

MECANISMO DE AÇÃO DO DINITROFENOL  
NA FORÇA DE CONTRAÇÃO MUSCULAR

Moustafa Mohamed El-Guindy *x*

Assistente do Departamento de Genética Médica  
Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil

Tese apresentada à Universidade  
Estadual de Campinas para a ob-  
tenção do Grau de Doutor em Ci-  
ências.

Orientador:

Prof. Dr. Aldo Focesi Jr. *t*

Ao meu pai e a meu irmão que  
já partiram deste mundo, mas  
dele não estão ausentes, pois  
vivem em mim.

À minha mãe e meus irmãos.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho se deve a contribuição desinteressada de muitas pessoas. A ausência de citação nominal é falta imperdoável mas não significa, de forma alguma, esquecimento da colaboração prestada. A todos, os nossos mais sinceros agradecimentos.

Ao Professor Doutor Aldo Focesi Jr., sob cuja orientação constante e segura, foi realizado todo esse trabalho, e ainda, pela compreensão e carinho nos nossos primeiros dias aqui no Brasil, expressamos nossos sinceros agradecimentos.

Ao Professor Doutor Bernardo Beiguelman, mestre e amigo, ser humano real, verdadeiro pesquisador exemplar, fiel intelectual honesto, cuja figura de homem já é um exemplo para nós, e nossos colegas, pela dedicação, colaboração e orientação que se refletem em cada palavra desta tese, queremos consignar nossa profunda gratidão.

Ao Professor Doutor Oswaldo Vital Brazil, pela colaboração valiosa durante a investigação farmacológica do presente trabalho, nosso muito obrigado.

Ao Professor Doutor José Ribeiro do Valle, Professor Titular do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina, pela colaboração generosa durante a análise espectrofotométrica, os nossos agradecimentos.

Ao Doutor Walter Pinto Junior, nosso colega de Departamento, realidade evidente do jovem pesquisador ideal, pelo muito que ele representa e significa para nós, pelas suas sugestões, os nossos profundos agradecimentos.

A Doutora Cecília Barreto Gomes, do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina, pelo muito que fez durante a realização deste trabalho, oferecendo seu tempo, seu laboratório, e a sua colaboração valiosa deixamos aqui o nosso muito obrigado.

Ao Sr. Nadim Farah Heluany Sobrinho, Técnico do Departamento de Farmacologia da UNICAMP e à Srta. Haydée Rezende Reuter, Técnica do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina, nossos agradecimentos pela colaboração desinteressada na parte técnica dos experimentos realizados neste trabalho.

Ao Dr. Edwal de Freitas, Diretor do UNIÃO DE CURSOS, verdadeiro amigo e a sua excelente equipe em particular a Srta Yoshiko Masaki pela colaboração generosa no serviço gráfico deste trabalho, nossos mais sinceros agradecimentos.

À Srta Ivone Aparecida Onisto, Secretária do Departamento de Genética Médica, nossos agradecimentos pela incansável colaboração ao datilografar várias vezes os originais deste trabalho.

Ao Acadêmico de Medicina e colega de Departamento, Abimael Martins Costa agradecemos vivamente a ajuda valiosa na preparação das fotos necessárias ao presente trabalho.

Aos caros colegas do Departamento de Genética Médica, de Bioquímica, e Farmacologia da UNICAMP e dos Departamentos de Bioquímica e Farmacologia e Biofísica da Escola Paulista de Medicina, nossos sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

Capítulo I.	INTRODUÇÃO .....	1
	I.1 - Revisão da literatura .....	1
	I.2 - Objetivos do presente trabalho .....	14
Capítulo II.	MATERIAL E MÉTODOS .....	16
	II.1 - Determinação do conteúdo sanguíneo das catecolami nas em ratos tratados e não tratados .....	16
	II.2 - A medida do efeito do dinitrofenol sobre as reser vas adrenérgicas do conduto deferente de ratos ..	20
	II.3 - Determinação da força da contração do músculo car díaco <u>in vivo</u> .....	21
	II.4 - Medidas da força da contração cardíaca <u>in vitro</u> .	23
	II.5 - Análise espectrofotométrica .....	25
Capítulo III.	RESULTADOS .....	27
	III.1 - Conteúdo sanguíneo das catecolaminas em ratos - tratados com dinitrofenol .....	27
	III.2 - Efeito do dinitrofenol sobre a reserva adrenérgi ca no conduto deferente do rato .....	42
	III.3 - Efeito do dinitrofenol sobre a força da contra ção cardíaca <u>in vivo</u> .....	44
	III.4 - Medidas da força da contração cardíaca <u>in vitro</u> .	52
	III.5 - Análise espectrofotométrica .....	55

Capítulo IV. DISCUSSÃO .....	62
Capítulo V. CONCLUSÕES .....	69
Capítulo VI. RESUMO .....	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72

## I.1 - REVISÃO DA LITERATURA

O 1-2-4 dinitrofenol (P.M. 184), também conhecido como alfa-dinitrofenol [  $C_6H_3.OH(NO_2)_2$  ], apresenta-se, à temperatura ambiente, sob a forma de cristais sólidos de cor amarela, ligeiramente solúveis em água e mais solúveis em álcool ou éter. O ponto de fusão se dá à  $114^{\circ}C$ . A solução de dinitrofenol em água pode ser preparada até a concentração de 3 %, sob aquecimento e com a adição de 1g de bicarbonato de sódio, para cada 2g da droga (praticamente mol/mol).

O dinitrofenol é altamente relacionado, quimicamente, com o ácido pícrico (trinitrofenol) e é facilmente preparado e purificado, podendo, por isso, ser produzido a baixo custo.

De acordo com CUTTING et al. (1.933), o dinitrofenol despertou a atenção de médicos franceses durante a Primeira Guerra Mundial (1.914-1.918), depois que foram constatados casos de intoxicação por esse produto em operários de fábricas de explosivos. Entretanto, segundo os mesmos autores, os estudos desses médicos, sobre os quais não fazem referência, não foram concluídos.

Maior interesse pelos efeitos farmacológicos e possíveis aplicações terapêuticas do dinitrofenol, só foi despertado a partir dos trabalhos de CUTTING e TAINTER (1.932) e de MAGNE et al. (1.932).

Esses últimos autores estudaram os efeitos tóxicos e fisiológicos de toda a série dos mono (orto, meta e para) e dinitrofenóis (1-2-3, 1-2-4, 1-2-5, 1-2-6, 1-3-4 e 1-3-5), constatando em cães tratados com o 1,2:4 dinitrofenol, polipnéia térmica e aumento de temperatura, como sinais clínicos mais marcantes. Analisando os resultados dos seus estudos comparativos dos vários mono e dinitrofenóis, os autores concluíram que a presença de um grupo ( $NO_2$ ) na posição - para deveria ser necessária para que esses sintomas aparecessem. Para explicar os casos de morte por ação dos dinitrofenóis, MAGNE et al. (1.932) aventaram a hipótese de que esses derivados atuariam como metemoglobinizantes fortes. Não estabeleceram, entretanto, claramente, as razões que os levaram a propor tal explicação.

Baseados em uma comunicação pessoal (HEYMANS), CUTTING e TAINTER (1.932), realizaram uma série de experiências com o intuito de investigar os efeitos - farmacológicos e terapêuticos do 1,2:4 dinitrofenol. Tais autores relataram - que a droga, quando aplicada em animais (pombos, ratos, coelhos e cães) e em seres humanos, produz um aumento de temperatura de até  $4^{\circ}C$ ., após 1/2 a 4 horas, em doses de 5-40mg/Kg de peso (a dose exata dependia da espécie e da via de administração), bem como uma estimulação respiratória, tanto na frequência quanto na amplitude.

Dando prosseguimento às investigações sobre os efeitos do dinitrofenol, - TAINTER e CUTTING (1.933), aplicaram doses repetidas da droga em cães e em coelhos, as quais variaram de 5-35mg/Kg de peso, por um período de 2 a 3 meses, - com intervalos de 3 ou mais dias, relatando que:

1. os exames de urina, os testes de van den Bergh e os índices de icterícia, não indicaram evidências de intoxicação durante o período de administração da droga;
2. não foram encontradas alterações patológicas significantes, salvo algum prejuízo do baço;
3. o dinitrofenol aumentou a frequência e a amplitude da respiração dos coelhos, previamente injetados por via subcutânea com doses elevadas - de morfina (40 mg), cloral (05, a 10g) e barbital (200 mg), ou por via intraperitoneal com 1,5 a 5,0 ml de álcool, tendo sido o dinitrofenol mais eficaz, nesses casos, do que a cafeína;
4. os exames patológicos dos cortes intestinais dos coelhos tratados com o dinitrofenol não acusaram qualquer alteração, a não ser quando o mesmo era administrado em altas concentrações.

Esses resultados, somados aos citados em suas publicações anteriores, estabeleciam, na opinião de TAINTER e CUTTING (1.933), as bases para o uso do dinitrofenol em experimentos fisiológicos e farmacológicos, com a finalidade de aumentar o metabolismo e a temperatura corporal. Além disso, indicariam a possibilidade de aplicação dessa substância em várias condições clínicas, onde a estimulação respiratória, a ativação do metabolismo básico ou o aumento da temperatura fossem necessários.

Essas investigações, cujos resultados foram considerados promissores pelos pesquisadores de San Francisco, U.S.A., (TAINTER e colaboradores), incentivaram numerosos autores a ampliar as áreas de estudo dos efeitos farmacológicos e terapêuticos do dinitrofenol.

Assim, CUTTING, MEHRTENS e TAINTER (1.933), constataram em animais experimentais, tratados com dose de 10mg de dinitrofenol por Kg de peso, uma aceleração de quase 50 % do metabolismo básico. Tal aceleração foi registrada no primeiro minuto após a injeção, e um pouco mais tardiamente quando a administração era feita por via oral. A recuperação dos níveis normais do metabolismo dos animais utilizados nessa experiência, deu-se num período de 6 a 48 horas, dependendo da dose e da via de administração. Ainda no mesmo trabalho, os autores relataram a sua experiência com o emprego clínico do dinitrofenol em doses de 3-5 mg/Kg de peso administradas por via oral, dose considerada por eles,

como fisiológica. Os resultados dessa aplicação clínica vieram a confirmar as observações feitas em animais e provocaram perdas de peso de 2-3 libras(908g a 1.362g) por semana.

Os resultados obtidos por CUTTING e TAINTER incentivaram MUNTWYLER (1934) a estudar o consumo do oxigênio de tecidos isolados de ratos tratados com dinitrofenol. A substância foi aplicada por injeção subcutânea em dose 40mg/Kg de peso, por períodos de 30-40 minutos. As observações desse autor mostraram que o consumo do oxigênio dos tecidos hepáticos isolados daqueles ratos não foi significativamente alterado.

Os efeitos catalizadores do dinitrofenol levaram CUTTING e TAINTER (1933) à hipótese de que essa substância poderia substituir a tiroxina, o que a tornaria indicada no tratamento de pacientes com hipotireoidismo. Todavia, nas experiências feitas por esses autores, embora o dinitrofenol provocasse uma ativação metabólica maior do que a da tiroxina, aquela substância não se mostrou capaz de mimetizar os outros efeitos hormonais da última. Concluíram, por isso, que os efeitos hormonais da tiroxina não dependem da ativação do metabolismo, a fastando, assim, a hipótese anteriormente formulada.

Na mesma linha de pesquisa, TAINTER et al. (1.933) registraram que a presença da insulina ativa é necessária para que o dinitrofenol desenvolva sua ação, visto que o dinitrofenol, quando administrado a cães pancreatectomizados, provocou nos mesmos forte intoxicação, que os levou à morte, mesmo antes que o aumento da respiração e da temperatura atingissem o máximo. A hipótese de que a acentuação da acidose diabética poderia ser considerada a causa de morte repentina por ação do dinitrofenol, foi refutada pelos autores, visto que as alterações, tanto dos valores de pH, quanto dos de reserva alcalina do sangue, foram incompatíveis com tal eventualidade.

A preocupação com o possível efeito prejudicial do dinitrofenol sobre a eficiência de órgãos importantes do corpo, levou SCHULTE e TAINTER (1.934) a estudar o efeito dessa substância sobre a função renal. Tais autores administraram esse produto diariamente a coelhos, em doses crescentes, inclusive as fatais, por injeção subcutânea, durante um período de 77 dias. Os dados obtidos pela determinação quantitativa dos elementos componentes do sedimento urinário se situaram sempre entre as variações diárias normais, considerando-se tanto a média dos resultados do grupo tomado como um todo, quanto os obtidos individualmente de cada animal. Esses resultados foram confirmados nos exames histológicos dos rins desses coelhos, feitos por D.A. WOOD (cf. SCHULTE e TAINTER, 1.934), que não acusou qualquer alteração patológica.

Também foi relatado por TAINTER et al. (1.934) que o exame anátomo-patoló

gico do cérebro de 2 grupos diferentes de cães tratados com dinitrofenol, em doses de 5 a 10mg/Kg de peso, durante um período de 6 meses consecutivos, não acusou anomalias. As verificações, a cada 3 semanas, da taxa de glicose e de albumina urinária, hemoglobina, hemácias, leucócitos e contagem diferencial das células sanguíneas, feitas nesses animais, mostrou que nos dois grupos os níveis normais não sofreram alteração. Do mesmo modo, o índice icterico, a capacidade do sangue de se combinar com o oxigênio e a fragilidade das hemácias não mostraram desvios significativos dos padrões normais. As conclusões desses trabalhos fortaleceram as indicações de CUTTING e TAINTER (1.933) a favor do uso clínico do dinitrofenol, sem preocupações com os eventuais efeitos colaterais indesejáveis da droga.

O efeito do dinitrofenol sobre o metabolismo dos lipídios foi estudado por WINTER et al. (1.934), que o administraram em doses de 1mg/100g de peso a um grupo de ratos submetidos à dieta sugerida por CHANUTIN & LUDEWIG (1.933, cf. WINTER et al., 1934) e adaptada pelos autores. Puderam, assim, constatar um aumento dos níveis normais dos ésteres do colesterol sanguíneo, acompanhado de uma ligeira redução dos níveis sanguíneo e hepático dos ácidos graxos. Tal aumento não foi compatível com a aceleração do metabolismo.

Resultados semelhantes foram encontrados por CUTTING et al. (1.934) em pacientes com hipotireoidismo, tratados com dinitrofenol, levando-os, por isso, a concluir que a correlação significativa estabelecida entre as atividades do metabolismo básico e a concentração do colesterol no sangue, deixa de existir quando o dinitrofenol é aplicado. Além disso, as alterações da concentração do colesterol sanguíneo não estão relacionadas diretamente com os efeitos metabólicos da tiroxina, mas sim com outros efeitos hormonais da secreção tireoideana.

A tireoidectomia e a adrenalectomia, segundo CUTTING et al. (1.933), não alteraram os efeitos comumente produzidos pelo dinitrofenol, e descritos acima, o que foi aceito por eles como indicando que esses órgãos não interferem no mecanismo de ação da droga.

Visando investigar as alterações bioquímicas provocadas pelo dinitrofenol, TAINTER et al. (1.935) estudaram o metabolismo e as alterações energéticas em pacientes tratados com essa droga e submetidos a condições controladas, com dietas de valor calórico baixo e conteúdo protéico mínimo. Os resultados obtidos nesse trabalho, a respeito da determinação quantitativa dos metabólitos componentes da urina, fezes e sangue, levaram os autores a concluir que a energia extra do metabolismo, quando ele é ativado, é derivada, principalmente, da oxidação completa dos lipídios, e não das proteínas ou dos hidratos de carbono. A ausência de alteração dos níveis normais de amônia e dos ácidos orgânicos da uri-

na indicaram que a oxidação dos lipídios ocorre sem causar acidose ou formar corpos cetônicos.

A determinação do nitrogênio na urina e nas fezes, do nitrogênio protéico e não protéico do sangue, da albumina urinária, da uréia, do ácido úrico, da creatina, da creatinina na urina e no sangue, em amostras tiradas dos pacientes tratados por TAINTER et al. (1.935), não mostrou alterações significativas. Além disso, a perda do peso (2-3 libras por semana) relatada por CUTTING et al. (1.933) foi, também, confirmada.

Em vista dos resultados mencionados, o dinitrofenol passou a ser usado, em larga escala, no tratamento da obesidade e, segundo TAINTER et al. (1.933), com sucesso.

Por outro lado, desenvolveu-se uma série de experimentos clínicos visando investigar os eventuais efeitos terapêuticos dessa substância em outras condições patológicas. Assim, EMGE, WULFF e TAINTER (1.933), após implantarem fibrosarcoma em ratos brancos, estudaram o efeito do dinitrofenol sobre o metabolismo das células de neoplasmas malignos, administrando-o, por um período de 3-4 semanas, nas doses necessárias para produzir um aumento máximo de temperatura de 2°C. Embora não tivessem notado alterações macroscópicas, as investigações microscópicas revelaram que a aparência citológica dos tumores não era uniforme, manifestando vascularidade aumentada e alterações celulares destrutivas.

Mais uma possibilidade do uso clínico do dinitrofenol foi sugerida por LOONEY e HOSKINS (1.934). Os autores empregaram essa substância no tratamento de esquizofrênicos, com o intuito de aumentar o nível do metabolismo básico, notavelmente baixo nesse tipo de pacientes. Tal substância foi administrada em doses de 3-4mg/Kg de peso, por um período de 49 dias, retirando-se dos pacientes, semanalmente, amostras de sangue para determinação do teor de nitrogênio, glicose, colesterol, ácido láctico, glutatião, dióxido de carbono, oxigênio e do pH. Também foi determinado o teor de nitrogênio na urina.

Segundo LOONEY e HOSKINS (1.934) o metabolismo dos esquizofrênicos foi aumentado em 50 %, sem que notassem alterações na pressão sanguínea, na temperatura ou grande perda de peso. Nesses pacientes, observaram, no início, um aumento do teor de nitrogênio não proteico e do nitrogênio da uréia e do ácido úrico. Tal aumento, porém, foi desaparecendo sem que houvesse necessidade de se interromper o tratamento. A variação dos níveis de colesterol e de ácido láctico, embora considerável, não mostrou uma tendência consistente.

A contra-indicação do uso do dinitrofenol surgiu no trabalho de BOARDMAN (1.935), o qual registrou o rápido desenvolvimento de um tipo não especificado de catarata, em pacientes do sexo feminino tratados com essa substância por

tempo prolongado (superior a 8 meses). Simultaneamente, HORNER, JONES e BOARDMAN, (1.935) publicaram um relatório sobre tres casos nos quais ocorrera o mesmo fenômeno. Segundo eles, a idade dos pacientes (50, 36, 30 anos) e a ausência de qualquer outro fator ao qual se pudesse atribuir o desenvolvimento de catarata, sugerem ser o dinitrofenol a causa dessa doença. Tal conclusão foi confirmada por BARKAN et.al.(1936), os quais registraram vários casos de catarata, de um tipo incapaz de ser identificado por eles, em pacientes anteriormente tratados com dinitrofenol. Segundo esses autores, todos os pacientes pertenciam ao sexo feminino, haviam sido tratados com o dinitrofenol por causa de obesidade, acusando, aliás, perda de peso. Nenhuma dessas pacientes sofria de qualquer deficiência visual antes do início do tratamento com o dinitrofenol, além do que, estavam incluídas em faixa etária que não permitia atribuir à idade valor importante como causa de catarata.

A relação direta entre o mecanismo de ação do dinitrofenol a esse tipo de catarata não foi esclarecida, porém BARKAN et al., (1.936) sugerem que o mecanismo responsável pelo desenvolvimento dessa anomalia ocular associada ao tratamento com o dinitrofenol seja o mesmo que MÜLLER e BUSCHKE (1.934), STRAUSS e WALTER (1.934), BELLOWS (1.936) e FISHER (1.934), (cf. BARKAN et al., 1.936) propuseram para explicar a catarata causada por naftalina e a catarata senil. Em outras palavras, haveria o desaparecimento do ácido ascórbico do humor aquoso e do cristalino, destruindo-se assim, o sistema de auto-oxidação desse último.

A hipótese proposta por BOARDMAN (1.935) e BARKAN et al. (1.936), na qual os autores associam o desenvolvimento rápido da catarata com a administração de dinitrofenol não foi aceita por BORLEY e TAINTER (1.937) e por TAINTER e BORLEY (1.938).

Os primeiros relataram que a aplicação in vitro de tal substância a cápsulas do cristalino não provocou alterações na permeabilidade dessas membranas. Por outro lado, TAINTER e BORLEY (1.938) realizaram uma série de experiências visando investigar o possível desenvolvimento de catarata em animais tratados com dinitrofenol e submetidos a condições controladas. Assim, dois grupos de ratos albinos, de peso médio de 34 a 36g que foram submetidos a dietas especiais deficientes em vitaminas A e B<sub>2</sub>, contendo dinitrofenol na concentração de 1 %, vieram a morrer depois de um período médio de 58 dias. Um exame cuidadoso, com oftalmoscópio, dos olhos dos ratos utilizados nesse trabalho, foi feito a cada dois dias, durante o período da experiência. Nenhum dos exames, segundo esses autores, acusou alterações no cristalino desses animais, que pudessem ser associadas com a manifestação de catarata.

Uma experiência semelhante foi realizada, ainda por eles, em cobaias, para

estudar os efeitos do dinitrofenol sobre o cristalino desses animais submetidos a dieta deficiente de vitamina C. Também nesse caso não foi registrada qualquer alteração no cristalino, mesmo quando a deficiência de vitamina C se tornava fatal.

Tais resultados levaram TAINTER & BORLEY (1.938) a concluir que não há evidências experimentais de que o dinitrofenol produza alterações no cristalino capazes de provocar a catarata, mesmo quando essa droga é aplicada em concentrações máximas toleráveis, em animais em condições deficientes de vitaminas A, B<sub>2</sub> e C.

Além das contra-indicações do uso do dinitrofenol sugeridas por HORNER et al. (1.935) e BARKAN (1.936), uma série de relatórios publicados acusaram várias manifestações de efeitos colaterais indesejáveis dessa substância. Dentre eles figuram os de FRUMESS (1.934), constatando o desenvolvimento de erupções na pele (algumas vezes eram, certamente, alérgicas, por efeito de doses não tóxicas do dinitrofenol); de DINTENFASS (1.934), relatando que o dinitrofenol provocou, em um paciente tratado por ele, dores, fraqueza e hipo-acusia; e de BOHN (1.934) acusando o desenvolvimento da esternalgia agranulocítica numa jovem de 19 anos que tinha tomado dinitrofenol para reduzir seu peso.

Aqui, porém, é importante acentuar que a disponibilidade do dinitrofenol ampliou largamente seu uso descontrolado no tratamento da obesidade, em muitos casos sem orientação médica e em doses exageradas. Isso, provavelmente, intensificou o aparecimento de casos com efeitos colaterais indesejáveis, o que provocou forte abalo no prosseguimento do emprego e das investigações sobre esse produto químico.

Por volta da década de 50, entretanto, o interesse dos pesquisadores pelo dinitrofenol tornou-se novamente acentuado, embora sem visar aplicações práticas imediatas.

Assim, LOOMIS e LIPMANN (1.948) nos seus estudos sobre a fosforilação oxidativa no sistema aeróbico, relataram o efeito desacoplador do dinitrofenol sobre tal processo. A substância aplicada em concentração de  $5 \times 10^{-6}$  inibiu sensivelmente a esterificação do fosfato inorgânico, sem afetar a oxidação. Tal efeito mostrou-se reversível quando o dinitrofenol foi retirado do meio. Resultados semelhantes aos de LOOMIS e LIPMANN, foram obtidos por CROSS et al. (1949).

JUNQUEIRA & BELGUELMAN (1.955) estudando o mecanismo de ação do composto 48-80 (produto da condensação do p-metoxi-fenetil-metilamina com formaldeído) sobre os mastócitos de ratos, utilizaram o dinitrofenol, entre outros inibidores metabólicos, visando verificar a possível interferência do metabolismo celular em tal ação. O dinitrofenol, quando aplicado em doses de  $0,12 \times 10^{-3}$  a

$0,33 \times 10^{-2}$  M inibia a extrusão dos grânulos dos mastócitos tratados posteriormente com o composto 48-80, resultado que sugere, segundo os autores, que os processos da fosforilação estão envolvidos no mecanismo da ação de tal composto.

PARKER, BARNES e DENS, 1.951 (cf. BARNES et al., 1.955) observaram que o rigor mortis se desenvolve rapidamente nos animais envenenados fatalmente com o dinitro-ortocresol. Tal observação levou BARNES e DUFF, 1.954. (cf. BARNES et al., 1.955) a estudar o efeito do dinitrofenol sobre músculos estriados isolados. Segundo esses autores, quando o dinitrofenol era adicionado ao banho no qual o músculo ficava suspenso, induzia uma forte contração, cuja recuperação se iniciava lentamente, uma hora após a adição da droga. Quando o dinitrofenol era adicionado em concentrações adequadas, o músculo respondia à estimulação - depois que a droga era removida. Esses resultados foram também observados por CORI e CORI (1.936, cf. BARNES et al., 1.955), em músculos de sapo e por WEEKS e CHENOWETH (1.952), em preparação isolada do músculo esquelético de mamíferos (diafragma de rato).

Continuando as suas investigações, BARNES et al. (1.955) estudaram o comportamento do músculo estriado de mamíferos em presença do dinitrofenol, em concentrações de  $10^{-6}$  a  $10^{-3}$  M, por períodos de 1/2 a 2 horas. A técnica de preparação do nervo frênico do diafragma utilizada por esses autores, foi a de BULBRING (1.946), cf. BARNES et al. 1.955), modificada por BARNES e DUFF (1.953, cf. BARNES et al. 1.955), e as miofibrilas foram preparadas e examinadas, seguindo a técnica de HANSON e HUXLEY (1.953, cf. BARNES et al., 1.955).

Segundo BARNES et al., (1.955), quando o dinitrofenol era adicionado em concentração de  $10^{-4}$ , a contratura muscular se iniciava decorridos 3-6 minutos após a adição, e se desenvolvia rapidamente, atingindo o máximo, nos 10 minutos seguintes. O grau de desenvolvimento de tal contratura, aumentava proporcionalmente à concentração da droga. Em certas preparações, a contratura podia se manter por uma hora, antes que o músculo iniciasse lentamente o relaxamento (retirando-se ou não o dinitrofenol), atingindo seu comprimento original durante os 60 minutos seguintes.

Tendo por objetivo interpretar tais alterações do comportamento muscular por efeito do dinitrofenol, BARNES et al. (1.955) estudaram as alterações bioquímicas encontradas, precisamente após o tempo de incubação do dinitrofenol, registrando os seguintes resultados:

1. a contratura estava associada a uma queda significativa nas concentrações das ligações de fosfato de alta energia, não havendo recuperação, caso o relaxamento subsequente ocorresse em presença de dinitrofenol;

2. quanto maior a concentração usada de dinitrofenol, maior a queda do conteúdo muscular de ATP e dos nucleotídeos adenílicos totais;
3. após uma incubação de 30 minutos com dinitrofenol ( $10^{-5}$  M e  $10^{-4}$  M), seguida de lavagem, foi registrada uma recuperação significativa na concentração de ATP, fato que não ocorria quando essa droga era aplicada em concentração de  $10^{-3}$  M. Tal recuperação mostrou-se associada a uma certa excitabilidade, nessas preparações. De qualquer modo, nem a capacidade de contração, nem a concentração de ATP, foram completamente recuperadas;
4. quando a preparação era mantida em condições de anóxia nitrogenada, a contratatura produzida pelo dinitrofenol era mais rápida que a usual, embora a preparação não se mostrasse significativamente mais sensível a doses baixas de dinitrofenol. O relaxamento também ocorria mais rapidamente nessas condições do que nas preparações oxigenadas. Além disso, foi registrado um aumento no período latente antes da contratatura, quando o dinitrofenol era adicionado, e o grau de desenvolvimento da contração foi reduzido;
5. as miofibrilas isoladas não responderam ao dinitrofenol, o que mostrava que a contratatura não se devia à despolarização.

Baseados nos resultados mencionados, BARNES et al. (1.955) concluíram que o dinitrofenol afeta os sistemas metabólicos responsáveis pelo comportamento integrado do músculo estriado, além do que, a perda e a recuperação da função estão relacionadas com as alterações da concentração de ATP e da capacidade de sintetizar o glicogênio.

O efeito do dinitrofenol sobre a tensão, consumo de oxigênio e concentração de ATP no músculo liso foi estudado por BORN e BÜLBRING (1.955). Os autores relataram que a tensão, a atividade espontânea e o consumo do oxigênio foram aumentados quando esse produto foi aplicado em concentrações baixas. A concentração do ATP não foi alterada em tais concentrações.

KRAATZ e TRAUTWEIN (1.957) aplicaram o dinitrofenol em uma preparação neuromuscular do músculo extensor do 4º dedo e músculo sartório do sapo. Quando o dinitrofenol foi adicionado à preparação, em concentração 0,2 M, foi registrada uma queda na amplitude, sem haver recuperação em presença da droga. Levando em consideração a semelhança de ação do dinitrofenol com a da fadiga muscular, esses autores sugeriram que o mecanismo de ação dessa substância, como redutora do potencial de repouso, seria o mesmo que ocorre no estado de fadiga, isto

é, ou uma diminuição no número de quanta (referindo-se à teoria da liberação de acetilcolina em quanta e não em fluxo) ou uma diminuição das ligações de fosfato de alta energia disponíveis, diminuindo, assim, o conteúdo de acetilcolina de cada quantum.

Ainda no mesmo trabalho, KRAATZ e TRAUTWIN (1.957) constataram que a liberação espontânea de acetilcolina (frequência e amplitude dos potenciais espontâneos), estava aumentada no músculo intoxicado por dinitrofenol. Concluíram, baseados em seus resultados, que a intoxicação por dinitrofenol começava nas proximidades das terminações nervosas, o que provocava progressiva desorganização e destruição, com diminuição da resistência, da membrana pré-sináptica.

O efeito glicogenolítico do dinitrofenol, ou seja, quebra do glicogênio e aumento do ácido láctico, poderia ser explicado por uma possível ação exercida sobre o sistema responsável pela quebra do glicogênio, isto é, sobre o sistema fosforilase.

Assim, CORI e ILLINGWORTH (1.956) adicionaram a dinitrofenol em concentrações de  $10^{-5}$  M e  $10^{-3}$  M a uma preparação isolada do músculo sartório do sapo, em condições aeróbicas, por períodos de 30 a 60 minutos, com ou sem pré-incubação de 30 minutos com adrenalina. A atividade da fosforilase a (enzima ativa), em concentrações iniciais elevadas no músculo, ficava reduzida, ao passo que, em baixas concentrações, não mostrava alteração. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando a cafeína, ao invés do dinitrofenol.

Nesse trabalho de CORI e ILLINGWORTH (1.956) pode-se ressaltar as seguintes deduções desses autores:

1. a glicogenólise, aparentemente, pode ser acelerada por efeito do dinitrofenol, quando o conteúdo da fosforilase a no músculo, no início da experiência, é muito baixo;
2. para haver uma ativação da glicogenólise, um aumento da atividade da fosforilase a parece indispensável;
3. a acetilcolina também tende a reduzir o conteúdo da fosforilase ativa;
4. o aumento do fosfato inorgânico durante a contração, favorece a ativação da fosforilase no sentido da glicogenólise;
5. ao contrário do esperado, a concentração do fosfato inorgânico durante a ação da adrenalina parece ficar diminuída.

Investigar o efeito direto do dinitrofenol sobre o metabolismo da fosforilação e da respiração dos tecidos condutores, sob condições experimentais idênticas.

ticas àquelas usadas na mensuração do fenômeno bioelétrico e a troca iônica, foi o objetivo principal do trabalho de ABOOD et al., (1.961). Os efeitos dessa droga em concentração de 0,01-1 mM sobre o potencial de ação e de repouso das fibras musculares, foram observados por um período de duas horas, registrando-se, assim, uma queda do potencial de repouso, proporcional ao aumento da concentração do dinitrofenol.

Em concentrações de 0,01-0,05 mM de dinitrofenol, o registro da queda do potencial de repouso nunca foi menor do que 60 mv e não foi notado, nessas condições, nenhuma alteração da excitabilidade das fibras. Entretanto, na aplicação de 1 mM, durante um período de 60 a 120 minutos, a maioria das fibras mostrou um potencial de repouso menor que 60 mv, com perda total da excitabilidade.

Também foram estudados no mesmo trabalho, os efeitos de várias concentrações de dinitrofenol (0,001-1 mM). Sobre as concentrações de potássio e de sódio intracelulares. Assim, ABOOD et al. (1.961) constataram que os níveis de sódio não foram afetados por uma concentração de 0,01 mM de dinitrofenol, enquanto que os de potássio foram reduzidos em 22 %. O aumento máximo da concentração de sódio (30 %) foi atingido com o emprego de uma concentração de 0,1 mM de dinitrofenol. Em relação ao potássio, a sua concentração diminuiu - proporcionalmente ao aumento de concentração do dinitrofenol.

BEANI et al., (1.966) relataram que a secreção de acetilcolina no diafragma indiretamente estimulado foi inibida pelo dinitrofenol. Tal efeito mostrou-se diretamente relacionado com a concentração do dinitrofenol, estimulação e temperatura. Segundo esses autores a secreção de acetilcolina, em repouso, não foi afetada, nem a atividade da transferase da acetilcolina.

O efeito do dinitrofenol sobre o sistema fosforilase voltou a ser estudado por SIMÕES et al. (1.969). Os autores aplicaram essa substância por injeção subcutânea em doses de 2,5 mg/Kg de peso, a um grupo de coelhos adultos (peso 2.000 a 3.000 g), retirando amostras de sangue e de músculo, simultaneamente, para determinar o conteúdo de ácido láctico e a atividade das fosforilases. Segundo os autores, a incubação prolongada (até 160 minutos) de sangue com dinitrofenol, não mostrou alterações significativas.

As determinações feitas em vários tempos mostraram o aumento do conteúdo muscular e sanguíneo do ácido láctico, enquanto que a fosforilase b se mostrou bastante inibida.

O quadro construído com os resultados mencionados, indica, claramente, a vasta atuação metabólica do dinitrofenol conferindo-lhe uma importância espe-

cial como indutor ativo de várias alterações metabólicas, em diversas direções, atuação esta, que ainda pode, eventualmente, ser terapêuticamente melhor explorada. Por outro lado, o dinitrofenol poderá vir a ser de grande utilidade no campo das investigações bioquímicas, servindo de instrumento para esclarecer vários mecanismos metabólicos ainda obscuros.

É óbvio, porém, que para colocar em prática essas possibilidades, o esclarecimento do mecanismo da ação do dinitrofenol é indispensável. Tal mecanismo, em vista dos resultados mencionados, não está ainda esclarecido, muito embora uma aproximação a respeito tivesse sido oferecida no trabalho de FOCESI JR *et al.* (1.969). Nesse trabalho, foi relatado um aumento no conteúdo da fosforilase a em ratos envenenados com dinitrofenol (2,5 g/100g de peso), explicando -se tal aumento como decorrente de uma ativação da quinase da fosforilase b, enzima responsável pela transformação da fosforilase b (enzima dependente da AMP) em fosforilase a (enzima independente). No mesmo trabalho foi registrado um aumento acentuado do conteúdo do ácido láctico no sangue dos animais estudados, o que sugere, fortemente, segundo esses autores, que o mecanismo de ação do dinitrofenol é semelhante ao dos demais agentes glicogenolíticos.

O mecanismo sugerido para explicar o aumento no conteúdo da fosforilase a encontrado nos músculos de animais tratados com dinitrofenol foi esquematizado por DRUMMOND *et al.* (1.969). Esses autores relataram que o aumento do conteúdo da fosforilase a é a conclusão de uma série de reações iniciada pela ativação da ciclase de adenila por efeito da adrenalina. A ciclase de adenila é a enzima responsável pela formação de 3', 5' - monofosfato cíclico da adenosina (AMP cíclico) a partir de trifosfato de adenosina (ATP). O AMP cíclico, por sua vez, estimula a quinase protéica dependente de AMP cíclico, enzima essa que atua na transformação da forma inativa da quinase da fosforilase b em sua forma ativa. O aumento do conteúdo da forma ativa da quinase de fosforilase b acelerará, por sua vez, a transformação da fosforilase b em a, e conseqüentemente a degradação do glicogênio.

Um outro meio de ativar a formação de fosforilase a foi sugerido no trabalho de DANFORTH *et al.*, 1.962 - (cf. STULL e MAYER, 1.971). Nesse trabalho - os autores relataram que a ativação máxima da formação da fosforilase a foi conseguida em 3 segundos, submetendo-se o músculo sartório de sapo a estímulo elétrico tetânico.

Dois fatos sugerem, fortemente, a possibilidade de o sistema fosforilase poder ser estimulado por outros mecanismos, além daquele determinado pelo aumento do conteúdo de AMP cíclico e, conseqüentemente, da ativação da quinase de

fosforilase a (mecanismo adrenérgico). São eles:

1. a adrenalina também aumenta a formação da fosforilase a, embora necessite de tempo relativamente bem maior para atingir o valor máximo da sua ação;
2. o uso de bloqueadores beta-adrenérgicos (dicloro-isoproterenol) inibem a ação da adrenalina sobre o sistema fosforilase, ao mesmo tempo que não afetam a ativação da formação da fosforilase a induzida pelo estímulo elétrico;

Várias evidências favoreciam essa sugestão. Assim, POSNER et al. (1.965) observaram que a estimulação elétrica de músculos de sapo; bem como de músculos esqueléticos de ratos, aumenta o conteúdo da fosforilase a e da forma ativa da quinase da fosforilase b. O conteúdo muscular de AMP cíclico durante a experiência mostrou-se, segundo os autores, inalterável.

A ativação da transformação da fosforilase b em a, sem qualquer alteração no conteúdo de AMP cíclico foi também relatada por DRUMMOND et al. (1.969), os quais ainda informaram que aquela ativação ocorreu sem qualquer aumento detectável na forma ativa da quinase de fosforilase b.

Os resultados de DRUMMOND et al. (1.969) fizeram, portanto, com que a hipótese anteriormente sugerida, de que a formação da fosforilase a pode ser ativada através de diferentes mecanismos, ficasse plenamente comprovada.

O fato de que os resultados de DRUMMOND et al. (1.969), foram constatados em músculo sartório do sapo e no diafragma do rato, bem como in vivo, no músculo gastrocnêmio do rato, durante contração induzida por estímulo elétrico, permitiu-nos vislumbrar um outro mecanismo, através do qual a formação da fosforilase a poderia ser ativada. Tal mecanismo seria a contração muscular.

Essa sugestão encontrou uma base nas observações registradas por CORI & ILLINGWORTH (1.956), os quais relataram que a ativação da glicogenólise, observada no músculo durante a contração, atinge níveis muito maiores do que os observados quando o músculo é submetido à ação da adrenalina e, para explicar essa observação, concluíram ser indispensável, uma ativação da fosforilase a.

## I.2 - OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

Na caminhada racional na linha de investigação visando ao esclarecimento do mecanismo de ação do dinitrofenol como agente glicogenolítico e, considerando a constatação feita por FOCESI JR. et al. (1.969) a respeito da existência de um aumento de conteúdo da fosforilase a em músculos esqueléticos de animais tratados com dinitrofenol, tornava-se premente o estudo dessa ação, através dos dois mecanismos tidos como responsáveis pela ativação da formação da fosforilase a. Em outras palavras, tornava-se necessário investigar se o efeito glicogenolítico do dinitrofenol se dá através do conteúdo de AMP cíclico e, consequentemente, da forma ativa da quinase da fosforilase b, ou se esse efeito decorre do desencadeamento do processo da contração muscular, mecanismo pela qual a fosforilase a fica bastante aumentada.

Para averiguar a veracidade, tanto do primeiro propósito (a ativação da ciclase da adenila e desencadeamento da série das reações consequentes), quanto do segundo (a indução da contração muscular), tem-se que admitir que a adrenalina deve ter importância relevante.

Os resultados obtidos por EL-GUINDY, SEKINO, TAHIN & FOCESI JR. (1.970), mostraram que o efeito glicogenolítico do dinitrofenol fica inibido quando essa substância é administrada a animais previamente tratados com alfa-metil-dopa (AMD), droga conhecida como inibidor competitivo da biossíntese da adrenalina. Tais resultados sugerem, fortemente, uma possível correlação entre o mecanismo de ação do dinitrofenol como agente glicogenolítico, e o da adrenalina na glicogenólise.

Essa eventual correlação poderia decorrer de duas alternativas que não são, obrigatoriamente, mutuamente exclusivas:

- a) aumento dos níveis da adrenalina, por descarga das reservas desse hormônio, ou por ativação da biossíntese do mesmo. Tal aumento se reflete diretamente no aumento de conteúdo de AMP cíclico, segundo LARAIA & REDDY (1.968), NAMM et al. (1.968) e MAYER et al. (1.970);
- b) potencialização da ação da adrenalina sobre a força da contração muscular e, consequentemente, sobre a fosforilação e a ativação da fosforilase a, ou seja, sobre a transformação da fosforilase b em a.

A veracidade da primeira situação poderia ser investigada através da determinação do nível sanguíneo das catecolaminas em animais tratados com dinitrofenol.

Independentemente de serem os níveis das catecolaminas alterados significativamente ou não, a segunda situação poderia ser investigada através da determinação da ação do dinitrofenol sobre a força da contração do músculo cardíaco, em animais tratados com essa substância e da verificação posterior de tal ação em preparações isoladas de músculo, na presença e na ausência da adrenalina.

Por outro lado, o envolvimento da adrenalina no mecanismo de ação do dinitrofenol sobre a força da contração muscular, poderia ser investigado através de uma análise espectrofotométrica do plasma de ratos envenenados antes e depois da adsorção das catecolaminas.

Essas investigações constituíram os objetivos do presente trabalho.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

## II.1 - DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO SANGUÍNEO DAS CATECOLAMINAS EM RATOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM DINITROFENOL

A técnica empregada na determinação espectrofotofluorométrica das catecolaminas foi a descrita por ANTON e SAYRE (1.962), a qual se baseia na oxidação dessas substâncias (adrenalina ou noradrenalina) transformando-as nos seus derivados fluorescentes (tri-hidroxi-indol), os quais foram submetidos a análise espectrofotofluorométrica. A Fig. 1. resume os passos químicos da transformação das catecolaminas em derivados tri-hidroxi-indólicos, através da oxidação pelo ferrocianeto.

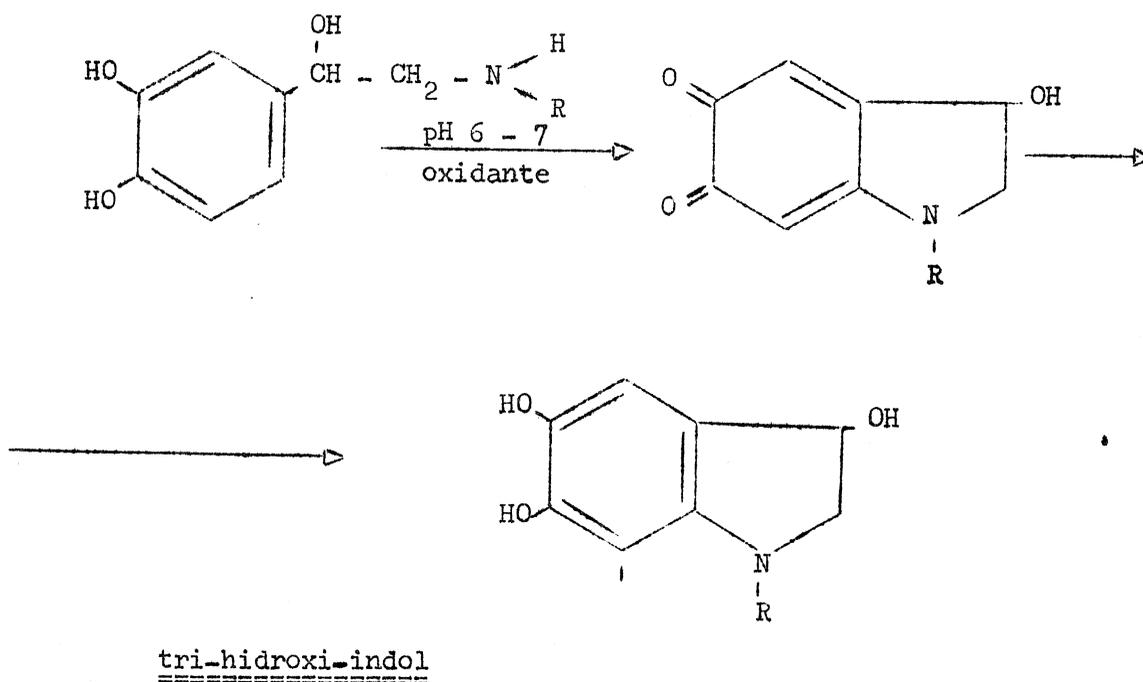


Fig. 1. Resumo dos passos bioquímicos da transformação das catecolaminas em derivados tri-hidroxi-indólicos, através da oxidação pelo ferrocianeto.

Adrenalina R = H

Noradrenalina R = CH<sub>3</sub>

O processo experimental foi dividido, arbitrariamente, em dois passos, ou seja, extração e oxidação, fazendo-se, depois disso, a leitura da intensidade da fluorescência relativa dos produtos formados por oxidação.

### II.1.1. Extração

Para a extração das catecolaminas do plasma, utilizaram-se 200 ratos machos, de peso médio de 250 g. Todos esses ratos foram cedidos gentilmente pela Divisão de Animais do Instituto Biológico de São Paulo.

Os 200 ratos foram distribuídos casualmente em 20 grupos iguais, a metade dos quais foi utilizada como controle. Os outros 10 grupos foram injetados com dinitrofenol na dose de 2,5 g/ 100 g de peso do animal, uma hora antes de iniciar o experimento.

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 30 mg/ kg de peso e heparinizados com Lique mine na dose de 500 uI por rato. O sangue desses animais foi recolhido da artéria carótida, na presença de metabissulfito - de sódio em concentração de 0,5 mg/ml e rapidamente centrifugado em centrífuga refrigerada a 19.000 xg a 10°C, durante 10 minutos.

As proteínas plasmáticas foram precipitadas pela ação do perclorato. Assim, 30 ml do plasma foram transferidos para um tubo de centrífuga de polietileno, no qual foi adicionado o ácido perclórico concentrado (11,6 N) até a concentração 0,4 N do ácido. O tubo foi fechado, agitado vigorosamente durante 5 minutos e depois centrifugado a 19.000 xg, por 10 minutos.

O volume do sobrenadante foi completado, quando necessário, para 25 ml - com HClO<sub>4</sub> 0,4 N e transferido para um tubo de centrífuga de 50 ml, contendo - 400 mg de óxido de alumínio (Woelm natural activity grade 1) ativado pelo processo de ANTON e SAYRS (1.962) e 200 mg de ácido etileno diamonotetraacético - -disódico (EDTA).

O pH da mistura foi ajustado em potenciômetro até 8,6, sob agitação mecânica rápida e constante. Após esse ajustamento, sendo agitada por mais 5 minutos após o que, foi levada à centrifugação a 19.000 xg, a 10°C durante 10 minutos. O sobrenadante, do qual as catecolaminas foram adsorvidas pelo óxido de alumínio, foi desprezado.

O precipitado (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) foi levado com 10 ml de água bidestilada com EDTA (1g/litro) arrolhando-se o tubo e agitando-se-o durante 2 minutos. O tubo foi centrifugado em seguida, em centrífuga clínica, durante 1 minuto, desprezando-se a água, ao final.

Essa lavagem foi repetida quatro vêzes, após o que, as catecolaminas foram eluídas por agitação vigorosa de  $Al_2O_3$ , durante 15 minutos com 3 ml de  $HClO_4$  0,05 N. Interrompendo-se a agitação, o sobrenadante contendo as catecolaminas - foi transferido para um tubo de centrífuga de polietileno e centrifugado durante 10 minutos a 30.000 xg a 10°C. O extrato claro, separado por essa centrífuga, foi submetido ao passo experimental descrito em seguida.

II.1.2. Oxidação (Formação dos derivados fluorescentes)

A uma alíquota de 0,2 ml do extrato, transferida para um pequeno tubo de ensaio, foi adicionado, sob agitação rápida, 0,1 ml de tampão de fosfato 0,5N, pH 7. A seguir adicionou-se 0,02 ml de ferricianeto de potássio (0,25 %), recém preparado, que era misturada rapidamente. O tubo, mantido em repouso durante 1 minuto, tinha a reação interrompida pela adição de 0,20 ml da solução ascorbato alcalino, preparado imediatamente antes do uso, com breve agitação. Decorridos 15 a 30 segundos, adicionava-se 0,5 ml de água bidestilada, agitando-se o tubo fortemente.

O contduo do tubo foi transferido para a cubeta e a intensidade da fluorescência relativa foi lida no espectrofotofluormetro Aminco Bowman, utilizando-se o tubo fotomultiplicador R.C.A. IP-21. Tais leituras foram sempre tomadas após um minuto da adição do esorbato alcalino e antes de decorridos 5 minutos de tal adição.

O aparelho foi sempre testado antes de ser posto em uso, com uma solução - de sulfato de quinina (0,1 mg/ml em ácido sulfúrico 0,1 N) e com soluções padrões de adrenalina e noradrenalina. Esses testes foram sempre repetidos durante a experiência.

A intensidade da fluorescência relativa de cada amostra foi tomada em pH 7 e, logo depois, o pH da mesma amostra foi ajustado para pH 2, com HCl 5N, repetindo-se a leitura.

II.1.3. Padrões (standards) e controles

Os níveis de catecolaminas encontrados no sangue de ratos não tratados foram tomados como controle. O "branco" foi obtido utilizando-se a mesma técnica, com omissão da aplicação de  $K_3Fe(CN)_6$ , adicionando-se 0,02 ml de água ao invés desse reagente.

Com a finalidade de concluir qual o nível de recuperação das catecolaminas adsorvidas pelo óxido de alumínio, submeteu-se uma série de soluções de adrena-

lina e outra de noradrenalina (20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{g/ml}$ ) à técnica mencionada, omitindo-se ou não o passo da absorção com óxido de alumínio e, consequentemente, da eluição em ácido perclórico 0,05 N. As curvas dos resultados obtidos nesses dois experimentos foram utilizados para obter o nível de recuperação conseguido através dessa técnica.

Soluções padrões de 50  $\mu\text{g/ml}$  de ambas as catecolaminas foram submetidos a mesma técnica. Tais soluções serviram como padrões externos.

Os padrões internos foram obtidos pela adição de adrenalina e de noradrenalina ao plasma antes de iniciar o passo da oxidação, nas quantidades necessárias para atingir a concentração final (da substância adicionada) de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Todas as leituras e os registros foram tomados, obedecendo os seguintes parâmetros:

A - Para o sulfato de quinina

Arranjo de fendas	3-2-3, 3-2-3, 2
Sensibilidade	50
M.M.	0,3
Excitação	350 mU
Emissão	450 mU

B - Para a adrenalina

pH	2
Arranjo de fendas	5-4-5, 5-4-5, 5
Sensibilidade	50
M.M.	0,3
Excitação	422 $\mu\text{u}$
Emissão	513 $\mu\text{u}$

C - Para a noradrenalina

pH	7
Arranjo de fendas	5-4-5, 5-4-5, 5
Sensibilidade	50
M.M.	0,3
Excitação	409
Emissão	519

## II.2 - A MEDIDA DO EFEITO DO DINITROFENOL SOBRE A RESERVA ADRENÉRGICA DO CONDU- TO DEFERENTE.

O conduto deferente foi isolado do animal submetido a anestesia profunda por incubação com éter etílico. Após dissecação, lavava-se a luz do órgão com 3,0 ml de solução nutritiva aquecida a 30°C. A seguir amarrava-se a porção proximal do mesmo (extremidade prostática), num gancho de ação inoxidável adaptado na base da cuba de vidro cuja capacidade era de 10 ml\*. A porção terminal ou epididimal era ligada por meio de um fio de linha à haste da alavanca isotônica de inscrição frontal que permitia uma ampliação de 6 vezes com carga de 500 mg. Efetuava-se o registro em papel esfumado adaptado ao cilindro de um quimógrafo "Palmer".

Nesta cuba, o órgão era mantido em solução nutritiva a 30°C e aerada. O líquido utilizado apresentava a seguinte composição (PICARELLE e VALLE 1.969):

Na cl	0,138 M
K cl	0,0057 M
Ca cl <sub>2</sub>	0,0018 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,00036 M
NaHCO <sub>3</sub>	0,015 M
Glicose	0,0055 M

Essa solução foi preparada a partir de duas outras soluções mais concentradas, uma contendo os cloretos e a outra o fosfato. Tais soluções concentradas eram, no momento de usar, convenientemente diluídas com água bidestilada e desionizada, e depois então a glicose era adicionada. O pH do líquido nutritivo mantém-se em torno de 7,6.

Trinta minutos depois de adaptado o conduto deferente às condições de análise experimental, o dinitrofenol foi adicionado na concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M e o efeito foi registrado durante 5 minutos.

Essa experiência foi repetida fazendo-se uso da adrenalina ou a noradrenalina ao em vez do dinitrofenol.

## II.3 - DETERMINAÇÃO DA FORÇA DA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO CARDÍACO IN VIVO.

Para determinar a força de contração cardíaca in vivo, usaram-se 20 cães, sendo 12 machos e 8 fêmeas. O peso dos animais do sexo masculino variou entre 6 e 11 kg. Os do sexo feminino variou entre 4,2 e 22,5 kg. Todos os cães foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 30 mg/kg de peso. A veia femoral desses animais foi sistematicamente canulada com uma cânula de polietileno para a introdução das drogas utilizadas.

A pressão arterial foi sempre tomada na artéria carótida e registrada com auxílio do fisiógrafo projetor (PMP-4A, E & M Instruments Company, Inc.) utilizando-se o transdutor miográfico linear-Core (R), P-1000A da E & M. Introduzia-se na traquéia, uma cânula de dupla abertura, tendo uma das suas saídas ligada ao respirador Takaoka, para garantir a sobrevivência do animal. A outra saída, habitualmente, permanecia fechada.

Em todos os cães foi feita uma incisão vertical mediana na parede anterior do tórax, mantendo-se as partes separadas com o auxílio de um afastador. Após a incisão do pericárdio, ligava-se o transdutor miográfico Linear-Core (R), F-50 da E & M, por meio de um fio ponta do coração, em posição livre de qualquer contato com os tecidos circunvizinhos que pudesse afetar o seu movimento e a força da contração cardíaca era, então, registrada no fisiógrafo.

Após toda a manipulação cirúrgica, cada animal foi heparinizado com 2.500 UI de Lique mine (Roche). Fez-se uso do Flaxedil, injetando-se-o em doses de 800 µg/kg de peso dos animais, para evitar a interferência do movimento da respiração no registro da força da contração.

O funcionamento do sistema foi testado através da administração da adrenalina (Laboratório Paulista de Biologia) em doses de um e de meio µg/kg de peso do animal.

Nos 20 cães utilizados administrou-se o dinitrofenol, em doses de 2,5, 3,5 e 5 mg/kg de peso, doses estas preparadas a partir de uma solução concentrada de dinitrofenol a 10 mg/ml e com pH 7.

Em 5 dos 20 cães utilizados foi injetado isoproterenol em doses de 10 µg/kg de peso, por via endovenosa, com o intuito de realizar o estudo comparativo entre o efeito estimulador da força da contração cardíaca dessa droga e o de dinitrofenol. Em tais animais o dinitrofenol só foi injetado depois de passado o efeito do isoproterenol, ou seja, depois que a amplitude da força da contração, anteriormente aumentada pelo efeito de tal substância, voltou a ser apresentada no início da experiência.

Uma experiência semelhante à mencionada acima foi realizada em outros 5

cães, fazendo-se uso da adrenalina em doses de 2 ug/kg de peso, ao invés do isoproterenol.

Visando investigar a hipótese proposta a respeito da participação da adrenalina no funcionamento do dinitrofenol e, conseqüentemente, do seu envolvimento no mecanismo de ação dessa droga, 5 cães foram tratados com bloqueador beta-adrenérgico (propranolol), antes de serem submetidos a aplicação do dinitrofenol. O propranolol foi introduzido pela veia femoral em doses de 1,5 mg/kg de peso do animal. Decorridos dez minutos da injeção, o dinitrofenol foi administrado em dose de 3,5 mg/kg de peso.

## II.4 - MEDIDAS DA FORÇA DE CONTRAÇÃO CARDÍACA IN VITRO

Usaram-se 16 coelhos de ambos os sexos, de peso de 2.500 a 3.000 g, os quais foram sacrificados com uma pancada na cabeça e sangrados rapidamente. O tórax desses animais foi aberto e a aurícula foi imediatamente isolada e transferida para uma placa de Petri contendo solução de Ringer-Lock (NaCl 0,8 % ;  $\text{CaCl}_2$  0,24 % ; KCl 0,42 % ;  $\text{NaHCO}_3$  0,1 % e glicose 0,2 %) continuamente oxigenada. Nessa solução, a concentração de cloreto de sódio foi diminuída de 0,9 % para 0,8 % e a da glicose foi elevada de 0,1 % para 0,2 % (BARNES e DUFF, 1.954). A preparação da aurícula isolada, imersa nessa solução, apresentou melhores condições experimentais.

Após livrar as aurículas do sangue e da gordura, cada uma delas foi transferida para uma cuba de 50 cc com duas saídas, contendo a solução fisiológica mencionada acima.

Uma das saídas da cuba foi ligada por meio de um tubo de borracha na fonte de oxigênio, mantendo-se, assim, a solução constantemente oxigenada. A outra saída foi ligada a um sistema de vácuo, que era colocado em funcionamento quando se fazia necessário uma troca do meio. As aurículas foram sempre fixadas por uma das suas extremidades ao fundo da cuba e o registro da força de **contração** foi conseguido com auxílio de uma alavanca de Starlin, à qual se ligava a outra extremidade da aurícula. Tal registro foi sempre tomado em quimógrafo.

A preparação foi mantida durante toda a experiência a uma temperatura de 28°C.

Após todo o sistema montado e em funcionamento, registrou-se sempre a amplitude da força de contração da aurícula, antes de submetê-la a ação de drogas. Tal registro foi considerado como referência e denominado de registro controle.

Adicionou-se 0,1 ml de uma solução de adrenalina a 1.000 ug/ml à cuba para atingir a concentração final de 2 ug/ml. A resposta do músculo auricular foi registrada durante o período de 2 minutos. Após repetidas trocas do meio, garantindo a retirada total da adrenalina, adicionou-se 0,1 ml de uma solução de 1 mg/ml de dinitrofenol, quando se verificava o estabelecimento do registro de contração muscular semelhante ao registro controle. Ficava, assim, a concentração final do dinitrofenol na cuba igual a 2 g/ml. O efeito foi registrado durante 2 minutos.

Para retirar o dinitrofenol, procedia-se a nova troca do meio e repetia-se o registro até que o registro controle aparecesse. A aurícula era, então, subme

tida à ação das duas drogas, simultaneamente, durante o mesmo período e nas mesmas concentrações anteriores usadas.

## II.5 - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA

Utilizaram-se 100 ratos do sexo masculino, de peso médio 250 gramas da colônia 2-BAW, gentilmente cedidos pelo Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina. Esses animais foram distribuídos em 10 grupos, 5 dos quais foram tratados com dinitrofenol administrado em doses de 2,5 mg/100 g de peso, através de injeção intraperitoneal, 60 minutos antes do início da experiência.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg), injetado intraperitonealmente e heparinizados com Lique mine (Roche). Uma das carótidas foi isolada, canulada com uma cânula de polietileno, sendo o sangue colhido num depósito mantido em gelo. O volume total do sangue do grupo (10 ratos) foi determinado, misturado com metabissulfito de sódio (0,5 mg/ml) e centrifugado em centrífuga refrigerada durante 10 minutos a 19.000 xg a 10°C.

O plasma foi separado e suas proteínas foram precipitadas pela adição do ácido perclórico (11,6 N) até a concentração de 0,4 N do ácido, agitando-se-o durante 5 minutos e depois centrifugando-se-o durante 10 minutos a 19.000 xg a 10°C.

Foram separados 5 ml do sobrenadante, para a análise espectrofotométrica, tanto dos animais tratados, quanto dos não tratados, que receberam as denominações de fração T-1 e N-1, respectivamente. O resto foi ajustado a 25 ml com ácido perclórico 0,4 N e transferido para um tubo de centrífuga de polietileno contendo 400 mg de  $Al_2O_3$  ativado e 200 mg de EDTA. Após ajustar o pH a 8,6 com agitação mecânica, o tubo foi fechado completamente, agitado por mais 5 minutos e centrifugado durante 10 minutos a 19.000 xg a 10°C.

O sobrenadante (fração T-2 para os tratados e N-2 para os não tratados) foi separado e centrifugado outra vez durante 10 minutos a 19.000 xg a 10°C garantindo-se, assim, a retirada total das partículas finas de óxido de alumínio. Depois dessa etapa o sobrenadante foi submetido à análise.

No estudo espectrofotométrico utilizou-se o espectrofotômetro Beckman, ACTA - V, registrando a absorção óptica das amostras na faixa 600 - 200 m $\mu$  fazendo - se uso dos seguintes parâmetros:

Sensibilidade	1,0
Scan Speed	1 nm/sec
Chart expansion	50 nm/inch

Foram realizados os seguintes registros diluindo-se todas as amostras, dez vezes em água bidestilada.

1. Fração N-1 contra fração N-2
2. Fração T-1 contra fração N-2
3. Fração T-2 contra fração N-2
4. Mistura da fração T-2 (diluída 1/10) com a fração N-2 (diluída 1/25), contra fração N-2

Também foram realizados os seguintes registros:

1. Solução de dinitrofenol 2 ug/ml em água bidestilada contra água bidestilada.
2. Solução de adrenalina 20 ug/ml em água contra água bidestilada.
3. Solução de dinitrofenol (2 ug/ml) + adrenalina (20 ug/ml) contra água bidestilada.
4. Solução de dinitrofenol (2 ug/ml) + adrenalina (40 ug/ml) contra água bidestilada.
5. Solução de dinitrofenol (2 ug/ml) + adrenalina (80 ug/ml) contra água destilada.

Finalmente, visando investigar a atividade óptica do dinitrofenol na presença da adrenalina, foi registrada a curva da absorção de uma solução contendo dinitrofenol (2 ug/ml) e adrenalina (20 ug/ml) contra uma solução de adrenalina - (20 ug/ml).

### III - RESULTADOS

#### III.1 - CONTEÚDO SANGUÍNEO DAS CATECOLAMINAS EM RATOS TRATADOS COM DINITROFENOL

Após obter uma curva padrão da adrenalina sob a forma de bitartarato, e uma outra de bitartarato de noradrenalina, foram preparados os gráficos necessários para obter o nível de recuperação dessas substâncias.

A curva padrão, tanto da adrenalina, quanto da noradrenalina, foi obtida com 5 soluções, nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{g/ml}$ , submetidos à técnica mencionada no capítulo anterior, omitindo-se ou não o passo da extração.

A comparação entre as leituras das intensidades relativas das várias concentrações de adrenalina (Figs. 2 e 3) e de noradrenalina (Figs. 4 e 5) quando se omitia o passo da extração, e aquelas feitas após a aplicação da técnica completa (Figs. 6 a 9) mostra que a recuperação da adrenalina foi, em média de 90,8 (Tabela 1) e a da noradrenalina foi, em média de 73,4 % (Tabela 2).

Embora na técnica original empregada pelo autor, fosse preconizado o uso do ácido acético 1,6 N para obter o pH ótimo da reação da adrenalina ( $\text{pH}_2$ ), verificou-se, durante os experimentos, que o ácido clorídrico 5N era mais eficiente para esse propósito, pois o "branco" feito empregando HCl 5N acusou absorção - fluorométrica mínima, como pode ser observado na fig. 10.

A determinação espectrofotofluorométrica do conteúdo sanguíneo de adrenalina e de noradrenalina, em ratos tratados e não tratados com dinitrofenol, mostrou que essa substância não tem efeito liberador de adrenalina ou de noradrenalina.

A Fig. 11 representa a intensidade relativa da emissão fluorométrica da adrenalina e da noradrenalina encontrada no sangue de ratos normais. Tais catecolaminas foram determinadas do registro direto da emissão fluorométrica das mesmas e, também, através dos valores dos padrões externos e internos.

O conteúdo sanguíneo da adrenalina e da noradrenalina de ratos tratados com dinitrofenol a 2,5 mg/100g de peso encontra-se representado na fig. 12.

As figs. 11 e 12 mostram, pois, que o nível da adrenalina e da noradrenalina no plasma dos ratos não foi significativamente alterado após a administração de dinitrofenol a esses animais, o que também fica patente na Tabela 3.

Intensidade relativa de fluorescência

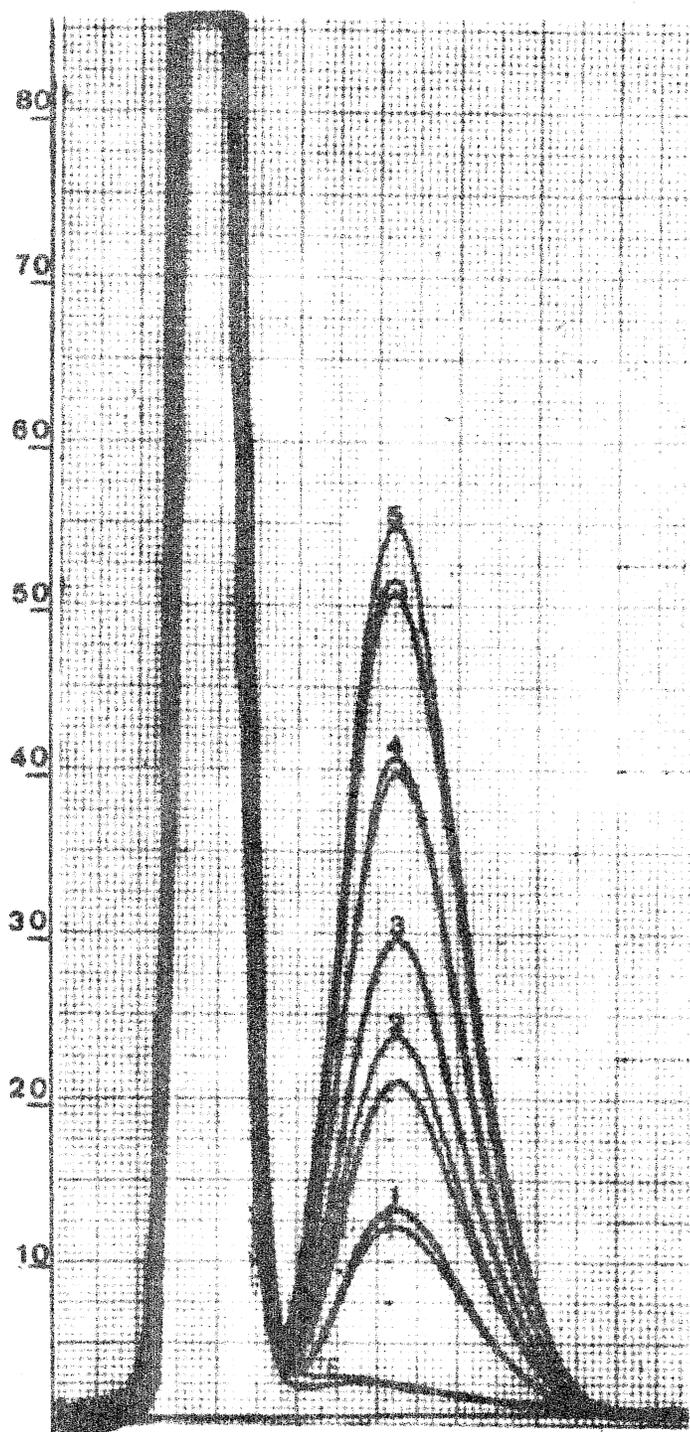


Fig. 2 - O registro de intensidade relativa de curva padrão de adrenalina (sem adsorção). Concentração em µg/ml: 1-20; 2-40; 3-60; 4-80; 5-100.

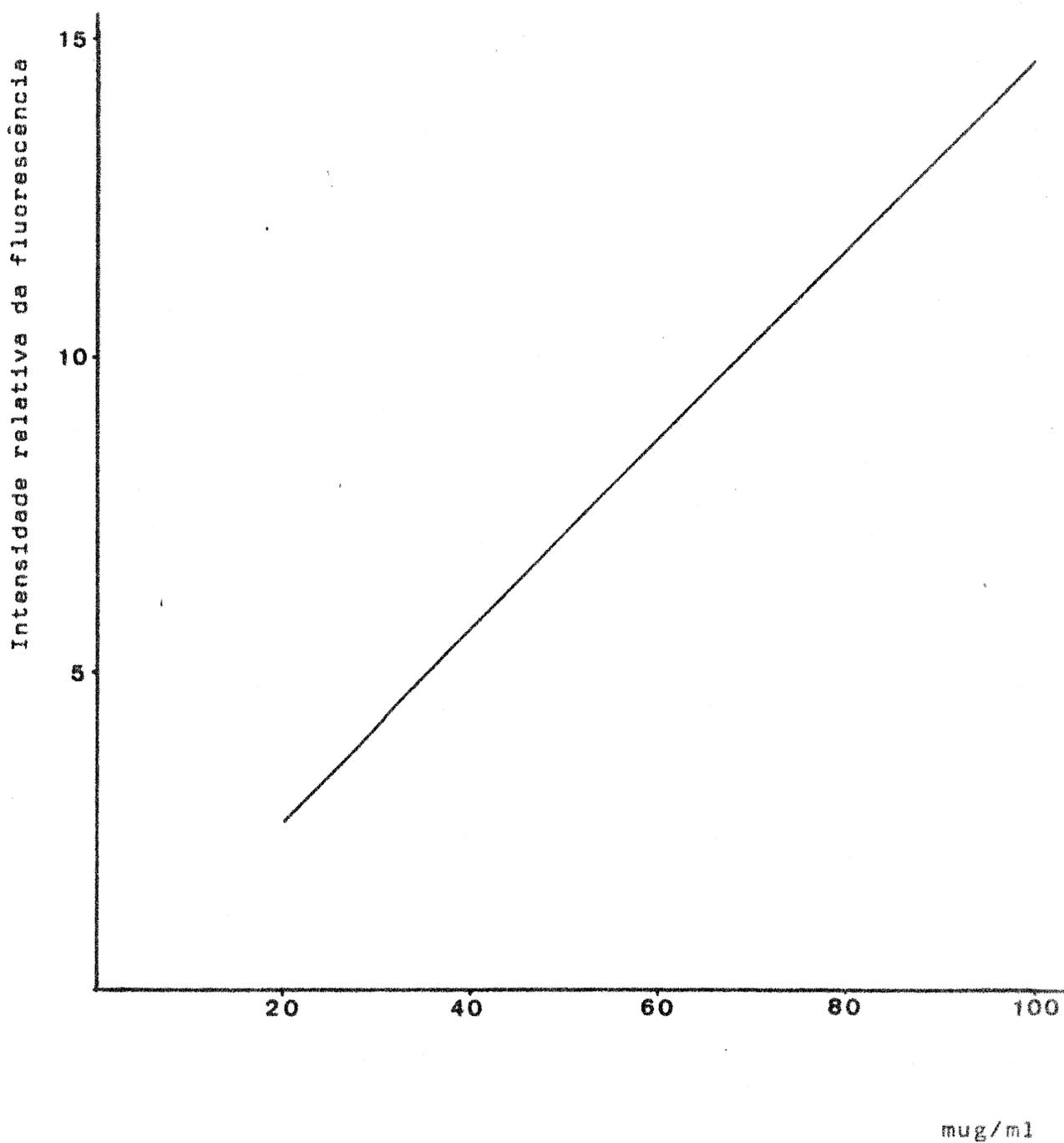


Fig. 3 - A curva padrão da intensidade relativa da fluorescência da adrenalina (sem adsorção).  
Coeficiente de regressão = 0.15

Intensidade relativa de fluorescência

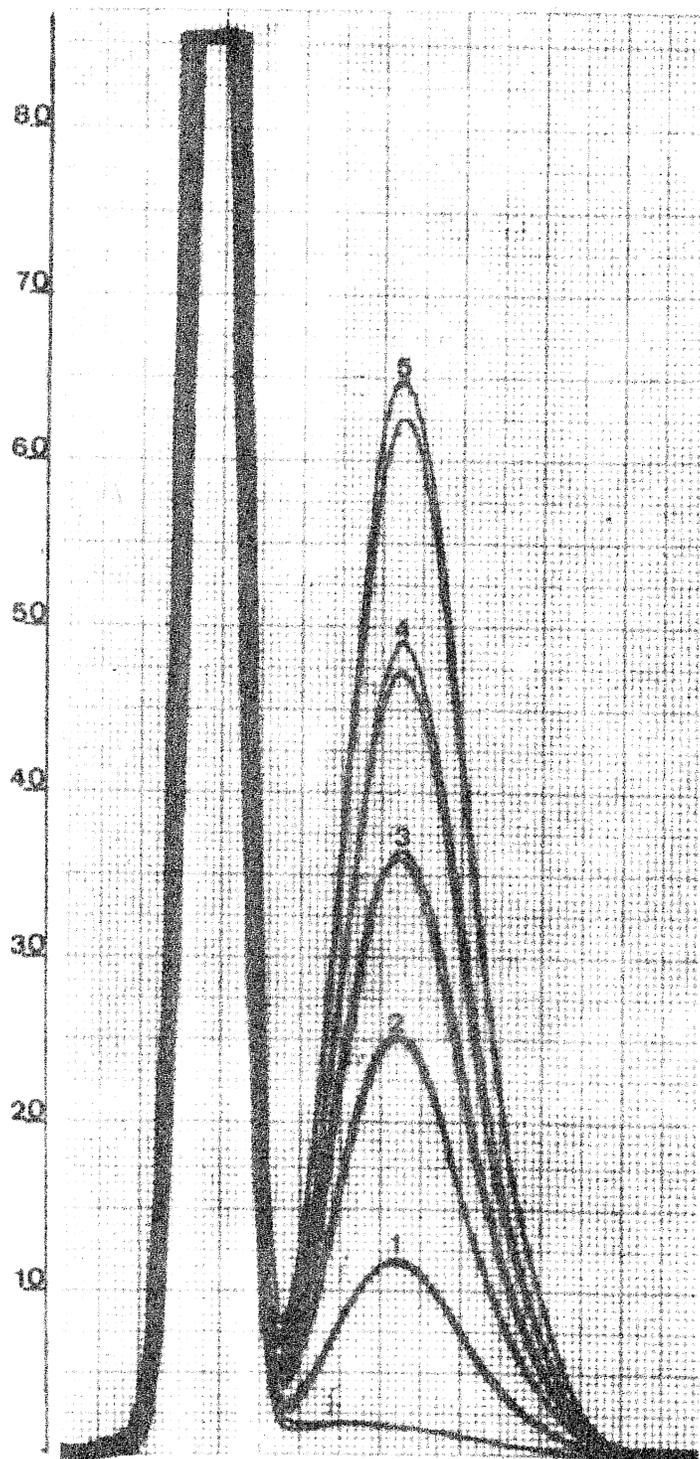


Fig. 4 - O registro da intensidade relativa de fluorescência da noreadrenalina (sem adsorção). Concentração em µg/ml: 1-20; 2-40; 3-60; 4-80; 5-100.

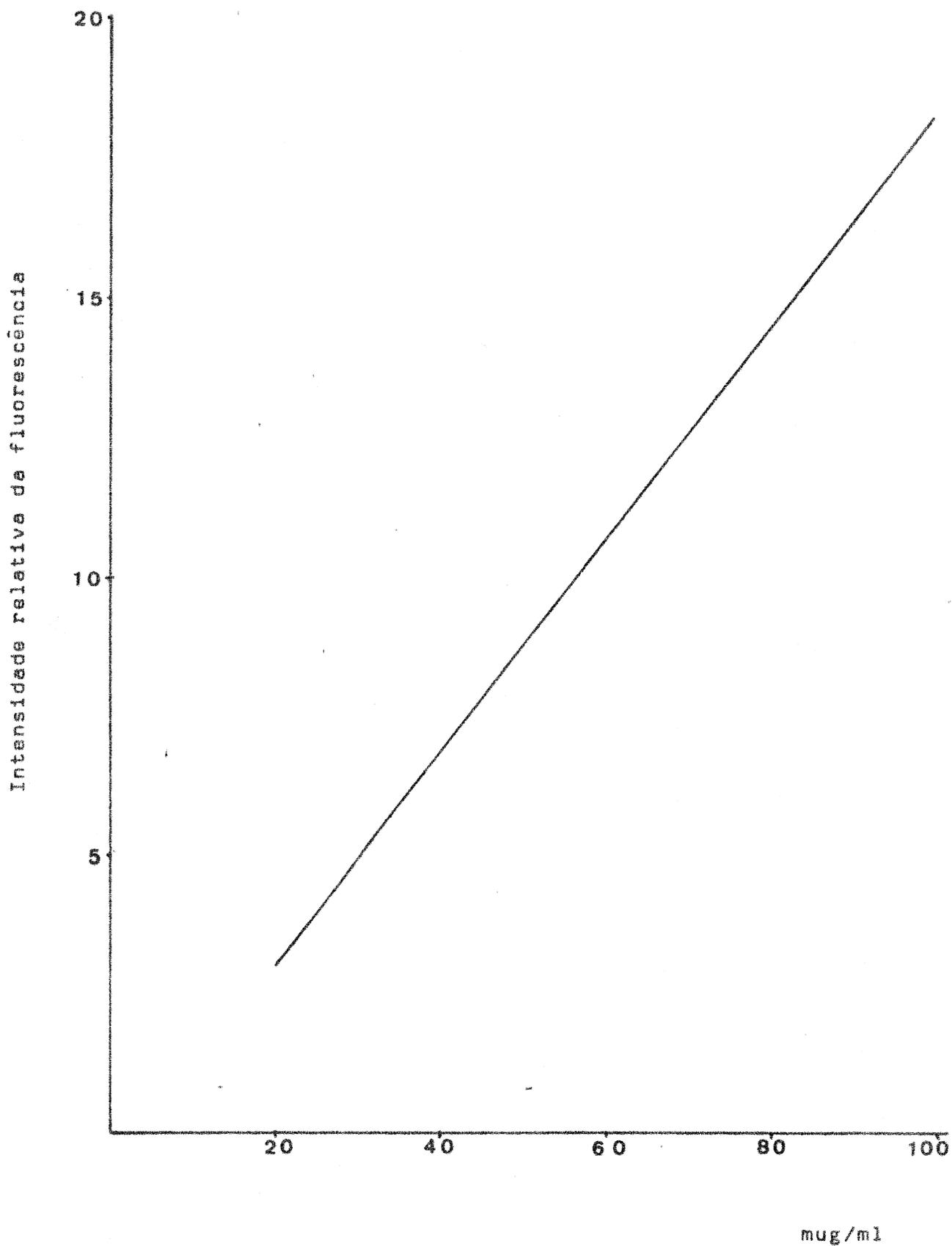


Fig. 5 - A curva padrão da noradrenalina (sem adsorção). Coeficiente de regressão = 0,19

Intensidade relativa da fluorescência

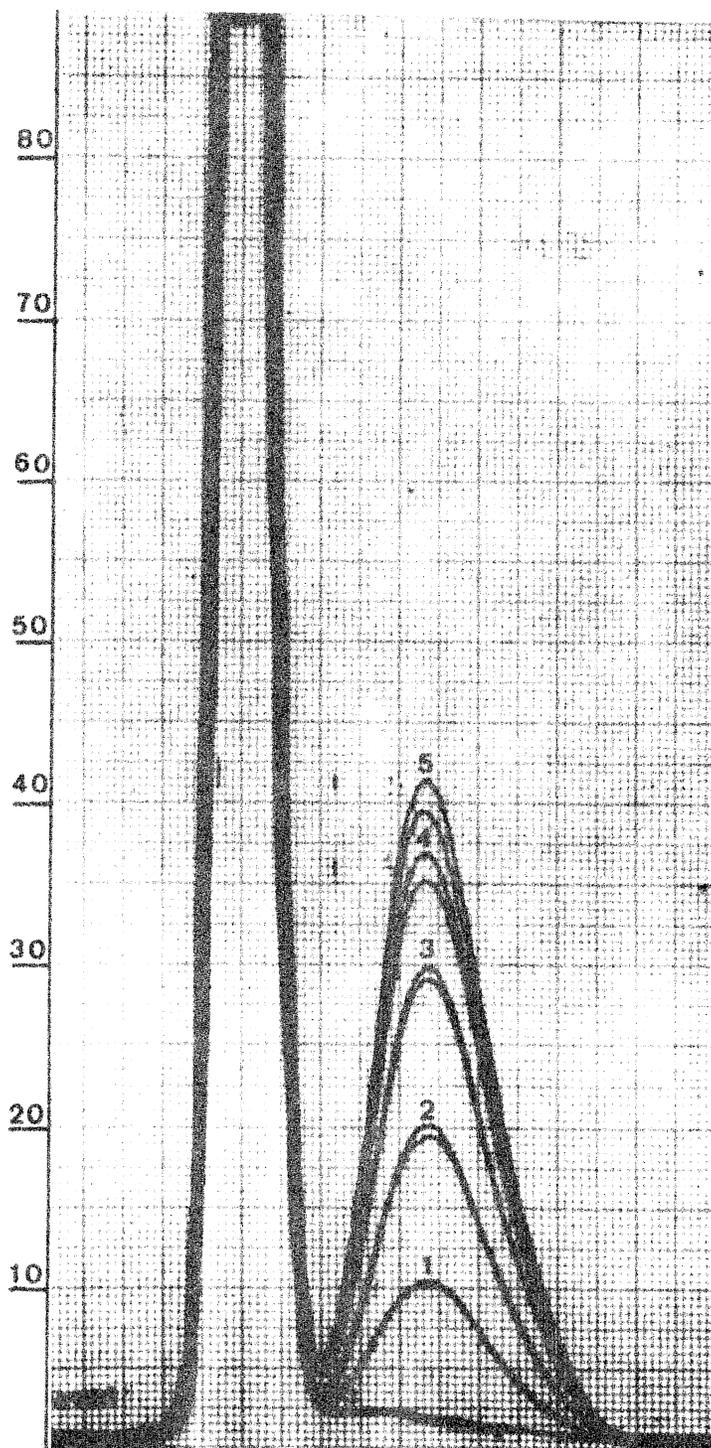


Fig. 6 - A intensidade relativa da fluorescência da adrenalina (com adsorção). Concentração em µg/ml: 1-20; 2-40; 3-60; 4-80; 5-100.

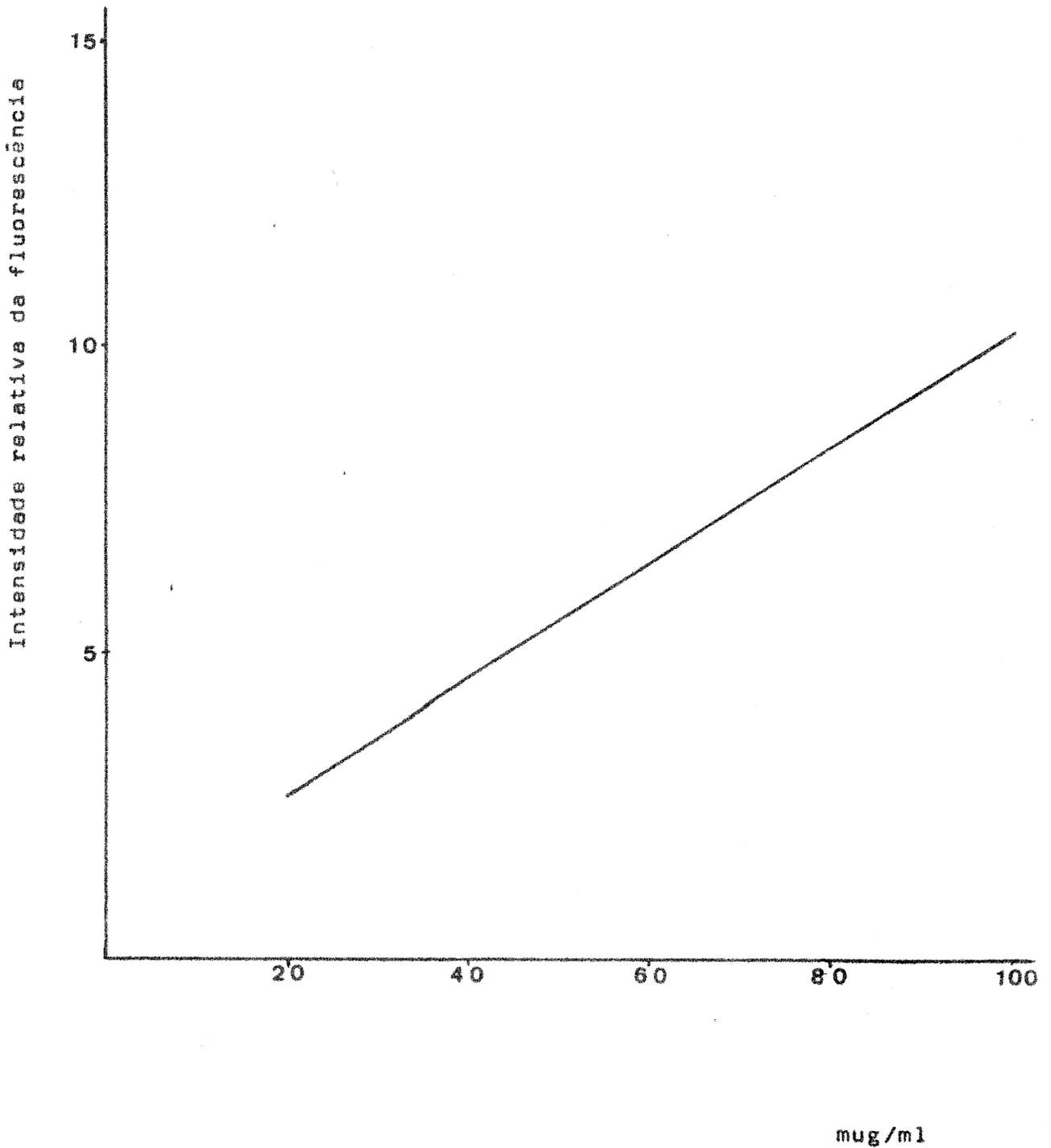


Fig. 7 - A curva padrão da adrenalina (com adsorções). Coeficiente de regressão = 0,12

Intensidade relativa de fluorescência

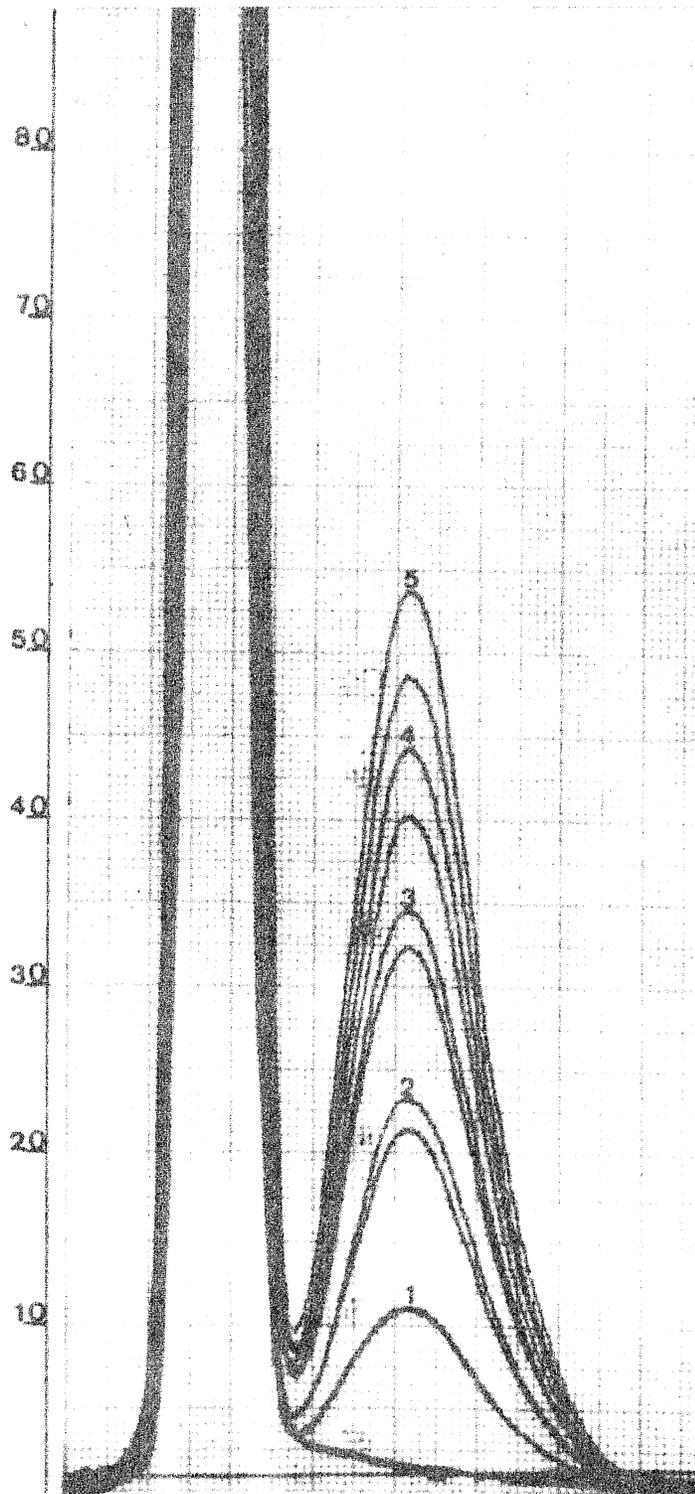


Fig. 8 - Registro da intensidade relativa de fluorescência d noreadrenalina (com adsorção). Coeficiente em µg/ml 1-20; 2-40; 3-60; 4-80; 5-100.

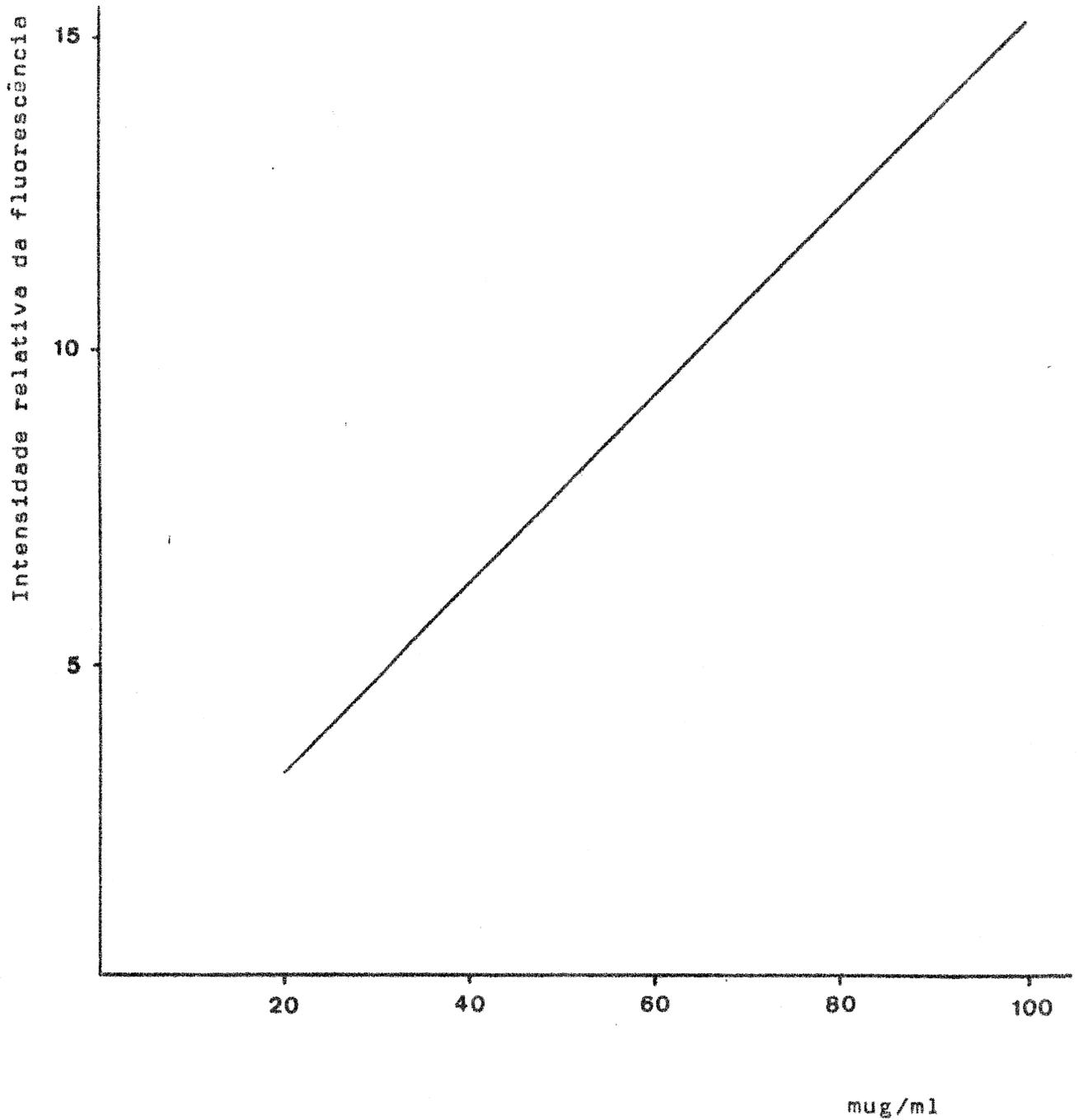


Fig. 9 - Curva padrão de noradrenalina (com adsorção). Coeficiente de regressão = 0,15

Tab. 1 - Cálculo da recuperação da Adrenalina adsorvida no óxido de alumínio pela técnica de ANTON & SAYER (1.962).

Concentração µg/ml	Fluorescência emitida		Recuperação %
	sem adsorção	com adsorção	
20	2,57	2,40	93,4
40	5,87	5,32	90,6
60	8,23	8,25	100,0
80	10,78	10,20	94,6
100	15,32	11,55	75,4
Recuperação média			90,8 %

Tab. 2 - Cálculo da recuperação da noradrenalina adsorvida no óxido de alumínio pela técnica de ANTON & SAYER (1.962).

Concentração µg/ml	Fluorescência emitida		Recuperação %
	sem adsorção	com adsorção	
20	4,42	3,00	67,9
40	8,82	6,45	73,1
60	12,57	9,75	77,6
80	16,40	12,30	75,0
100	20,37	15,00	73,6
Recuperação média			73,4 %

Intensidade relativa de fluorescência

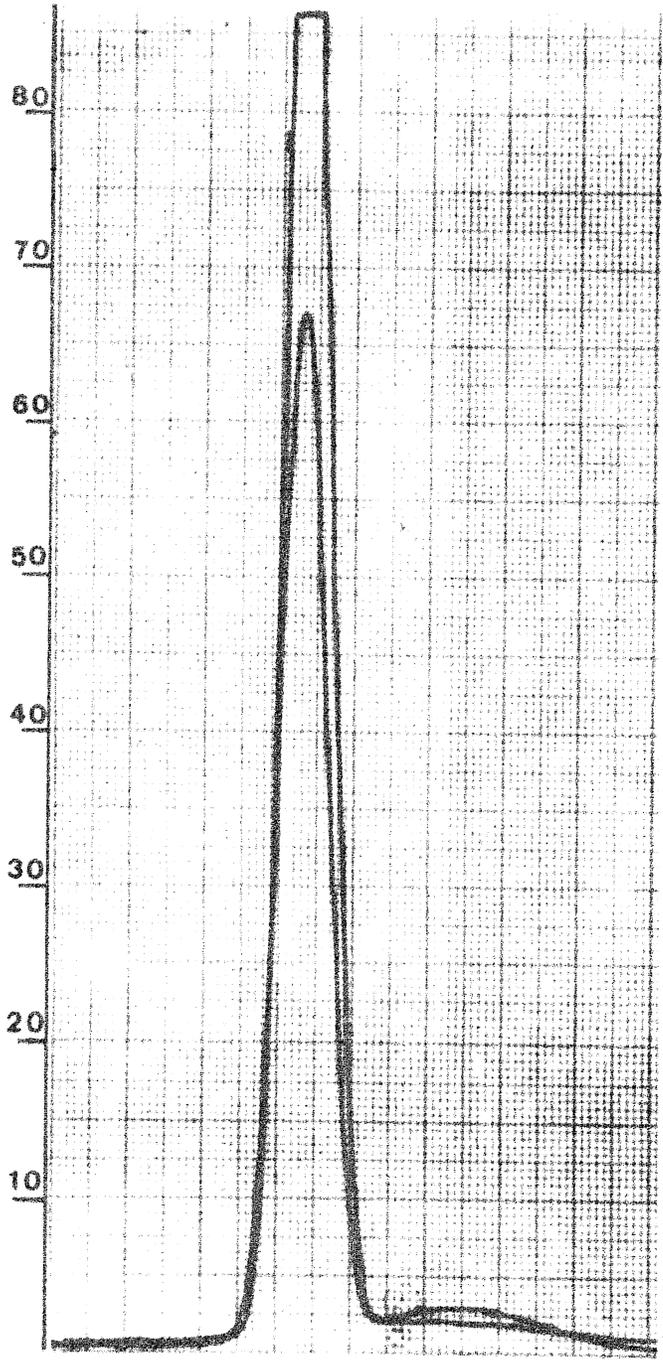


Fig. 10 - As leituras do "Branco" de adrenalina (superior) e da noredrenalina (inferior).



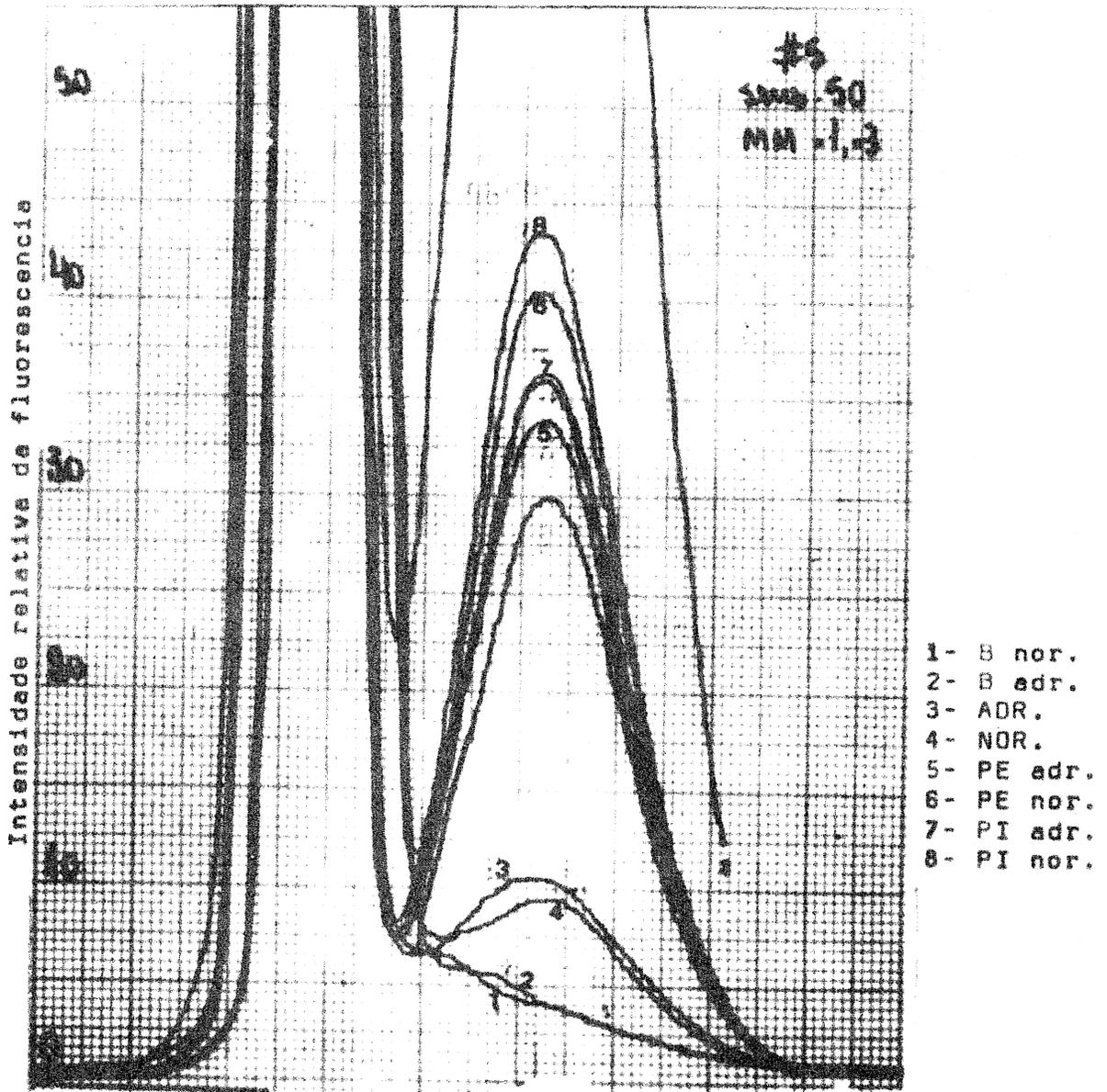


Fig. 12 - Análise fluorométrica de plasma de ratos tratados com dinitrofenol (2,5mg por 100g de peso), (B branco ; PE padrão externo ; PI padrão interno)

Tabela 3 - Os valores da adrenalina e da noradrenalina encontrados no sangue de ratos tratados e não tratados com dinitrofenol.

SUBSTÂNCIA	CONTEÚDO SANGUÍNEO EM $\mu\text{g/L}$	
	NÃO TRATADOS	TRATADOS
ADRENALINA	5,12	5,32
NORADRENALINA	4,01	4,37

III.2 - EFEITO DO DINITROFENOL SOBRE A RESERVA ADRENÉRGICA NO CONDUTO DEFERENTE DO RATO

Os condutos deferentes isolados de ratos normais não responderam ao dinitrofenol, mesmo após a adição de adrenalina ao banho nutritivo em que foram imersos, como se pode verificar na Fig. 13.

Essa ausência de resposta ao dinitrofenol indica que essa substância não teve efeito liberador das reservas de catecolaminas do conduto deferente.

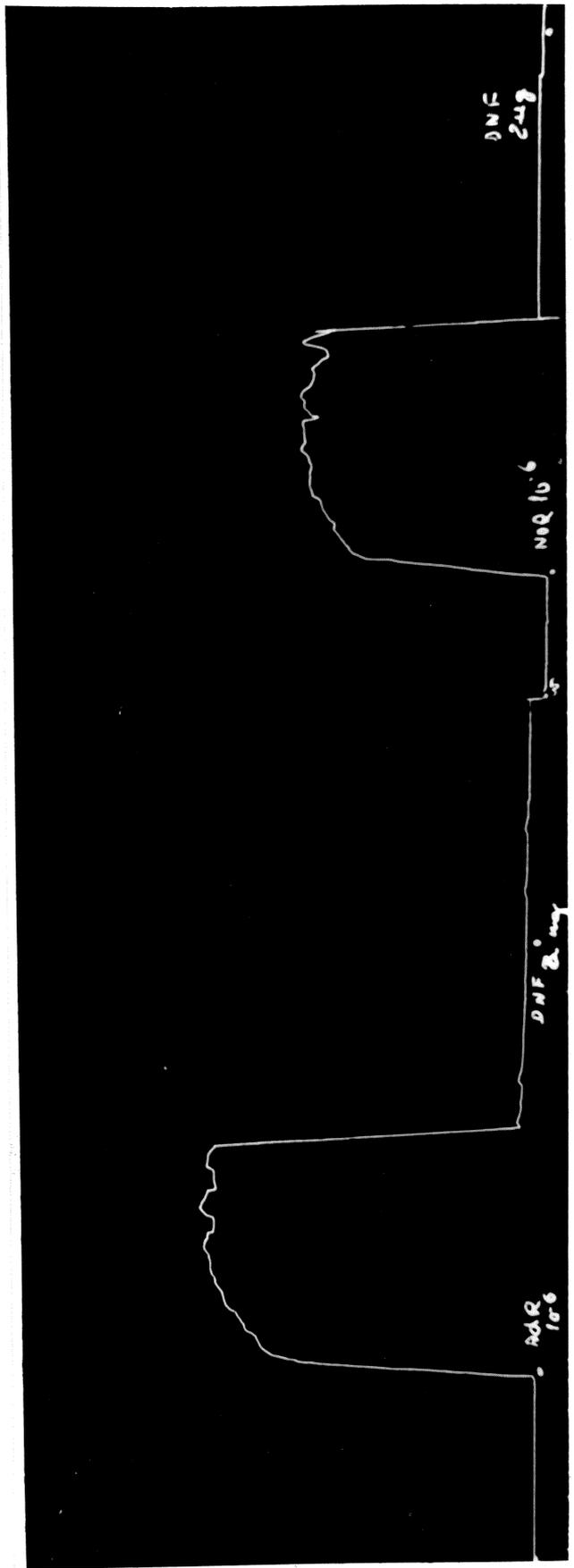


Fig. 13 - efeito do dinitrofenol sobre a reserva adrenergica do conduto deferente.

### III.3 - EFEITO DO DINITROFENOL SOBRE A FORÇA DA CONTRAÇÃO CARDÍACA IN VIVO

Usando-se como controle, em todos os experimentos, o registro apresentado pelo animal antes de aplicar as drogas testadas, verificou-se que a amplitude da força da contração cardíaca mostrou-se aumentada imediatamente após a administração do dinitrofenol. Tal aumento, foi em média, de 33 % quando a droga foi aplicada em dose de 2,5 mg/kg de peso e em média, de 93 % quando a dose usada foi de 5 mg/kg de peso. Enquanto a dose de 2,5 mg/kg de peso, não mostrou efeito sobre a frequência, a de 5 mg/kg aumentou-a em 15 %. Os resultados correspondentes às doses de 2,5 e 5 mg/kg de peso encontram-se evidenciados respectivamente nas Figs. 14 e 15. O efeito do dinitrofenol, que foi constatado durante uma hora após a sua injeção, permitiu verificar um aumento médio de 38,5 % na amplitude da força da contração cardíaca, decorridos 55 minutos da injeção intravenosa do dinitrofenol em dose de 5 mg/kg de peso (Fig. 16).

Na Fig. 17 observa-se um aumento na amplitude da força da contração cardíaca da ordem de 165 %, o qual foi registrado após a administração de isoproterenol em doses de 10 µg/kg de peso, por via intravenosa, dose essa que também aumentou a frequência em 25,4 %.

A adrenalina foi administrada em doses de 2 µg/kg de peso do animal. O registro representativo do efeito dessa droga feito na Fig. 18, mostra um aumento de 90 % na amplitude e da ordem de 40 % na frequência.

O dinitrofenol mostrou-se sem efeito, quando aplicado na dose de 3,5 mg/kg de peso em cães previamente tratados com um bloqueador beta-adrenérgico (Inderal). O Inderal foi administrado 10 minutos antes da introdução do dinitrofenol, na dose de 1,5 mg/kg de peso. Essa experiência, da qual a Fig. 19 constitui um registro, mostra que o dinitrofenol não exerceu qualquer efeito sobre a força da contração, tanto na amplitude, quanto na frequência.

Os resultados mencionados, encontram-se sumariados na tabela 4, na qual aparecem registrados os aumentos percentuais da amplitude e da frequência da força da contração cardíaca observados em cães tratados com as drogas utilizadas nas experiências relatadas no presente tópico.

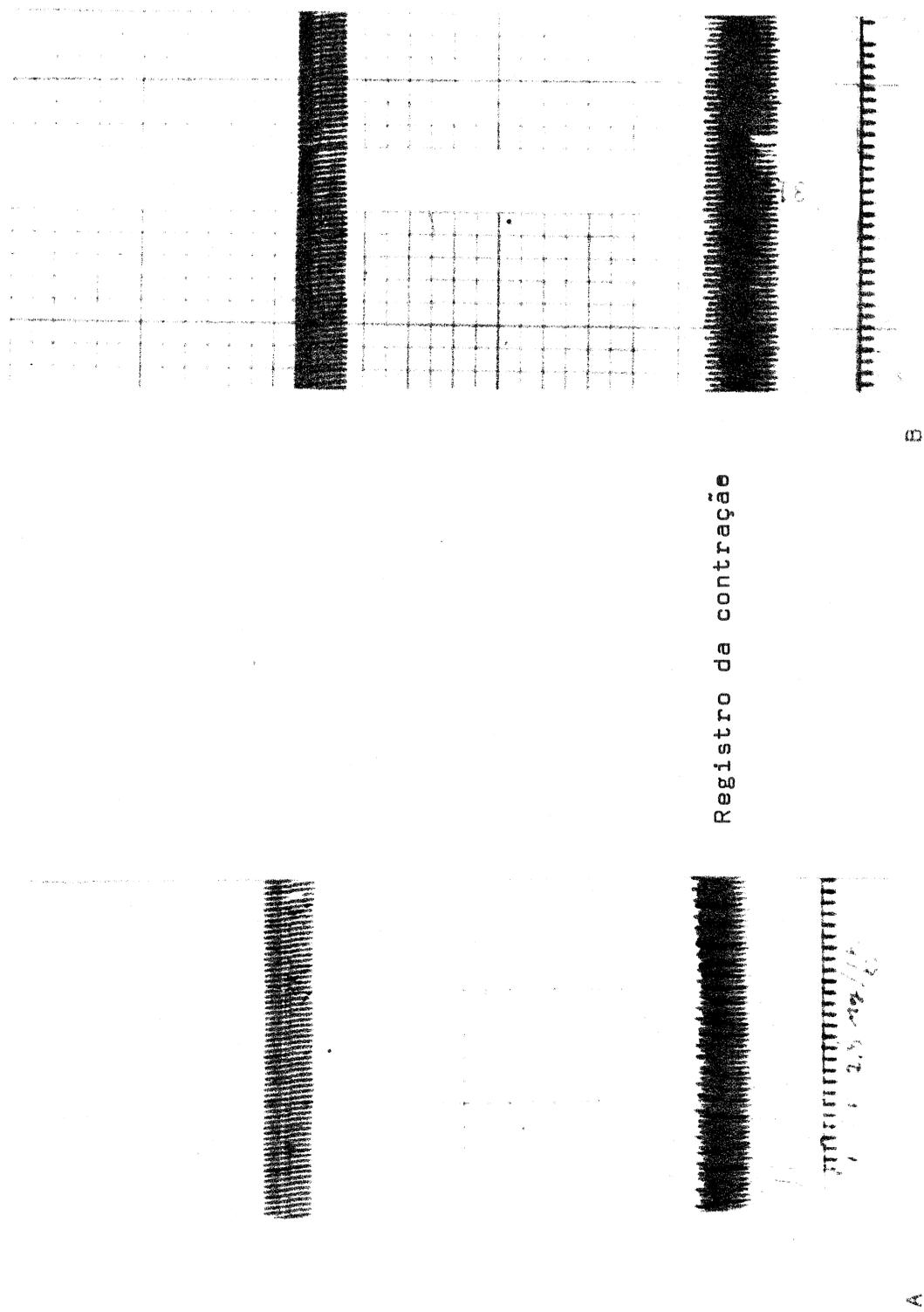
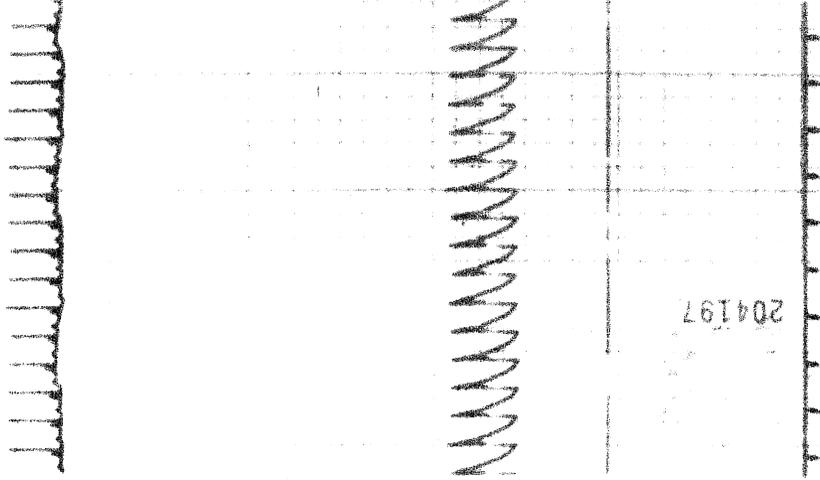
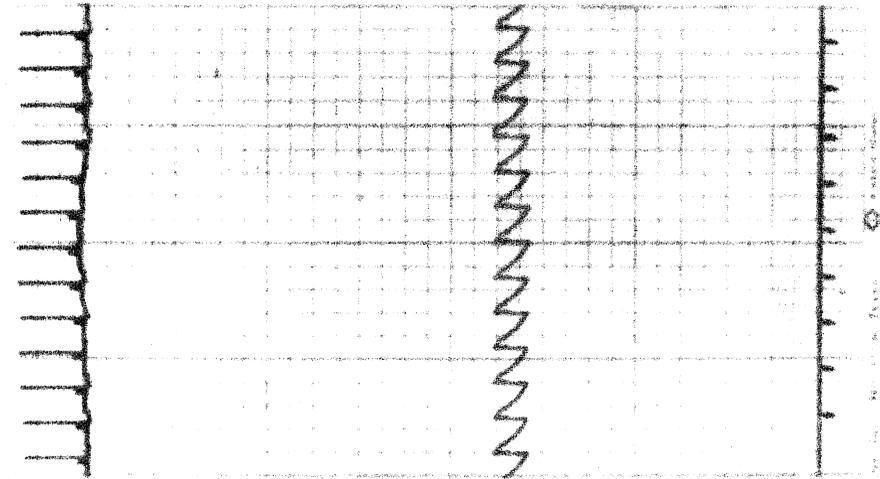


Fig. 14 - O efeito do dinitrofenol (2,5 mg/kg de peso) sobre a força cardíaca "in vivo".

A - Controle

B - Depois da aplicação da droga



Registro da contração

204197

A

B

Fig. 15 - O efeito do dinitrofenol (5 mg/kg) sobre a força de contração cardíaca "in vivo"  
A - Controle B - Após a administração da droga

ALUNO: RAFAEL LOPES A



Registro da contração



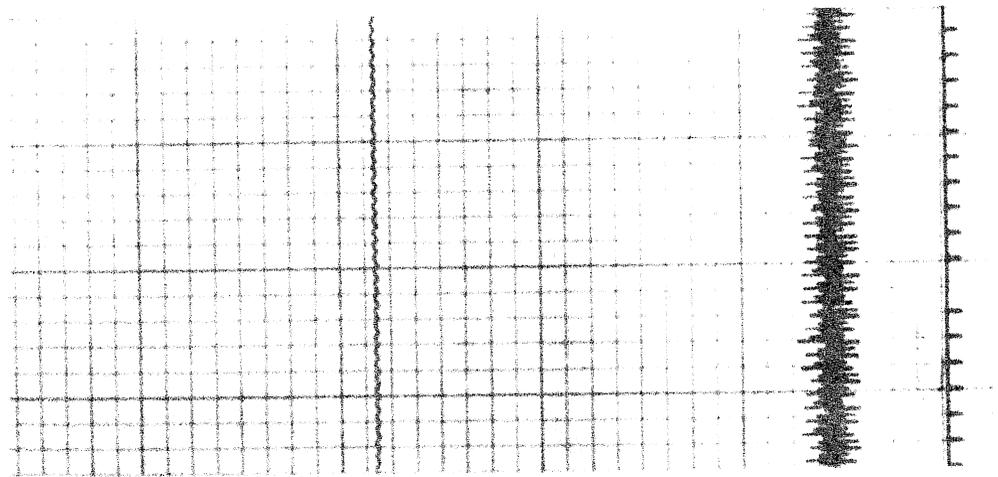
A B

ALUNO: RAFAEL LOPES A



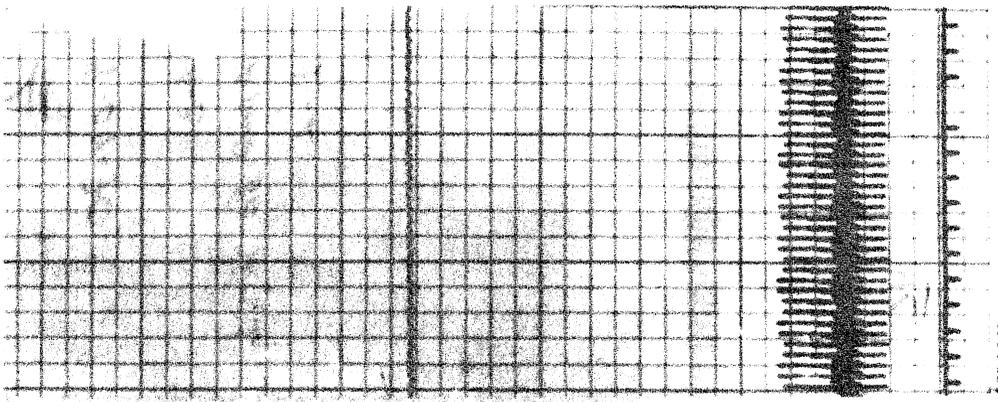
A B

Fig. 16 - O efeito do dinitrofenol (5 mg/kg) sobre a força da contração cardíaca 55 minutos após administração da droga  
 A - Controle B - 55 minutos após e injeção



A

Registro da contração



B

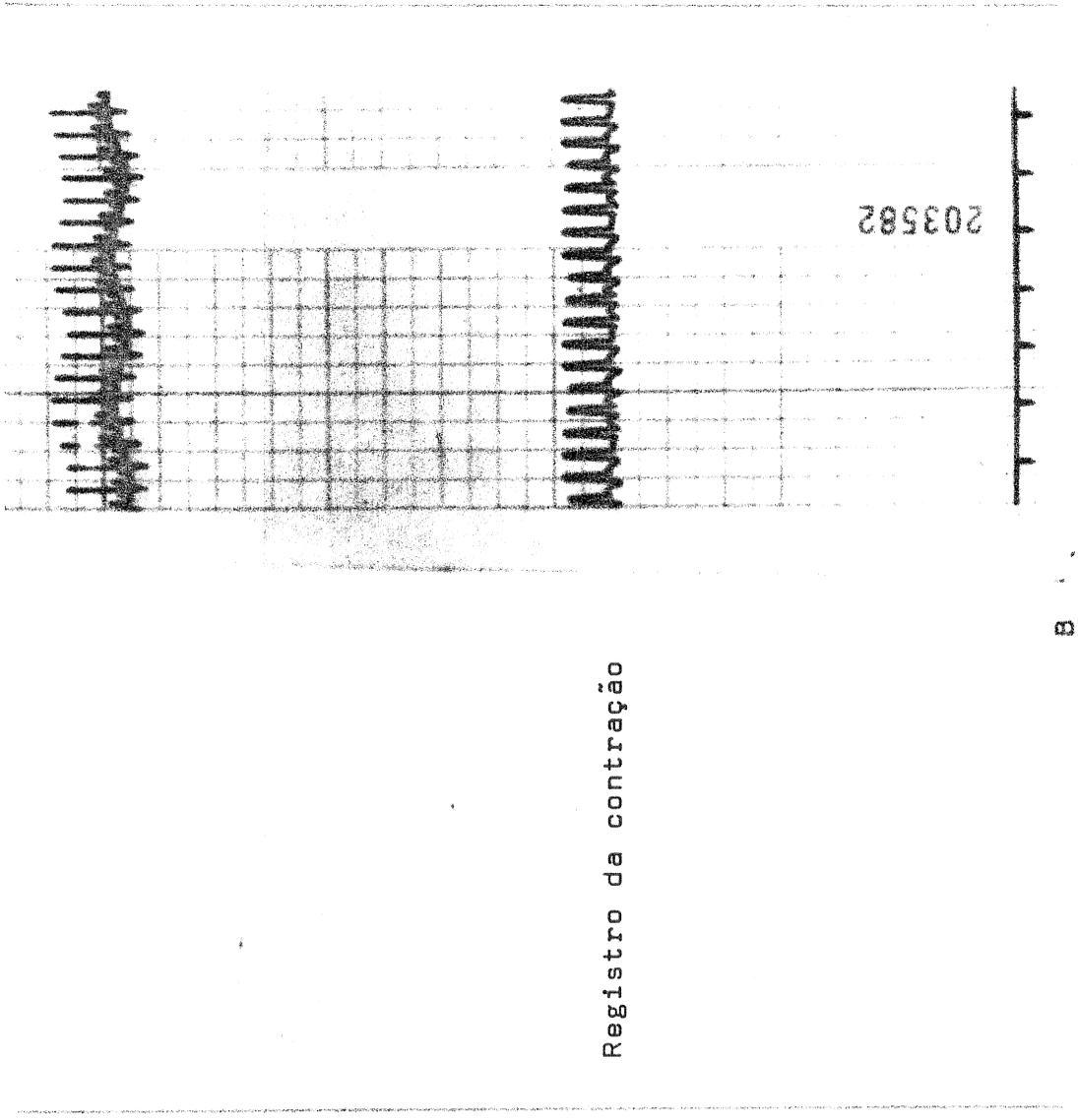
Fig. 17 - O efeito de isoproterenol (10 ug/kg) sobre a força de contração cardíaca "in vivo"

A - Controle

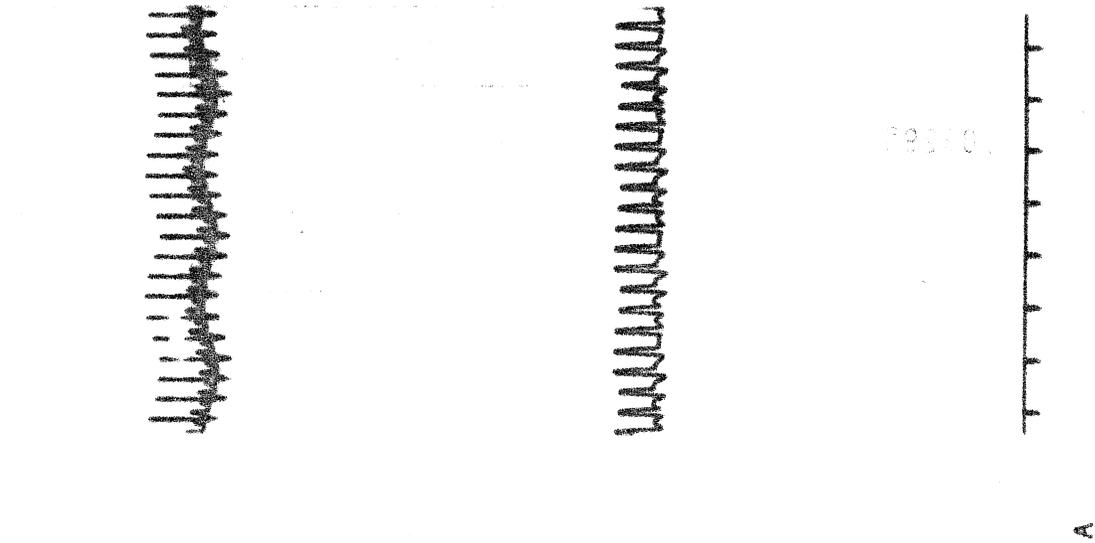
B - Após a administração de droga



I 0/429



A



B

Fig. 19 - O efeito de dinitrofenol (2,5 mg/kg) sobre a força de contração cardíaca em cães previamente tratados com Inderal (1,5 mg/kg).

A - Controle

B - Após a administração da droga

Tabela 4 - Aumentos percentuais da amplitude e da frequência da força da contração cardíaca observados em cães tratados com diferentes drogas.

D R O G A		AUMENTO PERCENTUAL	
NOME	DOSE POR KG DE PESO	AMPLITUDE DA CONTRAÇÃO	FREQUÊNCIA
Dinitrofenol	2,5 mg	33	-
Dinitrofenol	5 mg	100	15
Isoproterenol	10 µg	156	25,4
Adrenalina	2 µg	90	40,0
Dinitrofenol*	3,5 mg	-	-

\* (Cães tratados previamente com Inderal em dose de 1,5 mg/kg de peso do animal.

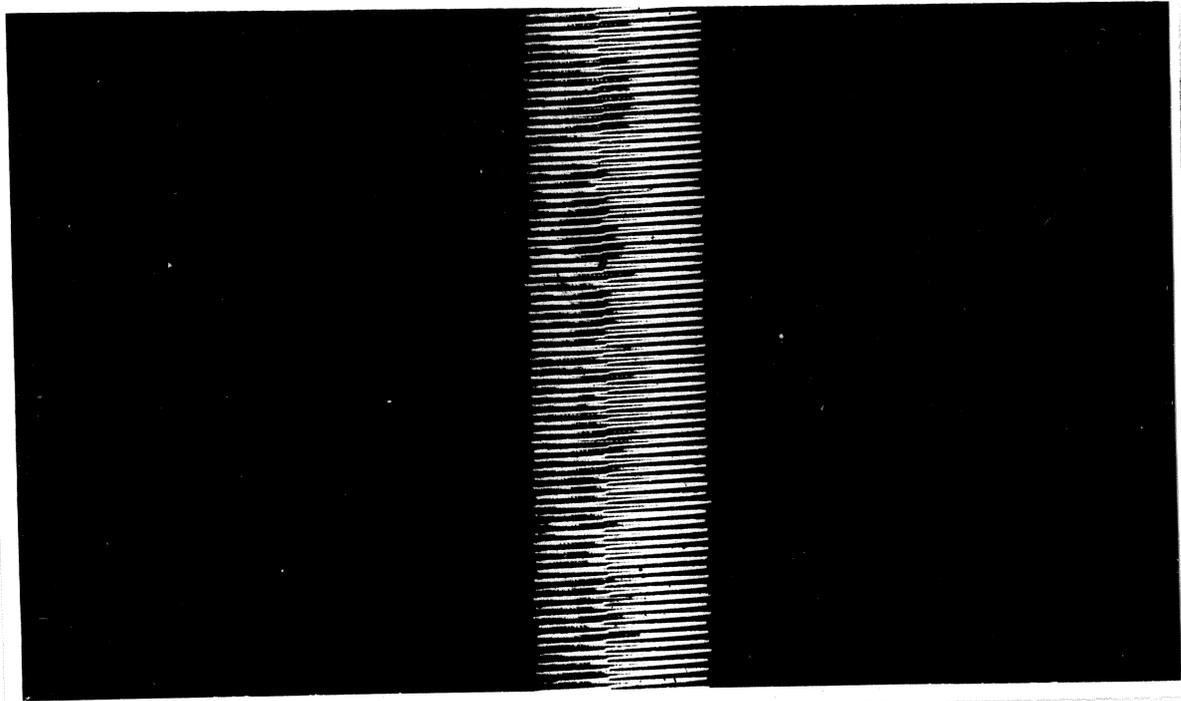
### III.4 - MEDIDAS DA FORÇA DA CONTRAÇÃO CARDÍACA "IN VITRO"

O efeito do dinitrofenol mostrou-se correlacionado às catecolaminas. O aumento da amplitude da força da contração muscular induzido por efeito do dinitrofenol concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M aplicado em preparações isoladas de aurícula de coelho conseguiu ser de 10 % (Fig. 20).

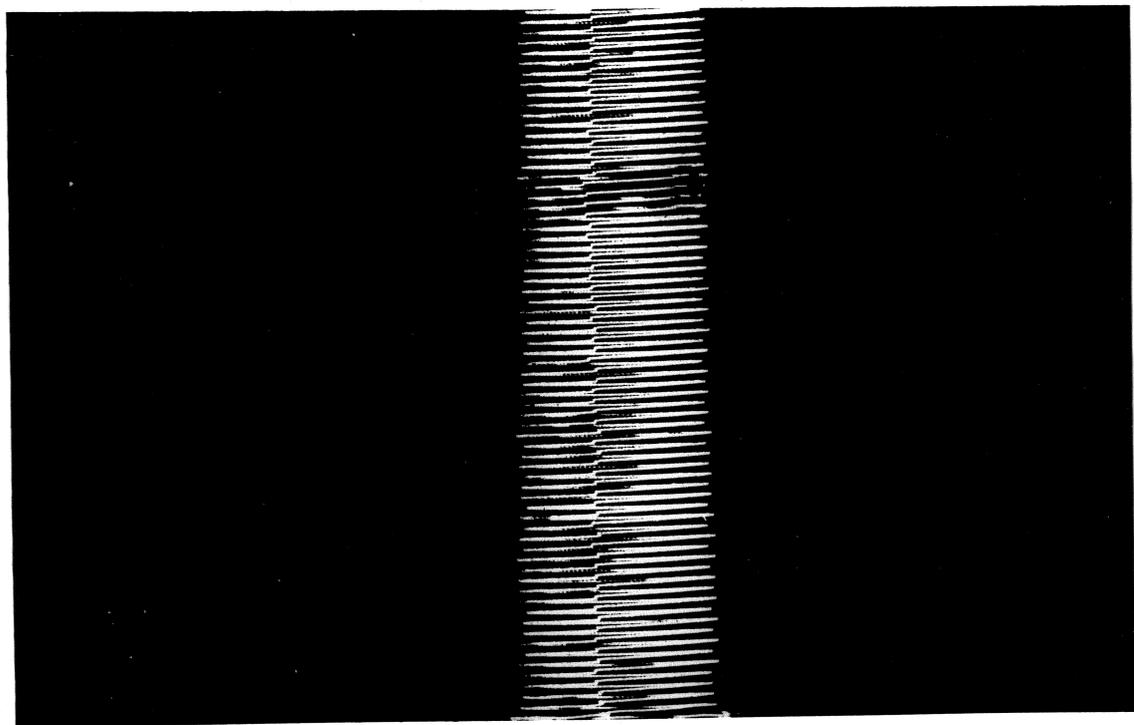
A ação produzida pela adição simultânea do dinitrofenol e da adrenalina - foi muito maior do que a constatada quando qualquer uma dessas duas substâncias foi aplicada isoladamente. Além disso, foi maior do que o esperado como resultado de um efeito somatório dessas substâncias.

A adrenalina utilizada em concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M introduziu um aumento médio de 177 % na amplitude da força da contração da aurícula, enquanto aumentou a frequência, em média, de 100 %.

A ação simultânea da adrenalina e do dinitrofenol, ambos em concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M, registrou um aumento na amplitude, em média, de 240 %. Contudo, a frequência não se mostrou afetada pelo dinitrofenol, apresentando, assim, o mesmo aumento encontrado quando a aurícula era submetida à ação exclusiva da adrenalina. Tais resultados são evidenciados na Fig. 21.



A



B

Fig. 20 - O efeito de dinitrofenol ( $1 \times 10^{-5} M$ ) sobre a força de contração cardíaca em preparação isolada de aurícula de coelho.

A - Controle

B - Após a aplicação da droga

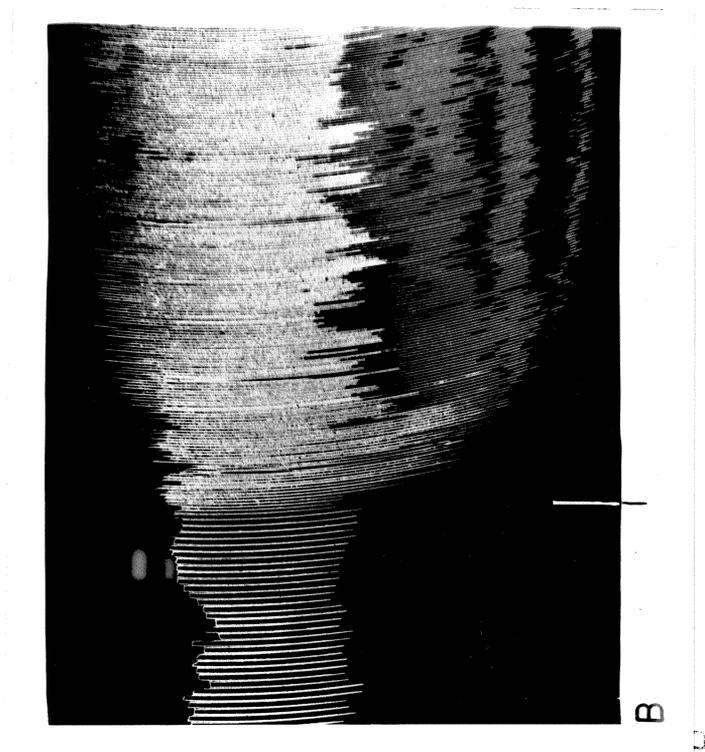


FIG. 21 - Ação de adrenalina e do dinitrofenol sobre a força de contração muscular de aurícula isolada do coelho.

A - adrenalina ( $1 \times 10^{-6} M$ )      B - adrenalina ( $1 \times 10^{-6} M$ ) + 2,4 Dinitrofenol ( $1 \times 10^{-5} M$ )

### III.5 - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA

Nos estudos espectrofotométricos, utilizou-se o plasma desproteínado, limpo, de ratos tratados e não tratados com dinitrofenol, que foi dividido em duas partes. Uma delas, não foi submetida a qualquer tratamento, enquanto a outra - foi tratada com óxido de alumínio, a fim de que, esta substância, através da adsorção, deixasse o plasma isento de catecolaminas.

Portanto, o estudo espectrofotométrico pôde ser feito com quatro tipos de plasma:

- A - plasma de ratos normais sem adsorção (N - 1)
- B - plasma de ratos normais com adsorção (N - 2)
- C - plasma de ratos tratados sem adsorção (T - 1)
- D - plasma de ratos tratados com adsorção (T - 2)

A diluição do plasma em água bidestilada com EDTA (1:10 v/v) mostrou-se - mais adequada para esse tipo de experimentos.

Calibrou-se o espectrofotômetro (Beckman Acta V) com água bidestilada, usando-se cubetas de quartzo, as quais foram utilizadas durante toda a experiência. Utilizando-se a água bidestilada como "branco", registrou-se a curva da absorção espectrofotométrica de uma solução do dinitrofenol ( $1 \times 10^{-5}$  M) e de uma solução de adrenalina  $5 \times 10^{-4}$  M, constatando-se a absorção máxima do dinitrofenol em 360 m $\mu$  (Fig. 22) e a da adrenalina em 275 m $\mu$  (Fig. 22).

Na análise do plasma, a fração N-2 foi sempre utilizada como "branco".

A curva da absorção óptica do plasma de ratos normais, sem adsorção (fração N - 1) se caracterizou pela absorção máxima encontrada em 275 m $\mu$  (Fig. 23) ou seja, o mesmo apresentado pela adrenalina, e representado na Fig. 22.

Na mesma Fig. 23, encontra-se a curva 2 da absorção espectrofotométrica do plasma de ratos tratados com dinitrofenol 2,5 mg/100g de peso, sem adsorção (fração T - 1), na qual também se observa a absorção máxima de 275 m $\mu$ . Ainda na mesma Fig. 23 foi registrada a absorção do plasma de ratos tratados com dinitrofenol na mesma dose, com adsorção (fração T-2). Nota-se, nela, o aparecimento da absorção máxima de 360 m $\mu$ , constatando-se assim, a presença do dinitrofenol nessa fração.

A curva 4 da mesma Fig. 23 representa a absorção óptica de uma mistura de plasma de ratos normais, sem adsorção, com plasma de ratos tratados com adsorção na proporção de 1/1. Nessa curva pode-se observar o desaparecimento do pico

característico do dinitrofenol, registrando-se somente o pico da adrenalina - (275  $\mu$ ). Nota-se também a semelhança entre esse registro e o obtido com plasma de animais tratados, sem adsorção, apresentado na mesma figura.

Uma experiência semelhante à mencionada acima, foi realizada diminuindo -se a concentração do plasma de ratos normais (fração N-1) para a proporção de um volume de plasma desses ratos para 2,5 v de plasma de ratos tratados, com adsorção, visando verificar o efeito que a adrenalina exerce sobre a atividade óptica do dinitrofenol. Assim, na Fig 24. encontra-se o registro da absorção - óptica da fração N-1 (curva 1), da fração T-1 (curva 2), da fração T - 2 (curva 3), da mistura do plasma de ratos tratados com adsorção, em diluição final de 1/10 e de plasma de ratos normais, sem adsorção (diluição final de 1/25), a qual se encontra-se na curva 4 do mesmo gráfico.

Um estudo semelhante foi realizado com soluções preparadas de dinitrofenol e de adrenalina. Nesse estudo foi registrada a curva de absorção de uma solução de dinitrofenol ( $1 \times 10^{-5}$  M), a qual acusou a sua absorção máxima em 360  $\mu$ . Esse registro encontra-se na curva 1 da Fig. 25.

A curva 2 dessa figura é a obtida com uma solução de adrenalina de  $1 \times 10^{-4}$  M, constatando-se a sua absorção máxima em 275  $\mu$ .

Na mesma Fig. 25, encontram-se as curvas 3,4 e 5 representando a absorção espectrofotométrica de três soluções de adrenalina de  $1 \times 10^{-4}$  M,  $2 \times 10^{-4}$  M e  $4 \times 10^{-4}$  M, sempre na presença de dinitrofenol em concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M, Nessas curvas, observa-se o desaparecimento da curva da absorção característica do dinitrofenol, quando a adrenalina está presente.

Em toda essa experiência a água bidestilada foi utilizada como "branco".

Finalmente, registrou-se a curva da absorção óptica de uma mistura de dinitrofenol em concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M e da adrenalina em concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M, contra uma solução de adrenalina  $1 \times 10^{-4}$  M como "branco". Nesse registro (Fig. 26), nota-se a ausência total de qualquer atividade óptica que possa ser atribuída ao dinitrofenol.

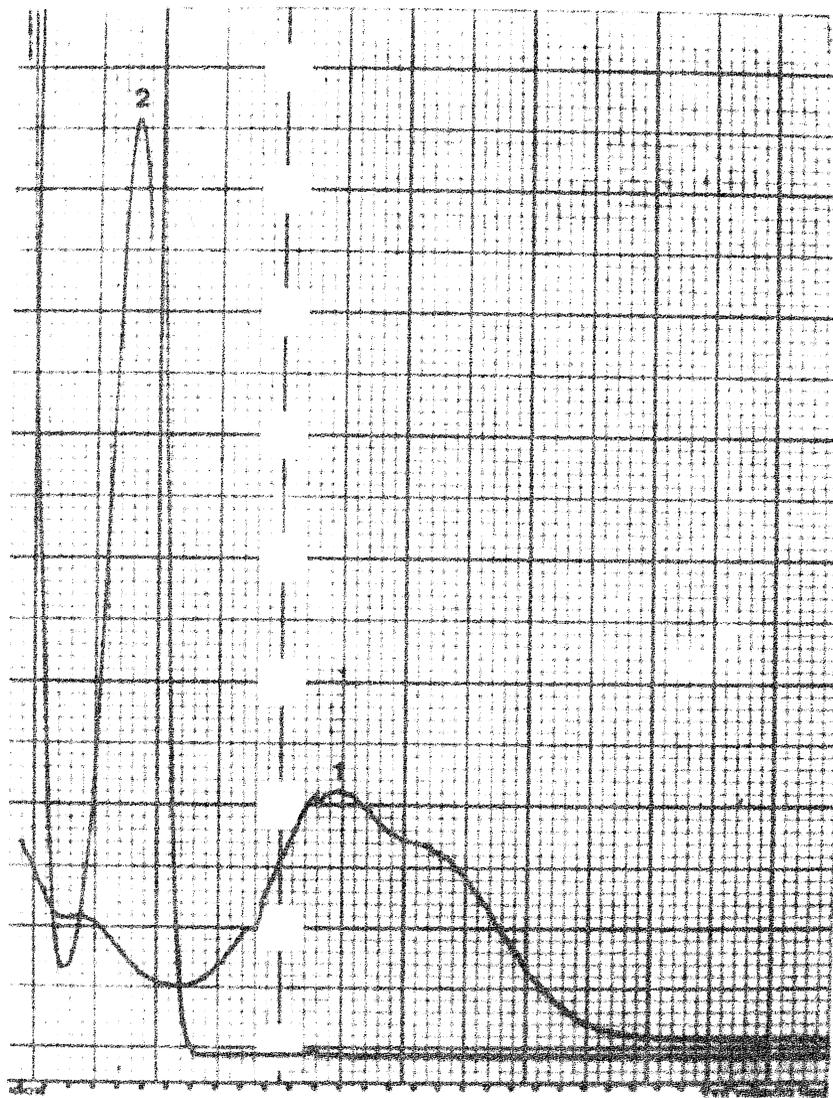


Fig. 22 - As curvas da absorção espectrofotométrica do dinitrofenol (1) e da adrenalina (2)

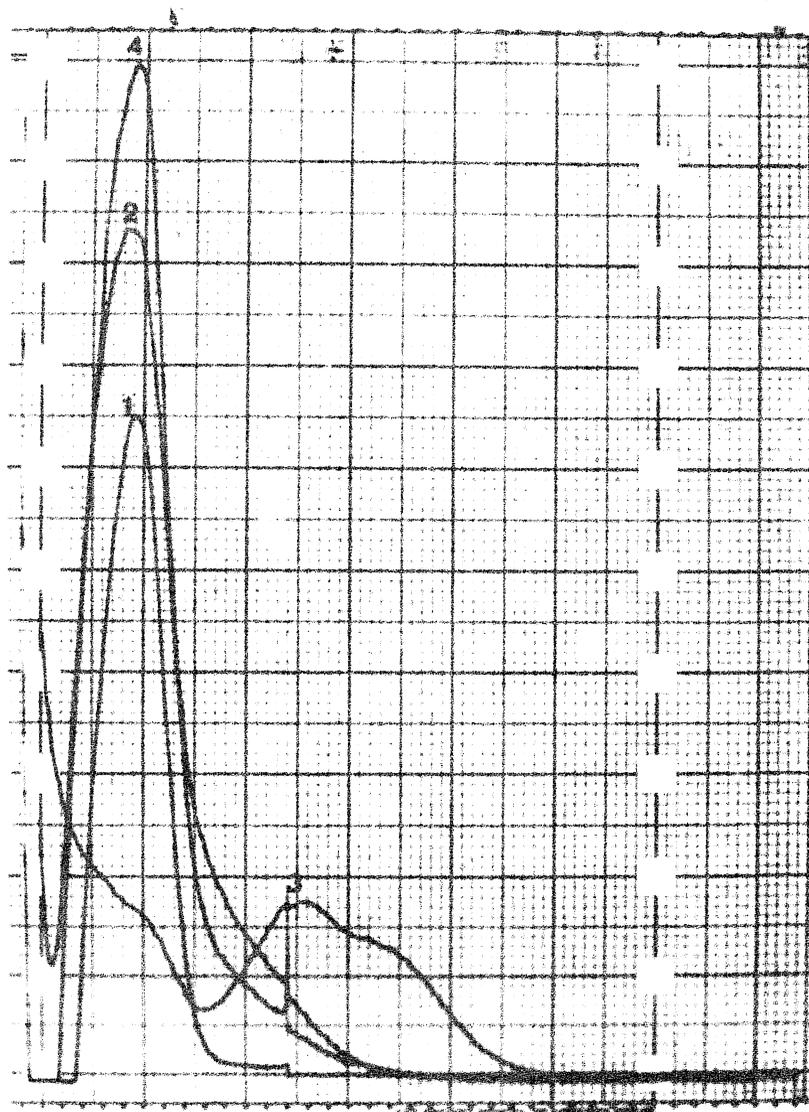


Fig. 23 - Análise espectrofotométrica de plasma de ratos tratados e não tratados com dinitrofenol. 1 - não tratados sem adsorção; 2 - tratados sem adsorção; 3 - tratados com adsorção; 4 - plasma de ratos tratados com adsorção mais plasma de ratos normais se adsorção (1/1).

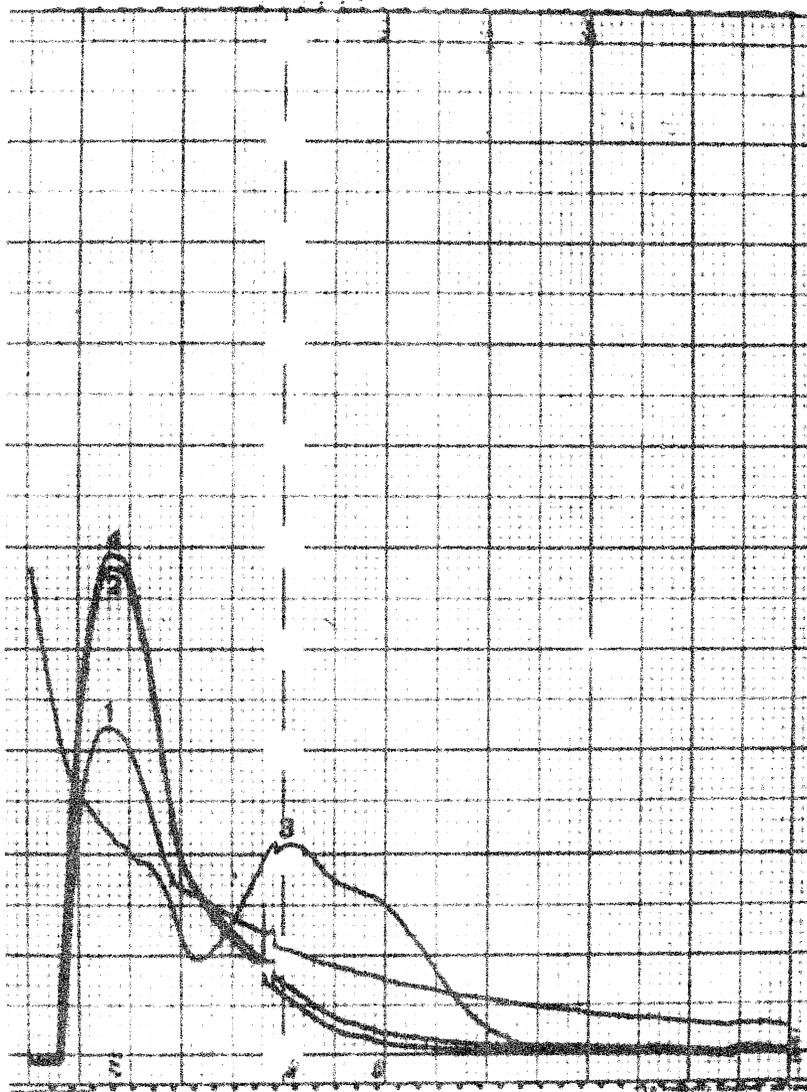


Fig. 24 - Análise espectrofotométrica de plasma de ratos tratados e não tratados com dinitrofenol (2,5 mg/100g). 1 - não tratados sem adsorção; 2 - tratados sem adsorção; 3 - tratados com adsorção; 4 - plasma de ratos tratados com adsorção mais plasma de ratos normais sem adsorção (proporção de 2,5/1).

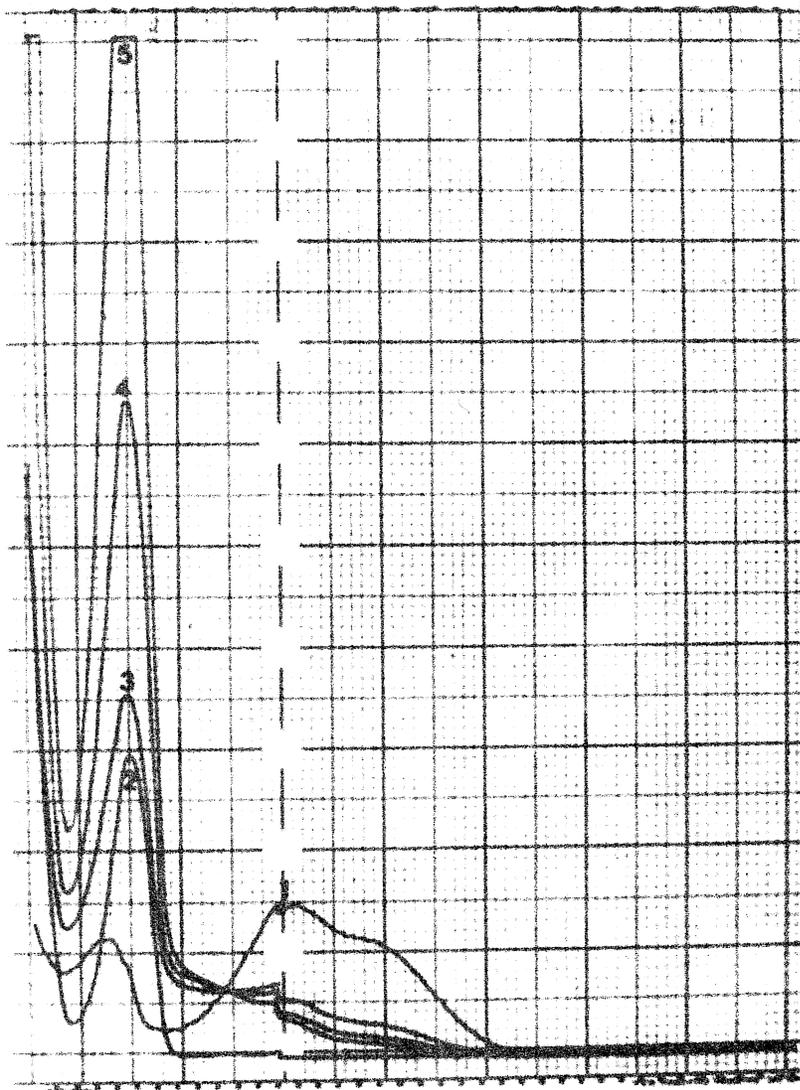


Fig. 25 - Análise espectrofotométrica de várias soluções de adrenalina e de dinitrofenol. 1 - dinitrofenol ( $1 \times 10^{-5} M$ ); 2 - adrenalina  $1 \times 10^{-4} M$ ; 3 - dinitrofenol  $1 \times 10^{-5} M$  mais adrenalina  $1 \times 10^{-4} M$ ; 4 - dinitrofenol  $1 \times 10^{-5} M$  mais adrenalina  $2 \times 10^{-4} M$ ; 5 - dinitrofenol  $1 \times 10^{-5} M$  mais adrenalina  $4 \times 10^{-4} M$ .

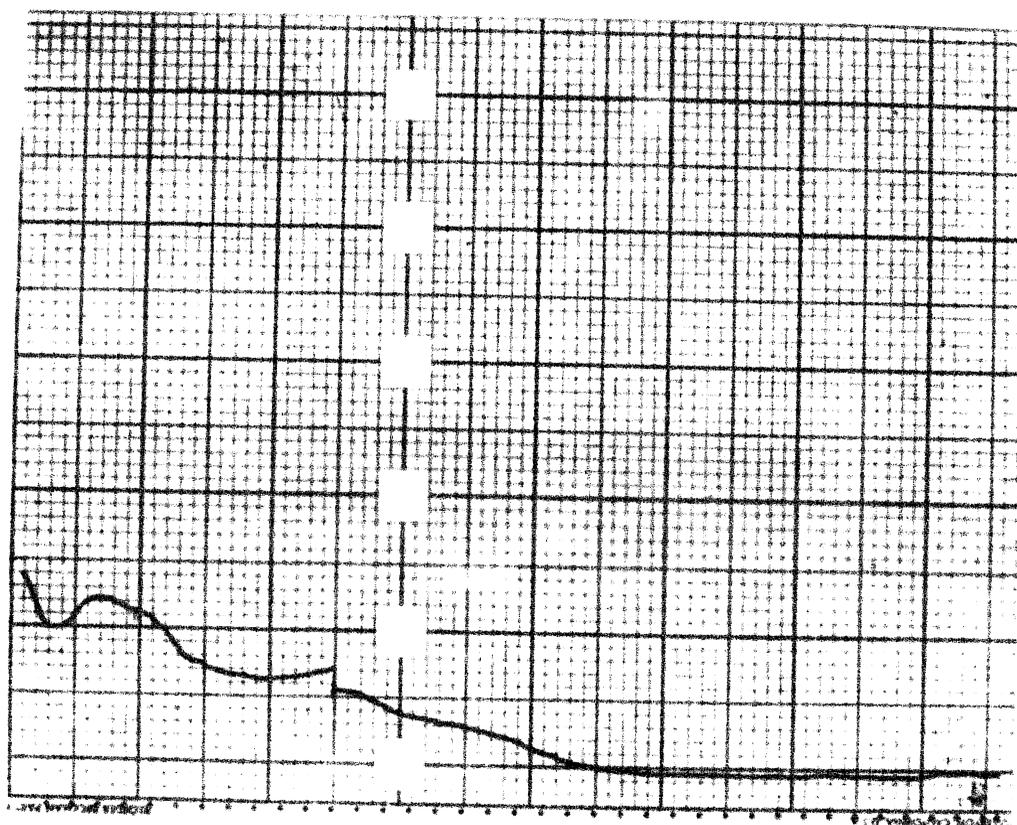


Fig. 26 - Absorção espectrofotométrica do dinitrofenol ( $1 \times 10^{-5} M$ ) na presença da adrenalina ( $1 \times 10^{-4} M$ ) usando-se como "branco" uma solução de adrenalina ( $1 \times 10^{-4} M$ ).

#### IV - DISCUSSÃO

O aumento de conteúdo da fosforilase a, seja em músculos esqueléticos (FOCESI JR et al., 1.969), seja em músculo cardíaco (VERCESI et al., (1.970) de ratos tratados com dinitrofenol em dose de 2,5 mg/100g de peso do animal, era explicado, até o presente, com base nos trabalhos de NAMB et al., (1.968) e de DRUMMOND et al., (1.969). Em outras palavras, tal aumento seria consequência da série de reações iniciadas pela ativação da ciclase de adenila sob o efeito da adrenalina. Com isso, o AMP cíclico formado, ativaria a quinase protéica dependente de AMP cíclico, a qual age na transformação da quinase inativa da fosforilase b em sua forma ativa que, por sua vez, cataliza a formação da fosforilase a a partir da fosforilase b, acelerando, assim, a degradação do glicogênio.

Entretanto, algumas evidências favoreciam a sugestão de que a ativação da formação da fosforilase a poderia ser induzida através de um outro mecanismo. De fato, DANFORTH et al. (1962 cf. STULL e MAYER, 1.971) relataram que a ativação máxima da formação da fosforilase a foi atingida em 3 segundos, em músculos esqueléticos submetidos a estímulo elétrico tetânico.

Com base nessa informação, e sabendo que a aceleração da formação da fosforilase a, quando induzida pela adrenalina, exige relativamente muito mais tempo para atingir o seu valor máximo, era permissível supor, portanto, que a ativação da fosforilase a não deveria depender, exclusivamente, dos níveis de AMP cíclico ou da quinase da fosforilase b. Aliás, essa sugestão encontrava um forte apoio no trabalho de POSNER et al. (1.965), no qual relataram que o aumento rápido da atividade da fosforilase a e a formação estimulada da forma ativa da quinase da fosforilase b, encontrados nos músculos esqueléticos de ratos, de sapos submetidos a estímulo elétrico, não foram acompanhados de qualquer alteração do conteúdo de AMP cíclico. Com esse trabalho, pode-se, pois, excluir a hipótese de que o aumento do conteúdo de AMP cíclico é indispensável para que a formação da fosforilase a seja aumentada.

Uma informação adicional no mesmo âmbito foi fornecida por DRUMMOND et al. (1.969), que relataram poder a conversão da fosforilase b em a ser ativada em condições nas quais os níveis de AMP cíclico e da forma ativa da quinase da fosforilase b permaneciam inalterados. Tais resultados foram observados durante a contração muscular induzida por estímulo elétrico, aplicado ao músculo sartório de sapo, diafragma de ratos, e, "in vivo", no músculo gastrocnêmico de ratos.

O trabalho de DRUMMOND et al. (1.969), portanto, além de estabelecer o envolvimento de outro mecanismo na ativação da transformação da fosforilase b em a, no qual o AMP cíclico e a quinase não participam, sugeriu que esse mecanismo

era a contração muscular. O aumento de conteúdo da fosforilase a induzido pela contração muscular foi sugerido por CORI e ILLINGWORTH (1.956) ao observar que o processo da glicogenólise durante a contração muscular é muito mais ativo do que aquele observado quando se submete o músculo à ação da adrenalina (100-1000 vezes mais ativado). Consideraram, por isso, que durante a contração deveria ser indispensável um aumento do conteúdo de fosforilase a no músculo.

Diante do exposto, poder-se-ia portanto, propor duas hipóteses para explicar o efeito glicogenolítico do dinitrofenol:

- 1ª - O dinitrofenol liberaria a adrenalina e, com isso, aceleraria o desencadeamento de uma série de reações iniciadas pela ativação da ciclase de adenila e aumentaria o conteúdo muscular de AMP e da forma ativa da quinase da fosforilase b.
- 2ª - O dinitrofenol realizaria a sua ação glicogenolítica empregando o processo da contração muscular para aumentar a fosforilase a.

Ao por a prova essas duas hipóteses, verificou o autor que a primeira tinha que ser afastada. De fato, a análise das experiências sumariadas nas Figs. 11 e 12 e na tabela 3, mostram, claramente, que, tanto os níveis sanguíneos de adrenalina, quanto os de noradrenalina não foram significativamente alterados nos ratos tratados com dinitrofenol. Do mesmo modo os resultados obtidos no conduto de ferente de ratos submetido à ação do dinitrofenol na concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M (Fig. 13) evidenciaram que essa substância não mostrou qualquer efeito sobre as reservas adrenérgicas desse órgão.

Portanto, se é verdade que o dinitrofenol não age através da liberação de catecolaminas, passava a ser premente por à prova a segunda hipótese, ou seja, a de que essa substância demonstraria a sua ação glicogenolítica através do aumento da formação da fosforilase a, provocado pela contração muscular induzido por ela.

Visto que VERCESI et al., (1.970) haviam relatado que o músculo cardíaco de ratos apresentava um aumento de 56 % no seu conteúdo de fosforilase a, após a administração do dinitrofenol em doses de 2,5 mg/100g de peso do animal, a segunda hipótese passaria a ser aceita como verdadeira se ficasse demonstrado que o dinitrofenol aumentava a força da contração do músculo cardíaco. E, de acordo com os experimentos do autor, foi isso o que ocorreu

Assim, a análise das figs. 14 e 15 permitem concluir que a amplitude da força de contração do músculo cardíaco, sob a ação de 2,5 mg e 5 mg de dinitrofenol por kg de peso do animal, foi aumentada, respectivamente de 33 % e de 93 %, em média, em relação à força da contração antes do emprego dessa substância, além do que, através da fig. 16 se verifica que esse aumento da força da contração cardíaca ainda se manteve durante, praticamente, uma hora, após a aplicação do dinitrofenol.

Aliando os resultados do autor, aos obtidos por FOCESI JR et al., (1.969) e por VERCESI et al., (1.970), deve-se aceitar, portanto, a hipótese de que o dinitrofenol quando injetado in vivo induz um aumento da força de contração muscular e que ele deve agir na glicogenólise através do aumento de formação da fosforilase a provocada pela contração muscular induzida por ele.

Os resultados obtidos por FOCESI JR et al., (1.969) e por VERCESI et al., pareciam discordar dos constatados por CORI E ILLINGWORTH (1.956), já que os últimos autores relataram que o conteúdo de fosforilase a em músculo sartório de sapos não aumentava sob a ação do dinitrofenol. Diante desse aparente paradoxo, e tendo em vista que os primeiros autores administraram o dinitrofenol in vivo, enquanto os últimos aplicaram-no em preparação de músculo isolado, pensou o autor que a manifestação do efeito do dinitrofenol pudesse estar na dependência de alguma outra substância presente in vivo mas não na preparação isolada.

Essa sugestão não foi gratuita, mas estava apoiada em uma observação feita durante a realização da técnica da determinação das catecolaminas no sangue de animais tratados com dinitrofenol. Assim, na fase de extração observamos - que o plasma desproteínizado e centrifugado, apresentava-se transparente. Tratando-o, porém, com óxido de alumínio, para adsorver as catecolaminas, o plasma passava a apresentar a cor amarela, ou seja, a cor de uma solução de dinitrofenol. Em outras palavras, quando o plasma desproteínizado continha as catecolaminas e o dinitrofenol, ele era incolor, mas quando as catecolaminas eram removidas do meio, o dinitrofenol se manifestava através do aparecimento da coloração amarela.

Os resultados obtidos com soluções puras de dinitrofenol e de adrenalina vieram a confirmar o que foi observado no plasma, isto é, o desaparecimento da cor do dinitrofenol na presença da adrenalina.

Com base nessa observação, e levando em conta:

1ª - O trabalho de HARDMAN et al., (1965), que relataram ser a cocaína capaz de potencializar a ação da adrenalina e da noradrenalina no que concerne a força da contração cardíaca;

2ª - A similaridade existente entre os efeitos do dinitrofenol e da adrenalina no que se refere ao aumento da força da contração muscular e da glicogenólise;

A hipótese mais atraente que se oferecia ao autor foi a de que o dinitrofenol só atuaria em presença da adrenalina, e que, eventualmente potencializasse a ação desse hormônio.

Tal hipótese, conciliaria, portanto, os resultados de FOCESI JR et al. - (1.969) e de VERCESI et al. (1.970) com os de CORI E ILLINGWORTH (1.956). Os resultados obtidos ao por à prova essa hipótese foram favoráveis à sua aceitação. Assim, a análise da fig. 19 indica que o dinitrofenol não mostrou qualquer efeito sobre a força da contração cardíaca quando foi administrado a animais previamente tratados com bloqueador beta-adrenérgico (propranolol). Em outras palavras, quando a ação da adrenalina foi bloqueada, o efeito de dinitrofenol, também, foi inibido.

Os resultados obtidos na experiência realizada com preparações isoladas de aurícula de coelho, igualmente, falaram a favor da hipótese proposta. De fato, a análise das figs. 20 e 21 permite verificar que o aumento significativo da força da contração cardíaca, induzido pelo dinitrofenol, só pode ser observado quando essa substância foi adicionada junto com a adrenalina. Na fig. 21 também é possível constatar que o efeito do dinitrofenol e da adrenalina atuando simultaneamente é bem maior do que aquele verificado quando qualquer das duas substâncias é adicionada isoladamente. Ainda na mesma figura, pode-se constatar que o efeito resultante da administração simultânea das duas substâncias não pode ser considerado como somatório, devendo-se admitir a hipótese de que o dinitrofenol potencializa a ação da adrenalina. Em resumo, os resultados resumidos nas figs. 19, 20 e 21, mostram que o dinitrofenol realiza seu efeito através da potencialização da adrenalina, aumentando a contração muscular, e acelerando assim, a glicogenólise.

Ao admitir a última hipótese, encontramos, também, subsídios para explicar os achados de ABOOD et al. (1.961), que relataram ser o dinitrofenol capaz de alterar as concentrações de sódio e de potássio intracelulares. Assim, o dinitrofenol a 0,1 mM aumenta a concentração de sódio intracelular em 30 %. enquan-

to que reduz de 36 % a concentração do potássio intracelular.

A soma dos resultados mencionados, parece permitir, agora, esclarecer melhor a ação do dinitrofenol sobre a força da contração muscular.

Visto que a adrenalina atua na despolarização da membrana, poder-se-ia explicar o aumento na concentração do sódio intracelular induzido pelo dinitrofenol como consequência de seu efeito na potencialização da ação da adrenalina.

Portanto, a ativação da entrada do sódio na célula, que por si só já aumenta o fluxo do sódio que atravessa a membrana, produz o estado de potencial invertido. O potencial de ação desenvolvido durante essa alteração do estado da célula, faz com que se processe uma mobilização súbita do cálcio sob a forma iônica, cálcio esse, que, normalmente, está unido firmemente ao fino retículo que se estende ao longo das miofibrilas. E será esse excesso de íons cálcio que irá iniciar as reações químicas entre os filamentos da actina e da miosina e originar o processo contrátil.

A natureza da associação entre o dinitrofenol e a adrenalina também foi estudada no presente trabalho. O método escolhido para realizar esse estudo, tomou, por base a observação constatada no plasma de ratos tratados com dinitrofenol, ou seja, o desaparecimento da coloração dessa substância na presença da adrenalina. Tal observação, sugeriu, obviamente, a associação entre o dinitrofenol e a adrenalina, constatada funcionalmente, e observada em tubo de ensaio, se faz através da formação de um suposto complexo adrenalina-dinitrofenol.

O fenômeno do aparecimento e desaparecimento de cor pela formação e ruptura de complexos já é exaustivamente conhecido e bastante aproveitado nas técnicas de estudo da Química Analítica.

Assim, por exemplo, o produto de condensação do furfural ou da hidroximetil de furfural com a antrona apresenta cor verde ou verde azulada, inexistente nessas substâncias antes de formar o complexo. Em oposição, a remoção do ácido sulfúrico do seu complexo com a fucsina faz com que se manifeste cor vermelha. Podemos, pois, atribuir o aparecimento da cor amarela do dinitrofenol, após a remoção da adrenalina, a um mecanismo semelhante ao do complexo ácido sulfúrico-fucsina.

Ao testar a veracidade dessa hipótese, os resultados obtidos se mostraram bastante favoráveis à sua aceitação. De fato, a análise da curva 2 na fig. 23 acusa a ausência de qualquer atividade espectrofotométrica que possa ser atribuída ao dinitrofenol no plasma de ratos tratados com essa substância, quando esse plasma não foi tratado com óxido de alumínio para adsorver as catecolaminas.

A curva característica da absorção óptica do dinitrofenol (piCo 360  $\mu$ ), idêntica àquela obtida em uma solução pura de dinitrofenol ( $1 \times 10^{-5}$  M)(Fig. 22), foi obtida com o mesmo plasma, após isentá-lo de seu conteúdo de catecolaminas. Ainda na fig. 23, nota-se que a curva da absorção óptica, característica do dinitrofenol, constatada no plasma de ratos tratados, isento das catecolaminas, voltou a desaparecer quando esse plasma foi misturado na proporção de 1/1 com plasma de ratos normais sem adsorção. Em outras palavras, observa-se que a adição do plasma contendo catecolaminas fez desaparecer a curva da atividade óptica do dinitrofenol.

Os experimentos realizados com soluções preparadas de adrenalina e de dinitrofenol vieram a confirmar os que foram obtidos com plasma de ratos (Fig. 25). Também na fig. 26, pode-se observar a ausência quase total de qualquer atividade óptica, quando uma mistura de dinitrofenol ( $1 \times 10^{-5}$  M) e de adrenalina ( $1 \times 10^{-4}$  M) foi analisada contra uma solução de adrenalina ( $1 \times 10^{-4}$  M).

Pode-se, pois, estabelecer como conclusivo que o desaparecimento da atividade óptica do dinitrofenol se deve à presença da adrenalina, a qual reaparece quando essa catecolamina é removida do meio, o que favorece a hipótese de que a potencialização da ação da adrenalina deveria ocorrer através da formação de um complexo adrenalina-dinitrofenol, o qual teria maior atividade do que a adrenalina na despolarização da membrana.

Analisando as figs. 23, 24 e 25 observa-se que a atividade óptica da adrenalina, embora ligeiramente aumentada, não foi praticamente alterada na presença do dinitrofenol.

Esse resultado, porém, não invalida as conclusões firmadas anteriormente, pois sabemos que uma alteração estrutural não conduz necessariamente a uma alteração na atividade óptica. Assim, se imaginarmos que a condensação da adrenalina com o dinitrofenol ocorre de maneira a não afetar os radicais opticamente ativos da estrutura da adrenalina, mas anulando totalmente a atividade óptica do dinitrofenol, os achados das Figs. 23, 24 e 25, ficam satisfatoriamente explicadas.

O efeito da formação do complexo sobre a atividade do dinitrofenol poderia ser discutido com base no trabalho de HEYMANS (1.934) que relatou estar o efeito do dinitrofenol associado à presença de um dos radicais  $\text{NO}_2$  na posição quatro do anel fenólico (considerando a hidroxila na posição 1) e que a esterificação do grupo OH nos dinitrofenóis estimularia a sua ação. Os resultados obtidos por HEYMANS (1.934) forneceu, pois, uma base para supor que a ocupação do grupo OH do dinitrofenol poderia estimular o seu efeito.

Acreditamos, pois, ter chegado a momento de encerrar o presente capítulo - harmonizando as contribuições aqui apresentadas, formulando de modo sucinto a teoria sobre o mecanismo de ação do dinitrofenol.

Nessa teoria, explica-se o efeito do dinitrofenol sobre a força da contração muscular como consequência da formação do complexo adrenalina-dinitrofenol, que aumentaria a despolarização da membrana, aumentando, assim, a entrada do só dio na célula e desencadeando o processo da contração, e durante tal processo, a glicogenólise ficaria acelerada. Aliás, não só esse último processo, mas também a própria despolarização da membrana poderiam ter efeito glicogenolítico, já que, de acordo com OZAWA et al. (1.967) a simples excitação da superfície da membrana é capaz de, por si só, induzir a glicogenólise.

V - CONCLUSÕES

Do exposto nas páginas precedentes podem-se extrair as seguintes conclusões finais:

- 1 - O dinitrofenol não exerce efeito liberador sobre as reservas adrenérgicas, seja quando administrado in vivo, seja quando aplicado a preparações isoladas, isto é, in vitro.
- 2 - O dinitrofenol, quando administrado in vivo, em doses fisiológicas, induz um aumento na força da contração cardíaca. Esse aumento se mantém durante uma hora após a aplicação da droga. O aumento significativo da frequência só se dá com doses relativamente altas.
- 3 - O aumento da força da contração cardíaca, induzido pelo dinitrofenol, só pôde ser demonstrado in vitro, na presença da adrenalina. Na ausência dessa catecolamina, o efeito do dinitrofenol in vitro sobre a contração do músculo cardíaco não teve qualquer significação.
- 4 - Os resultados obtidos no concernente à resposta do músculo cardíaco à adrenalina em presença do dinitrofenol, reforçaram a hipótese do autor, de que essa substância exerce efeito potencializador sobre a ação da adrenalina.
- 5 - O dinitrofenol não provoca a manifestação de seus efeitos, no que se refere à força da contração cardíaca, quando a ação da adrenalina é inibida.
- 6 - A associação entre a adrenalina e o mecanismo de ação do dinitrofenol constatada in vivo e in vitro, se faz através da formação de um complexo adrenalina - dinitrofenol. Tal complexo é responsável pela intensificação do efeito dessas substâncias quando elas atuam simultaneamente.

Além dessas conclusões, o autor propõe uma teoria capaz de explicar o efeito glicogenolítico do dinitrofenol. Segundo essa teoria, o complexo adrenalina-dinitrofenol teria efeito despolarizador da membrana, superior ao da adrenali-

na e, através dele, ativaria a entrada de sódio na célula, desencadeando, assim, o processo da contração muscular, o qual, por sua vez, aceleraria a glicogenólise.

VI - RESUMO

Como finalidade primordial, visou-se, no presente trabalho, ao esclarecimento do mecanismo de ação do dinitrofenol na glicogenólise.

A hipótese de que tal ação se realizaria através da liberação das catecolaminas foi afastada, visto que os níveis de tais substâncias no sangue de ratos tratados com dinitrofenol mostraram-se inalterados. Tais resultados foram apoiados pelos obtidos na experiência feita com preparações isoladas do conduto deferente de ratos.

A força da contração do músculo cardíaco sob a ação do dinitrofenol mostrou-se aumentada quando essa substância foi administrada in vivo. Só se pôde observar tal aumento in vitro, em presença da adrenalina. Além disso, o efeito conjunto dessas duas substâncias só pôde ser explicado como decorrente da potencialização da ação da adrenalina pelo dinitrofenol, já que esse efeito muito aumentado não pode ser explicado como resultante de simples somação das duas substâncias, tomadas isoladamente.

Os resultados verificados após a administração do dinitrofenol à animais previamente tratados com propranolol, evidenciaram a associação entre o dinitrofenol e a adrenalina.

O estudo espectrofotométrico do plasma de ratos tratados e não tratados com dinitrofenol, mostrou que a associação verificada nas experiências anteriores se faz através da formação de um complexo adrenalina - dinitrofenol. Tal complexo tem maior atividade do que a adrenalina sobre a força da contração muscular.

O ajustamento dessas conclusões ao conjunto de dados extraídos da literatura específica levaram o autor, não só a esclarecer os resultados, aparentemente discrepantes, de diferentes autores, mas também, a formular uma teoria capaz de explicar o efeito glicogenolítico do dinitrofenol.

Segundo essa teoria, a formação de um complexo adrenalina - dinitrofenol, teria maior atividade do que a adrenalina na despolarização da membrana, e a ativação da entrada do sódio na célula, induzida por essa despolarização, desencadearia o processo da contração, que, por sua vez, aceleraria a glicogenólise.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOOD, L.G; KOKETSU, K. and NODA, K. Effect of dinitrophenol on phosphorylation and bioelectric phenomena of excitable tissues. *Am. J. Physiol.*, 200: 431-436, 1961.
- ANTON, A. H. and SAYRE, D. F. "A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines" *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 138: 360-375, 1962.
- BARKAN, H.; BORLEY, W. E.; FINE, M. and BETTMAN, J. Operative results in cataracts coincident with dinitrophenol therapy. *Calif. West. Med.*, 44 (5): 360-364, 1936.
- BARNES, J. M. and DUFF, J.I. The action of 2:4 dinitrophenol (DNP) on mammalian striated muscle. *J. Physiol.*, 124: 37P, 1954.
- BARNES, J.M.; DUFF, J.I. and THRELFALL, C.J. The behaviour of mammalian striated muscle in the presence of 2:4-Dinitrophenol. *J. Physiol.*, 130: 585-600, 1955.
- BEANI, L.; BIANCHI, C. and LEDDA, F. The effect of 2,4-Dinitrophenol on neuro-muscular transmission. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 27: 299-312, 1966.
- BOARDMAN, W.W. Rapidly developing cataract after dinitrophenol. *J.A.M.A.*, 105: 108, 1935.
- BOHN, S. E. Agranulocytic angina following ingestion of dinitrophenol. *J.A.M.A.*, 103: 249-251, 1934.
- BORLEY, W.E. and TAINTER, M.L. Effects of Dinitrophenol on the permeability of the capsule of the lens. *Arch. Ophth.*, 18: 908-911, 1937.

- BORNS, G.V.R. and BULBRING, E. The effect of 2:4-dinitrophenol (DNP) on the smooth muscle of the guinea-pig's taenia coli. J. physiol., 127: 626-635, 1955.
- CORI, G.T. and ILLINGWORTH, B. The effect of epinephrine and other glycogenolytic agents on the phosphorylase a content of muscle. Biochem. Biophys. Acta., 21: 105-110, 1956.
- CUTTING, W.C.; MEHRTENS, H.G. and TAINTER, M.L. Actions and uses of dinitrophenol. J.A.M.A., 101 (3): 193-195, 1933.
- CUTTING, W.C.; KYTAND, D.A. and TAINTER, M.L. Relationship between blood cholesterol and increased metabolism from dinitrophenol and thyroid. J. Clin. Invest., 13: 547-552, 1934.
- CUTTING, W.C. and TAINTER, M.L. Actions of Dinitrophenol, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 29: 1268-1269, 1932.
- CUTTING, W.C. and TAINTER, M.L. Metabolic actions of dinitrophenol. J.A.M.A., 101 (27): 2099-2102, 1933.
- CROSS, R.J.; TAGGART, J.V.; COVO, G.A. and GREEN, D.E. "Studies on the cyclophorase system" J. Biol. Chem., 177: 655-678, 1949.
- DINTENFASS, H. An ear complication from dinitrophenol medication. J.A.M.A., 102: 838-841, 1934.
- DRUMMOND, G.I.; HARWOOD, J.P. and POWELL, C.A. Studies on the activation - of phosphorylase in skeletal muscle by contraction and by epinephrine. J. Biol. Chem., 244: (15): 4235-4240, 1969.
- EMGE, L.A.; WULFF, L.M.R. and TAINTER, M.L. Effects of Dinitrophenol on an experimental sarcoma of the white rat. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 31: 152-154, 1933.

- FOCESI JR, A.; TAHIN, Q.S.; EL-GUINDY, M.M.; and VERCESI, A.E. Effect of 2,4-dinitrophenol on the phosphorylases system of the skeletal muscle in vivo. *Experientia*, 25: 1243-1245, 1969.
- FRUMESS, G.M. Allergic reaction to dinitrophenol, *J.A.M.A.*, 102: 1219-1220, 1934.
- HARDMAN, J.G.; MAYER, S.E.; and CLARK, B. Cocaine potentiation of the cardiac inotropic and phosphorylase responses to catecholamines as related to the uptake of  $H^{-3}$ -Catecholamines. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 150: 341-348, 1965.
- HEYMANS, C. The influence of some new nitroderivatives on the cellular metabolism and on the body temperature. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 51: 144-145, 1934.
- HORNER, W. D.; JONES, R.B. and BOARDMAN, W.W. Cataracts following the use of dinitrophenol. *J.A.M.A.*, 105: 108-110, 1935.
- JUNQUEIRA, L.C.U. and BEIGUELMAN, B. Studies on the IN VITRO action of compound 48-80, a formaldehyde condensation product, on rat mast-cells. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 13 (1): 69-75, 1955.
- KRAATZ, H.G. and TRAUTWEIN, W. Die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die neuromuskuläre Erregungsübertragung. *Arch. Exper. Path. U. Pharmacol.*, 231: 419-439, 1957.
- LARAIA, P.J. and REDDY, W.J. Hormonal regulation of myocardial adenosine 3:5'-monophosphate. *Biochem. Biophys. Acta.* 177: 189-195, 1969.
- LOOMIS, W.F. and LIPMANN, F. Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. *J. Biol. Chem.*, 173: 807-808, 1948.

- LOONEY, J.M. e HOSKINS, R.G. The effect of dinitrophenol on the metabolism as seen in schizophrenic patientes. *New Engl. J. Med.*, 210: 1206-1213 , 1934.
- MAGNE, H. MAYER, A. e PLANTEFOL, L. Etudes sur l'action du dinitrophenol 1-2-4 (Thermol). *Ann. Physiol. et Physicochim. Biol.*, 8: 167-175, 1932.
- MUNTWYLER, E. Effect of dinitrophenol on the oxygen uptake of rat tissue . *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 31: 621-622, 1934.
- NAMM, D.H., MAYER, S.E. e MALTBIE, M. The role of potassium and calcium ions in the effect of epinephrine on cardiac cyclic adenosine 3:5'-mono-phosphate, phosphorylase kinase, and phosphorylase. *Mol. pharmacol* 4 (5): 522-530, 1968.
- OZAWA, E.; HOSOI, K. and EBASHI, S. Reversible stimulation of muscle phosphorylase b kinase by low concentrations of calcium ions. *J. Biochem.*, 61: 531-533, 1967.
- POSNER, J.B.; STERN, R. and KREBS, E.G. Effects of eletrical stimulation and epinephrine on muscle phosphorylase, phosphorylase b kinase, and adenosine 3', 5'-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 240: 982-985, 1965.
- SCHULTE, T.L. and TAINTER, M.L. Chronic toxicity of dinitrophenol: Renal function. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 31: 1163-1166, 1934.
- SIMÕES, A.A.; FOCESI JR.; A. and GONÇALVES, J.M. Glycogenolytic effect and inhibition of glycogen phosphorolysis by 1, 2, 4-Dinitrophenol in skeletal muscle. *Experientia*, 25: 139-140, 1969.
- STULL, J.T. and MAYER, S.E. Regulation of phosphorylase activation in skeletal muscle in vivo. *J. Biol. Chem.*, 246: 5716-5723, 1971.

- TAINTER, M.L.; STOCKTON, A.B. and CUTTING, W.C.- Use of dinitrophenol in obesity and related conditions. J.A.M.A., 101: 1472-1475, 1932.
- TAINTER, M.L.; BOYES, J.H. and EDS, F. de- Actions of dinitrophenol in diabetic dogs. Arch. int. Pharmacodyn. et Thérap., 45: 235-240, 1933.
- TAINTER, M.L. and CUTTING, W.C.- Miscellaneous actions of dinitrophenol repeated administrations, antidotes, fatal doses, antiseptic tests and actions of some isomers. J. Pharmacol. Exp. Therap., 49: 187-208, 1933.
- TAINTER, M.L.; CUTTING, W.C.; WOOD, D.A. and PROESCHER, F.- Dinitrophenol. Studies of blood, urine and tissues of dogs on continued medication and after acute fatal poisoning. Arch. Path., 18: 881-890, 1934.
- TAINTER, M.L. and BORLEY, W.E.- Influence of vitamins and dinitrophenol on the production of experimental cataract. Arch. Opth., 20: 30-36, 1938.
- VERCESI, A.E.; SANTOS, L.T.; TAHIN, Q.S. e FOCESI JR., A.- Conteúdo de fosforilase a e b no músculo cardíaco de ratos envenenados com 2,4-dinitrofenol. Res. XXII Reun. An. SBPC, P-89, 356, 1970.
- WEEKS, J. and CHENOWETH, M.B.- A stationary manometric respirometer for isolated rat diaphragm allowing simultaneous direct registration of mechanical activity. Observations with sodium azide and dinitrophenol. J. Pharmacol. Exp. Therap., 104: 187-201, 1952.
- WINTER, I.C.; HALE, D. and FARMER, C.J.- Effect of dinitrophenol, sodium citrate, sodium bicarbonate and citric upon distribution of cholesterol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 32: 262-264, 1934.