

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETAR
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
L B

MARIZA BOSCACCI MARQUES

METABOLISMO MICROSSOMAL HEPÁTICO DE DIPIRIDAMOL

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Mariza Boscacci Marques
e aprovada pela Comissão Julgadora.
15/07/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Ciências na
área de Bioquímica

Orientadora:
Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles

UNICAMP
1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M348m
V.	Ex.
TOMBO BC/	38934
PROC.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/10/99
V.º CPD	

CM-00126420-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Marques, Mariza Boscacci
M348m Metabolismo microssomal hepático de dipiridamol/Mariza
 Boscacci Marques. -- Campinas, SP:[s.n.], 1999.
 84f.:ilus.

Orientadora: Nilce Correa Meirelles
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

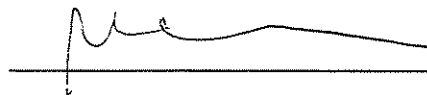
1. Citocromo P₄₅₀. 2. Xenobióticos. 3. Lipoperoxidação.
 I. Meirelles, Nilce Correa. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 15 de julho de 1999

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES

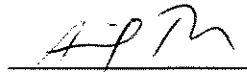
Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles



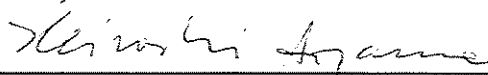
Profa. Dra. Christiane Phillipini Ferreira Borges



Profa. Dra. Ana Célia Ruggiero



Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

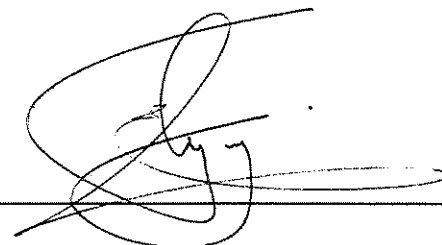


Prof. Dr. Sérgio Marangoni



SUPLENTE

Prof. Dr. Edson Antunes



Prof. Dr. José Camillo Novello



Dedico este trabalho ao Andrés,
aos meus amores,
meus amigos,
meus alunos
e a todas as ausências ainda presentes.

"Somos uma temível mistura de ácidos nucleicos e lembranças, de desejos e proteínas. O século que termina se ocupou muito de ácidos nucleicos e proteínas. O próximo vai se concentrar nas lembranças e nos desejos. Saberá resolver tais questões?

Em O rato, a mosca e o homem.

François Jacob, 1997.

Agradeco

À circunstancial descoberta da bioquímica, que tem mostrado ao longo de cada momento o quão lúdica e logicamente possível é a existência da vida.

À Dra. Nilce Correa Meirelles, pela razão, pela circunstância e pela emoção.

Ao Dr. Bayardo Baptista Torres por mostrar a força e a doçura da tentativa de um desarme permanente.

À Dra. Eneida de Paula pelos sims e pelos nãoos.

Ao Dr. Marcel Tabak que, mesmo na ausência de uma interface, atuou como estímulo.

À Dra. Ana Célia Ruggiero pela leitura crítica desta tese.

À Denise pelo interação com a pesquisa em ensino de bioquímica, pelos estímulos, pequenos e grandes detalhes.

Ao Armindo pelo diálogo do conflito, pela cumplicidade, pela persistente busca da integridade.

À Dani, Eduardo, Luca e Pô pela intensidade e pelo brilho dos bons e maus instantes.

À Daniela Y. pela vivência de uma afinidade tão improvavelmente próxima de 1.

À Sosô pelas longas conversas.

À Maria e à Celeste pela demonstração de amor que permitiu que este trabalho fosse finalizado.

À Marina, Míriam e Andréia pela personalidade no desempenho profissional.

A D. Cida, Daniel, Paulinho, Neto e Jack por atender aos pedidos mais impertinentes com um pequeno sorriso.

A todos aqueles que permitiram o uso de reagentes, vidrarias, equipamentos, bibliografia e laboratórios.

A todos aqueles que em algum momento, estimularam e colaboraram para este estudo.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos meus alunos da Universidade Estadual de Ponta Grossa que têm dado sentido a este contínuo aprendizado.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 BIOTRANSFORMAÇÃO	11
1.2 MEMBRANAS MICROSSOMAIS	13
1.3 CITOCROMO P ₄₅₀	15
1.4 CITOCROMO B ₅	20
1.5 INDUÇÃO DE ISOFORMAS DO CITOCROMO P ₄₅₀	21
1.6 METABOLISMO MICROSSOMAL	25
1.7 LIPOPEROXIDAÇÃO DA MEMBRANA MICROSSOMAL	27
1.8 DIPIRIDAMOL (DIP)	30
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 ANIMAIS	37
3.2 PREPARAÇÃO MICROSSOMAL CEREBRAL	37
3.3 PREPARAÇÃO MICROSSOMAL HEPÁTICA	37
3.4 DOSAGEM PROTÉICA	38
3.5 DETERMINAÇÃO DE CITOCROMO P ₄₅₀	38
3.6 DETERMINAÇÃO DE CITOCROMO B ₅	38
3.7 EXPERIMENTOS DE INDUÇÃO DE CITOCROMO P ₄₅₀ HEPÁTICO	39
3.7.1 Por Fenobarbital (PB)	39

3.7.2 Por 3-metilcolantreno (3MC)	39
3.8 INTERAÇÃO DIP-MEMBRANA MICROSSOMAL	39
3.9 METABOLISMO MICROSSOMAL HEPÁTICO DE DIP	40
3.9.1 Metabolismo microssomal em camundongos.....	40
3.9.2 Metabolismo microssomal em ratos	40
3.10 INCUBAÇÃO COM CO	40
3.11 ESTIMATIVA DE LIPOPEROXIDAÇÃO.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 TESTE DE ATIVIDADE MICROSSOMAL CEREBRAL	43
4.2 TESTE DE ATIVIDADE MICROSSOMAL HEPÁTICA	45
4.2.1 Caracterização espectral de citocromo b_5 e citocromo P_{450}	45
4.2.2 Indução de citocromo P_{450} por PB e 3MC.....	47
4.3.1 VELOCIDADES DE OXIDAÇÃO DE NADPH.....	50
4.3.2 INIBIÇÃO DO METABOLISMO MICROSSOMAL HEPÁTICO DE DIP EM PRESENÇA DE CO	52
4.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DO DIP POR FLUORESCÊNCIA.....	58
4.6 LIPOPEROXIDAÇÃO MEDIADA POR DIP	63
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS	79

ÍNDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS

Figura	página	Título
1	15	Diagrama esquemático de uma célula eucariótica.
2	30	Representação espacial mais provável do DIP
3	44	Espectro de absorção de MCR
4	46	Espectros de absorção de citocromos microsossmais
5	47	Quantificação de indução em MHC
6	49	Espectro de absorção UV-Vis de NADPH e citocromo b_5 no metabolismo de DIP por MHC_{3MC}
7	50	Oxidação do citocromo b_5 pelo metabolismo microsossomal de DIP
8	51	Coeficientes de velocidade de oxidação de NADPH para o metabolismo de DIP
9	54	Controle de espalhamento de luz MHR-DIP
10	56	Espectros de fluorescência da interação não-metabólica DIP-MHR
11	57	Decaimento da intensidade de fluorescência de DIP em condições não-metabólicas
12	59	Interação metabólica e não-metabólica de DIP
13	60	Intensidade de fluorescência absoluta de DIPx tempo em condições metabólicas
14	62	Espectros de fluorescência de DIP em condições metabólicas e na presença de inibidor de citocromo P_{450}
15	63	Decaimento de fluorescência de DIP em condições metabólicas e na presença de CO
16	64	Medidas de TBARS de MHR_c na presença de SRNADPH e DIP
17	65	Efeito do DIP sobre a lipoperoxidação em MHR_c
Esquema		
1	16	Funções do complexo enzimático citocromo P_{450}
2	26	Quadro geral das reações catalíticas do complexo citocromo P_{450}
Tabela		
I	24	Indutores de isoformas de citocromo P_{450}
II	53	Efeito de CO sobre o consumo de DIP por MHC
III	61	Velocidades de consumo metabólico de DIP

LISTA DE ABREVIATURAS

3MC- 3 metil colantreno
 ADP - adenosina difosfato
 AMP - adenosina monofosfato
 AMP_c- adenosina monofosfato cíclico
 ARNT- proteína nuclear translocadora do receptor
 ATP - adenosina trifosfato
 BSA - soro albumina bovina
 DDT- dicloro difenil tricloroetano
 de hidrocarbonetos aromáticos
 DIP - dipiridamol
 DTPA - ácido etileno diamina pentacético
 DTT- ditioneitol
 EDTA - ácido etileno diamino tetracético
 EPR- Ressonância paramagnética eletrônica
 ESR- Ressonância de spin eletrônico
 FADH₂ - flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
 FMN - flavina mononucleotídeo (forma oxidada)
 HAP - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
 HPLC- High Performance Liquid Chromatography
 IDPN- iminodipropionitrila
 Ip- intraperitoneal
 LDL - lipoproteína de baixa densidade
 LPC - lisofosfatidilcolina
 MCR- microssoma cerebral de rato
 MHC- microssoma hepático de camundongo
 MHR- microssoma hepático de rato.
 NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
 NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
 PB- fenobarbital
 PMSF- fenil metil sulfonil fluoreto
 RHA - receptor de hidrocarbonetos aromáticos
 RNA_m- ácido ribonucleico mensageiro
 SNC- Sistema Nervoso Central
 SRNADPH- sistema regenerador de NADPH
 TRIS- tris hidroximetil amino metano
 Trp- triptofano

RESUMO

Enzimas presentes em retículo endoplasmático de hepatócitos são responsáveis pela biotransformação da maioria dos compostos exógenos, podendo gerar metabólitos mais ou menos tóxicos que a droga mãe. O complexo enzimático citocromo P₄₅₀ desempenha papel relevante nesta função, ao possuir inúmeros substratos, dentre os quais vários atuam como indutores de isoformas específicas, caracterizando um potente mecanismo fisiológico de defesa e importante ferramenta para o estudo das adaptações celulares à exposição a agentes químicos. O processo de biotransformação catalisado pelo complexo P₄₅₀ é uma das fontes endógenas de espécies reativas de oxigênio, envolvidas em mecanismos destrutivos de lipoperoxidação de membranas biológicas. Dipiridamol (DIP) é um vasodilatador de uso clássico que potencializa efeitos de algumas drogas terapêuticas com atividade anti-trombótica, citotóxica, radioprotetora, entre outras, além de apresentar importante ação antioxidante, cujo mecanismo de ação ainda não foi devidamente esclarecido.

Este estudo demonstrou que suspensões microssomais hepáticas são parcialmente responsáveis pela biotransformação de DIP. Em condições metabólicas *in vitro*, resultados espectrofotométricos demonstraram oxidação completa de NADPH com posterior oxidação de citocromo b₅, confirmando que NADPH fornece o primeiro elétron enquanto citocromo b₅ pode ceder o segundo elétron ao conjunto de reações catalisadas pelo citocromo P₄₅₀. Microssomas obtidos de animais tratados com fenobarbital e 3-metilcolantreno, indutores de citocromo P₄₅₀, consumiram mais rapidamente NADPH e citocromo b₅, sugerindo que alguma das isoformas induzidas apresenta maior especificidade por DIP. Na presença de CO foi verificada uma inibição parcial da metabolização de DIP. Estes resultados foram confirmados pelo decaimento da emissão de fluorescência de DIP quando em condições ideais à biotransformação, mecanismo que também sofreu relativa inibição por CO. DIP nas condições descritas mantém certa atividade antioxidante, prevenindo a membrana microssomal da lipoperoxidação induzida por NADPH e Fe-ADP endógenos.

ABSTRACT

Enzymes present in hepatocytes endoplasmatic reticulum are responsible for the xenobiotics biotransformation and can generate metabolites more toxic than the drug. The enzymatic complex cytochrome P₄₅₀ plays an important role on this function, since it has many substrates that can act as inductors of specific isoforms, characterizing a potent physiologic mechanism of defence and important tool for the study of cellular adaptations to exogenous agents exposure. The biotransformation cytochrome P₄₅₀-dependent is one of the endogenous sources of oxygen reactive species , involved in lipoperoxidation mechanisms that destroy biological membranes. Dipyridamol (DIP) is a vasodilator that amplifies some effects of therapeutic drugs such as antithrombotic, citotoxic or radioprotector activities, among others, besides presenting important antioxidant action, although the mechanism has not been properly understood yet.

This study demonstrated that microsomal suspensions liverworts are active in the DIP biotransformation, as demonstrated by the decrease of the characteristic absorbance at 340 nm (the peak of the reduced form of NADPH) and confirmed by the kinetic decrease of the drug fluorescence emission in 496 nm. The P₄₅₀ enzymatic system involvement was verified by the metabolic process inhibition in the presence of CO. DIP even in biotransformation continues exercising its inhibitory action on the the NADPH-dependent microsomeal membrane lipoperoxidation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biotransformação

A interação de compostos orgânicos com o organismo vivo pode ser evidenciada pela atividade terapêutica dos medicamentos, ou mesmo, pelas reações adversas (intoxicação) promovidas por muitos agentes químicos que interagem com sistemas biológicos. Os efeitos da maioria das drogas sobre o organismo decorre de suas interações com macromoléculas, muitas vezes componentes da membrana plasmática (Ross, 1972).

Do ponto de vista operacional, devemos levar em consideração dois conceitos farmacológicos básicos: *farmacocinética* - resposta do organismo ao fármaco (qualquer agente químico que afeta processos que ocorrem no organismo vivo) e *farmacodinâmica* - efeitos que o fármaco causa ao organismo

A grande maioria dos compostos orgânicos sintéticos é transformada no organismo através de uma série de alterações químicas resultando na sua excreção, normalmente por via renal, na forma de metabólitos específicos. Este fenômeno constitui a *biotransformação* (Williams, 1959).

As propriedades físico-químicas dos xenobióticos (compostos químicos exógenos) que permitem sua passagem, rápida, através das membranas biológicas durante a absorção e distribuição também interferem na posterior excreção.

Após a filtração no glomérulo renal, por exemplo, a maioria dos compostos químicos lipossolúveis escapa à excreção ao ser rapidamente reabsorvido por difusão através das células tubulares renais. Assim, a biotransformação enzimática das drogas gera metabólitos mais polares e menos lipossolúveis, aumentando sua excreção e

reduzindo o volume de distribuição. Como resultado tem-se o alívio da carga de substâncias exógenas, essencial à sobrevivência do organismo (Hollemborg, 1992).

Interações droga-nutrientes ou droga-alimentos, similar ao que acontece nas interações droga-droga, podem representar problemas clínicos relevantes podendo interferir com o processo farmacocinético, resultando em reações adversas como toxicidade. Em algumas situações, tais interações podem conduzir a falhas terapêuticas e mesmo deficiências nutricionais. O estado nutricional do paciente desempenha um papel chave na resposta farmacológica à droga. (LaBella, 1991).

Atenção crescente tem sido dada às interações droga-nutrientes pelo fato de algumas drogas tornarem-se mais potentes e apresentarem maior especificidade decorrente de tal associação. Idade avançada, gestação, aleitamento e má nutrição são fatores favoráveis. Frequentemente, o mecanismo de ação de uma droga pode envolver nutrientes de maneira similar a compostos não-nutrientes. Sítios de interação droga-alimentos incluem trato gastrointestinal, sangue e receptores celulares da droga. Algumas drogas podem, inclusive, modificar a composição corporal como observado em drogas anfifílicas catiônicas, como amantadina, cloroquina, clorpromazina fentermina, entre outras, ao afetarem a estocagem de fosfolípidos (Kodavanti & Mehendale, 1990).

Alterações na distribuição de algumas drogas induzidas por nutrientes podem ser parcialmente dependentes da biotransformação hepática, como evidenciado pela competição entre drogas e nutrientes, absorvidos, pelo primeiro passo do metabolismo, no intestino ou fígado (Thomas, 1995).

O fígado é, reconhecidamente, o principal sítio de biotransformação. As diversas famílias enzimáticas que catalisam o metabolismo de xenobióticos têm sido exaustivamente estudadas. Entretanto, enzimas como a UDPGT (*UDP glucuronosil transferase*) e citocromo P₄₅₀ vêm sendo detectadas também em tecidos extra-hepáticos como rins, pulmões, pele, intestino, coração, glândulas supra-renais, placenta e cérebro (Aitio *et alii.*, 1980; Nabeshima *et alii.*, 1980; Testa & Jenner, 1981; Walther *et*

alii., 1987; Ravindranath *et alii*, 1989; Perrin *et alii.*, 1990; Minn *et alii.*, 1991; Ghersi-Egea *et alii.*, 1993).

Os processos metabólicos mais comumente envolvidos na biotransformação de xenobióticos podem ser classificados em FASE I- reações de funcionalidade e FASE II- reações de conjugação. Os substratos da FASE I geralmente são moléculas lipofílicas e sofrem reações de monooxigenação, dealquilação, redução, aromatização ou hidrólise. Essas moléculas podem possivelmente servir como substrato para enzimas da FASE II as quais conjugam o grupo funcional a um composto polar endógeno, por exemplo um aminoácido, um grupamento sulfato, uma molécula de glutathione ou um açúcar (LaBella, 1991).

1.2 Membranas Microsossomais

O citoplasma da maioria das células eucarióticas contém uma rede de membranas interconectadas que formam cisternas e se estendem desde o envelope nuclear até a membrana plasmática. Esta longa estrutura subcelular, denominada retículo endoplasmático, é composta de membranas de aspecto liso em alguns locais e rugoso em outros. A aparência rugosa se deve à presença de ribossomos na superfície citoplasmática da membrana, enquanto a porção lisa não os contém (DePierre & Dallner, 1975).

O retículo endoplasmático desempenha várias funções tais como: síntese de lipídeos, síntese de proteínas e lipídeos para organelas e exportação, síntese lipídica e reações de biotransformação de drogas. Também tem seu papel aliado ao Aparelho de Golgi na formação de outras organelas subcelulares como lisossomos e peroxissomos (DeDuve, 1971).

Microsossomas (ou microsossomos) são freqüentemente usados para o estudo de ciclos redox de drogas e processos de lipoperoxidação. Apesar da denominação

microsomas não constituem organelas intracelulares, sendo obtidos por processos que envolvem ruptura e fracionamento de células. Quando células são rompidas em homogeneizador, membranas plasmáticas e retículo endoplasmático são invertidos e a fração microsomal obtida por ultracentrifugação, constitui um agregado de vesículas de ambos sistemas membranares (DeDuve, 1971).

Mesmo sendo apenas um artefato de preparação, onde cisternas e túbulos do retículo são rompidos e reconstituídos em vesículas menores, as relações topológicas entre a membrana, luz e ribossomas são mantidas. Contêm além do sistema enzimático citocromo P_{450} , 30 ou 40 enzimas inseridas na membrana. Constituem um excelente modelo de membrana biológica para o estudo de metabolização de drogas, dado que são compostos por 70% de proteína, 20% de RNA e somente 10% de lipídeos (Hird *et alii*, 1964).

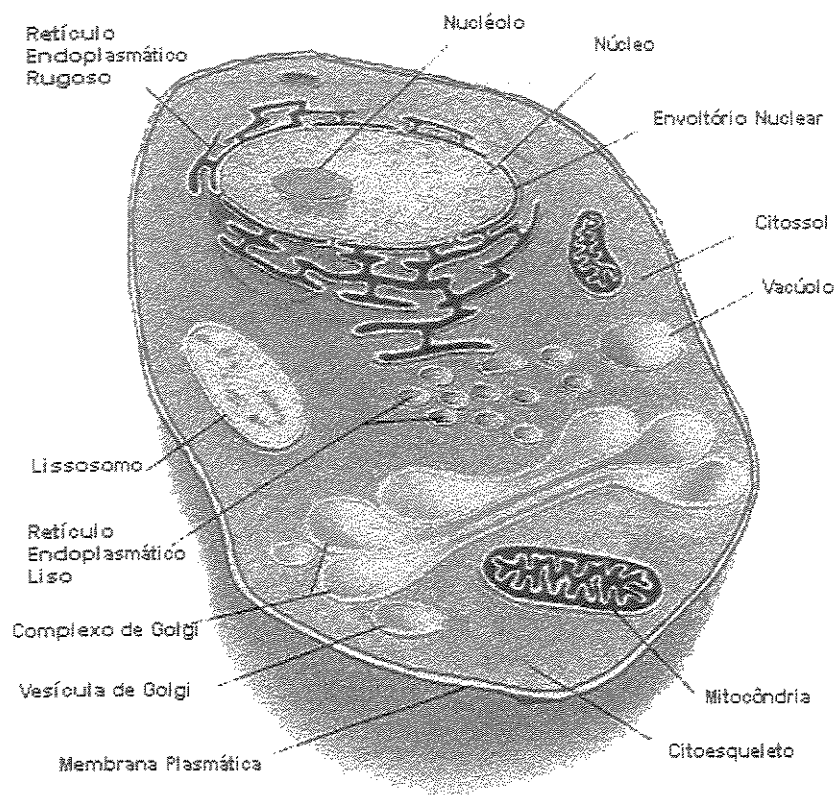
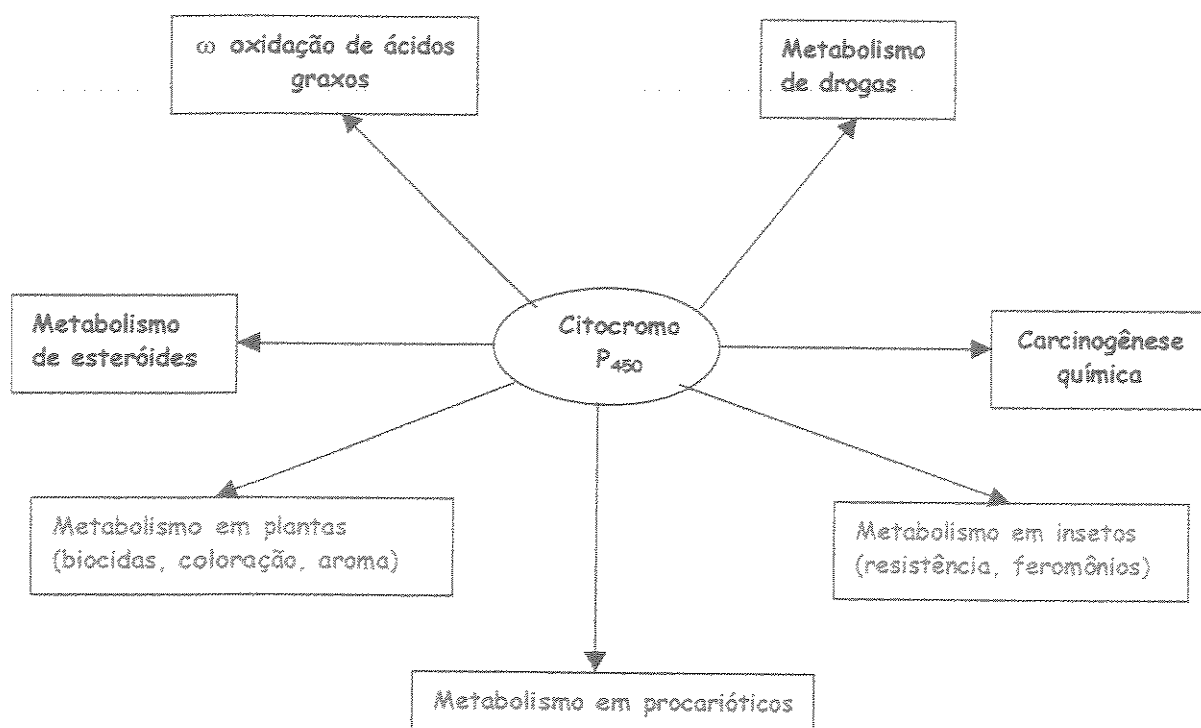


FIGURA 1. Diagrama esquemático de uma célula animal eucariótica (Adaptado de Rawn, 1989)

1.3 Citocromo P₄₅₀

O termo citocromo P₄₅₀ refere-se a um grupo de hemeoproteínas, cujo complexo Fe²⁺-CO apresenta um espectro de absorção com pico máximo em 450 nm. Esta característica espectrofotométrica é atribuída à única ligação do grupamento heme com um resíduo de cisteína (Omura & Sato, 1964). Estão envolvidas com o metabolismo de carcinógenos e drogas, bem como no metabolismo em insetos, plantas, entre outros, como visualizado no Esquema 1.



ESQUEMA 1. Funções do citocromo P₄₅₀ (Adaptado de Estabrook, 1996)

As áreas grafadas em vermelho representam tópicos de interesse biomédico, enquanto as grifadas em verde representam novas áreas da Biologia, nas quais os diversos papéis do citocromo P₄₅₀ vêm sendo exaustivamente estudados.

A denominação de superfamília gênica P₄₅₀ abrange um grande número de enzimas, das quais 400 já caracterizadas em procariotos e eucariotos (Porter & Coon, 1991; Guengerich, 1992; Bhamre *et alii*, 1993; Shimada *et alii*, 1994). O complexo citocromo P₄₅₀ é ubíquo e apresenta uma homologia estrutural que varia de 10 a 90%, sendo encontrado em microorganismos, plantas e animais (Coon *et alii*, 1992; Graham-Lorence & Peterson, 1996).

O complexo citocromo P₄₅₀ é ligado à membrana do retículo endoplasmático sendo constituído pelo próprio citocromo P₄₅₀, NADPH citocromo P₄₅₀ redutase, NADH citocromo b₅ redutase, citocromo b₅ e fosfolipídeos. Durante as reações de biotransformação o sistema citocromo P₄₅₀ pode produzir espécies reativas de oxigênio que podem inativá-lo, sendo considerados iniciadores de processos de lipoperoxidação (Lai & Piette, 1978; Gutteridge *et alii.*, 1979; Bondy & Naderi, 1994).

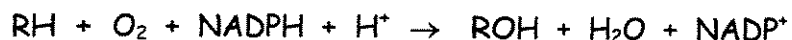
As enzimas possuem massa molecular de cerca de 57 KDa, correspondente a aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos. O sítio ativo do citocromo P₄₅₀ possui como grupo prostético a ferroprotoporfirina IX, sendo que o átomo de Fe é ligado a quatro nitrogênios dos anéis pirrólicos da ferroprotoporfirina e tem como quinto ligante o ânion tiolato, que invariavelmente pertence a um resíduo de Cys. O quinto ligante contribui para as propriedades catalíticas e espectrais próprias das enzimas citocromo P₄₅₀, enquanto a sexta posição de coordenação do Fe pode ser ocupada por uma molécula de H₂O, O₂ ou CO (Porter & Coon, 1991).

Como as enzimas citocromo P₄₅₀ eucarióticas estão inseridas na membrana mitocondrial interna ou no retículo endoplasmático, torna-se difícil a obtenção de dados mais detalhados sobre sua estrutura tridimensional. Tanto a localização dos sítios catalíticos como do grupamento heme ainda são assuntos controversos. É aceita a presença de dois grandes domínios estruturais, sendo o primeiro um domínio transmembrana composto por uma hélice N-terminal de 30 resíduos de aminoácidos aproximadamente e um segundo domínio (globular) citossólico, onde se encontram o grupamento heme e o(s) sítio(s) catalítico(s) (Brown & Black, 1989; Black, 1992; Uvarov *et alii.*, 1994).

A localização do grupamento heme, praticamente perpendicular ao plano da membrana do retículo endoplasmático, é evidenciada pela posição proposta do citocromo b₅ ligado, pela partição dos substratos do citocromo P₄₅₀, pela ligação de antipeptídeos a anticorpos e pela possibilidade da livre movimentação intramolecular protéica durante o

processo catalítico (Edwards *et alii.*, 1991). Os centros funcionais do sistema P₄₅₀ microsomal se situam numa posição relativa ao grupamento heme (Centeno & Gutiérrez Merino., 1992).

As oxidases de função mista P₄₅₀-dependentes catalisam uma grande variedade de reações incluindo epoxidações, N-dealquilações, O-dealquilações, S-oxidações e hidroxilações de substratos aromáticos e alifáticos. A diversidade de reações pode ser compreendida sabendo-se que a reação inicial, em todos os casos, envolve a inserção de uma hidroxila ao substrato com formação de um intermediário hidroxilado que pode, então, dependendo da natureza do substrato e da estabilidade do intermediário, sofrer dealquilação, deaminação, etc. (White & Coon, 1980). As reações gerais catalisadas pelo citocromo P₄₅₀ ocorrem com a seguinte estequiometria:



Onde RH é o substrato principal e NADPH a coenzima que fornece equivalentes redutores. Como a maioria das monooxigenases catalisa reações onde o substrato é hidroxilado, também são denominadas hidroxilases.

As coenzimas podem ser flavinas mono ou dinucleotídeos (FMNH₂ ou FADH₂) ou nicotinamidas dinucleotídeos (NADPH ou NADH). Nos mamíferos, além dos citocromos P₄₅₀ e b₅ as principais fontes de elétrons são nucleotídeos piridínicos NADPH e NADH, sendo que duas flavoproteínas os transportam no sistema enzimático do retículo endoplasmático (NADPH-citocromo P₄₅₀ redutase e NADH-citocromo b₅ redutase). A NADPH-citocromo P₄₅₀ redutase tem como grupos prostéticos flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), enquanto FAD atua comoceptor de elétrons do NADPH, FMN reduz o citocromo P₄₅₀ e, em alguns casos o b₅ (Peterson & Prouah. 1986).

O sistema citocromo P₄₅₀ é essencial à biotransformação de numerosos compostos químicos tais como drogas, carcinógenos, esteróides, pesticidas, hidrocarbonetos e produtos naturais, entre outros. Entre os xenobióticos encontram-se mais de 250.000 substratos potenciais, quando não indutores ou inibidores de alguma isoforma P₄₅₀ (Lu & West, 1980; Porter & Coon, 1991; Coon *et alii.*, 1992; Koop, 1992).

A toxicidade destes produtos pode ser modulada por várias reações catalisadas pelo sistema citocromo P₄₅₀. Alterações na atividade das enzimas junto a substratos endógenos estão relacionadas a patologias (Kuntzmann *et alii.*, 1966; Bolt *et alii.*, 1977).

O principal papel de isoformas citocromo P₄₅₀ em fígado, pulmões e rins, parece estar na regulação de níveis de moléculas lipofílicas sinalizadoras não-peptídicas como hormônios, ácidos graxos, vitaminas A, D, entre outras. Tais compostos são metabolizadas pelo sistema enzimático de monooxigenases, preferencialmente à oxidação de xenobióticos lipofílicos acompanhada da formação de metabólitos que interagem com enzimas de conjugação e subsequente excreção (Nebert, 1990, 1994).

A indução do citocromo P₄₅₀1A1 na presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos demonstra uma resposta plausível através da qual células de mamíferos se adaptam à exposição a xenobióticos. Por exemplo, estudos de carcinogênese causada por esta classe de hidrocarbonetos revelaram que o metabolismo P₄₅₀1A1-dependente do carcinógeno é requerido pelo processo neoplásico. Tais resultados contribuíram para a hipótese que muitos agentes carcinogênicos são substâncias eletrofílicas genotóxicas (Conney, 1982).

Os hidropéroxidos lipídicos resultantes do processo de lipoperoxidação, parecem também estar envolvidos na inativação de conversões de substratos citocromo P₄₅₀-dependentes ao oxidar o grupamento heme da proteína (Lindstron & Aust, 1984; Iba & Mannering, 1987). Por outro lado, a inativação de citocromos P₄₅₀ microssomais tem sido observada sob diferentes condições de "stress" oxidativo tais como exposição ao

ozônio, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos como cumeno e terc-butil hidroperóxido, ou mesmo espécies reativas de oxigênio geradas durante a biotransformação (Lai & Piette, 1978; Gutteridge *et alii.*, 1979; Balvers *et alii.*, 1992).

Os sistemas enzimáticos de oxidases de função mista citocromo P₄₅₀-dependentes apresentam absoluta necessidade de NADPH e O₂ para sua atividade catalítica. O próprio citocromo P₄₅₀ desempenha um papel crítico ao ligar o substrato, ativar um átomo de oxigênio e ligar esse oxigênio ao substrato, determinando dessa forma a especificidade pelo substrato para todo o sistema e a estrutura(s) do(s) produto(s) formados durante a metabolização do substrato (Hollenberg, 1992).

1.4 Citocromo b₅

O citocromo b₅ é uma proteína com peso molecular de 16 kDa composta de dois domínios: uma cauda hidrofóbica que a ancora à membrana e uma porção hidrofílica, o domínio heme-ligante, que é ativo em reações redox. A isozima ligada à membrana se localiza no retículo endoplasmático onde pode aceitar um elétron tanto da NADH-citocromo b₅ redutase como da NADPH-citocromo P₄₅₀ redutase. Assim o citocromo b₅ reduzido pode providenciar equivalentes redutores para biossíntese de determinados lipídeos e doar o segundo elétron para o ciclo de reações catalisadas pela super-família citocromo P₄₅₀. (Hildebrandt & Estabrook, 1971; Canova-Davis & Waskell, 1984).

Essa proteína pode transferir elétrons por apresentar um potencial redox de 20 mV capaz de aceitar ou doar um simples elétron, sendo que uma das funções detectadas *in vivo* é a de reduzir hemoglobina em eritrócitos (Velick & Strittmatter, 1956). Também foram isoladas isozimas na membrana interna mitocondrial e, os domínios heme dos citocromos b₅ mitocondriais e microssomais apresentaram 58% de seus aminoácidos constituintes conservados, sendo portanto produtos de gens diferentes (Fukushima & Sato, 1973; Lederer *et alii.*, 1983).

Entre as diversas funções das quais o b_5 pode participar estão a desaturação e alongação de cadeias de ácidos graxos, biossíntese de colesterol, redução de metahemoglobina, biossíntese de ácido siálico, etc (Vergères & Waskell, 1995).

1.5 Indução de isoformas do citocromo P₄₅₀

Bacteriologistas definem indução como o acréscimo na velocidade de síntese de uma determinada proteína, o que no sistema bacteriano implica na síntese de um RNAm. Ao contrário do que se verifica no crescimento de sistemas bacterianos, onde a degradação protéica desempenha um papel menor na determinação dos níveis enzimáticos totais, os níveis protéicos em tecidos animais, no estado estacionário, são sempre regulados pela síntese e degradação (Jacob & Monod, 1961; Epstein & Bekwitt, 1968).

Uma vez que o mecanismo molecular do processo ainda não está suficientemente esclarecido, o termo operacional indução será considerado, segundo Schinke & Doyle (1970), como um aumento da taxa de velocidade de síntese protéica em relação à degradação. Assim, um acréscimo na quantidade protéica é descrita sem implicações mecanísticas e, experimentalmente, a indução será comprovada pelo aumento no peso do "pool" de tecido hepático e na concentração de citocromo P₄₅₀ em relação à preparação microsomal controle.

Conney e colaboradores (1957), num dos mais antigos relatos sobre a auto-indução da regulação do metabolismo de exógenos, mostraram que roedores tratados com benzopireno eram sujeitos a uma aceleração no metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos(HAP) e outros carcinógenos.

Alguns anos mais tarde foi demonstrada a presença de uma maior concentração de, no mínimo, duas isoformas protéicas em fígado de ratos tratados com HAP ou barbituratos (Sladek & Mannerino, 1966; Alvarez *et alii*, 1967).

A identificação de um receptor citossólico para hidrocarbonetos aromáticos (RHA), que após translocação ao núcleo ativa o gene *CYP1A1*, foi de fundamental importância para estudos posteriores (Polland *et alii.*, 1973). O uso de ferramentas genéticas e bioquímicas demonstrou que RHA regulava a expressão de, ao menos, um gene fornecendo base conceitual para o estudo da regulação de outros genes por HPA (Witlock, 1986; Nebert & Gonzalez, 1987).

Hankinson e colaboradores demonstraram evidências da necessidade de uma proteína adicional para o funcionamento do receptor RHA, uma proteína nuclear translocadora do receptor de aril hidrocarbonetos (ARNT). A descoberta de que tanto o receptor RHA como a ARNT eram proteínas hélice-alça-hélice, requeridas para ativação do gene *CYP1A1* foi proveitosa para investigações posteriores (Hoffman *et alii.*, 1991; Landers *et alii.*, 1992).

Dois outros receptores foram identificados: o receptor ativador da proliferação de peroxissomos (Isseman & Green, 1990) e o receptor do elemento da resposta antioxidante (Rushmore *et alii.*, 1990).

Vários outros compostos como proliferadores de peroxissomos, esteróides catatóxicos, t-butilhidroquinona e hidroxianisol butilado têm induzido essas enzimas hepáticas em mamíferos. Alguns compostos não-genotóxicos indutores de isoformas de citocromo P₄₅₀ específicas apresentam atividade carcinogênica. As espécies ativas de oxigênio geradas pelas próprias isoformas induzidas, podem simultaneamente inibir ou estimular a proliferação de comunicações intracelulares (Koblyakov, 1998).

A regulação de isoformas hepáticas de citocromo P₄₅₀ que sofrem modulação durante o desenvolvimento foram revistos por Waxmann (1988), que observou o envolvimento de outros fatores na regulação, como por exemplo hormônios peptídicos e esteróides, fatores de crescimento e fatores de transcrição hepáticos.

Existem mais de 480 genes que codificam isoformas caracterizadas pela especificidade por múltiplos substratos e vários mecanismos regulatórios de expressão. A multiplicidade de isoformas pode ser explicada pelo fato de muitos compostos orgânicos lipofílicos serem substratos da superfamília citocromo P₄₅₀. Aparentemente, a especificidade dos carcinogênicos por órgãos e espécies pode ser atribuída, em muitos casos, a várias expressões de isoformas de citocromo P₄₅₀ que os metabolizam, nestes mesmos órgãos e espécies-alvo (Nelson *et alii*, 1993).

As isoformas de citocromo P₄₅₀ de mamíferos podem ser subdivididas em dois grupos:

- a) isoformas envolvidas na biossíntese de esteróides e, portanto, expressas nos órgãos correspondentes (adrenais, glândulas mamárias e ovários)
- b) isoformas que metabolizam xenobióticos lipofílicos em órgãos responsáveis pela biotransformação destes (fígado, pulmões, rins e pele).

São vários os compostos químicos de ação farmacológica conhecida que apresentam a capacidade de induzir isoformas do citocromo P₄₅₀ (Tabela I).

Tabela I- Indutores de isoformas de citocromo P₄₅₀*

Classe farmacológica	Composto
Hipnóticos e sedativos	Barbituratos (PB), glutetimida, Hidrato de cloral
Anticonvulsivos	Difenilhidantoína
Tranqüilizantes	Meprobamato, clordiazepóxido
Antipsicóticos	Clorpromazina, imipramina
Estimulantes do SNC	Nicetamida
Antiinflamatórios	Fenilbutazona, aminopirina
Agentes hipoglicêmicos	Tolbutamida, carbutamida
Anti-histamínicos	Orfenadrina
Antibióticos	Rifampicina, griseofulvina
Fungicida	Clotrimazol
Esteróides	Espironolactona, pregnelona 16 carbonitrila
Inseticidas	DDT (clorfenotano), clordane, hexaclorociclohexano, dieldrin, hexaclorobenzeno
Hidrocarbonetos policíclicos carcinogênicos	3MC, 3,4 benzopireno
Diversos	TCDD (2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina), flavonas, safrol.

* Bock & Remmer, 1978.

O carcinógeno 3MC e o hipnótico PB estão entre os primeiros indutores identificados e classificados em distintos grupos, uma vez que induzem a síntese de isoformas de P₄₅₀ que catalisam diferentes reações de oxidação. O nível induzido de citocromo P₄₅₀ cessa com a excreção ou degradação do agente indutor, como demonstrado pela administração crônica de PB a ratos ocasionando um acréscimo na concentração da enzima até a obtenção de um novo estado estacionário; por outro lado, após uma única injeção intraperitoneal, o nível induzido rapidamente retorna ao fisiológico após excreção de PB (Bock & Remmer, 1978).

Já o inseticida DDT por sofrer acúmulo no tecido adiposo, mantém a indução enzimática por um período de tempo mais prolongado, como detectado em biópsia hepática (Bock & Remmer, 1978).

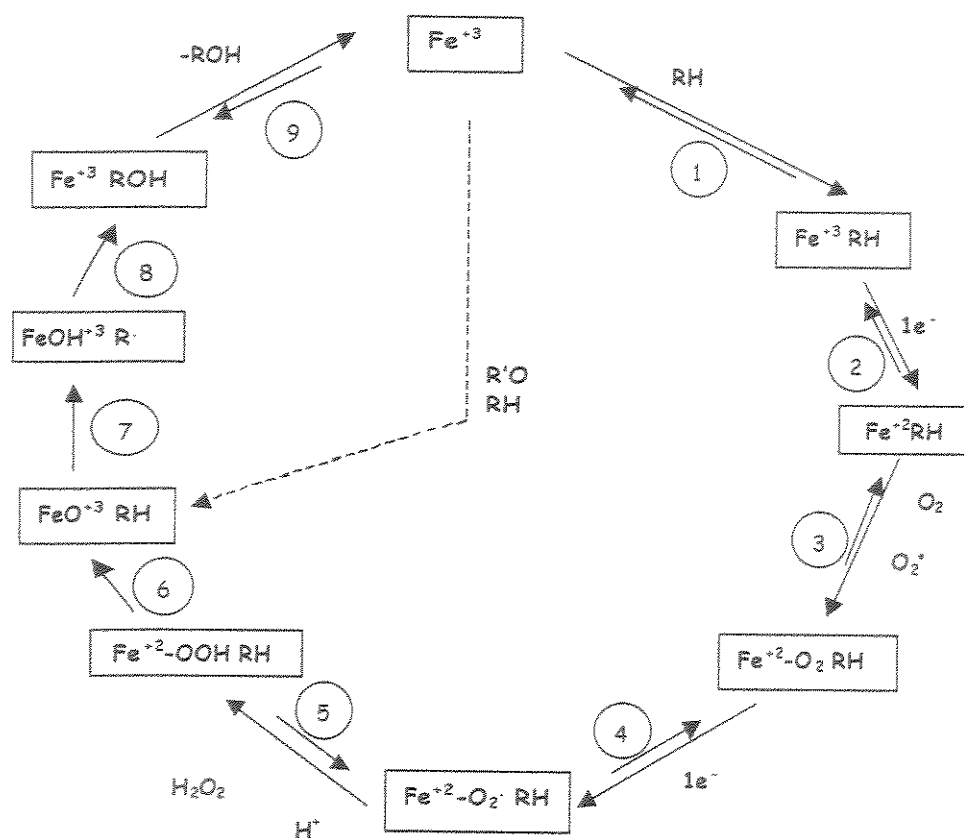
Os sistemas enzimáticos de monooxigenases PB-induzidos oxidam, entre outros substratos, aminopirina e hexobarbital, enquanto os 3MC-induzidos oxidam benzopireno, por exemplo (Holder *et alii*, 1974; Selkirk *et alii*, 1974).

O tratamento com PB e 3MC induz a síntese de isoformas que quando isolados e *in vitro* apresentam alterações espectrais e denominações adequadas às alterações observadas tais como P₄₄₆, P₄₄₈ e P₁₄₅₀, (Bock & Remmer, 1978).

1.6 Metabolismo Microsomal

As atividades catalíticas do sistema microsomal são decorrentes, pelo menos em grande parte, do complexo enzimático citocromo P₄₅₀ e várias técnicas têm sido utilizadas para determinar quais isoformas contribuem para uma atividade catalítica particular. Um dos principais pontos é a especificidade catalítica, uma vez que pode influenciar a probabilidade com que um indivíduo responde a um composto de uma determinada forma. A flexibilidade estrutural do grupamento heme decorre da presença de alguns resíduos-chave, que podem modular a atividade do sistema P₄₅₀ através do tamanho das cadeias laterais, polaridade e carga, resultando no alto grau de seletividade de cada isoforma por tantos substratos (Negishi *et alii*, 1996).

Poulos & Raag (1992) afirmam ser necessário definir detalhes do mecanismo do ciclo de reação após a ligação ao substrato, que ocorre segundo o esquema apresentado na Figura 4 (Guengerich *et alii*, 1995).



ESQUEMA 2. Quadro geral das reações catalíticas do complexo citocromo P₄₅₀, destacando a produção de O₂⁻ e H₂O₂ (adaptado de Guengerich *et alii*, 1995)

A ativação do citocromo P₄₅₀ para que ele possa oxidar seu (s) substrato(s), requer dois elétrons que são fornecidos pelo NADPH através da NADPH citocromo P₄₅₀ redutase ou mesmo pelo citocromo b₅, sendo NADH o fornecedor de equivalentes redutores, nos diversos passos do ciclo catalítico (Vergères & Waskell, 1995). O ciclo catalítico envolve os seguintes passos, segundo White & Coon (1980):

- 1) ligação do substrato RH ao Fe³⁺;
- 2) redução monoelétrica do complexo férrico enzima-substrato;

- 3) ligação do oxigênio molecular ao complexo ferroso enzima-substrato, com provável geração de superóxido;
- 4) transferência do segundo elétron do NADPH ao complexo enzima-substrato, via NADPH citocromo P₄₅₀ redutase ou citocromo b₅;
- 5) protonação do átomo de oxigênio distal por um íon hidrogênio, com provável produção de peróxido de hidrogênio;
- 6) clivagem da ligação O-O para produzir um intermediário ferro-oxo reativo;
- 7) inserção de um átomo de oxigênio ativado numa ligação C-H do substrato;
- 8) dissociação do produto e regeneração do citocromo P₄₅₀ férrico.

1.7 Lipoperoxidação da Membrana Microsomal

De maneira geral, a lipoperoxidação principia com a abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado com conseqüente formação de radical lipídico. O rearranjo de ligações duplas gera dienos conjugados, que ao serem atacados por oxigênio molecular formam um radical peroxilipídico. Este, tanto pode abstrair um hidrogênio do lipídeo vizinho formando hidroperóxido lipídico como pode formar um endoperóxido lipídico (Poyer & Stanley, 1975).

A lipoperoxidação também pode ser definida como um processo degenerativo que envolve a ruptura de ácidos graxos poliinsaturados, ruptura provavelmente causada por radicais livres e que acaba produzindo um radical lipídico (Slee & Slee, 1980). A taxa de peroxidação em microsomas mostrou ser função da concentração de ácidos graxos poliinsaturados (Tien & Aust, 1982).

Ácidos graxos com três ou mais ligações duplas intercaladas com pontes metilênicas produzem malondialdeído. Malondialdeído pode se ligar a grupos amino de fosfatidil-etanolamina e de cadeias laterais protéicas, produzindo cromolípídeos fluorescentes (Dillard & Tappel, 1971).

A preparação microssomal obtida a partir de retículo endoplasmático liso e rugoso pode sofrer dois tipos de lipoperoxidação. A de natureza enzimática é NADPH-dependente e requer a presença de Fe-ADP (Hochstein & Ernster, 1963; May & McCay, 1968; Wills, 1969; Poyer & McCay 1971), enquanto a não-enzimática requer ascorbato como agente indutor (Wills, 1969; Koster & Slee, 1980).

Microssomas hepáticos têm demonstrado a capacidade de catalisar peroxidação NADPH-dependente de ácidos graxos insaturados endógenos, sendo necessária a presença de íons férricos e quelantes metálicos, tais como ADP ou pirofosfatos (Svingen *et alli.*; 1979). A função dos quelantes seria impedir a ligação do Fe^{2+} aos componentes da membrana e prevenir a precipitação de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (Buege & Aust, 1978).

Ferro reduzido por via enzimática pode desempenhar um papel significativo na iniciação e propagação de lipoperoxidação NADPH-dependente (Sugioka & Nakano, 1976). Essa lipoperoxidação ocorre em dois passos principais e distintos: na iniciação há formação de pequena quantidade de hidroperóxidos lipídicos catalisada por um íon perferriil-ADP, enquanto na propagação há quebra dos hidroperóxidos formados no primeiro passo, com concomitante formação de intermediários reativos e produtos característicos de peroxidação. Hidroperóxidos lipídicos e compostos que reagem com ácido tiobarbitúrico são formados rapidamente durante a propagação, que pode ser catalisada pela adição de Fe^{2+} -EDTA, Fe^{2+} -DTPA ou citocromo P_{450} oxidado. Entretanto, essa enzima é destruída durante o passo final do processo (Svingen *et alli.*, 1979).

A mistura de sais de Fe^{2+} e H_2O_2 reage com muitas moléculas orgânicas, provavelmente pela formação de um radical hidroxil; tracos de Fe^{3+} também podem

reagir lentamente com H_2O_2 , em condições fisiológicas. Ambos contribuem para a lipoperoxidação de membranas biológicas (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Também tem sido observado que alguns substratos do citocromo P_{450} ao sofrerem hidroxilação, inibem o processo lipoperoxidativo, sugerindo que lipoperoxidação e metabolismo de drogas competem por equivalentes redutores de um mesmo componente transportador de elétrons. Algumas dessas drogas são potentes agentes antioxidantes, enquanto outras se convertem a antioxidantes, ao serem hidroxiladas pelo próprio sistema enzimático (Pederson & Aust, 1974).

NADH não catalisa a rápida lipoperoxidação em lipídeos de microssomas intactos na presença de $ADP-Fe^{3+}$, porém se esse complexo estiver presente se mostra tão efetivo quanto o próprio NADPH. Pederson e colaboradores (1973) demonstraram que NADPH citocromo b_5 redutase purificada de preparações microssomais, promove a peroxidação de lipídeos de microssomas isolados em um sistema reconstituído contendo NADH e Fe^{3+} quelado, tanto por ADP como por EDTA.

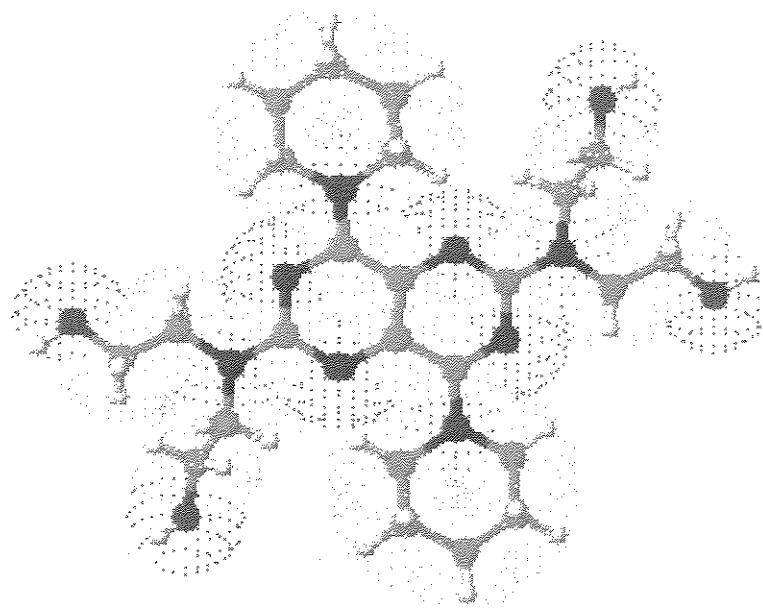
Citocromo P_{450} interage com hidroperóxidos lipídicos exógenos, promovendo consumo de O_2 e gerando produtos de quebra de peróxidos lipídicos (O'Brien & Rahimtula, 1975).

Fe em preparações microssomais, pode estar presente tanto na forma heme como não-heme e, a adição de EDTA, desferrioxamina ou ortofenantrolina inibem a formação de peróxidos lipídicos incubados com NADPH (Wills, 1969).

O complexo Fe^{2+} -EDTA catalisa o início radical da quebra de hidroperóxidos lipídicos, formando intermediários reativos que parecem incluir $O_2^{\cdot-}$ mas não $HO^{\cdot}$. Fe^{3+} -citocromo P_{450} é um agente endógeno de propagação de peroxidação, mesmo sendo destruído durante o processo de propagação (Svingen *et alii*, 1979).

1.8 Dipiridamol (DIP)

Dipiridamol, 2,6- bis(dietanolamina)-4,8-dipiperidino-[5,4-d] pirimidina (Figura 2) é um vasodilatador coronariano de uso clínico clássico, redutor da afinidade da hemoglobina por O_2 tanto na forma isolada como em eritrócitos intactos (Marshall & Parrat, 1973; Meirelles, 1983; Marchant *et alii.*, 1984).



• C, • N, • O, • H

FIGURA 2. Representação espacial mais provável do DIP (Obtida pelo programa ChemSketch 3D)

Não só o DIP, mas também alguns dos seus derivados apresentam efeito inibitório sobre o transporte dos íons fosfato e adenosina através da membrana de

eritrócitos (Gerlach *et alii.*, 1965). Também foi demonstrado que DIP inibe o crescimento, a incorporação de nucleosídeos e a ativação plaquetária em tumores humanos (Batisda *et alii.*, 1985).

Modelos experimentais têm demonstrado que DIP previne trombose, sendo possível que outros fatores além da inibição de agregação plaquetária possam contribuir para sua efetividade (Harker *et alii.*, 1976). Compostos que aumentam a concentração de AMP_c intraplaquetário inibem agregação plaquetária, independentemente do agonista utilizado (Mills & Smith, 1971).

O principal mecanismo sugerido para a inibição propunha que:

- a) DIP agiria como um efector alostérico negativo da fosfodiesterase de plaquetas, causando acréscimo de concentração de AMP_c intraplaquetário e conseqüente potencialização das ações inibitórias de agregação das prostaciclinas;
- b) estimularia diretamente o endotélio vascular à liberação deste eicosanóide;
- c) inibiria o metabolismo e consumo celular de adenosina, causando um acréscimo de sua concentração na interface parede vascular-plaqueta (Fitzgerald, 1987).

DIP pode exercer sua atividade antitrombótica *in vivo* ao regular a disponibilidade do vasodilatador endógeno adenosina, inibidor da agregação de plaquetas que também pode modificar lesão de células endoteliais neutrófilo-dependentes. O consumo celular de adenosina é regido por dois mecanismos: o primeiro envolve saturação a altos níveis de substrato, mecanismo este inibido por DIP segundo a cinética de Michaelis-Menten; o segundo corresponde às leis de uma difusão simples que não é afetada por DIP, a difusão facilitada prevalece em concentrações fisiológicas de adenosina (Ross & Pflieger, 1972; Schrader *et alii.*, 1972).

Como adenosina pode inibir agregação plaquetária ao estimular adenilato ciclase, concentrações suficientes de DIP poderiam amplificar o efeito ao inibir fosfodiesterase. Aumento de concentrações plasmáticas de adenosina foram observadas após injeções intravenosas de DIP em voluntários, por outro lado, concentrações terapêuticas de DIP ($3,2 \mu\text{M}$) têm inibido ADP e agregação induzida por colágeno em sangue total, mas não em plasma rico em plaquetas, *in vitro*. Concentrações de DIP da ordem de $0,2 \mu\text{M}$ que não afetam agregação ADP-induzida, inibem agregação espontânea em sangue total (Harrison *et alii*, 1985).

Embora não existam evidências diretas que comprovem a participação desse mecanismo no efeito antitrombótico pós administração oral de DIP, seria interessante especular a sua relevância quando a destruição de eritrócitos coexiste com ativação plaquetária, dado que eritrócitos liberam ADP e esse, por sua vez, ativa plaquetas. O ação agregante do ADP é perdida quando da incubação com células endoteliais e torna-se anti-agregante mesmo na ausência de formação de prostaciclina, já que seu metabolismo gera adenosina. DIP potencializa a atividade anti-agregante coincidentemente com a inibição do consumo de adenosina por células endoteliais (Crutchley *et alii*, 1980).

DIP interage com micelas de lisofosfatidilcolina (LPC) e soro albumina bovina (BSA), permitindo inferir que esta última seria o alvo primeiro da droga *in vivo* (Tabak & Borisevitch, 1992).

Ratos tratados com DIP apresentaram proteção à discinesia -distúrbio motor crônico agravado por "stress", induzida por iminodipropionitrila (IDPN), decréscimo de vitamina E, acréscimo de dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos em cérebro, sugerindo o envolvimento de espécies reativas de oxigênio no processo (Tariq *et alii*, 1995).

Essa droga também inibe lipoperoxidação (Batisda *et alii.*, 1985; Ford & Hait, 1990) e atua como seqüestrador de radicais superóxido, hidroxila e peroxil (Iuliano *et alii.*, 1995).

A aspirina® apresenta alta eficiência, já suficientemente comprovada, no combate à oclusão vascular, porém doses de 25 mg de ácido acetil salicílico associadas a 200 mg de DIP com uma forma modificada de liberação demonstraram maior eficácia na prevenção secundária a acidentes vasculares (Diener *et alii.*, 1996).

A oxidação de DIP em solventes como acetonitrila e etanol é detectada por um decréscimo de fluorescência e alterações no espectro de absorção ótica, com a liberação de um elétron e concomitante formação de um cátion radical identificável por ressonância de spin eletrônico (ESR). A susceptibilidade do DIP à oxidação está em concordância com a sua já relatada atividade antioxidante tanto em sistemas modelo como em meios biológicos (Almeida *et alii.*, 1998).

DIP em benzeno apresenta uma pequena atividade antioxidante, enquanto que a proteção à lipoperoxidação aumenta com o aumento de polaridade do solvente, sendo maior em vesículas lipídicas. Resultados de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e eletroquímica sugerem a existência de uma reação de transferência monoeletrônica entre o radical peroxil iniciador e o DIP, com geração de um radical cátion DIP e um ânion peroxil LOO^- , confirmando resultados já citados (Pedulli *et alii.*, 1999).

2. OBJETIVOS

- Obter preparações microsossomais cerebrais de camundongos para analisar, comparativamente, a possibilidade de DIP sofrer biotransformação por microsossomas hepáticos e cerebrais;
- Verificar a indução de isoformas hepáticas do citocromo P_{450} por PB e 3MC, não só para testar a atividade enzimática microsossomal, mas também para verificar a participação do sistema enzimático citocromo P_{450} ;
- Estudar a interação DIP-membrana microsossomal hepática para uma melhor análise dos experimentos de metabolização de DIP;
- Analisar a possibilidade de DIP sofrer biotransformação por sistemas microsossomais hepáticos controle e induzidos, visando demonstrar a participação do sistema citocromo P_{450} neste processo;
- Estudar a atividade antioxidante do DIP em preparações microsossomais hepáticas, em condições metabólicas e não-metabólicas, com o objetivo de demonstrar que DIP mesmo em processo ativo de biotransformação pode manter sua atividade antioxidante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongo Swiss, com um mês de idade e pesando entre 8 e 20 g e ratos machos Wistar, com peso entre 200 e 250 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP.

3.2 Preparação Microssomal Cerebral

Ratos Wistar foram decapitados e os cérebros retirados, pesado, picados com o auxílio de um bisturi e homogeneizados em um Potter-Elvehjen em três volumes de tampão TRIS-HCl 10 mM, EDTA 0,2 mM, PMSF 0,1 mM, DTT 0,1 mM, BSA 0,2 %, pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 9.000 $\times g$ por 30 minutos e o sobrenadante obtido, submetido a duas ultracentrifugações consecutivas a 120.000 $\times g$ por 1 hora, cada. Todos os experimentos foram conduzidos a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em tampão TRIS-HCl 10 mM, EDTA 0,2 mM, pH 7,4 e armazenado em Biofreezer Forma Scientific a -80 °C, por um período máximo de 90 dias.

3.3 Preparação Microssomal Hepática

Os camundongos e os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, os fígados retirados, pesados e lavados em NaCl 0,9%, sendo em seguida homogeneizados em Potter-Elvehjen em três volumes de tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 0,1 mM, pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 9.000 $\times g$ por 20 minutos, o precipitado descartado e o sobrenadante novamente centrifugado a 20.000 $\times g$ por 40 minutos em uma Centrífuga Beckman J2-21. O sobrenadante obtido foi

ultracentrifugado por 2 vezes consecutivas a $105.000\times g$ por 1 hora, o pellet final, contendo a fração microssomal foi ressuspensionado no mesmo tampão de preparação e armazenado num Biofreezer Forma Scientific a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período máximo de 90 dias. Todos os passos experimentais foram conduzidos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4 Dosagem Protéica

A dosagem da concentração de proteína total nas preparações microssomais foi feita pelo método de Lowry (Lowry *et alii.*, 1951), utilizando curva padrão de BSA.

3.5 Determinação de citocromo P₄₅₀

A concentração de citocromo P₄₅₀ foi estimada pela diferença de absorbância em 450 nm do citocromo reduzido por ditionito de sódio e saturado com CO e da forma reduzida em 490 nm, utilizando-se um coeficiente de extinção de $91\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Omura & Sato, 1964).

3.6 Determinação de citocromo b₅

O citocromo b₅ foi determinado pela diferença do espectro da forma reduzida por ditionito e o espectro da forma oxidada, com um coeficiente de extinção molar de $118\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ em 423 nm (Ozols, 1974).

3.7 Experimentos de indução de citocromo P₄₅₀ hepático

3.7.1 Por Fenobarbital (PB)

Os experimentos de indução foram conduzidos através da aplicação de NaCl 0,9% nos camundongos fêmea, seguida de sete dias de água *ad libitum* para os animais controle. Nos animais teste foi aplicada uma única injeção intraperitoneal (ip) de PB 80 mg/Kg de peso corporal em NaCl 0,9%, seguida de PB 0,1% na água de beber por sete dias consecutivos. Logo em seguida os animais foram sacrificados por decapitação.

3.7.2 Por 3-metilcolantreno (3MC)

Ao animais controle receberam uma injeção i.p. diária de óleo de oliva por três dias consecutivos, enquanto os animais teste receberam uma injeção i.p. diária de 3MC 30 mg/Kg em óleo de oliva, durante o mesmo período. Os animais foram sacrificados seguindo a metodologia descrita no item anterior.

3.8 Interação DIP-membrana microssomal

Valores de concentração de DIP variando entre 1 e 5 μM em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e protegidos da fotooxidação. Essas mesmas concentrações foram incubadas com concentrações de até 0,06 mg de proteína/mL de membrana microssomal hepática obtida de ratos, em iguais condições. Logo, foram obtidos espectros de fluorescência de varredura entre 430 e 600 nm, com $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm, filtro 1, ganho 1, $\text{HV}_A = 680$, $\text{HV}_B = 590$, em um espectrofluorímetro SLM Aminco SPF-500TM. Os gráficos foram obtidos através de "software" acoplado ao fluorímetro e convertidos com o uso de programa gráfico ORIGIN®.

3.9 Metabolismo microsomal hepático de DIP

3.9.1 Metabolismo microsomal em camundongos

O meio de incubação controle conteve até 0,6 mg/mL de proteína microsomal, sistema regenerador de NADPH (10 mmol/mL de glicose-6-fosfato, 1 mmol/mL de NADP⁺ e 1 unidade de glicose-6-fosfato desidrogenase) ou a próprio coenzima em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4. DIP foi adicionado até uma concentração final de 10 µM. DIP foi solubilizado em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4 sob aquecimento a 60 °C por um período de 3 horas, após o qual foi submetido a uma filtração. A concentração máxima obtida atingiu 22,5 µM de DIP.

O consumo de NADPH na solução controle e na amostra foi acompanhado pelo decréscimo de absorbância em 340 nm (pico da forma reduzida), em um espectrofotômetro Beckman DU-70, que também permite a impressão dos gráficos obtidos.

3.9.2 Metabolismo microsomal em ratos

O meio de incubação controle conteve até 0,06 mg/mL de proteína microsomal e até 10 µM de DIP, sendo que também foram feitos controles do sistema regenerador na presença da membrana microsomal e do sistema regenerador somente na presença da droga. A biotransformação de DIP conduzida por microsomas hepáticos de ratos foi acompanhado pela variação da intensidade de fluorescência da droga em 496 nm, quando da excitação em 415 nm, sendo as medidas conduzidas no mesmo aparelho já citado.

3.10 Incubação com CO

Para os ensaios de inibição do complexo enzimático citocromo P₄₅₀ foram utilizadas alíquotas de 40 µL de solução de H₂O desionizada saturada por borbulhamento com CO. Alíquotas foram adicionadas a amostras de mesma composição às determinadas para metabolismo microsomal hepático de DIP em camundongos e ratos, sendo pré-incubadas com CO por 5 minutos na presença de NADPH, previamente à adição de DIP.

A solução saturada de CO apresenta uma concentração $2,6 \times 10^{-5}$ M como determinado por titulação com hemoglobina (dados não mostrados), a alíquota utilizada para detecção e quantificação de citocromo P₄₅₀ foi equivalente a uma concentração de 10^{-7} M.

Foram determinadas as constantes de velocidade de consumo de DIP em condições metabólicas, sendo k a constante de velocidade de consumo de DIP obtida pelo decréscimo de intensidade de fluorescência em 496 nm ($\lambda_{exc} = 415$ nm), através da razão V_{in}/C_{in}^D onde V_{in} é a velocidade do decréscimo de fluorescência obtida pela tangente do ponto médio na declividade inicial da curva de decaimento e C_{in}^D é a concentração inicial de DIP; k_r sendo a razão entre as k obtidas na presença de CO e na ausência de CO.

3.11 Estimativa de Lipoperoxidação

Concentrações com um máximo de 0,5 mg/mL de proteína microsomal foram incubadas em meio contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, ao qual foram adicionadas concentrações de DIP até uma concentração final de 10 µM na presença ou na ausência do sistema regenerador de NADPH, sempre para um volume final de 0,5 mL. Também foram feitos experimentos na presença ou ausência de EDTA.

Todas as amostras em duplicata com um mínimo de 3 experimentos, foram incubadas por 20 minutos a 37 °C.

Após a incubação, 2 µl de butil hidróxi tolueno (BHT) 100 µM foram adicionados para inibir o processo oxidativo e as amostras foram tratadas com 1 mL de H₂SO₄ 0,04 M, 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% em NaOH 2,5 M. Em seguida as amostras foram incubadas a 90 °C por 20 minutos e 5 mL de n-butanol foram adicionados à mistura, que foi centrifugada a 1000xg por 15 minutos. As substâncias reativas ao TBA (TBARS) foram determinadas na camada orgânica por medidas de fluorescência utilizando-se $\lambda_{exc}= 515$ nm e $\lambda_{emis}= 555$ nm. O conteúdo de TBARS foi calculado com base em uma curva padrão de 1, 1, 3, 3-tetraetóxiopropano (Yagi, 1976).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de atividade microsomal cerebral

Para testar a integridade da atividade enzimática microsomal, foram feitas dosagens de proteína pelo método de Lowry e colaboradores (1951). As preparações cerebrais apresentaram um valor médio de 3,4 mg/mL, porém, apesar do teor proteico, o máximo volume obtido a partir de 10-14 animais não ultrapassou 3,0 mL, insuficiente para os ensaios metabólicos.

A concentração de P_{450} em cérebro de ratos é em torno de 4% do nível hepático e apresenta múltiplas isoformas como demonstrado por resultados de imunoinibição e "imunoblotting"; ensaios imunocitoquímicos detectaram P_{450} , predominantemente, em corpos celulares de neurônios e, em menor quantidade, córtex cerebral, cerebelo, tálamo, hipotálamo, e hipocampo (Anandatheerthavarada *et alii.*, 1990; Bhamre *et alii.*, 1992).

Os microsomas cerebrais foram obtidos de homogenato de cérebro sem o cerebelo e além do pequeno volume obtido, contiveram uma mínima quantidade de P_{450} , da ordem de picomoles/mg de proteína, sendo parte na forma de citocromo P_{420} , forma solúvel de P_{450} e que não participa de processos de biotransformação. A identificação do citocromo P_{420} foi feita através do pico de absorção característico em 420 nm (Omura & Sato, 1964) que aparece concomitante com o pico do citocromo P_{450} como verificado na Figura 3.

A forma solúvel P_{420} pode ser reduzida por NADPH ou NADH em condições anaeróbicas, porém diferentemente do P_{450} , não sofre redução na presença dessas coenzimas quando em aerobiose. A conversão de P_{450} em P_{420} é facilmente obtida pela digestão anaeróbica de microsomas com veneno de cobra ou deoxicolato, agentes que podem atacar fosfolípidos de membrana (Omura & Sato, 1964).

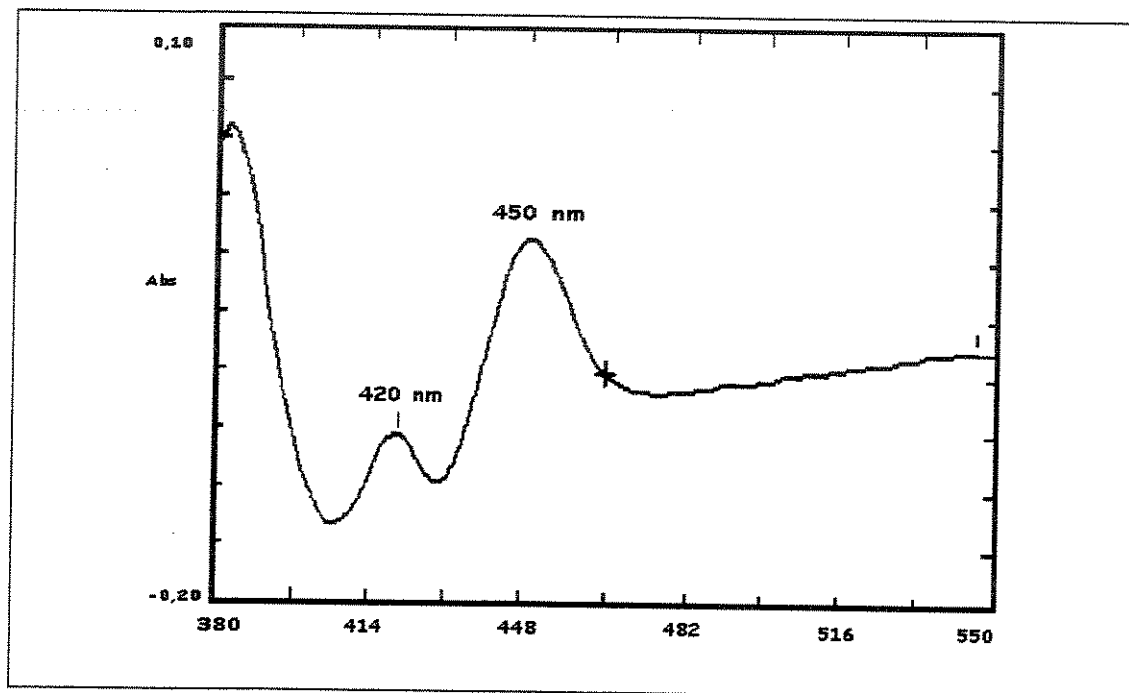


FIGURA 3. Espectro de absorção de MCR.1,0 mg/mL de proteína em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, reduzidos por ditionito de sódio e complexados com CO, 25 °C.

É possível que a solubilização de parte da população de citocromo P_{450} seja decorrente de uma maior susceptibilidade da membrana microssomal cerebral aos experimentos preparativos. Várias foram as tentativas de estabelecer uma metodologia adequada, no entanto as preparações cerebrais não apresentaram resultados repetitivos, tendo sido descartada por todos os motivos citados.

O estudo do metabolismo de xenobióticos mediado pelo citocromo P_{450} cerebral é de extrema importância, não só pela possibilidade de regulação local da ação farmacológica, mas igualmente pela geração de metabólitos inativos ou mais ativos, pelo vazamento de espécies reativas de oxigênio e seus efeitos, ou ainda pelo possível envolvimento na patogênese de várias desordens neurodegenerativas (Ravindranath *et alii.*, 1989).

A isoforma debrisoquina hidroxilase, por exemplo, é um dos maiores receptores de inibidores do transporte de dopamina (Niznik *et alii.*, 1990), também foi

sugerido que uma isozima P_{450} pode ser um receptor sigma dopaminérgico (Ross, 1990; Klein *et alii.*, 1991). Como muitos ligantes de receptores sigma apresentam efeitos psicotomiméticos, citocromos P_{450} podem estar envolvidos com estados psicóticos (LaBella, 1991).

4.2 Teste de atividade microssomal hepática

4.2.1 Caracterização espectral de citocromo b_5 e citocromo P_{450}

Os testes para verificação de atividade enzimática microssomal foram conduzidos após a determinação de concentração protéica total (17,6 mg/mL como valores médios) e, posterior identificação e dosagem de citocromo P_{450} e citocromo b_5 por espectros de absorção (Omura & Sato, 1964) como mostrado na Figura 4.

Os valores médios de citocromo P_{450} atingiram 0,2 μ moles/mg de proteína para microssomas hepáticos de camundongos e 0,6 μ moles/mg de proteína para ratos; valores de concentração de citocromo b_5 variaram em torno de 1,4 μ moles/mg para ambos animais. Tais valores estão de acordo com a literatura (Baker *et alii.*, 1990).

Ratos Wistar mostram uma peculiaridade no que tange a concentração de citocromo P_{450} , machos contêm uma maior concentração do que fêmeas, diferentemente do encontrado para humanos e outros mamíferos (Schenkman *et alii.*, 1967), sendo por este motivo utilizados para experimentos de metabolização de DIP.

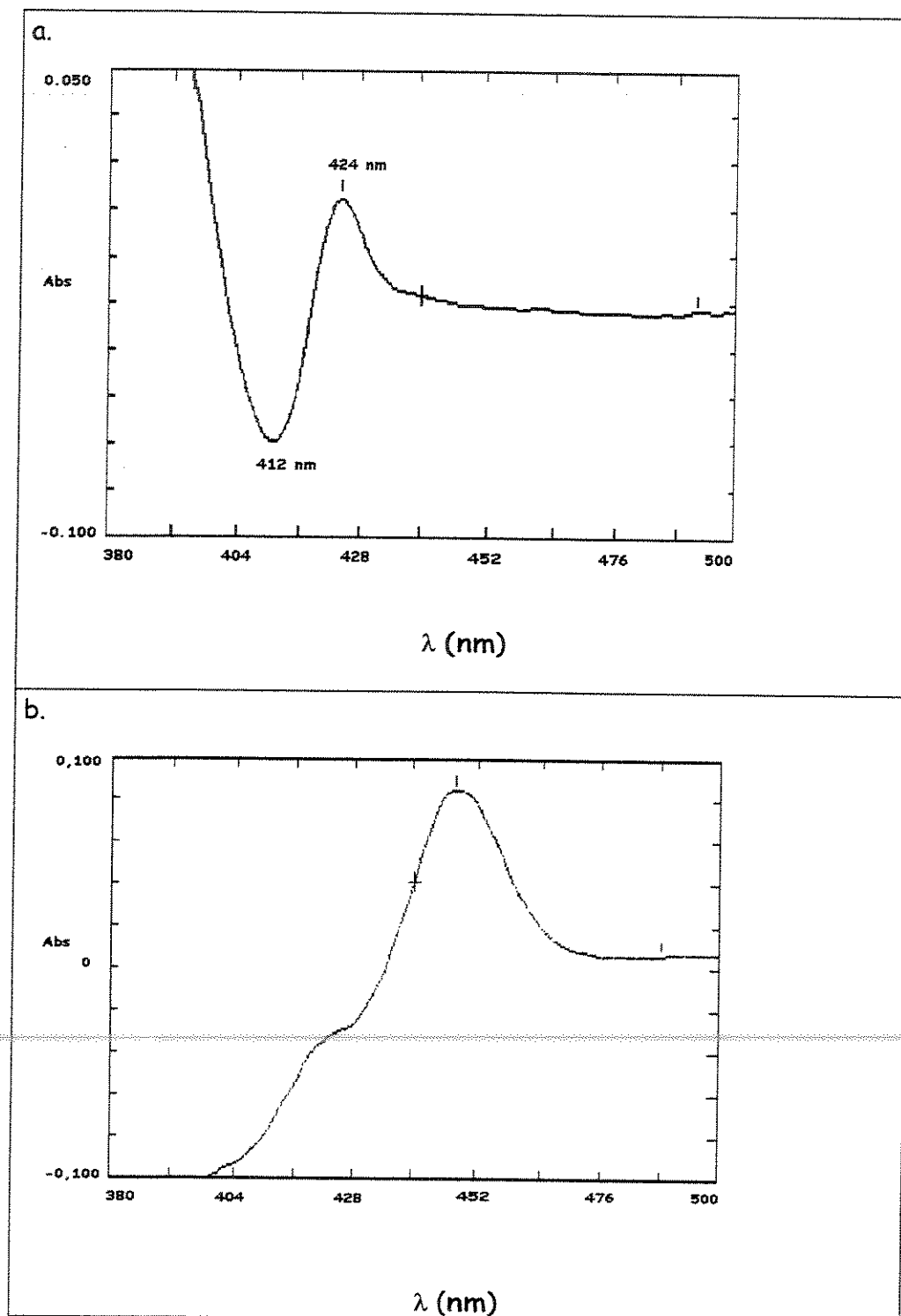


FIGURA 4. Espectros de absorção de citocromos microssomais. MHR 1mg/mL de proteína. Espectro de citocromo b_5 , obtido pela redução com ditionito de sódio, com picos característicos em 424 nm e 412 nm; espectro de citocromo P_{450} obtido pela complexação da amostra anterior com CO, com pico característico em 450 nm.

4.2.2 Indução de citocromo P₄₅₀ por PB e 3MC

As dosagens protéicas determinaram valores médios de 23 mg/mL. A indução de citocromo P₄₅₀ foi confirmada (Figura 5), sendo o grau de indução compatível com os dados de literatura (Anandatheerthavarada *et alii*, 1990).

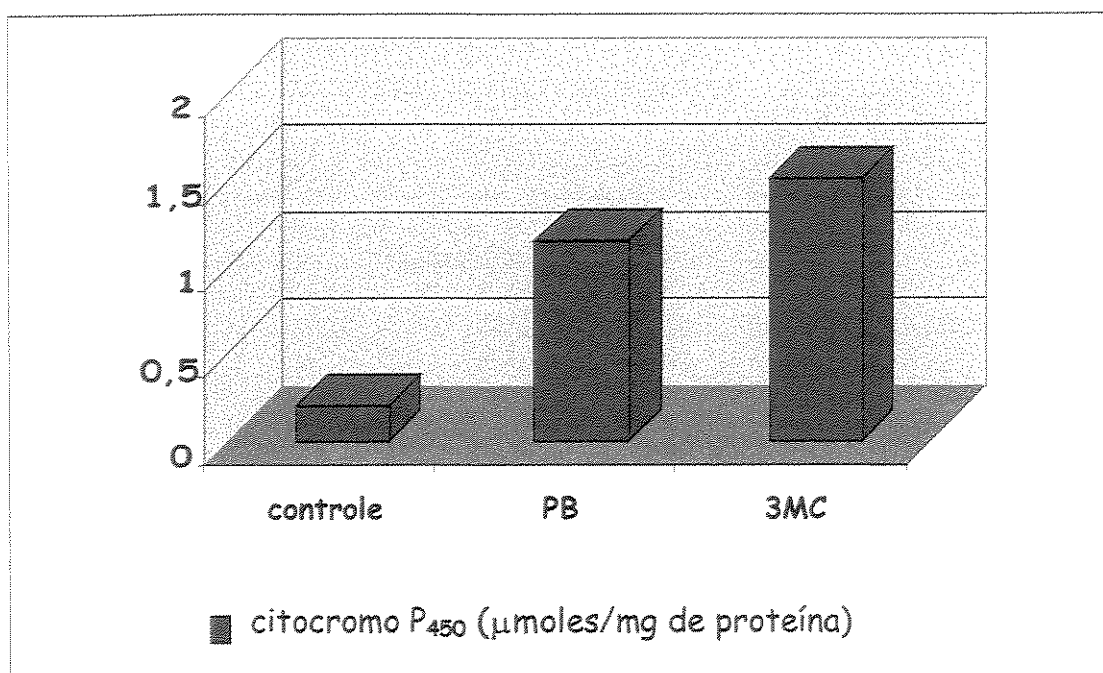


FIGURA 5. Quantificação de indução em MHC. Valores de citocromo P₄₅₀ em preparações microssomais hepáticas controle, tratadas com PB e 3MC.

O processo de indução de isoformas hepáticas visou a obtenção de um corpo de resultados que contribuísse para demonstrar a participação do complexo enzimático citocromo P₄₅₀ na metabolização do DIP. Verificada a indução, foram conduzidos experimentos espectrofotométricos para avaliar a biotransformação de DIP por MHC controle, tratados com PB e com 3MC.

4.3 Metabolismo hepático de DIP

A observação direta do metabolismo microsomal hepático de DIP por espectrofotometria é inviável em virtude do baixo coeficiente de extinção da droga na região do visível, $\epsilon_M = 5400 \text{ cm}^{-1}$ em 415 nm (Borisevitch & Tabak, 1992). Além do que, as suspensões colaboram aditivamente com o grau de espalhamento de luz. Sendo DIP um xenobiótico lipofílico e, portanto, potencial substrato de monooxigenases hepáticas NADPH-dependentes, analisou-se o metabolismo pela oxidação do cofator, doador de equivalentes redutores à reação.

Para tal, quando quantidades iguais de NADPH foram adicionadas ao meio de incubação contendo microsomas- meio controle e à amostra - microsomas e droga, observou-se um decréscimo na concentração do cofator reduzido em 340 nm (Fig. 6). O consumo de NADPH foi dependente do tempo, sempre zerando contra o meio controle.

A Figura 6 mostra também um decréscimo no pico correspondente ao citocromo b_5 reduzido, com um máximo em 424 nm e um mínimo em 412 nm. O pico surgiu no espectro diferencial de microsomas, logo após a adição de NADPH à amostra e permaneceu inalterado até que NADPH pudesse ser detectado (espectros 1-3), quando então decresceu (espectros 4-6).

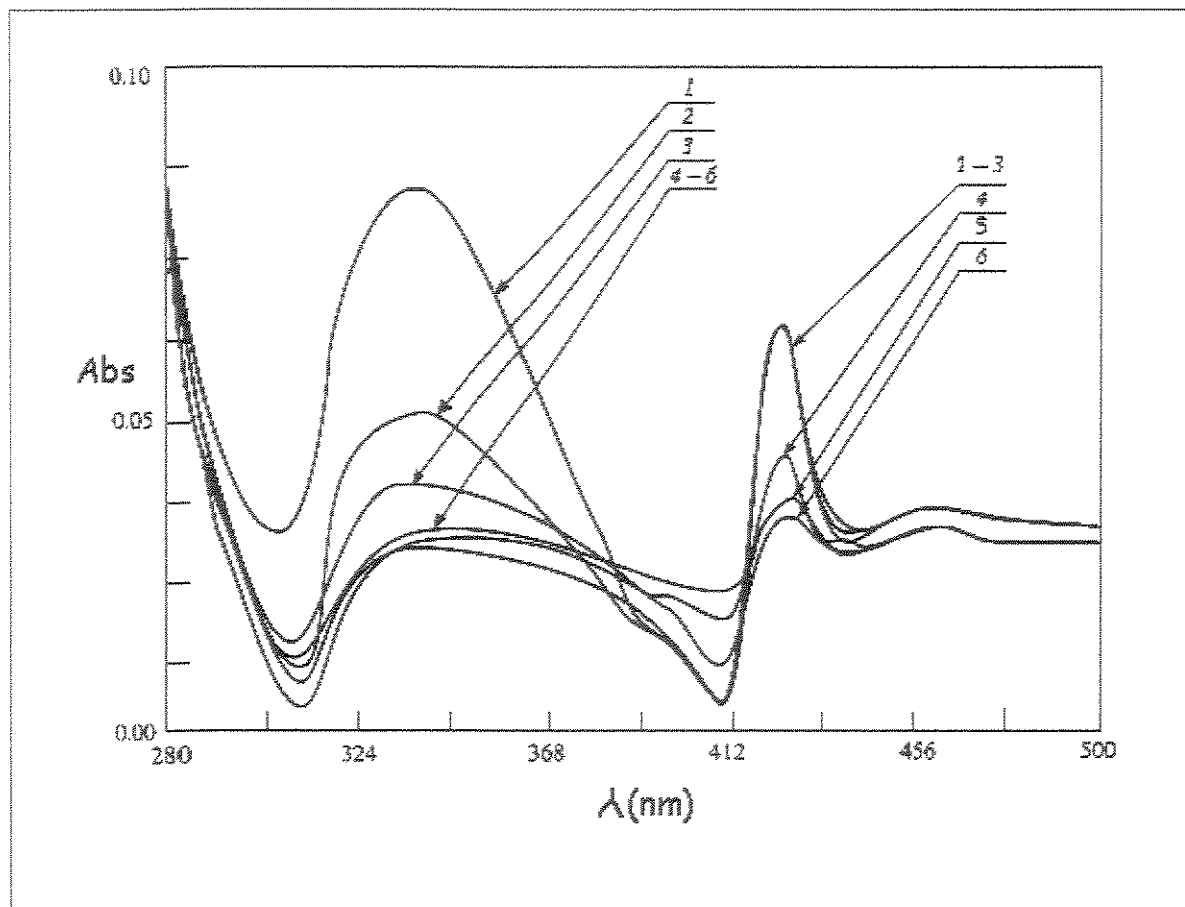


FIGURA 6. Espectro de absorção UV-Vis de NADPH e citocromo b_5 no metabolismo de DIP por MHC_{3MC} . Os espectros diferenciais foram coletados em intervalos de 2 min contra controles contendo MHC_{3MC} e DIP. As concentrações iniciais foram 10 μM de DIP, 0,3 mg/mL de proteína microsomal e 0,6 mM de NADPH, 25 °C.

A oxidação só foi detectada para concentrações protéicas acima de 0,30 mg/mL (Fig. 7), não havendo redução perceptível em concentrações inferiores. Tampouco algum decréscimo foi observado no controle, quando da incubação de NADPH com 0,6 mg/mL de proteína microsomal na ausência da droga, durante um intervalo de 2 horas.

Os resultados demonstram consumo do cofator em condições metabólicas para o DIP, bem como a oxidação do citocromo b_5 já na ausência de NADPH. Considerando que citocromo b_5 pode transferir o segundo elétron ao citocromo P_{450} , sua participação pode ser indicativa de que o substrato em questão poderia estar sofrendo uma redução (Pompon & Coon, 1984; Guengerich *et alii*, 1995).

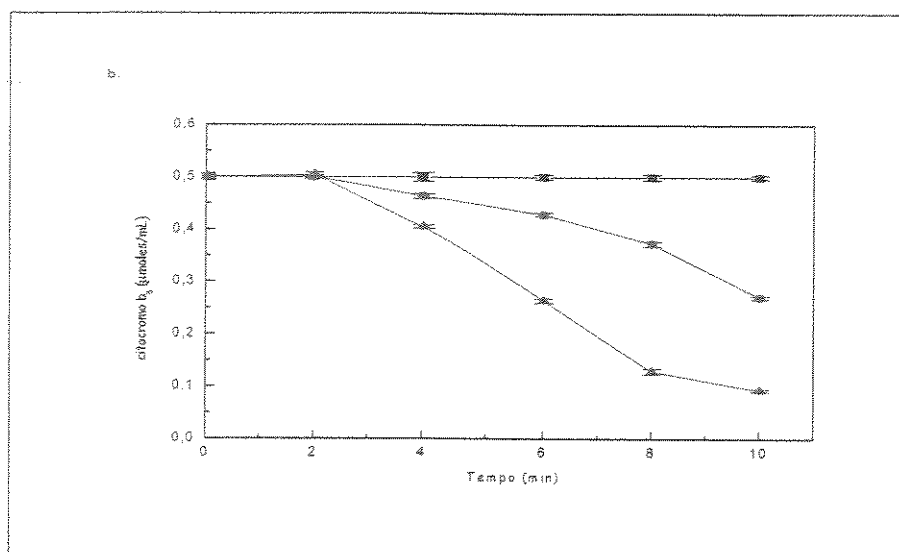


FIGURA 7. Oxidação do citocromo b_5 pelo metabolismo microssomal de DIP. 0,3 mg de proteína/mL, 10 μ M de DIP, 0,6 mM de NADPH em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, 25 °C. Cálculos obtidos do espectro de absorção do citocromo b_5 . (■) MHC controle, (●) MHC tratados com PB e (▲) MHC tratados com 3MC. Os valores foram normalizados em relação a MHC controle.

Tem sido demonstrado que a participação do citocromo b_5 pode ativar, inibir ou mesmo não afetar o metabolismo P_{450} -dependente, sendo os resultados experimentais claramente dependentes da isoforma envolvida, do substrato e das condições de protocolo. Como resultado da transferência do segundo elétron pelo b_5 , a oxidação do substrato catalisada pelo P_{450} torna-se mais eficiente, ou seja, uma maior concentração de produto é obtida às expensas de subprodutos tais como superóxido (Vergères & Waskell, 1995).

4.3.1 Velocidades de oxidação de NADPH

Os coeficientes de velocidade de oxidação do cofator em condições propícias ao metabolismo de DIP foram observados para microssomas controle, tratados com PB e 3MC em função da concentração protéica. Os valores de k foram obtidos pela diferença $k_D - k_c$, sendo k_D a velocidade de oxidação de NADPH na amostra contendo DIP e k_c a velocidade de oxidação de NADPH no controle, contendo apenas microssomas

e cofator. k é dado pela razão entre a velocidade de oxidação de NADPH e a sua concentração num tempo $t=0$. Os resultados representam a média de no mínimo três experimentos espectrofotométricos.

A Figura 8 mostra um aumento na velocidade de oxidação de NADPH na presença de DIP para microsomas tratados em relação ao controle, apresentando um máximo para 0,6 mg/mL de MHC tratados com 3MC.

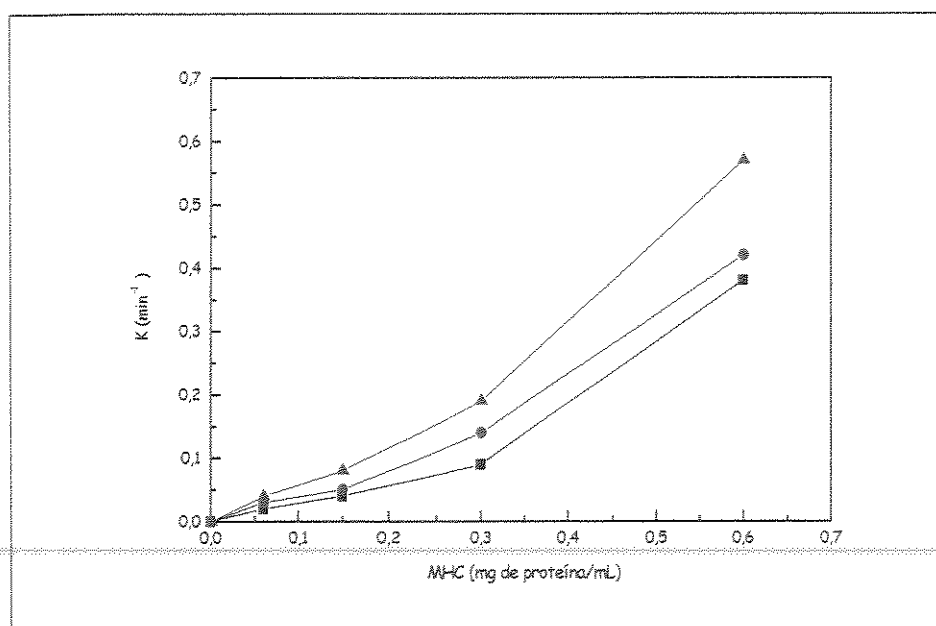


FIGURA 8. Coeficientes de velocidade de oxidação de NADPH para o metabolismo de DIP. 10 μ M de DIP em meio de incubação contendo 0,6 mM de NADPH e até 0,6 mg/mL de proteína microsomal, sendo (■) MHC controle, (●) MHC tratados com PB e (▲) MHC tratados com 3MC.

3MC é reconhecidamente, um potente indutor de isoformas citocromo P₄₅₀, como etóxicoumarina-O-deetilase, arilhidrocarboneto hidroxilase e etoxiresorufina O-dealquilase (CYP 1A1), enquanto PB induz pentoxiresorufina O-dealquilase (provável CYP IIB1), aminopirina N-demetilase e morfina N-demetilase (Anandatheerthavarada *et alii*,

1990; Balvers *et alii.*, 1992). Uma vez que os coeficientes de velocidade de oxidação de NADPH são maiores ($k_{3MC} > k_{PB} > k_C$) para preparações obtidas de animais tratados com indutores de citocromo P_{450} e, aliado a este resultado, os valores aumentam à medida que é maior a concentração protéica, este corpo de resultados constitui outra evidência da participação do complexo enzimático P_{450} na biotransformação do DIP.

4.3.2 Inibição do metabolismo microsomal hepático de DIP em presença de CO

Monóxido de carbono-CO é um dos mais tradicionais inibidores de hemoproteínas, apresenta uma afinidade extremamente alta por hemoglobina, sendo inclusive utilizado para dosagem de citocromo P_{450} reduzido por ditionito de sódio (Omura & Sato, 1964). A pré-incubação conforme descrita em Materiais e Métodos se faz necessária, uma vez que CO só complexa com a forma reduzida de citocromo P_{450} , enquanto que esta enzima precisa estar oxidada para conduzir a catálise (Guengerich *et alii.*, 1995).

O decaimento de intensidade de fluorescência do DIP em condições de metabolização por MHC na presença e na ausência de CO forneceu os resultados apresentados na Tabela II, sendo os valores de k obtidos como descrito em Materiais e Métodos.

Tabela II. Efeito de CO sobre o consumo de DIP por MHC

Tratamento	microssomas controle		Microssomas tratados com PB		microssomas tratados com 3MC	
	$k \times 10^3$	k_r	$k \times 10^3$	k_r	$k \times 10^3$	k_r
sem CO	16 ± 6 n=4	1,0	56 ± 11 n=3	1,0	30 ± 2 n=3	1,0
com CO	$5 \pm 0,3$ n=4	$0,3 \pm 0,1$ n=4	$10 \pm 1,2$ n=3	$0,3 \pm 0,1$ n=3	$16 \pm 0,7$ n=3	$0,5 \pm 0,3$ n=3

Os valores demonstram que a presença de CO inibe o consumo de DIP em condições metabólicas, mais significativamente em microssomas tratados com PB. Tais resultados não confirmam os resultados de velocidade de oxidação de NADPH e citocromo b_5 , que mostram ser mais eficiente a metabolização catalisada por enzimas microssomais induzidas por 3MC, porém as constantes apresentam um desvio padrão considerável.

Por outro lado, estes dados demonstram que de fato quando DIP está na presença de muitas isoformas em pequenas concentrações, os valores de coeficiente de velocidade de oxidação de cofator apresentam um desvio significativo, enquanto que na presença de isoformas induzidas por PB e 3MC (menor número de isoformas, porém em maiores concentrações) o desvio cai consideravelmente. Logo, podemos inferir que algumas das isoformas induzidas deve apresentar maior especificidade catalítica na metabolização de DIP, o que justificaria um menor desvio padrão e confirmaria a participação de citocromo P_{450} neste processo.

4.4 Interação DIP-membrana microssomal hepática

Num primeiro momento, 295 nm foi escolhido como λ de excitação, não só por resultar na emissão de uma maior intensidade de fluorescência do DIP (Fig. 9) mas também por excitar mais especificamente Trp de membrana, permitindo uma dupla análise: o efeito da droga sobre a membrana microssomal e o efeito da membrana sobre a intensidade de fluorescência emitida pelo DIP. Para tal, foram feitos os controles de espalhamento de luz pelos valores de absorbância em 295, 343, 415 e 496 nm nas suspensões microssomais incubadas com 10 μ M de DIP, sendo selecionadas concentrações entre 0,01 e 0,06 mg/mL. Essas concentrações apresentaram absorbância $\leq 0,15$, portanto evitando os efeitos de filtro primário e secundário que poderiam mascarar os resultados de fluorescência (Fig 9).

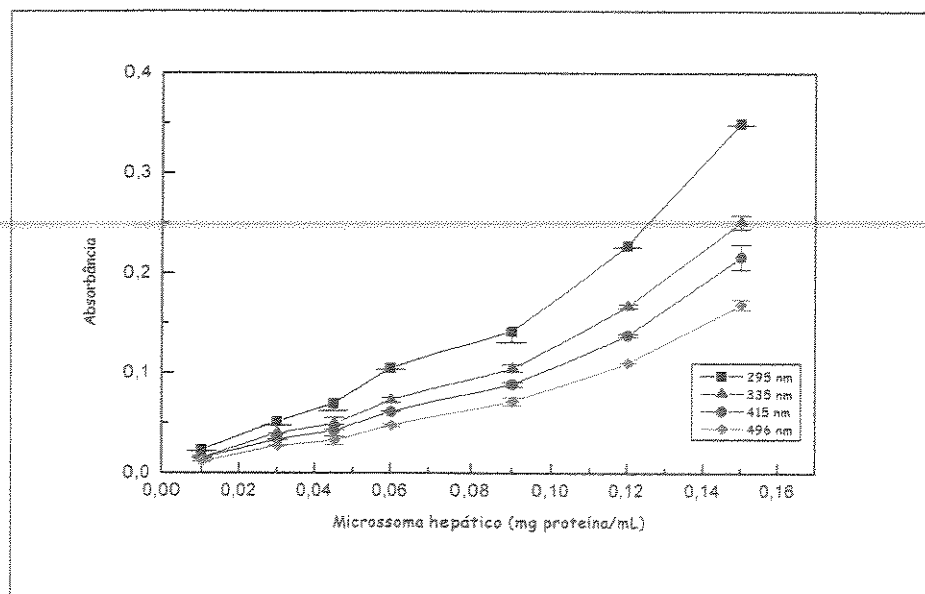


FIGURA 9. Controle de espalhamento de luz MHR-DIP. Concentrações de MHR incubadas com 10 μ M de DIP, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, 25 °C.

Considerando os resultados obtidos por espectrofotometria e o recém exposto, optou-se por confirmar a biotransformação do DIP por fluorescência, acompanhando agora o espectro de emissão do composto em 496 nm, excitado em 415 nm.

Os dados espectrofotométricos dos ensaios de interação DIP-membrana para avaliar os efeitos do composto sobre a membrana, utilizando $\lambda_{exc}= 295$ nm e $\lambda_{emis}= 343$ nm foram omitidos. A variação de intensidade de fluorescência foi extremamente pequena, dificultando uma análise acurada dos resultados.

No tocante à biotransformação de DIP por sistemas enzimáticos microsossomais, fez-se o estudo da interação de DIP com as membranas, objetivando analisar possíveis modificações espectrais da droga quando em condições não-metabólicas. Foram utilizadas concentrações de proteína microsossomal até um máximo de 0,06 mg/mL uma vez que para concentrações superiores o espalhamento de luz é detectado.

Não foi observado deslocamento algum no pico de intensidade de fluorescência da droga na presença de membrana, apenas uma redução na intensidade (Figura 10). Tampouco a presença de CO causou modificações no espectro de fluorescência para concentrações de até 5 μ M de DIP, durante 1 hora a 25 °C (resultados não mostrados).

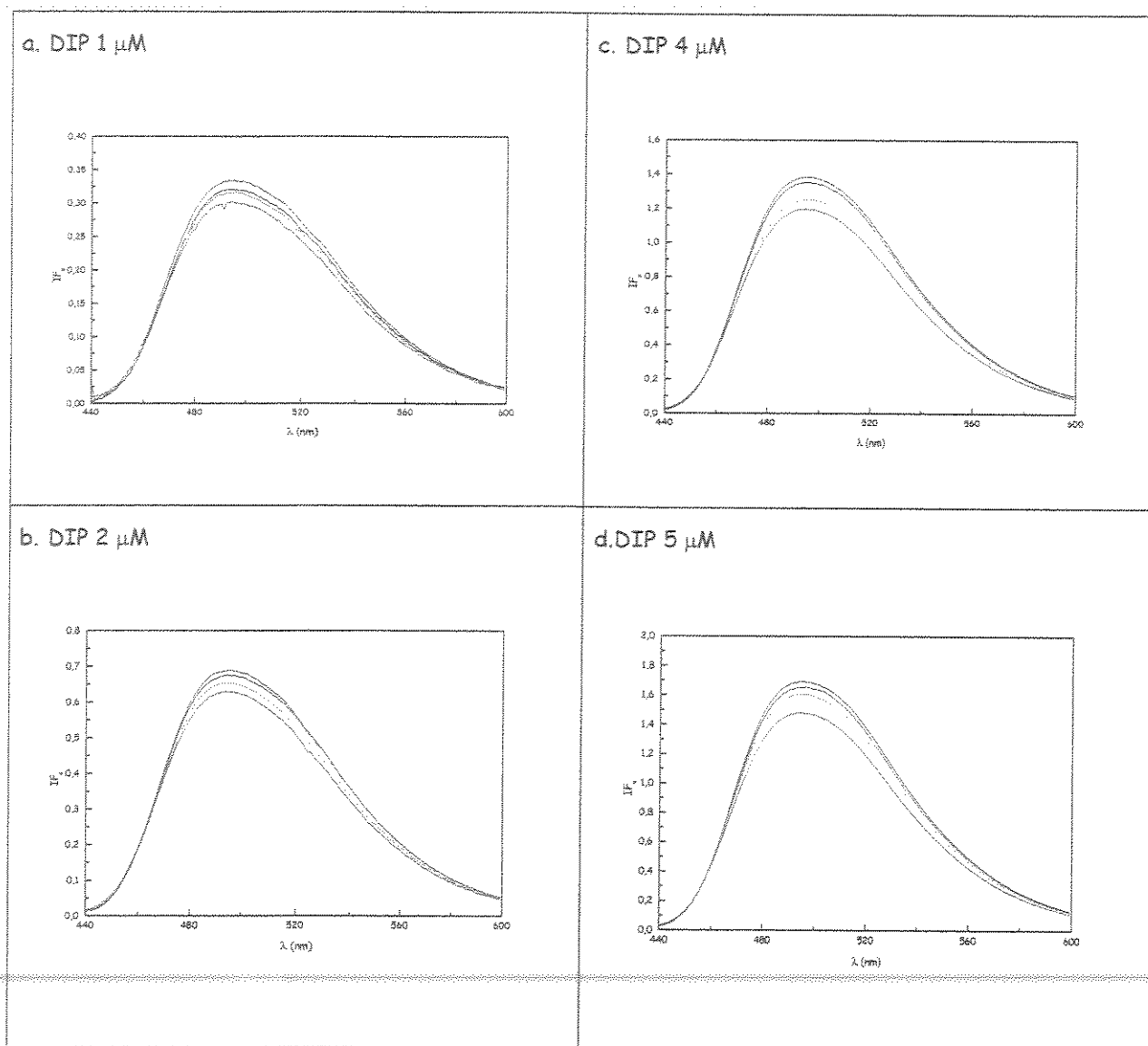


FIGURA 10. Espectros de fluorescência da interação não-metabólica DIP-MHR. Concentrações de DIP incubadas com membrana microssomal, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, 25 °C. (—) DIP controle, (---) com 0,01 mg/mL, (···) com 0,03 mg/mL, (- · -) com 0,06 mg/mL.

O que também pode ser observado foi um pequeno aumento da intensidade de fluorescência da droga na presença de 0,01 mg/mL de proteína microssomal, exceto para a concentração de 5 μ M, em todos os experimentos. A Fig. 11 apresenta valores comparativos.

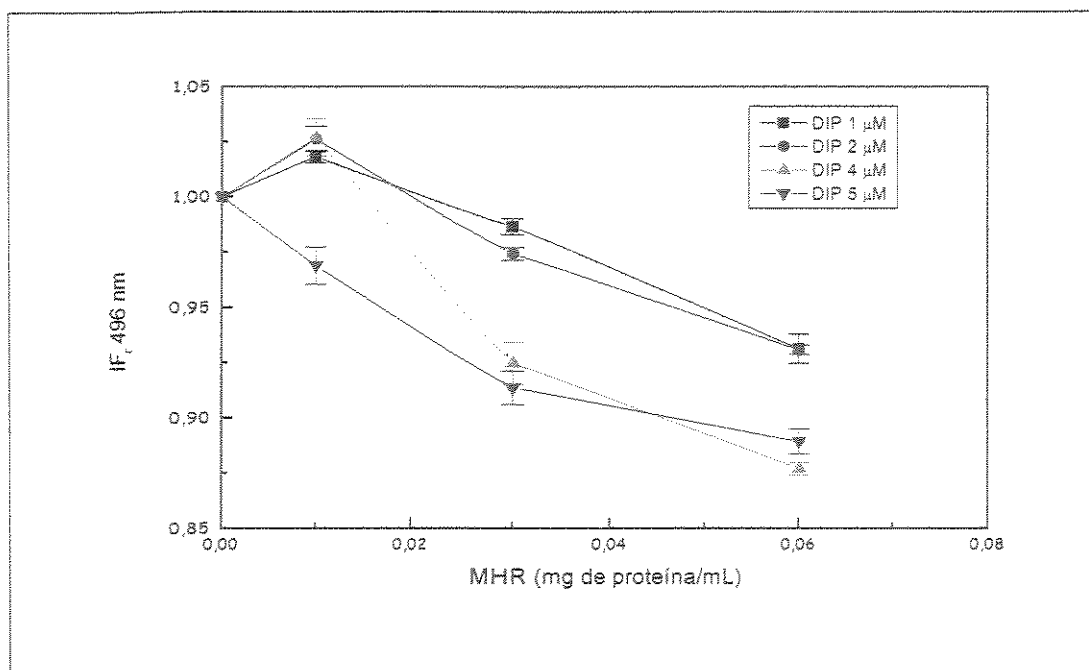


FIGURA 11. Decaimento da intensidade de fluorescência de DIP em condições não-metabólicas. Concentrações de DIP em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, 25 °C, incubado com diferentes concentrações protéicas de MHR.

É provável que o acréscimo de intensidade de fluorescência observado seja decorrente de um equilíbrio entre moléculas de DIP ligadas à membrana e livres em solução, como verificado para interação de DIP com micelas de lisofosfatidilcolina. A droga apresenta-se totalmente desprotonada em pH 5,8, sendo que na presença de membrana o valor de pK passa a 7,4 (Tabak & Borisevitch, 1992). Algumas considerações podem ser feitas:

- a) considerando significativo o pequeno aumento de intensidade de fluorescência, em concentrações muito pequenas de DIP, é plausível que todas as moléculas estejam prioritariamente na fase aquosa, sendo imperceptível qualquer partição da droga na fase membranar;
- b) ou ainda, a disponibilidade de lipídeos de membrana que favoreceriam a partição de DIP nos microssomas, é muito pequena dado que as

concentrações de MHR são muito baixas e a contribuição lipídica pequena (10%);

- c) o mesmo não se verifica para concentrações maiores, provavelmente pela presença de uma maior concentração de DIP, com deslocamento do equilíbrio favorecido pela interação com a fase membranar, podendo assim ser detectada.

Assim sendo, os resultados demonstram a existência de redução na intensidade de fluorescência da droga em função do aumento de concentração de proteína de membrana microssomal, evidenciando que há uma interação efetiva de concentrações terapêuticas de DIP com a fase membranar, na ausência de condições propícias ao metabolismo.

4.5 Biotransformação do DIP acompanhada por fluorescência

Os resultados dos experimentos de biotransformação de DIP por membranas microssomais, portanto na presença de cofator (SRNADPH), evidenciam a existência de uma cinética de decaimento da intensidade de fluorescência da droga.

Na Figura 12 pode ser observado que mesmo a fluorescência emitida pela droga em tampão, apresenta oscilações próprias do desvio das medidas experimentais, enquanto o decaimento em presença do meio membranar confirma ensaios anteriores nos quais o tempo de incubação era pequeno (5 minutos). Os valores utilizados para cálculos de velocidade levaram em consideração a redução de fluorescência decorrente da interação DIP-membrana.

A cinética em condições metabólicas não apresenta-se monofásica, no primeiro intervalo de 30 minutos pode ser observado um rápido decaimento da emissão de fluorescência, entre 30 e 60 minutos foi detectada uma pequena redução na

velocidade e a partir de 60 minutos de incubação os valores se mantiveram constantes. É provável que um processo de lipoperoxidação tenha sido desencadeado pela ação de radicais livres provenientes do próprio mecanismo metabólico.

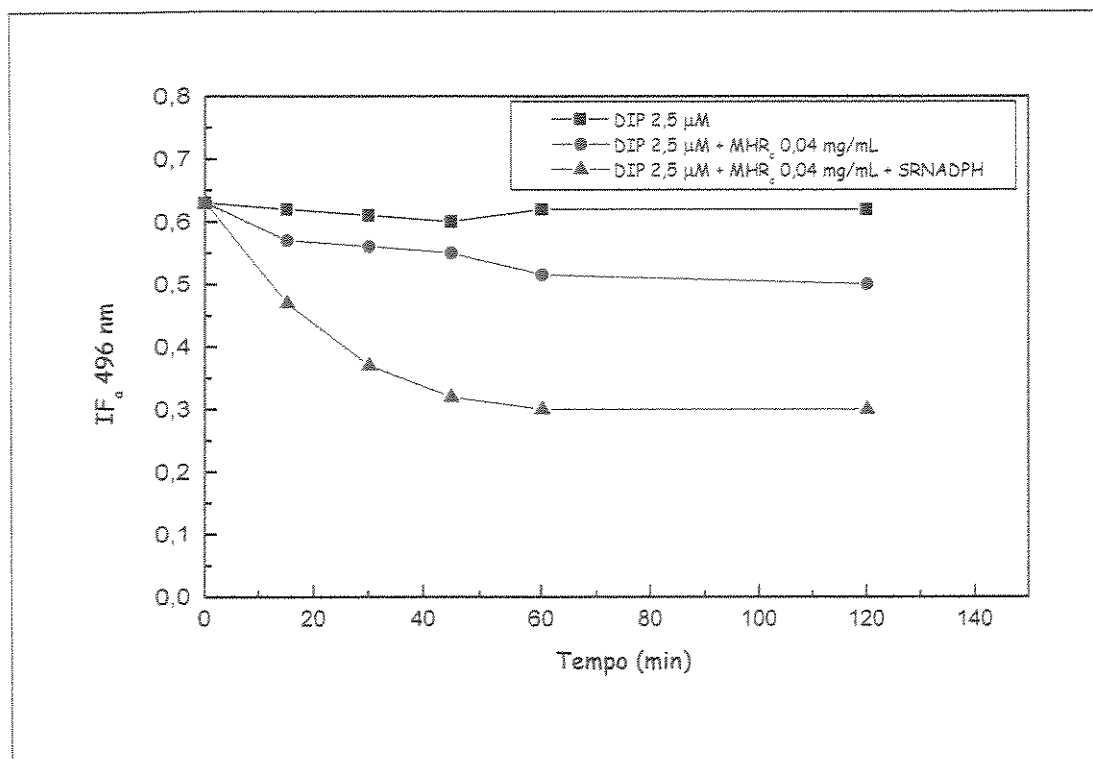


FIGURA 12. Interação metabólica e não-metabólica de DIP com MHR por fluorescência. DIP 2,5 µM, 0,04 mg/mL de proteína microssomal na presença e na ausência de SRNADPH, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, 25 °C.

O processo lipoperoxidativo NADPH-dependente que ocorre em membranas microssomais parece envolver mais a destruição do grupamento heme do que a ruptura da integridade da membrana (Svingen *et alii.*, 1979).

Por outro lado, a destruição peroxidativa do citocromo P₄₅₀ e, provavelmente também do citocromo b₅, pode ser responsável pela rápida perda de linearidade da atividade biotransformadora de drogas (Levin *et alii.*, 1973). A cinética metabólica microssomal de DIP, nestas condições, não apresenta uma linearidade proporcional à concentração protéica. A interação da droga com a fase membranar pode

modular o reconhecimento do sítio catalítico pelo substrato, dado que há uma inserção prévia da droga na superfície.

Existem interações entre NADPH citocromo P_{450} redutase e P_{450} , bem como entre b_5 e P_{450} (como neste caso, conforme demonstrado pelo consumo oxidativo de citocromo b_5 em condições metabólicas) para catálises oxidativas de vários substratos que podem ser moduladas pela porção polar da bicamada lipídica (Shank-Retzlaff *et alii.*, 1998).

As melhores curvas de decaimento foram obtidas para concentrações de 0,03 mg/mL de proteína microssomal e 2,5-5 μM da droga (Fig. 13), permitindo o cálculo de velocidades parciais apresentadas na Tabela III.

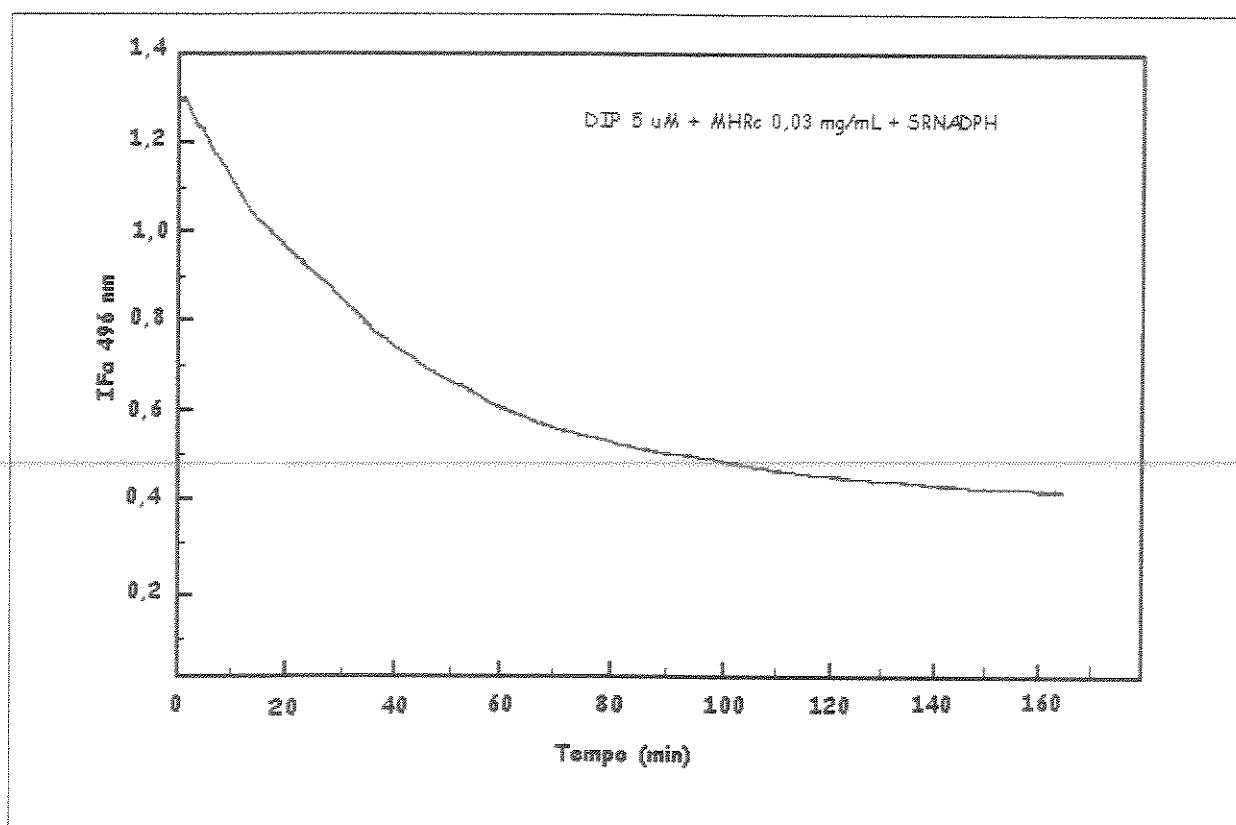


FIGURA 13. Intensidade de fluorescência absoluta de DIP x tempo em condições metabólicas. Meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, acompanhado a 25 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 415 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emis}} = 496 \text{ nm}$.

Tabela III- Velocidades de consumo metabólico de DIP

Tempo (min)	$V_{\text{média}} (\mu\text{M}/\text{min})$	
	DIP 2,5 μM	DIP 5 μM
30	$\pm 1,7 \times 10^{-6}$	$\pm 2,8 \times 10^{-6}$
60	$\pm 3,7 \times 10^{-7}$	$\pm 1,5 \times 10^{-6}$
90	$\pm 6,1 \times 10^{-8}$	$\pm 6,8 \times 10^{-7}$
120	$\pm 6,1 \times 10^{-8}$	$\pm 3,7 \times 10^{-7}$

Nas concentrações de 0,06 mg/mL de proteína o decaimento foi mais abrupto e acompanhado por menores intervalos de tempo, sendo as velocidades calculadas levando em consideração apenas o intervalo de tempo total de duração do experimento. Maiores concentrações de membrana e, conseqüentemente de citocromo P₄₅₀ biotransformam a droga a mais rapidamente, sempre que em presença de concentrações não limitantes de coenzima e de b₅, de acordo com o esperado.

Os dados de literatura analisam o metabolismo de drogas mediado pelo sistema microssomal citocromo P₄₅₀ pela avaliação de atividades enzimáticas específicas (os nossos resultados não podem ser comparativos uma vez que não se tem identificada qual atividade de qual isoforma está preferencialmente envolvida com este substrato). Tampouco foram conduzidos experimentos para detecção e quantificação de metabólitos por técnicas mais apuradas tais como espectrometria de massa, imunoinibição de isoformas, radiometria, etc (Bornheim *et alii*, 1995).

Finalizando, os ensaios metabólicos foram conduzidos com adição prévia de CO, objetivando confirmar a inibição do sistema enzimático responsável pela biotransformação parcial do DIP. A Figura 14 mostra os espectros de fluorescência colhidos após uma corrida à temperatura ambiente, na ausência e presença de CO. Não foram observados deslocamentos no pico em 496 nm, apenas redução na intensidade de fluorescência da droga confirmando a natureza metabólica da interação, parcialmente inibida pela presença de CO.

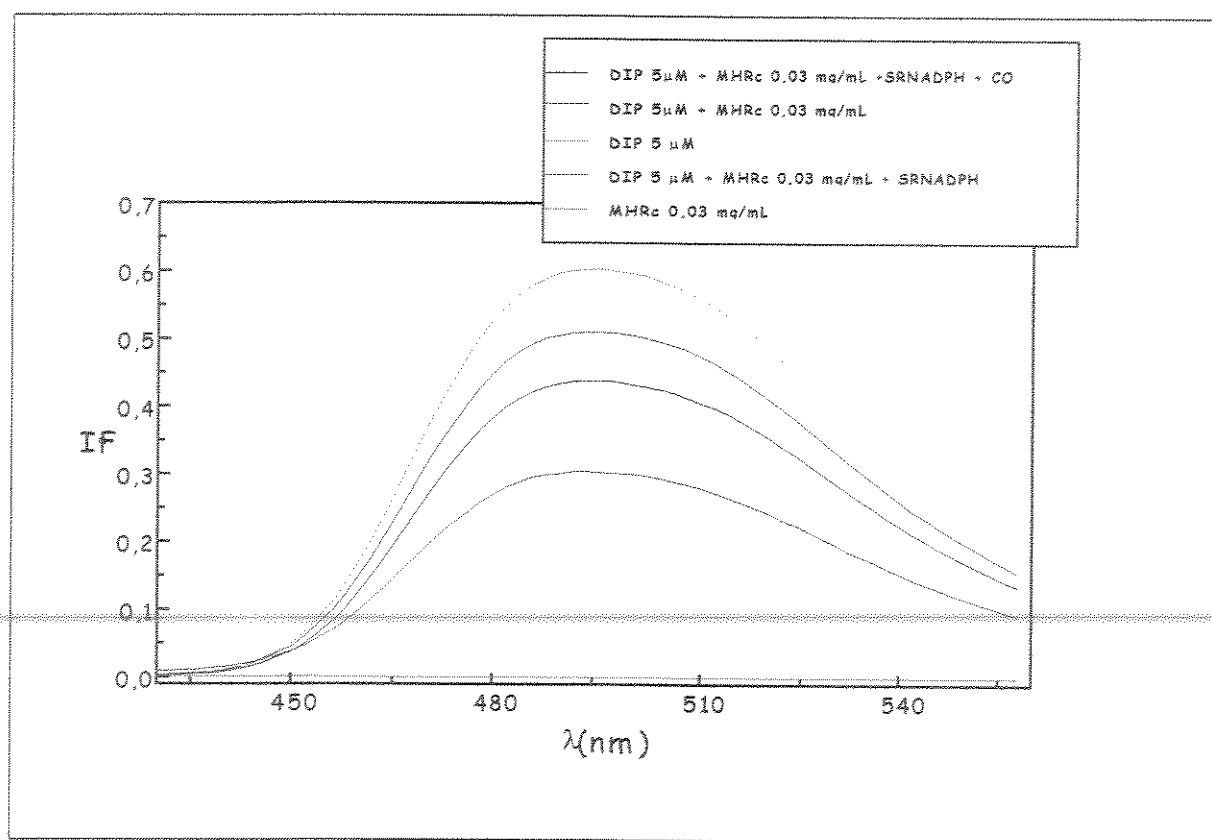


FIGURA 14. Espectros de fluorescência de DIP em condições metabólicas e na presença de inibidor de citocromo P₄₅₀. DIP 5 μM, 0,03 mg de proteína/mL, SRNADPH, CO, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, 25 °C, λ_{exc} = 415 nm.

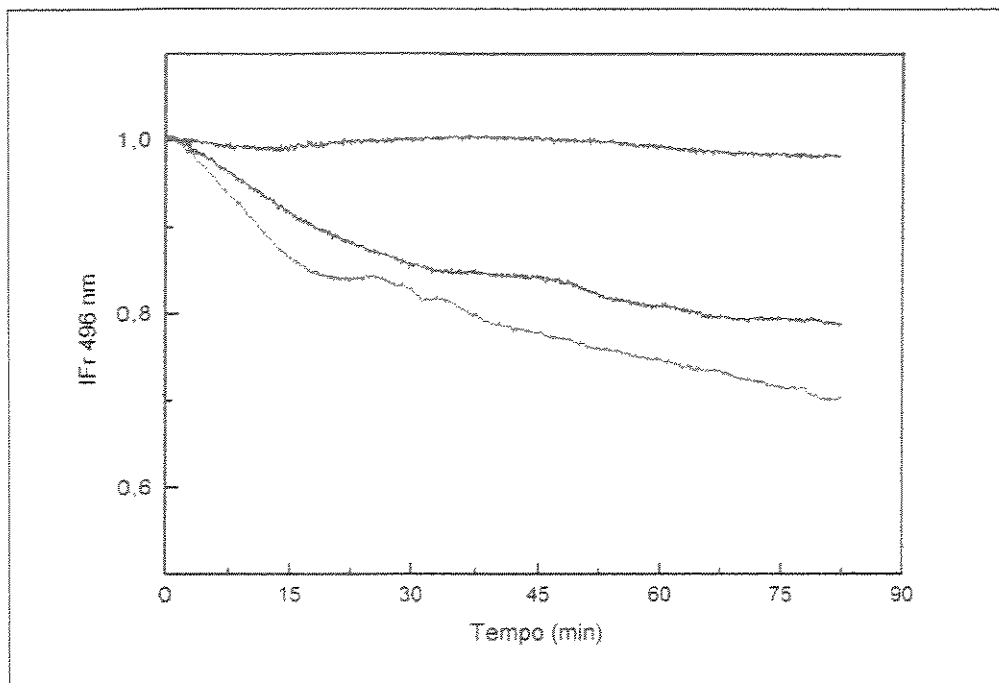


Figura 15. Decaimento de fluorescência de DIP em condições metabólicas e na presença de CO. (—) DIP 5 μ M, (---) DIP 5 μ M + 0,03 mg/mL + SRNADPH + CO, (· · ·) 5 μ M + 0,03 mg/mL + SRNADPH, 25 °C.

A Figura 15 mostra o decaimento da intensidade de fluorescência com o tempo na presença das enzimas microssomais citocromo P_{450} , parcialmente inibida por CO. É possível que outros sistemas enzimáticos presentes na vesícula participem da biotransformação da droga, dado que toda a população enzimática citocromo P_{450} está inativada uma vez que o volume utilizado de solução saturada de CO foi o mesmo utilizado para quantificar citocromo P_{450} em 1,0 mg/mL de proteína microssomal.

4.6 Lipoperoxidação mediada por DIP

DIP não só se caracteriza por apresentar potente ação antioxidante, mas também por potencializar a ação de vários agentes terapêuticos como drogas radioprotetoras, anticancerígenas, entre outras.

Foi verificado que DIP e alguns derivados inibem lipoperoxidação induzida por Fe em mitocôndrias, bem como sugerem que o efeito seja provavelmente decorrente da sua ligação à porção lipídica e não da interação com proteínas da membrana mitocondrial (Nepomuceno *et alii.*, 1997).

Resultados preliminares demonstram que DIP protege a membrana microssomal da lipoperoxidação NADPH-dependente, ou seja, em condições metabólicas, mesmo em concentrações de proteína microssomal de dez e vinte vezes maior que as utilizadas nos ensaios metabólicos (Figuras 16 e 17). Também pode ser observado que a quantidade de TBARS detectada para 0,5 mg/mL de membrana é próxima da encontrada para 1,0 mg/mL na presença da droga.

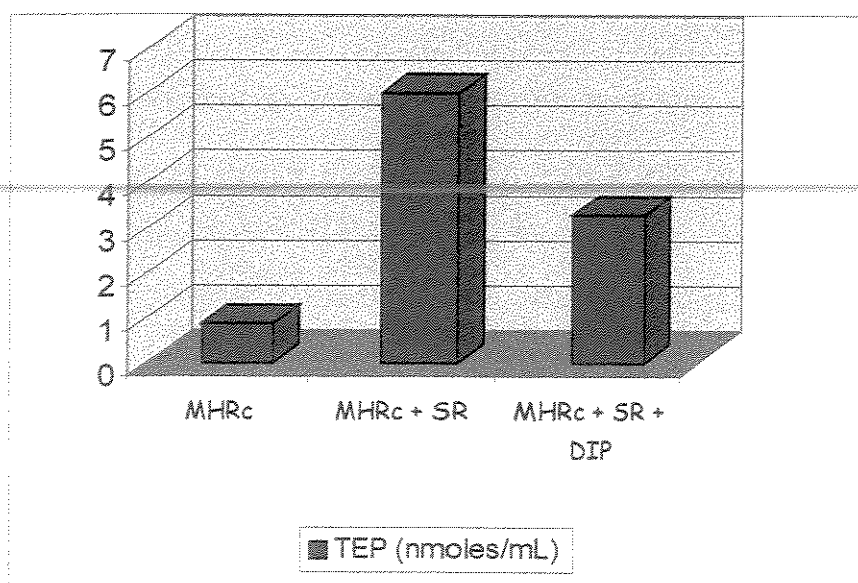


Figura 16. Medidas de TBARS de MHR_c na presença de SRNADPH e DIP. Foram utilizadas 0,5 mg/mL de proteína microssomal, SRNADPH, DIP 5 μ M, λ_{exc} = 515 nm, λ_{emis} = 555 nm, sendo TBARS obtido por medidas de 1,1,3,3, tetraetóxiopropano (TEP).

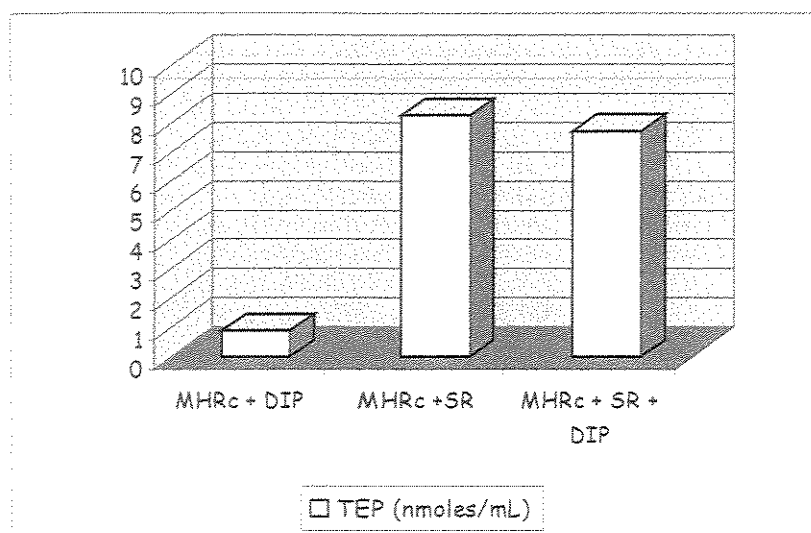


Figura 17. Efeito de DIP sobre a lipoperoxidação em MHR_c. Foram utilizadas 1,0 mg/mL de proteína microssomal, SRNADPH, DIP 5 μ M. λ_{exc} = 515 nm, λ_{emis} = 555 nm.

Em membranas microssomais, a porção lipídica é pequena e a porção protéica atinge os 70% (Hird *et alii.*, 1964), aliado à composição protéica massiva, citocromos P₄₅₀ são degradados por lipoperoxidação NADPH-induzida, ou seja, o próprio cofator enzimático poderia atuar como efector da atividade catalítica. O sistema catalítico é gerador de radicais livres (Esquema 2), igualmente envolvidos com o desencadeamento de processos oxidativos em membranas biológicas. Com estas considerações, o estudo da atividade antioxidante de DIP enquanto substrato de monooxigenases microssomais, poderia contribuir, e muito, para a compreensão dos possíveis mecanismos presentes em ambos processos- o metabólico e o de proteção à lipoperoxidação.

Porém, os experimentos de lipoperoxidação NADPH-induzida e atividade protetora do DIP não constituem resultados totalmente elucidativos, não só porque a localização do complexo citocromo P₄₅₀ em domínios lipídicos preferenciais ainda não se encontra definida (Shank-Retzlaff *et alii.*, 1998), mas também por serem múltiplas as probabilidades de presença de agentes indutores e propagadores envolvidos no processo.

Entre as perspectivas futuras estão o estudo detalhado do papel do citocromo P_{450} como agente biotransformador de drogas com a utilização de técnicas avançadas como EPR, espectrometria de massa, HPLC acoplado a espectrofluorímetro, etc.

Por outro lado, também seria ideal explorar o processo catalítico conduzido pelo citocromo P_{450} e quais mecanismos atuam como moduladores, qual a sua interação com domínios lipídicos ou com outras proteínas, através de espectroscopia de fluorescência.

O estudo do papel do citocromo P_{450} em plantas transgênicas faz parte de um projeto interdisciplinar de pesquisa submetido à JAIKA, entidade financiadora japonesa, por um grupo de professores da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

5. CONCLUSÕES

Nas condições de trabalho utilizadas para este estudo, pode-se afirmar que:

- Nas condições estabelecidas, foi verificada a indução de citocromo P₄₅₀ por PB e 3MC.
- Existe uma interação do DIP com a membrana microssomal hepática, como verificado pelos resultados obtidos por fluorescência;
- Há uma metabolização parcial de DIP por monooxigenases microssomais hepáticas, conduzida preferencialmente por isoformas induzidas por 3MC como demonstrado pelo consumo de NADPH e inibição parcial por CO, observado em experimentos espectrofotométricos;
- A cinética de consumo metabólico de DIP conduzida por enzimas microssomais apresenta-se bifásica, com uma fase inicial rápida à qual se segue uma fase lenta, segundo dados da Tabela III;
- Verificou-se que há uma proteção parcial do DIP à lipoperoxidação induzida por NADPH em membranas microssomais hepáticas, dependente da concentração de proteína microssomal, na ausência de EDTA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITIO, A. & MARNIEMI, J. (1980) Extrahepatic glucoronide conjugation. Em T.E. Gram (Ed.), *Extrahepatic Metabolism of drugs and other Foreign Compounds*, MTP Press, Lancaster, USA, páginas 365-387.
- ALMEIDA, L.E.; CASTILHO, M.; MAZO, L.H. & TABAK, M. (1998) Voltametric and spectroscopic studies of the oxidation of the anti-oxidant drug dipyridamole in acetonitrile and ethanol. *Anal. Chim. Acta* **375**:223-231.
- ALVARES, A.P.; SCHILLING, G.; LEVIN, W. & KUTZMAN, R. (1967) Studies on the induction of CO-binding pigment in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholantrene. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **29**: 521-526.
- ANANDATHEERTHAVARADA, H.K.; SHANKAR, S.K. & RAVINDRANATH, V. (1990) Rat brain cytochromes P₄₅₀: catalytic, immunochemical properties and inducibility of multiple forms. *Brain Res.* **536**: 339-343.
- BALVERS, W.G.; BOERSMA, M.G.; VEEGER, C. & RIETJENS, I.M.C.M. (1992) Differential cumene hydroperoxide sensitivity of cytochrome P₄₅₀ enzymes IA1 and IIB1 determined by their way of membrane incorporation. *Biochim. Biophys. Acta* **1117**: 179-187.
- BAKER, M.T.; VASQUES, M.T. & CHIANG, CK. (1990) Evidence for the stability and cytochrome P₄₅₀ specificity of the phenobarbital-induced reductive halothane-cytochrome P₄₅₀. *Biochem. Pharmacol.* **41**.(11): 1691-1699.
- BATISDA, E.; DEL PRADO, J.; ALMIRALL, I.; JANIESON, G.A. & ORDINAS, A. (1985) Inhibitory effects of dipyridamole on growth, nucleoside incorporation and platelet-activating capability in the U87G and KMNC human tumor cells lines. *Cancer Res.* **45**: 4048-4052.
- BHAMRE, S.; ANANDATHEERATHAVARADA, H. K.; SHANKAR, S. K.; BOYD, M. R. & RAVINDRANATH, V. (1993) Purification of multiple forms of cytochrome P₄₅₀ from a human brain and reconstitution of catalytic activities. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**.(2): 251-255.
- BLACK, S. D. (1992) Membrane topology of the mammalian P₄₅₀ cytochromes. *FASEB J.* **6**: 680-685.
- BOCK, K.W. & REMMER, H. (1978) Induction of hepatic hemoproteins . In Heme and hemoproteins, De Matteis, F. and Aldridge, WN (editores), Springer-Verlag, Alemanha.

- BOLT, H.M.; BOLT, M. & KAPPUS, H. (1977) Interaction of rifampicin treatment with pharmacokinetics and metabolism of ethinylestradiol in man. *Acta Endocrinol.* **5**: 189-197.
- BONDY, S. C. & NADERI, S. (1994) Contribution of hepatic cytochrome P₄₅₀ systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.* **48**(1): 155-159.
- BORNHEIM, L.M.; KIM, K.Y.; CHEN, B. & ALMIRA CORREIA, M. (1995) Microsomal cytochrome P₄₅₀-mediated liver and brain anandamide metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **50**(5): 677-686.
- BORISEVITCH, I.E. & TABAK, M. (1992) Electronic absorption and fluorescence spectroscopic studies of dipyridamole. *J. Luminescence* **51**: 315-322.
- BROWN, C.A. & BLACK, S.D. (1989) Membrane topology of mammalian cytochromes P₄₅₀ from liver endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **264**: 4442-4449.
- BUEGE, J.A. & AUST, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* **LII**: 302-310.
- CANOVA-DAVIES, E. & WASKEEL, L. (1984) The identification of heat-stable microsomal protein required for methoxyflurane metabolism as cytochrome b₅. *J. Biol. Chem.* **259**: 2541-2546.
- CENTENO, F. & GUTIÉRREZ-MERINO, C. (1992) Localization of functional centers in the microsomal cytochrome P₄₅₀ System. *Biochemistry* **31**: 8473-8481.
- CONNEY, A.H. (1982) Induction of microsomal enzymes by foreign compounds and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* **42**: 4875-4917.
- COON, M.J.; DING, X.; PERNECKY, S.J. & VAZ, A.D. (1992) Cytochrome P₄₅₀: progress and prediction. *FASEB J.* **6**: 669-673.
- CRUTCHLEY, D.J.; RYAN, U.S. & RYAN, J.W. (1980) Effects of aspirin and dipyridamole on the degradation of adenosine diphosphate by cultured cells derived from bovine pulmonary artery. *J. Clin. Invest.* **66**: 29-35.
- DAGGETT, V. (1987) Protein degradation: the role of mixed-function oxidases. *Pharmacol. Res.* **4**: 278-284.
- DE DUVE, C. (1971). Tissue fractionation- past and present. *J. Cell Biol.* **50**: 20-55.
- DEPIERRE, J.W. & DALLNER, G. (1975) Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 411- 472.

- DIENER, H.C.; CUNHA, L.; FORBES, C.; SIVENIUS, J.; SMETS, P. & LOWUNTHAL, A. (1996) European stroke prevention study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J. Neurol. Sci.* **143**: 1-13.
- DILLARD C.J. & TAPPEL, A.L. (1971) *Lipids* **6**: 715-721.
- EDWARDS, R.J.; MURRAY, B.P.; SINGLETON, A.M. & BOOBIS, A.R. (1991) Orientation of cytochromes P₄₅₀ in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **30**: 71-76.
- EPSTEIN, W. & BECKWITH, J.R. (1968) Regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* **37**: 411-436.
- ERNSTER, L. & NORDENBRAND, K. (1972) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzimology* **X**: 574-580.
- ESTABROOK, R.W. (1996) The remarkable P_{450s}: a historical overview of these versatile hemeprotein catalyst. *FASEB J.* **10**(2): 202-204.
- FITZGERALD, G.A (1987) Dipyridamole. *N. Engl. J. Med.* **316**: 1247-1257.
- FORD, J.M. & HAIT, W.N. (1990) Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Rev.* **42**: 155-199.
- FUKUSHIMA, K. & SATO, R. (1973) Purification and characterization of cytochrome b₅-like hemoproteins associated with outer mitochondrial membrane of rat liver. *J. Biol. Chem.* **74**: 161-173.
- GHERSI-EGEA, J.F.; PERRIN, R.; LEININGER, B.; GRASSIOT, M.C.; FLOQUET, J.; CUNY, G.; SIEST, G. & MINN, A. (1993) Subcellular localization of cytochrome P₄₅₀, and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochem. Pharmacol.* **43**(3): 647-658.
- GRAHAM-LORENCE, S. & PETERSON, J.A. (1996) P_{450s}: structural similarities and functional differences. *FASEB J.* **10**(2): 206-214.
- GUENGERICH, F.P. (1992) Characterization of human cytochromes P₄₅₀ enzymes. *FASEB J.* **6**: 745-748.
- GUENGERICH, F.P.; BELL, L.C. & OKAZAKI, O. (1995) Interpretations of cytochrome P₄₅₀ mechanisms from kinetic studies. *Biochimie* **77**: 553-580.
- GUTTERIDGE, J.M.C., RICHMOND, R. & HALLIWELL, B. (1979) Inhibition of the iron-catalyzed formation of hydroperoxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.* **184**: 469-472.

- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. (1989) Oxygen is poisonous- an introduction to oxygen toxicity and free radicals. Em *Free radicals in biology and medicine*. Cap. I, pág. 18-20.
- HARKER, L.A.; ROSS, R.; SLICHTER, S.J. & SCOTT, C.R. (1976) Homocystine-induced arteriosclerosis: the role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J. Clin. Invest.* **58**: 731-741.
- HARRISON, M.J.G.; POLLOCK, S.S.; STEINER, M. & WEISBLATT, E. (1985) Inhibitors of "spontaneous" platelet aggregation in whole blood. *Atherosclerosis* **58**: 199-203.
- HILDEBRANDT, A. & ESTABROOK, R.W. (1971) Evidence for the participation of the cytochrome b₅ in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **143**: 66-69.
- HIRD, H.J.; McLEAN E.J.T. & MUNRO, H.N. (1964) Incorporation of amino acids by the protein of the post microsomal fraction of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **87**: 219-231.
- HOCHSTEIN, P. & ERNSTER, L. (1963) ADP-mediated lipid peroxidation coupled to the TPNH oxidase system of microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**(5): 388-394.
- HOFFMAN, E.C.; REYES, H.; CHU, F-F; SANDER, F.; CONLEY, L.H.; BROOKS, B.A. & HANKINSON, O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* **252**: 954-958.
- HOLLENBERG, P.F. (1992) Mechanisms of cytochrome P₄₅₀ and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASEB J.* **6**: 686-694.
- IBA, M.M. & MANNERING, G.J. (1987) NADPH- and linoleic acid hydroperoxide-induced lipid peroxidation and destruction of cytochrome P₄₅₀ in hepatic microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **36**: 1447-1455.
- ISSEMAN, I. & GREEN, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferator. *Nature (London)* **347**: 645-650.
- IULIANO, L.; PEDERSEN, J.Z.; ROTILIO, G.; FERRO, D. & VIOLI, S.A. (1995) A potent chain-breaking antioxidant activity of the cardiovascular drug dipyridamole. *Free Rad. Biol. Med.* **18**: 239-247.

- IULIANO, L.; COLAVITA, A.R.; CAMASTRA, C.; BELLO, V.; QUINTARELLI, C.; ALESSANDRONI, M.; PIOVELLA, F. & VIOLI, F. (1996) Protection of low density lipoprotein oxidation at chemical and cellular level by the antioxidant drug dipyridamole. *Brith. J. Pharmacol.* **119**: 1438-1446.
- JACON, F. & MONOD, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Molec. Biol.* **3**: 318-356.
- KAWATO, S.; GUT, J.; CHERRY, R.J.; WINTERHALTER, K.H. & RICHTER, C. (1982) Rotation of cytochrome P₄₅₀ I. Investigation of protein-protein interactions of cytochrome P₄₅₀ in phospholipid vesicles and liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **257**(12): 7023-7029.
- KLEIN, M.; CANOL, P.D. & MUSACCHIO, J.M. (1991) SKF 525-A and cytochrome P₄₅₀ ligands inhibit with high affinity the binding of [³H] dextromethorphan and sigma ligands to guinea pig brain. *Life Sci.* **48**: 543-550.
- KOBLIAKOV, V. A. (1998) Inducers of the Cytochrome P₄₅₀ Superfamily as Promoters of Carcinogenesis. *Biochem. (Moscou)* **63**: 1043-1058.
- KODAVANTI, U.P. & MEHNDAL, H.M. (1990) Cationic amphophilic drugs and phospholip storage disorder. *Pharmacol. Rev.* **42**: 327-351.
- KOOP, D. R. (1992) Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P₄₅₀ 2E1. *FASEB J.* **6**: 724-730.
- KOSTER, J.F. & SLEE, R.G. (1980) Lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **620**: 489-499.
- KUNTZMANN, L.; MARK, L.C.; BRAND, L.; JACOBSON, M.; LEVIN, W. & CONNEY, A.H. (1966) Metabolism of drugs and carcinogens by human liver enzymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **152**: 151.
- LABELLA, F.S. (1991) Cytochrome P₄₅₀ enzymes: ubiquitous "receptors" for drugs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **69**: 1129-1132.
- LAI, C.S. & PIETTE, L.H. (1978) Spin-trapping studies of hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**: 27-38.
- LANDERS, J.L.; POLAND, A. & BRADFIELD, C.A. (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8185-8189.
- LEDERER, F.; GHRIR, R.; GUIARD, B.; CORTIAL, S. & ITO, A. (1983) Two homologous cytochromes b₅ in a single cell. *Eur. J. Biochem.* **132**: 95-102.

- POMPON, D. & COON, M. (1984) On the mechanism of action of cytochrome P₄₅₀ oxidation and reduction of the ferrous dioxygen complex of liver microsomal cytochrome P₄₅₀ by cytochrome b₅. *J. Biol. Chem.* **259**: 15377-15385.
- PORTER, T. D. & COON, M.J. (1991) Cytochrome P₄₅₀: multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. IV- Dependence on Fe³⁺. *J. Biol. Chem.* **266**: 13469-13472.
- POULOS, T.L. & RAAG, R. (1992) Cytochrome P₄₅₀ CAM: crystallography, oxygen activation and electron transfer. *FASEB J.* **6**: 674-679.
- POYER, J.L. & McCAY, P.B. (1971) Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* **246**: 263-269.
- PRYOR, W.A. & STANLEY, J.P. (1975) A suggested mechanism for the production of malondehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids, nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxydes during autoxidation. *J. Org. Chem.* **40**(24): 3615-3617.
- RAVINDRANATH, V.; ANANDATHEERTHAVARADA, H.K. & SHANKAR, S.K. (1989) Xenobiotic metabolism in human brain -presence of cytochrome P₄₅₀ and associated mono-oxygenases. *Brain Res.* **496**: 331-335.
- RAWN, J.D. (1989) *Biochemistry*. Neil Paterson Publishers, USA, página 13.
- ROSS, H. & PFLEGER, K. (1972) Kinetics of adenosine uptake by erythrocytes, and the influence of dipyridamole. *Molec. Pharmacol.* **8**: 417-425.
- RUSHMORE, T.H.; KING, R.G.; PAULSON, K.E. & PICKETT, C.B. (1990) Regulation of glutathione S-transferase Y_A subunit gene expression: Identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3826-3830.
- SCHENKMAN, J.B; FREY, L.; REMMER, H. & ESTABROOCK, R.W. (1967) Sex differences in drug metabolism by rat liver microsomes. *Molec. Pharmacol.* **3**: 516-525.
- SCHINKE, R.T. & DOYLE, D. (1970) Control of enzyme levels in animal tissues. *Ann. Rev. Biochem.* **39**: 929-976.
- SCHRADER, J.; BERNE, R.M. & RUBIO, R. (1972) Uptake and metabolism of adenosine by human erythrocyte ghosts. *Am. J. Physiol.* **223**: 159-166.

- SHANK-RETZLAFF, M.L.; RANER, G.M.; COON, M.J.SLIGAR, S.G. (1998) Membrane topology of cytochrome P₄₅₀ 2B4 in Langmuir-Blodgett monolayers. *Arch. Biochem. Biophys.* **359**.(1): 82-88.
- SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; MIMURA, M.; YUKIHARU, I. & GUENGERICH, P. (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P₄₅₀ enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 japanees and 30 caucasians. *J. Pharmacol. Exp.Ther.* **270**.(1): 414-423.
- SLADEK, N.E. & MANNERING, G.J. (1966) Evidence for a news P₄₅₀ heprotein in hepatic microsomes from methylcholantrene treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**: 668-674.
- SLEE, J.F. & SLEE, R.G. (1980) Lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **620**: 489-499.
- SUGIOKA, K. & NAKANO, M. (1976) A possible mechanism of the generation of singlet molecular oxygen in NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **423**: 203-216.
- SVINGEN, B.A.; BUEGE, J.A; O'NEAL, F.O. & AUST, S.D. (1979) The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **254**.(13): 5892-5899.
- TABAK, M. & BORISEVITCH, A.I. (1992) Interaction of Dipyrindamole with micelles of lysophosphatidylcholine and with bovine serum albumin: fluorescence studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1116**: 241-249.
- TARIQ, M.; AL-DEEB, S.; AL-MOUTAERY, K.; BRUYN, G.W.; PRICE EVANS, D.A. & ARSHADUDDIN, M. (1995) Dipyrindamole attenuates the development of iminodipropionitrile-induced dyskinetic abnormalities in rats. *Brain Res. Bull.* **38**.(1): 31-35.
- TESTA, B. & JENNER, P. (1981) Inhibitors of cytochrome P₄₅₀ and their mechanism of action. *Drug Metab. Rev.* **12**: 1-117.
- THOMAS, J.A. (1995) Drug-nutrients interactions. *Nutrition Rev.* **53**.(10): 271-282.
- TIEN, M. & AUST, S.D. (1982) Rabbit liver microsomal lipid peroxidation - The effect of lipid on the rate of peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **712**: 1-9.
- UVAROV, V.Y.; SOTNICHENKO, A.I.; VODOVOZOVA, E.L.; MOLOTKOVSKY, J.G.; KOLESANOVA, E.F.; LYULKIN, Y.A.; STIER, A.; KRUEGER, V. & ARCHAKOV, A.I. (1994) Determination of membrane-bound fragments of cytochrome P₄₅₀ 2B4. *Eur. J. Biochem.* **222**: 483-489.

- VELICK, S. & STRITTMATTER, P. (1956) The oxidation-reduction stoichiometry and potential of microsomal cytochrome b₅. *J. Biol. Chem.* **221**: 2652- 2675.
- VERGÈRES, G. & WASKEEL, L. (1995) Cytochrome b₅, its function, structure and membrane topology. *Biochimie* **77**: 604-620.
- WAXMANN, D.J. (1988) Interactions of hepatic cytochromes P₄₅₀ with steroid hormones. Regioselectivity and stereoespecificity of steroid metabolism and hormonal regulation of rat P₄₅₀ enzyme expression. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 71-84.
- WHALTER, B.; GHERSI-EGEA, J.F.; MINN, A. & SIEST, G. (1987) Subcellular distribution of cytochrome P₄₅₀ in the brain. *Brain Res.* **375**: 338-344.
- WHITE, R. E. & COON, M. J. (1980) Oxygen Activation by Cytochrome P₄₅₀. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 315-356.
- WILLIAMS, R.T. (1959) *Detoxication Mechanisms*. Chapman & Hall, London, 2^a-edição, páginas 1-22.
- WILLS, E.D. (1969) Lipid peroxide formation in microsomes. I- General considerations. *Biochem. J.* **113**: 315-324
- WILLS, E.D. (1969) Lipid peroxide formation in microsomes. II- The role of non-haem iron. *Biochem. J.* **113**: 325-341.
- WITLOCK, J.P., Jr. (1986) The regulation of cytochrome P₄₅₀ gene expression. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **26**: 333-369.
- YAGI, K.A. (1976) A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* **15**: 212-216.
-

7. ANEXOS

Durante o desenvolvimento desse estudo, foram apresentados os seguintes trabalhos em congressos nacionais:

1. De Paula, E.; Costa, C.; **Marques, MB** & Macedo, DV. "Advantages of using drama for the evaluation of basic biochemistry courses for physical education". Resumo J2, XXIV SBBq, 1995, Caxambu/MG.
2. **Marques, MB**; Meirelles, NC.; Malheiros, SVP. & Degterev, IA. "Mouse liver microsomes membranes protect red blood cells (RBC) against damage caused by drugs, ethyl alcohol and tween 80". Resumo P30, XXIV SBBq, 1995, Caxambu/MG.
3. **Marques, MB**; Meirelles, NC. & Degterev, IA. "UV-Vis and spectrofluorescence study of metabolic transformation and membrane interaction of Dipyrindamole (DIP) in mouse liver microsomes (MLM)". Resumo M28, X FESBE, 1995, Serra Negra/SP.
4. **Marques, MB**; Meirelles, NC. & Degterev, IA. "UV-Vis and spectrofluorimetric of Dipyrindamole (DIP) metabolism". Resumo P17, XXV SBBq, 1996, Caxambu/MG.
5. Malheiros, SVP; **Marques, MB**; Meirelles, NC. & Degterev, IA. "Interaction of Dipyrindamole (DIP) and Trifluoperazine with biological membranes". Resumo 05.038, XXV SBBq, 1996, Caxambu/MG.

Em congressos internacionais:

1. **Marques, MB.**; Meirelles, NC. & Degterev, IA. "Metabolic and non-metabolic Dipyrindamole (DIP) interactions with biomembranes". Resumo P-Misc 14, XIIth International Biophysics Congress (IUPAB), 1996, Amsterdam, Holanda.

2. **Marques, MB.;** Meirelles, NC. & Degterev, IA. "Dipyridamole interacts with biological membranes". Resumo 26.47, 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (ICBMB), 1997, San Francisco, USA.

Sendo publicado:

3. **Marques, M.B.;** Meirelles, n.c.; Zaikov, G.E.; Tatarskaya, N.K. & Degterev, I.A. (1998) Metabolic oxidation of dipyridamole (DIP) by mouse liver microsomes. **Oxidation Communications** 21.(1): 120-126. (Em anexo).

Oxidation Communications 21, No 1, 120–126 (1998)

METABOLIC OXIDATION OF DIPYRIDAMOLE(DIP) BY MOUSE LIVER MICROSOMES

M. B. MARQUES^a, N. C. MEIRELLES^a, G. E. ZAIKOV^b,
N. K. TATARSKAYA^b, I. A. DEGTEREV^{ab*}

^a *Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), C. P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil*

^b *Department of Kinetics of Chemical and Biological Reactions, Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

ABSTRACT

A method of spectrofluorimetric monitoring of dipyridamole (DIP) metabolism has been developed. The spectrophotometric monitoring of NADPH microsomal oxidation as a measure of DIP metabolism has also been performed. The drug metabolic oxidation by microsomes requires NADPH and is accompanied by the oxidation of both cofactor and cytochrome b₅. Carbon monoxide inhibits DIP metabolic oxidation.

AIMS AND BACKGROUND

An interest to study DIP metabolism is due to the new findings concerning this a well new coronary vasodilator. It has been shown to inhibit platelet aggregation¹ and to act as a potent antioxidant², radioprotector³, antiviral agent⁴. The use of the drug in the cancer treatment to either diminish the damage caused by anticancer agents or potentate their activity has also been reported^{5–8}. At the same time, DIP metabolism is not studied well due to difficulties of the drug itself or its metabolite detection⁹. Thus, the development of the methodology of DIP metabolic consumption could contribute to a better understanding of both mechanisms of drug metabolism and therapeutic activity.

A method of spectrofluorimetric monitoring of DIP metabolism has been developed in the present study. The drug metabolic oxidation by microsomes requires NADPH and is accompanied by the oxidation of this cofactor and cytochrome b₅. Carbon monoxide inhibits DIP metabolic oxidation.

EXPERIMENTAL

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Dipyridamole (DIP), the cytochrome P-450-inducers, phenobarbital (PB) and 3-methylcholantrene (3-MC), NADP⁺, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucose, glucose oxidase, and catalase from Sigma and sodium dithionite from Merck (F.R.G), were used.

* For correspondence.

Animals. Male Swiss mice (one month old, 18–20 g) were used throughout the experiments.

Treatment of the animals with P-450-inducers. Approximately 15 mice were used per group in each of three fully independent experiments. For treatment with phenobarbital, the animals received a single i.p. injection of 80 mg/kg b.w. in saline and subsequently 0.1 % phenobarbital in their drink water for one week. The control animals received a single i.p. injection of saline. For treatment with 3-MC, the animals received three consecutive daily i.p. injections of 30 mg/kg b.w. in olive oil. The control animals received two i. p. injections of olive oil.

Preparations of the liver microsomes. The control and induced mice were decapitated and their livers isolated, washed with ice-cold isotonic solution and immediately homogenized. A portion of the homogenate was suspended in three volumes of ice-cold sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and used to prepare the microsomal fraction. The suspension was consecutively centrifuged at 9000 *g* for 20 min and 20000 *g* for 40 min. The final supernatant was centrifuged at 105 000 *g* for 1 hour. The resulting pellet (microsomal fraction) was subsequently washed with 10 ml of ice-cold buffer in order to remove erythrocytes, hemoglobin and cofactors, and then re-centrifuged at 105 000 *g* for a further hour. The microsomes thus obtained were suspended in the same buffer and used to study the consumption of DIP.

Protein content of microsomes was determined by the method of Lowry et al.¹⁰. The cytochrome P-450 content in microsomes was determined by the method of Omura and Sato¹¹.

Microsomal incubation and spectroscopic measurements were performed as described elsewhere¹². An NADPH-generating system (1 mmol dm⁻³ of NADP⁺, 10 mmol dm⁻³ of glucose-6-phosphate and 1 unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase/ml) was used in order to support a steady-state concentration of this electron donor.

Fluorimetric measurements were performed using a spectrofluorimeter Aminco SPF-500.

RESULTS

Oxidation of NADPH and cytochrome b₅ in microsomes in the presence of DIP. While the direct monitoring of DIP metabolic oxidation in mouse liver microsomes is impossible due to low extinction of the drug and highly dissipating media, we developed the monitoring of NADPH oxidation. This was based on the assumption that if the drug is metabolized by NADPH-dependent enzymes (which are microsomal monooxygenating system), an acceleration of this electron donor oxidation can be detected.

When equal amounts of NADPH have been added to both sample and control cuvettes a time-dependent decrease of the cofactor concentration in the sample cuvette can be monitored by the decrease of the characteristic absorbance at 340 nm (the peak of the reduced form of NADPH) (Fig. 1a). A time-dependent decrease at 340 nm was also monitored in the control cuvette containing all the same compounds but without DIP. This figure also shows a decrease of the peak

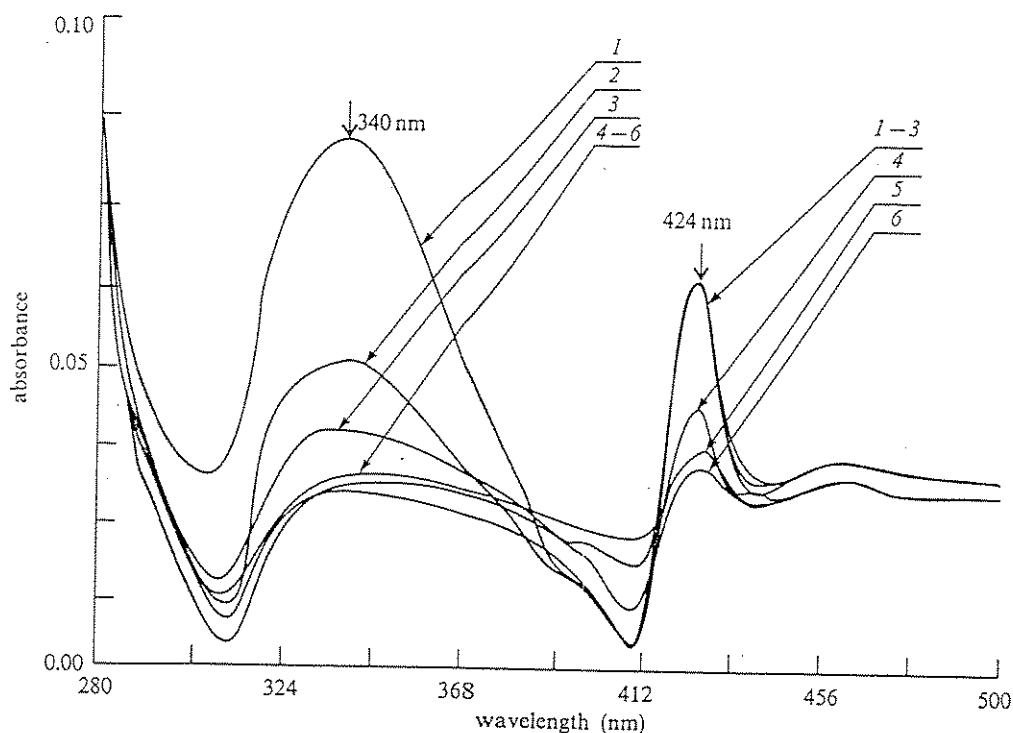


Fig. 1a. Uv-Vis monitoring of NADPH (340 nm) and cytochrome b_5 (424–411 nm) oxidation during DIP metabolism in mouse liver microsomes from 3-MC-treated mice. The differential spectra are registered in 2 min intervals versus control containing all compounds except of NADPH. Initial concentrations: $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ of DIP, 0.6 mmol dm^{-3} of NADPH, $0.3 \text{ mg protein/ml}$ of microsomes. The vertical arrows show the direction of an absorbance change

corresponding to the reduced cytochrome b_5 (max. 424 nm, min 411 nm). The peak appears in the differential spectra of microsomes immediately after the addition of NADPH to the sample and remains unchanged until NADPH presents in the mixture (spectra 1–3), then sharply decreases (spectra 4–6). We monitored the intensity of this peak as a function of time when DIP ($10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) was incubated with microsomes of different concentrations (from 0.06 to 0.6 mg protein/ml) in the presence of 0.6 mmol dm^{-3} NADPH. It was found that no time-dependent decrease of the reduced enzyme concentration can be observed during 30 min of NADPH and DIP incubation with 0.06 to 0.15 mg protein/ml of microsomes, while the enzyme was oxidized at microsomal concentration $\geq 0.3 \text{ mg protein/ml}$. No such a decrease was observed in control when NADPH was incubated for 1–2 h with microsomes (0.6 mg protein/ml) in the absence of DIP.

The rate coefficients of NADPH oxidation during DIP metabolism in mouse liver microsomes isolated from control (1), PB-treated (2) and 3-MC-treated (3) animals as a function of microsome concentration are shown in Fig. 1b

The K values were measured as a difference ($K_d - K_c$) where K_d and K_c are the rate coefficients of NADPH oxidation in the sample (microsomes + NADPH + DIP) and the control (microsomes + DIP), respectively. $K = W/C_{in}$, where W is the rate of NADPH oxidation and C_{in} is an initial

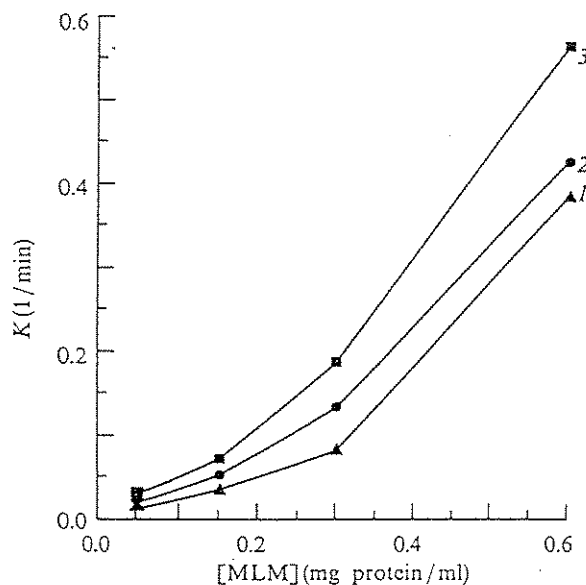


Fig. 1b. The rate coefficients of NADPH (0.6 mmol dm^{-3}) oxidation during DIP ($10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) metabolism in mouse liver microsomes isolated from control (1), PB-treated (2), and 3-MC-treated (3) animals as a function of microsome concentration

concentration of NADPH ($t=0 \text{ min}$). The results represent the mean $\pm$ SD of three experiments.

One can see (Fig. 1b), that the rate of NADPH oxidation in the presence of DIP increased when microsomes of the induced mice were used as compared with the control ones. This effect was maximum when PB was served as an inducer of cytochrome P-450.

Spectrofluorimetric monitoring of DIP metabolic transformation. Spectra of the drug excitation and emission in buffer solution in the presence and the absence of microsomes are presented in Fig. 2. It was found that the intensity of DIP fluorescence in microsomal suspension does not change with time incubation for at least three hours. In contrast, time-dependent decrease of intensity of DIP fluorescence in the presence of NADPH was detected (Fig. 3). Microsomes isolated from the control mice were used. The incubation mixtures contained $15 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ of DIP, $0.6 \text{ mg protein/ml}$ of microsomes, and NADPH of various concentrations in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4. The experiments were performed in either the presence (1) or the absence (2) of NADPH-generating system at room temperature, each point representing the mean $\pm$ SD of a minimum of three experiments. The rate coefficient is equal to: $K = W_i / C_{in} C_m$, where W_i is the initial rate of a decrease of fluorescence (rel. units), C_m —the microsomal membranes concentration (mg protein/ml). It was established in the control experiments that the intensity of DIP in buffer solution is unaffected by the presence of up to 1 mmol dm^{-3} of NADPH. Thus, Fig. 3 shows NADPH-dependent DIP consumption in mouse liver microsomes accompanied by a decrease of the drug fluorescence. A steady-state concentration of this cofactor was maintained in the presence of NADPH-generating system which resulted in higher rate DIP metabolic transformation.

The influence of carbon monoxide (CO), a heme-containing enzymes poison competing with oxygen for P-450 binding, on the rate of DIP metabolic

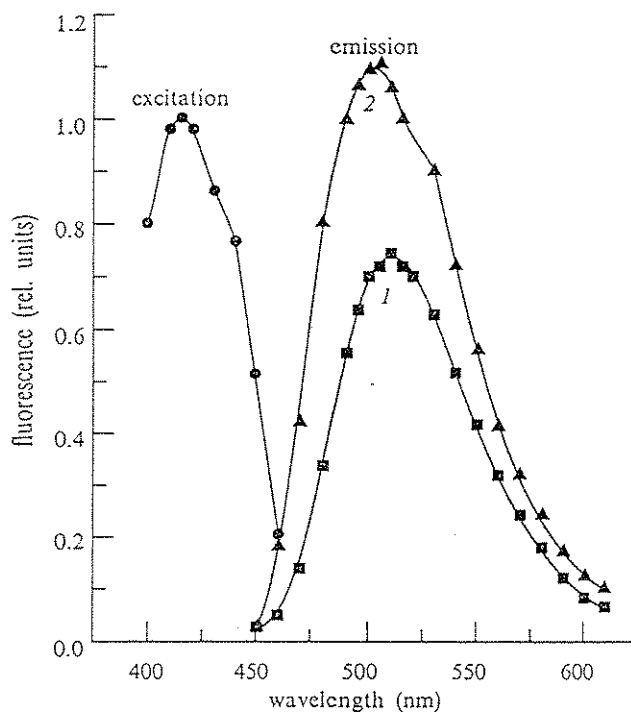


Fig. 2a. Spectra of DIP excitation ($\lambda_{em}=510\text{ nm}$) and emission ($\lambda_{exc}=415\text{ nm}$) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, in the presence (1) or the absence (2) of microsomes (0.6 mg protein/ml). Each point represents the mean $\pm$ SD of three measurements

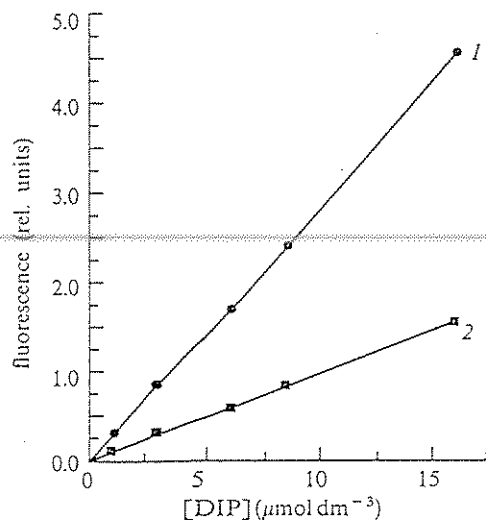


Fig. 2b. Intensity of DIP fluorescence ($\lambda_{exc}=415\text{ nm}$, $\lambda_{em}=510\text{ nm}$) as a function of drug concentration in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 in the absence (1) or the presence (2) of mouse liver microsomes (0.6 mg protein/ml)

consumption has also been studied. Water saturated with CO (10 ml) was added to a microsomal suspension (0.3 mg protein/ml) containing NADPH (0.6 mmol dm^{-3}) prior to addition of the drug ($10\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$) and the kinetics of a fluorescence decrease was measured in this sample compared to the control

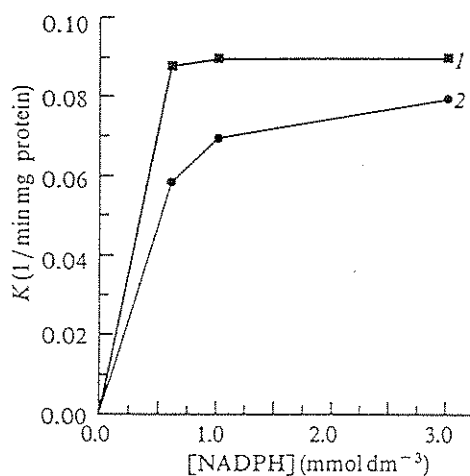


Fig. 3. Kinetics of DIP metabolic transformation on mouse liver microsomes as measured by a decrease of a specific drug fluorescence ($\lambda_{exc}=415\text{ nm}$, $\lambda_{em}=510\text{ nm}$)

Table 1. An inhibition by CO of DIP consumption by liver microsomes of control, phenobarbital, and 3-methylcholantrene-treated mice

Conditions	Microsomes					
	control		phenobarbital treated		3-methylcholantrene treated	
	$K \times 10^3$	K_r	$K \times 10^3$	K_r	$K \times 10^3$	K_r
Without CO	16 ± 6 $n=4$	1.0	56 ± 11 $n=3$	1.0	30 ± 2 $n=3$	1.0
+CO	5 ± 3 $n=4$	0.3 ± 0.1 $n=4$	10 ± 1.2 $n=3$	0.3 ± 0.2 $n=3$	16 ± 7 $n=3$	0.5 ± 0.3 $n=3$

K is the rate coefficient of DIP metabolic transformation measured by the fluorescence decrease. $K = V_{in}/C_D^0$, where V_{in} is the rate of the fluorescence decrease measured as an initial slope of the kinetic curve, and C_D^0 is the initial concentration of DIP. K_r is the ratio of the K value obtained in the presence of CO to that in the absence of CO.

sample containing all the same compounds except CO. The results presented in Table 1 clearly show that CO inhibits DIP metabolic transformation.

DISCUSSION

The importance of DIP as a multipurpose drug mentioned in the introduction to this work is confirmed by the fact that more than 500 articles concerning this long-time used drug have appeared for the less than two years. At the same time, we have failed to find one concerning DIP metabolism. This is, however, commonly recognized that biological action of any drug is tightly bound to, if not pre-determined, by its metabolic transformation. Concerning difficulties in DIP metabolites determination we choose an approach based on the determination of kinetics of drug metabolic transformation which was developed in our studies of nitroheterocyclic drug metabolic transformation¹²⁻¹⁴.

A decrease in specific fluorescence of DIP (Figs 2 and 3) has showed that the drug consumption in microsomes requires NADPH (no decrease in fluorescence

intensity was found in the absence of this cofactor) and depends on its concentration. That means that DIP transformation is driven by NADPH-dependent enzyme. These conclusion, resulted from the fluorimetric data, was confirmed by the results obtained by a differential spectroscopy (Fig. 1) which shows that NADPH oxidation in microsomes accelerated in the presence of DIP. This effect increases with an increase of the membrane concentration, e. g. an increase of enzymes concentration. It is also of interest that not DIP, but NADPH that is completely oxidized and the drug uses reduced cytochrome b_5 as an electron source for further biotransformation (Fig. 1a). The NADPH concentrations at which this effect was observed were $60 \mu\text{mol dm}^{-3}$ and $150 \mu\text{mol dm}^{-3}$ which is 6–15 times more than DIP concentration ($10 \mu\text{mol dm}^{-3}$). One can suppose that there is a deep DIP transformation in microsomes requiring up to 15 electrons.

The inducers of cytochrome P-450 (PB and 3-MC) were used in order to elucidate a role of this enzyme in metabolic transformation of DIP.

One can see from the data presented in Fig. 1b, that the rate of DIP-dependent NADPH oxidation accelerated when microsomes of the induced mice were used as compared with the control ones. This is an evidence of P-450 participation in DIP metabolism.

One more evidence comes from the data presented in Table 1. Carbon monoxide is known as an inhibitor of cytochrome P-450. It prevents oxygen binding to enzyme, thus preventing monooxygenation. Thus, the inhibition effect shown in Table 1 presents an evidence of both P-450 participation in DIP microsomal metabolism and an oxidative mechanism of this process.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 3000989/93-8).

REFERENCES

1. G. MANCUSO et al.: *Genitourinary Medicine*, **71**, 57 (1995).
2. M. L. SELLEY et al.: *Atherosclerosis*, **111**, 91 (1994).
3. M. POSPISIL et al.: *Rad. Res.*, **142**, 16 (1995).
4. R. SNOEK et al.: *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **5**, 312 (1994).
5. S. SATO et al.: *Anti-Cancer Drug Design*, **8**, 289 (1993).
6. B. D. DAMILE et al.: *Int. J. Cancer*, **56**, 113 (1994).
7. C. T. VALLEJO et al.: *Amer. J. Clin. Oncol.*, **18**, 185 (1995).
8. E. RAGAZZI et al.: *Int. J. Oncol.*, **6**, 659 (1995).
9. L. IULIANO et al.: *Lipids*, **27**, 349 (1992).
10. O. H. LOWRY et al.: *Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
11. T. OMURA, R. SATO: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2371 (1964).
12. I. A. DEGTEREV et al.: *Pharmac. Chem. J.*, **24**, 9 (1990).
13. V. N. VEROVSKIY et al.: *Pharmac. Chem. J.*, **24**, 20 (1990).
14. I. A. DEGTEREV et al.: In: *Bioactive Compounds. Biotransformation and Biological Action*. NOVA Science Publ., New York, 1993.

Received 24 September 1996
Revised 18 October 1996