSÃO FINAL

Este trabalho teve por objetivo contribuir para o conhecimento dos mecanismos pelos quais a micotoxina citrinina pode levar ao dano e morte celular, procurando relacionar suas propriedades químicas com sua ação sobre a transição de permeabilidade mitocondrial, a interação com a bicamada lipídica, bem como com a sua capacidade de inibir a lipoperoxidação ferro-induzida. A ação da citrinina como agente indutor de transição de permeabilidade mitocondrial que foi avaliada através de experimentos clássicos de inchamento mitocondrial e determinação de potencial elétrico de membrana, chamaram a atenção para os seguintes resultados: a) a estrita dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  para que o inchamento mitocondrial fosse induzido pela citrinina; b) a proteção conferida por CsA e ATP, indicando que o fenômeno ocorre devido a formação de poro; c) a falta de proteção por DTT, BHT e catalase, bem como a ausência de formação de agregados proteicos de alta massa molar, sugerindo que processos oxidativos severos não estão envolvidos no dano celular causado pela citrinina. Apesar da independência dos efeitos do DTT, o envolvimento de grupos  $-\text{SH}$  nos efeitos causados pela citrinina, não puderam ser descartados, posto que a micotoxina interfere nos níveis de exposição destes grupos, após incubação na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esse íon aumenta o nível de exposição de grupamentos sulfidrílicos de proteínas alterando a reatividade destes grupamentos a reagentes específicos (KOWALTOWSKI *et al.*, 1997). Portanto, o envolvimento destes grupamentos na indução de transição de permeabilidade pela citrinina, é confirmado pela necessidade estrita de  $\text{Ca}^{+2}$  no interior da mitocôndria para o desenvolvimento do fenômeno, bem como, pela verificação da ação da citrinina sobre estes grupamentos, após a incubação da membrana mitocondrial com este íon.

Os reagentes sulfidrílicos indutores da transição de permeabilidade mitocondrial como a diamida, óxido fenilarsina e DIDS, ou protetores como, DTT e mersalil, têm sido

muito utilizados em estudos da regulação do poro. Segundo BERNARDI *et al.* (1992), a ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  a sítios específicos, como os grupamentos sulfidrílicos vicinais, é imprescindível para a abertura do poro de transição de permeabilidade e que este seria sensível a voltagem, ou seja, um baixo potencial elétrico de membrana mitocondrial propiciaria a abertura do poro. Nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho na transição de permeabilidade mitocondrial induzida pela citrinina, o baixo potencial elétrico de membrana constituiu uma característica comum nos diferentes experimentos realizados, seja no inchamento mitocondrial em condições desenergizadas ou na acentuada queda de potencial constatada na presença de  $\text{Ca}^{+2}$  e citrinina em mitocôndrias energizadas (Figura 10).

Por outro lado, a observação de que um efeito protetor da MTP induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{P}_i$ , ocorre com o uso de baixas concentrações de citrinina ( $10 - 25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), tornou possível a sua comparação com a ação de um reagente sulfidrílico hidrofóbico monofuncional, a *N*-etilmaleimida (NEM). Semelhante à citrinina, NEM é capaz de induzir a transição de permeabilidade quando em altas concentrações e inibir em baixas concentrações ( $10-20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). A localização do sítio reativo específico da NEM na membrana mitocondrial permanece indefinida, contudo considera-se que o efeito protetor da NEM ocorra devido a sua ligação a grupamentos sulfidrílicos específicos, enquanto seu efeito indutor, provavelmente, seja mediado por um evento oxidativo, uma vez que esta indução é protegida por DTT (COSTANTINI *et al.*, 1998). Portanto, neste aspecto a ação da NEM difere daquela da citrinina.

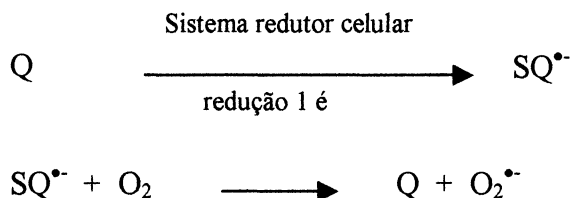
Outro exemplo de agente com ação dual sobre a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e agentes pró-oxidantes é a trifluoperazina, uma droga fenotiazínica que inibe o fenômeno em baixas concentrações ( $15-35 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e potencializa em altas concentrações (acima de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Considera-se que o efeito protetor da

trifluoperazina seja devido a indução de mudanças conformacionais nas proteínas de membrana convertendo grupamentos sulfidrílicos superficiais em grupamentos mais internalizados, diminuindo a probabilidade da formação de ligações dissulfetos (PEREIRA *et al.*, 1992).

Apesar de estar claro o envolvimento dos grupamento sulfidrílicos na ação da citrinina sobre a transição de permeabilidade, não há dados conclusivos quanto ao mecanismo preciso desta ação. Além da possibilidade de ocorrer uma ligação direta da citrinina a grupamentos específicos da membrana, a semelhança do que ocorre com a NEM, pode-se considerar a hipótese de uma modificação estrutural das proteínas alterando a posição de sítios reguladores específicos, a semelhança do que ocorre com a trifluoperazina.

Quanto ao efeito protetor da citrinina, é importante considerarmos a condição experimental em que ele foi observado. A indução da transição de permeabilidade por  $\text{Ca}^{2+}$   $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $\text{Pi}$   $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , em mitocôndrias energizadas, ocorre por um mecanismo envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio levando a um processo de lipoperoxidação da membrana mitocondrial (KOWALTOWSKI *et al.*, 1996). Sabe-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  mobiliza o ferro intramitocondrial tornando-o disponível para as reações de Fenton (MERRYFIELD *et al.*, 1982; CASTILHO *et al.*, 1995 b). Assim, o efeito protetor da citrinina sobre a transição de permeabilidade induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  mais  $\text{Pi}$  pode estar relacionado com o mecanismo descrito por RIBEIRO *et al.* (1998), referente a um efeito protetor sobre a lipoperoxidação ferro induzida.

A citrinina é classificada quimicamente como uma quinona (GEIGER, 1946, HARAGUCHI *et al.*, 1989; SCOTT, 1994). As quinonas possuem, no mínimo, dois mecanismos de toxicidade, através de reação com grupos  $-\text{SH}$  de proteínas ou devido a possibilidade de sofrerem ciclo redox, conforme as reações a seguir:



onde Q representa a quinona e  $\text{SQ}^{\bullet-}$  a semiquinona (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Segundo HARAGUCHI *et al.* (1989) a citrinina é uma quinona que aceita elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, sendo reduzida a dihidrocitrinina de forma irreversível, ou seja não sofrendo o ciclo redox que gera espécies reativas de oxigênio. Esta propriedade afeta diretamente a bioenergética mitocondrial e, conseqüentemente, todo o metabolismo celular, porém, ela também pode justificar o fato de não ser observado o fenômeno de lipoperoxidação na morte celular induzida pela citrinina (ALEO *et al.* 1991). Além disso, a capacidade da citrinina quelar  $\text{Fe}^{3+}$ , formando um complexo redox inerte, e a sua reatividade com peróxido de hidrogênio, observadas neste estudo, são requisitos satisfatórios que suportam a hipótese da citrinina atuar como uma inibidora de processos oxidativos. A inibição de processos oxidativos pode ocorrer, também, na presença de sistemas difenóis/semiquinonas, uma vez que estes podem reagir com radicais de oxigênio, inclusive o radical peroxil ( $\text{RO}_2^{\bullet}$ ), doando elétrons e protegendo processos de lipoperoxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A citrinina não reagiu com o radical livre estável DPPH demonstrando que, nas condições experimentais utilizadas, não possui a propriedade de doar elétrons ao radical livre. Contudo, é importante destacar que sistemas difenóis/quinonas podem agir como geradores ou sequestradores de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , dependendo da posição de equilíbrio e também do pH, uma vez que o grau de protonação afeta a os potenciais de redução destes sistemas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Neste aspecto, um aprofundamento do estudo da citrinina seria necessário.

A demonstração, através dos experimentos de polarização de fluorescência da sonda DPH incorporada em lipossoma de DMPC, de que a citrinina interage com regiões mais

hidrofóbicas de bicamadas lipídicas sintéticas, reforça a possibilidade de uma ação protetora desta micotoxina em membranas, como foi observado para os flavonóides (SAIJA *et al.* 1995). BARBER *et al.*, (1987) demonstraram que em solução aquosa e pH fisiológico, a citrinina existe como a mistura diastereoisomérica de hidratos mostrada na figura 4 (página 10). A forma de uma metil-quinona, mostrada na figura 3 (página 10), seria a predominante quando solubilizada em solvente orgânico. Segundo os autores, a citrinina na forma de hidrato é produzida dentro da célula do fungo; na interface membrana citosol ocorreria a desidratação formando a citrinina lipossolúvel (figura 3, página 10). Após o transporte através da membrana, ocorreria a rehidratação formando a mistura de estereoisômeros, a qual é encontrada no meio de cultura. A formação de metil-quinona em meio aquoso é desfavorável, sugerindo que não ocorra a reação de adição de Michael em solução livre, porém, em um ambiente de enzimas hidrofóbicas, a formação de metil-quinona possibilitaria a adição de Michael. Esta reação consiste em uma adição nucleófila a compostos de carbono  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados (MORRISON & BOYD, 1983).

A reação de quinonas com grupamentos sulfidrílicos, envolvidos na transição de permeabilidade mitocondrial, tem sido mencionada ocorrer por adição de Michael. A menadiona, uma quinona indutora de transição de permeabilidade, comporta-se como um tiol substituinte através de uma adição de Michael similar aquela que ocorre com a NEM, devido a um grupamento carbonil conjugado com um dupla ligação carbono-carbono em sua estrutura química (PETRONILLI *et al.*, 1994; BELLOMO *et al.*, 1990). Portanto, a proposta de que a citrinina na forma metil-quinona inserida nas regiões hidrofóbicas da bicamada lipídica, possa sofrer reação de adição de Michael com grupamentos sulfidrílicos de proteínas seria pertinente.

Outro aspecto que pode estar relacionado com a capacidade da citrinina sofrer adição de Michael seriam as alterações estruturais sofridas após a reação com  $H_2O_2$ , observadas

através das alterações espectrais (UV/VIS e IV). Analisando a estrutura proposta por BARBER *et al.* (1987) para a citrinina em solução aquosa em pH fisiológico (figura 4, página 10), podemos considerar que as características de distribuição eletrônica e os grupamentos –OH livre, assim como na estrutura do derivado dihidrocitrinina (figura 5 ou esquema 1, páginas 11 e 100 ), justificariam alterações espectrais observadas.

O descolamento de um monocamada de células causado pela citrinina parece envolver uma ação direta sobre a superfície celular, especialmente na manutenção de ligações adesivas entre as células e o substrato sugerindo que esta micotoxina pode afetar componentes do citoesqueleto (CHAGAS *et al.* 1994). Embora a atividade transmembrana plasmática, ligada a mudanças do estado de oxidação-redução de dissulfetos envolvidos na adesão das células ao suporte sólido, seja fundamental para o crescimento celular (CRANE *et al.*, 1985), alguns estudos sugerem que a adesão seja também mediada por componentes de superfície que são inibidos por reagentes ligantes de grupamentos sulfidrílicos tais como mercuriais, agentes alquilantes e arsenicais (GRINNEL *et al.*, 1972). Além disso, a formação de “blebs” de membrana plasmática observada durante a injúria tóxica em hepatócitos isolados é considerada como uma consequência de alteração na homeostase de  $Ca^{2+}$  e de tióis (JEWELL *et al.*, 1982;). Assim, a alteração da citrinina sobre os fluxos mitocondriais de  $Ca^{2+}$  (CHAGAS *et al.*, 1995 c) e sua interferência com grupamentos sulfidrílicos quando na presença de íons  $Ca^{2+}$ , demonstradas neste trabalho (figura 11, página 60) podem sustentar a hipótese de que estes mecanismos de ação estejam também envolvidos nos efeitos apresentados pela citrinina.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a citrinina:

- 1) não promove a formação de agregados proteicos de alta massa molar;
- 2) apresenta efeito dual sobre a transição de permeabilidade em mitocôndrias isoladas, possuindo um efeito indutor quando presente em altas concentrações (0,1 a 1 mmol.L<sup>-1</sup>) e protetor em baixas concentrações (10-25 μmol.L<sup>-1</sup>);
- 3) altera a fluidez de membranas agindo numa região mais hidrofóbica das bicamadas lipídicas;
- 4) apresenta interação com grupamentos sulfidrílicos de proteínas mitocondriais quando na presença de íons Ca<sup>2+</sup>;
- 5) forma complexo redox inerte com Fe<sup>3+</sup> e reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> impedindo a propagação da reação de Fenton;
- 6) não libera ferro da ferritina
- 7) quando reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> forma um produto que promove liberação de ferro da ferritina.

***ANEXO***

---



# Citrinin-Induced Mitochondrial Permeability Transition

Eneida J. Da Lozzo, Maria Benigna M. Oliveira, and Eva Gunilla S. Carnieri\*

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brasil

Received 19 August 1997; revised 6 February 1998

**ABSTRACT:** The effects of mycotoxin citrinin on  $\text{Ca}^{2+}$  efflux and membrane permeabilization were studied in isolated rat liver mitochondria. The efflux rate observed when in presence of ruthenium red was higher when citrinin was added. Swelling experiments demonstrated  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent membrane permeabilization by citrinin. Catalase, butylhydroxitoluene (BHT), and dithiothreitol (DTT) did not protect swelling caused by  $\text{Ca}^{2+}$  plus citrinin. The protection conferred by ATP- $\text{Mg}^{2+}$  and cyclosporin A in the latter experiments are strong indications of pore formation. These results suggest that citrinin can induce permeability transition by a mechanism that does not involve oxidative damage. © 1998 John Wiley & Sons, Inc. *J Biochem Toxicol* 12: 291–297, 1998

**KEY WORDS:** Citrinin, Mycotoxin, Mitochondria, Permeability Transition, Swelling.

## INTRODUCTION

Citrinin [IUPAC: (3R,4S)-4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid] (Figure 1) is a mycotoxin produced by several *Penicillium* and *Aspergillus spp.* and is a contaminant of foods (1–3). Studies have shown the toxicity of citrinin in several animal species (4–7), and kidney functional and structural damage has always been observed, as well as alterations in liver metabolism. In addition, in vitro studies have demonstrated that citrinin produces biochemical alterations in renal proximal tubule suspensions (8), in cultured kidney cells (9,10), and in isolated mitochondria of kidney and liver (11–16).

The mechanism of citrinin action on mitochondrial metabolism has been studied. This mycotoxin inhibits several enzymes linked to the respiratory chain of kidney cortex and liver mitochondria of rats, as well as malate and glutamate dehydrogenases and the ATP-synthase complex (12,13). The transmembrane electri-

cal potential, developed by energized mitochondria, is partially dissipated by citrinin (12,13), and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is also affected (15). In the intact cell, it was observed that citrinin interferes in mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes and promotes perturbation of the cell surface with characteristic blebbing of the plasma membrane (10).

Calcium ions are involved in the phenomenon known as permeability transition (PT), which has been defined as permeabilization of the mitochondrial inner membrane when  $\text{Ca}^{2+}$  is accumulated in the matrix and in the presence of an inducing agent (17,18). This phenomenon is characterized by a decrease in membrane potential, a loss of matrix ions, including  $\text{Ca}^{2+}$ , and mitochondrial swelling. Despite extensive studies, PT is a controversial theme. Its occurrence is attributed to the opening of a proteinaceous pore (18,19), which is protected by adenine nucleotides plus  $\text{Mg}^{2+}$  (19), and submicromolar concentrations of cyclosporin A (CsA). It is significant that this cyclic endecapeptide is now widely used in order to identify the operation of the pore (18,20–24).

Damage of mitochondrial inner membranes is another attractive hypothesis to explain PT. Permeabilization could be due to alterations of the phospholipid bilayer such as lipoperoxidation (25,26), lysophospholipid accumulation due to increased activity of phospholipase  $\text{A}_2$  (27,28), or alterations of the proteins embedded in the membrane (protein oxidation leading to high-molecular weight membrane protein aggregates) (29,30).

Although the biochemical mechanism mediating permeability transition has not yet been entirely elucidated (18), its induction has been implicated in the toxicity mechanism of several chemical agents (31). The purpose of the present work is to analyze whether the effect of citrinin on the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes is correlated to the phenomenon known as permeability transition.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Bovine serum albumin, D-mannitol, succinate, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid

\*Address correspondence to Eva Gunilla S. Carnieri, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brasil. Fax: 5541-2662042; E-mail: carnieri@garoupa.bio.ufpr.br.  
© 1998 John Wiley & Sons, Inc. CCC 1095-6670/98/050291-07

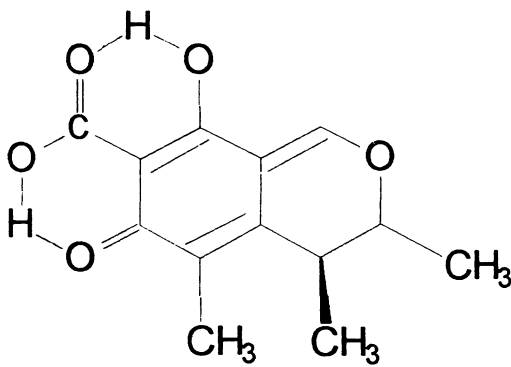


FIGURE 1. Chemical structure of citrinin.

(Hepes), calcium ionophore  $A_{23187}$  ( $A_{23187}$ ), rotenone, ruthenium red, ATP, ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether) (EGTA), calcium chloride, Chelex 100, diamide, catalase, dithiothreitol (DTT), and butylhydroxytoluene (BHT) were from Sigma (St. Louis, MO); Arsenazo III was from Aldrich (Milwaukee, WI); cyclosporin A was from Sandoz Pharma AG (Basel, Switzerland); and magnesium chloride and dimethylsulfoxide (DMSO) were from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals were of the highest purity commercially available.

### Preparation of Rat Liver Mitochondria

Mitochondria were isolated from rat liver by differential centrifugation (32) using a mannitol extraction medium containing 250 mM mannitol, 10 mM Hepes (pH 7.2), 1 mM EGTA, and 0.1 g% bovine serum albumin (BSA). In all cases, the mitochondrial pellet was washed twice with extraction medium, being the last pellet washed and suspended in the same medium without EGTA. Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (33), using bovine serum albumin as the standard.

### Mitochondrial Swelling

Mitochondrial swelling was measured by absorbance changes occurring at 540 nm as described (23,34), using an Aminco-Chance Dual Wavelength/Split Beam Recording Spectrophotometer. The reactions were carried out at 30°C in 3 mL of the required medium, as indicated in the legends of the figures. In the experiments with ATP- $Mg^{2+}$ , the free  $Ca^{2+}$  concentration in the medium was calculated by employing an iterative computer program (35) modified from that described by Fabiato and Fabiato (36).

### Determination of $Ca^{2+}$ Fluxes

$Ca^{2+}$  fluxes across the inner mitochondrial membrane were followed spectrophotometrically at 685–

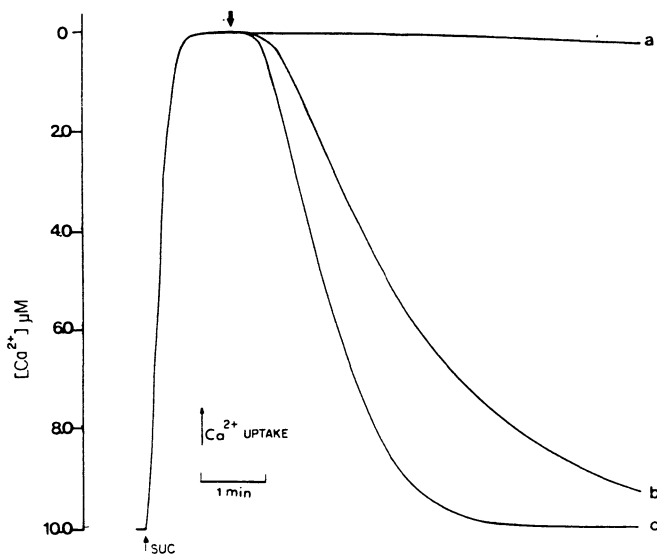
675 nm at 30°C, in the presence of Arsenazo III (37) using an Aminco-Chance Dual Wavelength Double Beam Recording Spectrophotometer. All media used for determination of  $Ca^{2+}$  fluxes were previously treated overnight with Chelex-100 and filtered with  $Ca^{2+}$ -free filter paper before use. The medium should thus be considered  $Ca^{2+}$  free.

### Citrinin Preparation

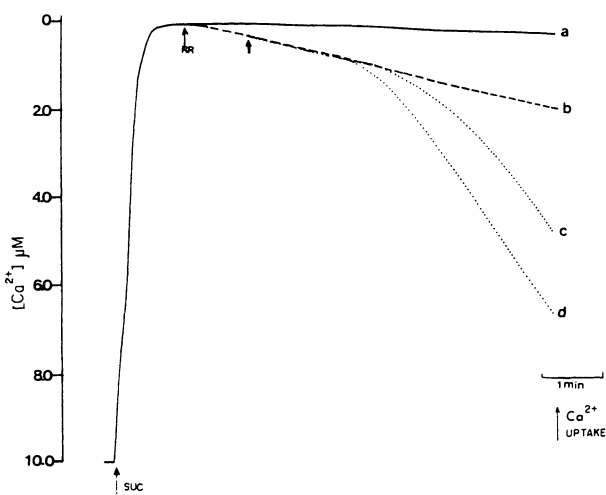
Citrinin (crystalline) was prepared in the Laboratory of Mycotoxins (Department of Microbiology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil) from liquid cultures of *Penicillium citrinum* (Thom), grown in Czapeck-Dox medium (Cruz, Rosa). The estimated purity of citrinin, measured by chromatographic and spectrometric analysis (mass, NMR, infrared, and ultraviolet), exceeded 98%. Citrinin was dissolved in DMSO and diluted further in the medium, and solvent controls with DMSO were carried out in each assay. DMSO, in the concentrations used (up to 30  $\mu$ L) in these experiments, had no effect on mitochondrial properties.

## RESULTS

Previous studies showed a dose-dependent citrinin interference in the mitochondrial  $Ca^{2+}$  fluxes (15). In the present study, the effect of citrinin on  $Ca^{2+}$  efflux was evaluated under experimental conditions in which mitochondria were previously loaded with  $Ca^{2+}$ . The results of such experiments are shown in Figures 2 and 3. That depicted in Figure 2A shows that energized rat liver mitochondria take up  $Ca^{2+}$  until a steady-state  $Ca^{2+}$  distribution is attained and is maintained for at least 8 minutes. Addition of citrinin (0.75 and 1 mM), after  $Ca^{2+}$  uptake, promoted  $Ca^{2+}$  efflux (Figures 2B and 2C). It is known that rat liver mitochondria take up  $Ca^{2+}$  by a uniport mechanism and that both  $Ca^{2+}$  uptake and its retention by mitochondria are dependent on the transmembrane electrical potential ( $\Delta\psi$ ) (38). As citrinin promotes a drop of membrane potential in mitochondria that oxidize succinate (12,13), it could be possible that citrinin-induced  $Ca^{2+}$  efflux was occurring mainly via reversal of the uniporter. To avoid this possibility, the  $Ca^{2+}$  efflux promoted by citrinin was measured in the presence of 2.5  $\mu$ M ruthenium red (RR) (Figure 3), a known inhibitor of the  $Ca^{2+}$  uniporter (38). In Figure 3B, the operation of the  $Ca^{2+}$  efflux pathways in the presence of and absence of citrinin can be observed. In the experiments whose results are shown in Figures 3C and 3D, citrinin was added after addition of RR. It can be observed that citrinin promoted stimulation of the  $Ca^{2+}$  efflux in the presence of RR (Figures 3C and 3D), demonstrating



**FIGURE 2.** Effect of citrinin on mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  efflux. Rat liver mitochondria (RLM) (0.5 mg/mL) were incubated in medium containing 125 mM mannitol, 10 mM Hepes pH 7.2, 65 mM KCl, 1 mM Pi, 0.1 g% BSA, 5  $\mu\text{M}$  rotenone, 30  $\mu\text{M}$  Arsenazo III, and 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . The  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was initiated by addition of 3 mM succinate. Addition of citrinin is indicated by the arrow. (A) Absence of citrinin. (B) and (C) correspond to 0.75 and 1 mM citrinin, respectively. The traces depicted in the figure are representative of at least five independent experiments.

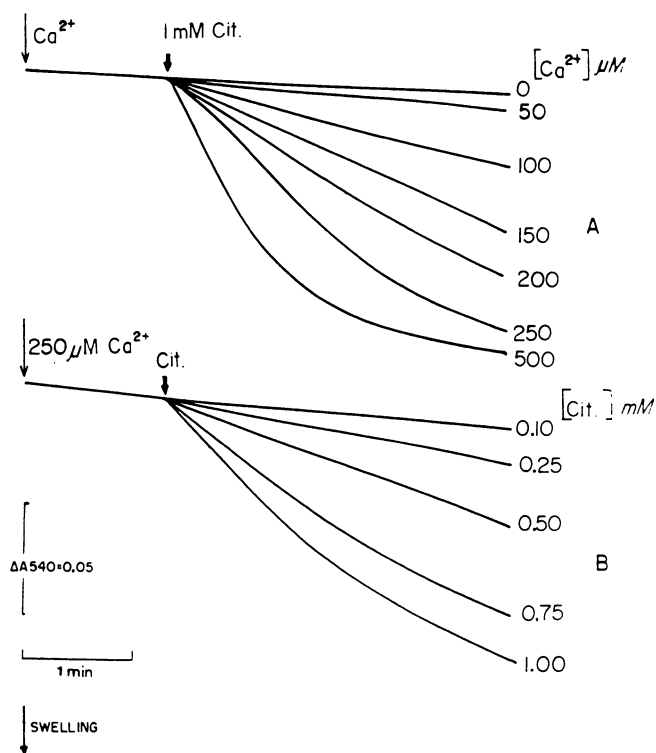


**FIGURE 3.** Effect of citrinin on  $\text{Ca}^{2+}$  efflux in the presence of ruthenium red (RR). RLM (0.5 mg/mL) were incubated in the same medium described in Figure 2. The  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was initiated by addition of 3 mM succinate; RR was added where indicated. (A) Shown without RR. The dashed (B) trace represents efflux with 2.5  $\mu\text{M}$  RR. In traces (C) 0.75 mM and (D) 1 mM, citrinin was added 1 minute after addition of 2.5  $\mu\text{M}$  RR. The traces depicted in the figure are representative of at least five independent experiments.

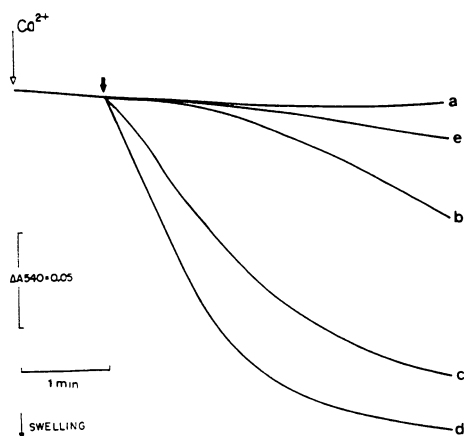
that under this specific condition, stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  efflux induced by citrinin was not occurring by the reversal of the uniporter. These results prompted us to study membrane permeabilization as a possible mechanism involved in the phenomenon.

Changes in mitochondrial volume have been used to follow inner mitochondria permeabilization induced by  $\text{Ca}^{2+}$  and inducers agents (17–19). This classical mitochondrial swelling technique (17,18) follows the net influx of the osmotic support associated with increase in membrane permeability of isolated mitochondria. De-energized mitochondria and high  $\text{Ca}^{2+}$  concentration have been used to examine permeability transition (30); in this condition, the influx of the cation is driven by a gradient of  $\text{Ca}^{2+}$  activity across the inner membrane. This experimental condition has the advantage of eliminating the involvement of respiration, membrane potential, and  $\text{Ca}^{2+}$  cycling across the inner membrane. Considering the action of citrinin in the membrane electrical potential (12,13), experiments using de-energized mitochondria were carried out in order to allow a more accurate analysis of the effects of this mycotoxin on membrane permeability. Figure 4 shows representative swelling experiments, in which calcium (4A) and citrinin (4B) concentrations were variables. In Figure 4A, it can be observed that 1 mM citrinin did not induce swelling in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . However, citrinin in the presence of increasing  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (50–500  $\mu\text{M}$ ) promoted an increasing and accentuated stimulus of the mitochondrial swelling rate (Figure 4A). This result indicates that citrinin causes a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent increase in the permeability of the inner mitochondrial membrane, allowing the penetration of the osmotic support (mannitol/KCl) into the matrix. Figure 4B shows a citrinin dose-dependent (0.1–1 mM) mitochondrial swelling, when a fixed  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (250  $\mu\text{M}$ ) was used. It must be emphasized that in the absence of citrinin, no swelling occurred with this calcium concentration (data not shown). Thus, it might be concluded that the observed effects were both  $\text{Ca}^{2+}$  and citrinin dependent.

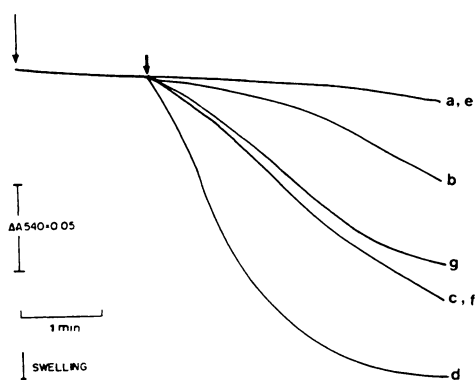
In order to assess  $\text{Ca}^{2+}$  location during mitochondrial membrane permeabilization induced by citrinin, the swelling experiments presented in Figure 5 were carried out with de-energized mitochondria in the presence of the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore  $\text{A}_{23187}$  or in the presence of RR. Figure 5A shows that under this experimental condition, no swelling was observed with  $\text{Ca}^{2+}$  alone. Figure 5B shows the swelling caused by diamide, which is a thiol oxidant and a well-known inducer of PT (18); it was therefore used as a control. Figures 5C and 5D show the swelling promoted by citrinin, either in the absence (5C) or in the presence of  $\text{A}_{23187}$  (5D). Significant mitochondrial swelling was not observed in the presence of diamide or citrinin, when RR was added prior to  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 5E). These results indicate



**FIGURE 4.** Effect of different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and citrinin on mitochondrial swelling. RLM (0.5 mg/mL) were incubated in medium containing 125 mM mannitol, 10 mM Hepes pH 7.2, 65 mM KCl, 0.1 g% BSA, and 1  $\mu\text{M}$  FCCP. (A) 1 mM citrinin was added to mitochondria preincubated with varying  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. (B) Different citrinin concentrations were added to mitochondria preincubated with 250  $\mu\text{M}$  of  $\text{Ca}^{2+}$ , as indicated in the figure. The traces depicted in the figure are representative of at least five independent experiments.



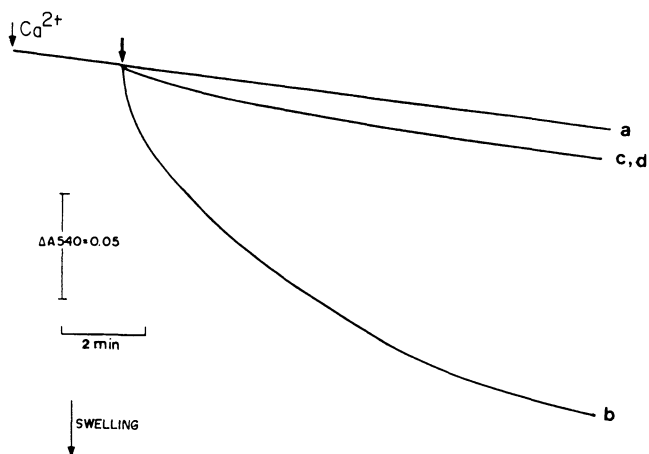
**FIGURE 5.** Effect of  $\text{A}_{23187}$  and ruthenium red (RR) on mitochondrial swelling induced by  $\text{Ca}^{2+}$  and citrinin. RLM (0.5 mg/mL) were incubated in the same medium described in Figure 4, supplemented with 250  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . (A) The arrow ( $\downarrow$ ) indicates addition of (B) 300  $\mu\text{M}$  diamide, (C) 1 mM citrinin, and (D) 5  $\mu\text{M}$   $\text{A}_{23187}$  on situation (C). (E) represents situation (B) and (C) in the presence of 2.5  $\mu\text{M}$  RR. The traces depicted in the figure are representative of at least five independent experiments.



**FIGURE 6.** Effect of DTT, BHT, and catalase on mitochondrial swelling induced by  $\text{Ca}^{2+}$  and citrinin. RLM (0.5 mg/mL) were incubated in the same conditions described in Figure 4, supplemented with 250  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Line (A) represents the addition of 1 mM citrinin or 300  $\mu\text{M}$  diamide without  $\text{Ca}^{2+}$ . The arrow ( $\downarrow$ ) indicates addition of (B) 300  $\mu\text{M}$  diamide and (C) 1 mM citrinin in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Lines (D) and (E) represent the same situation as in (C) and (B) in the presence of 1 mM DTT. Lines (G) and (F) represent the same situation as (C) in the presence of 10  $\mu\text{M}$  BHT (G) and 1  $\mu\text{M}$  catalase (F). The traces depicted in the figure are representative of at least five independent experiments.

that for the occurrence of citrinin- or diamide-induced swelling,  $\text{Ca}^{2+}$  might be inside the mitochondria and that even in de-energized mitochondria the uniporter is still important for the entry of  $\text{Ca}^{2+}$ . The requirement of  $\text{Ca}^{2+}$  in the matrix was also confirmed by the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore  $\text{A}_{23187}$  (Figure 5D), which stimulated the swelling caused by  $\text{Ca}^{2+}$  plus citrinin.

To obtain more information about the molecular mechanism involved in the mitochondrial permeabilization by  $\text{Ca}^{2+}$  plus citrinin, we carried out the experiments depicted in Figures 6 and 7. Mitochondrial inner membrane permeabilization by  $\text{Ca}^{2+}$  plus pro-oxidants such as diamide or *t*-butyl hydroperoxide has been associated with oxidation of protein thiol forming cross-linked protein aggregates or oxidation of membrane lipids by a mechanism involving reactive oxygen species (ROS) (26,29,30,39). In Figure 6, swelling caused by 250  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  plus 300  $\mu\text{M}$  diamide in de-energized rat liver mitochondria (Figure 6B) was prevented by the presence of 1 mM DTT (Figure 6E), a reductant of disulfide groups. However, when the swelling was caused by 250  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  plus 1 mM citrinin (Figure 6C), the presence of 1 mM DTT caused a greater swelling instead of the expected protection (Figure 6D), suggesting that the mechanism of permeabilization promoted by  $\text{Ca}^{2+}$  plus citrinin does not involve cross-linking of vicinal thiol groups. Furthermore, exogenous catalase (1  $\mu\text{M}$ ) did not cause protection against the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  plus citrinin (Figure 6F), and 10  $\mu\text{M}$  BHT, a known inhibitor of lipid peroxidation, did not cause significant alterations on this swelling (Figure 6G), suggesting that ROS does not partici-



**FIGURE 7.** Effect of CsA and ATP-Mg<sup>2+</sup> on swelling induced by Ca<sup>2+</sup> plus citrinin. RLM (0.5 mg/mL) were incubated under the same conditions as described in Figure 4, supplemented with 1 μM FCCP and 250 μM Ca<sup>2+</sup> (A). The arrow (↓) indicates addition of 1 mM citrinin (B). The traces (C) and (D) represent the same situation (B) in the presence of 0.5 μM CsA (C) and 0.5 mM ATP plus 0.5 mM Mg<sup>2+</sup> (D). The traces depicted in the figure are representative of at least five independent experiments.

pate in the phenomenon and that lipid peroxidation does not occur. All together, these results indicate that there is not oxidative damage involved in the membrane permeabilization by Ca<sup>2+</sup> plus citrinin under our experimental conditions.

Inhibitors of PT such as ATP-Mg<sup>2+</sup> and cyclosporin A have been used to indicate the operation of a proteinaceous pore in this phenomenon (18–24). Figure 7 shows that the swelling of de-energized mitochondria induced by 250 μM free Ca<sup>2+</sup> plus 1 mM citrinin (Figure 7B) was strongly inhibited by 0.5 μM CsA (Figure 7C) as well as by 0.5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup> (Figure 7D). These results suggest that permeability transition induced by citrinin could be due to the formation of a proteinaceous pore.

## DISCUSSION

The occurrence of mitochondrial permeability transition has been characterized by Ca<sup>2+</sup> release, mitochondrial swelling, and collapse of the inner Δψ, all of which occur after Ca<sup>2+</sup> uptake and in the presence of an inducing agent (18).

In the present work, we showed that citrinin induced the release of Ca<sup>2+</sup> from isolated preloaded rat liver mitochondria (Figure 2) as well as mitochondrial swelling. Collapse of the transmembrane electrical potential also occurs in energized conditions (data not shown).

Previous studies of citrinin on mitochondrial metabolism demonstrated its interference on some en-

ergy-linked functions (12,13), including Ca<sup>2+</sup> fluxes (15). The results observed in Figure 3 in the presence of RR are strongly indicative of increased membrane permeability by citrinin. To estimate the action of citrinin in the membrane permeability without the influence of energetic parameters, we performed some of the experiments under de-energized conditions. Increase of membrane permeability was confirmed in Ca<sup>2+</sup>-citrinin dose-dependent swelling developed on de-energized mitochondria (Figure 4).

The presence of high Ca<sup>2+</sup> concentration is necessary because in this de-energized condition Ca<sup>2+</sup> enters only by concentration gradient and PT has been assumed to require the accumulation of Ca<sup>2+</sup> into the matrix. The swelling protection conferred by RR and the stimulation by A<sub>23187</sub> (Figure 5) suggest that citrinin promoted mitochondrial permeabilization when Ca<sup>2+</sup> was in the matrix. Altogether, these results characterize citrinin as a possible inducer of the PT.

The permeabilizing effect of citrinin is strictly dependent on the presence of Ca<sup>2+</sup>. The role of Ca<sup>2+</sup> in PT has not yet been elucidated. Vercesi *et al.* (26,29,30,39) suggest that Ca<sup>2+</sup> in the presence of a prooxidant agent induces an increase in the production of reactive oxygen species causing oxidative damage. In our experiments, no protection is seen by catalase, BHT, and DTT (Figure 6), and this fact suggests that the phenomenon developed by Ca<sup>2+</sup> plus citrinin is not due to oxidative damage. In our experiments, we have seen stimulation of the swelling by DTT, and we also observed that another SH reagent, NEM (20 μM), a known inhibitor of PT when present in low concentration (18), also increases the swelling in our conditions (data not shown). Kowaltowski *et al.* (40) observed in de-energized mitochondria that Ca<sup>2+</sup> is able to induce alterations on the reactivity of thiol groups, suggesting that the Ca<sup>2+</sup>-binding site on the inner mitochondrial membrane promotes extensive alteration in the conformation of the proteins of the membrane, which results in the change of location of the thiol groups. These structural changes caused by Ca<sup>2+</sup> on the inner mitochondrial membrane might be of great importance for the action of citrinin.

Me<sup>2+</sup> binding to inner and outer sites of inner mitochondrial membrane have been implicated in the pore open-closed transition modulation (23,24). The protection conferred by ATP-Mg<sup>2+</sup> and by CsA observed by us are strong indications of pore formation (Figure 7). Studies concerning the modulation of the pore indicate that a low membrane electrical potential favors the opening of the pore (22,41). In our experiments, mitochondria were de-energized and in presence of the uncoupler carbonyl cyanide *p*-trifluorophenyl hydrazone (FCCP), so under these conditions, the membrane potentials including Donnan potential were collapsed (42). It has been reported by some au-

thors that some sulphhydrylic groups are directly involved in the opening of the cyclosporine A-sensitive and  $\text{Ca}^{2+}$ -operated pore (43,44), as well as in the conformation of the nucleotide adenine translocator (45). This translocator seems to participate in the structure (46) or regulation (24) of the pore. Regulation of the pore opening is complex, and it is still not clear whose mechanisms would be involved. Consequently, the mechanism by which citrinin develops this phenomenon also must be further investigated.

Recent research has suggested that mitochondrial permeability transition could be involved in cell injury (31). The injury caused by citrinin, observed as blebbing of the plasma membrane and loss of cell viability (10), could be the final event of the toxicity mechanism mediated by mitochondrial permeability transition. Additional studies on this hypothesis are of importance and are being continued in our laboratory.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the helpful comments of Dr. Aníbal E. Vercesi. (EJDL) is a doctoral student, supported by a CNPq fellowship.

## REFERENCES

- H. Kurata (1978). Current scope of mycotoxin research from the viewpoint of food mycology. In *Toxicology, Biochemistry and Pathology of Mycotoxins*, K. Uraguchi and M. Yamazaki, eds., pp. 220–221, Kodansha, Tokyo.
- V. Betina (1984). Mycotoxins: production, isolation, separation and purification. In *Developments in Food Science*, V. Betina, ed., vol. 8, pp. 217–236, Elsevier, Amsterdam.
- P. M. Scott (1990). Mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products. In *Mycotoxins in Dairy Products*, H. P. van Egmond, ed., pp. 193–259, Bur. Chem. Saf.: Ottawa.
- W. H. Jordan and W. W. Carlton (1977). Citrinin mycotoxicosis in the mouse. *Food. Cosmet. Toxicol.*, **15**, 29–34.
- M. Gupta, S. Bandyopadhyay, and D. Sashmal (1979). Effects of Ochratoxin A and citrinin on liver function and metabolism. *IRCS Med. Sci.*, **7**, 320.
- M. Gupta, S. Bandyopadhyay, D. Sashmal, and S. K. Majumder (1979). Effects of Ochratoxin A and citrinin on kidney functions. *IRCS Med. Sci.*, **7**, 466.
- M. E. Krejci, N. S. Bretz, and D. A. Koechel (1996). Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]plasma. *Toxicology*, **106**, 167–177.
- M. D. Aleo, R. D. Wyatt, and R. G. Schenellmann (1991). The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **107**, 73–80.
- M. Yoneyama and R. P. Sharma (1987). Biochemical alterations induced by citrinin in cultured kidney epithelial cell systems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **16**, 765–770.
- G. M. Chagas, M. L. W. Klüppel, A. P. Campello, D. F. Buchi, and M. B. M. Oliveira (1994). Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. *Cell Struct. Funct.*, **19**, 103–108.
- H. Haraguchi, T. Tanaka, M. Tanaguchi, S. Oi, and K. Hashimoto (1987). Inhibitory effects of citrinin on mitochondrial function. *Agr. Biol. Chem.*, **51**, 1373–1378.
- G. M. Chagas, A. P. Campello, and M. L. W. Klüppel (1992). Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. I. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of renal cortical mitochondria. *J. Appl. Toxicol.*, **12**, 123–129.
- G. M. Chagas, M. B. M. Oliveira, A. P. Campello, and M. L. W. Klüppel (1992). Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. II. Effects on respiration, enzyme activities, and membrane potential of rat liver mitochondria. *Cell Biochem. Funct.*, **10**, 209–216.
- G. M. Chagas, M. B. M. Oliveira, A. P. Campello, and M. L. W. Klüppel (1995). Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III. Effects on renal cortical and liver mitochondrial swelling. *J. Appl. Toxicol.*, **15**, 91–95.
- G. M. Chagas, M. B. M. Oliveira, A. P. Campello, and M. L. W. Klüppel (1995). Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. IV. Effect on  $\text{Ca}^{2+}$  transport. *Cell Biochem. Funct.*, **13**, 53–59.
- S. M. R. Ribeiro, G. M. Chagas, A. P. C. Campello, and M. L. W. Klüppel (1997). Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem. Funct.*, **15**, 203–209.
- T. E. Gunter and D. R. Pfeiffer (1990). Mechanism by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.*, **258**, C755–C786.
- M. Zoratti and I. Szabò (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 139–176.
- D. R. Hunter and R. A. Haworth (1979). The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 453–459.
- I. Szabò and M. Zoratti (1991). The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J. Biol. Chem.*, **266**, 3376–3379.
- S. A. Novgorodov, T. I. Gudz, Y. M. Milgrom, and G. P. Brierley (1992). The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16274–16282.
- V. Petronilli, C. Cola, S. Massari, R. Colonna, and P. Bernardi (1993). Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21939–21945.
- P. Bernardi, P. Veronese, and V. Petronilli (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate  $\text{Me}^{-}$  binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1005–1010.
- S. A. Novgorodov, T. I. Gudz, G. P. Brierley, and D. R. Pfeiffer (1994). Magnesium ion modulates the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore to cyclosporin A and ADP. *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 219–228.
- D. Le Quoc and K. Le Quoc (1989). Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 466–478.
- M. F. Nepomuceno, D. V. Macedo, and L. Pereira-da-Silva (1991). Lipoperoxidation associated with mitochon-

- drial membrane permeabilization in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **24**, 833–836.
27. J. W. Palmer and D. R. Pfeiffer (1981). The control of  $\text{Ca}^{2+}$  release from heart mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **256**, 6742–6750.
  28. V. G. Gogvadze, N. N. Brustovetsky, and A. A. Zhukova (1990). The role of phospholipase  $\text{A}_2$  in lipid peroxidation-induced fall of membrane potential of rat liver mitochondria. *FEBS Lett.*, **264**, 168–170.
  29. M. M. Fagian, L. Pereira-da-Silva, I. S. Martins, and A. E. Vercesi (1990). Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by  $\text{Ca}^{2+}$  plus prooxidants. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19955–19960.
  30. R. F. Castilho, A. J. Kowaltowski, A. R. Meinicke, E. J. H. Bechara, and A. E. Vercesi (1995). Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by  $\text{Ca}^{2+}$  ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.*, **18**, 479–486.
  31. H. M. Mehendale, R. A. Roth, A. J. Gandolfi, J. E. Klau-nig, J. J. Lemasters, and L. R. Curtis (1994). Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity. *FASEB J.*, **8**, 1285–1295.
  32. D. O. Voss, A. P. Campello, and M. Bacila (1961). The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **4**, 48–51.
  33. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. C. Farr, and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
  34. A. L. Lehninger (1959). Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2465–2471.
  35. G. Inesi, M. Kurzmack, C. Coan, and D. E. Lewis (1980). Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.*, **255**, 3023–3031.
  36. A. Fabiato and F. Fabiato (1979). Calculator programs for computing the compositions of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol.*, **75**, 463–505.
  37. A. Scarpa (1979). Measurement of cation transport with metalocromic indicators. In *Methods in Enzymology*, vol. 61, pp. 301–358, Academic, New York.
  38. D. Nicholls and K. Akerman (1982). Mitochondrial calcium transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **683**, 57–88.
  39. R. F. Castilho, A. J. Kowaltowski, A. R. Meinicke, and A. E. Vercesi (1995). Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II) citrate or *t*-butyl hydroperoxide in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ : effect of coenzyme Q redox state. *Free Rad. Biol. Med.*, **18**, 55–59.
  40. A. J. Kowaltowski, A. E. Vercesi, and R. F. Castilho (1997). Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by  $\text{Ca}^{2+}$ : correlation with mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 395–402.
  41. P. Bernardi (1992). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8834–8839.
  42. V. Chernyak, V. N. Dedov, and V. Ya. Chernyak (1995).  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered membrane permeability transition in de-energized mitochondria from rat liver. *FEBS Lett.*, **365**, 75–78.
  43. V. Petronilli, P. Costantini, L. Scorrano, R. Colonna, S. Passamonti, and P. Bernardi (1994). The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16638–16642.
  44. P. Constantini, B. V. Chernyak, V. Petronilli, and P. Bernardi (1996). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J. Biol. Chem.*, **271**, 6746–6751.
  45. K. Lê Quốc and D. Lê Quốc (1988). Involvement of ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Arch. Biochem. Biophys.*, **265**, 249–257.
  46. A. P. Halestrap and A. M. Davidson (1990). Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.*, **268**, 153–160.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELSON, P.H.; HINES, P.J. The Plant revolution. **Science (Wash.DC)**, v. 285, p. 367-368, 1999.
- AKERMAN, K. E. O.; WIKSTRÖM, M. F. K. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS. Lett.**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 191-197, 1976.
- ALEO, M.D.; WYATT, R.D.; SCHENELLMANN R.G. The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Duluth v. 107, p. 73-80, 1991.
- ANTUNES-MADEIRA, M. C.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. C. DDT-membrane interactions studied with two fluorescent probes. **Pestic. Sci.**, Chichester, v. 33, p. 347-357, 1991.
- ANTUNES-MADEIRA, M. C.; CARVALHO, A.P.; MADEIRA, V.M.C. Effects of insecticides on thermotropic lipid phase transitions. **Pest. Biochem. Physiol.**, Chichester, v.14, p. 161-169, 1980.
- ANTUNES-MADEIRA, M. C.; VIDEIRA, R. A.; KLÜPPEL, M. L.; MADEIRA, V. M. C. Amiodarone effects on membrane organization evaluated by fluorescence polarization. **Int. J. Cardiol.**, Shannon, v. 48, p. 211-218, 1995.
- APSIMON, J.W. The biosynthetic diversity of secondary metabolites. In: Miller, J. D.; Trenholm, H.L., (Ed.) **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan, 1994. p. 3-18.
- AUST, S.D.; MILLER, D.M.; SAMOKYSZYN, V.M. Iron redox reactions and lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 186, p. 457-463, 1990.
- BARBER, J.; CORNFORD, J.L.; HOWARD, T.D.; SHARPLES, D. The structure of citrinin in vivo. **J. Chem. Soc. Perkin Trans I**, Cambridge, p. 2743-2744, 1987.



BEARDALL, J.M.; MILLER, J.D. Diseases in humans with mycotoxins as possible causes.

In: In: Miller, J. D.; Trenholm, H.L., (Ed.) **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan, 1994. p. 487-539.

BELLOMO, G.; THOR, H.; ORRENIUS, S. Modulation of cellular glutathione and protein thiol status during quinone metabolism. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.186, p.627-635, 1990.

BERNARDI, P.; BAÇO, E.; COLONNA, R.; COSTANTINI, P.; LISA, F.D.; ERIKSSON, O.; FONTAINE, E.; FORTE, M.; ICHAS, F.; MASSARI, S.; NICOLLI, A.; PETRONILLI, V.; SCORRANO, L. Perspectives on the mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1365, p. 200-206, 1998.

BERNARDI, P.; VASSANELLI, S.; VERONESE, P.; COLONNA, R.; SZABÓ, I.; ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 267, p. 2934-2939, 1992.

BERNARDI, P.; VERONESE, P.; PETRONILLI, V. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate  $Me^{2+}$  binding sites with opposing effects on the pore open probability, **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 268, p. 1005-1010, 1993.

BERNDT, W.O.; HAYES, A.W. The effect of probenecid on citrinin-induced nephrotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Duluth, v. 64, p. 118-124, 1982.

BERNDT, W.O.; HAYES, A.W.; BAGGETT, J.McC. Effect of fungal toxins on renal slice calcium balance. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Duluth, v. 74, p. 78-85, 1984.

BETINA, V. Biological effects of mycotoxins. In: **Mycotoxins: Production, Isolation, Separation and Purification**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984 a. p. 25-36.

BETINA, V. Citinin and related substances. In: **Mycotoxins: Production, Isolation, Separation and Purification**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984 b. p. 217- 236.

- BETINA, V.; BARÁTHOVÁ, H. Citrinin an inducer of permeability changes in *Eremothecium ashbyi*. **J. Antibiot**, Tokyo, v. 21, p. 628-629, 1968.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature (Lond.)**, v.181, p. 1199-1200, 1958.
- BONNET, R.; BROWN, R. F. C.; CLARK, V. M.; SUTHERLAND, I. O.; TODD, A. Experiments towards the synthesis of Corrins. Part II. The preparation and reactions of  $\Delta^1$ -pyrroline 1-oxides. **J. Chem. Soc.(Lond.)**, p. 2094-2102, 1959.
- BRAUGHER, J.M., DUNCAN, L.A., CHASE, R.L. The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 261, p. 10282-10289, 1986.
- BRYSON, W. G. Applications of electron spin resonance in the analytical chemistry of transition metal ions. Part II. The determination of iron (III) in aqueous solution. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 96, p. 99-106, 1978.
- CARTER, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 40, p. 450-458, 1971.
- CASSARINO, D.S.; PARKS, J.K.; PARKER JR, D.; BENNETT JR, J. The parkinsonian  $MPP^+$  opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome *c* in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1453, p. 49-62, 1999.
- CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; BECHARA. E.J.H.; VERCESI, A.E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by  $Ca^{2+}$  ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria, **Free Radical Biol. Med.**, Tarrytown, v.18, p. 479-486, 1995 b.
- CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; VERCESI, A.E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or *t*-butyl hydroperoxide in the presence

- of  $\text{Ca}^{2+}$ : Effect of coenzyme Q redox state. **Free Radical Biol. Med.**, Tarrytown, v.18, p. 55-59, 1995 a.
- CASTILHO, R. F.; MEINICKE, A. R.; ALMEIDA, A. M.; HERMES-LIMA, M.; VERCESI, A. E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate is potentiated by  $\text{Ca}^{2+}$  and induces lipid peroxidation and alterations in membrane proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 308, p. 158-163, 1994.
- CHAGAS, G.M.; CAMPELLO, A.P.; KLÜPPEL, M.L.W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. I. Effects on respiration, enzyme activities, and membrane potential of renal cortical mitochondria. **J. Appl. Toxicol.**, Chichester, v. 12, p. 123-129, 1992 a.
- CHAGAS, G.M.; CAMPELLO, A.P.; KLÜPPEL, M.L.W.; OLIVEIRA, M.B.M. Citrinin affects the oxidative metabolism of BHK-21 cells. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 13, p. 267-271, 1995 a.
- CHAGAS, G.M.; KLÜPPEL, M.L.W.; CAMPELLO, A.P.; BUCHI, D.F.; OLIVEIRA, M.B.M. Alterations induced by citrinin in culture kidney cells. **Cell Struct. Funct.**, Kyoto, v. 19, p. 103-108, 1994.
- CHAGAS, G.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; CAMPELLO, A.P.; KLÜPPEL, M.L.W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. II. Effects on respiration, enzyme activities, and membrane potential of rat liver mitochondria, **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 10, p. 209-216, 1992 b.
- CHAGAS, G.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; CAMPELLO, A.P.; KLÜPPEL, M.L.W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III. Effects on renal cortical and liver mitochondrial swelling. **J. Appl. Toxicol.**, Chichester, v. 15, n. 2, p. 91-95, 1995 b.

- CHAGAS G.M.; OLIVEIRA M.B.M.; CAMPELLO A.P.; KLÜPPEL M.L.W., Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. IV Effect on  $\text{Ca}^{2+}$  transport. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 13, p. 53-59, 1995 c.
- CHANCE, B; WILLIAMS, G. R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: I. Kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 217, n. 1, p. 383-393, 1955.
- CHARMLEY, L. L.; ROSENBERG, A.; TRENHOLM, H.L. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxins contamination of grains, foods, and feedstuffs. In: Miller, J. D.; Trenholm, H.L., (Ed.) **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan, 1994. p. 471-486
- CHERNYAK, B.V.; DEDOV, V.N.; CHERNYAK, V.Ya.  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered membrane permeability transition in deenergized mitochondria from rat liver. **FEBS Lett.** Amsterdam, v. 365, p. 75-78, 1995.
- COSTANTINI, P.; CHERNYAK, B.V.; PETRONILLI, V.; BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 271, p. 6746-6751, 1996.
- COSTANTINI, P.; COLONNA, R.; BERNARDI, P. Induction of the mitochondrial permeability transition by N-ethylmaleimide depends on secondary oxidation of critical thiol groups. Potentiation by copper-ortho-phenantroline without dimerization of the adenine nucleotide translocase. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1365, 385-392, 1998.
- CRANE, F. L.; SUN, I. L.; CLARK, M. G.; GREBING, G.; LOW, H. Transplasma-membrane redox systems in growth and development. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.811, p. 233-264, 1985.

- DALOCE, E.J. **Permeabilização da membrana mitocondrial interna por citrinina e  $\text{Ca}^{2+}$** . Curitiba, 1995. p. 64. Tese (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná.
- DAMODARAN, C. In vitro binding of citrinin to serum protein. **Experientia**, v.33, p. 598-599, 1977.
- DINIS, T.C.P.; MADEIRA, V.M.C.; ALMEIDA, L.M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 315, n. 1, p. 161-169, 1994.
- DIRHEIMER, G. Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. **Ver. Méd. Vét. (Toulouse)**, v. 149, n. 6, p. 605-616, 1998.
- DUNN, B.B.; PARK, D.L.; FRIEDMAN, L.; KING, R.L. Metabolism of  $^{14}\text{C}$ -Citrinin in rats preliminary study. **Proc. Int. Symp. Mycotoxins**, p. 393-403, 1983.
- FAGIAN, M.M.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; MARTINS, I.S.; VERCESI, A.E. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by  $\text{Ca}^{2+}$  plus prooxidants, **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 265, p.19955-19960, 1990.
- FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CACIOTTI, B.; SUGHERINI, L.; CICCOLI, L.; GIACHETTI, D.; COMPORTI, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 416, p. 123-129, 1997.
- FINKELSTEIN, E.; ROSEN, G. M.; RAUCKMAN, E. J. Spin Trapping of superoxide and hydroxyl radical: Practical aspects. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 200, n. 1, p. 1-16, 1980.

- FODOR, I.; MARX, J.J.M. Lipid peroxidation of rabbit small intestinal microvillus membranes vesicles by iron complexes. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 961, p. 96-102, 1988.
- FOULER, S. G.; TRIVEDI, A. B.; KITABATAKE, N. Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v. 77, n. 3, p. 631-637, 1994.
- FRANCO, C. M.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B.; CEPEDA, A.; LALLAOUI, L.; PROGNON, P.; MAHUZIER, G. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin. Application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. **J. Chromatogr. Sect. A**, Amsterdam, v. 723, p. 69-75, 1996.
- FUKUZAWA, K.; TADOKORO, T.; KISHIKAWA, K.; MUKAI, K.; GEBICKI, J.M. Site-specific induction of lipid peroxidation by iron in charged micelles. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 260, p. 146-152, 1988.
- FUNK, F.; LENDERS, J. P.; CRICHTON, R. R.; SCHNEIDER, W. Reductive mobilisation of ferritin iron. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 152, p. 167-172, 1985.
- GEIGER, W. B. The mechanism of the antibacterial action of quinones and hydroquinones. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 11, p. 23-32, 1946.
- GOLDSTEIN, D.B. Effects of drugs on membrane fluidity. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.24, p. 43-64, 1984.
- GRINNEL, F.; MILAN, M.; SRERE, P. A. Studies on cell adhesion II. Adhesion of cells to surface of diverse chemical composition and inhibition of adhesion by sulfhydryl reagents. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 153, p. 193-198, 1972.

- GRISHAM, M. B.; WARE, K.; MARSHALL, S., YAMADA, T., SANDHU, I.S. Prooxidant properties of 5-Aminosalicylic Acid. Possible mechanism for its adverse side effects. **Dig. Dis. Sci.**, v. 37, n. 9, p. 1383-1389, 1992.
- GUNTER, T.E. AND PFEIFFER, D.R. Mechanism by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 258, p.755-C786, 1990.
- GUPTA, M.; BANDYOPADHYAY, S.; SASHMAL, D.; MAJUMDER, S.K. Effects of ochratoxin A and citrinin on kidney functions. **IRCS Med. Sci.**, Essex, v. 7, p. 466, 1979 a.
- GUPTA, M.; BANDYOPADHYAY, S.; SASHMAL, D. Effects of ochratoxin A and citrinin on liver fuction and metabolism. **IRCS Med.Sci.**, Essex, v. 7, p. 320, 1979 b.
- GUPTA, M.; DOLUI, A.K.; DEY, S.N.; MUKHERJEE, S.; MAJUMDER, U.K.; BATABYAL, S.K. Effect of the mycotoxin citrinin on some hormones and on enzymes and substrates of the Embden-Meyerhof pathway in mice. **Toxicon**, Oxford, v. 24, p. 519-523, 1986.
- HALESTRAP, A. P.; DAVIDSON, A. M. Inhibition of  $Ca^{2+}$ -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. **Biochem. J.**, London, v. 268, p. 153-160, 1990.
- HALESTRAP. A. P.; KERR, P. M.; JAVADOV, S.; WOODFIELD, K.-Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1366, p. 70-94, 1998.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 186, p. 1-85, 1990.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 1999. 936 p.

- HAMAZAKI, S., OKADA, S., LILI, J., TOYOKUNI, S., MIDORIKAWA, O. Oxygen reduction and lipid peroxidation by iron chelates with special reference to ferric nitrilotriacetate. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 272, p. 10-17, 1989.
- HARAGUCHI, H.; HASHIMOTO, K.; SHIBATA, K. ; TANAGUCHI, M. ; OI, S. Mechanism of antifungal action of citrinin , **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 51, p. 1373-1378, 1987 a.
- HARAGUCHI, H. ; TANAKA, T. ; TANAGUCHI, M. ; OI, S. ; HASHIMOTO, K. Inhibitory effects of citrinin on mitochondrial function, **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, 51, 1453-1454, 1987 b.
- HARAGUCHI, H., TANIGUCHI, M., TANAKA, T., OI, S., HASHIMOTO, K. Citrinin, an electron acceptor having antifungal activity. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 53, p. 1741-1742, 1989.
- HAWORTH, R.A.; HUNTER, D.R. The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the  $\text{Ca}^{2+}$  trigger site. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 195, p. 460-467, 1979.
- HOEHLER, D.; MARQUARDT, R.R.; McINTOSH, A. R.; HATCH, G.M. Induction of free radicals in hepatocytes, mitochondria and microsomes of rats by ochratoxin A and its analogs. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1357, p. 225-233, 1997.
- HSIEH, D.P.H. Potential human health hazards of mycotoxins. In: Natori, S.; Hashimoto, K.; Ueno, Y. (Ed.) **Mycotoxins and Phytotoxins' 88**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 69-79.
- HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanism,. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 195, p. 453-459, 1979 a.



- HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional  $\text{Ca}^{2+}$  release. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 195, p. 468-477, 1979 b.
- HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A.; SOUTHWARD, J.H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 251, p. 5069-5077, 1976.
- JAIN, M.K.; WU, N.M. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III fase transition in lipid bilayer. **J. Membr. Biol.**, v.34, p. 157-201, 1977.
- JEWELL, S. A.; BELLOMO, G.; THOR, H.; ORRENIUS, S. Blebs formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. **Science (Wash., DC)**, v. 217, p. 1257-1259, 1982.
- JONES, T.; SPENCER, R.; WALSH, C. Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavins and dihydroflavins analogues. **Biochemistry**, Washington, DC, v.17, p. 4011-4017, 1978.
- JORDAN, W. H.; CARLTON, W.W. Citrinin mycotoxicosis in the mouse. **Food. Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v. 15, p. 29-34, 1977.
- KELLOGG, E. W.; III; FRIDOVICH, I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 250, p. 8812-8817.
- KOVÁČ, S.; NEMEC, P.; BETINA, V.; BALAN, J. Chemical structure of citrinin. **Nature(Lond.)**, v. 190, p.1104-1105, 1961.
- KOWALTOWSKI, A.J; CASTILHO, R.F.; GRIJALBA, M.T.; BECHARA, E.H.J.; VERCESI, A.E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by  $\text{Ca}^{2+}$  ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 271, p. 2929-2934, 1996 .

- KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E.; CASTILHO, R.F. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by  $\text{Ca}^{2+}$ : correlation with mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1318, p. 395-402, 1997.
- KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.**, Tarrytown, v. 26, p. 463-471, 1999.
- KRABBE, EVERTON L. **Micotoxinas: como reduzir perdas** [on line]. Disponível em: <<http://www.ecologia.com.br/users/rjr/micotoxinas.html>> acesso em 21 ago. 1999.
- KREJCI, M.E., BRETZ, N. S., KOECHEL, D. A. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]plasma. **Toxicology**, Shannon, v. 106, p. 167-177, 1996.
- KROGH, P. Causal associations of mycotoxic nephropathy. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A, Suppl.**, Copenhagen, n. 269, p. 23, 1978.
- KROGH, P. The role of mycotoxins in disease of animal and man. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, p. 99S-104S., 1989.
- KROGH, P.; HASSELAGER, E.; FRIIS, P. Studies on fungal nephrotoxicity. 2. Isolation of two nephrotoxic compound from *Penicillium viridicatum* Westling: citrinin and oxalic acid. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect B, Microbiol.**, Copenhagen, v. 78, p.401-413, 1970.
- KUIPER-GOODMAN, T. Prevention of human mycotoxicoses through risk assessment and risk management. In: Miller, J. D.; Trenholm, H.L., (Ed.) **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan, 1994. p. 439-469.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (Lond.)**, v. 227, p. 680-685, 1970.

- LE QUOC, D; LE QUOC, K. Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 273, p. 466-478, 1989.
- LEMASTERS, J. J.; NIEMINEN, A-L; QIAN, T.; TROST, L. C.; ELMORE, S. P.; NISHIMURA, Y.; CROWE, R. A.; CASCIO, W.E.; BRADHAM, C..A.; BRENNER, D. A.; LENA Z, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1366, p. 53-67, 1998.
- LENTZ, B. R.; BARENHOLZ, Y.; THOMPSON, T. E. Fluorescence depolarization studies of phase transition and fluidity in phospholipid bilayers. 1-Single component phosphatidylcholine liposomes. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 15, n.20, p. 4521-4528, 1976.
- LITMAN, B. J.; BARENHOLZ, Y. Fluorescent probe diphenylhexatriene. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 81, p. 678-685, 1982.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.C.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folinphenol reagent, **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACHARETTI, H.; GOMES, E. M.; SILVA JR, J. G. Atividade da succinato desidrogenase em mitocôndrias isoladas como teste de avaliação toxicológica em camundongos intoxicados por citrinina. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v. 38, n. 3, p. 785-792, 1995.
- MATHIESON, D.W.; WHALLEY, W.B. The chemistry of fungi. Part XLIV. The conformation of citrinin. **J. Chem. Soc.(Lond.)**, p.4640-4641, 1964.
- MERRYFIELD, M. L.; LARDY, H. A.  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occur via release of  $\text{Fe}^{2+}$  from rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 257, n. 7, p. 3628-3635, 1982.
- MINOTTI, G., AUST, S. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 262, p. 1098-1104, 1987.

- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature (Lond.)**, v. 191, p. 144-148, 1961.
- MITCHELL, J.H.; GARDNER, P.T.; McPHAIL, D.B.; MORRICE, P.C.; COLLINS, A.R.; DUTHIE, G.G. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 360, p. 142-148, 1998.
- MONTEIRO, H. P.; WINTERBOURN, C. C. 6-Hydroxydopamine releases iron from ferritin and promotes ferritin-dependent lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 38, p. 4177-4182, 1989.
- MOREL, I.; LESCOAT, G.; COGREL, P.; SERGENT, O.; PASDELOUP, N.; BRISSOT, P.; CILLARD, P.; CILLARD, J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 45, p. 13-19, 1993.
- MORRISON, R.; BOYD, R. Compostos de carbonilo insaturados - $\alpha,\beta$  adição conjugada. In: \_\_\_\_\_ **Química Orgânica**. 8. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1983. p.1389-1411.
- MOULÉ, Y. Biochemical effects of mycotoxins. In: \_\_\_\_\_ **Mycotoxins: Production, Isolation, Separation and Purification**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. p. 37-43.
- MUGABE, J. Grain of truth in fears of biotechnology. **Nature (Lond.)**, v. 399, p. 319-320, 1999.
- NEPOMUCENO, M.F.; MACEDO D.V. AND PEREIRA-DA-SILVA, L. Lipoperoxidation associated with mitochondrial membrane permeabilization in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 833-836, 1991.
- NICHOLLS, D. G. **Bioenergetics: an introduction to the chemiosmotic theory**. New York: Academic Press, 1982. 190 p.

- NOVGORODOV, S.A.; GUDZ, T.I.; BRIERLEY, G.P. AND PFEIFFER, D.R. Magnesium ion modulates the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore to cyclosporin A and ADP. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 311, p. 219-228, 1994.
- NOVGORODOV, S.A.; GUDZ, T.I.; MILGROM, Y.M. AND BRIERLEY, G.P.. The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A, **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 267, p. 16274-16282, 1992.
- OMAR, R.F.; HASINOFF, B.B.; MEJILLA, F.; RAHIMTULA, A. D. Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 40, p. 1183-1191, 1990.
- OMINSKI, K. H.; MARQUARDT, R.R.; SINHA, R.N., ABRAMSON, D. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: Miller, J. D.; Trenholm, H.L., (Ed.) **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan, 1994. p. 287-312.
- OTEIZA, P. I.; KLEINMAN, C.G.; DEMASI, M.; BECHARA, E. J. H. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 316, p. 607-611, 1995.
- PEREIRA, R. S.; BERTOCCHI, A. P. F.; VERCESI, A. E. Protective effect of trifluoperazine on the mitochondrial damage induced by  $\text{Ca}^{2+}$  plus prooxidants. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 44, p. 1795-1801, 1992.
- PESTKA, J. J.; BONDY, G. S. Immunotoxic effects of mycotoxins. In: Miller, J. D.; Trenholm, H.L., (Ed.) **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan, 1994. p. 339-358
- PETRONILLI, V.; COLA, C.; MASSARI, S.; COLONNA, R.; BERNARDI, P. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive

- permeability transition pore of mitochondria, **J. Biol. Chem**, Bethesda, v. 268, p. 21939-21945, 1993.
- PETRONILLI, V.; COSTANTINI, P.; SCORRANO, L.; COLONNA, R.; PASSAMONTI, S.; BERNARDI, P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiol. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 269, p. 16638-16642, 1994.
- PETRONILLI, V.; SZABÒ, I.; ZORATTI, M. The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 259, n.1, p. 137-143, 1989.
- PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, v. 38, p. 161-170, 1980.
- PRELUSKY, D. B.; ROTTER, B. A.; ROTTER, R. G. Toxicology of mycotoxins. In: Miller, J. D.; Trenholm, H.L., (Ed.) **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan, 1994. p. 359-403
- PRELUSKY, D.B. Residues in food products of animal origin. In: Miller, J. D.; Trenholm, H.L., (Ed.) **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan, 1994. p. 405-419.
- PUNTARULO, S.; CEDERBAUM, A. I. Stimulation of microsomal chemiluminescence by ferritin. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1157, p. 1-8, 1993.
- RAHIMTULA, A. D.; BÉRÉZIAT, J. – C.; BUSSACCHINI-GRIOT, V.; BARTSCH, H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 37, p. 4469-4477, 1988.
- RAJAN, K.S.; SINHA, A. Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, India. **J. Sci. Food Agric.**, Chichester, v. 56, p. 39-47, 1991.

- RAMADOSS, C.S.; MUKHERJEE, A. *In vitro* inhibition of bovine liver glutamate dehydrogenase by citrinin, a mycotoxin. **J. Antibiot.(Tokyo)**, v. 30, p. 172-174, 1977.
- REDDY, R.V.; TAYLOR, M.J.; SHARMA, R.P. Evaluation of citrinin toxicity on the Immune Functions of Mice. **J. Food. Protect.**, Ames, v. 51, p.32-36, 1988.
- RIBEIRO, S.M.R.; CAMPELLO, A. P. C; CHAGAS, G.M.; KLÜPPEL, M. L. W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. VI. Effect on iron-induced lipid peroxidation of rat liver mitochondria and microsomes. **Cell Biochem.Funct.**, Chichester, v.16 , p. 15-20, 1998.
- RIBEIRO, S.M.R., CHAGAS, G.M., CAMPELLO, A P. C., KLÜPPEL, M. L. W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v.15 , p. 203-209, 1997.
- ROBINSON, P.M.; PARK, D. Citrinin - a fungistatic antibiotic and narrowing factor. **Nature(Lond.)**, v.211, n. 5051, p. 883-884, 1966.
- ROGINSKY, V. A.; BARSUKOVA, T. K.; BRUCHELT, G.; STEGMANN, H. B. Iron bound ferritin catalyzes ascorbate oxidation: effects of chelating agents. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1335, p. 33-39, 1997.
- ROSA, C.A.R.; CRUZ, L. C. H.; CHAGAS, W.A.; VEIGA, C.E.M.O. Ocorrência natural de nefropatia micotóxica suína causada pela ingestão de cevada contaminada com citrinina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, v.7, n.3, p.87-90, 1985.
- SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 19, p. 481-486, 1995.
- SANTOS, A.C.; UYEMURA, S.A.; LOPES, J.L.C.; BAZON, J.N.; MINGATTO, F.E.; CURTI, C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane

- permeability transition in mitochondria. **Free Radical. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 24, p. 1455-1461, 1998.
- SAVARD, M. E.; BLACKWELL, B. A. Spectral characteristics of secondary metabolites from *Fusarium* fungi. In: Miller, J. D.; Trenholm, H.L., (Ed.) **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan, 1994. p. 59-257.
- SCHNELLMANN, R. G. Mechanisms of *t*-butyl hydroperoxide-induced toxicity to rabbit renal proximal tubules. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 255 (Cell Physiol. 24) C28-C33, 1988.
- SCOTT, P.M. *Penicillium* and *Aspergillus* toxins. In: Miller, J. D.; Trenholm, H.L., (Ed.) **Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan, 1994. p. 201-210.
- SERAGELDIN, I. Biotechnology and food security in the 21st century. **Science (Wash., DC)**, v. 285, n. 5426, p. 387-389, 1999.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. 299 p.
- SINHA, K.K.; SINHA, A.K. Incidence of mycotoxigenic fungi on stored grain insects, *Sitophilus oryzae* and *Tribolium casteneum*. **Proc. Indian Natn. Sci. Acad.**, New Delhi, v. B57, p. 77-79, 1991.
- SKULACHEV, V. P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 397, p. 7-10, 1996.
- SMITH, J. E.; MOSS M. O. Human mycotoxicoses. In: \_\_\_\_\_ **Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance**. Great Britain: John Wiley & Sons, 1985 a. p. 73-82.



SMITH, J. E.; MOSS M. O. Natural occurrence of mycotoxins. In: \_\_\_\_\_ **Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance**. Great Britain: John Wiley & Sons, 1985 b. p. 83-103.

SMITH, J. E.; MOSS M. O. Implications of mycotoxins in animal disease. In: \_\_\_\_\_ **Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance**. Great Britain: John Wiley & Sons, 1985 c. p. 50-72.

SMITH, J. E.; MOSS M. O. Structure and formation of mycotoxins. In: \_\_\_\_\_ **Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance**. Great Britain: John Wiley & Sons, 1985 d. p. 31-49.

STORMER, F.C.; SANDVEN, P.; HUITFELDT, H.S.; EDUARD, W.; SKOGSTAD, A. Does the micotoxin citrinin function as a sun protectant in conidia from *Penicillium verrucosum*? **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 142, p. 43-47, 1998.

SZABÒ, I.; ZORATTI, M. The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A, **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 266, p. 3376-3379, 1991.

SZABÒ, I.; BERNARDI, P.; ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 267, p. 2940-2946, 1992.

TANGERAS, A.; FLATMARK, T.; BÄCKSTRÖM, D.; EHRENBERG, A. Mitochondrial iron not bound in heme and iron-sulphur centers. Estimation, compartmentation and redox state. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 589, p. 162-175, 1980.

THOMAS, C. E.; MOREHOUSE, L.A.; AUST, S.D. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 260, p. 3275-3280, 1985.

TIEN, M., MOREHOUSE, L.A., BUCHER, J.R., AUST, S.D. The multiple effects of ethylenediaminetetraacetate in several model lipid peroxidation systems. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 218, p. 450-458, 1982.

TIMONIN, M.I. Another mould with anti-bacterial ability. **Science(Wash. DC)**, v. 96, p. 2500, 1942.

TOPLACK, H.; BATCHIULIS, V.; HERMETTER, A.; HUNZINKER, T.; HONEGGER, U.E.; WIESMANN, U.N. Effects of culture and incubation conditions on membrane fluidity in monolayers of culture cells measured as fluorescence anisotropy using trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH). **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1028, p. 62-72, 1990.

TRIVERDI, A. B.; DOI, E.; KITABATAKE, N. Toxic compounds formed on prolonged heating of citrinin watery conditions. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 58, p. 229-231, 1993.

UNIVERSIDADE DO CAMPO. Os fungos causam prejuízos à criação de suínos: abra o olho [on line]. Disponível em: < <http://celepar6.pr.gov.br/ucampo/suinos2.html> > acesso em 21 ago. 1999.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN BALEN, G. P.; VAN DEN BERG, D.-J.; BAST, A.; VAN DER VIJGH, W. J. F. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 56, p. 935-943, 1998.

VAN HOLDE, K. E. Absorption and emission of radiation. In: HAGER, L.; WOLD, F. *Physical Biochemistry*. New Jersey: Prentice-Hall, 1975. p. 171-175.

VAZQUEZ, B.I.; FENTE, C.; FRANCO, C.; CEPEDA, A.; PROGNON, P.; MAHUZIER, G. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and citrinin in cheese by time-resolved luminescence using terbium. **J. Chromatogr. Sect.A**, Amsterdam, v. 727, p. 185-193, 1996.

VERCESI, A. E.; KOWALTOWSKI, A. J.; GRIJAIIBA, M. T.; MEINICKE, A. R.; CASTILHO, R. F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosc. Rep.**, New York, v. 17, p. 43-52, 1997.

VIÑAS, I.; DABON, J.; SANCHIS, V. Citrinin-producing capacity of *Penicillium expansum* strains from apple packinghouses of Lerida (Spain). **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 19, p. 153-156, 1993.

- VOSS, D.O.; CAMPELLO, A.P.; BACILA, M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria, **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, Orlando, v. 4, p. 48-51, 1961.
- WANG, H.; JONES, C.; CIACCI-ZANELLA, J.; HOLT, T.; GILCHRIST, D.G. DICKMAN, M.B. Fumonisisns and *Alternaria alternata lycopersici* toxins: Sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v. 93, p. 3461-3465, 1996.
- WARREN, H. H.; DOUGHERTY, G.; WALLIS, E.S. The syntesis and antibiotic activity of analogs of citrinin and dihydrocitrinin. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, DC, v.79, p.3812-3815, 1957.
- YONEYAMA, M.; SHARMA, R.P. Biochemical alterations induced by citrinin in cultured kidney epithelial cell systems, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 16, p. 765-770, 1987.
- ZORATTI, M; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition, **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1241, p. 139-176, 1995.