

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DO
DIPYRIDAMOL EM MITOCÔNDRIAS E
MITOPLASTOS**

Maria Eugênia de Oliveira Mamede

Campinas - SP

1999

AÇÃO ANTIOXIDANTE DO DIPIRIDAMOL EM MITOCÔNDRIAS E MITOPLASTOS

MARIA EUGÊNIA DE OLIVEIRA MAMEDE

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Maria Eugênia de Oliveira Mamede e aprovada pela Comissão Julgadora M. Silva

25/02/99

Orientadora:
Profa. Dra. Lucia Pereira-da-Silva
Depto. de Bioquímica-IB-UNICAMP

Tese apresentada ao curso de pos-graduação para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Bioquímica.

CAMPINAS-SP

1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

JNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
V.	Ex
TOMBO BC/	37607
PROC.	229199
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/05/99
N.º CPD	

CM-00122992-1

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M31a **Mamede, Maria Eugênia de Oliveira**
Ação antioxidante do dipiridamol em mitocôndrias e
mitoplastos/Maria Eugênia de Oliveira Mamede. -- Campinas,
SP:[s.n.], 1999.
55f.:ilus.

Orientadora: Lucia Pereira da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Mitocôndria. 2. Íons de ferro. 3. Peroxidação. I. Silva,
Lucia Pereira da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Local e Data: - Campinas, 25 de fevereiro de 1999

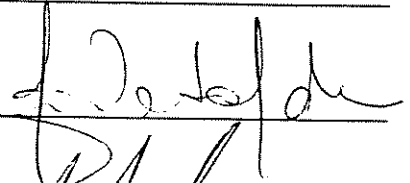
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

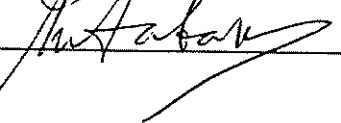
Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva (Orientadora)



Profa. Dra. Eneida de Paula



Prof. Dr. Marcel Tabak



SUPLENTE:

Profa. Dra. Maria de Fatima Nepomuceno



“Este mundo é inconcluso:
Além, há continuação.
Invisível, como a música.
Evidente como o som.”

Emily Dickinson

Dedico esta tese a
minha família.

Os experimentos com Fluorescência foram feitos sob orientação do Dr. Marcel Tabak, pesquisador do Instituto de Química da USP – São Carlos e da Dra. Maria de Fátima Nepomuceno, Profa. da Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP e pesquisadora em nosso laboratório.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva, a Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, a Profa. Dra. Maria de Fátima Nepomuceno, ao Prof. Marcel Tabak pela orientação e dedicação.

A todos os colegas e funcionários do departamento.

A todos os professores pelos conhecimentos transmitidos, especialmente aos professores Dr. Hiroshi, Dra. Eneida, Dra. Marcela que contribuíram para realização deste trabalho.

À minha família pelo incentivo.

A CAPES pelo apoio financeiro.

ABREVIACÕES

ADP- Adenosina 5'difosfato

ATP- Adenosina 5'trifosfato

BHT- Butilhidroxitolueno

CuOOH – Hidroperóxido de cumeno

DH- Desidrogenase

DIP- Dipiridamol

DNA- Ácido desoxirribonucléico

DTT-Ditiotreitol

EGTA- Ácido etileno glicol-bis (β -amino éter) N,N,N',N',-Tetracético

EPR - Resonância Paramagnética Eletrônica

FAD- Flavina adenina dinucleotídeo oxidada

FADH₂ - Flavina adenina dinucleotídeo reduzida

GDP- Guanosina 5'difosfato

GPX- Glutathiona peroxidase

GRT- Glutathiona redutase

GSH- Glutathiona reduzida

GSSG- Glutathiona oxidada

GTP- Guanosina 5'trifosfato

HEPES- [N-(2 hidroxietil) piperasina N'-(2-ácido etanosulfônico)]

I- Intensidade de fluorescência

MAL- Malato

MBR - Receptor periférico de benzodiazepínicos

MFR- Mitocôndria de Fígado de Rato

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (forma reduzida)

NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)

NADPH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (forma reduzida)

OXAL- Oxaloacetato

Pi- fosfato inorgânico

SOD- Superóxido dismutase

TBARS- Substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico

TDH- Transidrogenases

INDÍCE

RESUMO----- 1

ABSTRACT----- 2

INTRODUÇÃO----- 3

Mitocôndrias como fonte de radicais livres----- 3

Íons de ferro----- 1 0

Peroxidação lipídica----- 1 2

Papel dos íons de ferro na iniciação da peroxidação lipídica----- 1 4

Dipiridamol----- 1 6

OBJETIVOS----- 2 0

MATERIAIS E MÉTODOS----- 2 1

Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato----- 2 1

Isolamento de Mitoplastos----- 2 2

Determinação do consumo de oxigênio----- 2 4

Determinação do consumo de oxigênio extra por Mitocôndrias de Fígado de Rato (MFR) na presença de FeSO_4 -----	2 5
Determinação das constantes de associação do Dipiridamol-----	2 7
Determinação da associação do Dipiridamol com íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} -----	2 8
Determinação das variações do Volume Mitocondrial-----	2 9
RESULTADOS -----	3 0
Efeito do Dipiridamol sobre o consumo de oxigênio por Mitocôndrias-----	3 0
Efeito do Dipiridamol sobre o inchamento Mitocondrial induzido por oxidantes de grupos tiólicos-----	3 3
Efeito do Dipiridamol sobre o consumo de oxigênio induzido por Fe^{2+} em Mitocôndrias e Mitoplastos-----	3 5
Associação do Dipiridamol com a Membrana Mitocondrial Interna--	3 8
Efeito da adição de Dipiridamol ou Butilhidroxitolueno após a velocidade de consumo extra de oxigênio (v_1)-----	4 1
Ação do Dipiridamol com quelante de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} -----	4 3

DISCUSSÃO----- 4 5

5 0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----

6 0

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS-----



RESUMO

O Dipiridamol (DIP) é um vasodilatador coronário, antiplaquetário que atua de maneira sinérgica com várias drogas antitumorais, além de possuir atividade antioxidante em diferentes sistemas de membrana, interagindo com micelas, monocamadas de fosfolípidios, vesículas e membranas biológicas. O efeito antioxidante do DIP sobre a lipoperoxidação mitocondrial induzida por Fe^{2+} já foi estudado, observando-se boa correlação com sua característica lipofílica (Nepomuceno et alii, 1997). Neste trabalho, utilizando mitocôndrias e mitoplastos o papel do DIP como inibidor da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} , foi melhor estudado. A utilização de baixas concentrações de DIP não provocou mudanças no estado respiratório 4 nem no estado respiratório 3 e portanto, a interação do DIP com os receptores periféricos de benzodiazepínicos foi descartada. A constante de associação do DIP com mitoplastos foi estimada em torno de $1,1 \pm 0,2 \text{ (mg/mL)}^{-1}$. Este valor é ligeiramente superior ao obtido para mitocôndrias, $0,8 \pm 0,1 \text{ (mg/mL)}^{-1}$. Observou-se para os mitoplastos que o DIP não foi totalmente recuperado após incubação com essas membranas, provavelmente devido à metabolização da droga formando um produto não fluorescente. Os estudos de consumo de oxigênio na presença de FeSO_4 mostraram que o efeito antioxidante do DIP não provocou mudanças na oxidação do Fe^{2+} . Nossos dados permitem-nos sugerir que o efeito antioxidante do DIP está relacionado com a sua partição na membrana e não à sua ligação específica a proteínas de membrana. A proteção contra a peroxidação lipídica pode ser devida à inibição direta das reações de propagação ou à ação do DIP em sequestrar as espécies radicalares que poderiam iniciar o processo peroxidativo.

ABSTRACT

Dipyridamole (DIP), a coronary vasodilator, presents activity for a number of antitumor drugs as well as antioxidant activity in membrane systems. DIP and derivatives interact with membrane systems such as micelles, phospholipid monolayers, vesicles and biological membranes. The antioxidant effect of DIP upon iron induced lipoperoxidation on mitochondria has been reported and a good correlation between the hydrophobicity and its protective effect was found (Nepomuceno et alii, 1997). In the present work an effort is made to better understand the role of DIP as inhibitor of Fe^{2+} -induced lipid peroxidation in mitochondria and mitoplasts. At low concentration, no significant effect on either state IV or state III respiration was found, discarding a possible direct interaction of DIP with the peripheral benzodiazepine receptor. The association constants for DIP in mitoplasts were estimated, being $1.1 \pm 0.2 \text{ (mg/mL)}^{-1}$. This value is slightly higher than that obtained for mitochondria, $0.8 \pm 0.1 \text{ (mg/mL)}^{-1}$. It was observed that under mitoplast was used, some of the drug was not recovered, probably due to DIP metabolization into a no fluorescent species. Oxygen consumption studies in the presence of FeSO_4 showed that the antioxidant effect of DIP did not involved the initial step of Fe^{2+} oxidation. Our data strongly support the hypothesis that the antioxidant effect of DIP is related to its partition in the lipid phase of the mitochondrial or mitoplast membrane and not to a specific interaction with membrane proteins. This protection may be due either to a direct inhibition of the propagation steps or a scavenger effect, removing the radicalar species that would trigger the peroxidative process.

INTRODUÇÃO

Mitocôndrias como Fonte de Radicais Livres

As mitocôndrias são organelas envoltas por duas membranas, uma externa e outra interna que diferem entre si não só na composição lipídica e proteica, como principalmente na função exercida dentro da célula. Ambas possuem um alto grau de ácidos graxos poliinsaturados nos dois maiores grupos de fosfolípidios (fosfatidilcolina e fosfatidietanolamina) e, medidas em relação à quantidade de proteína, que constituem aproximadamente 75 % ($\mu\text{g}/\text{mg}$) dos fosfolípidios totais. Em menor proporção aparecem a cardiolipina com 18 % ($\mu\text{g}/\text{mg}$) e o colesterol com 3 % ($\mu\text{g}/\text{mg}$) (Cullis & Hope, 1985).

A membrana mitocondrial interna é rica em proteínas envolvidas no metabolismo celular e que correspondem a aproximadamente 80 % ($\mu\text{g}/\text{mg}$) dos componentes dessa membrana. Os cerca de 20 % ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de lípidios presentes são constituídos principalmente de cardiolipina (Daum, 1985).

A membrana externa, é rica em porinas, que somam 1 % ($\mu\text{g}/\text{mg}$) das proteínas mitocondriais totais, sendo altamente permeável o que confere ao espaço intermembrânico uma composição iônica próxima do meio citosólico. Ao contrário, a membrana interna é altamente seletiva, sendo permeável somente a O_2 , H_2O e NH_3 . Quaisquer outros metabólitos, para atravessar a membrana interna e chegar à matriz mitocondrial precisam de transportadores específicos (Haworth & Hunter, 1980). Esta característica da membrana interna é que confere às mitocôndrias o papel de produtoras de energia nas células.

Sabe-se que a produção aeróbia de ATP ocorre nas mitocôndrias, mais precisamente pelo acoplamento entre cadeia respiratória e ciclo de Krebs. A produção

de ATP está intimamente ligada à formação de um gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$), conhecido como força proton motriz e que possui dois componentes: um elétrico ($\Delta\psi$), com carga negativa no interior das mitocôndrias e outro químico (ΔpH) alcalino na matriz. Esses componentes estão relacionados entre si de acordo com a equação (Cramer & Knaff, 1991):

$$\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\psi - 60\Delta\text{pH}.$$

A formação do $\Delta\mu\text{H}^+$ é garantida pela reoxidação das coenzimas NADH e FADH_2 (formadas nas vias catabólicas que ocorrem através do ciclo de Krebs, da β -oxidação, da descarboxilação do piruvato, etc.) através das proteínas da cadeia de transporte de elétrons, situadas na membrana mitocondrial interna. Ou seja, as reações de óxido-redução que ocorrem pela passagem de elétrons pelos quatro complexos proteicos geram energia suficiente para bombear prótons unidirecionalmente da matriz para o espaço intermembranas. A volta específica de prótons pela enzima F_0F_1 ATPase (ATP sintetase), também localizada na membrana mitocondrial interna é termodinamicamente favorável e é imprescindível para a liberação do ATP formado (Mitchell, 1961) (Figura 1).

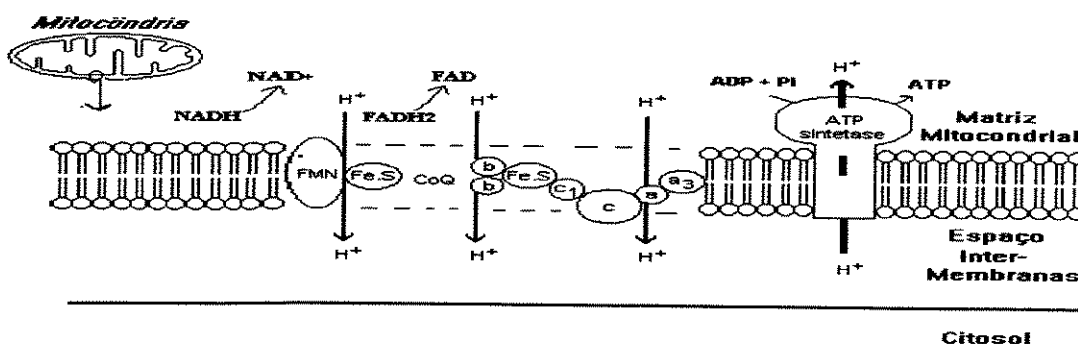


Figura 1. Esquema da membrana interna da mitocôndria, mostrando a formação do $\Delta\mu\text{H}^+$ e a entrada de prótons pela *FoF1-ATP sintetase*, imprescindível para a síntese de ATP.

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é constituída de proteínas e um composto lipídico, a coenzima Q. Estes componentes foram separados em quatro complexos. O complexo I (*NADH-CoQ redutase*) é constituído por flavina mononucleotídeo (FMN) e proteínas Fe-S. A reoxidação do NADH fornece elétrons que reduzem o complexo I. Este complexo é reoxidado pela coenzima Q. O complexo II (*succinato-CoQ redutase*) é constituído por FADH₂, proteínas Fe-S e citocromo *b*₅₆₀. A reoxidação do FADH₂ reduz o complexo II, que também é reoxidado pela CoQ. Esta é reoxidada pelo complexo III (*CoQ-citocromo c redutase*), constituído por citocromo *b*, proteínas Fe-S e citocromos *c* e *c*₁ que por sua vez é reoxidado pelo citocromo *c* (Fe⁺²/Fe⁺³), que se reoxida reduzindo o complexo IV. O complexo IV (*citocromo c oxidase*) é reoxidado, pela redução do O₂ a H₂O e é constituído por citocromo *a* e citocromo *a*₃. O potencial redox da cadeia respiratória varia de -320 (complexo I) até 380 mV (complexo IV). Normalmente, a redução do O₂ ocorre dentro do complexo IV e embora seja feita em quatro etapas univalentes, somente água é liberada como produto final da reação (Boyer et alii, 1977).

Como o O₂ é um elemento com forte tendência em aceitar elétrons, a passagem dos elétrons pela cadeia respiratória pode resultar na formação de radicais livres toda vez que ocorrer sua redução incompleta (Boveris & Chance, 1972). Radical livre, por definição, é toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados sendo portanto altamente reativo, com um alto poder oxidante.

A adição de um elétron à molécula de oxigênio (O₂) dá origem ao radical ânion superóxido (O₂^{•-}). Nas mitocôndrias a produção de O₂^{•-} ocorre pela transferência de elétrons pela CoQ, em quantidades consideráveis, e em menor grau pela NADH desidrogenase (Boveris & Chance, 1972).

A coenzima Q (CoQ) ou Ubiquinona (forma oxidada) poder ser reduzida por dois ou apenas um elétron. Quando reduzida por apenas um elétron dá origem à formação da coenzima QH ou ubisemiquinona (semiquinona), e quando reduzida

por dois elétrons dá origem a coenzima QH₂ ou Ubiquinol (hidroquinona) que é bastante estável. Tanto a hidroquinona quanto a semiquinona, em uma condição de sobrecarga de elétrons, são reoxidadas doando seus elétrons para o oxigênio com produção de radical ânion superóxido (Figura 2).

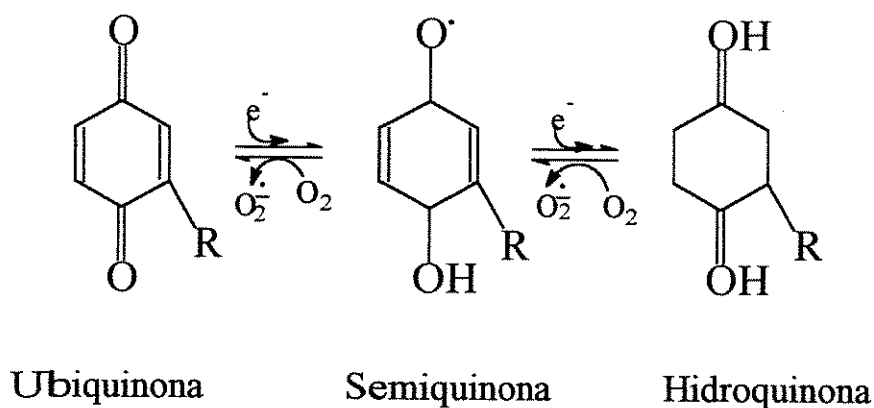
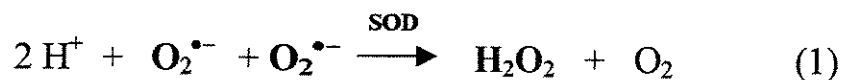


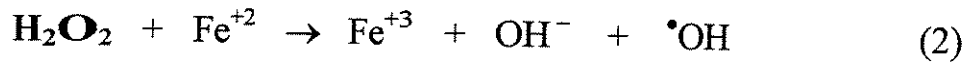
Figura 2. Produção de radical ânion superóxido através da coenzima Q (Smith et alii, 1985).

As células, por sua vez, possuem suas próprias defesas anti-radicais. A superóxido dismutase é uma enzima que está presente tanto no citossol quanto nas mitocôndrias, exercendo a função de catalizar a reação de dismutação do radical ânion superóxido. Esta reação consome prótons e produz peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (reação 1).



A alta produção de O₂^{•-} leva conseqüentemente à excessiva produção de H₂O₂ que "per se" não é uma espécie radicalar; nem um oxidante potente. No entanto,

como o H_2O_2 pode atravessar facilmente as membranas, ao reagir com Fe^{+2} ou Cu^+ através da reação de Fenton (reação 2) pode levar à produção do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), o qual é muito instável, reagindo onde é formado (Tien et alii, 1982; Halliwell & Gutteridge, 1989 b) (reação 2):



Desta forma, duas enzimas: a catalase (reação 3), presente principalmente nos peroxissomas e a glutathiona peroxidase (GPX) (Figura 3) localizada tanto no citosol quanto nas mitocôndrias têm a função de proteger o organismo contra a alta produção de H_2O_2 . Esta última enzima utiliza o poder redutor do NADPH e da glutathiona reduzida (GSH) e necessita do auxílio das enzimas glutathiona redutase (GRT), transidrogenase (TDH) e de desidrogenases do ciclo de Krebs (DH) para seu funcionamento (Figura 3) (Chance et alii, 1979; Naqui et alii, 1986).

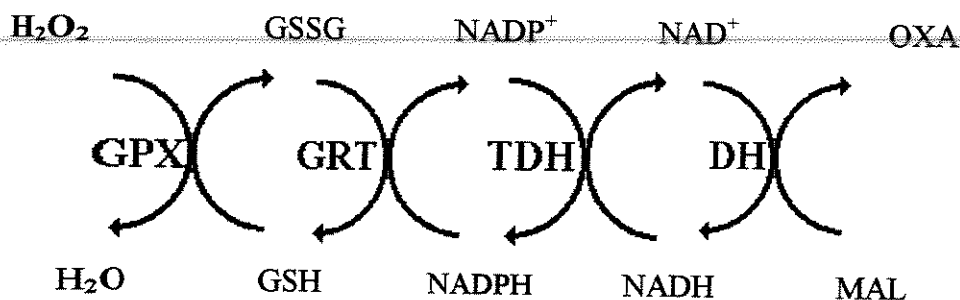
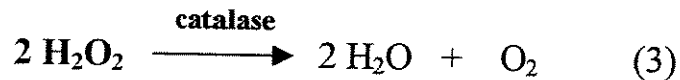


Figura 3. Mecanismo de ação do sistema glutathiona peroxidase/glutathiona redutase e sua interação com os sistemas redutores celulares.

Além dos antioxidantes enzimáticos, moléculas sequestradoras de espécies radicalares tais como o ascorbato, GSH, cisteína e α -tocoferol, embora ofereçam proteção menos específica, também limitam o dano oxidativo nas células (Halliwell, 1978).

Quando num organismo há um desequilíbrio entre produção e defesa, seja por um excesso na produção de espécies radicalares ou pela queda na capacidade do seu sistema de defesa antioxidante, diz-se que este se encontra em uma situação de estresse oxidativo. Esta condição de estresse oxidativo desencadeia uma série de processos que podem levar ao dano ou mesmo morte celular (Figura 4).

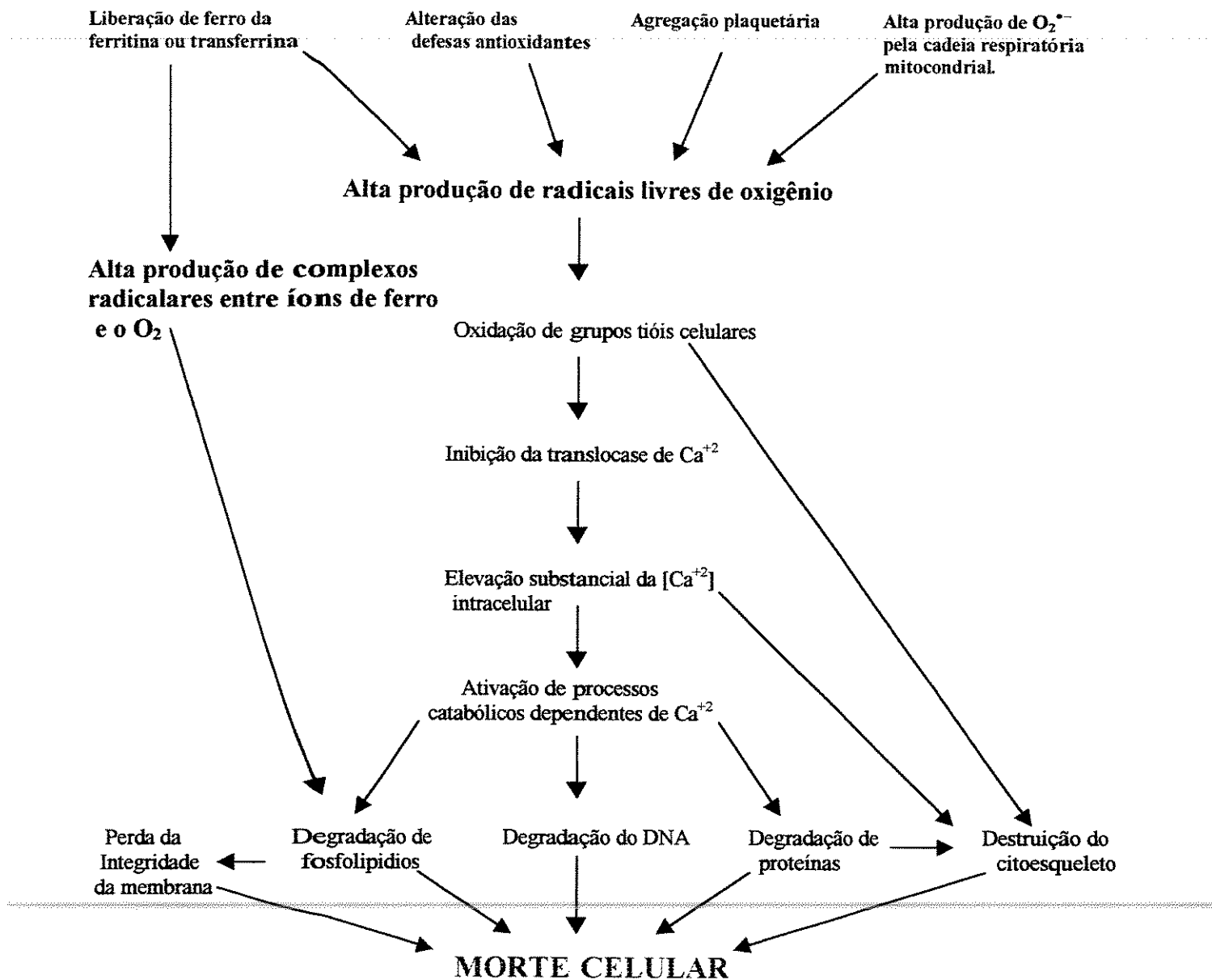


Figura 4. Esquema da produção de espécies radicalares com seus possíveis alvos de ataque levando conseqüentemente à morte celular (segundo Rice- Evans & Burdon, 1993).

Íons de Ferro

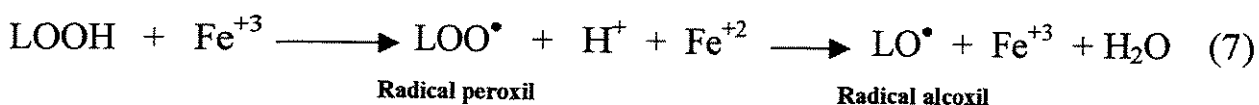
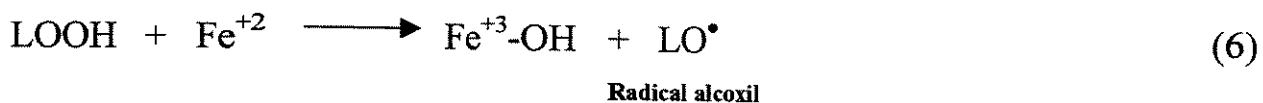
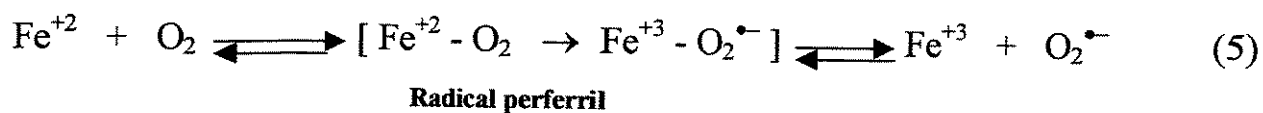
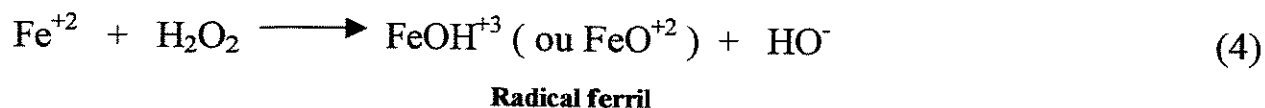
O ferro é um metal de transição que pode assumir diferentes estados de oxidação. Os três estados mais comumente encontrados nos sistemas biológicos são: Fe^{2+} , Fe^{3+} e em menor proporção Fe^{4+} (Ryan & Aust, 1992)

Nos organismos vivos, o ferro é o metal mais abundante pois faz parte da estrutura de enzimas e complexos proteicos. Algumas enzimas apresentam sua atividade baseadas no potencial do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ para catalizar a oxidação ou redução de biomoléculas. O potencial redox do ferro é dependente de sua coordenação. No entanto, quando o ferro está ligado a proteínas do tipo hemoglobina, mioglobina ou ao complexo do citocromo c da cadeia respiratória, as reações de oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} com a possível formação de espécies radicalares (reação 2) não são energeticamente favoráveis (Ryan & Aust, 1992; Meneghini, 1997).

O Fe^{2+} livre no organismo é altamente tóxico e desta forma os organismos desenvolveram todo um complexo sistema para controlar seu transporte, armazenagem e metabolismo. No sangue, o ferro é transportado pela proteína transferrina, através de um complexo ferro-transferrina. Além da função de transporte esta proteína é também responsável pela homeostase intracelular de ferro. Seu armazenamento na célula é função da proteína ferritina, que só armazena Fe^{3+} , por isso todo o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} por um processo ainda não totalmente explicado (Meneghini, 1997).

A toxicidade do Fe^{2+} pode ser explicada pela reação 2 pois ele é catalizador da reação de Fenton que gera o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), espécie altamente reativa. Entretanto, os íons de ferro "*per se*" também são considerados radicais livres (Halliwell, 1978; Halliwell & Gutteridge, 1990) e além de contribuir para a formação de $\cdot\text{OH}$ também podem formar complexos com o O_2 , como o radical ferril (com valência IV) (reação 4), extremamente reativo (Koppenol & Liebman, 1984; Ullrich,

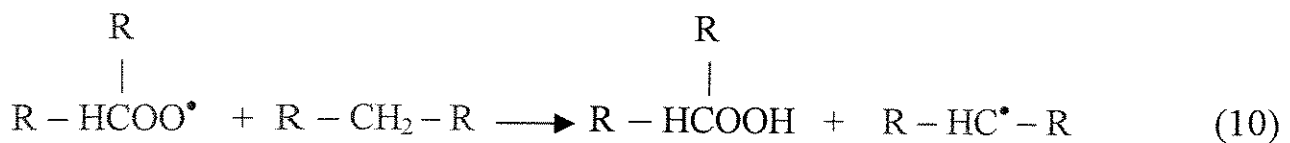
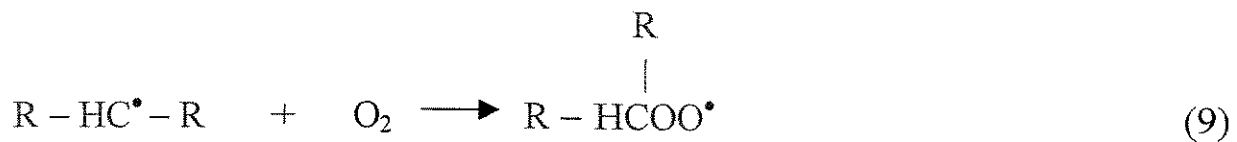
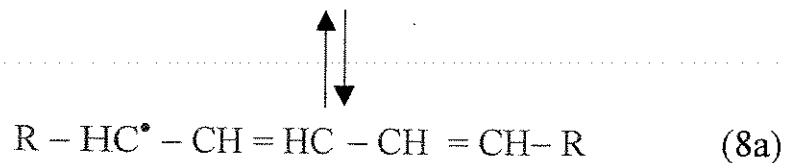
1984) ou o íon perferril, com valência V, menos reativo (reação 5) (Bucher et alii 1983). Além disso, o Fe^{2+} pode reagir com peróxidos lipídicos de maneira similar ao peróxido de hidrogênio, causando a quebra da ligação O-O com formação do radical alcóxil (reação 6). Já o Fe^{3+} pode formar ambos, radicais peróxil e alcóxil (reação 7) (Brien, 1969; Waters, 1976; Braugler et alii, 1986).



Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é um processo degradativo que envolve reações entre radicais livres e membranas biológicas levando a alterações estruturais e funcionais (Bindoli, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1989b; Rice-Evans & Burdon, 1993). Dentre estas alterações estão a diminuição na fluidez da membrana, intimamente relacionada com a maioria de suas funções, como transporte de íons e permeabilidade seletiva entre outras. A peroxidação das membranas biológicas é um processo que ocorre normalmente. Em situações de estresse oxidativo esta é aumentada podendo contribuir e causar certas patologias como os processos de isquemia/reperfusão e aterosclerose (Halliwell & Gutteridge, 1990; Rice Evans & Diplock, 1993). Nesse processo degradativo ocorrem uma série de reações em cascata, que envolvem três passos básicos: iniciação, propagação e terminação (Ryan & Aust, 1992).

Os ácidos graxos poliinsaturados, componentes dos lipídeos que formam as membranas biológicas possuem em sua estrutura grupos metilênicos ($R - CH_2 - R$), adjacentes às duplas ligações e algumas espécies de radicais são suficientemente reativas para abstrair um átomo de hidrogênio deste grupo metilênico, formando assim um radical centrado no carbono (reação 8). Este, por ser muito instável sofre uma mudança conformacional dando origem a dienos conjugados (reação 8a), iniciando o processo de oxidação dos lipídios da membrana. Na presença de oxigênio a reação se propaga, formando o radical peroxil (reação 9) que por sua vez pode abstrair um átomo de hidrogênio de outro grupo metilênico, transformando o radical peroxil em hidroperóxido lipídico e formando novamente o radical centrado no carbono (reação 10) (Halliwell & Gutteridge, 1989 b; Ryan & Aust, 1992).



O radical peroxil pode também sofrer uma ciclização, formando um endoperóxido cíclico, que reagindo com outra molécula de oxigênio, daria origem a aldeídos de baixo peso molecular, principalmente o malondialdeído e o β -hidroxinonenal. Este processo estaria relacionado com a etapa de terminação (Minotti & Aust, 1987a,b). Estes aldeídos, ao reagirem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) dão origem a um complexo colorido quantificado a 532 nm. A medida da concentração dessas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é uma das mais conhecidas e usadas para se quantificar o ataque oxidativo "*in vitro*" e "*in vivo*" (Ohkawa et alii, 1979).

Uma outra maneira de se seguir o processo de peroxidação lipídica utilizando mitocôndrias isoladas é através do registro do consumo extra de oxigênio. Esta é uma técnica simples, onde se pode detectar precisamente a velocidade de consumo de oxigênio relacionada à peroxidação, analisando-se a diminuição na concentração de oxigênio no meio de reação, à medida que as reações acima descritas ocorrem (Wills, 1969; Driomina et alii, 1993).

Papel dos Íons de Ferro na Iniciação da Peroxidação Lipídica

Embora o Fe^{2+} na forma livre seja considerado extremamente tóxico, ainda não existe um consenso na literatura em relação ao radical iniciador da peroxidação lipídica induzida por íons de Fe^{2+} . Como descrito anteriormente, estes podem formar várias outras espécies reativas além do $\cdot\text{OH}$. Como vários grupos não observaram uma correlação positiva entre produção de $\cdot\text{OH}$ e peroxidação lipídica, todas as outras espécies formadas com a participação de Fe^{2+} já foram, em algum momento, postuladas como o radical iniciador do processo (Minotti & Aust, 1987; Halliwell & Gutteridge, 1990)

Uma observação consensual em relação ao efeito do Fe^{2+} , independente do modelo de membrana utilizado pelos vários autores é a existência de um período latente (Δt) entre a adição do Fe^{2+} e o início da peroxidação lipídica. Postula-se que este intervalo de tempo seja necessário para a formação e ataque do radical iniciador à membrana (Driomina et alii, 1993; Pogosyan et alii, 1996; Tang et alii, 1997). Outra observação consensual é que os íons de Fe^{2+} apresentam tanto atividade oxidante como antioxidante, dependendo da concentração utilizada. A concentração do íon necessária para se observar o efeito peroxidativo máximo foi chamada de concentração crítica ($[\text{Fe}^{2+}]^*$). Acima dela, é observado um efeito antioxidante. Alguns autores postulam que este efeito máximo foi obtido quando se atinge uma razão ótima $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$ (Driomina et alii, 1993; Tang et alii, 1997).

Dados recentes do nosso grupo de pesquisa mostram que a $[\text{Fe}^{2+}]^*$ varia de acordo com o estado de oxidação do Fe^{2+} (Alonso et alii, submetido). Foi observado que quanto mais reduzido, menor é a $[\text{Fe}^{2+}]^*$ e maior a capacidade do íon se ligar à membrana mitocondrial. Por sua vez, quanto mais oxidado, menor sua capacidade de ligação à membrana e maior a $[\text{Fe}^{2+}]^*$. Além disso, Alonso, (1998) mostrou que o Δt é

diminuído pela presença prévia de Fe^{3+} e modulado pela concentração de proteína mitocondrial (Pagosyan et alii, 1996; Alonso et alii, submetido). A correlação entre esses dados indicam que a ligação do Fe^{2+} à membrana parece modular o efeito do íon, mas que a iniciação da lipoperoxidação requer uma concentração crítica de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e mitocôndrias, provavelmente como uma fonte de $\text{O}_2^{\bullet-}$, reforçando a hipótese do íon perferril como o radical iniciador do processo de peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} (Ryan & Aust, 1992; Alonso et alii, submetido).

Dipiridamol

O dipiridamol (2,6-bis-dietanolamino-4,8 dipiperidinopirimido-(5,4-d)-pirimidina) (DIP) (Figura 5) é um derivado da pirimidopirimidina, e está entre as principais drogas prescritas para o tratamento de doenças cardiovasculares por suas atividades vasodilatadoras e por inibir a agregação plaquetária, prevenindo a formação de trombos. A atividade antitrombótica e antiagregante plaquetária é exercida por dois mecanismos distintos: a inibição da recaptção da adenosina nos trombócitos, eritrócitos e células endoteliais da parede vascular, assim como a inibição da GMPc - fosfodiesterase (Fitzgerald,1987). Posteriormente, uma série de trabalhos foram surgindo na literatura mostrando que esta droga também apresentava propriedades antioxidantes (Iuliano et alii,1989; Iuliano et alii, 1992a).

A ação antioxidante de uma determinada droga está relacionada com a sua capacidade de inibir processos que ativam a formação de espécies radicalares ativas, inibir a ação das espécies reativas, sequestrando-as, ou suprimir o aumento dos danos, interrompendo o ataque de radicais secundários derivados de outros compostos (Rice-Evans & Diplock, 1993). As propriedades antioxidantes do DIP foram sugeridas por Iuliano em 1989, que mostrou que o DIP tinha capacidade de sequestrar $O_2^{\bullet-}$ gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase. Por outro lado, como aparentemente a peroxidação lipídica desencadeada por diferentes sistemas geradores de radicais livres de oxigênio era inibida pela presença de DIP, esse grupo sugeriu que o DIP estaria limitando a propagação do processo peroxidativo (Iuliano et alii,1989). Posteriormente, estudando a cinética da reação, foi proposto que o DIP também teria a capacidade de sequestrar $\bullet OH$ gerado tanto em solução aquosa de Fe^{+3} / ascorbato/ H_2O_2 , como por radiólise da H_2O (Iuliano et alii,1992a).

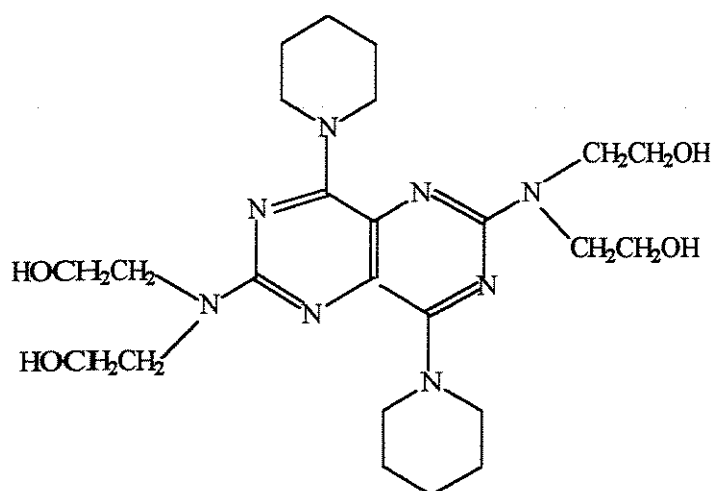


Figura 5. Estrutura Química do Dipiridamol .

O mecanismo de ação antioxidante exercido pelo DIP é discutido com base em seus anéis bi-pirimídicos e nos quatro grupos alcóois (-CH₂-CH₂OH) presentes em sua estrutura. Segundo Iuliano e colaboradores, a espécie radicalar poderia abstrair os átomos de hidrogênio que estão ligados ao oxigênio (-OH) ou saturar os anéis causando sua quebra. Os produtos destas reações não puderam ser detectados, porém ocorreu uma alteração no espectro da molécula do DIP após a radiólise (Iuliano et alii, 1992a).

Pedulli e colaboradores, verificaram que o mecanismo de ação antioxidante do DIP se deve a transferência de elétrons do hidrogênio de um dos grupos alcoóis da molécula de DIP e a espécie radicalar, dando origem a formação do DIP oxidado (Pedulli, 1999).

Também a peroxidação de micelas de ácido araquidônico induzida por radicais peroxil (gerados pela decomposição térmica de azoiniciadores) mostrou que a adição de DIP provoca uma diminuição no consumo de oxigênio e um conseqüente aumento

no período latente (Δt) precedente ao processo, levando à sugestão que o DIP sequestraria o radical peroxil gerado no sistema sofrendo conseqüente oxidação (Iuliano et alii, 1995). Como os radicais peroxil possuem um papel de intermediários nas reações que levam à agregação plaquetária (Iuliano et alii, 1992b) foi sugerida a aplicação do DIP no tratamento da aterosclerose (Iuliano et alii, 1995).

A interação do DIP e seus derivados com micelas e vesículas foi demonstrada por Borissevitch e colaboradores (1996). De acordo com este estudo, a forte interação do DIP e seus derivados com membranas estaria relacionada com o seu grau de hidrofobicidade (Borissevitch et alii, 1996).

Resultados recentes de nosso grupo de pesquisa em colaboração com o Prof. Marcel Tabak (IQSC – USP) mostraram que o DIP parece ser um inibidor específico da peroxidação lipídica induzida por FeSO_4 em mitocôndrias isoladas, apresentando 50% de inibição na concentração de $1 \mu\text{M}$ ($\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$). Entretanto, o DIP exerceu pouca proteção quando a lipoperoxidação foi induzida por CuOOH , mesmo na presença de baixas concentrações de Fe^{2+} . A comparação da ação antioxidante do DIP com alguns de seus derivados apresentou correlação positiva entre a sua hidrofobicidade e seu efeito protetor. Isto levou à interpretação de que o CuOOH , por ser altamente lipofílico pode gerar espécies radicalares ao nível de membrana mitocondrial interna. O DIP, apesar de ser bastante hidrofóbico, não interage com estas espécies radicalares que são geradas em ambientes diferentes ao da membrana, onde provavelmente ocorreria a interação do DIP (Nepomuceno et alii, 1997).

Além de sua capacidade de ligação aos componentes lipídicos de membranas, Hirsch e colaboradores mostraram que o DIP também se liga a proteínas da membrana mitocondrial, como o receptor periférico de benzodiazepínicos, MBR (Hirsch et alii, 1988a). A composição das subunidades do MBR inclui o canal aniônico de voltagem (VDAC), localizado na membrana externa, o carreador de nucleotídeos de adenina (AAC), da membrana interna e uma outra proteína de 18

KDa, aparentemente localizada no espaço intermembranas (McEnery,1992). Foi proposto que estas três proteínas compreenderiam o receptor periférico de benzodiazepínicos, que se liga com grande afinidade a drogas como o diazepam, ciclosporina, dipiridamol e outras. Esta ligação levaria a um aumento no estado respiratório 4 e a uma diminuição no estado respiratório 3, com conseqüente queda do controle respiratório mitocondrial (Hirsch et alii, 1988 a, b). Embora não se saiba ainda exatamente a função dos MBR, na membrana mitocôndrial, há uma proposta de que poderiam agir como moduladores do metabolismo energético (Anholt, 1986). Recentemente foi mostrado que o MBR possui um papel de intermediário na formação de radicais livres em astrócitos (Itzhak et alii, 1994) e também na geração de radical ânion superóxido por fagócitos (Zavala & Lanfant, 1987).

OBJETIVOS

O objetivo da presente tese foi aprofundar os estudos sobre a ação antioxidante do DIP no processo de peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} e verificar se esta ação está correlacionada a sua partição entre as membranas mitocondrial externa e interna, se depende da ligação específica à proteínas da membrana ou simplesmente se deve à quelação do íon de ferro. Para isto, observamos o efeito do DIP sobre mitocôndrias intactas e mitoplastos isolados de fígado de rato, e incubadas na presença ou ausência de FeSO_4 .

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato

As mitocôndrias de fígado de rato (MFR), foram isoladas segundo Schneider & Hogeboom (1950), utilizando-se fêmeas de ratos adultos Wistar, pesando cerca de 200 g, mantidas em jejum por 12 horas.

Após o animal ter sido sacrificado por destroncamento cervical, retirou-se o fígado e picotou-se com tesoura em meio de isolamento I (sacarose 250 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, EGTA 0,5 mM). Este material foi levado ao homogeneizador Potter-Elvehjem por 2 min. Centrifugou-se, em centrífuga Beckman modelo J2-21 (rotor JA20), por 10 min. a 700 x g. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 12.100 x g por 20 min. O sedimento foi ressuspense em meio II (sacarose 250 mM e HEPES 10 mM pH 7,4). A suspensão formada foi centrifugada a 14600 x g por 10 min. Ressuspendeu-se novamente o sedimento, com o mínimo volume possível de meio II, obtendo-se uma suspensão mitocondrial bastante pura. Todo este procedimento foi feito mantendo-se a temperatura entre 0 e 4° C.

A quantidade de mitocôndrias foi determinada em termos de concentração de proteína, pelo método do biureto, modificado pela adição de ácido cólico a 1 % (p/v) (Gornall et alii, 1949; Kaplan et alii, 1983). Como padrão utilizou-se uma curva de BSA (soroalbumina bovina). As leituras de absorbância foram feitas a 540 nm em espectrofotômetro Beckman modelo DU 640.

Isolamento de mitoplastos

A fração de mitoplastos foi preparada segundo método descrito por Pedersen e colaboradores (1978) a partir de uma suspensão de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, com concentração aproximada de 100 mg de proteína por mL de meio de reação com adição de digitonina (Pedersen, et alii 1978).

Adicionou-se 1,0 mL da suspensão mitocondrial a 1,0 mL de meio H (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, BSA 0,2 %, HEPES 5,0 mM pH 7,2 contendo 1,2 mg de digitonina / 10 mg de proteína). Este material mantido em banho de gelo, foi agitado lentamente por 15 min. Após este tempo foi diluído pela adição de 6,0 mL de meio H e centrifugado a 12.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 6,0 mL de meio H sem digitonina e novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi reservado para dosagem da atividade da enzima monoamino oxidase, presente somente na membrana mitocondrial externa, o sedimento foi ressuspense em 2 mL de meio H, obtendo-se uma fração de mitoplasto com concentração aproximada de 65 mg/mL.

A confirmação da retirada da membrana externa nesta fração foi feita pelas dosagens das atividades da citocromo c oxidase e da monoamino oxidase presente na membrana interna e externa, respectivamente, realizadas segundo métodos de (Schnaitman e colaboradores, 1967; Schnaitman & Grenawalt, 1968. A atividade da citocromo c oxidase foi determinada polarograficamente, pela medida de consumo de oxigênio, através de um eletrodo tipo Clark, a 23°C. Primeiramente foi feito um controle no qual, a 1,8 mL de meio contendo tampão fosfato 75 mM, pH 7,2, adicionou-se 1mg/mL de mitoplasto e após um minuto 30 µM de citocromo c de coração de cavalo (tipo III-Sigma), ascorbato de sódio 3,75 mM e N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilenediamina didrocloreto (TMPD) 300 µM. Posteriormente foi

realizado o mesmo experimento mais a adição de Triton X-100 na razão de 1,2 mg/mg de proteína. O mesmo procedimento foi feito com as mitocôndrias. O cálculo da atividade da citocromo c oxidase foi baseado na diferença do consumo de oxigênio da mitocôndria com o do mitoplasto, tanto na ausência quanto na presença de Triton X-100, utilizando a equação abaixo. A atividade seria igual a 75-65% para o mitoplasto e de 95-85% para as mitocôndrias, esta diferença na porcentagem de atividade pode ser explicada pela possível perda da atividade da citocromo c oxidase na preparação de mitoplastos (Schnaitman et alii, 1967).

$$\text{Atividade \%} = \frac{(\text{atividade na presença de Triton X-100}) - (\text{atividade na ausência de Triton X-100})}{(\text{atividade na presença de Triton X-100})} \times 100$$

* atividade tanto na presença como na ausência de Triton X-100 = consumo de oxigênio

A atividade da monoamino oxidase foi determinada espectrofotometricamente em 250 nm a 37°C, pela formação de benzaldeído em um sistema contendo tampão fosfato 50 mM, pH 7,6, após adição de hidrocloreto de benzilamina 2,5 mM (Schnaitman & Grenawalt, 1968).

Determinação do Consumo de O₂

O consumo de O₂ pela suspensão mitocondrial foi determinado polarograficamente, utilizando-se um eletrodo tipo Clark, acoplado a um registrador gráfico.

Numa cela de vidro vedada, com agitação magnética, contendo 1,8 mL de capacidade total, colocou-se o meio (M₁) para determinação do controle respiratório, o qual contém sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4, Pi 3 mM, succinato 5 mM e rotenona 5 µM e adicionou-se a suspensão de mitocôndrias em volume suficiente para uma concentração final de 1 mg/mL. Registrou-se o estado respiratório 4 (estado basal). Após 3 minutos adicionou-se ADP (300 µM) registrando o estado respiratório 3, onde ocorre aceleração do consumo de O₂ devido à fosforilação oxidativa. Depois de todo o ADP ter sido consumido, a respiração das mitocôndrias volta ao estado respiratório 4. As velocidades de consumo de O₂ nos dois estados foram utilizadas para o cálculo do controle respiratório (CR). O CR é definido como a razão entre o consumo de O₂ no estado 3 (respiração estimulada pela adição de ADP) e o consumo de O₂ após todo ADP ter sido fosforilado (estado respiratório 4). A preparação mitocondrial foi considerada adequada para os experimentos quando o controle respiratório era maior que 4 (Nicholls & Akerman, 1982).

O registro do consumo de O₂ nos estados respiratórios 3 e 4 e a determinação do controle respiratório (CR) na presença de DIP foram utilizados para verificar a ligação do Dip ao receptor periférico de benzodiazepínico (Hirsch et alii, 1988 a e b).

Determinação do Consumo Extra de Oxigênio por Mitocôndrias Isoladas de Fígado de Rato na presença de FeSO₄.

As mitocôndrias, numa concentração de 1 mg de proteína /mL, foram incubadas numa cela de vidro vedada com agitação magnética contendo 1,8 mL de capacidade total em meio (M₁).

Após 1 minuto de incubação diferentes concentrações de FeSO₄ foram adicionadas. A figura 1 mostra o perfil do consumo extra de O₂ pelas mitocôndrias, obtido após adição de FeSO₄. Podemos verificar a presença de dois picos de consumo extra de O₂, denominados de v₁ e v₂, separados por um intervalo de tempo (Δt). O primeiro pico, referido como v₁, corresponde à oxidação do Fe²⁺ adicionado enquanto o segundo pico v₂, corresponde ao processo de peroxidação lipídica propriamente dito pois é inibido pela adição de butilhidróxitolueno (BHT) no início do experimento (Alonso et alii, submetido). Este experimento permitiu seguir todo o processo de consumo extra de oxigênio.

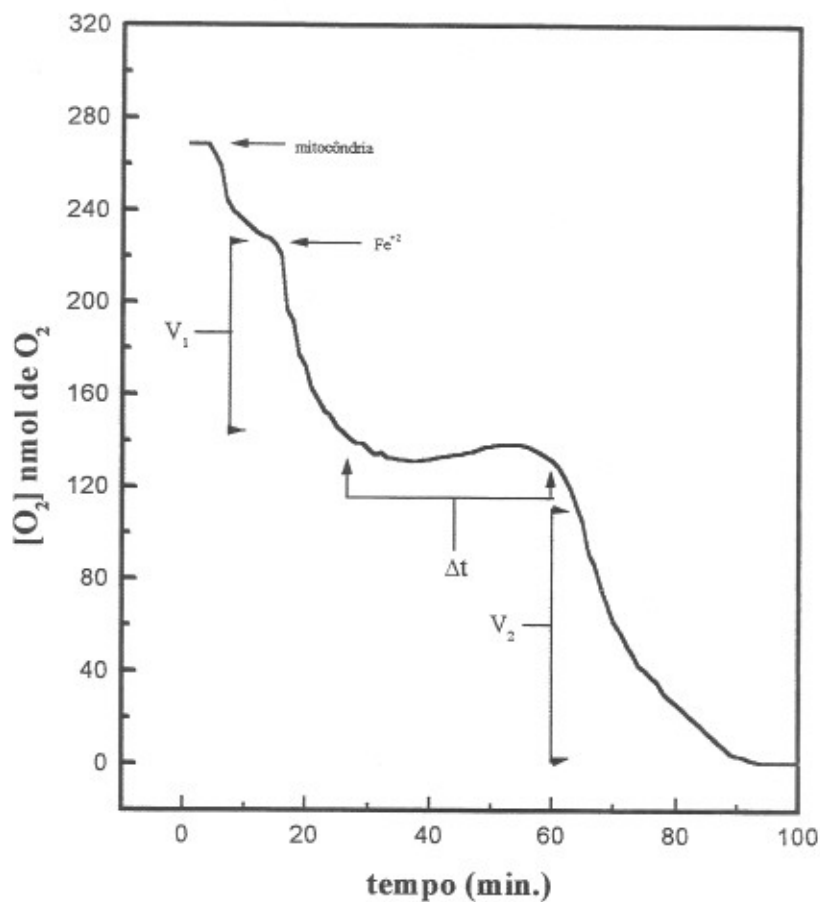


Figura 6. Consumo de Oxigênio por Mitocôndrias na presença de Fe²⁺. MFR (1 mg/mL), foi incubada por 1 minuto em meio de reação (sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4, Pi 3 mM, succinato 5 mM e rotenona 5 μM). Após esse tempo foi adicionado FeSO₄ 0,5 mM, registrando-se o consumo de O₂. Pico 1: consumo extra de O₂ devido a oxidação de Fe²⁺ a Fe³⁺. Pico 2 : consumo extra de O₂ devido à peroxidação lipídica. Δt: intervalo de tempo necessário para o início do processo de peroxidação lipídica, após oxidação do Fe²⁺.

Determinação das Constantes de Associação do DIP

A determinação das constantes de associação do DIP com a membrana mitocondrial foi feita por titulação, variando-se a concentração de proteína mitocondrial de 0.8 a 4.0 mg proteína/mL. DIP (2 μ M) foi adicionado ao meio de reação (KCl 120 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, Succinato 5 mM, Pi 3 mM e rotenona 2 μ M) antes da adição da suspensão de mitoplastos. Após incubação por 30 min. à 30°C, as amostras foram centrifugadas a 4.000 x g por 20 min e feitas as leituras do sobrenadante. O precipitado obtido da centrifugação foi colocado em nitrogênio líquido (Robertson & Rottenberg, 1983) e então solubilizado em 1 mL de solução contendo Triton X-100 7.0 mM e NaCl 171 mM. Para calcular a quantidade de DIP que ficou retido no precipitado utilizou-se um padrão de DIP (2 μ M) sem membrana. A medida de emissão de fluorescência do sobrenadante e do precipitado foi feita entre 425-600 nm, com excitação a 410 nm (Tabak & Borissevich, 1992) Os dados obtidos foram analisados através do gráfico de duplo-recíproco ou diretamente da lei de ação das massas utilizando, respectivamente, as formulas abaixo.

$$1/\Delta F = 1/\Delta F_{\max.} + 1/\Delta F_{\max.} \times 1/K_b \times 1/[M] \text{ (Tabak \& Borissevich 1992).}$$

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{\max.} [M]}{k_d + [M]}$$

Determinação da Associação do DIP com Íons Fe²⁺ e Fe³⁺

A complexação do DIP com íons de ferro poderia resultar numa supressão de fluorescência devido a formação de um complexo. A possibilidade de interação direta entre o DIP e Fe²⁺ ou Fe³⁺ foi analisada através do monitoramento da supressão de fluorescência do Dip (5µM) por (FeSO₄ 2mM + Ascorbato 50mM) ou FeCl₃ (2mM), respectivamente, no meio de reação (M₁) sem mitocôndrias. Após uma incubação de 2 horas a temperatura ambiente, as medidas de emissão de fluorescência foram feitas à 499 nm e a absorbância da amostra foi acompanhada através de uma varredura de 250 a 600 nm (Tabak & Borissevich, 1992). As medidas de absorbância foram feitas em espectrofotômetro Beckman DU 640 e as de fluorescência em espectrofluorímetro SLM Aminco-SPF-500.

Determinação das Variações do Volume Mitochondrial (Inchamento Mitochondrial)

Como as suspensões mitocondriais são turvas, elas espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença do índice de refração entre a matriz e o meio. Qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada (Nicholls & Akerman, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e o do meio, com a consequente diminuição da luz espalhada. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias prestam-se bem para a aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramentos de suas pregas. O acompanhamento deste processo foi feito em função da diminuição da absorbância em um espectrofotômetro Beckman DU 640, ajustado para um comprimento de onda de 520 nm.

RESULTADOS

Efeito do DIP sobre o Consumo de O₂ por Mitocôndrias Isoladas

Nossa primeira intenção foi verificar se o DIP “per se” afetava diretamente o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, medido pela velocidade de consumo de oxigênio no estado respiratório 4. A Figura 7 mostra o efeito de diferentes concentrações de DIP sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias incubadas na presença de substratos de complexo I (A) e complexo II (B). É possível observar que quando variamos a concentração de DIP até 10 μM ocorre um aumento no consumo de O₂ no estado respiratório 4 (v_4) de cerca de 15%, independente do substrato utilizado. Estes dados indicam que o DIP não altera o estado respiratório 4.

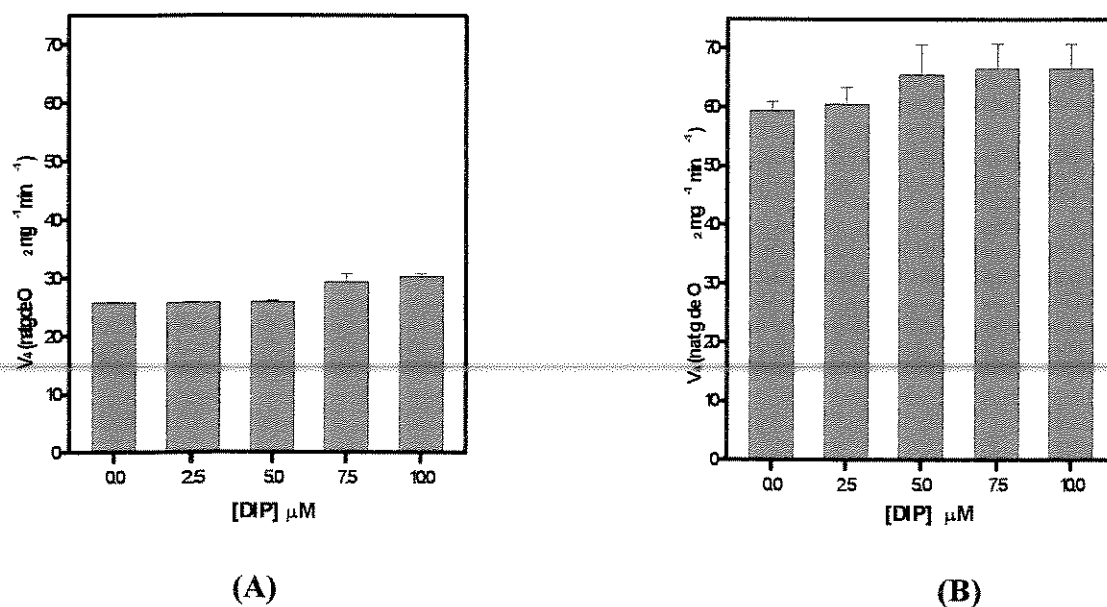
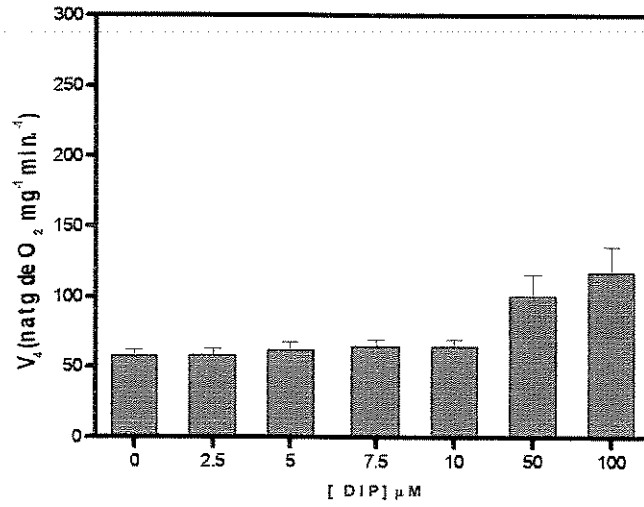


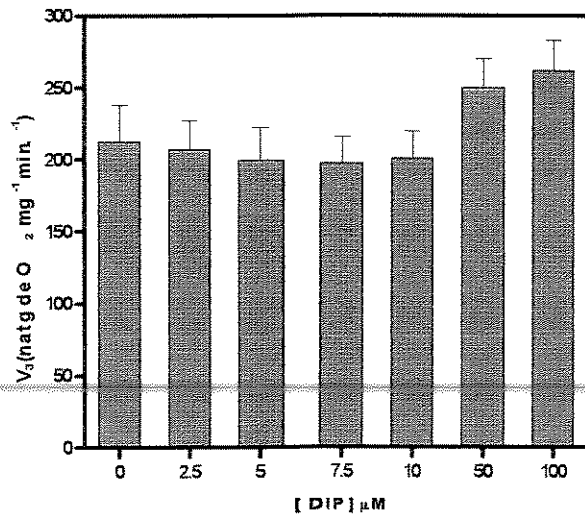
Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de DIP sobre o consumo de oxigênio no estado respiratório 4. MFR (1mg/mL) foram incubadas em meio M₁ na presença de succinato ou piruvato e malato na presença de concentrações crescentes de DIP (0-10 μM) e a velocidade de consumo de O₂ foi determinada. (A) Estado respiratório 4 na presença de substrato de 1^o sítio (piruvato 5 mM + malato 5 mM). (B) Estado respiratório 4 na presença de substrato de 2^o sítio (succinato 5 mM). n=5

Dados da literatura mostram que o DIP se liga a proteínas do receptor periférico de benzodiazepínicos da membrana mitocondrial (Hirsch et alii, 1988a). Esta ligação aparentemente causa um aumento no estado respiratório 4 e diminuição no estado respiratório 3 com conseqüente diminuição nos valores do controle respiratório (v_3/v_4) (Hirsch et alii, 1988b). Como os dados da figura anterior sugeriam um leve efeito desacoplador, dose-dependente, verificamos a ação de diferentes concentrações de DIP (Figura 8) sobre estes dois estados respiratórios.

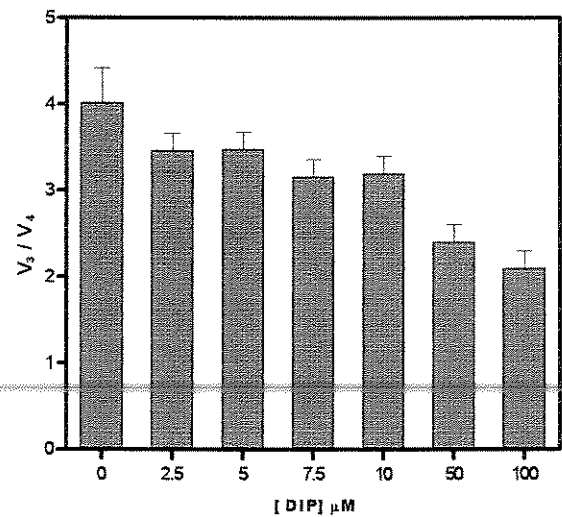
Foi possível observar que nas concentrações mais baixas (até 10 μM) o DIP afeta muito ligeiramente os dois estados respiratórios com pouca alteração no controle respiratório. Podemos observar um efeito do DIP mais pronunciado somente nas concentrações mais altas. Neste caso, tanto a velocidade de consumo de oxigênio no estado respiratório 3 quanto no estado respiratório 4 aumentaram, sendo este aumento mais marcante em v_4 , o que causou uma queda mais acentuada nos valores de controle respiratório (Figura 8A, B e C). Entretanto, é importante salientar que nas concentrações de DIP capazes de impedir totalmente a peroxidação lipídica, que variam entre 2,5 e 5 μM (Nepomuceno et alii, 1997) o efeito do DIP sobre a respiração foi muito pequeno. Esses dados indicam que a ação antioxidante do DIP provavelmente não está relacionada a sua ligação aos MBR.



(A)



(B)



(C)

Figura 8. Efeito do DIP no estados respiratórios 4 (A), 3 (B) e no Controle Respiratório (CR) (v_3/v_4). MFR (1mg/mL) foram incubadas no mesmo meio de reação M_1 , na presença de concentrações crescentes de DIP e a velocidade de consumo de O_2 determinada. $n=5$

Efeito do DIP sobre o Inchamento Mitochondrial induzido por Oxidantes de Grupos Tiólicos

Dados da literatura mostraram a interação do DIP com membranas modelo e biológicas e sua ação no sequestro de diversas espécies radicalares (Iuliano et alii, 1989; Iuliano et alii, 1995; Borissevich et alii, 1996; Nepomuceno et alii, 1997). Entretanto, não existem relatos sobre a proteção do DIP contra a oxidação de grupos tiólicos proteicos. Assim, utilizando um oxidante específico de grupos tiólicos (diamida), realizamos os experimentos mostrados na Figura 9. É conhecido na literatura que a presença de Ca^{2+} e diamida induz um aumento na permeabilidade da membrana mitochondrial interna, capaz de ser observado pela queda na absorbância à 520 nm. Podemos observar que neste caso, somente a presença de DTT (reduzidor de grupos sulfridila) é suficiente para impedir o processo de permeabilização mitochondrial e que o DIP não exerceu ação protetora alguma.

Estes dados mostram que o DIP não impede a oxidação de grupos -S-H de proteínas, sugerindo que a ação antioxidante se dá pela associação do DIP a bicamada lipídica.

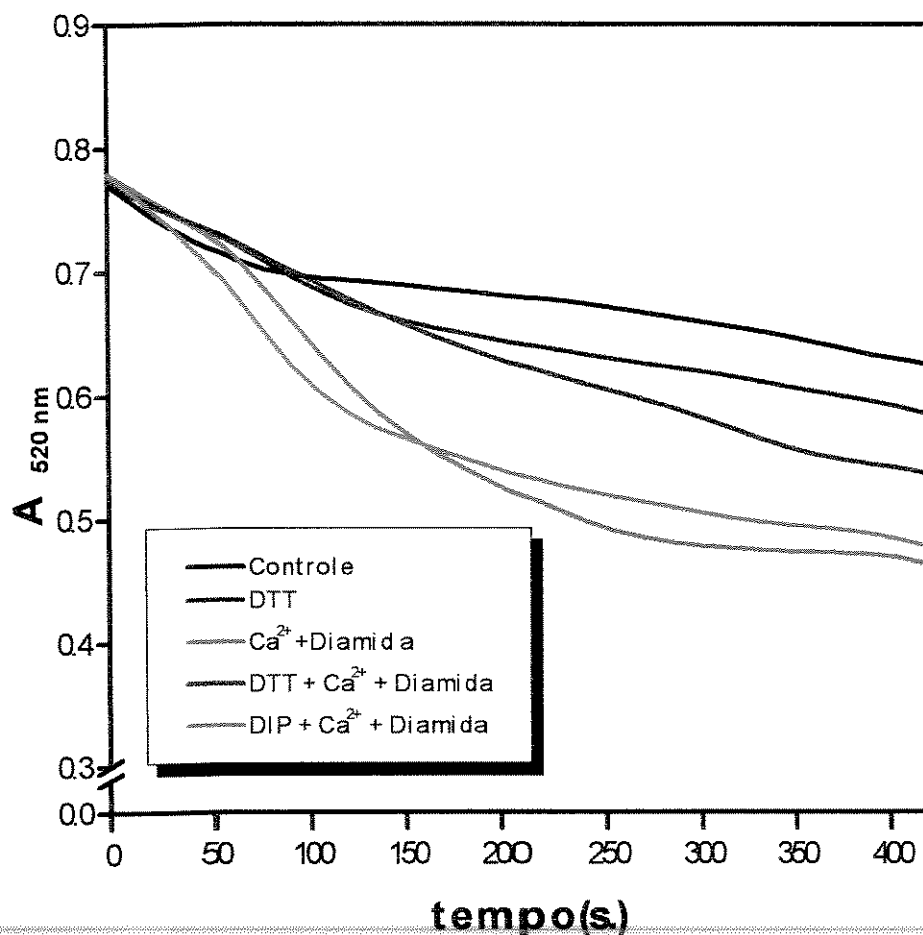


Figura 9. Ação antioxidante do DIP e DTT na oxidação de grupos tiólicos. MFR (1mg/mL) foram pré-incubadas (0-7 min.) à 30°C, em meio padrão (sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4, Pi 3 mM) quando presentes, DTT (1 mM), Diamida (0,5 mM) e Ca²⁺ (100µM) e DIP (5µM), foram adicionados após 1 minuto de pré-incubação e os valores de absorvância medidos à 520 nm. n= 3

Efeito do DIP sobre o Consumo Extra de Oxigênio induzido por Fe²⁺ em Mitocôndrias e Mitoplastos:

Conforme mostrado em Materiais e Métodos, quando Fe²⁺ é adicionado em meio contendo mitocôndrias observam-se dois grandes picos de consumo de oxigênio ("bursts"), separados entre si por um intervalo de tempo (Δt). O primeiro pico de consumo extra de oxigênio, referido como v_1 , está relacionado com a oxidação do Fe²⁺ na presença de O₂ sendo que o processo peroxidativo ocorre durante o segundo pico de consumo extra de oxigênio, referido como v_2 . A existência de um período latente (Δt) antes do início da peroxidação lipídica é fato observado por alguns autores, utilizando outros sistemas membranares tais como lipossomas ou microsossomos (Minotti & Aust,1987, Driomina et alii,1993) e explicado como o período necessário para a formação das espécies radicalares que darão início ao processo peroxidativo, as quais aparentemente dependem de uma razão crítica de Fe²⁺: Fe³⁺ com provável formação de um complexo entre eles e o O₂ (Minotti & Aust,1987, Driomina et alii,1993; Tang & Shen,1997).

Os dados da Tabela 1 mostram que o DIP é capaz de inibir v_2 na mesma concentração (2,5 μ M) para inibir a peroxidação lipídica detectada pelo aumento na produção de TBARS (Nepomuceno et alii, 1997). Podemos observar também que a presença de DIP, embora iniba totalmente v_2 , não causa mudanças em v_1 . Estas ocorreram somente em altas concentrações de DIP (100 μ M) que, conforme mostrado na Figura 8a também afeta a velocidade de consumo de O₂ no estado respiratório 4 mitocondrial. Estes dados sugerem que o DIP não foi capaz de alterar o estado de oxidação do Fe²⁺, pelo menos nas concentrações em que é capaz de inibir a peroxidação lipídica.

Tabela 1. Efeito do DIP sobre a velocidade de consumo extra de oxigênio induzida por FeSO₄. MFR (1mg/mL) foram incubadas em meio de reação (sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM, Pi 3 mM, succinato 5 mM, rotenona 5 μM, pH 7.4) na presença de diferentes concentrações de DIP. n= 5

[DIP] μM	v ₁ (natg de O ₂ mg ⁻¹ min. ⁻¹)				Δt (min.)				v ₂ (natg de O ₂ mg ⁻¹ min. ⁻¹)			
	[FeSO ₄] μM				[FeSO ₄] μM				[FeSO ₄] μM			
	50	100	200	500	50	100	200	500	50	100	200	500
0	50 ± 6	74 ± 8	111±2	218±10	6 ± 1	7 ± 1	9 ± 1	11 ± 1	37 ± 5	47 ± 2	81 ± 8	150 ± 6
2.5	60 ± 2	72 ± 7	108±5	219±6	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	65 ± 5	73 ± 7	110±2	219±8	-	-	-	-	-	-	-	-
7.5	62 ± 4	86 ± 4	111±2	223±9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	64 ± 7	91 ± 8	111±5	225±7	-	-	-	-	-	-	-	-
50	67 ± 7	101±14	141±8	228±3	-	-	-	-	-	-	-	-
100	104 ± 5	140±11	165 ± 7	240±9	-	-	-	-	-	-	-	-

Os experimentos mostrados na Tabela anterior foram feitos com mitocôndrias isoladas. A seguir foram realizadas então os mesmos experimentos na presença de mitoplastos (mitocôndrias destituídas da membrana externa).

Os dados mostrados na Tabela 2 indicam que em mitoplasto há necessidade de uma concentração maior de Fe²⁺ para se observar o processo de peroxidação lipídica. Esses dados sugerem que a manipulação da suspensão mitocondrial para a obtenção dos mitoplastos faz com que estas apresentem uma velocidade de consumo de O₂ maior que a de mitocôndrias intactas (Pedersen et alii, 1978), o que por sua vez, diminui a velocidade de produção de H₂O₂ (Boveris & Chance, 1973). De acordo com dados anteriores do nosso grupo de pesquisa H₂O₂ também é necessário para a formação de concentrações suficientemente altas do íon perferril (reação 5), que parece ser o verdadeiro iniciador do processo peroxidativo (Alonso et alii, submetido). Isto explicaria a necessidade de maiores concentrações de Fe²⁺ sendo oxidado a Fe³⁺ para ocorrer a peroxidação lipídica. Por outro lado, podemos também

observar pela Tabela 2 que o DIP é igualmente eficiente em proteger os mitoplastos da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} pois induz total inibição do segundo pico de consumo extra de oxigênio (v_2) mesmo nas menores concentrações, como observado também com as mitocôndrias intactas.

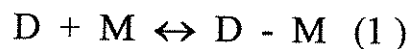
Tabela 2. Efeito do DIP sobre o consumo extra de oxigênio induzida pôr FeSO_4 na presença de mitoplastos. Os mitoplastos (1mg/mL) foram incubados em meio de reação (sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM, Pi 3 mM, succinato 5 mM, rotenona 5 μM , pH 7,4) na presença de diferentes concentrações de DIP. n=4

[DIP] μM	$v_1(\text{natg de O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min.}^{-1})$				$\Delta t (\text{ min. })$				$v_2(\text{natg de O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min.}^{-1})$			
	[FeSO_4] μM				[FeSO_4] μM				[FeSO_4] μM			
	50	100	200	500	50	100	200	500	50	100	200	500
0	62 ± 5	89 ± 7	113 ± 6	192 ± 7	-	19 ± 1	14 ± 2	8 ± 1	-	14 ± 2	43 ± 2	53 ± 3
2.5	60 ± 6	90 ± 3	105 ± 10	180 ± 10	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	62 ± 7	91 ± 7	110 ± 7	195 ± 3	-	-	-	-	-	-	-	-
7.5	67 ± 6	93 ± 2	116 ± 5	198 ± 5	-	-	-	-	-	-	-	-
10.0	67 ± 5	92 ± 5	115 ± 3	203 ± 2	-	-	-	-	-	-	-	-

Associação do DIP com a membrana mitocondrial interna

A titulação de diferentes concentrações de suspensões de mitocôndrias com DIP 2 μM indicou que a associação foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de mitocôndria (Nepomuceno et alii, submetido). A análise dos espectros de emissão de fluorescência do DIP na presença de mitoplastos (Figura 10) mostra resultados bem similares aos já obtidos com mitocôndrias intactas. Podemos observar que ao aumentarmos a concentração de membrana a intensidade de emissão de fluorescência diminui, no sobrenadante (Figura 10 A) o que condiz com uma situação de mais droga ligada à membrana e menos droga no sobrenadante. Estas alterações no espectro de emissão foram usadas para estimar a constante de associação do DIP na membrana (Nassar et alii, 1997).

Considerando o equilíbrio:



Onde D representa a droga e M o mitoplasto, a fluorescência total observada é devida às espécies livres e ligadas de D. ΔF representa a diferença entre a intensidade de emissão de fluorescência da droga em uma certa concentração de mitoplasto, (F) e a intensidade de fluorescência inicial (F^0), na ausência de mitoplasto. Para se obter quantitativamente a constante de associação da droga ao mitoplasto, os dados foram tratados usando a lei de ação das massas e o método de duplo recíproco (Tabak & Borissevich, 1996). Este tratamento foi baseado nas seguintes equações:

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{\max} [M]}{k_d + [M]}$$

$$1 / \Delta F = 1 / \Delta F_{\max} + 1 / \Delta F_{\max} \times 1 / k_b \times 1 / [M] \quad (2)$$

O gráfico de $1/\Delta F$ em função de $1/[M]$ pode ser usado para calcular a constante de associação, K_b . Do gráfico de ΔF em função de $[M]$ obtém-se diretamente k_d .

Os dados da Figura 10A mostram que a intensidade de fluorescência do sobrenadante diminui à medida que a concentração de mitoplasto foi aumentada, sendo que no precipitado tratado com Triton X-100 para recuperação do DIP, a intensidade de fluorescência aumentou de acordo com o aumento da concentração de mitoplasto (Figura 10B). A partir do gráfico do duplo recíproco (não mostrado), obtido de acordo com a equação 2, calculou-se a constante e constante de associação $K_b = 1,1 \pm 0,2 \text{ (mg/mL)}^{-1}$. A constante de dissociação é igual a $0,93 \pm 0,14 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ (Figura 11).

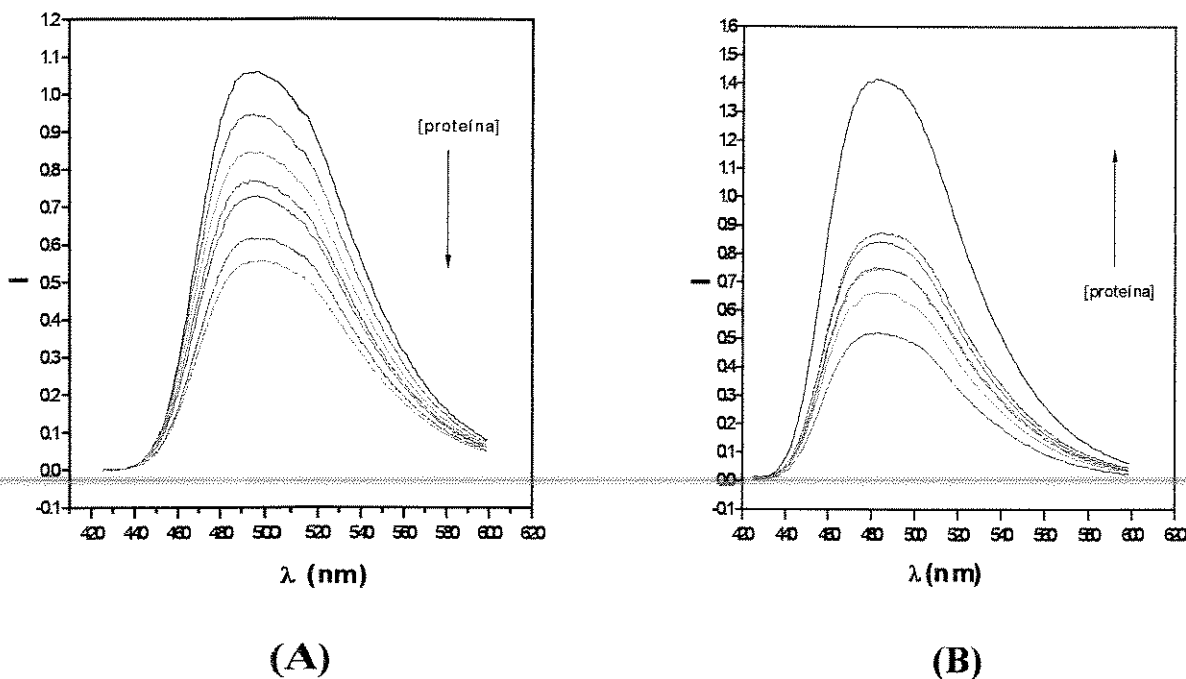


Figura 10. Espectros de emissão de fluorescência do DIP. O DIP ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$) foi incubado com os mitoplastos em meio de reação como descrito em Materiais e Métodos. Após centrifugação foram feitas as leituras de emissão de fluorescência do sobrenadante (A) e do precipitado (B) como descrito em Materiais e Métodos. A concentração de proteína variou de 0,8 - 4,0 mg/mL, e a excitação foi à 410 nm. As setas indicam o sentido do aumento de concentração de proteína. Os gráficos em preto correspondem à $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ de DIP nos respectivos meios na ausência de membranas. $n=3$

O gráfico abaixo foi obtido através da relação entre a área do espectro de emissão do DIP na presença de concentrações crescentes de membrana, após tratamento do precipitado com Triton X-100 e a área do espectro de emissão do DIP no meio de Triton X-100, sem membrana (espectro preto da Figura 10B). Portanto esta fração será sempre menor que um e, ao multiplicarmos cada valor de fração obtida por 100, obtivemos a porcentagem de DIP no precipitado. Portanto foi obtida uma fração de até 21% de DIP no precipitado. É suposto que a fração de DIP que ficou no precipitado corresponde ao DIP ligado à membrana. Estes dados indicam que embora ocorra a associação do DIP à membrana, grande parte da droga permanece no meio de reação.

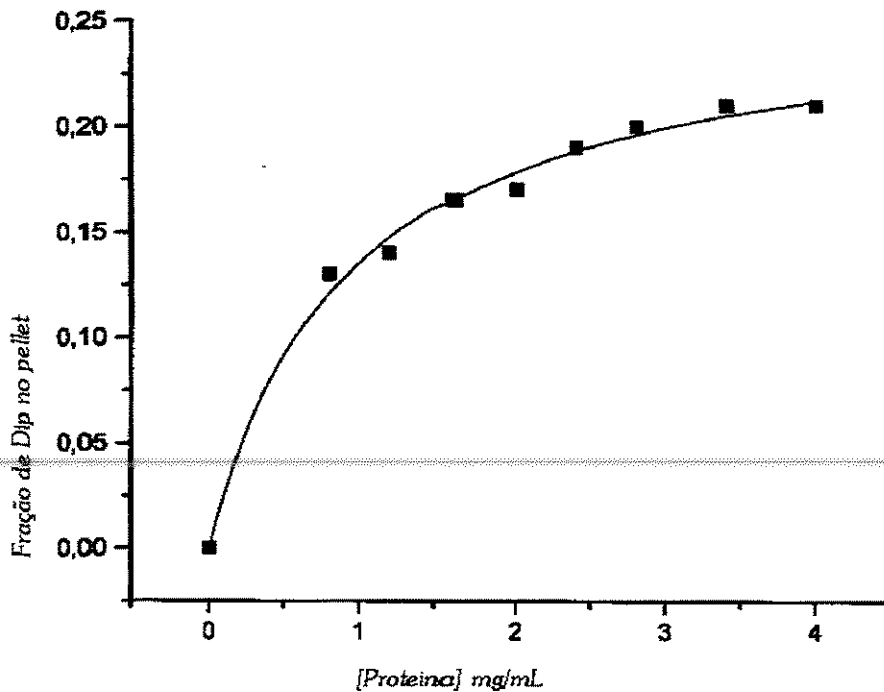


Figura 11. Isoterma de associação do DIP aos mitoplastos. O DIP (2×10^{-6} M) foi incubado com os mitoplastos, centrifugado e o precipitado tratado com Triton X-100. A excitação foi a 410 nm. O ajuste foi feito através da lei de ação de massas, ou seja
$$\Delta F = \frac{\Delta F_{\max} [M]}{k_d + [M]}$$
.

Efeito da Adição de DIP ou BHT após v_1 .

Já é conhecido na literatura a necessidade de uma razão equivalente de Fe^{2+}/Fe^{3+} para a formação da espécie radicalar iniciadora do processo de peroxidação lipídica induzida por íons de ferro (Minotti & Aust, 1987b). Recentemente, Tang e colaboradores (1997) mostraram que a remoção de Fe^{2+} ou Fe^{3+} pela adição de um segundo quelante de ferro ao final do período latente resultava na inibição da lipoperoxidação (Tang et alii, 1997). A Figura 12 mostra o efeito da adição de DIP (5 μ M) ou butil hidróxi-tolueno (sequestrador de radicais-BHT) (90 μ M) em quatro momentos distintos, imediatamente após v_1 , durante o período latente (Δt) e também ao final de Δt e após o processo peroxidativo ter sido iniciado. Podemos observar que o DIP é capaz de inibir totalmente o processo, independente do momento de sua adição, da mesma forma que o BHT, cujo efeito já está bastante caracterizado na literatura.

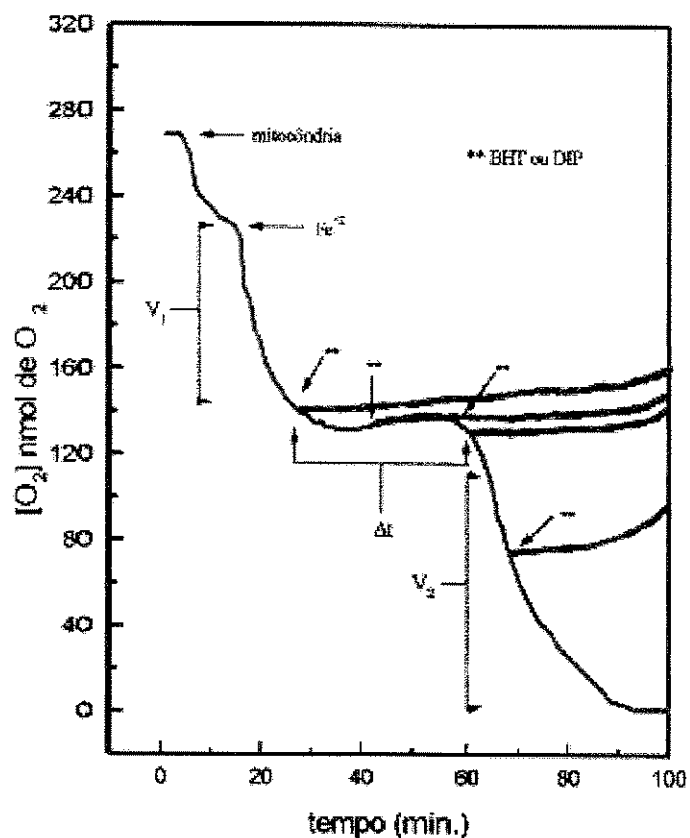
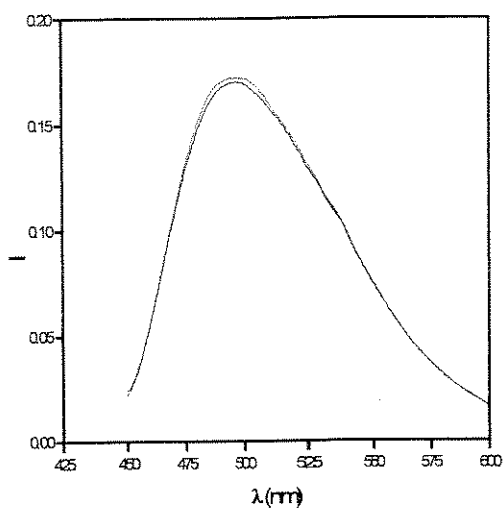


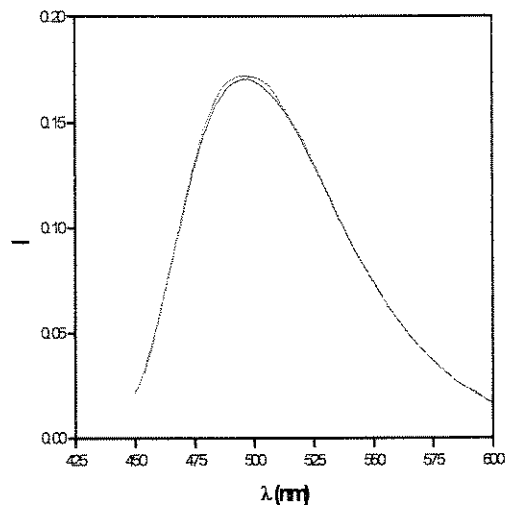
Figura 11. Efeito da adição de DIP e BHT sobre o consumo de O_2 em mitocôndrias após a adição de $FeSO_4$. MFR (1mg/mL) foram incubadas em um meio como descrito em *Materias e Métodos* por um minuto e $FeSO_4$ (500 μM) foi adicionado. Onde indicado foram adicionados DIP (5 μM) ou BHT (90 μM). As linhas (—) indicam que o consumo de oxigênio foi inibido. $n = 3$

Ação do DIP como quelante de íons Fe^{3+} e Fe^{2+}

Sendo o DIP um composto altamente fluorescente, resolvemos verificar sua possível complexação com os íons de ferro. A possibilidade de uma interação direta entre o DIP e Fe^{2+} e Fe^{3+} foi investigada através de estudos de supressão de fluorescência do DIP pelos íons de ferro no meio de reação (M_1) na ausência de mitocôndria. O primeiro experimento com sulfato de ferro não foi quantitativo devido à rápida oxidação de ferro (Fe^{2+} a Fe^{3+}), impedindo assim a análise. A oxidação do ferro provocou uma turbidez na amostra provavelmente devido à precipitação do hidróxido de ferro. Como o Fe^{3+} absorve no mesmo comprimento de onda do DIP, a diminuição da fluorescência poderia não ser devida à supressão do DIP. Este fenômeno é chamado efeito de filtro interno (Figura 12). Assim foi feito um experimento onde o DIP ficou incubado com solução de FeSO_4 ou FeCl_3 por três horas, posteriormente as amostras foram centrifugadas a 144.000 x g e uma leitura do espectro de fluorescência do sobrenadante foi feita (Figura 13). Dos dados obtidos (Figura 13), foi possível descartar a complexação do DIP com íons de ferro, pois a fluorescência da solução permaneceu a mesma após incubação.



(A)



(B)

Figura 13. Espectro de emissão de fluorescência do DIP na presença de íons de ferro. No meio contendo (KCl 65 mM, sacarose 125 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4) foi adicionado FeSO_4 (2mM) e Ascorbato (50 mM)(A) e FeCl_3 (2mM)(B). Os traçados coloridos indicam emissão da molécula de DIP após a incubação com íons de ferro por 3 horas .
n= 3

DISCUSSÃO

Dados do nosso laboratório em colaboração com o Laboratório do Prof. Marcel Tabak (IQSC-USP), mostraram que o dipiridamol (DIP) exerce um poderoso papel antioxidante em relação a peroxidação lipídica induzida por FeSO_4 e esta proteção está diretamente relacionada com a hidrofobicidade do DIP, uma vez que seus derivados mais hidrofílicos são menos efetivos contra a peroxidação lipídica mitocondrial (Nepomuceno et alii, 1997). Também tem sido mostrado que esta droga inibe a peroxidação lipídica induzida por outros compostos, como hidroperóxidos e azoiniciadores em sistemas diferenciados como micelas (Iuliano et alii, 1995) e lipoproteínas de baixa densidade (Iuliano et alii, 1996) Entretanto, é citado na literatura que o DIP se liga a receptores periféricos de benzodiazepínicos (MBR), localizados na membrana mitocondrial externa (Davis & Huston, 1981; Hirsch et alii, 1988), embora esta afinidade seja bem menor do que a relatada para outros ligantes como o Ro5-4864 e PK 11195 (Hirsch et alii, 1988 a). O DIP ao se ligar no MBR provoca mudanças no controle respiratório, devido ao aumento do consumo de oxigênio do estado respiratório 4 e uma diminuição do consumo de oxigênio do estado respiratório 3. Entretanto tais experimentos foram realizados com mitocôndrias isoladas de rim de rato, que contém uma alta concentração de receptores benzodiazepínicos quando comparada as mitocôndrias de fígado (Hirsch et alii, 1988). Sob nossas condições experimentais, utilizando mitocôndrias de fígado de rato observamos alterações semelhantes apenas quando utilizamos altas concentrações de DIP. Os dados apresentados nas Figuras 7 e 8, mostraram que o DIP em concentrações fisiológicas (até 10 μM) provocou alterações insignificantes no controle respiratório, enquanto que uma queda significativa no controle respiratório foi observada apenas em altas concentrações de DIP (50-100 μM), muito maiores do

que as requeridas para inibir a peroxidação lipídica (2,5-5,0 μM). Este fato pode ser devido aos efeitos citotóxicos provocados pelas altas concentrações da droga.

Desde que a inibição do DIP sobre a peroxidação lipídica induzida por FeSO_4 , foi observada em concentrações bem menores do que as concentrações que alteram o controle respiratório, a constante de associação (K_b) do DIP às membranas mitocondriais foi também verificada. O valor de K_b para mitocôndria foi previamente por nós calculado, obtendo-se um valor de $0.8 \pm 0.1 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ e a porcentagem de DIP que se ligou à membrana mitocondrial atingiu um máximo de saturação de 47% (Nepomuceno et alii, submetido). Sob as mesmas condições experimentais, mas retirando a membrana externa da mitocôndria com digitonina (mitoplastos), verificamos a ligação do DIP a membrana interna. Apesar da composição de lipídios e proteínas da membrana externa ser muito diferente da membrana interna, (Daum,1985) o valor de $K_b = 1.1 \pm 0.2 \text{ (mg/mL)}^{-1}$, encontrado para os mitoplastos, foi maior do que o valor de K_b para mitocôndria. Como é possível observar através dos resultados mostrados nas figuras 10 a e b, à medida que a concentração de membrana aumenta a porcentagem de DIP diminui consideravelmente no sobrenadante. O máximo de saturação de DIP no precipitado obtido a partir dos mitoplastos, foi 21%. Somando-se com 40% de DIP que ficou no sobrenadante, totaliza-se 61% de DIP recuperado, enquanto que nas suspensões mitocondriais a recuperação do DIP no precipitado e no sobrenadante totalizou praticamente 100%. Esses resultados mostraram que ao contrário do que observado previamente em mitocôndrias, parte do DIP não foi recuperada após a ressuspensão dos mitoplastos.

Por outro lado, o citocromo P_{450} já foi detectado em mitocôndrias de fígado de rato, sendo localizado mais precisamente entre a membrana interna e a matriz (Sato et alii, 1977). A função deste citocromo em mitocôndria de fígado de rato ou humano pode estar relacionada a metabolização da vitamina D_3 , de colesterol e de outros

diferentes esteróides (Oftebro et alii, 1981). O citocromo P₄₅₀ age como uma monooxigenase (cataliza a inserção de um átomo de O₂ a um substrato orgânico, com redução de outro substrato a H₂O), detoxificando as células através da transformação de compostos apolares em compostos polares para uma maior solubilização e consequente excreção (Capdevila et alii, 1992). É importante ressaltar também que o sistema de óxido-redução presente na cadeia respiratória é capaz de reduzir ou oxidar hidroperóxidos, através do transporte de elétrons que se dá através da mesma (Kennedy et alii, 1992)

Iuliano et alii (1995) verificaram que o DIP, ao sequestrar o radical peroxil gerado por decomposição térmica de azoiniciadores, atuou como um antioxidante fenólico clássico, através da transferência de hidrogênios que estão ligados aos grupamentos alquilas da molécula, dando origem a um intermediário radicalar, passível de ser detectado através de ESR, embora a natureza química do produto não-radicalar não pode ser determinada. Também foi mostrado através das técnicas de voltametria cíclica, absorção ótica, fluorescência e ESR que o DIP diluído tanto em acetonitrila como em etanol na presença de potencial adequado sofre oxidação eletroquímica monoeletrônica dando origem a um radical paramagnético não fluorescente (Almeida et alii, 1998). Recentemente foi detectado por EPR a formação de um cátion radical pelo DIP, após a interação deste com o radical peroxil, experimentos de voltametria cíclica indicaram uma fácil oxidação do DIP para este cátion radical. Sendo que a transferência de proton proposta por Iuliano foi descartada (Pedulli et alii, 1999).

Com base nestes dados e ressaltando a ação do citocromo P₄₅₀, podemos sugerir que a oxidação do DIP ao nível de membrana leva a formação de um radical com características espectroscópicas próprias, não fluorescente, conforme já mostrado (Almeida, et alii, 1998). Desta forma, podemos sugerir que a recuperação

parcial do DIP a partir do sobrenadante e precipitado obtidos após a incubação de mitoplastos com a droga, é decorrência da formação deste radical.

Este aspecto é de grande relevância, uma vez que Iuliano e colaboradores, (1995) já haviam sugerido que a oxidação metabólica do DIP poderia dar origem a novos compostos que, de alguma forma, poderiam estar envolvidos com as propriedades terapêuticas deste composto (Iuliano et alii, 1995).

Por outro lado, experimentos mostrados na figura 12, indicam a eficiente ação antioxidante do DIP, pois o mesmo inibiu a ocorrência da peroxidação lipídica quando adicionado em várias etapas do processo, com eficiência semelhante ao butilhidroxitolueno (BHT), um antioxidante sintético clássico que atua como sequestrador de espécies radicalares. O metabolismo do BHT se dá através do citocromo P₄₅₀ e ele apresenta efeitos citotóxicos “*in vivo*” quando usado em altas concentrações (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A hipótese de que o DIP possa atuar como quelante de íons ferro e desta forma inibir a peroxidação lipídica não foi descartada (Pedulli et alii, 1999). Os resultados aqui apresentados confirmam a habilidade do DIP em sequestrar radicais gerados a partir de Fe²⁺, que induzem a peroxidação lipídica em suspensões mitocondriais, mas a possibilidade do DIP atuar como quelante de Fe²⁺ e Fe³⁺ foi descartada (Figuras 13 a e b).

Iuliano e colaboradores através de uma série de trabalhos verificaram que o DIP é capaz de sequestrar : o radical ânion superóxido, gerado diretamente através do sistema xantina/xantina oxidase (Iuliano et alii, 1989); o radical hidroxila gerado pela reação de Fenton ou por radiólise da água (Iuliano et alii, 1992a); o radical peroxil, gerado por decomposição térmica de azoiniciadores (Iuliano et alii, 1995). Usando sistemas biológicos diferentes, outros grupos, verificaram que o DIP apresenta uma ampla ação terapêutica no tratamento de formação de trombos e aterosclerose, patologias essas que podem ser desenvolvidas por radicais livres.

Sugeriu-se assim que a ação de antioxidantes pode prevenir ou retardar a ocorrência de tais patologias (Iuliano et alii,1994; Iuliano et alii,1997).

Uma análise global dos nossos resultados permite sugerir que a atividade do DIP é decorrente de sua ação em sequestrar tanto espécies reativas de oxigênio geradas no início da peroxidação lipídica, quanto radicais lipoperóxidos formados na etapa de propagação. Estes dados são de grande importância, pois podem ajudar na compreensão da ação terapêutica desta droga quando administrada “*in vivo*”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALMEIDA, L.E.; CASTILHO, M.; MAZO, L.H. AND TABAK, M. (1998) Voltammetric and spectroscopic studies of the oxidation of the anti-oxidant drug dipyridamole in acetonitrile and ethanol. *Anal. Chim. Acta.* **375**:223-231.
- ALONSO, A.; ALVES, A.A.; PEREIRA-DA-SILVA AND MACEDO, D.V. (1999) The use of ESR to study Fe²⁺-induced lipid peroxidation in isolated mitochondria *J. Inorg. Biochem* (submetido).
- ANHOLT, R.R.H. (1986) Mitochondrial benzodiazepine receptors as potential modulators of intermediary metabolism. *Trends Pharmacol.* **12**:506-511.
- BINDOLI, A. (1988) Lipid peroxidation in mitochondria: an overview, *Free Radic. Biol. Med.* **5**:247-261.
- BORISSEVICH, I.E.; BORGES, C.P.F.; BORISSEVICH, G.P.; YUSHMANOV, V.E.; LOURO, S.R.W. AND TABAK, M. (1996) Binding and location of dipyridamole derivatives in micelles: The role of the drug molecular structure and charge, *Z. Naturforsch.* **51**:578-590.
- BORGES, C.P.F.; BORISSEVITCH, I.E. AND TABAK, M. (1995) Charge-and pH-dependent bindings sites of dipyridamole in ionic micelles: A fluorescence study. *J. Luminesc.* **65**: 105-112.
- BOVERIS, A. AND CHANCE, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide, *Biochem. J.* **134**:707-716.

BOYER, P.D.; CHANCE, B.; ERNESTER, L.; MITCHELL, P.; RACKER, E. AND SLATER, E.C. (1977) Coupling mechanisms in capture, transmission and use of energy. *Annu. Rev. Biochem.* **46**: 957-966.

BRAUGHLER, J.M.; DUNCAN, L.A. AND CHASE, R.L. (1986) The involvement of iron in lipid peroxidation, *J. Biol. Chem.* **261**:10282-10289.

BUCHER, J.R.; TIEN, M. AND AUST, S.D. (1983) The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ferrous iron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**:777.

CAPDEVILA, J.H.; FALCK, J.R. AND ESTABROOK, R.W. (1992) Cytochrome P 450 and the arachidonate cascade. *FASEB J.* **6**:731-736.

CHANCE, B.; SIES, H. AND BOVERIS, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mamalian organs. *Physiol. Rev.* **59**:527-605.

CULLIS, P.R. AND HOPE, M.J. (1985) Physical properties and functional roles of lipids in membranes, in: *Biochemistry of lipids and membranes* (Dennis E. Vance and Jean F. Vance eds.) p.25-72, Menlo Park-California.

DAUM, G. (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **822**:1-42.

DAVIS, L.P.; HUSTON, V. (1981) Peripheral benzodiazepine binding sites in heart and their interaction with dipyridamole. *Eur. J. Pharmacol.* **73**:209-211.

DRIOMINA, E.S.; SHAROV, V.S. AND VLADIMIROV, Y. A. (1993) Fe⁺²-Induced lipid peroxidation kinetics in liposomes: The role of surface Fe⁺² concentration in switching the reaction from acceleration to decay. *Free Radic. Biol. Med.* **15**:239-247.

FITZGERALD, G.A. (1987) Dipyridamole. *N. Engl. J. Med.* **316**:1247-1255.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J. AND DAVID, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.* **177**:751-766.

HALLIWELL, B. (1978) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates, *FEBS. Lett.* **213**:9-14.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (1989a) The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species, in: *Free Radic. Biol. Med.* (B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge eds.) p.22-81, Oxford UK.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (1989b) Lipid peroxidation: a radical chain reaction, in: *Free Radic. Biol. Med.* (B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge eds.) p. 188-266, Oxford UK.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Meth. Enzymol.* **186**:1-85.

HAWORTH, R.H. AND HUNTER, O.R. (1980) Allosteric inhibition of the Ca⁺²-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides, *J. Memb. Biol.* **54**:231-236.

HIRSCH, J.D.; BEYER, C.F.; MALKOWITZ, L.; LOULLIS, C.C. AND BLUME, A.J. (1988 b) Characterization of ligand binding to mitochondrial benzodiazepine receptors. *Mol. Pharmacol.*, **34**:164-172.

HIRSCH, J.D.; BEYER, C.F.; MALKOWITZ, L.; LOULLIS, C.C. AND BLUME, A.J. (1988 a) Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control. *Mol. Pharmacol.*, **34**:157-163.

ITZHAK, Y.; BENDER, A.S.; NOREMBERG, M.D. (1994) *Brain Res.* **644**: 221-225.

IULIANO, L.; VIOLI, F.; GHISELLI, A.; ALESSANDRI, C. AND BALSANO, F. (1989) Dipyridamole inhibits lipid peroxidation and scavenges oxygen radicals. *Lipids.* **24**:430-433.

IULIANO, L.; PRATICÒ, D.; GHISELLI, A.; BONAVIDA, M.S. AND VIOLI, F. (1992 a) Reaction of Dipyridamole with the Hydroxyl Radical. *Lipids.* **27**:349-353.

IULIANO, L.; VIOLI, F.; PEDERSEN, J.Z.; PRATICÒ, D. (1992b) Free radical-mediated platelet activation by hemoglobin released from red blood cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **299**:220-224.

IULIANO, L.; PEDERSEN, J.Z.; PRATICÒ, D.; ROTILIO, G. AND VIOLI, F. (1994) Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur. J. Biochem.* **221**:695-704.

IULIANO, L.; PEDERSEN, J.Z.; ROTILIO, G.; FERRO, D. AND VIOLI, F (1995) A potent chain-breaking antioxidant activity of the cardiovascular drug dipyridamole. *Free Radic. Biol. Med.* **18**:239-247.

IULIANO, L.; COVALITA, A.R.; CAMASTRA, C.; BELLO, V.; QUINTARELLI, C. AND ALESSANDRONI, M. (1996) Protection of low density lipoprotein oxidation at chemical and cellular levels by the antioxidant drug dipyridamole. *Brit. J. Pharmacol.* **119**:1438-1446.

IULIANO, L.; COVALITA, A.R.; LEO, R.; PRATICÒ, D. AND VIOLI, F. (1997) Oxygen free radicals and platelet activation, *Free Radic. Biol. Med.*, **22**:999-1006.

KAPLAN, R.S. AND PEDERSEN, P.L. (1983) Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria, *Biochem. J.* **212**:279-288.

KENNEDY, C.H.; CHURCH, D.F.; WINGSTON, G.W.; PRYOR, W.A. (1992) Tert-butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria, *Free Radic. Biol. Med.* **12**:381-387.

KOPPENOL, W.H. AND LIEBMAN, J.F. (1984) The oxidizing nature of the hydroxyl radical. A comparison with the ferryl ion (FeO_2^+), *J. Phys. Chem.* **88**:99.

McENERY, M.W. (1992) The mitochondrial benzodiazepine receptor: Evidence for association with the voltage-dependent anion channel (VDAC). *J. Bioenerg. Biomem.* **24**:63-69.

MENEGHINI, R. (1997) Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage: an overview, *Free Radic. Biol Med.* **23**:783-792.

MINOTTI, G. AND AUST, S.D. (1987a) The role of iron in the initiation of lipid peroxidation, *Chem. Phys. Lip.* **44**:191-208.

MINOTTI, G. AND AUST, S.D. (1987b) The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.* **262**:1098-1104.

MITCHEL, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism, *Nature*. **191**:144-148.

NAQUI, A.; CHANCE, B. AND CADENAS, E. (1986) Reactive oxygen intermediates in biochemis, *Ann. Rev. Biochem.* **55**:137.

NASSAR, P.M.; ALMEIDA, L.E. AND TABAK, M. (1997) Binding of dipyridamole to phospholipid vesicles: a fluorescence study, *Biochim. Biophys. Acta*. **1328**:140-150.

NEPOMUCENO, M.F.; ALONSO, A.; PEREIRA-DA-SILVA, L. AND TABAK, M. (1997) Inhibitory effect of dipyridamole and its derivatives on lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **23**:1046-1054.

NEPOMUCENO, M.F.; MAMEDE, M.E.O.; MACEDO, D.V.; ALVES, A.A.; PEREIRA-DA-SILVA, L. AND TABAK, M. (1999) Antioxidant effect of

dipyridamole and its derivative RA25 in mitochondria: correlation of activity and location in the membrane. *Biochim. Biophys. Acta* (in press.).

NICHOLLS, D.G. AND AKERMAN, K. (1982) Mitochondrial calcium transport. *Biochim. Biophys. Acta.***683**: 57-88.

O'BRIEN, P.J. (1969) Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds, and nucleophiles, *Can. J. Biochem.*,**47**:485-492.

OFTEBRO, H.; SAAREM, K. AND BJÖRKHEM, I. (1981) Side chain hydroxylation of C₂₇-steroids and vitamin D₃ by a cytochrome P₄₅₀ enzyme system isolated from human liver mitochondria. *J. lipid Res.***22**:1254-1264.

OHKAWA, T.; NOBUKO, O. AND YAGI, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*,**95**:351-358.

PEDERSEN, P.L.; REYNAFARJE, J.W.G.B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G.L.; SOPER, J.W. AND BUSTAMANTE, E. (1978) Preparation and characterization of mitochondria and liver derived tissue. in: *Meth. Cell Biol.* **20**: 411-481.

PEDULLI, F.G.; LUCARINI, M.; MARCHESI, E.; PAOLUCCI, F.; ROFFIA S.; FIORENTINI, D. AND LANDI, L. (1999) Medium effects on the antioxidant activity of dipyridamole. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:295-302.

POGOSYAN, G.A.; DREMINA, Ye.S.; SHAROV, V.S.; ZAKARYAN, A.Ye.; PANASYAN, G.A. AND VLADIMIROV, Yu.A. (1996) Kinetics of lipid

peroxidation induced by Fe⁺² ions in a suspension of mitochondrial and nuclear membranes, *Biophys.* **41**:329-333.

RICE-EVANS, C. AND DIPLOCK, A.T. (1993) Current Status of Antioxidant Therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **15**:77-96.

RICE-EVANS, C. AND BURDON, R. (1993) Free radical-lipid interactions and their pathological consequences, *Prog. Lipid Res.* **32**:71-110.

ROBERTSON, D.E. AND ROTTENBERG, H. (1983) Membrane potential and surface potential in mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **258**: 11039-11048.

RYAN, P.T. AND AUST, S.D. (1992) The role of iron in oxygen-mediated toxicities, *Crit. Rev. Toxicol.* **22**:119-141.

SATO, R.; ATSUDA, Y.I.; TANIGUCHI, S. AND OKUDA, K. (1977) Hepatic mitochondrial cytochrome P₄₅₀: Isolation and functional characterization. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5477-5481.

SCHNAITMAN, C.A.; ERWIN, V.G. AND GREENAWALT, J.W. (1967) The submitochondrial localization of monoamine oxidase. *J. cell Biol.* **32**:719.

SCHNAITMAN, C.A. AND GREENAWALT, J.W. (1968) Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* **38**: 158.

SCHNEIDER, W.C. AND HOGEBROOM, G.H. (1950) Intracellular distribution of enzymes. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* **183**:123-128.

SMITH, M.T.; EVANS, C.G.; THOR, H. AND ORRENIUS, S. (1985) Quinone-induced oxidative injury to cells and tissues. in: *Oxidative Stress*. Eds. Helmut Sies, Acad. Press.

TABAK, M. AND BORISSEVICH, I.E. (1992) Interaction of dipyrromethane with micelles of lysophosphatidylcholine and with bovine serum albumin: fluorescence studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1116**: 241-249.

TANG, L.X.; YANG, F.L. AND SHEN, X. (1997) Effects of additional iron-chelators on Fe⁺²-initiated lipid peroxidation: Evidence to support the Fe⁺²...Fe⁺³ complex as the initiator, *J. Inorg. Biochem.* **68**:265-272.

TIEN, M.; SVINGEN, B.A. AND AUST, S.D. (1982) An investigation into the role of hydroxyl radical in xanthine oxidase-dependent lipid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.* **216**:142-151.

ULLRICH, V. (1984) The role of metal ions in the chemistry and biology of oxygen, in: *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, Bors, W.; Saran, M. and Trait, D., Eds. Walter de Gruyter, New York, p.391.

WATERS, W.A. (1971) The kinetics and mechanism of metal-catalyzed autoxidation, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **48**:427.

WILLS, E.D. (1969) Lipid peroxide formation in microsomes, *Biochem. J.*, **113**:325.

ZAVALA, F. AND LANFANT, M. (1987) *Ann. NY Acad. Sci.* **496**:240-249.

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS

1. Trabalhos apresentados em congressos e reuniões científicas

M.E.O. Mamede, M.F. Nepomuceno, D.V. Macedo, M.Tabak and L. Pereira-da-Silva. Antioxidant Activity of Dipyridamole on Mitochondrial Lipid Peroxidation. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ .Caxambu- MG. Período: 3 a 6 de maio de 1997.

M.F. Nepomuceno, M.E.O. Mamede, D.V. Macedo, M.Tabak and L. Pereira-da-Silva. Antioxidant Effect of Dipyridamole and its derivative RA-25 in Mitochondria : Correlation of Activity and Location in the Membrane. New Perspectives in Mitochondrial Research. Padova - Italia. Período: 18 a 21 de setembro de 1997.

M.F. Nepomuceno L. Pereira-da-Silva, M.E.O. Mamede, D.V. Macedo and M. Tabak. Antioxidant Effect of Dipyridamole and its derivative RA-25 in Mitochondria : Correlation of Activity and Location in the Membrane. XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ. Caxambu - MG. Período: 23 a 26 de maio de 1998.

M.F. Nepomuceno, L. Pereira-da-Silva, M.E. Mamede, D.V. Macedo and M.Tabak . Antioxidant effect of dipyridamole: correlation of activity and location in the mitochondrial membrane. Tenth European Bioenergetics Conference. Göteborg - Suécia. Período: 27 de junho a 2 de julho de 1998.

1.1. Trabalho submetido e em preparação

M.F. Nepomuceno, M.E.O. Mamede, A.A. Alves, D.V. Macedo, L. Pereira-da-Silva and M.Tabak (1998). Antioxidant Effect of Dipyridamole and its Derivative RA25 on Mitochondria: Correlation of Activity and Location in the Membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* (in press).

M.E.O. Mamede, M.F. Nepomuceno, D.V. Macedo, L. Pereira-da-Silva and M.Tabak. Antioxidant Effect of Dipyridamole on mitoplast (em preparação).