

Papel dos íons de ferro na iniciação do processo de peroxidação lipídica em mitocôndrias isoladas de fígado de rato

ARMINDO ANTONIO ALVES

ORIENTADORA

Profa. Dra. LUCIA PEREIRA DA SILVA

Departamento de Bioquímica

Instituto de Biologia

UNICAMP

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

Campinas - SP

1996

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) *Armindo Antonio Alves* e aprovada pela Comissão Julgadora. *Lucia Pereira da Silva*
17/7/96

9614013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

AL87p Alves, Armindo Antonio
Papel dos íons de ferro na iniciação do processo de peroxidação lipídica em mitocôndrias isoladas de fígado de rato / Armindo Antonio Alves. - Campinas, SP : [s.n.], 1996.

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

1. Peroxidação. 2. Mitocondria - Membranas. 3. Íons de ferro. I. Silva, Lúcia Pereira da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	AL87p
V.	Ex. 01
TOMBO BC/	28483
PROC.	667196
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/09/1996
N.º CPD	

Local e Data: - Campinas, 17 de Julho de 1996

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva (Orientadora)

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Profa. Dra. Eneida de Paula

SUPLENTE

Dr. Antonio Alonso







“Não se deve temer os deuses, não se deve temer a morte, a felicidade existe, é possível vencer a dor”

“Tetrapharmakon” - Epícuro (filósofo grego) - 300 a.C.

**Dedico esta tese à minha muito amiga,
*Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo***

Os experimentos com RPE (Ressônança paramagnética eletrônica) foram feitos sob orientação do Dr. Antonio Alonso, pesquisador do Instituto de Física da UNICAMP.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva

A Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Ao Prof. Dr. Antonio Alonso

A Prof. Dra. Eneida de Paula

A Prof. Dra. Maria de Fátima Nepomuceno

A Soraya, Simone, Agnes, Bia, Luzia, Marina, Daniel, Eduardo, Claudio, Carmem, Patricia, Jaime, Dr. Hiroshi, Marisa, Dra. Nilce, Guilherme, Andrea, Alexandre, Alessandro, Cida, Sônia, Mauro, Newton, Ana Célia,

Aos demais amigos do Departamento de Bioquímica da UNICAMP,

A minha mãe, Deolinda, minha irmã e meus irmãos.

Ao CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

INDÍCE

1 - RESUMO.....	1
2 - SUMMARY.....	3
3 - INTRODUÇÃO.....	5
A - Membranas Biológicas.....	5
B - Mitocôndria e membrana transdutora de energia.....	6
C - Oxidações biológicas.....	11
D - Peroxidação lipídica.....	14
E - Peroxidação lipídica induzida por ferro.....	16
4 - OBJETIVOS.....	21
5 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
A - Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	22
B - Determinação do consumo de O ₂	23
C - Peroxidação lipídica - TBARS	24
D - Deteminação da concentração de Fe ²⁺	27
E - Ressonância paramagnética eletrônica.....	30
6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
7 - CONCLUSÕES.....	57

8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
9 - COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS.....	59
10 - MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO.....	60

ABREVIACÕES

AA -	Antimicina A
ADP -	Adenosina 5' difosfato
ATP -	Adenosina 5' trifosfato
BHT -	Butilhidroxitolueno
DH -	Desidrogenase
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
EGTA -	Ácido etileno glicol -bis (β -amino éter) N, N, N', N' - Tetracético
FAD -	Flavina adenina dinucleotídeo oxidada
FADH ₂ -	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
GDP -	Guanosina 5' difosfato
GPX -	Glutaciona peroxidase
GRT -	Glutaciona redutase
GSH -	Glutaciona reduzida
GSSG -	Glutaciona oxidada
GTP -	Guanosina 5' trifosfato
HEPES -	[N-(2 hidroxietil) piperasina N'-(2-ácido etanosulfônico)]
I -	Intensidade de fluorescência
MAL -	Malato
MFR -	Mitocôndrias isoladas de fígado de rato
NAD ⁺ -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP ⁺ -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

OXAL -	Oxaloacetato
Pi -	Fosfato inorgânico
RPE -	Ressonância paramagnética eletrônica
RNA -	Ácido ribonucleico
SOD -	Superóxido dismutase
TBA -	Ácido 2-tiobarbitúrico
TDH -	Transidrogenases
TBARS -	Substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico

1 - RESUMO

Neste trabalho estudamos o papel dos íons de ferro na peroxidação lipídica induzida por FeSO_4 em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (MFR). Na literatura aparecem duas teorias distintas para explicar o papel dos íons de ferro na iniciação da peroxidação lipídica. A primeira propõe que o ferro é o catalisador das reações de Haber-Weiss e de Fenton que produzem o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) que atacaria os ácidos graxos polinsaturados das membranas. Uma segunda hipótese contesta a primeira, por considerar que o $\cdot\text{OH}$ é muito reativo para difundir-se dos sítios onde é formado até a parte hidrofóbica da membrana, onde estão os ácidos graxos passíveis de ataque. Neste caso, a proposta é que a peroxidação lipídica seria induzida por complexos radicalares formados por Fe^{2+} , Fe^{3+} e O_2 . Estas espécies teriam reatividade suficiente para abstrair átomos de hidrogênio das pontes metilênicas entre as duplas ligações dos ácidos graxos polinsaturados.

Nossos resultados mostram que a peroxidação lipídica induzida por FeSO_4 causa alterações na fluidez das membranas mitocôndriais e é dependente de uma relação $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ equimolar para atingir seu efeito máximo. Fatores que levem a um aumento na velocidade de oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} pelo O_2 contribuem para um aumento significativo da lipoperoxidação. Entre esses estão a presença de H_2O_2 , o vazamento de elétrons quando as mitocôndrias estão energizadas, e íons como Pi presentes no meio de reação. Os experimentos em que a peroxidação lipídica foi inibida pelo sequestrador de radicais butilhidroxitolueno (BHT) permitem afirmar que a iniciação do processo peroxidativo depende da geração de uma espécie radicalar além da presença de FeSO_4 . O fato do manitol, conhecido sequestrador do radical

hidroxila, não ter apresentado efeito inibitório sobre essa peroxidação, somado à observação anterior, permite descartar a hipótese de ser o radical hidroxila o iniciador do processo. Os resultados aqui apresentados, corroboram a hipótese de que complexos radicalares de valências mistas de ferro e O_2 seriam os iniciadores da peroxidação lipídica induzida por $FeSO_4$ em mitocôndrias isoladas, nas condições por nós estudadas.

2 - SUMMARY

Here we have studied the role of iron ions on the mitochondrial lipid peroxidation induced by FeSO_4 in isolated rat liver mitochondria. There are two hypothesis to explain the role of iron ions on the initiation of this peroxidative process. The first one suggests that iron catalyses Haber Weiss and Fenton reactions generating the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$). This later would attack the polyunsaturated fatty acids of the membrane phospholipids. The second explanation discards a direct participation of $\cdot\text{OH}$, as it is a very reactive species to difuse from its generating site to the hydrophobic part of the membrane, where are situated the fatty acids. In this case, the proposal is that the peroxidative process would be initiated by complexes of Fe^{2+} and Fe^{3+} and O_2 . These species would be reactive enough to react with the hydrogen from the methylenic bridges between the polyunsaturated fatty acid double bonds.

Our results show that the FeSO_4 -induced lipid peroxidation causes alterations on the mitochondrial membrane fluidity and the maximum effect is reached when an equimolar $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ relation is achieved. Conditions favouring an increase on the Fe^{2+} to Fe^{3+} oxidation by O_2 contribute to a significant increase on lipid peroxidation. Among these are the presence of H_2O_2 , the electron leak occuring when energized mitochondria were used and phosphate ions in the reaction medium. The experiments showing that the peroxidation is inhibited by butylhydroxytoluene (BHT), a known radical scavenger, lead to the conclusion that to initiate the peroxidative process a radical should be generated besides the presence of FeSO_4 . As mannitol was found unable to inhibit this process and it is known that mannitol scavenges $\cdot\text{OH}$, the hypothesis that hydroxyl is the radical species needed to initiate this

process can be discarded by our results. Moreover, our data support the proposal that complexes of iron mixed valences and O_2 would be the real initiators of the lipid peroxidation induced by $FeSO_4$ in isolated mitochondria.

3 - INTRODUÇÃO

A - Membranas Biológicas

As membranas biológicas têm como principal função, a compartimentalização da célula ou de organelas celulares. Elas oferecem uma barreira física para a saída e a entrada de algumas moléculas e íons e permitem a passagem de outras mantendo assim a homeostase celular. A barreira hidrofóbica é formada principalmente por uma bicamada de fosfolipídios (além de colesterol, esfíngo e glicolipídios) onde inserem-se proteínas com funções variadas (carreadores, receptores, proteínas estruturais e enzimas), que para as exercer precisam de um certo grau de mobilidade. Se os ácidos graxos, presentes nos fosfolipídeos, fossem todos saturados, ficariam empacotados, formando uma estrutura rígida que serviria apenas como barreira hidrofóbica. Entretanto, as membranas celulares são constituídas de uma mistura de ácidos graxos saturados e polinsaturados (todos em cis) o que garante uma estrutura menos ordenada e portanto mais fluída. A variedade de fosfolipídios (com diferentes cabeças polares) também contribui para a alteração do grau de ordem das membranas. Quanto mais especializada for a membrana, maior a concentração de proteínas e também de ácidos graxos polinsaturados (Cullis & Hope, 1985). Outra característica das membranas mais especializadas é a menor concentração de colesterol na sua bicamada lipídica, uma vez que o estado físico da membrana, em temperatura fisiológica é de líquido cristalino e o colesterol enrijece essa estrutura (Halliwell & Gutteridge, 1989b).

Os efeitos do enrijecimento das membranas são: diminuição da fluidez, inativação de enzimas ligadas a elas e alterações no metabolismo, chegando

eventualmente a causar a perda completa de sua integridade (Halliwell & Gutteridge, 1989b).

O termo fluidez é empírico e compreende alterações de ordem e mobilidade das moléculas, na bicamada. Medidas de variação da ordem podem ser feitas através do parâmetro de ordem "S" obtido do espectro de RPE utilizando-se marcadores de spin adequados (McConnel, 1976). Em geral, esses marcadores são derivados do ácido esteárico com o anel do radical nitróxido ligado a carbonos específicos, e são facilmente inseridos dentro da bicamada lipídica. O tempo de correlação rotacional do marcador, refletindo as variações no microambiente onde este se encontra, indica o estado de ordenamento dos lipídios e portanto pode ser usado como medida da fluidez das membranas (McConnel, 1976).

B - Mitocôndria e membrana transdutora de energia

A mitocôndria é uma organela subcelular, delimitada por duas membranas, funcionalmente distintas: a membrana externa, compartimentalizadora e a interna, transdutora de energia e delimitante do espaço interno chamado matriz mitocondrial.

A membrana externa, delimitante do espaço intermembranas, é rica em porinas que somam 1 % das proteínas mitocondriais totais (Haworth & Hunter 1980). As porinas podem se associar em dímeros e permitem a difusão aparentemente passiva de moléculas com massa molecular entre 5.000 e 10.000 Daltons. Levando-se em conta a permeabilidade da membrana externa, o espaço intermembranas apresenta uma composição iônica próxima do meio citosólico. Apesar disso, o espaço intermembranas possui compostos que lhe

são específicos, como por exemplo a *creatina quinase* e a *adenilato quinase*. Recentemente, a existência de sítios de contato entre a membrana externa e a membrana interna foi demonstrada (Kottke et alii, 1991; Brdiczka, 1991). Ao nível desses sítios de contato sugeriu-se um modelo de associação entre o transportador ADP/ATP, a creatina quinase e a membrana externa (Brdiczka, 1991).

A matriz mitocondrial, espaço interno às membranas, é um meio aquoso que embebe enzimas de variadas e importantes funções no metabolismo, tais como a descarboxilação oxidativa do piruvato, o ciclo de Krebs, o ciclo de Lynen e a formação do carbomoi-fosfato a partir de NH_4 e HCO_3 , enzimas antioxidantes como *glutathiona peroxidase* (EC. 11.1.9), *glutathiona reductase*; glutathiona oxidada e reduzida, ATP, ADP, GDP, GTP, coenzimas (NAD e FAD), metabólitos como piruvato, acetil-CoA, e intermediários do ciclo de Krebs (citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato, malato, oxaloacetato) além de DNA e RNA mitocondriais.

A membrana interna é caracterizada por profundas invaginações (cristas) e é impermeável à difusão passiva de íons e compostos neutros com uma massa molecular superior a 100 Daltons, como por exemplo a sacarose. Ao contrário, o O_2 , H_2O e NH_3 parecem atravessá-la livremente. Outros metabólitos passam pela membrana interna por intermédio de transportadores específicos que permitem a conexão do metabolismo citosólico ao metabolismo da matriz.

Os organismos aeróbicos, obtêm a maior parte da sua energia através da fosforilação oxidativa, que ocorre nas mitocôndrias, mais especificamente na membrana mitocondrial interna. Este processo está acoplado à reoxidação das coenzimas NADH e FADH_2 pelos componentes da cadeia respiratória da

Krebs e no ciclo de Lynen (na matriz mitocôndrial) e também na via glicolítica que ocorre no citosol. O NADH, gerado no citosol, é reoxidado através dos sistemas de lançadeiras “glicerol fosfato” ou “malato/aspartato” em diferentes tecidos e em diferentes espécies. Uma vez dentro da mitocôndria, como mostra a figura 1, os elétrons provenientes do NADH entram na cadeia respiratória pela redução do complexo I (*NADH-CoQ redutase*) e os provenientes do FADH₂ pela redução do complexo II (*Succinato-CoQ redutase*). Os complexos I e II reduzem a coenzima Q, que reduz o complexo III (*CoQ-citocromo c redutase*) que por sua vez reduz o complexo IV (*Citocromo C Oxidase E.C. 1.9.3.1*). No último componente do complexo IV (citocromo aa₃), ocorre a redução total do O₂ a H₂O. A variação do potencial padrão de oxido redução a pH 7,0 (E°), entre os pares redox NAD⁺/NADH (-0,324 V) e FAD/FADH₂ (-0,219 V) e o par redox O₂/H₂O (+0,816 V), indica que esta cadeia de reações de oxido-redução é altamente favorecida termodinamicamente, produzindo 105,2 kcal por mol de O₂ reduzido (Cramer & Knaff, 1989). A maior parte desta energia é armazenada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons na membrana mitocôndrial interna ($\Delta\mu_{H^+}$), formado pelo bombeamento unidirecional de prótons da matriz para o espaço intermembranas que ocorre como consequência da passagem dos elétrons pela cadeia respiratória. O $\Delta\mu_{H^+}$ possui dois componentes, um elétrico ($\Delta\psi$), com polaridade negativa no interior da mitocôndria e outro químico (ΔpH), relacionados entre si de acordo com a equação:

$$\Delta\mu_{H^+} = \Delta\psi - 60\Delta pH \quad (1)$$

De acordo com a teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa, a energia gerada pela volta desses prótons para a matriz mitocôndrial, pela *FoF1*-

De acordo com a teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa, a energia gerada pela volta desses prótons para a matriz mitocondrial, pela *FoF1-ATP sintetase*, seria utilizada por esta última para a síntese de ATP (Mitchell, 1961).

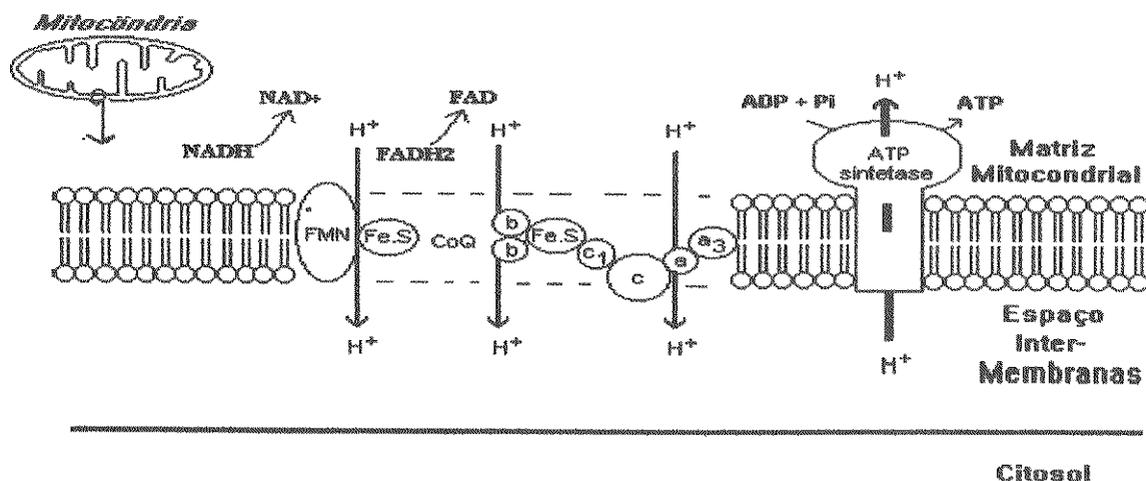


Figura 1 - Esquema da membrana interna da mitocôndria, mostrando a formação do potencial $\Delta\mu\text{H}^+$ e a entrada de prótons pela *FoF1-ATP sintetase*.

Estudos mais recentes sobre a fosforilação oxidativa (Boyer et alii, 1977, 1982; Grubmeyer et alii, 1982; Hatefi et alii, 1987) têm mostrado que a síntese de ATP na superfície da *FoF1-ATP sintetase* não necessita de fornecimento de energia. Segundo esta hipótese, a passagem dos prótons pela enzima, provocaria mudanças conformacionais, que modificariam a afinidade desta pelos substratos (ADP + Pi e ATP). Assim, na conformação em que a enzima tem grande afinidade por ADP e Pi, estes se ligam aos sítios catalíticos. Com a mudança na conformação (provocada pela passagem de H⁺), a enzima passaria a ter maior afinidade por ATP e então o ADP e o Pi reagiriam entre si formando ATP, sem necessidade de fornecimento de energia. Com nova mudança conformacional o ATP seria expulso, utilizando a energia do

gradiente de prótons, ocorrendo novamente ligação de ADP e Pi ao sítio. A *FoF1-ATP sintetase*, tem três sítios ativos para síntese de ATP (Boyer et alii, 1977; Hatefi et alii, 1987).

A membrana mitocondrial interna tem constituição lipoproteica, com 80 % de proteínas e 20 % de lipídios (em peso). Os lipídios garantem a fluidez necessária para o funcionamento das proteínas e a impermeabilidade a prótons que mantém o $\Delta\mu H^+$ (Halliwell & Gutteridge, 1989b). A constituição lipídica das membranas interna e externa da mitocôndria de fígado de rato foi determinada em conjunto (Cullis & Hope, 1985):

39 % - Fosfatidilcolina

35 % - Fosfatidiletanolamina

21 % - Cardioplipina

3 % - Colesterol

A cardioplipina, com suas quatro cadeias graxas altamente insaturadas, só existe na membrana interna, enquanto o colesterol só aparece na membrana externa.

Para manter a fluidez, os lipídios da membrana mitocondrial interna são altamente insaturados, com média de 1,5 insaturações por ácido graxo. A presença de cardioplipina na membrana tem sido relacionada com a atividade da cadeia respiratória, especialmente do complexo III (Ozawa et alii, 1987) e da *citocromo c oxidase*, indicando que a composição lipídica da membrana além de funcionar como barreira hidrofóbica ou meio de reação para as proteínas de membrana, também é importante para o funcionamento das mesmas (Cullis & Hope, 1985).

A parte protéica da membrana mitocondrial interna é composta principalmente por *translocases*, responsáveis pelo transporte de metabólitos

para os quais esta membrana seria impermeável, e pelos componentes da cadeia respiratória (aí incluída a *FoF1-ATP sintetase*).

C - Oxidações Biológicas: Fonte de radicais livres de oxigênio

Define-se como radical livre, toda a espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados. Nesta definição pode-se incluir o átomo de hidrogênio, os átomos de metais de transição e também o oxigênio molecular (O_2). O O_2 , no seu estado fundamental, possui dois elétrons desemparelhados de spins paralelos. Devido a esta característica, para o O_2 oxidar outro átomo ou molécula, aceitando um par de elétrons ambos devem ser de spins também paralelos. As biomoléculas em geral são espécies não radicalares, com grande número de ligações covalentes. Os dois elétrons que formam a ligação covalente possuem spins opostos que ocupam o mesmo orbital molecular e desta forma, restrições de spin evitam que o O_2 reaja prontamente com biomoléculas (Halliwell & Gutteridge, 1990). A figura 2 mostra os diversos estados da molécula de O_2 .

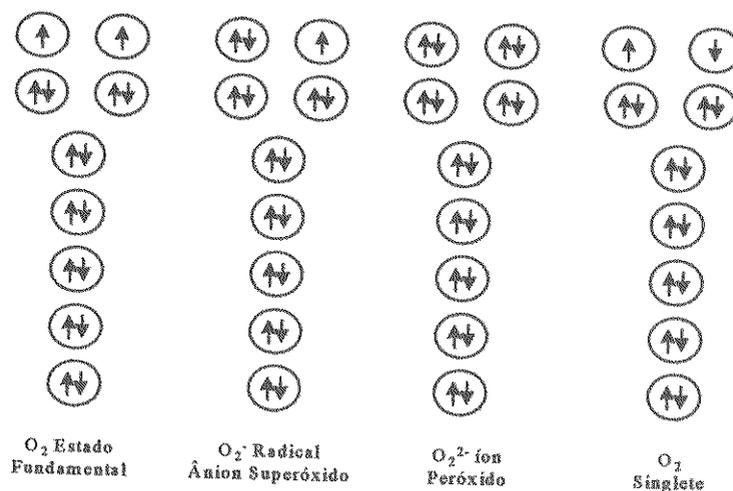


Figura 2 - Diferentes estados energéticos do oxigênio (Halliwell & Gutteridge, 1989a)

A adição de um elétron à molécula de oxigênio (O_2) produz o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este, de fato, pode ser formado não enzimaticamente em praticamente todas as células aeróbicas, como resultado do vazamento de elétrons da cadeia respiratória diretamente para o O_2 . Este vazamento ocorre principalmente a nível da CoQ e em menor grau pela *NADH desidrogenase* (Boveris & Chance, 1972). O $O_2^{\cdot-}$ pode ser formado também enzimaticamente por outras oxidases, como por exemplo a *xantina oxidase* (Halliwell & Gutteridge, 1989a). Duas moléculas de $O_2^{\cdot-}$ dismutam-se espontânea ou enzimaticamente, como consequência da ação da enzima *superóxido dismutase* (SOD). Esta reação consome prótons e produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2):



Assim, fica evidente que toda vez que houver aumento na produção de $O_2^{\cdot-}$, inevitavelmente, ocorrerá produção de H_2O_2 . A enzima *superóxido dismutase* foi localizada tanto na mitocôndria quanto no citosol, isto é, em locais compatíveis com os sítios de geração de $O_2^{\cdot-}$ (Faber et alii, 1990).

O H_2O_2 também pode ser formado quando o $O_2^{\cdot-}$ é reduzido diretamente em dois elétrons. Esta reação é catalisada por *oxidases* presentes geralmente nos peroxissomas (organelas citoplasmáticas). O H_2O_2 pode ser reduzido a água, pela ação distinta de duas enzimas: *Catalase* (EC. 1.11.1.6), presente principalmente nos peroxissomas, e *Glutathiona peroxidase* (GPX) (EC. 1.11.1.9), localizada tanto no citosol quanto nas mitocôndrias. A figura 3 mostra a ação da *Glutathiona peroxidase*, que utiliza o poder redutor do NADPH e da glutathiona reduzida (GSH) e precisa do auxílio das enzimas

Glutationa redutase (GRT), Transidrogenase (TDH) e de Desidrogenases do ciclo de Krebs (DH) (Chance et alii, 1979; Naqui et alii, 1986):

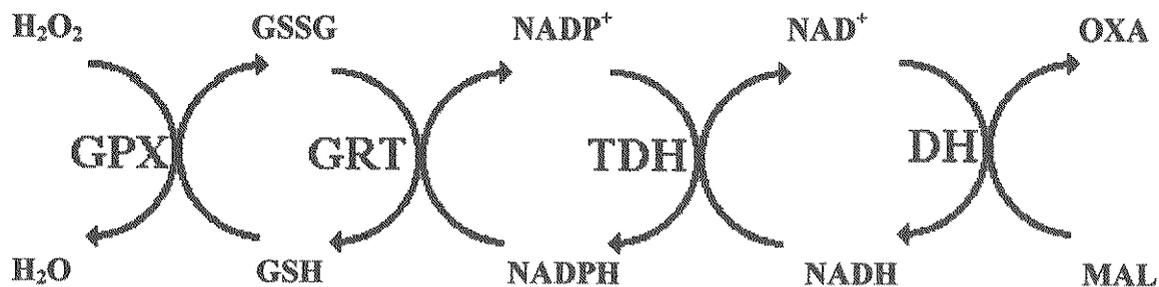


Figura 3 - Mecanismo de ação do sistema Glutationa peroxidase/Glutationa redutase e sua interação com os sistemas redutores celulares.

A ligação O-O do H_2O_2 é uma ligação fraca e pode ser rompida pela adição de mais um elétron, segundo a reação de Haber Weiss (equação 3), que produz o ânion hidroxila (HO^\cdot), relativamente inócuo e o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) uma das espécies mais reativas que se conhece. As principais fontes de elétrons para esta redução univalente do H_2O_2 são íons de metais de transição, particularmente Fe^{2+} e Cu^+ . Estas reações são conhecidas como reações de Fenton (equações de 4 a 6):



A interação desses radicais com alguns alvos celulares desencadeia eventos que podem levar à morte celular. Os alvos mais importantes são as membranas celulares e intracelulares, com o início e a propagação da peroxidação lipídica; as proteínas e as moléculas do DNA (nuclear e

mitocôndrial) com o aparecimento de quebras e/ou ligações cruzadas com proteínas, muitas vezes irreversíveis (Fridovich, 1986; Imlay & Linn, 1988).

Fisiologicamente, embora todas as células aeróbicas gerem, enzimaticamente ou não, espécies radicalares, as abundantes defesas antioxidantes dos organismos previnem o dano celular causado por estas espécies. Além disso, moléculas sequestradoras de espécies radicalares, tais como o ascorbato, a glutathiona reduzida, a cisteína e o α -tocoferol, embora ofereçam proteção menos específica, também limitam o dano total da célula (Kappus, 1985). Entretanto, há uma série de condições nas quais a velocidade de formação de espécies reativas está aumentada e/ou as defesas antioxidantes das células estão diminuídas. Neste caso, está estabelecido um estresse oxidativo, que pode resultar em dano ou mesmo morte celular. Há teorias que sugerem o envolvimento de radicais livres com processos de envelhecimento, câncer, lesões por radiação, danos celulares e tissulares pós-isquêmicos e também com o exercício físico (Imlay & Linn, 1988).

D - Peroxidação lipídica, uma das possíveis consequências do ataque de radicais livres.

As membranas celulares e intracelulares, especialmente a membrana interna da mitocôndria, contendo grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados, são um alvo importante das espécies reativas de O_2 (EROS). Os radicais livres para se estabilizarem devem doar ou receber elétrons de uma outra molécula, transformando-a numa espécie radicalar. Assim, uma das características das reações por radicais livres é que elas tendem a ocorrer em cascata (Halliwell & Gutteridge, 1989a; Ryan & Aust, 1992).

As insaturações dos ácidos graxos polinsaturados não são conjugadas, mas possuem entre si pontes metilênicas. As ligações carbono-hidrogênio do radical metil dessas pontes, são enfraquecidas pela dupla ligação adjacente, tornando seus hidrogênios suscetíveis de serem abstraídos por radicais livres. Espécies radicalares potentes podem remover tal hidrogênio numa reação que deixa o carbono do fosfolipídio momentaneamente com um elétron desemparelhado desencadeando o processo peroxidativo. Estes radicais lipídicos (L \cdot) se rearranjam molecularmente em dienos conjugados. Os dienos conjugados reagem com O $_2$ formando radicais peroxi (LOO \cdot). Estes radicais peroxi são oxidantes potentes e conseguem abstrair um segundo átomo de hidrogênio de um outro ácido graxo, propagando assim a cadeia de reações e formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Desta maneira, o radical iniciador começou um processo autocatalítico que no final converte a maioria dos ácidos graxos de membrana em hidroperóxidos lipídicos (Halliwell & Gutteridge, 1989b), conforme as equações de 7 a 9. O processo de peroxidação lipídica prossegue, porque os hidroperóxidos lipídicos, na presença de Fe $^{2+}$, podem ser oxidados a radicais alcoxi lipídicos (LO \cdot) (equação 10), que sofrem quebra na ligação C-C seguinte e dão origem a aldeídos de baixo peso molecular (principalmente malondialdeído e β -hidroxinonenal) e hidrocarbonetos (principalmente etano e n-pentano).



“In vitro”, os aldeídos de baixo peso molecular, podem reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando complexos coloridos (Halliwell & Gutteridge, 1989b). Estes complexos podem ser usados como indicadores da ocorrência da peroxidação lipídica nos sistemas biológicos.

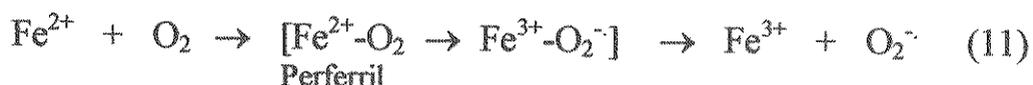
E - Peroxidação lipídica induzida por Ferro

A capacidade do ferro de poder alterar seu estado de oxidação, potencial redox e configuração eletrônica de spins, em resposta a diferentes ligantes o qualifica para exercer as funções de cofator de várias proteínas (Reed, 1985; Ryan & Aust, 1992). Desta forma, proteínas que contêm ferro como cofator, desempenham funções importantes na respiração celular, na liberação de O₂ para os tecidos, na síntese de DNA e regulação do ciclo de Krebs. Por outro lado, as mesmas propriedades físicas que permitem ao ferro participar como um cofator em reações redox controladas, também o capacitam a agir como um potente catalisador da oxidação de moléculas, quando não protegido. Não é sem motivo que, com a evolução dos complexos protéicos contendo ferro, a natureza tenha providenciado maneiras eficientes e não tóxicas de controlar sua absorção, transporte e armazenagem pelos organismos, como a utilização da ferritina, para estocagem nas células e a transferrina para o transporte na corrente sanguínea. O ferro ligado a essas proteínas está eficientemente protegido da oxidação direta (Miller et alii, 1990; Ryan & Aust, 1992). Deve ser destacado ainda o heme, grupo prostético da hemoglobina, mioglobina e de citocromos, que é uma estrutura hidrofóbica (protoporfirina IX), inserida num bolsão hidrofóbico que protege o ferro da oxidação.

É bom enfatizar que nas oxidações biológicas, as reações diretas entre o oxigênio molecular e a maioria das biomoléculas são extremamente lentas, quando não ocorrem na presença de metais de transição como catalisadores. Os metais de transição, não têm restrição de spin, portanto são eficientes transportadores de elétrons (Miller et alii, 1990). Entretanto, alguns estudos feitos desprezam a importância desses metais catalisadores, por não considerarem a possibilidade de haver contaminantes metálicos em seus ensaios (Miller et alii, 1990; Ryan & Aust, 1992), sendo que o metal mais abundante em meios biológicos é o ferro.

A despeito de um grande número de trabalhos, muitos detalhes dos mecanismos das oxidações catalisadas por ferro não são ainda conhecidos, em particular a identidade química do iniciador do processo de peroxidação lipídica.

Uma das propostas mais frequentes indica o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) como o iniciador do processo (embora a maior parte das evidências sejam indiretas) (McCord & Day, 1978; Gutteridge, 1984). De fato, o Fe^{2+} pode tomar parte nas reações com o oxigênio molecular:

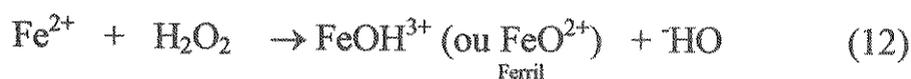


O superóxido formado pode dismutar e formar H_2O_2 , produzindo todos os componentes para as reações de Fenton e formação do radical hidroxila, conforme mostrado nas equações 3, 4 e 5 (McCord & Day, 1978; Gutteridge, 1984). Assim, segundo esta hipótese, a adição de sais de Fe^{2+} a um meio completamente livre de peróxido lipídico polinsaturado desencadearia a peroxidação lipídica pela abstração de H por $\cdot\text{OH}$. Esta sugestão baseia-se na observação de que este processo peroxidativo pode ser inibido por enzimas que removem H_2O_2 (*Catalase* e *Glutathione peroxidase*), sequestradores de $\cdot\text{OH}$

(manitol ou formiato) e por quelantes de ferro (EDTA) (Halliwell & Gutteridge, 1989a).

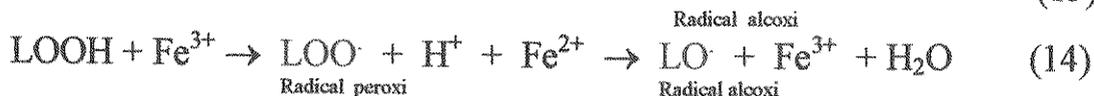
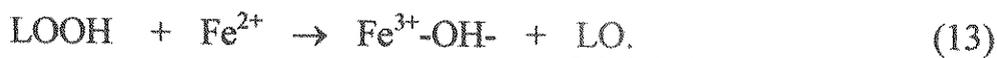
Por outro lado vários trabalhos sobre a peroxidação lipídica catalisada por ferro mostraram pouca ou nenhuma correlação do radical hidroxila com esse processo. Isto levou à proposta de outros iniciadores para o processo, tais como o complexo $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ou ferro em complexos com o O_2 (Bucher et alii, 1983; Minotti & Aust, 1987a, 1987b, 1987c; Driomina et alii, 1993).

Embora a maioria dos cientistas concorde que quando o ferro é adicionado ao H_2O_2 ou a sistemas geradores de O_2^- seja formado radical hidroxila (Halliwell, 1978; McCord & Day, 1978; Grootveld & Halliwell, 1986; Halliwell et alii, 1987; Halliwell et alii, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1989b; Halliwell & Grootveld, 1987), Rush & Koppenol (1986) mudaram este ponto de vista, com base em estudos detalhados da degradação do citocromo c por misturas de Fe-citrato + H_2O_2 . Esses autores mostraram que a espécie reativa formada é o radical ferril e não o hidroxila. O radical ferril é um complexo do O_2 com o Fe^{2+} , no qual o ferro passa a ter valência 4 (equação 12):



Entretanto, evidências diretas que o radical ferril seja formado em sistemas tipo Fenton ainda não foram obtidas, nem há qualquer evidência que esta espécie seja detectada pela técnica de “spin-trapping” (Halliwell & Gutteridge, 1990). O próprio perferril (equação 11) é outra espécie que se sugere estar envolvida na iniciação do processo de peroxidação lipídica (Pedersen & Aust, 1975). Entretanto, de acordo com o que é conhecido da química dos complexos de perferril parece que eles não tem reatividade suficiente para abstrair hidrogênio diretamente das cadeias de ácidos graxos

(Halliwell & Gutteridge, 1990). Além desses, estudos da cinética da peroxidação lipídica em microsossomos ou lipossomos, na presença de íons de Fe^{2+} e/ou Fe^{3+} levaram Minotti & Aust a proporem que a primeira cadeia de iniciação requer um complexo $Fe^{2+}/Fe^{3+}-O_2$, ou pelo menos uma razão crítica específica de 1:1 Fe^{2+}/Fe^{3+} (Minotti & Aust, 1987a, b, c; Ryan & Aust, 1992). Esta proposta foi baseada nas observações de que a peroxidação lipídica dependente de Fe^{2+} em um sistema de membranas se processa mais rapidamente na presença de Fe^{3+} . Na verdade, vários outros autores obtiveram resultados comparáveis com estes (O'Brien, 1969; Braugher et alii, 1986; Davies & Slater, 1987; Goddard & Sweeney, 1987; Ryan & Aust, 1992; Driomina et alii, 1993). Por outro lado, não podemos nos esquecer que já foi demonstrado há longo tempo que o ferro desempenha um segundo papel importante na peroxidação lipídica, pois pode reagir com peróxidos lipídicos de uma maneira similar ao H_2O_2 , causando a quebra da ligação O-O com formação de radical alcoxi (equação 13). Já o Fe^{3+} pode formar ambos, radicais peroxi e alcoxi (equação 14).



Se considerarmos que as organelas são isoladas de células que foram rompidas, não podemos descartar a presença de peróxidos lipídicos. Também os lipídios disponíveis comercialmente aparentemente poderão estar contaminados com peróxidos lipídicos (Gutteridge & Kerry, 1982). Estes podem formar radicais alcoxi e peroxi que são reativos o suficiente para abstrair um hidrogênio e propagar a peroxidação. Assim não haveria a necessidade da primeira fase de iniciação (equação 7). Os íons metálicos adicionados não estariam fazendo mais que estimular a lipoperoxidação por

quebrar peróxidos lipídicos. Segundo Halliwell, não é impossível que ferril, perferril e provavelmente complexos $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$ iniciem a peroxidação lipídica por sua capacidade de destruir esses peróxidos lipídicos (Halliwell & Gutteridge, 1990).

4 - OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1 - Estudar o papel dos íons de ferro na iniciação da peroxidação lipídica utilizando, como sistema gerador de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , mitocôndrias isoladas de fígado de rato, respirando em estado respiratório 4.
- 2 - Identificar possíveis alterações na fluidez da bicamada lipídica mitocôndrial, que estariam relacionadas a alterações em suas funções.

5- MATERIAIS E MÉTODOS

A - Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

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

Após o animal ser sacrificado por destroncamento cervical, retirou-se o fígado, picou-se com tesoura, em meio de isolamento I (sacarose 250 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, EGTA 0,5 mM). Após, homogenizou-se, em homogeneizador Potter-Elvehjem por 2 minutos. Centrifugou-se, em centrífuga Beckman modelo J2-21 (rotor JA20), por 10 minutos a 700 x g. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 12100 x g por 10 minutos. O precipitado formado foi ressuspensão em meio II (sacarose 250 mM e HEPES 10 mM pH 7,4). A suspensão formada foi centrifugada a 14600 x g por 10 minutos. Ressuspendendo-se o precipitado formado, com o mínimo possível de meio II, obteve-se uma suspensão mitocôndrial bastante pura. Todo este procedimento foi feito mantendo-se a temperatura entre 0 e 4° C. Para os experimentos de análise de TBARS, onde a presença de sacarose é interferente, o sedimento de mitocôndrias foi ressuspensão em meio contendo KCl 120 mM e HEPES 20 mM, pH 7,4.

Tanto no primeiro caso, suspensão de mitocôndrias em meio de sacarose, como no segundo, suspensão em meio de KCl, a concentração mitocôndrial foi determinada em termos de concentração de proteína, pelo método do biureto, modificado pela adição de colato a 1 % (p/v) (Gornall et alii, 1949; Kaplan & Pedersen, 1983). Como padrão foi utilizada uma curva de

BSA (soroalbumina bovina). As leituras de absorvância foram feitas a 540 nm em espectrofotômetro Beckman modelo DU 640.

B- Determinação do consumo de O₂

O consumo de O₂ pela suspensão mitocôndrial foi determinado polarográficamente, utilizando-se um eletrodo, tido 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 para controle respiratório (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 suspensão de mitocôndrias em volume suficiente para uma concentração final de 1 mg/mL. Registrou-se o estado respiratório 4. Após 3 minutos adicionou-se ADP 300 µM e registrou-se 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 foi utilizada para o calculo do controle repiratório (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 no estado 4 (estado basal). A preparação mitocôndrial foi considerada adequada para os experimentos quando o controle respiratório deu resultado maior que 4 (Nicholls, 1982).

C - Peroxidação lipídica observada pela análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Um dos métodos para se quantificar os produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff, conforme mostra a figura 4. Esses complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada por espectrofotometria a 535 nm, ou fluorescência a 515 nm de excitação e 555 de emissão (Ohkawa et alii, 1979).

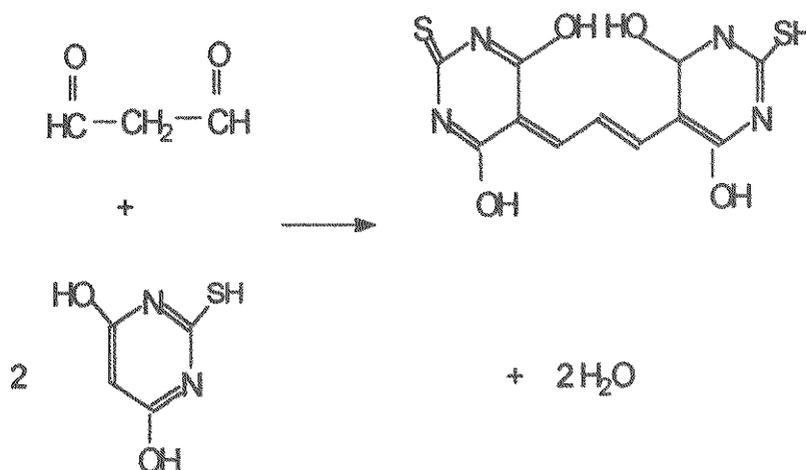


Figura 4 - Formação dos complexos coloridos (bases de Schiff) entre o malondialdeído (TBARS) e o ácido tiobarbitúrico (TBA).

Este é um método simples e sensível, embora despreze os produtos voláteis da peroxidação lipídica (etano e n-pentano) além de desconsiderar que outros compostos, tais como prostaglandinas, tromboxanas, desoxirribose e outros carboidratos, possam formar bases de Schiff com o TBA. Na verdade, o

próprio malondialdeído formado, pode formar bases de Schiff com grupos NH_2 de várias biomoléculas (fosfolípidios, aminoácidos e proteínas, ácidos nucleicos e açúcares). Assim para melhorar os resultados, após o tempo necessário para ocorrer a peroxidação lipídica (vinte minutos, na maioria dos experimentos) adicionou-se butilhidroxitolueno (BHT - um sequestrador de radicais livres) $90 \mu\text{M}$ para paralisar o processo e também abaixou-se o pH para 2,0, antes de se adicionar o TBA. Isto torna mais eficiente a formação dos complexos e evita a formação da bases de Schiff entre o malondialdeído e outras biomoléculas e também a formação de polímeros de malondialdeído (Kappus,1985).

Construção da curva padrão

Para se quantificar a concentração de TBARS formados nas diferentes condições experimentais, elaborou-se uma curva padrão, utilizando-se 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP), se transforma linearmente em malondialdeído (MDA)(Yagi, 1976). A figura 5 mostra a leitura de varredura de emissão no espectrofluorímetro, com excitação fixa em 515 nm, entre 520 e 600 nm. A semelhança nos espectros de emissão (pico em 555 nm) indica que as mesmas espécies devem estar sendo formadas tanto na amostra proveniente da quebra do TEP, quanto na proveniente da indução de peroxidação lipídica em suspensão mitocondrial, possibilitando o uso da curva padrão de TEP para quantificar a concentração de TBARS nas amostras.

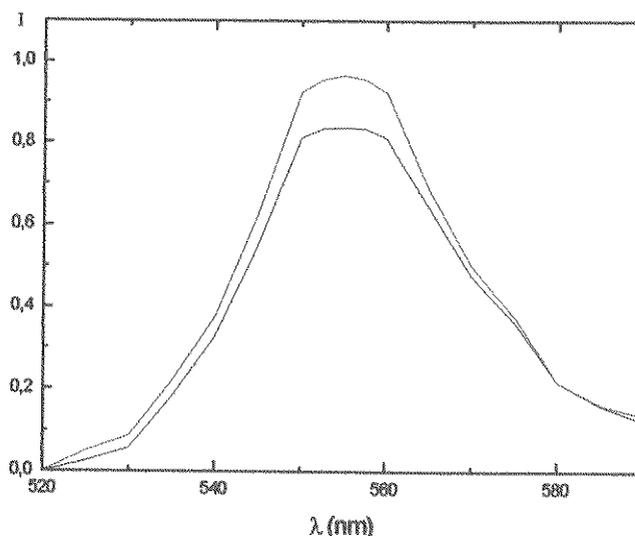


Figura 5 - Espectros de varredura de emissão de bases de Schiff formadas pelas TBARS: formadas pelo TEP (—) e aquelas provenientes da peroxidação lipídica sofrida por suspensão mitocondrial (1 mg proteína/mL) induzida por FeSO_4 (0,5 mM) (---). Temperatura ambiente, λ de excitação 515 nm.

Concentrações crescentes do padrão TEP (0 a 30 μM) ou 1 mg/mL de proteína mitocondrial foram incubados à temperatura ambiente e aeradas, em 1 mL de meio de reação (KCl 120 mM, HEPES 20 mM pH 7,4, succinato 5 mM, rotenona 2 μM), durante 20 minutos. Após a adição de BHT 90 μM , dividiu-se a amostra em duas para aumentar a precisão do método. O pH foi corrigido para 2,0 com 1 mL de H_2SO_4 0,04 M e após adicionou-se 1 mL do reagente de TBA (TBA 0,67%, SDS 0,4%, NaOH 0,06 M). As amostras foram incubadas em banho-maria a 90° C por 20 minutos. Após rápido resfriamento das amostras em banho de gelo, a fase orgânica foi extraída com 3 mL de n-butanol. Fez-se a leitura em espectrofluorímetro, com excitação em 515 nm e emissão em 555 nm, conforme o gráfico da figura 6. A regressão linear foi calculada. As leituras provenientes das amostras foram convertidas em

concentrações de TBARS, usando-se esta curva padrão. Esta curva padrão representa a média de 5 experimentos.

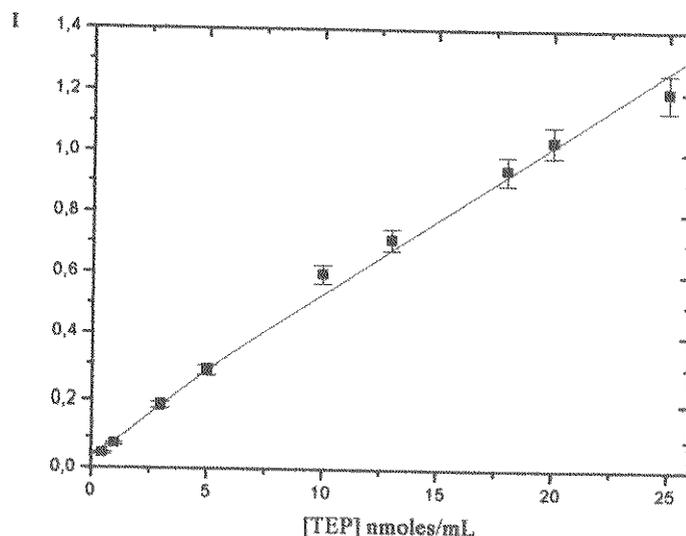


Fig. 6 - Curva padrão para dosagem de TBARS - Soluções de concentrações crescentes de TEP foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente em 1 mL de meio e depois foi adicionado 1 mL de H_2SO_4 0,04 M e 1 mL de reagente de TBA, incubando-se por 20 minutos em banho-maria a $90^\circ C$. A fase orgânica foi extraída com 3 mL de n-butanol e foram feitas as leituras em espectrofluorímetro a 515 nm de excitação e 555 de emissão. ($r = 0,9965$).

D- Determinação da concentração de Fe^{2+}

Para se saber a concentração de Fe^{2+} presente num determinado ensaio, usou-se uma substância que se complexa especificamente com Fe^{2+} e não com Fe^{3+} . Segundo Vogel (1979) os íons Fe^{2+} reagem com a orto-fenantolina (figura 7), formando um íon complexo que tem cor vermelha e cuja

concentração pode ser determinada por espectrofotometria a 510 nm. Este método tem sido utilizado para se determinar a concentração de Fe^{2+} em experimentos envolvendo meios biológicos (Minotti & Aust, 1987c; Tien et alii, 1982).

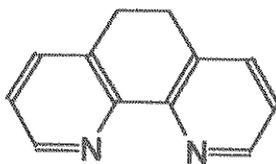


Figura 7 - Formula estrutural da orto-fenantrolina

Construção da curva padrão

Preparou-se uma solução de FeSO_4 50 mM, com ascorbato de potássio 150 mM (1:3) de forma que todo o ferro se mantivesse no estado ferroso (Fe^{2+})

O espectro de varredura do complexo Fe^{2+} -orto-fenantrolina é mostrado na figura 8. Verificou-se a absorvância máxima no λ 510 nm.

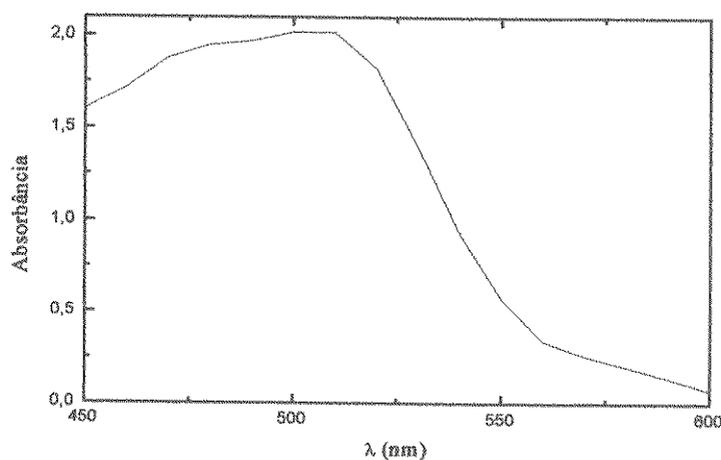


Figura 8 - Espectro de absorção do complexo Fe^{2+} /o-fenantrolina - Fe^{2+} 0,5 mM + orto-fenantrolina 7,5 mM diluídos em H_2O .

Usando-se a solução estoque descrita acima, preparou-se uma curva padrão com concentrações de Fe^{2+} entre 0 e 2 mM. Adicionou-se o-fenantrolina 7,5 mM. Mediu-se a absorbância a 510 nm, originando o gráfico da figura 9, que representa a média de 5 experimentos e os desvios padrão. Calculou-se a regressão linear, e esses dados foram utilizados para determinar a concentração de Fe^{2+} , a partir da absorbância das diversas amostras.

A curva feita com FeSO_4 sem ascorbato, nas mesmas condições de tempo e de temperatura é igual à obtida na presença do ascorbato (dado não mostrado).

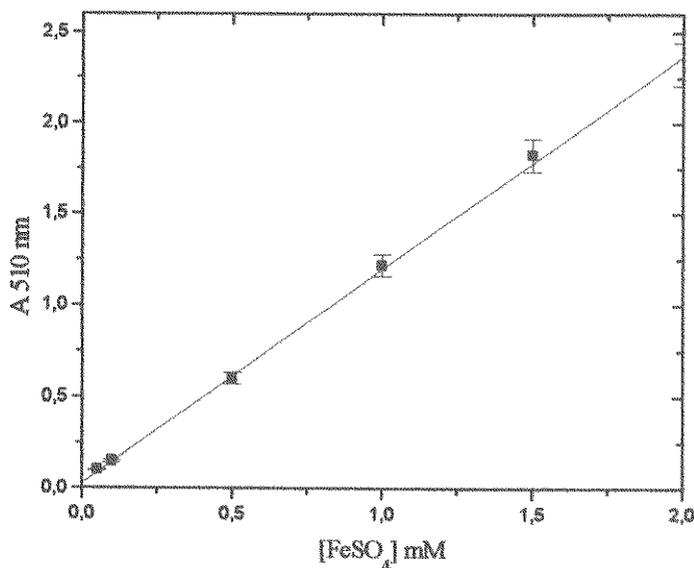


Figura 9 - Curva padrão de Fe^{2+} /o-fenantrolina - Concentrações crescentes de FeSO_4 com Ascorbato (1:3) foram diluídas em 1 mL de H_2O . Adicionou-se orto-fenantrolina 7,5 mM. As leituras foram feitas a 510 nm. ($r = 0,9995$).

E - Ressonância Paramagnética Eletrônica - (RPE)

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica útil no estudo das estruturas e dinâmicas moleculares. É um método sensível e bastante adequado para, entre outras aplicações, sinalizar a presença de radicais livres e medir a fluidez de membranas biológicas (Borg,1976).

Uma condição essencial para que se possa obter o espectro de RPE de uma molécula é que esta possua um elétron desemparelhado(o que na natureza é encontrado nos radicais livres e em metais de transição). Um elétron livre, possuindo uma carga negativa, está em constante rotação, originando um campo magnético. Ao eixo em torno do qual o elétron gira é associado a um campo magnético. Restrições quânticas determinam que, em relação a um eixo de referência, só existam duas orientações de spin. Essas duas possíveis orientações do elétron, de igual energia, são designadas α e β e estão associadas a um número quântico de spin (M_s). O elétron livre, na ausência de um campo magnético externo, não tem preferência por um ou outro desses estados, ou seja, seu estado de energia está degenerado (Borg, 1976).

Quando submetidos a um campo magnético externo, os eletrons se alinham ao campo, criando níveis de energia. Os de spin paralelo ao campo são um pouco mais estáveis que os de spin antiparalelo, por terem um nível de energia um pouco menor. Os de spin paralelo tem $M_s = -1/2$ e os de spin antiparalelo tem $M_s = +1/2$. A diferença entre esses dois níveis de energia (ΔE) é dada pela equação 15.

$$\Delta E = g\beta H \quad (15)$$

Onde g é um fator do elétron que é dependente da espécie paramagnética onde o mesmo está situado, β é o magnéton de Bohr do elétron e H a intensidade do campo magnético externo aplicado.

Quando se irradia uma amostra contendo elétrons desemparelhados com uma radiação eletromagnética oscilante (cuja energia de fóton seja E , descrita na equação 15), a energia do fóton pode ser transmitida aos elétrons orientados paralelamente ao campo (de nível de energia mais baixo) se esta energia E for igual à diferença de energia entre os spins α e β (ΔE na equação 15). Neste caso:

$$\Delta E = h \nu = g\beta H \quad (16)$$

Neste caso os elétrons desemparelhados da amostra estarão em ressonância com o campo. Alguns elétrons, com spin paralelo ao campo ($M_s = -1/2$) absorverão energia e passarão a ter spin antiparalelo ($M_s = +1/2$) e após um certo tempo esses elétrons farão o inverso.

É esta absorção de energia (ou sua derivada) que é registrada na espectroscopia de RPE. Instrumentalmente existe um campo de modulação pequeno (0,5 a 5 G) com uma frequência de oscilação na faixa de 100 KHz e paralelo ao campo magnético externo que serve para criar deslocamentos rápidos do valor total do campo sobre a amostra e, desta forma, fazer rápidos deslocamentos da posição de ressonância. É este artifício instrumental que permite a relaxação eletrônica, isto é, que os elétrons desçam para o nível de energia mais baixo, para novamente poderem absorver energia subindo para o nível superior. Sem este campo de modulação o espectro de RPE não seria observado.

De acordo com a distribuição de Boltzmann, as partículas energizadas em diferentes níveis de energia sempre povoam os níveis mais estáveis.

Considerando uma determinada amostra submetida a um campo eletromagnético nas condições da equação 17, onde há N_α elétrons de spin antiparalelo com energia E_α e N_β elétrons de spin paralelo com energia E_β , sua distribuição será:

$$N_\alpha/N_\beta = \exp [\Delta E/kT] \quad (17)$$

Onde k é a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta. Como $E \ll kT$, as populações dos dois níveis são praticamente iguais. Para uma temperatura de 300 K e um campo de 3400 G tem-se que $N_\alpha/N_\beta = 1,0015$, ou seja há uma diferença de $15 \cdot 10^{-4}$ spins. Mas como N é bastante elevado, a diferença de população total da amostra é geralmente muito grande. Supondo-se $N \approx 10^{15}$ spins tem-se, pela relação acima, uma diferença de população ($\Delta N = N_\alpha - N_\beta$) de $1,5 \cdot 10^{12}$ spins, o que garante um bom sinal de RPE. O sinal depende portanto da diferença de populações (ΔN) que faz com que a amostra absorva suficiente energia do campo eletromagnético aplicado, e apresente o espectro de EPR. O espectro normalmente registrado é a primeira derivada dessa absorção. Como explicado anteriormente, apenas uma pequena parte dos elétrons contribui para o sinal de RPE e por isso há necessidade de um sistema eletrônico sofisticado de detecção e ampliação (Borg, 1976).

A espectroscopia de RPE aparece no espectro eletromagnético na região das microondas ($10^{12} - 10^{10}$ Hz) (McConnell, 1976, Borg, 1976, Tabak et alii, 1985).

Uma das informações mais importantes do espectro de RPE é a interação nuclear hiperfina, que consiste na interação entre o espectro de ressonância eletrônica e os campos magnéticos dos núcleos da espécie paramagnética, resultando na separação em dois ou mais componentes

desdobramentos hiperfinos), sendo assim um meio de se identificar a estrutura do radical livre presente.

Neste trabalho, os espectros de RPE foram usados para medir alterações na fluidez da membrana mitocôndrial interna, após exposição à peroxidação lipídica.

Para se medir alterações na fluidez da membrana mitocondrial, usou-se o marcador de spin 5-doxil estearato, que possui o anel do radical nitróxido ligado ao carbono 5 (anfifílico). Da mesma natureza química dos fosfolipídios constituintes da membrana, o marcador de spin se insere dentro desta e o seu espectro de RPE pode fornecer informações sobre sua mobilidade (tempo de correlação rotacional). Comparando espectros do marcador de spin em membranas íntegras e submetidas a vários graus de peroxidação lipídica, pode-se saber se houve alterações de mobilidade no ambiente onde as moléculas do marcador de spin se encontram, tendo assim informações sobre o grau de fluidez da membrana. Geralmente as bicamadas mais fluidas são as mais desordenadas devido ao maior passo de difusão dos lipídios. O ordenamento lipídico é avaliado calculando-se o parâmetro de ordem (S), que varia de 1 (totalmente rígido) a zero (totalmente fluido). Para o cálculo do parâmetro S são utilizadas as medidas dos desdobramentos hiperfino paralelo e perpendicular aparentes, medidos diretamente nos espectros (figura 12). O cálculo é feito através da fórmula de Gaffney (1976):

$$S = \frac{T_{\parallel}^i - T_{\perp}^i - C}{T_{\parallel}^i + 2T_{\perp}^i + 2c} \cdot 1,723 \quad (18)$$

Onde $T_{//}$ e T_{\perp} representam respectivamente os desdobramentos hiperfinos paralelo e perpendicular, e C é um fator de correção empírico da polaridade dado por: $C = 1,4 - 0,053 (T_{//} - T_{\perp})$ (Gaffney, 1976).

Determinação do parâmetro de ordem S

MFR (1 mg/mL) foram incubadas a 37° C, por 20 minutos, em 1,5 mL de meio de reação contendo KCl 120 mM, HEPES 20 mM, succinato 5 mM, rotenona 5 μ M, Pi 5 mM, e concentrações variadas de FeSO_4 (0 a 2 mM). As amostras foram centrifugadas durante 2 minutos, para concentração da MFR. Após adicionou-se a um tubo limpo o marcador diluído em etanol 5 mg/mL, evaporou-se o etanol com N_2 gasoso e a MFR foi colocada sobre o filme do marcador de spin. A concentração do marcador na solução foi estimada em $2 \cdot 10^{-4}$ M. Após a adição do marcador, foi tirado o espectro de EPR e calculado o parâmetro de ordem S , conforme descrito anteriormente.

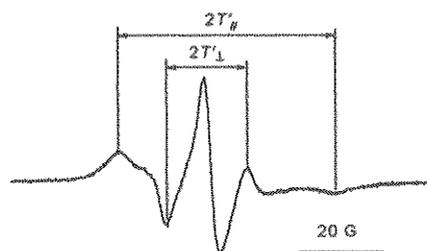


Figura 10 - Espectro do marcador de spin ácido 5 doxil esteárico em MFR - MFR 1mg/mL incubada em meio de reação + ácido 5 doxil esteárico. Indicam-se os parâmetros $2T_{//}$ e $2T_{\perp}$, utilizados na formula 18.

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, estudamos o processo peroxidativo induzido por FeSO_4 em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, acompanhando o acúmulo de produtos da lipoperoxidação determinados através de detecção de TBARS, alteração na fluidez de membrana estimada através da variação do parâmetro de ordem S e pelo registro de consumo de O_2 pelas organelas.

As mitocôndrias, quando incubadas por 20 minutos com concentrações crescentes de FeSO_4 , apresentam um aumento na formação de TBARS até uma concentração de FeSO_4 correspondente a 0,5 mM, quanto então permanece constante a concentração de TBARS. Aumentando-se ainda mais a concentração de FeSO_4 , verifica-se que ocorre diminuição da concentração de TBARS a partir de FeSO_4 1 mM. Esses resultados, conforme mostra a figura 11 refletem realmente o grau de lipoperoxidação, uma vez que a presença do sequestrador de radicais livres Butilhidroxitolueno (BHT) no meio de incubação, previne completamente a formação de TBARS em qualquer concentração de FeSO_4 estudada.

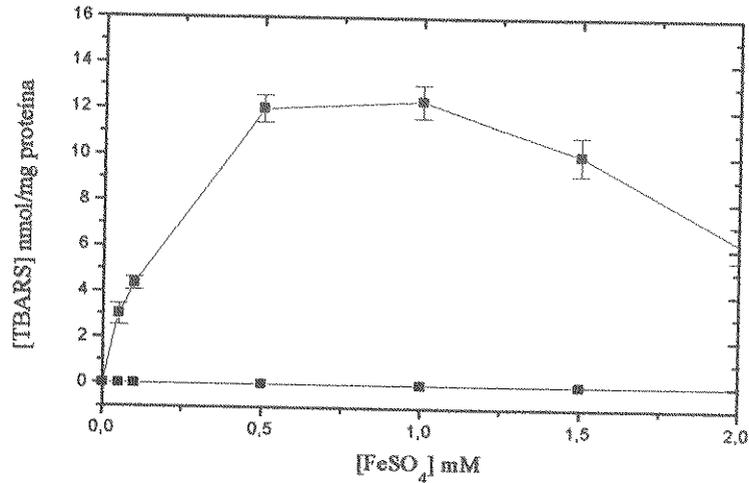


Figura 11 - Peroxidação lipídica induzida por FeSO₄ - MFR 1 mg/mL foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, em meio isosmótico (KCl 120 mM, HEPES 20 mM pH 7,4, succinato 5 mM, rotenona 5 μ M e Pi 1 mM), com concentrações crescentes de FeSO₄ (—) ou adicionando-se BHT 90 μ M antes da adição de FeSO₄ (---).

Utilizando-se o ácido 5-doxyl esteárico como sonda paramagnética, pudemos verificar que ocorre uma alteração nos espectros de RPE de mitocôndrias antes e após a lipoperoxidação induzida por FeSO₄. Desses resultados, mostrados na figura 12, obteve-se a determinação do parâmetro de ordem S, que é uma medida adequada do grau de fluidez das membranas (ver item D, Materiais e Métodos)

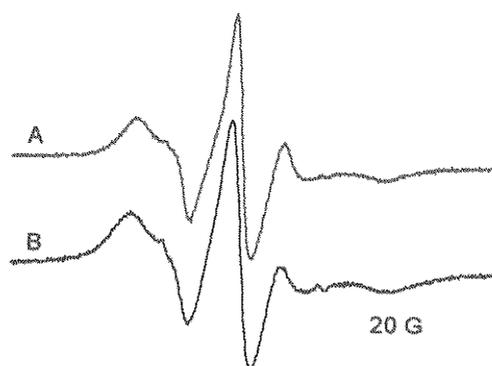


Figura 12 Espectros de RPE em MFR - Marcador de spin 5 doxil estearato inserido em MFR 1 mg/mL incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, nas condições da figura 11, controle (—), com FeSO_4 0,5 mM (—).

Calculado o parâmetro de ordem S para cada concentração de FeSO_4 utilizada, pudemos observar que o aumento na formação de TBARS correlaciona-se com a diminuição da fluidez da membrana mitocondrial conforme mostra a figura 13. Podemos observar também que o processo de “enrigecimento” causado pela peroxidação parece atingir um pico máximo (entre 0,5 e 1 mM de FeSO_4); em concentrações maiores ocorre aumento de fluidez (diminuição do S), até valores próximos aqueles da amostra inicial.

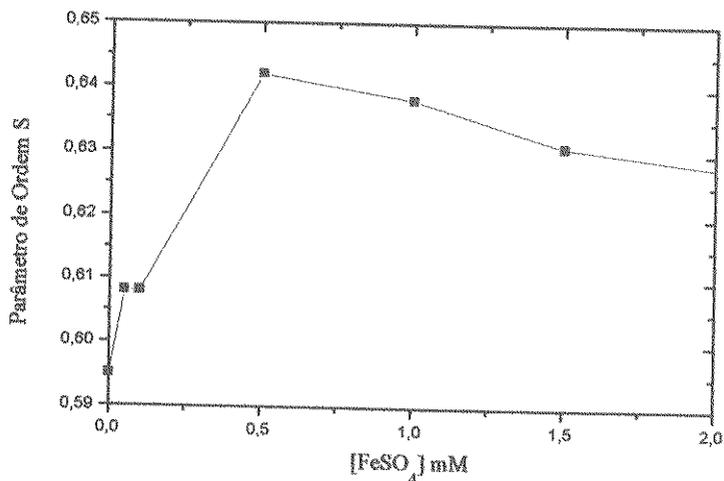


Figura 13 - Alteração na fluidez induzida por FeSO₄ - MFR 1 mg/mL, incubadas nas mesmas condições da figura 11, na presença do marcador de spin 5-doxyI estearato. Para cada concentração de FeSO₄ registrou-se o espectro de RPE e calculou-se o parâmetro de ordem S de acordo com a equação 15.

Esses resultados concordam com os obtidos por Driomina et alii (1993), que já havia sugerido a existência de uma concentração crítica de oxidante (Fe²⁺), designada [Fe^{2+*}], após o qual o Fe²⁺ parece agir como antioxidante. Entretanto, esses experimentos que quantificam o acúmulo de produtos secundários da peroxidação lipídica e as alterações de fluidez das membranas mitocondriais após um certo tempo de incubação, não permitem o seguimento da cinética do processo ao longo do tempo.

Com esse objetivo em mente, repetimos as mesmas condições de incubação das mitocôndrias com FeSO₄, registrando o consumo de O₂ pelas organelas. Desta forma, obtivemos a curva mostrada na figura 14.

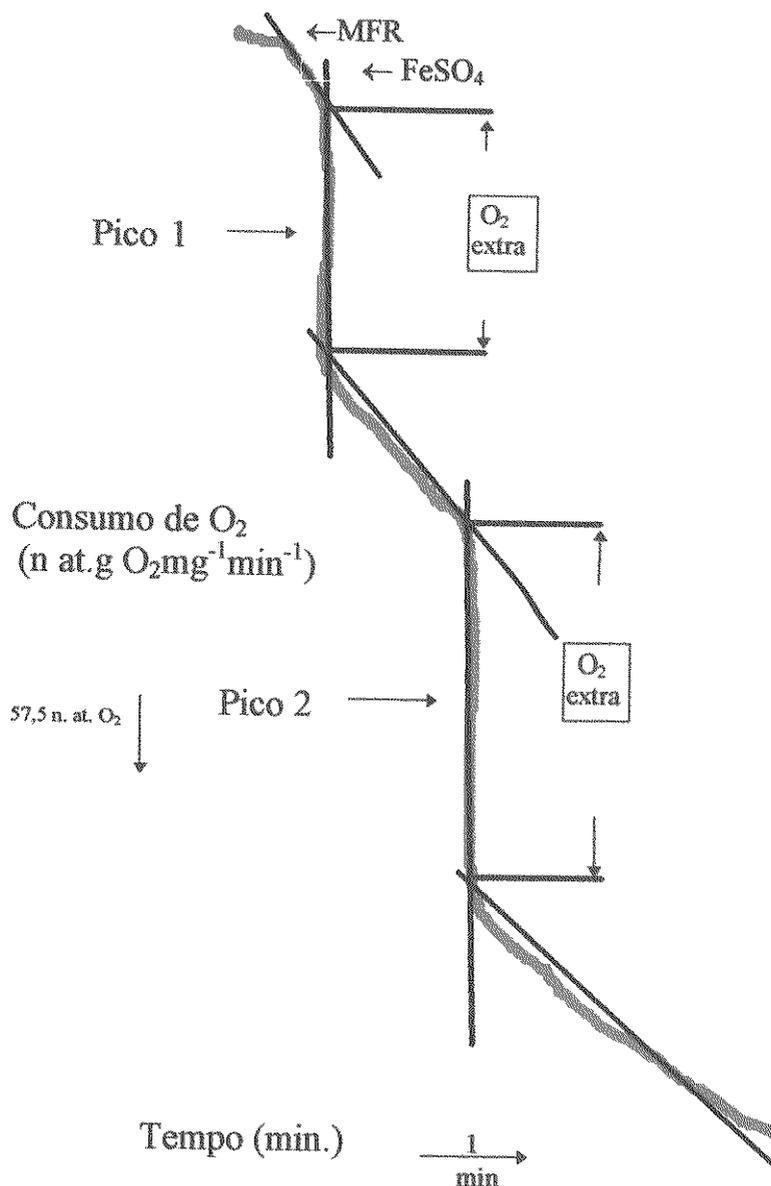


Figura 14 - Registro de oxígrafo, mostrando os dois picos de consumo de O₂ extra, quando se adiciona FeSO₄ a suspensões de MFR respirando em estado respiratório 4 - MFR, 1 mg/mL, foi encubada por 3 minutos em meio de reação (sacarose 125 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, Pi 3 mM, succinato 5 mM), após esse tempo foi adicionado FeSO₄ 0,5 mM, registrando-se o consumo de O₂. Pico 1: oxidação de Fe²⁺ a Fe³⁺. Pico 2: peroxidação lipídica.

Quando adicionamos FeSO_4 a 1 mg de suspensão mitocondrial respirando em estado respiratório 4 ocorre um primeiro pico de consumo de O_2 extra, relacionado com a oxidação de FeSO_4 e, após um intervalo de tempo, observa-se um segundo pico de consumo de O_2 extra, que correlaciona-se com o processo peroxidativo. Essa atribuição dos fenômenos nos picos 1 e 2 baseia-se nos estudos com variação da concentração de FeSO_4 na faixa de 50 μM a 2 mM, através dos quais obtivemos os dados apresentados na tabela I. Podemos verificar que, conforme aumenta a concentração de FeSO_4 no meio de reação a velocidade de consumo de O_2 no pico 1 também aumenta. No entanto, a velocidade de consumo de O_2 no pico 2 apresenta um estímulo máximo com FeSO_4 0,5 mM, a mesma concentração em que os traçados das figuras 11 e 13 atingem um valor máximo. Além disso, observa-se também que o intervalo de tempo entre os dois picos de consumo de O_2 vai ficando maior com o aumento da concentração de FeSO_4 , a ponto de não poder ser detectado quando atinge-se a concentração de FeSO_4 2 mM. Os dados correspondentes à V2 da tabela 1 foram plotados em função da concentração de FeSO_4 e a curva confirma que o consumo de O_2 pela peroxidação lipídica é bifásico subindo de 0 a 0,5 mM de FeSO_4 e decaindo de 0,5 a 1 mM (figura 15). Um resultado muito importante é que a presença de BHT impede a ocorrência do segundo pico, sem alterar o primeiro. Isto corrobora a interpretação que, no pico 1 o que vemos é o consumo de O_2 causado pela oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Como esta relação não depende da existência de uma espécie radicalar, o consumo de O_2 aumenta na dependência de uma maior disponibilidade de Fe^{2+} para ser oxidado, independente da presença de um sequestrador de radicais no meio de incubação. Por outro lado, a presença de manitol (50 mM) não previne nenhum dos picos de consumo de oxigênio extra, indicando que o consumo de O_2 do

pico 2 não deve ser atribuído à formação do radical $\cdot\text{OH}$, uma vez que o manitol é um conhecido sequestrador dessa espécie (Halliwell & Gutteridge, 1989a). Assim, embora a supressão do pico 2 por BHT nos permita concluir que essa etapa, correspondente à peroxidação lipídica ocorra através da geração de uma ou mais espécies radicalares, o resultado do experimento realizado na presença de manitol afasta a possibilidade de participação de $\cdot\text{OH}$ neste processo.

Tabela I - Velocidade de consumo extra de oxigênio por MFR em estado respiratório 4 na presença de concentrações crescentes de FeSO_4 - MFR (1 mg/mL) foram incubadas 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), na presença de concentrações crescentes de FeSO_4 . Os picos 1 e 2 foram determinados conforme mostrado na figura 14. As adições de manitol e de BHT foram feitas diretamente no meio de reação e as de FeSO_4 após 3 minutos de respiração. V1 e V2 correspondem às velocidades de consumo de O_2 nos picos 1 e 2 e Δt corresponde ao intervalo de tempo entre a ocorrência dos dois picos de consumo de O_2 .

[Fe ²⁺] μM	V1 n. at. $\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	Δt (s)	V2 n. at. $\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$
0	0	0	0
50	1,96	96	64,8
100	24,96	96	196,8
500	33,60	240	398,4
750	163,20	264	168,0
875	350,40	288	153,6
1250	240,00	384	158,4
1500	331,20	480	134,4
2000	408,00	n.d.*	n.d.*
500 (+BHT 90 μM)	33,90	n.d.*	n.d.*
500 (+Manitol 50 mM)	33,90	245	372,0

* n.d. = não detectado

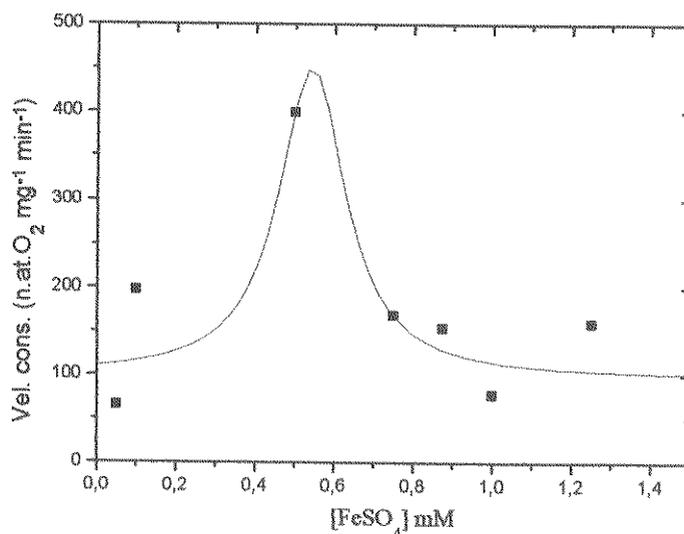


Figura 15 - Curva lorentziana de V2 - Variação dos valores de V2 da tabela I (pico 2 de consumo de O₂ - peroxidação lipídica) em função da concentração de FeSO₄.

Este conjunto de resultados suportam a hipótese de que a lipoperoxidação dependeria de uma relação adequada de Fe²⁺/Fe³⁺, conforme proposto por vários autores (Bucher et alii, 1983; Minotti & Aust, 1987a, 1987b, 1987c; Driomina et alii, 1993). O decréscimo, por nós observado, na peroxidação a partir de FeSO₄ 1 mM (figura 11) poderia ter relações com o tempo de incubação, que não seria suficiente para, em concentrações de FeSO₄ acima desse valor, proporcionar a oxidação do Fe²⁺. Desta forma, repetimos os experimentos nas mesmas condições, aumentando o tempo de incubação de 20 para 60 minutos. Nossos resultados, conforme mostra a figura 16, estão de acordo com essa hipótese, já formulada por Driomina e colaboradores (1993), em que a etapa limitante do processo de peroxidação lipídica seria a da obtenção de uma relação adequada Fe²⁺/Fe³⁺.

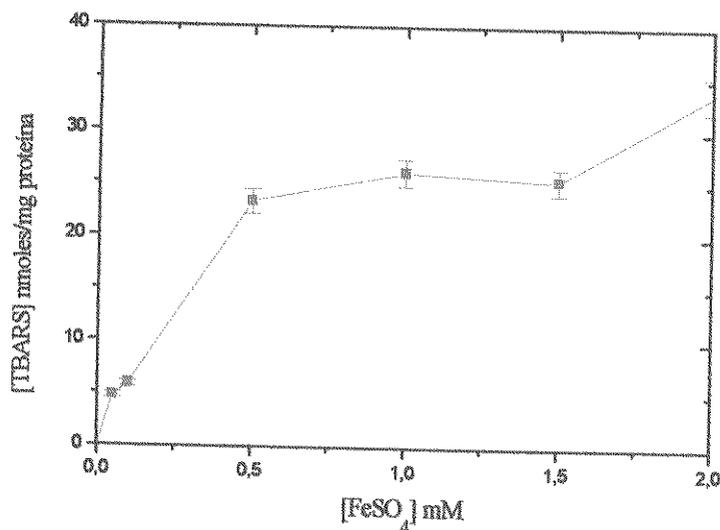


Fig. 16 - Efeito do tempo de incubação na presença de ferro sobre a peroxidação lipídica - MFR 1 mg/mL, incubada nas condições da figura 11 e aumentando-se o tempo de incubação para 60 minutos.

Uma vez caracterizado que o processo peroxidativo pode ser visualizado através de qualquer uma das três técnicas descritas acima (determinação de TBARS, RPE e consumo de O₂ mitocondrial) e que os resultados mostram que ele é dependente de uma concentração crítica de ferro para ocorrer, passamos a estudar o efeito de algumas condições experimentais sobre essa peroxidação lipídica induzida por FeSO₄. A figura 17 mostra o efeito do aumento na concentração de mitocôndrias (dosada pela quantidade de proteínas, em mg/mL), no mesmo tempo de 20 minutos de incubação e na presença de FeSO₄ 2 mM. Podemos observar que a peroxidação aumenta com o aumento da concentração de mitocôndrias até atingir um patamar, mantendo-se então nos mesmos níveis máximos observados anteriormente (figura 11). Estes resultados indicam que a concentração crítica de Fe²⁺ é dependente da concentração de

membranas em solução sendo que o aumento na concentração de MFR tende a aumentar a $[Fe^*]$.

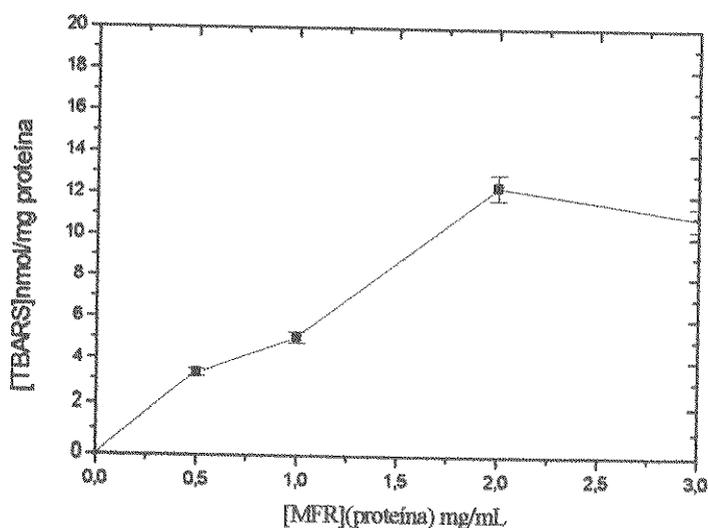


Figura 17 - Efeito da concentração de membranas sobre a peroxidação lipídica induzida por $FeSO_4$ em MFR. - Concentrações crescentes de MFR, incubadas nas condições da figura 11, com $FeSO_4$ 2 mM.

Driomina et alii (1993) interpretaram resultado semelhante, obtido com lipossomos de fosfatidilcolina, discutindo a necessidade de se atingir uma concentração local de ferro ligado à membrana como fator determinante no desenvolvimento das reações de lipoperoxidação. Entretanto, não podemos nos esquecer que em mitocôndrias energizadas, ocorre aumento da concentração de O_2^- e H_2O_2 gerados pela respiração mitocondrial. Passamos a estudar o efeito da inibição da cadeia respiratória, e por consequência da necessidade ou não de O_2^- e H_2O_2 para a ocorrência do processo peroxidativo induzido por $FeSO_4$. A figura 18 mostra que a presença de 1 μM de Antimicina-A (AA) durante o período de incubação com ferro diminui consideravelmente a formação de TBARS. Entretanto é mantido o mesmo perfil de aumento e

diminuição nos níveis da peroxidação lipídica com concentrações crescentes de FeSO_4 . Estes dados sugerem que a formação de O_2^- e H_2O_2 que ocorre quando as mitocôndrias estão respirando em estado respiratório 4 (Boveris & Chance, 1972) é muito importante para o efeito de Fe^{2+} ser máximo. Assim, repetimos os experimentos com mitocôndrias desenergizadas (com AA) adicionando-se 1 mM de H_2O_2 ao meio de incubação. Podemos observar na figura 18 que de fato, a presença de H_2O_2 durante o período de incubação com FeSO_4 , quando as organelas estão desenergizadas é suficiente para reverter o efeito da AA. Estes resultados sugerem que tão somente a presença de uma concentração adequada de FeSO_4 não é suficiente para se atingir a extensão da peroxidação lipídica observada nos experimentos anteriores, com as mitocôndrias energizadas. Além disso, esses resultados descartam a possibilidade dos íons de ferro estarem reagindo com hidroperóxidos lipídicos que poderiam ter sido formados durante o processo de isolamento das mitocôndrias.

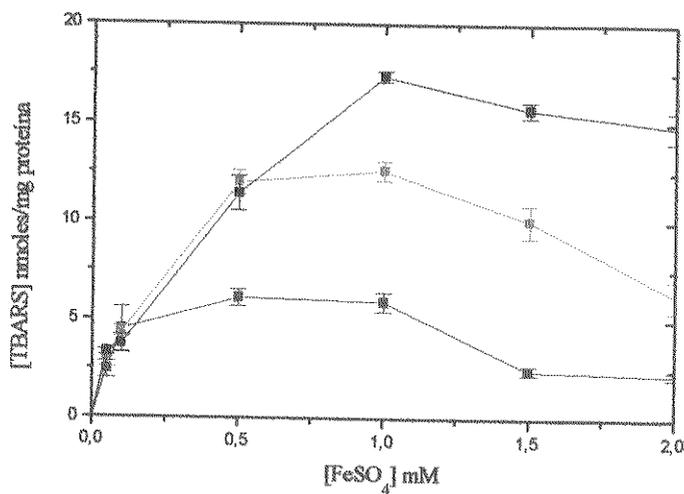


Figura 18 - Efeito da inibição da cadeia respiratória mitocondrial sobre a peroxidação lipídica induzida por FeSO_4 em MFR. - MFR 1 mg/mL incubadas nas mesmas condições da figura 11 (—), na presença de Antimicina A 1 μM (---), e AA 1 μM e H_2O_2 1 mM (⋯).

Para verificar se o efeito observado com H_2O_2 devia-se à formação do radical hidroxila, via reação de Fenton, utilizamos manitol (sequestrador de radical hidroxila) no meio de reação com FeSO_4 na presença e na ausência de 1 mM de H_2O_2 . Podemos observar (figura 19) que o manitol não foi capaz de impedir o processo peroxidativo em nenhum dos casos, em concordância com o verificado nos experimentos de consumo de O_2 mostrados na tabela I. Estes dados sugerem que o radical hidroxila provavelmente não seja a espécie radicalar envolvida na iniciação do processo peroxidativo, concordando com dados da literatura que citam outros sistemas geradores de radical ânion superóxido e H_2O_2 (O'Brien, 1969; Minotti & Aust, 1978a; Rush & Kopennol, 1986; Braughler et alii, 1986; Davies & Slater, 1987; Ryan & Aust, 1992; Driomina et alii, 1993).

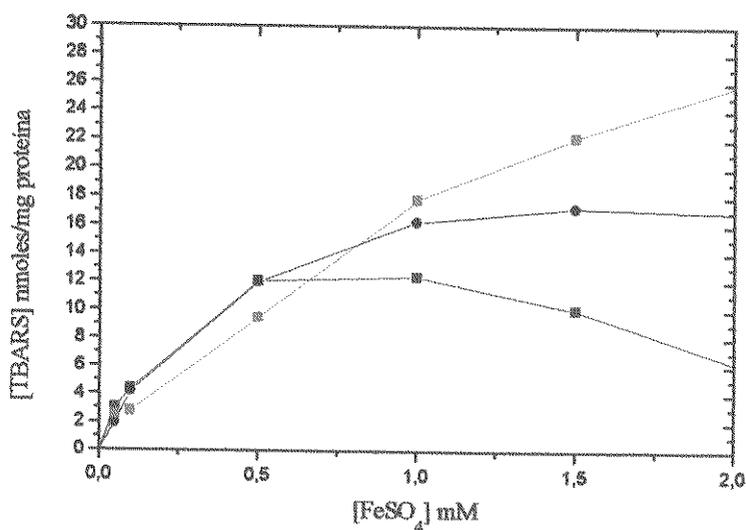


Figura 19- Efeito do manitol sobre a peroxidação lipídica induzida por concentrações crescentes de FeSO_4 em MFR - MFR 1 mg/mL incubada nas mesmas condições da figura 11(—), acrescentando-se manitol 0,5 M (—), manitol 0,5 mM e H_2O_2 1 mM (—).

Resultados anteriores de nosso laboratório (Nepomuceno et alii, 1991) já haviam mostrado que a peroxidação lipídica induzida por Ca^{2+} e t-butilhidroperóxido só ocorria na presença de fosfato inorgânico (Pi), e que a substituição de Pi por acetato impedia a lipoperoxidação. Desta forma, estudamos o efeito do Pi também sobre a peroxidação induzida por Fe^{2+} . Nossos resultados, apresentados na figura 20, mostram que a presença de Pi no meio de incubação é importante para o aumento na formação de TBARS, e por consequência, na peroxidação lipídica sofrida pelas organelas. Podemos observar que na ausência de Pi há um aumento lento e progressivo na concentração de TBARS, conforme aumentamos a concentração de FeSO_4 de 50 μM a 2 mM e que concentrações crescentes de Pi estimulam o processo peroxidativo. Entretanto podemos observar que, além da dependência de uma $[\text{Fe}^{2+}]$, também observa-se uma concentração ótima de Pi, que varia entre 0,5 e 1 mM. Somente na presença destas concentrações de Pi, o processo peroxidativo passa a ser bifásico, ou seja, dependente de uma concentração crítica de Fe^{2+} conforme mostrado nas figuras 11 e 13 e tabela I. Esses dados indicam que a concentração de Pi também é crítica para a observação deste efeito. A partir de então passamos a fazer todos os experimentos na presença de Pi 1 mM.

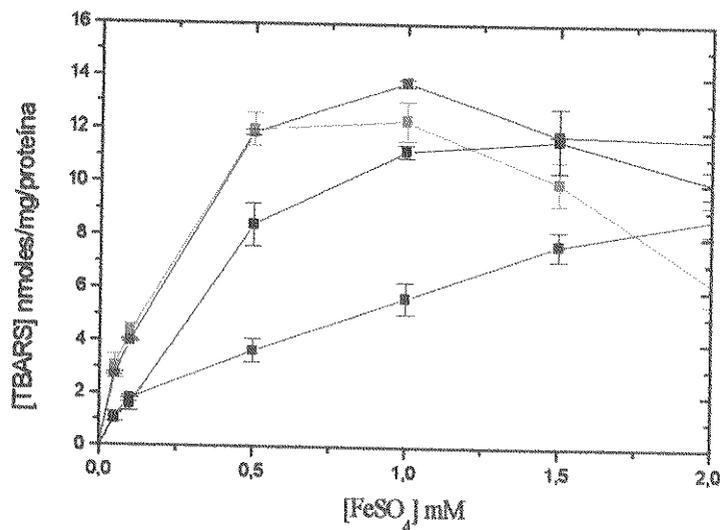


Figura 20 - Efeito do aumento da concentração de Pi sobre a peroxidação lipídica induzida por FeSO₄ em MFR - MFR nas condições descritas na figura 11, sem Pi no meio de incubação (—), na presença de Pi 0,5 mM (---), Pi 1 mM (—) e Pi 5 mM (—).

Para realmente caracterizar o efeito observado anteriormente na figura 20 como específico do fosfato, o substituímos por acetato. Podemos observar pelos resultados apresentados na figura 21 que essa substituição praticamente elimina a peroxidação induzida pelo FeSO₄ reforçando a importância da presença de Pi para a ocorrência de altos níveis de peroxidação em mitocôndrias, quer a peroxidação lipídica seja induzida por FeSO₄, como neste trabalho, quer o indutor seja a combinação Ca²⁺ e t-butil-hidroperóxido com já descrito na literatura (Nepomuceno et alii, 1991).

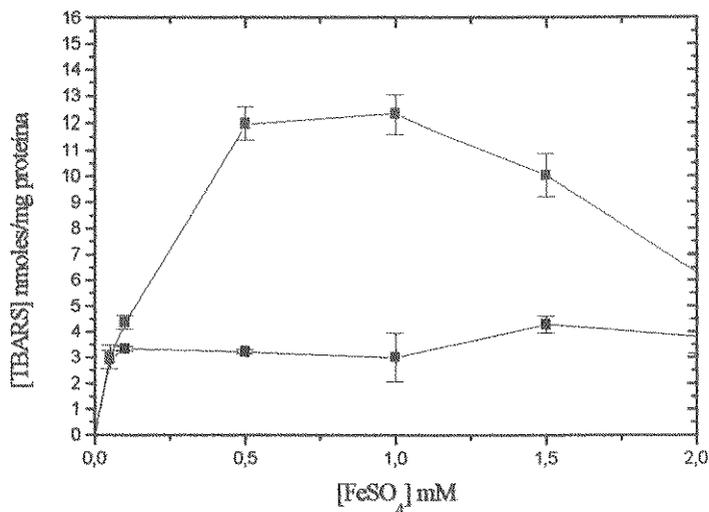


Figura 21 - Efeito da adição de acetato de potássio (1 mM) sobre a peroxidação lipídica induzida por FeSO₄ em MFR - MFR 1 mg/mL incubada nas mesmas condições da figura 11, com Pi (1 mM) (—), ou acetato de potássio (1 mM) no meio de reação (—).

Na maior parte dos trabalhos de outros laboratórios, encontramos o uso de FeSO₄ combinado com ascorbato ou com citrato, para garantir a manutenção do ferro como Fe²⁺ quer por redução (no caso do ascorbato) quer por quelação (no caso do citrato) (Kappus, 1985). Para melhor discutir nossos resultados estudamos o efeito da presença de ascorbato e de citrato nos experimentos de lipoperoxidação por FeSO₄.

A figura 22 mostra que a presença de ascorbato na proporção 0,5:1 (ascorbato/ FeSO₄) aumenta a peroxidação nas concentrações iniciais de FeSO₄ e desloca [Fe^{2+*}] de 1 para 0,5 mM. Em concentrações menores de FeSO₄ a peroxidação é ligeiramente inferior à verificada na ausência do redutor. A presença de citrato, na proporção 2:1, não alterou a [Fe^{2+*}], nem

influiu significativamente na peroxidação quando comparada ao controle, na ausência do quelante.

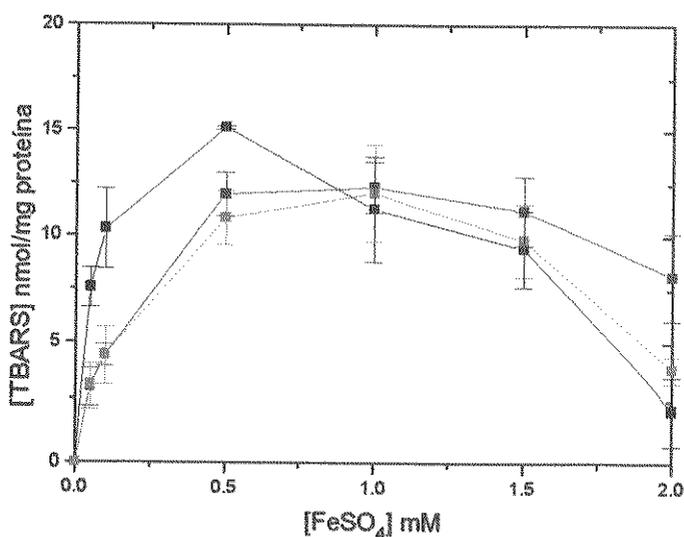


Figura 22- Efeito da adição de ascorbato ou citrato sobre a peroxidação lipídica induzida por FeSO₄ em MFR - MFR 1 mg/mL incubada nas mesmas condições da figura 11 (—), na presença de ascorbato (razão molar ascorbato/FeSO₄ 0,5:1) (—), na presença de citrato (razão molar citrato/ FeSO₄ 1:2) (—).

Para checar se a peroxidação lipídica induzida por FeSO₄ no nosso sistema era realmente dependente de uma razão crítica Fe²⁺/Fe³⁺, conforme demonstrado para microsossomos ou lipossomos (Rush & Kopennol, 1986; Minotti & Aust, 1987b) e mitocôndrias (Driomina et alii, 1993) e sugerido por nossos resultados anteriores, realizamos uma titulação com concentrações crescentes de Fe³⁺ sobre o consumo de O₂. Podemos observar pela tabela II que somente a presença de Fe³⁺ não foi suficiente para induzir a peroxidação lipídica nas mitocôndrias. Entretanto, na presença de Fe²⁺, o aumento na concentração de Fe³⁺ induziu um estímulo crescente do processo peroxidativo.

Em relação ao segundo pico induzido por Fe^{2+} 50 μM , que correlaciona-se com a peroxidação (conforme mostrado na figura 14) a peroxidação aumenta até a concentração de 50 μM de Fe^{3+} após a qual se mantém constante, sem alterar inclusive o intervalo de tempo para sua ocorrência (Δt). Esses dados indicam que uma razão crítica de aproximadamente 1:1 ($\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$) também é importante para que o processo peroxidativo se processe mais rapidamente na membrana mitocondrial.

Tabela II - Efeito da concentração de Fe^{3+} sobre a peroxidação lipídica induzida por FeSO_4 em MFR - MFR 1 mg/mL foi incubada nas condições da tabela I adicionando-se uma concentração fixa de Fe^{2+} (50 μM) e concentrações crescentes de Fe^{3+} . V1 e V2 correspondem ao consumo de O_2 nos picos 1 e 2, conforme mostrado na figura 14. Δt representa o tempo decorrido entre os picos.

[Fe^{2+}] μM	[Fe^{3+}] μM	V1 n. at. $\text{O}_2\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$	Δt (s)	V2 n. at. $\text{O}_2\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$
0	500	ausente	ausente	ausente
50	0	24	96	76
50	5	38,4	98	81,6
50	10	47,6	97	91,2
50	25	52,8	98	100,8
50	50	54	98	120
50	100	57,6	98	120,4
50	500	58	98	120

Uma vez que nossos resultados sugerem que quando valências mistas de ferro estão presentes a lipoperoxidação é mais pronunciada, passamos a estudar o estado de oxidação do FeSO_4 em algumas condições anteriormente definidas. A figura 23 mostra que, durante o período de incubação de 20 minutos, a concentração de Fe^{2+} não varia, se estiver diluído somente em H_2O . Esses

dados indicam que, na presença de O_2 , a oxidação do Fe^{2+} é muito lenta não sendo observado decréscimo de sua concentração.

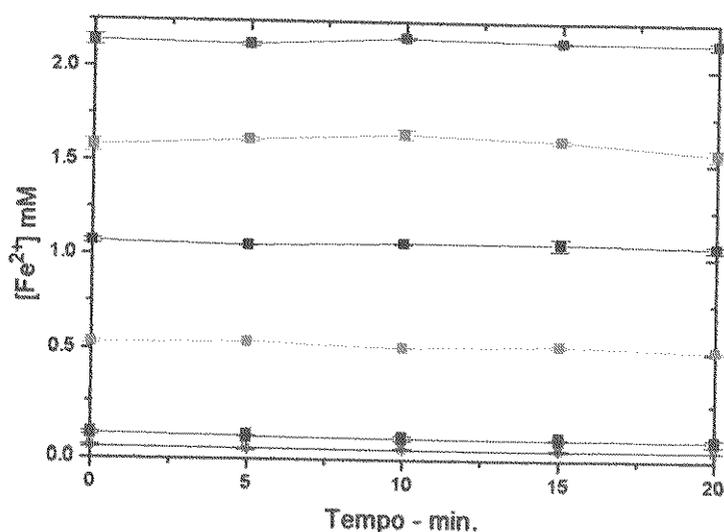


Figura 23 - Determinação da velocidade de oxidação de Fe^{2+} em função do tempo usando $FeSO_4$ diluído em H_2O . - Partindo-se de concentrações crescentes de $FeSO_4$, em 1 mL de H_2O , o decaimento de concentração de Fe^{2+} foi determinado pela adição de orto-fenantrolina 7,5 mM, medindo-se a absorbância em 510 nm. Concentrações de $FeSO_4$: 0,05 mM (—), 0,1 mM (—), 0,5 mM (—), 1 mM (—), 1,5 mM (—), 2 mM (—),

Por outro lado, os dados da figura 24 mostram que, se o $FeSO_4$ estiver diluído no meio de incubação (KCl 120mM, HEPES 20 mM pH 7,4, succinato 5 mM, Pi 1 mM e rotenona 5 μ M), a concentração de Fe^{2+} decai exponencialmente, como resultado da oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} , cuja presença a orto-fenantrolina não detecta. Esta oxidação parece ser bifásica, com uma fase mais rápida ocorrendo nos primeiros 5 minutos de incubação (inserção da figura 24). O valor das constantes de velocidade (k) variou de $7 \cdot 10^{-2}$ a $25 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, quando variamos o ferro de 50 μ M a 2 mM.

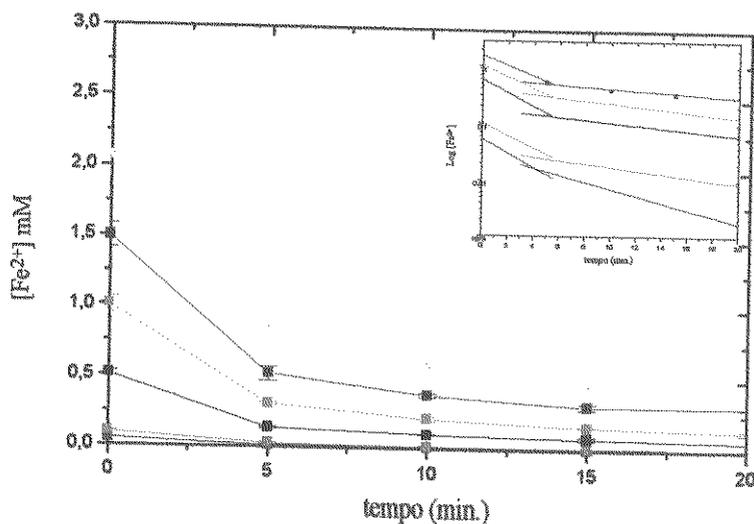


Figura 24 - Determinação da velocidade de oxidação de Fe^{2+} em função do tempo usando FeSO_4 diluído no meio de reação. - Mesmas condições da figura 22, substituindo-se a H_2O pelo meio de reação (KCl 120 mM, HEPES 20 mM pH 7,4, succinato 5 mM, rotenona 5 μM e Pi 1 mM). Concentrações de FeSO_4 : 0,05 mM (—), 0,1 mM (—), 0,5 mM (—), 1 mM (—), 1,5 mM (—), 2 mM () Na inserção retas de regressão linear.

Podemos observar pela figura 25 que a presença de MFR (1 mg proteína/mL) provoca apenas um ligeiro aumento na velocidade dessa reação. Estes dados nos indicam que a presença do meio e do O_2 é suficiente para o Fe^{2+} se oxidar. Neste caso, possivelmente esteja ocorrendo a formação de um complexo com o O_2 , sendo que esta formação é muito pouco afetada pela presença da MFR. O valor das constantes de velocidade (k) variou de $8 \cdot 10^{-2}$ a $28 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ quando se variou a concentração de FeSO_4 de 50 μM a 2 mM. Na verdade o aumento da velocidade na presença de MFR deve ocorrer principalmente pelo aumento da quantidade de O_2 disponível na amostra, já que a solubilidade do O_2 é maior em meios apolares como as membranas, do que em H_2O (Halliwell & Gutteridge, 1989a). Além disso, esses dados também

nos indicam que algum componente do meio está sendo importante para estimular a oxidação do ferro.

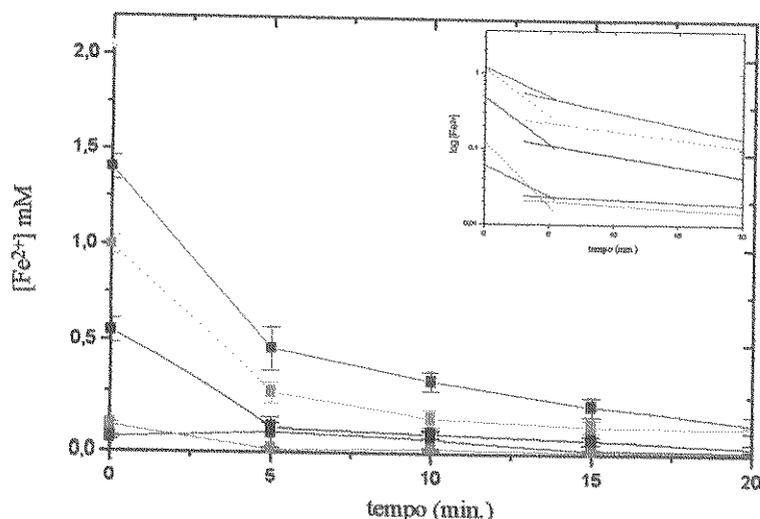


Figura 25 - Determinação da velocidade de oxidação de Fe^{2+} em função do tempo (FeSO_4 diluído no meio de reação com MFR). - Mesmas condições da figura 23, acrescentando-se MFR 1 mg/mL. Concentrações de FeSO_4 : 0,05 mM (—), 0,1 mM (—), 0,5 mM (—), 1 mM (—), 1,5 mM (—), 2 mM () Na inserção retas de regressão linear

Considerando a necessidade de uma concentração ótima de Pi (figura 20), além de uma concentração crítica de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (tabela II), para a ocorrência do processo peroxidativo, fizemos uma titulação com concentrações crescentes de Pi adicionados ao meio de reação e seguimos o estado de oxidação do ferro nos primeiros 5 minutos de incubação (período no qual ocorre a fase rápida de oxidação). Podemos observar pela figura 26 que, de fato, é a presença de Pi no meio de reação que acelera a oxidação do Fe^{2+} . Além disso podemos observar que em maiores concentrações de Pi, a velocidade de oxidação aumenta, produzindo um estímulo máximo perto de 1 mM de Pi. É importante salientar que a mesma concentração ótima de Pi

necessária para se observar níveis máximos de peroxidação (figura 20), é a que oxida mais rapidamente o ferro.

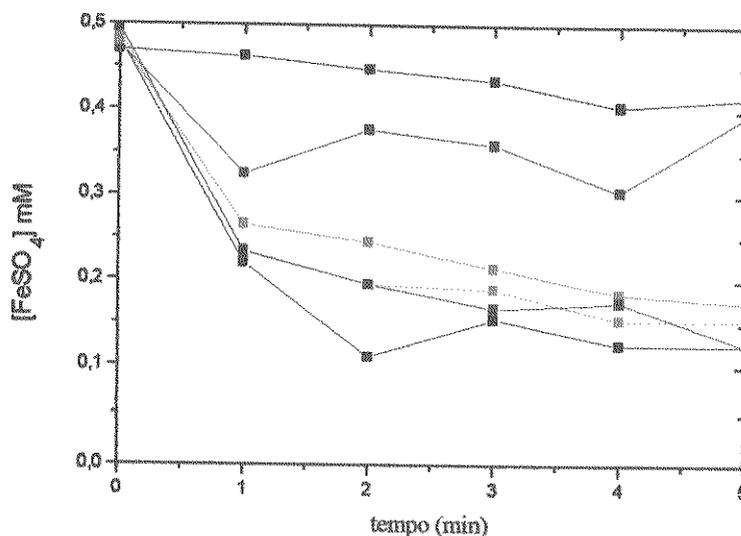


Figura 26 - Efeito de concentrações crescentes de Pi sobre a oxidação do Fe^{2+} em MFR - FeSO_4 0,5 mM, incubado nas condições da figura 24, variando-se a concentração de Pi do meio. [Pi]: 0 (—), 0,1 mM (—), 0,5 mM (—), 1 mM (—), 5 mM (—), 10 mM (—).

Da mesma maneira, se titularmos o estado de oxidação do FeSO_4 pelo H_2O_2 , observamos estímulo de oxidação, dependente da concentração de H_2O_2 (figura 27), sugerindo que o H_2O_2 é mais importante para o processo peroxidativo na MFR por sua ação como oxidante de ferro do que por ser um gerador de radical hidroxila, em concordância com nossos experimentos na presença de inibidores da cadeia respiratória e H_2O_2 (figura 18) ou manitol (sequestrador de $\cdot\text{OH}$) e H_2O_2 (figura 19), e dos experimentos de velocidade de consumo de O_2 (tabela I) na presença de manitol, em concordância com outros autores (Minotti & Aust, 1987b).

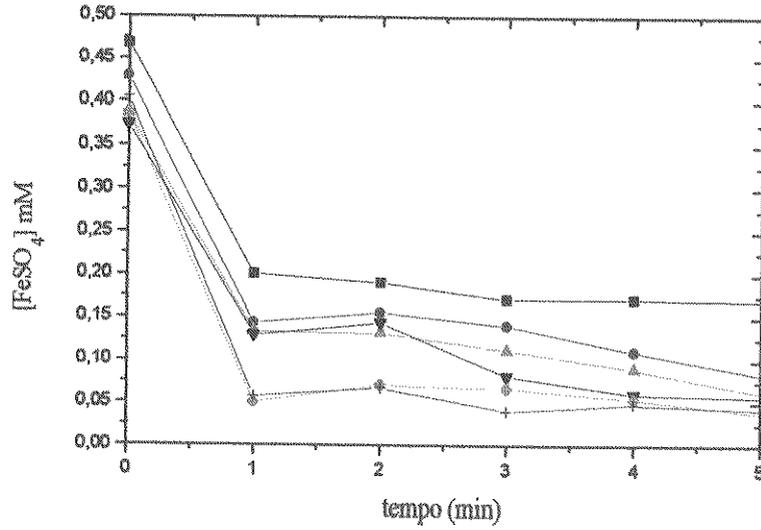


Figura 27- Efeito da titulação com concentrações crescentes de H_2O_2 sobre a oxidação do Fe^{2+} em MFR - FeSO_4 0,5 mM, incubado nas condições da figura 24 (—), com H_2O_2 : 20 μM (—), 50 μM (—), 100 μM (—), 250 μM (—), 500 μM (—),

6 - CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados sugerem que a etapa determinante da ocorrência da peroxidação lipídica em mitocôndrias incubadas com FeSO_4 é a da oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} . A presença de Pi , numa razão molar 1:1 ($\text{Pi} : \text{FeSO}_4$) é importante para a oxidação do Fe^{2+} (figura 26) e para a peroxidação lipídica (figura 21). Esta oxidação ocorre muito lentamente na presença de O_2 somente, conforme os resultados da figura 24 e qualquer condição que acelere essa oxidação, permitindo que se alcance uma relação $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ equimolar, proporciona que se atinja o máximo de peroxidação para uma dada quantidade de mitocôndrias (tabela II). Entretanto, o fato do BHT não impedir a oxidação do Fe^{2+} mas anular totalmente o processo peroxidativo (tabela I) permite ainda propor que provavelmente o iniciador da peroxidação lipídica seria um complexo entre os íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e O_2 , embora neste trabalho não possamos afirmar qual radical estaria especificamente envolvido no processo iniciador da peroxidação lipídica ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2\text{-Fe}^{3+}$, ferril ou perferril). Descartamos ainda a proposta da necessidade de participação do radical hidroxila como iniciador do processo de peroxidação lipídica em nossas condições experimentais (tabela I).

Embora a atribuição do radical de ferro envolvido ainda seja controversa, o agente comum no processo peroxidativo é sempre o ferro. Sendo assim, qualquer disrupção no metabolismo deste metal de transição “in vivo” é potencialmente tóxica porque o ferro na presença de O_2 , quando não controlado enzimaticamente, pode ser um elemento muito nocivo principalmente pela sua capacidade de iniciar processos oxidativos.

7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BORG, D. C. (1976) Applications of electron spin resonance in biology in: *Free radicals in biology* (Pryor W.A. ed.) p. 69-147 Academic Press N.Y.
- BOVERIS, A. and CHANCE, B. (1972) 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.
- BOYER, P.D.; KOLHBRENNER, W.E.; McINTOSH, D.B.; SMITH, T.L. and O'NEAL, C.C. (1982) ATP and ADP modulations of catalysis by F1 and Ca^{2+} , Mg^{2+} - ATPases. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **402**:65-83.
- BRAUGHLER, J.M.; DUCAN, L. A. and CHASE, K. L. (1986) The involvement of iron in lipid peroxidation. *J.Biol.Chem.* **261**:10282-10289.
- BRDICZKA, D. (1991) Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy and protein transfer. *Bioch. Biophys. Acta*, **1071**:291-312.
- BUCHER, J. R.; TIEN, M. and AUST, S.D. (1983) The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ferrous ion. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **111**:777-784.

- CHANCE, B.; SIES, H. and BOVERIS, A. (1979), Hydroperoxide metabolism in mammalian 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.
- CRAMER, W. and KNAFF, D.B. (1989) Oxidation-reduction; electron and proton transfer. In *Energy transduction in biological membranes, a text book of bioenergetics*. (William A. Cramer and David B. Knaff eds.) pg.35-37, NY.
- DAVIES, M. J. and SLATER, T. F. (1987) Studies on the metal-ion and lipoxygenase-catalysed breakdown of hydroperoxides using electron-spin resonance spectroscopy, *Biochem.J.* **245**:167-173.
- DRIOMINA, E. S.; SHAROV V. S. and VLADIMIROV, Y. A. (1993) Fe²⁺-induced lipid peroxidation in liposomes: the role of surface Fe²⁺ concentration in switching the reaction from acceleration to decay, *Free Rad. Biol. Med.* **15**:239-247.
- FARBER, J. L.; KYLE, M. and COLEMAN, J.B. (1990) Biology of disease - Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* **62**:670-679.
- FRIDOVICH, I. (1986) Biological effects of superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys* **247**:1-11.

- GAFFNEY, B. J. (1976) in: *Spin Label theory and applications* (Lawrence J. Berliner ed.) p. 567-571, Academic Press, N.Y.
- GODDARD, J. D. and SWEENEY, G. D. (1987) Delayed ferrous ion-dependent peroxidation of rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* **259**:372-281.
- 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.
- GROOTVELD, M. and HALLIWELL B. (1986) Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl radical formation in vivo, *Biochem. J.* **237**:499-510.
- GRUBMEYER, C.; CROSS, R. L.; PENEFSKY H.S. (1982) Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* **257**:12092-12105.
- GUTTERIDGE, J. M. C. (1984) Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* **172**: 245-249.
- GUTTERIDGE, J. M. C. and KERRY, P. J. (1982) Detection by fluorescence of peroxides and carbonyls in samples of arachidonic acid. *Br. J. Pharmacol.* **76**:459-462.

- HALLIWELL, B. (1978) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates, *FEBS Lett.* **92**:321-326.
- HALLIWELL, B. and GROOTVELD, M. (1987) The measurement of free radicals reactions in humans, *FEBS. Lett.* **213**:9-14.
- HALLIWELL, B.; GROOTVELD, M.; KAUR, H. and FAGERHEI, M. (1988) in: *Free radicals, methodology and concepts* (C.Rice-Evans and B.Halliwel eds.) pg. 33, London.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J. M. C. (1989a) The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species, in: *Free Radicals in Biology and Medicine* (B. Halliwel 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 Radicals Biology and Medicine* (B.Halliwel 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.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. and ARUOMA, O. I. (1987) The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants of hydroxyl radicals *Anal. Biochem.* **165**:215-219.

- HATEFI, Y.; MATSUNO-YAGI, A. and YAGI T. (1987) Recent advances in oxidative phosphorylation, in: *Bioenergetics: structure and function of energy transducing systems* (T.Ozawa and S. Papa eds.) p.289-303, Tokyo.
- 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.
- IMLAY, J. A. and LINN, S. (1988), DNA damage and oxygen radical toxicity, *Science* **240**: 1302.
- KAPLAN, R.S. and PEDERSEN, P. L. (1983) Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria *Biochem.J.* **212**:279-288.
- KAPPUS, H.(1985) Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance, in: *Oxidative stress* (Helmut Sies, ed.) pg. 273-310, London.
- KOTTKE, M.; VOLKER, A.; WALLIMANN, T.; NALAN, V. K. and BRDICZKA, D. (1991) Location and regulation of octameric creatine kinase in contact sites, *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**:215-225.
- McCONNEL, H. M. (1976) Molecular motion in biological membranes in: *Spin labeling theory and applications*, (Lawrence J. Berliner, ed) pg. 525-528, NY.

- McCORD, J. M. and DAY E.D. (1978) Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalysed by iron-EDTA complex, *FEBS Lett.* **86**:139-146.
- MILLER, D. M.; BEUTTNER, G. R. and AUST, S. D. (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions, *Free Rads Biol. Med.* **8**:95-108.
- MINOTTI, G. and AUST, S.D. (1987a) The requirement of Iron III in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide, *J.Biol. Chem.* **262**:1098-1104.
- MINOTTI, G. and AUST, S.D.(1987b) The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lip.*, **44**:191-208.
- MINOTTI, G. and AUST, S.D.(1987c) An investigation into the mechanism of citrate-Fe²⁺- dependent peroxidation, *Free Rads Biol. Med.* **3**:379-387.
- MITCHELL, 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) Reative oxygen intermediates in Biochemistry, *Ann. Rev. Biochem.* **55**:137.
- NEPOMUCENO, M. F.; MACEDO, D.V. and PEREIRA-DA-SILVA, L. (1991) Lipoperoxidation associated whith mitochondrial permeabilization in the presence of Ca²⁺, *Braz.J.Med.Biol.Res.* **24**:833-836.

- NICHOLLS, D. G. (1982) Chemiosmotic energy transduction in: *Bioenergetics* (David G. Nicholls eds.) pg. 1-12, London.
- O'BRIEN, P. J. O. (1969) Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide, *Can. J. Biochem.* **47**:485-492.
- OHKAWA, H.; NOBUKO, O. and YAGI, K. (1979), Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochim.* **95**:351-358.
- OZAWA, T.; NISHIMIKI, M.; SUZUKI, H.; TANAKA, M. and SHIMOMURA Y., (1987) Structure and assembly of mitochondrial electron-transfer complexes, in: *Bioenergetics: structure and function of energy transducing systems* (T.Ozawa and S. Papa eds.) p.101-119, Tokyo.
- PEDERSEN, T. C. and AUST, S. D. (1975) The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation, *Biochim. Biophys. Acta* **385**:232-241.
- REED, C. A. (1985) Oxidation states, redox potentials and spin states, in "*The Biological chemistry of iron* (Dundford, H.B., Dolphin, K.M. and Seiker, L. eds) pg. 15-45, Boston.
- RYAN, P. T. and AUST, S. D. (1992) The role of iron in oxygen-mediated toxicities, *Crit. Rev. Toxicol.* **22**:119-141.

- RUSH, J. D. and KOPPENOL, W. H. (1986) Oxidizing intermediates in the reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide, *J.Biol.Chem.* **261**:6730-6733.
- 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.
- TABAK, M; RUGGIERO, A.C., PERUSSI, J.R. (1985) O método de marcadores de spin aplicado à bioquímica, *Química Nova*, **8**:313-324.
- TIEN, M.; SVINGEN, B. A. and AUST, S.D. (1982) An investigation into the role of hydroxyl radical in xantine oxidase-dependent lipid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.* **216**:142-151.
- VOGEL A. I. (1979) Reactions of the cations iron II and iron III, in: *Vogel's textbook of macro and semimicro qualitative inorganic analysis* (Vogel A.I.) 241-245, 5th ed. Richard Clay Ltd. Suffolk, UK.
- YAGI, K. (1976) A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma, *Biochem Med.*, **15**:212-216.

8 - COMUNICACÕES EM CONGRESSOS

A. A. Alves, T.P. Rigoletto, A.M. Molnar, A.B. Arthur, C.C. Zoppi, P.E.S. Paterniani, D.V. Macedo and L. Pereira da Silva, *A suitable procedure to get mitochondria for undergraduate practical courses*, Livro de resumos da XXIII reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ), J-4, 1994

A. A. Alves, A. Alonso, D. V. Macedo and L. Pereira-da-Silva, *Fenton reaction in isolated mitochondria: a spin trapping (ESR) study*, Livro de resumos da XXIV reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ), S-14, 1995

A. A. Alves, A. Alonso, D. V. Macedo and L. Pereira-da-Silva, *Iron induced lipid peroxidation in isolated liver mitochondria*, Livro de resumos da XXV reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ), S-25, 1996

9 - MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

A. A. Alves, A. Alonso, D. V. Macedo and L. Pereira-da-Silva, *Papel dos íons de ferro na iniciação do processo de peroxidação lipídica em mitocôndrias isoladas de fígado de rato - manuscrito em fase de elaboração.*