

ANIBAL EUGÊNIO VERCESI

ESTUDOS SOBRE O EFEITO
GLICOGENOLÍTICO DO
DINITROFENOL

Tese de doutoramento apresen-
tada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de
Campinas.

Orientador:

Prof. Dr. ALDO FOCESI JÚNIOR

Campinas
1974

9315132

ANIBAL EUGÊNIO VERCESI

ESTUDOS SOBRE O EFEITO
GLICOGENOLÍTICO DO
DINITROFENOL

Tese de doutoramento apresen-
tada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de
Campinas.

Orientador:

Prof. Dr. ALDO FOCESI JÚNIOR

Campinas
1974

A meus pais,
esposa e filho

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Aldo Focesi Júnior, Orientador desta tese, que despertou nosso interesse pela Bioquímica e nos iniciou na carreira científica, acompanhando-nos durante todo o tempo como orientador e amigo, nosso profundo agradecimento.

Ao Professor Doutor Walter August Hadler, por ter-nos facilitado o uso dos laboratórios do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Professor Doutor Baltazar Reynafarje, do Instituto de Biologia Andina (Peru), por ter permitindo o uso de seus equipamentos e ter colaborado na execução dos experimentos com mitocôndrias cardíacas.

A todos os colegas do Departamento de Bioquímica que contribuíram para a realização deste trabalho e em particular ao Dr. Qui-vo S. Tahin, Dr. Avelino R. Oliveira e Nilce C. Meirelles.

As acadêmicos de Medicina, Victor M. C. F. da Silva, Ernest Schneider e José Roberto Miney, que muito colaboraram durante nossos trabalhos experimentais.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, que de diversas maneiras nos ajudaram.

À Srta. Maria do Carmo Biajoni, pelo esmero e dedicação no trabalho de datilografia e à Sra. Ana Gagliardi, bibliotecária do Instituto de Biologia, pela colaboração na organização das referências bibliográficas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela ajuda material durante tres anos, concedida através de Bolsa de Iniciação Científica, tempo em que grande parte do presente trabalho foi efetuado.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	13
1. Purificação de fosforilase <u>b</u> de músculo esquelético coelho	13
2. Purificação de fosforilase <u>b</u> quinase inativa de músculo de coelho	15
3. Preparação de fosforilase <u>b</u> como substrato de fosforila- se <u>b</u> quinase	16
4. Purificação de desidrogenase láctica de coração de boi .	16
5. Purificação de deaminase de ácido 5'-adenílico	19
6. Purificação de mioquinase	20
7. Purificação de apirase de batata	21
8. Purificação de mitocôndria de músculo cardíaco	22
9. Método de perfusão de coração	23
10. Determinação de fosforólise do glicogênio em extratos de músculos tratados com Dinitrofenol	23
11. Determinação de fosforilase <u>a</u> e total em tecido muscular	24
12. Unidades de fosforilase	25
13. Determinação da atividade de fosforilase <u>b</u> quinase	25
14. Determinação do AMP cíclico em músculo esquelético	26
15. Efeito inibidor de glicose-6-fosfato sobre a velocidade de reação catalisada por fosforilase <u>b</u> quinase	28
16. Determinação de fosfato inorgânico	29
17. Determinação de ácido láctico	30
18. Determinação de ATP, ADP e AMP em extratos de músculo ..	31
19. Determinação de Glicose-6-fosfato	33
20. Determinação das trocas de Ca^{++} e H^{+} em preparações de mitocôndrias	34

21. Outros equipamentos e reagentes utilizados	35
RESULTADOS	37
1. Conteúdo de ácido láctico no sangue e no coração de ani- mais envenenados com Dinitrofenol	37
2. Efeito do Dinitrofenol sobre a fosforólise do glicogê- nio	38
3. Influência do Dinitrofenol sobre o sistema de fosforila- ses do músculo cardíaco	39
4. Efeito do Dinitrofenol sobre fosforilase <u>b</u> quinase puri- ficada	40
5. Efeito do Dinitrofenol sobre o conteúdo de fosforilase <u>a</u> e total em corações perfundidos	40
6. Efeito do Dinitrofenol sobre o conteúdo de fosforilase <u>a</u> e fosforilase total em corações perfundidos de <u>ratos</u> reserpinizados	43
7. Efeito do Dinitrofenol sobre o conteúdo de adenosina 3'- 5'-fosfato cíclico em preparações de músculo esquelético	44
8. Efeito do Dinitrofenol sobre o conteúdo de nucleotídeos adenílicos e Glicose-6-fosfato em músculo cardíaco e es- quelético	49
9. Inibição de fosforilase <u>b</u> quinase por Glicose-6-fosfato.	52
10. Efeito do Dinitrofenol sobre as trocas de ions Ca^{++} e de protons na célula muscular	52
11. Efeito glicogenolítico de outros desacopladores da fosfo- rilação oxidativa	55
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	59
RESUMO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

INTRODUÇÃO

A polissacarídeo fosforilase (E.C. 2.4.1.1.) é uma enzima que tem papel relevante na regulação do metabolismo de carboidratos pela sua propriedade de catalisar o primeiro passo da sequência metabólica responsável pela degradação do glicogênio e, portanto, de controlar os níveis energéticos da célula, fornecendo em maior ou menor quantidade, energia química sob a forma de adenosina trifosfato (ATP).

Dos estudos, sobre os sistemas de fosforilases, importantes processos fisiológicos puderam ser compreendidos. Além daqueles inerentes a própria enzimologia "sensu lato", eles também abriram o caminho para a compreensão das bases moleculares da ação hormonal (BUTCHER et al. 1968; ROBINSON et al. 1968), e do mecanismo de contração muscular (MOMMAERTS et al. 1959; PEACHEY, 1968; EBASHI et al. 1969; HUXLEY, 1969).

Este sistema enzimático foi estudado, inicialmente, nos laboratórios dos Cori, em músculo esquelético de coelho, de onde duas formas da enzima foram purificadas e cristalizadas (GREEN e CORI 1943; CORI e CORI, 1945). Uma forma ativa foi denominada fosforilase a e uma forma totalmente inativa, denominada fosforilase b. Esta por sua vez apresenta atividade catalítica somente quando em presença de adenosina 5'-fosfato (AMP), o que já havia sido demonstrado antes da purificação da própria fosforilase b (CORI e CORI, 1936; PARNAS e MOCHNACK, 1936). É importante observar que a fosforilase foi a primeira enzima em que se observou a coexistência de duas formas, cuja interconversão entre elas exerce papel regulatório fundamental (CORI et al. 1943).

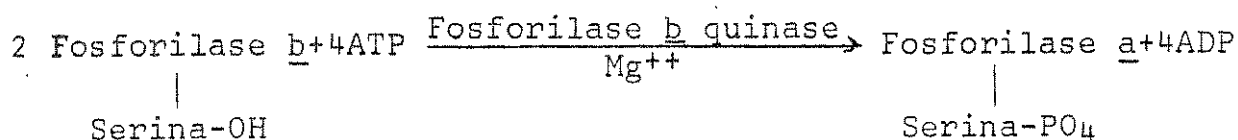
A atividade enzimática do sistema de fosforilases depende de pelo menos quatro parâmetros distintos de acordo com KELLER e CORI (1955) e FISCHER et al. (1964), sendo estes parâmetros os seguintes: polimerização de monômero produzindo dímero e tetrameros; a ativação do dímero por fosforilação específica do mesmo; ativação

por nucleotídeo (AMP) e presença de um grupo prostético, o piridoxal-5'-fosfato (P.L.P.) ligado a molécula da enzima.

Procuraremos agora, descrever estes parâmetros com maiores detalhes.

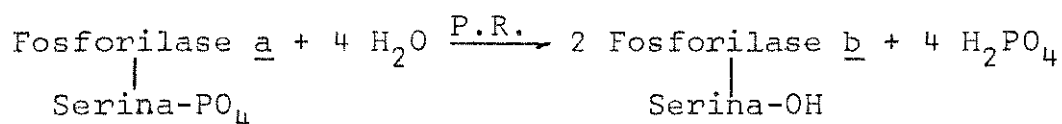
O grupo dos Cori, demonstrou que a fosforilase b tem peso molecular 250.000 Daltons e a fosforilase a 500.000 Daltons e ainda, que o tratamento de fosforilase a por p-cloromercuribenzoato dava origem a quatro sub-unidades iguais, enquanto que a fosforilase b pelo mesmo tratamento produzia somente duas. Os monômeros apresentavam pesos moleculares da ordem de 125.000 Daltons. Trabalhos mais recentes, todavia, (SEERY et al. 1967), demonstraram que o peso molecular da fosforilase a é na realidade 370.000 Daltons, enquanto o da fosforilase b é 185.000 Daltons. A polimerização dos monômeros produzindo dímeros e tetrâmeros parece se fazer, através de ligações tipo sulfidríla.

O músculo em repouso contém, predominantemente, fosforilase b. Durante a contração muscular ou sob ação de certos agentes glicogenolíticos como adrenalina, por exemplo, esta é convertida em fosforilase a. Uma quinase específica, a fosforilase b quinase, catalisa a conversão:



Nesta reação quatro moléculas de fosfato são transferidas do ATP a quatro resíduos de serina da molécula de fosforilase, tornando-a ativa (KREBS e FISCHER, 1962). As duas formas de fosforilase, são interconvertíveis e a fosforilase b quinase apenas catalisa a reação no sentido da formação de fosforilase a. A reação no sentido inverso é catalisada por uma fosforilase-fosfatase altamente específica, também chamada enzima P.R. (CORI e CORI, 1945) que catalisa a reação de fosforilase a em fosforilase b pela cisão da ligação fosfato-serina da fosforilase a, inativando a en-

zima de acordo com a reação:



Em um sistema onde há interconversão de duas formas de enzima é esperado que o acúmulo de uma das duas formas possa ocorrer pelo deslocamento da reação em um sentido ou pela inibição da reação no outro sentido. Assim, no caso das fosforilases, o acúmulo de fosforilase a (ativa), poderia ocorrer tanto por uma maior velocidade de transformação da forma b para a forma a, através de uma ativação da fosforilase b quinase, quanto pela inibição da enzima P.R. Estudos efetuados em músculo de animais intactos, (DANFORTH et al. 1962; KREBS et al. 1964), ou em sistemas purificados (HURD, 1967), foi demonstrado que o controle da atividade do sistema de fosforilases ocorre predominantemente através de ativação da fosforilase b quinase e não através da inibição da fosfatase.

O terceiro processo que a célula dispõe para aumentar as concentrações da forma ativa de fosforilase é através do AMP. Assim, fosforilase b é totalmente inativa na ausência do nucleotídeo enquanto que fosforilase a tem sua atividade aumentada cerca de 30 a 40% pela presença do mesmo, (FISCHER et al. 1964). A ativação das formas purificadas da enzima pelo AMP, depende evidentemente de várias condições, incluindo concentração do substrato, presença de íons metálicos divalentes, pH, temperatura, etc. (FISCHER et al. 1970). O papel fisiológico do AMP como ativador das fosforilases tem sido estudado ultimamente por muitos autores. De acordo com GERBACH et al. (1963), apesar do AMP intracelular estar sujeito a processos de transformação, como formação de ATP ou inosina monofosfato, sua concentração poderia estar em níveis suficientemente altos para interferir na atividade do sistema de fosforilases. Todavia, de acordo com MORGAN e PARMEGGIANI (1964), esta suposta ativação pode não se verificar em condições fisiológicas, uma vez que certos inibidores naturais de fosfori-

lase b, como ATP e Glicose-6-fosfato (G-6-P), podem se encontrar em concentrações suficientemente elevadas para impedir o efeito ativador do nucleotídeo na célula. Além disso, o AMP parece não ter um compartimento celular onde se acumule preferencialmente, enquanto que as enzimas diretamente envolvidas no metabolismo do glicogênio parecem estar associadas entre si num compartimento celular bem localizado. Evidentemente, o contácto entre estas enzimas e o efector AMP estaria prejudicado por este fato. Destas observações pode-se inferir que a ativação da fosforilase b pelo AMP, comparado com a ativação da enzima pela fosforilase b quina se tem, possivelmente, papel fisiológico irrelevante, (FISCHER et al. 1970).

O quarto parâmetro citado acima como controlador do sistema de fosforilases envolve o P.L.P. Este cofator é indispensável para a atividade da enzima (CORI e ILLINGWORTH, 1957). A remoção do P.L.P. da enzima por tratamento com sulfato de amônia em meio ácido, ou no caso da fosforilase b por incubação com cisteína fornece a apofosforilase totalmente inativa (FISCHER et al. 1964), que pode ser reativada para a forma da holoenzima pela adição do cofator que, por sua vez, se combina estequiometricamente com a mesma, na proporção de quatro moles de P.L.P. por mol de fosforilase a ou dois moles por mol de fosforilase b (BARANOWISKI et al. 1957). FISCHER et al. (1958), demonstraram que a redução do P.L.P. ligado a enzima, por borohidreto de sódio, resulta em perda de apenas 40% da atividade enzimática. Destas observações os autores concluíram que o P.L.P. não participa diretamente na reação catalisada pela fosforilase. O fato não tem precedente com outras enzimas P.L.P.-dependentes estudadas, cuja redução do cofator leva a total perda da atividade (GUIRARD e SNELL, 1964; FISCHER, 1964). É pois sugestivo que o papel do P.L.P. esteja mais relacionado com mudanças conformacionais da enzima, não participando diretamente no processo de catálise (ILLINGWORTH et al. 1958).

Dos fatores que regulam a atividade do sistema de fosforilases, acima discutidos, o de maior importância fisiológica, de acordo

com FISCHER et al. (1964), é a transformação de fosforilase b em a, catalisada pela fosforilase b quinase.

Dada a importância da enzima para a presente tese, procuraremos, rever brevemente suas propriedades.

A fosforilase b quinase também se apresenta sob duas formas: uma ativa e uma inativa. A interconversão entre elas é regulada por uma série de mecanismos, através de diferentes fatores. KREBS et al. (1959) estudaram a enzima extraída de músculo esquelético e relacionaram sua atividade com o processo de contração muscular. Destes estudos, os autores observaram que os extratos de músculo contêm a enzima em baixa atividade em pH 7,0. Esta atividade, todavia, aumenta nos processos de contração muscular ou por um aumento de pH, até 8,2. Quando a enzima purificada no estado inativo é tratada por ions Ca^{++} , ou por ions Mg^{++} na presença de ATP e adenosina-3'-5'-fosfato cíclico (AMPc), ela torna-se ativa em pH fisiológico (KELLER e CORI, 1955; KREBS et al. 1959; MEYER et al. 1964). Essa ativação é acompanhada de fosforilação de resíduos de serina da enzima (KREBS et al. 1964). O papel do AMPc é acelerar esta fosforilação (RILEY et al. 1968). Como o AMPc só conseguia ativar a quinase em preparações parcialmente purificadas, KREBS et al. (1964), supuseram a presença de um mediador entre o nucleotídeo e a enzima, mediador este que seria eliminado durante o processo de purificação. Com efeito, uma proteína quinase AMPc-dependente que catalisa a fosforilação da quinase pelo AMPc, foi isolada e purificada de músculo esquelético de coelho, (WALSH et al. 1968) e de outros tecidos de diversos animais. O mecanismo de ativação da quinase pelo AMPc foi melhor estudado por KUMON et al. (1972), que purificaram um sistema de proteínas -quinase-AMPc dependentes de fígado de rato. Estes autores verificaram que estas proteínas, quando estão associadas a uma outra denominada proteína-R, apresentam-se inativas. O AMPc, ligando-se alostericamente a esta proteína-R, promove a liberação e consequente ativação das proteínas quinases que por sua vez catalisam a fosforilação da fosforilase b quinase.

Através do mecanismo de ativação da fosforilase b quinase via AMPc, agentes de fundamental importância metabólica podem determinar um acúmulo de fosforilase a nos tecidos e contribuir para o aceleramento do fluxo glicogenolítico. É desta forma que a adrenalina, o glucagon e as metilxantinas ativam a fosforilase b quinase. O aumento do AMPc por ação desses agentes foi demonstrado "in vivo" e em corações perfundidos (MURAD et al. 1962; BUTCHER e SUTHERLAND, 1962; HAMMERMEISTER et al. 1965; ROBINSON et al. 1965; DRUMOND e DUNCAN, 1965). Todavia, os processos pelos quais o nucleotídeo cíclico está aumentado diferem entre si. Assim, a adrenalina e glucagon estimulam a formação do nucleotídeo por estimulação da adenil ciclase, enzima que catalisa a transformação de ATP em AMPc (SUTHERLAND e RALL, 1960; RALL et al. 1963), enquanto que as metilxantinas condicionam um aumento do AMPc, inibindo a fosfodiesterase, enzima responsável pela sua deciclicização e transformação em 5'-AMP (BUTCHER e SUTHERLAND, 1962). O tratamento prévio com bloqueadores de receptor- β -adrenérgico (dicloroisoproterenol, pronethalol, propanolol), impede o acúmulo do nucleotídeo cíclico em coração de cão, de ratos e em músculo esquelético tratados por adrenalina (MURAD et al. 1962; POSNER et al. 1965; DRUMOND e DUCAN, 1966; KRAUSE e WOLLENBERGER, 1967; WOLLENBERGER et al. 1969). A íntima relação, pois, entre o AMPc e a adrenalina está estabelecida. Todavia, o processo parece não ser universal, uma vez que o estímulo elétrico ou a contração muscular, que também condicionam acentuado aumento de atividade de fosforilase b quinase (HELMREICH, 1965), não são afetados pelo tratamento prévio com bloqueadores de receptores β -adrenérgicos, e nem o conteúdo de AMPc se encontra alterado pela ação deste tipo de estímulo nos animais normais (DANFORTH et al. 1962; POSNER et al. 1965). No caso de estímulo elétrico, a ativação da fosforilase b quinase parece não se dar pela via adrenérgica descrita. DRUMOND et al. (1969), sugerem a participação de ions Ca^{++} em tal ativação. No processo de contração muscular, ions Ca^{++} são liberados no citoplasma e a fosforilase b quinase encontra-se mais ativa (EBASHI et al. 1969; FISCHER et al. 1970).

Um outro mecanismo de ativação da fosforilase b quinase parcialmente purificada é pois, através da adição de ions Ca^{++} (FISCHER e KREBS, 1955). MEYER et al. (1964), verificaram que a quinase suficientemente pura não mais apresentava ativação pelo Cálcio, a menos que um fator proteico, removido durante a purificação, fosse readicionado à preparação. Esta última proteína denominada fator ativante da quinase (KAF), foi identificada em músculo esquelético (HUSTON e KREBS, 1968) e em músculo cardíaco (DRUMOND et al. 1965; DRUMOND e DUNCAN, 1966), como uma enzima proteolítica Cálcio-dependente que promovia uma ativação irreversível da quinase através de uma proteólise parcial (HUSTON e KREBS, 1968; DRUMOND e DUNCAN, 1968). A irreversibilidade deste processo contribuiu para afastá-lo como relevante no mecanismo de controle fisiológico (FISCHER et al. 1970). É interessante observar que a tripsina e a quimotripsina tem o mesmo efeito do KAF, (RALL e SUTHERLAND, 1958; KREBS et al. 1964). Experiências mais recentes de OZAWA et al. (1967); KREBS et al. (1969), contudo, revelaram que a adição de Ca^{++} em baixas concentrações, até 10^{-7}M , poderia promover a ativação da fosforilase b quinase independentemente de qualquer outro fator. Em vista de concentrações extremamente baixas de ions Ca^{++} serem capaz de ativar a enzima, os autores sugeriram a participação deste mecanismo nos processos fisiológicos.

A decisão entre a importância do AMPc e dos ions Ca^{++} nos processos fisiológicos de ativação da fosforilase b quinase tem sido objeto de estudo de inúmeros pesquisadores. Assim, NAMM et al. (1968), perfundindo corações com meio isento de Ca^{++} , não conseguiram aumento de produção de fosforilase a pela adição de adrenalina. É importante notar que a adrenalina causou considerável aumento nos níveis de AMPc das preparações. Por outro lado, quando o Ca^{++} era adicionado ao perfusato no lugar da adrenalina, um aumento da fosforilase a era verificado sem que os níveis de AMPc das preparações se alterassem. Estas observações demonstram o importante papel de ions Ca^{++} para a atividade catalítica de fosforilase b quinase "in vivo", que se passa pois, independentemente de qualquer fosforilação prévia da enzima, mediada por

AMPC. Este processo reversível de ativação da quinase por Ca^{++} parece estar associado ao processo de contração muscular que também requer ions Ca^{++} (EBASHI et al. 1969). Já está estabelecido que a contração muscular é iniciada pela liberação de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático e, que após a contração, ions Ca^{++} são reabsorvidos pelo mesmo retículo sarcoplasmático em um processo dependente de energia sob a forma de ATP, (MOMMAERTS et al. 1959; EBASHI et al. 1969; FISCHER et al. 1970).

Da mesma forma que o retículo sarcoplasmático, outra organela celular envolvida no transporte de ions Ca^{++} , é a mitocôndria (LEHNINGER, 1970; REYNAFARJE e LEHNINGER, 1969, 1973). Assim, durante o transporte de elétrons ao nível da cadeia respiratória, há uma transferência acelerada de ions Ca^{++} do citoplasma para o interior da mitocôndria, (LEHNINGER, 1970). Em consequência, há uma diminuição da concentração desses ions no citoplasma. Evidentemente, os processos fisiológicos, cujas atividades são Ca^{++} -dependentes, devem sofrer alterações consequentes a esses mecanismos de regulação. Assim, de acordo com CHANCE, (1965); LEHNINGER (1970; CARAFOLI e LEHNINGER, (1971); BATRA, (1973), além dos processos celulares como glicólise, respiração, etc., o transporte de Cálcio pela mitocôndria exerce também um papel regulador do ciclo excitação-relaxamento do músculo. Desta forma tanto o retículo sarcoplasmático como a mitocôndria seriam responsáveis pela liberação e reabsorção de Ca^{++} no citoplasma, ambos contribuindo para o controle dos processos fisiológicos referidos (CARAFOLI et al. 1969; HAUGAARD et al. 1969).

Em alguns tipos de músculo, como o cardíaco e o esquelético vermelho, onde existe relativa abundância de mitocôndria em comparação com o retículo sarcoplasmático, as mitocôndrias teriam papel preponderante (HAUGAARD et al. 1969). De acordo com FISCHER et al. (1970), a liberação de Ca^{++} no citoplasma funciona como um denominador comum ou fator controlador entre a contração muscular e a ativação da fosforilase b quinase.

Além do sistema de fosforilases, outros sistemas de fosfoquina-

ses estão envolvidos no controle da glicogenólise muscular. As outras fosfoquinases desta via metabólica tem, talvez, papel tão ou mais importante que a própria fosforilase b quinase. Aliás, fica difícil decidir qual das fosfoquinases é a mais ou menos importantes, uma vez que o processo glicogenolítico é altamente complexo e certamente estas quinases estão interrelacionadas no controle do mesmo (LOWRY et al. 1964; HELMREICH et al. 1965). A fosforilase b quinase como vimos, catalisa a ativação do sistema de fosforilases, proporcionando maior conteúdo de fosforilase a que por sua vez, promove a catálise do primeiro passo da sequência metabólica, produzindo glicose-1-fosfato (G-1-P) pela fosforilação do glicogênio. A fosfofrutoquinase, por sua vez catalisa a formação de frutose-1,6-difosfato, a partir de frutose-6-fosfato (F-6-P) e do ATP. A piruvato quinase pelo fato de formar ATP ao nível do substrato também tem efeito controlador (HESS e BOITEUX 1971).

Agentes como adrenalina e glucagon, promovem estímulo da glicogenólise sem correspondente estímulo da glicólise, o que faz com que haja acúmulo de ésteres fosfóricos nos tecidos (HELMREICH, et al 1964). MANSOUR, (1972), estudando o efeito da adrenalina sobre a fosfofrutoquinase, observou que esta enzima só era ativada pelo hormônio por efeito secundário ao aumento de AMPc e de ésteres fosfóricos, devido a estimulação primária da adenilciclase e da fosforilase b quinase. Desta maneira a produção de ácido láctico pela adrenalina não era proporcional a formação dos ésteres fosfóricos, ao contrário do que ocorre com o estímulo elétrico onde as duas enzimas, fosforilase b quinase e fosfofrutoquinase são estimuladas simultaneamente, permitindo um alto fluxo glicogenolítico com grande produção de ácido láctico (PASSONEAU e LOWRY, 1964). O mecanismo proposto para explicar o estímulo elétrico parece ser também verdadeiro para o caso da anóxia (MORGAN E PARMEGGIANI, 1964).

CORNBLATH et al. (1963), estabeleceram as diferenças entre o estímulo da glicogenólise pelo glucagon e pela anóxia. Esses autores, trabalhando com corações perfundidos, verificaram que o au

mento de ácido láctico era maior em consequência da anóxia que pela ação do glucagon, embora o aumento de fosforilase a fosse maior pela ação do glucagon. Os autores interpretaram esses achados, como sendo devido a uma ativação da fosforilase b pelo AMP, uma vez que este nucleotídeo estava aumentado pela anóxia, enquanto que a G-6-P e o ATP, que são inibidores da ativação da fosforilase b pelo AMP, estavam em níveis baixos, nestas condições. Todavia, à luz dos conhecimentos atuais, este fenômeno pode ser interpretado mais como uma estimulação da fosfofrutoquinase, devido ao baixo conteúdo de ATP encontrado na célula em condições de anóxia (MAYER e WILLIAN, 1967). Durante o processo de anóxia, os níveis de ATP celulares são extremamente baixos, uma vez que, nestas condições, a célula utiliza todo ATP disponível para seus processos vitais e a regeneração do mesmo está dificultada. Em consequência, as concentrações de ADP, AMP e Pi estão elevadas (REGEN et al. 1964).

É conhecido o fato de ser a fosfofrutoquinase controlada pelas razões: ADP/ATP, AMP/ATP e Pi/ATP (PASSONEAU e LOWRY, 1962). Quando estas razões são altas, a enzima fica ativada e em consequência a esta ativação, os níveis de G-6-P e F-6-P, substrato natural da enzima, encontram-se diminuídos. Em experiências de anóxia, com efeito, o que se constata é um abaixamento dos níveis de G-6-P na célula. Quanto a piruvato quinase, esta também é inibida por ATP e ativada por ADP, além de frutose-1,6-difosfato. Como estas enzimas representam passos limitantes da velocidade da glicólise (HESS e BOITEUX, 1971), suas ativações mantêm um alto fluxo glicolítico, e pode explicar a diminuição de ésteres fosfóricos em corações perfundidos em condições de anóxia (MORGAN e PARMEGGIANI, 1964), bem como o grande aumento na produção de ácido láctico encontrado.

Entre os agentes glicogenolíticos o 2,4- α -Dinitrofenol (DNF) constituía até há pouco, motivo de controvérsia na literatura. Assim, estudos de HALL, (1947); THER e MUELLER, (1950), revelaram que a droga condicionava um estímulo da glicogenólise, diminuindo os níveis de glicogenio muscular e hepático e proporcio-

nando um aumento do conteúdo de ácido láctico correspondente. Todavia, uma persistente inibição da fosforólise do glicogênio era encontrada nos extratos dos animais envenenados. As experiências de CORI e ILLINGWORTH, (1956), em músculo isolado, revelaram que quando o DNF era administrado em concentrações finais de $10^{-5}M$, não havia alteração significativa na atividade do sistema de fosforilases, porém, em doses de $10^{-3}M$, a droga causava uma sensível diminuição no conteúdo de fosforilase a. O aumento de consumo de glicogênio, pela droga, não foi então explicado por estes autores como sendo devido a estimulação do sistema de fosforilases, sistema considerado na época fundamental no controle da glicogenólise, uma vez que, sua estimulação era fato persistente pelos outros agentes glicogenolíticos estudados (adrenalina, glucagon, metilxantinas, estímulo elétrico, choques tetânicos, etc.). SEGAL e BLAIR, (1959), demonstraram que tanto o DNF como o salicilato de sódio, que promoviam uma rápida perda de glicogênio muscular, determinavam uma inibição da atividade do sistema de fosforilases, por diminuir o conteúdo da forma ativa da enzima. Esta diminuição de fosforilase a também foi constatada por GONÇALVES e FOCESI, (1967). Esses últimos autores, contudo, conseguiram demonstrar que somente a fosforilase b era inibida pelo DNF e pretenderam, explicar, pelo menos, que a droga não inibia a glicogenólise, uma vez que a fosforilase b não tinha papel relevante neste processo. Evidentemente, esses achados não contribuíram para explicar o efeito glicogenolítico do DNF, pelo contrário, lançaram mais dúvidas e controvérsia ao fenômeno. Porém, FOCESI et al. (1969), usando animais envenenados com DNF e determinando a atividade do sistema de fosforilases em condições tais que evitavam efeitos colaterais indesejáveis da droga sobre as determinações, demonstraram um aumento no conteúdo de fosforilase a as custas de uma ativação da fosforilase b quinase. Todavia, quando a droga era administrada a extratos de tecidos esta ativação não mais se verificava (FOCESI et al. 1969b). Os resultados encontrados por esses autores, nas experiências realizadas "in vivo" trouxeram pela primeira vez uma explicação razoável para o aumento do consumo de glicogênio causado pela droga quando administrada a animais ou a preparações de tecidos. Porém, quan

do se comparava o efeito glicogenolítico do DNF com aquele da adrenalina, importantes considerações podiam ser estabelecidas. Assim, o DNF era muito mais glicogenolítico que a adrenalina, pela avaliação dos níveis de lactato teciduais, apesar desta última proporcionar níveis de fosforilase a muito mais elevados. Des^{de} estes resultados ficou sugestivo que no caso do DNF, outros fatores além da ativação do sistema de fosforilases deveriam estar envolvidos no mecanismo de sua ação, pois os níveis da fosforilase a não explicavam o alto conteúdo de ácido láctico encontrado nos animais envenenados. Entre estes fatores, os que nos pareceram mais importantes foram aqueles relacionados com sua propriedade desacopladora de fosforilação oxidativa (PEISS e FIELD, 1948; LARDY e WELLMAN, 1952; LOOMIS e LIPMAN, 1948; DAUDOVA e SHVETS, 1973) e o seu efeito ATPásico (LARDY e WELLMAN, 1953). A somatória destes fatores proporcionam baixos níveis de ATP na célula e a glicogenólise poderia estar estimulada em consequência das alterações causadas pelos baixos níveis energéticos intracelulares. Com base nestas considerações e com finalidade de postular uma explicação para o mecanismo de ação glicogenolítica do DNF, realizamos uma série de experiências, cujos resultados julgamos, puderam contribuir, de alguma forma, para esclarecer este fenômeno tão discutido e da maior importância biológica, uma vez que mecanismos universais como Efeito Pasteur, por exemplo, estão implicados diretamente no problema.

MATERIAL E MÉTODOS

PURIFICAÇÃO DE FOSFORILASE b DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE COELHO

Inicialmente, esta enzima era preparada pelo método de CORI et al. (1955), a partir de fosforilase a obtida de músculo esquelético de coelho e transformada em fosforilase b por reação catalisada pela enzima P.R. O método simplificado por FISCHER e KREBS, (1958), possibilita a preparação da enzima diretamente a partir do músculo.

Procedimento

I. *Preparação do extrato de músculo* - Um coelho adulto era anestesiado com Nembutal e o sangue drenado pelas veias jugulares. O músculo do dorso e das patas posteriores eram cortados, pesados e moídos em máquina de moer carne, à temperatura ambiente. Para cada 100 g de músculo moído, adicionava-se ainda à temperatura ambiente, 100 ml de água destilada. Em seguida, a mistura era agitada durante 10 minutos, filtrada em gaze dupla, e o filtrado recolhido em banho de gelo. Nesta primeira extração obtinha-se uma quantidade pequena de filtrado. Fazia-se uma segunda extração, colocando-se igual volume ao anterior, de água destilada (25°C), por 10 minutos e filtrava-se como anteriormente. Uma terceira extração era feita adicionando-se a metade do volume anterior de água destilada. Os filtrados, reunidos em um bequer em banho de gelo, eram finalmente filtrados através de algodão de vidro, para remover partículas de gordura.

II. *Precipitação isoelétrica* - O pH do filtrado era ajustado para 5,1-5,2 adicionando-se cuidadosamente CH_3COOH 1,0N mantendo-se o líquido em contínua agitação. Observava-se, então, um aumento de turvação seguida de floculação. Após um repouso de 5 minutos em banho de gelo a 0°C, removia-se o precipitado por centrifugação a 1370 g por 45 min. a 0°C. O líquido sobrenadante era filtrado através de papel de filtro Whatman nº 3MM para remover

resíduos e partículas em suspensão. Posteriormente, ajustava-se o pH para 6,8 pela adição de KHCO_3 sólido.

III. *Precipitação com sulfato de amônia* - Para cada litro do filtrado, adicionava-se 700 ml de uma solução saturada de sulfato de amônia pH 6,8 tornando-o assim, 41% saturado. Caso o pH da mistura estivesse abaixo de 6,8, KHCO_3 sólido era adicionado para mantê-lo neste pH. A mistura era deixada em repouso a 30°C e, no dia seguinte, decantava-se o sobrenadante e o precipitado era centrifugado (0°C). Após a centrifugação, adicionava-se ao precipitado cerca de 10 ml de água destilada (25°C), para cada 150 g de músculo moido. A solução era dialisada por uma noite (3°C) contra 8 litros de tampão tris 0,001M pH 7,5.

IV. *Tratamento térmico em pH elevado* - À solução de proteína dialisada, as seguintes soluções eram adicionadas:

1. Cisteína 0,3M pH 7,0 recentemente preparada, para uma molaridade final de $3 \times 10^{-2}\text{M}$;
2. EDTA sódico 0,1M pH 7,0 para uma molaridade final de $5 \times 10^{-4}\text{M}$;
3. Tampão tris 2M para elevar o pH até 8,8.

A mistura era então incubada a 37°C durante uma hora, resfriada e, posteriormente, levada a pH 7,0 com ácido acético 1,0N. Se fosse observada alguma turvação, centrifugava-se a solução e eliminava-se o precipitado.

V. *Cristalização e recristalização* - Após a incubação da solução a 37°C e resfriamento, soluções neutras de AMP 0,1M e acetato de magnésio 1,0M eram adicionadas de modo que a concentração final dessas substâncias fossem: AMP 0,001M e Mg^{++} 0,01M. Após resfriamento a 0°C , a enzima começava a cristalizar num processo que continuava atingindo o máximo dentro de 6 horas.

Após este tempo, separavam-se os cristais por centrifugação a $8.000 \times g$ durante 20 minutos a 0°C e dissolvia-se em 100-120 ml de cisteína 0,03M pH 7,0 (30°C), para cada 1000 g de músculo usado inicialmente. O AMP e o acetato de magnésio eram adicionados como anteriormente. Geralmente, repetia-se o processo de recris-

talização várias vezes.

PURIFICAÇÃO DE FOSFORILASE b QUINASE INATIVA DE MÚSCULO DE COELHO

O processo de KREBS et al. (1964) é fundamentalmente baseado em centrifugação diferencial a baixa temperatura.

Procedimento

I. *Preparação do extrato de músculo* - Uma coelha de 3-4 kg era anestesiada com 200 mg de Nembutal e decapitada para permitir escoamento do sangue. Os músculos das patas traseiras e lombares eram extraídos, resfriados em gelo picado e moídos na câmara fria, em máquina de moer carne doméstica. O músculo era pesado e imediatamente homogenizado com 2,5 volumes (litro/kg), de solução neutra de EDTA $4 \times 10^{-3}M$ a $0^{\circ}C$ por 1 minuto, em liquidificador. O homogenizado era centrifugado a $0^{\circ}C$ durante 40 minutos a 4.000 x g. O sobrenadante decantado era filtrado em algodão de vidro para remoção do material lipídico.

II. *Tratamento em pH isoelétrico* - O pH do extrato gelado que estava em torno de 6,5-6,7 era ajustado para 6,1-6,2 pela adição vagarosa e com agitação, de ácido acético 1N, tornando-se, moderadamente, turvo. Depois de ser mantido em banho de gelo durante 5 a 10 minutos, a mistura era centrifugada a $0^{\circ}C$ durante 30 minutos a 4.000 g. O precipitado era suspenso em volume mais ou menos igual de tampão β -glicerofosfato 0,10M - EDTA $4 \times 10^{-3}M$, pH 8,2. Após dissolução da enzima, juntava-se mais 165 ml de solução tampão β -glicerofosfato 0,05M - EDTA $2 \times 10^{-3}M$, pH 7,0 para cada kg de músculo usado inicialmente. Procedia-se, então, homogeneização final a $0^{\circ}C$, usando aparelho Potter-Elvehøj para assegurar uma completa mistura e fina dispersão do material. O pH final devia estar entre 6,8 e 7,2.

III. *Centrifugação* - Esta suspensão era centrifugada a 80.000 x g durante 90 minutos a $0^{\circ}C$ ou a 30.000 rpm, usando-se rotor n°

30 da Spinco Model L, preparativa. O sobrenadante límpido ("30-Supernatant fraction") era decantado e levado ao congelador a -15°C , imediatamente. Nessa fase a enzima estava parcialmente purificada e passível de ativação pela incubação com AMPc, pois a proteína quinase AMP cíclico dependente ainda estava presente na preparação.

PREPARAÇÃO DE FOSFORILASE b COMO SUBSTRATO DE FOSFORILASE b QUINASE

A fosforilase b para servir de substrato à quinase, deve estar em concentração elevada e conter a menor concentração possível de AMP.

Procedimento - Cristais de fosforilase b, obtidos por centrifugação a $8.000 \times g$ por 20 minutos a 0°C , eram dissolvidos em volume adequado de solução de cisteína $0,03\text{M}$ pH 7,0 à temperatura ambiente. Caso houvesse precipitado, este era de cistina e era eliminado por centrifugação a $8.000 \times g$ por 20 minutos a $25-30^{\circ}\text{C}$. A recristalização iniciava pela adição de acetato de magnésio 1M e de AMP $0,1\text{M}$ pH 6,8, de modo que suas concentrações finais fossem respectivamente de 10 mM e $0,1 \text{ mM}$. A suspensão era conservada em banho de gelo até o dia seguinte.

Antes do uso, separavam-se os cristais por centrifugação e preparava-se solução de fosforilase b de concentração $20-25 \text{ mg/ml}$ em tampão de cisteína $0,03\text{M}$ pH 7,0. (Desprezava-se a cistina, se houvesse, por centrifugação à temperatura ambiente).

PURIFICAÇÃO DA DESIDROGENASE LÁCTICA DE CORAÇÃO DE BOI

A enzima é purificada pelo método de SCHWERT et al. (1962), a partir de coração de boi por um processo envolvendo principalmente precipitações fracionadas a baixa temperatura.

Procedimento

I. *Preparação do extrato* - Um coração de boi, era congelado imediatamente após abate no matadouro, conservado em câmara fria, bem como todas as soluções a serem usadas na preparação. O órgão era cortado em pequenos pedaços e a enzima era extraída com 2,4 litros de água gelada, durante uma hora, com agitação ocasional através de uma espátula de louça. O extrato era filtrado com auxílio de 4 camadas de gaze e o filtrado conservado em banho de gelo a 0°C. Adicionava-se, então, 0,5 ml de tampão acetado 0,8M pH 4,0 para cada 100 ml de filtrado.

II. *Tratamento com álcool etílico* - Cuidadosamente e por etapas, para que a temperatura não subisse acima de 0°C, etanol pré-esfriado a -20°C era adicionado ao extrato na proporção de 1 ml de etanol para cada 2 ml do filtrado (o pH do filtrado deve estar em torno de 5,2). Após a adição, a suspensão alcoólica era mantida em repouso em banho de gelo na câmara fria por 2 horas. O precipitado era então separado por centrifugação a 4.000 x g por 15 minutos a 0°C e suspenso em 400 ml de tampão fosfato 0,1M pH 6,95 a 0°C. A suspensão era homogenizada com auxílio de um liquidificador doméstico, mantendo-se a rotação mínima, durante 5-10 minutos. Após este tempo, a suspensão era centrifugada a 9.000 x g por 20 minutos a 0°C. Caso não fosse suficiente repetia-se a centrifugação, desprezava-se a fração insolúvel e o sobrenadante com atividade da desidrogenase poderia ser mantido por mais de uma semana a 0°C.

III. *Tratamento por sulfato de amônia* - Para cada 100 ml do sobrenadante adicionava-se cuidadosamente 43,3 g de sulfato de amônia purificado, com constante agitação através de agitador magnético e em banho de gelo a 0°C. Após a adição, deixava-se a suspensão em repouso durante uma noite. Na manhã seguinte, um precipitado volumoso era formado. A solução de sulfato de amônia correspondia a 0,6 de saturação. A suspensão era centrifugada a 11.000 x g por 20 minutos a 0°C (repetia-se a centrifugação, caso essa não fosse suficiente) e o sobrenadante era desprezado.

O precipitado, que continha sulfato de amônia 0,6 de saturação, era suspenso em 200 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e o volume final da mistura era medido. O volume, que excedia a 200 ml, correspondia ao volume de precipitado cuja concentração era 0,6 de saturação de sulfato de amônia. A seguir, preparava-se uma solução 0,9 de saturação de sulfato de amônia em tampão fosfato 0,2M pH 7,0 (900 ml de solução saturada de sulfato de amônia mais 100 ml de tampão fosfato 2M pH 7,6). A solução passou a ser denominada - solução 0,9. Calculava-se, então, o volume da solução 0,9 a ser misturada com a suspensão acima, de modo que a mistura final ficasse a 0,3 de saturação de sulfato de amônia.

A solução com 0,3 de saturação de sulfato de amônia era centrifugada e o precipitado formado era desprezado. Media-se exatamente o volume do sobrenadante e adicionava-se, gota a gota, e com agitação constante, igual volume de solução 0,9 à temperatura ambiente. Evitava-se, porém, temperatura superior a 25°C. Após a adição, continuava-se a agitação por cerca de mais 5 minutos. A solução final tinha concentração 0,6 de saturação de sulfato de amônia. Separava-se e desprezava-se o sobrenadante por nova centrifugação a 11.000 x g por 20 minutos a 5°C. Dissolvia-se o precipitado com 100 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,0. Em seguida, adicionava-se solução 0,9 em quantidade necessária para aumentar a saturação de sulfato de amônia para 0,3 de saturação, considerando-se a saturação do precipitado inicial. Após a adição total deixava-se agitando por cerca de mais 5 minutos e em repouso por 30 minutos. Separava-se e desprezava-se o precipitado formado por centrifugação a 11.000 x g por 20 minutos a 5°C. O sobrenadante era límpido e amarelado. Nova adição de solução 0,9 era feita, como anteriormente, de modo a aumentar a saturação de 0,4 para 0,5 de saturação. Após a adição, continuava-se a agitação - por mais uma hora. Mantinha-se a solução na câmara fria em repouso por uma noite. Na manhã seguinte, formava um precipitado que era separado por centrifugação a 22.000 x g por 10 minutos a 5°C ou à temperatura ambiente. Desprezava-se o sobrenadante e suspendia-se o precipitado em 20 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. De zeseis ml de solução 0,9 eram adicionados, gota a gota, com agi-

tação por cerca de uma hora e deixava-se em repouso por mais ou menos uma hora, na câmara fria. A suspensão era centrifugada a 22.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante era tratado com 3,2 ml de solução 0,9, gota a gota, sob constante agitação. Mantinha-se em agitação durante uma hora e, posteriormente, levava-se à câmara fria onde era mantido até o dia seguinte. O precipitado era centrifugado a 22.000 x g por 10 minutos e suspenso em 20 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,0. Adicionava-se novamente solução 0,9, gota a gota, com agitação constante, a 25°C, até que se observasse turvação (era necessário cerca de 19 ml de solução 0,9) e continuava-se a agitação por cerca de 15 minutos, deixando em repouso por mais ou menos 24 horas. Neste tempo podia-se notar a presença de cristais brancos. A enzima cristalizada podia ser conservada na mesma solução a 0°C. Geralmente a atividade enzimática, nessas condições, era mantida por muitos meses.

PURIFICAÇÃO DA DEAMINASE DE ÁCIDO 5'-ADENÍLICO

A enzima era purificada de músculo esquelético de coelho pelo método de NIKIFORUK e COLOWICK, (1955), por um processo que envolvia a adsorção da enzima por alumina Cy seguido de fracionamento por sulfato de amônia amoniacal.

Procedimento

I. *Preparação do extrato* - Músculo das patas traseiras e lombares de coelho era congelado, moido, lavado quatro vezes com quatro volumes de NaCl 0,5% e filtrado através de dupla camada de gaze. A deaminase era extraída do resíduo incolor por agitação ocasional com um volume de solução de NaHCO₃ 2% gelada, por uma hora, e filtrada através de papel de filtro Whatman nº 4 (fração 1).

II. *Adsorção da Deaminase por alumina* - Alumina Cy (peso seco 0,025 g/ml) era adicionada vagarosamente à fração 1 com agitação contínua. Cinquenta ml de alumina por litro da fração 1 era usu-

almente suficiente para uma completa adsorção. A suspensão era mantida a 8°C por 15 minutos, com agitações ocasionais. Em seguida era centrifugada a frio. O sobrenadante fluido era desprezado e a deaminase era eluída a 30°C com Na_2HPO_4 1M, usando-se 50 ml por litro da fração 1. O eluato era mantido no gelo para permitir a cristalização de todo o Na_2HPO_4 que era, em seguida, centrifugado e desprezado.

III. *Fracionamento com sulfato de amônia amoniaca* - Uma solução de sulfato de amônia saturada a 0°C e ajustada a pH 7,6 com 0,01 volumes de hidróxido de amônia 0,18M era adicionada vagarosamente ao eluato a 0°C até obter-se 0,27 de saturação. Após centrifugação o sobrenadante fluido era então levado a 0,45 de saturação e, após centrifugação, esta fração era dissolvida no menor volume possível de Na_2HPO_4 0,1M. Esta preparação pode ser mantida durante 4 meses a 4°C, sem perda apreciável da atividade.

PURIFICAÇÃO DE MIOQUINASE

A purificação da Mioquinase é baseada no método descrito por COLOWICK e KALKAR, (1943), que se baseia na adsorção de impurezas proteicas por alumina Cγ, seguida de fracionamento com ácido tricloroacético.

Procedimento

I. *Preparação do extrato* - Músculo esquelético de coelho era congelado, moido e extraído duas vezes com um volume de KOH 0,03M EDTA 0,002M gelado. A terceira extração era feita com 1/2 volume de EDTA 0,02M.

II. *Acidificação e aquecimento* - O extrato era acidificado com 0,05 volumes de HCl 2,0N e aquecido tão rapidamente quanto possível até 90°C. Depois de 3 minutos a esta temperatura, a solução era resfriada rapidamente e neutralizada com NaOH 2M. O precipitado volumoso formado era removido por filtração. O filtrado tor

nava-se cerca de seis vezes mais puro, com relação ao extrato inicial. A esta solução adicionava-se Alumina Cy (peso seco 0,025 mg/ml), na proporção de 1 ml:6 ml do extrato para adsorver proteínas inativas. Depois de uma hora à temperatura ambiente, a mistura era centrifugada. A mioquinase permanecia no sobrenadante.

III. *Fracionamento com ácido tricloroacético* - Para cada 10 ml do sobrenadante do passo II, juntava-se 0,25 ml de T.C.A. 10% e o precipitado era desprezado. Ao sobrenadante fluído juntava-se mais 0,5 ml de T.C.A. 10%. O precipitado era então separado por centrifugação, dissolvido em água e dialisado contra solução de sulfato de amônia 2%.

Após esta última fase, a enzima encontrava-se cerca de 14 vezes mais pura em relação ao extrato inicial e podia ser mantida a baixa temperatura, durante vários meses, sem perda apreciável de sua atividade.

PURIFICAÇÃO DE APIRASE DE BATATA

A apirase de batata foi purificada pelo método de KALKAR, (1944) modificado por KRISHNAN, (1955), num processo envolvendo precipitação fracionada por sulfato de amônia a baixa temperatura.

Procedimento - Um quilo de batata descascada era moida no "Waring Blendor" com 1 litro de KCN 0,01M pH 7,0. Em seguida, a suspensão resultante era filtrada, através de dupla camada de gaze e centrifugada a frio. A enzima ficava no sobrenadante e era precipitada pela adição de 450 g de sulfato de amônia finamente moido para cada litro de extrato, com agitação constante. O material precipitado era filtrado por gravidade, através de papel de filtro Whatmann nº 1 e mantido em banho de gelo durante a noite. No dia seguinte, o material sólido era suspenso em água, dialisado a frio contra água destilada corrente durante 24 horas. Em seguida, era centrifugado e o sobrenadante reprecipitado com sulfa

to de amônea. O material sólido era filtrado, suspenso em água, dialisado e centrifugado como acima. Para cada 100 ml desta solução, 30 g de sulfato de amônea era adicionado com agitação e o material precipitado era desprezado após filtração. Ao filtrado, 15 g de sulfato de amônea era novamente adicionado e a enzima era precipitada. O material era filtrado, dialisado a frio e depois de dissolvido no menor volume possível de água destilada, era centrifugado.

PREPARAÇÃO DE MITOCÔNDRIA DE MÚSCULO CARDÍACO

Mitocondrias cardíacas podem ser preparadas utilizando-se centrifugação fracionada e gradiente de densidade de acordo com PANDE e BLANCHER, (1971). As suspensões de células eram também tratadas por enzimas proteolíticas (Nagarse), de modo a hidrolisar proteínas indesejáveis nas preparações.

Procedimento - Coração de rato era removido rapidamente e colocado em solução gelada, (Sol. A), contendo: Manitol 0,21M; Sacarose 70 mμ; EDTA 0,1 mM; Tris-Cl 5mM, pH 7,4. Após lavagens sucessivas com esta solução, removia-se mecanicamente o tecido gorduroso e triturava-se o tecido muscular. Suspendia-se então 2 g de músculo triturado em 8 ml de solução A contendo 4 mg de Nagarse e incubava-se durante 8 minutos com agitação, em banho de gelo a 0°C. Em seguida, juntava-se mais 12 ml de solução A e homogenizava-se com homogenizador tipo Potter-Elvehjem, durante 30 segundos utilizando pistilo de diâmetro ligeiramente inferior ao correspondente do tubo de homogenização. Após 8 minutos de incubação adicional em banho de gelo a 0°C, adicionava-se mais 15 ml de solução A e homogenizava-se novamente com pistilo adequado para se obter uma suspensão fina. Em seguida centrifugava-se a suspensão fina. Em seguida centrifugava-se a suspensão a 0°C por 5 minutos a 400 x g e desprezava-se o precipitado. O sobrenadante era então centrifugado novamente durante 10 minutos a 12.000 x g e desprezado. O sedimento apresentava duas camadas, sendo que a camada mais clara superior era removida por lavagem com ligeira agi-

tação com solução A. O sedimento era novamente homogenizado com solução A, omitindo-se EDTA, e era recentrifugado a 12.000 x g durante 8 minutos. O novo sedimento era resuspenso em 0,6 ml de solução A, também na ausência de EDTA.

A proteína era determinada, em seguida pelo método de MURPHY e KIES, (1960), e a suspensão era convenientemente diluída de modo a se obter concentração de proteína de 50 mg/ml.

MÉTODO DE PERFUSÃO DE CORAÇÃO

Corações isolados de ratos previamente heparinizados e anestesiados com éter, eram suspensos e a perfusão era feita através de uma cânula implantada na aorta, permitindo a circulação via coronária. O perfusato escoava livremente a um recipiente adequado. A solução de perfusão era feita de acordo com KREBS e HENSELEIT, (1932). A temperatura era mantida a 37°C e o reservatório, colocado 70 cm acima do coração, era aerado com a mistura gasosa contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂, de acordo com MORGAN et al. (1961). As determinações nos corações perfundidos eram executadas após a imersão dos mesmos em Nitrogênio líquido. A solução de Krebs-Henseleit continha, (volume final, 2 litros): 13,80 g de NaCl; 0,70 g de KCl; 0,56 g de CaCl₂; 4,20 g de NaHCO₃; 0,22 g de MgCl₂.6H₂O; 0,28 g de NaH₂ PO₄.H₂O e 4,0 g de glicose e água destilada.

DETERMINAÇÃO DE FOSFORÓLISE DO GLICOGÊNIO EM EXTRATOS DE MÚSCULO TRATADOS COM DINITROFENOL

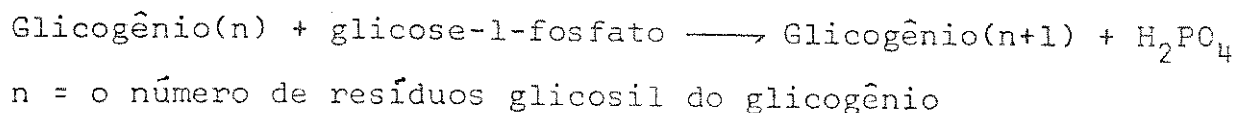
A fosforólise do glicogênio pode ser convenientemente determinada nos tecidos, através da medida do consumo de fosfato inorgânico, quando os mesmos são incubados com glicogênio em condições adequadas.

Procedimento - Ratos adultos eram injetados intra-peritonealmente

te com DNF 2,5 mg/100 g. Uma hora após a injeção, eram anestesiados com éter e o coração extraído rapidamente, pesado e triturado em solução gelada contendo tampão β -glicerolfosfato 0,002M - Fluoreto 3,8%, pH 6,8 na proporção de 2 ml de tampão por grama de músculo. Um ml do homogenizado centrifugado, era incubado a 37°C com 1 ml de glicogênio 2%. Em intervalos de 0 e 30 minutos, alíquotas de 0,3 ml eram retiradas e adicionadas a 5 ml de ácido tricloroacético 10%. Após filtração, o fosfato inorgânico consumido era determinado.

DETERMINAÇÃO DE FOSFORILASE a E TOTAL EM TECIDO MUSCULAR

A atividade das enzimas eram determinadas pelo método de ILLINGWORTH e CORI, (1953), isto é, pela medida do fosfato inorgânico liberado de glicose-1-fosfato usando-se glicogênio como "primer". A reação pode ser esquematizada como segue:



O equilíbrio dessa reação, catalisada por fosforilase a ou fosforilase b mais AMP, está grandemente deslocado "in vitro" no sentido de formação de ácido fosfórico. O ensaio realizado na ausência de AMP possibilita a determinação de fosforilase a, exclusivamente, enquanto que se AMP for adicionado ao ensaio, a atividade que se determina corresponde a atividade total, isto é, da somatória das duas enzimas: fosforilase a e fosforilase b.

Procedimento - Uma amostra de músculo esquelético ou cardíaco congelada era pesada e triturada em gral com areia de quartzo contendo EDTA 10^{-3} M, pH 6,8, na proporção de 25 ml por grama de músculo e centrifugado. Meio ml do sobrenadante era incubado com 0,5 ml de glicogênio 4%, durante 20 minutos, a 37°C. Alíquotas de 0,2 ml dessa mistura eram tratadas com glicose-1-fosfato, na presença ou não de AMP. As concentrações finais eram: glicogênio 1%, glicose-1-fosfato 0,016M, AMP 0,001M num volume final de 0,4

ml. Após 10 minutos de reação, alíquotas de 0,1 ml eram adicionadas sobre 3,5 ml de solução de ácido sulfúrico 0,07M e o fosfato inorgânico era determinado.

Unidades de fosforilase - A reação catalisada por fosforilase, nas condições descritas, é cineticamente de primeira ordem e a velocidade é proporcional à concentração da enzima a intervalos consideravelmente grandes de diluições da mesma. A equação abaixo representa a equação de constante de velocidade de reação de primeira ordem:

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{x_e}{x_e - x}$$

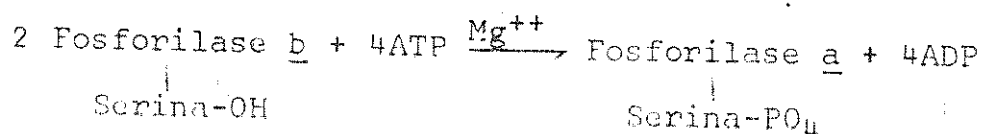
onde:

x_e , é a porcentagem de G-1-P convertida em fosfato inorgânico, no equilíbrio. Para pH da reação igual 6,8, $x_e = 78$; x , é a porcentagem de G-1-P convertida no tempo t (em minutos) e k , é a constante de velocidade da reação de primeira ordem.

Arbitrariamente, $k \times 1000$ representa o número de unidades da enzima presente na reação. Este número, multiplicado por um fator apropriado de diluição, representa o número de unidades presentes por grama de músculo.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFORILASE b QUINASE

O método de KREBS e FISCHER, (1955), baseia-se na propriedade que apresenta esta enzima de catalisar a fosforilação de fosforilase b pelo ATP na presença de ions Mg^{++} , de acordo com a seguinte reação:



A fosforilase a formada pode, por sua vez, ser determinada pelo método descrito anteriormente.

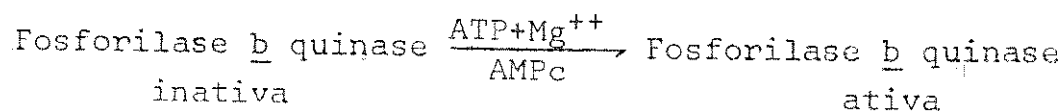
Procedimento - Amostra de músculo congelada era pesada e tritura da em gral, com areia de quartzo, contendo EDTA $2 \times 10^{-3}M$ pH 7,0 na proporção de 2 ml por grama de músculo. O homogenizado era então centrifugado a $4.000 \times g$, por 30 minutos, e o sobrenadante era filtrado através de lã de vidro e usado imediatamente. A mistura de reação continha: 0,1 ml de tampão tris 0,21M - β -glicerol fosfato 0,21M pH 7,0; 0,1 ml de solução de fosforilase b (cristalizada com AMP $10^{-4}M$, centrifugada e dissolvida em cisteína 0,015M pH 7,0 até concentração de 25 mg/ml); 0,05 ml da solução de fosforilase b quinase; 0,05 ml de acetato de magnésio 0,1M - ATP 0,03M pH 7,0 e 0,02 ml de NaF 1M. Depois de 5 minutos a $30^{\circ}C$ uma alíquota de 0,1 ml era removida e diluída 1:30 em tampão β -glicerolfosfato a 0,3M - cisteína 0,03M pH 6,8. A atividade da fosforilase a formada era analisada na ausência de AMP como descrito.

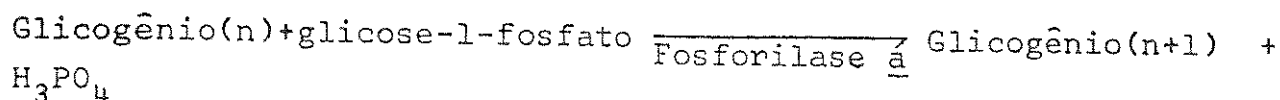
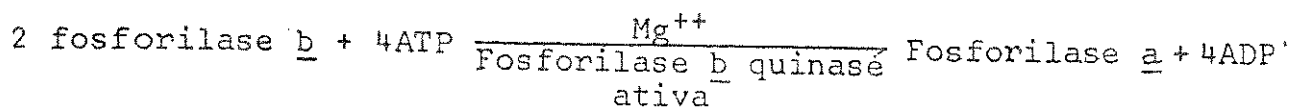
DETERMINAÇÃO DE AMP CÍCLICO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO

A análise de AMPc em extrato de tecidos pelo método de POSNER et al. (1964), é baseada na habilidade deste nucleotídeo em aumentar a velocidade de ativação da fosforilase b quinase inativa, pelo ATP na presença de Mg^{++} .

O papel do ATP está relacionado com a fosforilação da enzima. Na presença do AMPc, o processo é acelerado, embora, na sua ausência a ativação também ocorra, porém, em tempo mais prolongado.

A ativação da quinase pode ser avaliada pelo aumento da velocidade de conversão de fosforilase b em fosforilase a. Na realidade, a reação analisada se processava em 3 passos: ativação da quinase, conversão de fosforilase b em a e síntese de glicogênio catalisada pela fosforilase a formada. O esquema abaixo resume estas reações:





n = o número de resíduos glicosil do glicogênio.

Determinando-se o ácido fosfórico liberado, pode-se estabelecer uma relação entre esse e o AMPc introduzido na primeira fase do processo. Dada a peculiaridade do processo, é necessário a construção de uma curva padrão nessas condições.

Procedimento

I. *Preparação do extrato de músculo de ratos anestesiados com Nembutal* - Uma amostra de músculo esquelético da pata posterior era retirada e rapidamente congelada em Nitrogênio líquido. Após triturado, o tecido era colocado num tubo de vidro graduado. Tres volumes de KH_2PO_4 0,025M pH 7,8 era adicionado e a mistura era imediatamente imersa em banho de água fervente durante 5 minutos. Após resfriamento, centrifugava-se o extrato e desprezava-se o precipitado.

II. *Tratamento com tripsina* - Para remover fatores que interferem com a análise do AMPc no extrato, o sobrenadante do passo anterior era tratado com 10 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina, duas vezes cristalizada, durante duas horas a 30°C . A reação era interrompida pela adição de inibidor de tripsina de feijão soja numa concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$.

III. *Reação de ativação de fosforilase $\underline{b}$ quinase por AMPc* - A mistura de ativação de fosforilase $\underline{b}$ quinase continha: 10 μl de tampão β -glicerolfosfato 0,125 M-tris 0,125M pH 6,8; 10 μl de ATP 0,018M-acetato de magnésio 0,06M, pH 6,8; 10 μl do extrato de músculo preparado como acima, contendo AMPc e 10 μl de H_2O destilada. A mistura era incubada, aproximadamente, 3 minutos, a 37°C e a reação de ativação era iniciada pela adição de 10 μl da

quinase inativa. Após 10 minutos, a solução era diluída com 500 μ l de β -mercaptoetanol 0,125M pH 7,0 e mantida a 0°C. Com esta diluição a ativação da quinase era interrompida. A reação controle era feita nas mesmas condições na ausência de AMPc.

IV. *Reação de conversão de fosforilase b em a* - A fosforilase b quinase ativada no passo anterior, era usada para converter fosforilase b em a. Ions Mg^{++} e ATP são também necessários para esta reação. A mistura de conversão continha: 10 μ l de β -glicerolfosfato 0,125M-tris 0,125M, pH 6,8; 10 μ l de ATP 0,018M-acetato de magnésio 0,06M, pH 6,8 e 10 μ l de fosforilase b livre de AMP, (em solução neutra de cisteína 0,015M contendo 40.000 unidades por ml). A reação era iniciada pela adição de 10 μ l de quinase previamente ativada, e prosseguia por 5 minutos. Finalmente, era diluída com 500 μ l de tampão β -glicerolfosfato 0,04M - β -mercaptoetanol 0,03M, pH 6,8 e mantida a 0°C. A reação controle era feita nas mesmas condições na ausência de fosforilase b quinase.

V. *Determinação da atividade de fosforilase a* - A atividade da fosforilase a era analisada pelo método já descrito. Incubava-se 20 μ l de glicogênio 4% com 20 μ l da solução obtida no passo anterior, durante 20 minutos, a 37°C. Em seguida, adicionava-se 50 μ l de glicose-1-fosfato 0,032M, pH 6,8. Após 5 minutos, a reação era interrompida com 3,5 ml de H_2SO_4 0,07M. O fosfato liberado na reação era determinado colorimetricamente.

EFEITO INIBIDOR DE GLICOSE-6-FOSFATO SOBRE A VELOCIDADE DE REAÇÃO CATALISADA POR FOSFORILASE b QUINASE

Para estudar o mecanismo de inibição da fosforilase b quinase por G-6-P, experiências foram realizadas de modo a verificar se o ester interferia na ativação da fosforilase b quinase ou na velocidade da reação catalisada pela enzima previamente ativada.

Procedimento

I. *Inibição da ativação de fosforilase b quinase* - A reação de ativação mencionada no método anterior (III), se processava como descrito, adicionando-se, contudo, G-6-P em concentrações variadas. Os passos subsequentes eram executados de acordo com o mesmo método.

II. *Inibição da velocidade da reação catalisada por fosforilase b quinase previamente ativada* - Fosforilase b quinase era parcialmente ativada como descrito no método anterior, (reações I, II e III) utilizando-se, contudo, na reação III, diferentes concentrações de ATP. Essas preparações eram utilizadas para catalisar a conversão de fosforilase b em a. A G-6-P era, todavia, adicionada em concentração constante de $2 \times 10^{-3}M$.

O grau de inibição pela G-6-P em qualquer dos passos foi avaliado, como no método anterior, através da determinação do fosfato inorgânico liberado.

DETERMINAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO

Todos os métodos descritos até agora envolvem finalmente a determinação de fosfato inorgânico em suas execuções. O método de LOHMANN e JENDRASSIK, (1926), descrito abaixo, apresentou-se conveniente para este propósito. Este método é baseado na redução de ácido fosfomolibdico pelo ácido aminonaftolsulfônico.

Procedimento - Aliquotas de 3,5 ml contendo fosfato inorgânico (0,01 a 0,10 mg) em meio ácido eram tratadas com 0,5 ml de solução de molibdato de amônia 2,5% de ácido sulfúrico 5N. Após agitação vigorosa, 0,2 ml de solução 0,25% de ácido amino naftol sulfônico em bissulfito de sódio eram adicionados e a mistura era incubada a 37°C por 7 minutos. Após repouso à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos, a absorbância era determinada em fotocolorímetro P.L.4 a 660 nm.

Reagentes

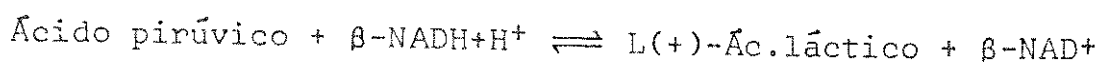
1) *Molibdato de amônia 2,5% em ácido sulfúrico 5N* - Cinquenta gramas de molibdato de amônia eram dissolvidos em cerca de 750 ml de água destilada e 277 ml de ácido sulfúrico 18M eram adicionados, cuidadosamente, com agitação e resfriamento. O volume era completado para 2 litros com água destilada.

2) *Ácido amino-naftolsulfônico* - Era preparado misturando-se 0,5 g do ácido e 196 ml de solução de bissulfito de sódio 15%. Após agitação, 5 ml ou mais, de solução de sulfito de sódio 20% era adicionado até completa dissolução. A solução, depois de 24 horas, a 4°C, era filtrada e mantida na geladeira em frasco escuro.

3) *Solução Padrão de Fosfato (0,08 mg Pi/ml)* - 0,351 g de fosfato monobásico de potássio, seco por 24 horas a 140°C eram dissolvidos em água destilada e 10 ml de ácido sulfúrico 10N eram adicionados. O volume era completado para 1 litro com água destilada.

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

A determinação de ácido láctico foi feita pelo método descrito por MARBACH e WEIL, (1967), e é baseada na propriedade da enzima desidrogenase láctica catalisar a seguinte reação reversível:



Na presença de NAD⁺, enzima e semicarbazida em excesso o equilíbrio da reação é deslocado no sentido de formação de ácido pirúvico com consequente redução do NAD⁺, que pode ser medido espectrofotometricamente em 340 nm.

Procedimento - Amostras de músculos congelados eram pesadas e trituradas em gral com areia de quartzo, contendo tampão fluoretado 0,02M - EDTA 10⁻³M na proporção de uma grama de músculo para 2 ml de tampão. Após centrifugação, o sobrenadante de cada extra^{to} era precipitado com ácido perclórico em concentração final de

3% e centrifugado novamente. A mistura de reação continha: 0,3 ml do extrato de músculo; 2,4 ml de tampão glicina 0,25M - semicarbazida 0,25M pH 10,0; 0,2 ml de desidrogenase lática cristalizada como descrito (1 mg/ml). A densidade ótica era determinada antes da adição de 0,2 ml de NAD^+ 6 mM. Uma hora após, nova leitura era feita para determinação do NADH formado.

As concentrações de ácido láctico no extrato eram determinadas por comparação com uma curva padrão construída previamente com concentrações conhecidas de ácido láctico.

DETERMINAÇÃO DE ATP, ADP e AMP EM EXTRATOS DE MÚSCULOS

O método de MUNCH PETERSEN e KALCKAR (1957) é baseado na conversão de ATP e ADP em 5'-AMP com subsequente deaminação deste último em 5'-IMP, pela deaminase do ácido 5'-adenílico, reação esta que pode ser seguida espectrofotometricamente a 265 nm (KALCKAR, 1947).

As reações que se passam podem ser esquematizadas como segue:

1. $\text{AMP} \longrightarrow \text{IMP}$
2. $\text{ADP} \longrightarrow 1/2 \text{ AMP} + 1/2 \text{ ATP}$
3. $\text{ATP} \longrightarrow \text{AMP} + 2\text{Pi}$

A reação 1 consiste na deaminação do 5'-AMP, catalisada pela 5'-AMP deaminase (KALCKAR, 1943). Na reação 2 a enzima mioquinase (KALCKAR, 1943; COLOWICK e KALCKAR, 1943), promove a conversão de ADP em ATP e AMP. A reação 3 é catalisada pela apirase de batata (KALCKAR, 1944), que defosforila o ATP (bem como o ADP) produzindo AMP.

Procedimento - Os extratos de músculo eram preparados como se segue: amostras de cerca de 20 mg de músculo eram rapidamente extraídas e mergulhadas em pequeno tubo de ensaio plástico afunilado, contendo 20 μl de ácido perclórico 10% previamente pesado. Nova pesagem para determinação exata da massa do músculo era efe

tuada. Com um bastão de vidro, que se adaptava exatamente ao tubo, triturava-se o músculo. Em seguida, outra porção de 200 μ l de ácido perclórico 2,5% era adicionada para lavar o bastão. Centrifugava-se e completava-se o volume do sobrenadante para 2 ml com tampão succinato 0,3M, pH 6,1.

O método de ensaio era procedido como se segue: a uma cubeta de quartzo adicionavam-se 2,5 ml de tampão succinato 0,3M, pH 6,1 ; 20 μ l de $MgCl_2$ 0,1M e 500 μ l de extrato de tecido neutralizado.

Procedia-se a determinação da absorbância a 265 nm (valor A). Dez μ l de deaminase (10 γ /ml) era adicionada, inicialmente, e a deaminação do AMP presente podia ser seguida pela diminuição da absorbância também em 265 nm. Quando a absorbância tornava-se constante (valor B), juntava-se 20 μ l de mioquinase (20 γ de proteína/ml) e prosseguia-se a leitura até um valor novamente constante (valor C). Finalmente, 50 μ l de apirase (10 γ /ml) era adicionada e novo decréscimo da absorbância em 265 nm era observado até valor constante (valor D). Os quatro valores A, B, C e D anotados eram convenientemente, tratados de modo a se calcular as concentrações dos nucleotídeos presentes no extrato. A tabela I, abaixo, representa um exemplo de uma determinação.

TABELA I

Adições de enzimas no sistema de reação (3 ml) que continha: tampão succinato 0,3M, pH 6,2; $MgCl_2$ 1mM e o extrato de músculo.

ADIÇÕES	ABSORBÂNCIA EM 265 nm	ΔA	NUCLEOTÍDEO
Nenhuma (A)	0,300	0,030	AMP
Deaminase (B)	0,270		1/2 ADP
Mioquinase (C)	0,240	0,160	1/2 ADP+ATP
Apirase (D)	0,080		

Sabendo-se que a conversão de 1 μ g de AMP por ml de IMP corresponde a um decréscimo de 0,019 na absorbância a 265 nm, as con-

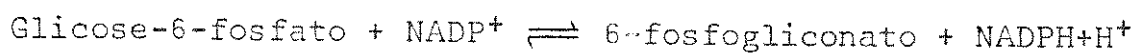
centrações dos nucleotídeos podem ser calculadas.

No músculo esquelético, em virtude dos níveis de AMP serem muito baixos não era possível proceder a sua determinação por este processo, exigindo a seguinte modificação: uma grama do músculo era homogenizada com 8 ml de ácido perclórico 3% e centrifugada. Em seguida, fazia-se adsorção dos nucleotídeos com Norit A (40 mg/ml do sobrenadante) em tubo de centrífuga fechado, com agitação contínua durante 10 minutos. O carvão era sedimentado por centrifugação. O líquido era submetido a novas adsorções por carvão até ausência de nucleotídeos avaliado pela determinação da absorbância em 265 nm.

Após a adsorção dos nucleotídeos, o carvão era lavado uma vez com água e tratado com solução de piridina 5% em etanol 50% sob agitação contínua, por um período de duas horas a 37°C. O carvão era finalmente separado por centrifugação e o sobrenadante evaporado por aeração até a obtenção de massa semi-sólida que era dissolvida no menor volume possível de água. O AMP era purificado por cromatografia de camada fina de sílica gel, usando-se como solvente: n-butanol, acetona, ácido acético, amônia 5% e água, nas proporções (9:3:2:2:4).

DETERMINAÇÃO DE GLICOSE-6-FOSFATO

A determinação foi feita pelo método de HORECKER e WOOD, (1957), que é baseado na propriedade da enzima G-6-P desidrogenase catalisar a seguinte reação:



Na presença de NADP^+ e da enzima em excesso, a G-6-P é convertida em ácido 6-fosfoglicônico com consequente redução de NADP^+ que pode ser acompanhada espectrofotometricamente em 340 nm.

Procedimento - Músculo congelado era triturado em gral com areia

de quartzo contendo ácido perclórico 3% na proporção de 1 g de músculo para 2 ml de ácido. Após centrifugação, o sobrenadante era neutralizado com hidróxido de sódio e a G-6-P determinada como se segue: a uma cubeta de quartzo (1 cm O.P.), adicionava-se: 0,5 ml do extrato de músculo; 0,3 ml de tampão tris 0,25M, pH 7,5; 0,10 ml de $MgCl_2$ 0,1M e 0,10 ml de $NADP^+$ (1,4 μ moles/ml). A mistura era agitada e uma leitura da absorbância era tomada em 340 nm. Em seguida, uma amostra de 0,01 ml da enzima cristalina, (1 mg/ml) era adicionada à mistura e o aumento da absorbância em 340 nm era acompanhado até se obter um valor constante. A concentração de G-6-P presente no extrato era calculada pela seguinte equação:

$$G-6-P (\mu\text{moles}) = \frac{(df-do) \times 1,04}{6,22}$$

onde:

df e do, representam as absorbâncias finais e iniciais respectivamente; 6,22 é a $E_{340}^{1\mu M}$ do NADP e 1,04 um fator de correção.

DETERMINAÇÕES DAS TROCAS DE Ca^{++} e H^+ EM PREPARAÇÕES DE MITOCONDRIAS

Para se proceder as determinações das trocas Ca^{++} e H^+ ao nível da membrana mitocondrial, foram usadas preparações de mitocôndrias de coração, preparadas como descrito anteriormente.

Procedimento - Num célula especial termostatzada a 25°C, onde estavam inseridos um eletrodo de Clark nº 4004, um eletrodo de vidro e eletrodo de calomelano de referência determinava-se simultaneamente, o consumo de O_2 por método polarográfico (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio), bem como o pH através de um potenciômetro (Sargent-welch pH-meter, Model LSX). O consumo de O_2 e o pH eram registrados, simultaneamente, num registrador Sargent-Wech-Records, Model DSRG. As soluções utilizadas estão descritas em "RESULTADOS".

OUTROS EQUIPAMENTOS E REAGENTES UTILIZADOS

Para as determinações colorimétricas e espectrofotométricas, utilizou-se espectrofotômetro Beckamn, modelo DU-2 ou modelo DB; espectrofotômetro Zeiss, modelo PMQ II e fotocolorímetro Zeiss, modelo PL-4.

As centrifugações eram feitas em centrífuga Sorvall, modelo RC2-B ou SS-4 de Ivan Sorvall Inc., N.Y., U.S.A. e centrífuga Eppendorf 3.2000.

As determinações potenciométricas eram feitas em potenciômetros Metrohn-Herisau pH-Meter E-396B e Radiometer Copenhagen, type PHM-2 22r nº 45055.

Para as preparações de tecidos utilizamos: Omni-mixer Sorvall; Waring Comercial Blendor e Potter-Elvehjem glass-Teflon homogenizer (A.H.Thomas Company, Phyladelphia, U.S.A.).

As pesagens eram realizadas em balanças Mettler, type SS; Mettler PL62 ou Sartorius, type 2443.

Dos reagentes, o glicogênio era preparado de fígado de coelho pelo método de PFLUGER, (1904), modificado por MANNERS e RYLEY, (1952). Soluções de 2,4- -dinitrofenol obtido da Sigma Chemical Company, U.S.A., eram preparadas suspendendo-o em pequeno volume de água e adicionando-se NaOH 1N até dissolução. Depois de dissolvido, juntava-se HCl 0,1M até pH 7,0 e completava-se o volume com água, até obtenção de solução de concentração 5 mg/ml.

O pentaclorofenol, de procedência Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y., gentilmente cedido pelo Prof. James R. Matton, da Johns Hopkins University, U.S.A., era dissolvido exatamente como o DNF.

As soluções de salicilato de sódio eram obtidas a partir de ácido salicílico de procedência Sigma Co.

O pH da solução era acertado para 7,0 pela adição de solução de hidróxido de sódio 1N imediatamente antes do uso.

O 3,4-Di-tert-butyl-4-hydroxy-benzylidenemalononitrile (SF-6847) gentilmente cedido pela Sumitomo Chemical Company Ltd. Osaka, Japan, era previamente dissolvido em álcool absoluto para ser injetado nos animais.

Outros produtos tais como:

Glicose-1-fosfato, glicose-6-fosfato, tripsina, ATP, ADP, AMP, AMPc, NAD, NADP, eram procedentes da Sigma Chemical Company.

O inibidor de tripsina (Soybean Inhibitor) era obtido da E.Merck Darmstadt, Germany.

O propanolol era obtido dos laboratórios Ayerst Ltd. S.P. - Brasil.

Outros reagentes utilizados, e não discriminados, eram produtos pró-análise ou equivalentes, provenientes da Mann, Sigma, Merck, Backer e BDH.

RESULTADOS

Nossas experiências tiveram a finalidade de encontrar resultados que esclarecessem o mecanismo da ação glicogenolítica do DNF, so mente encontrada "in vivo" por FOCESI et al. (1969). Para isto tornou-se necessário aventar uma série de hipóteses para explicar os achados destes autores. Desta forma, inicialmente, pensou-se na possibilidade do DNF induzir a liberação de catecolaminas na circulação, ou de ser transformado no organismo, e os produtos dessa transformação serem os verdadeiros responsáveis por sua ação. Com este objetivo, experiências foram realizadas com preparações de músculo esquelético e de músculo cardíaco de acordo com a conveniência. Antes contudo, foi necessário avaliar o efeito do DNF no músculo cardíaco nas mesmas condições das experiências realizadas com músculo esquelético, pelos autores acima isto é, verificar o efeito glicogenolítico do DNF "in vivo" neste tecido muscular.

1. *Conteúdo de ácido láctico no sangue e no coração de animais envenenados com Dinitrofenol.*

O estímulo da glicogenólise em corações dos animais envenenados pode ser avaliado pelo exame da tabela II. Essa tabela mostra que grupos de ratos quando submetidos a doses intra-peritoniais de DNF 2,5 mg/100 g de peso corporal, apresentaram um conteúdo de ácido láctico aumentado de cerca de 4 vezes, tanto no músculo cardíaco como no sangue periférico.

A ação glicogenolítica do DNF pode pois, ser observada no coração como pretendíamos demonstrar inicialmente. Evidentemente, vários órgãos extra cardíacos contribuem para o aumento do ácido láctico no sangue e portanto, as determinações neste sistema refletem a ação global da droga e não aquelas observadas exclusivamente no músculo cardíaco.

TABELA II

Conteúdo de ácido láctico sanguíneo e cardíaco de animais envenenados por DNF. O conteúdo de ácido láctico está expresso em μ moles por ml de sangue ou por grama de músculo. Os animais foram sacrificados, uma hora após a injeção da droga.

DETERMINAÇÕES DE ÁCIDO LÁCTICO	RATOS CONTROLES	RATOS ENVENENADOS COM DNF
Músculo cardíaco*	$1,4 \pm 0,2^{**}$	$6,0 \pm 0,4$
Sangue total	$1,7 \pm 0,09$	$7,0 \pm 2,0$

* Grupos de 10 ratos foram utilizados nas determinações.

** Desvio padrão.

2. Efeito do Dinitrofenol sobre a fosforólise do glicogênio.

Uma vez que o conteúdo de ácido láctico encontrava-se aumentado nos corações dos animais envenenados, experiências de sua ação sobre a fosforólise do glicogênio nos extratos, tornaram-se necessárias para se constatar se o acúmulo de ácido láctico encontrado era devido ao metabolismo de glicogênio acelerado ou não, no coração.

A tabela III mostra o efeito da droga sobre a fosforólise do glicogênio em músculo cardíaco de animais injetados com DNF 2,5 mg por 100 g. Porções de músculo cardíaco eram retiradas uma hora após a injeção e a velocidade de glicogenólise determinada.

A tabela III mostra ainda claramente um estímulo da fosforólise nos animais envenenados. Na mesma tabela, pode-se observar ainda que, se o DNF é adicionado diretamente ao extrato de músculo cardíaco de animais normais em concentrações da ordem de $10^{-3}M$, evidente inibição pode ser constatada.

TABELA III

Ação do DNF sobre a fosforólise do glicogênio em animais "in vivo" e extrato de músculo de animais. A velocidade de glicogenólise está expressa em μ moles de Pi consumido em 30 minutos por 100 g de músculo.

DETERMINAÇÕES	CONSUMO DE FOSFATO INORGÂNICO
Ratos controles	44,2 $\pm$ 14,7
Ratos envenenados com DNF	96,8 $\pm$ 22,1
DNF 10 ⁻³ M adicionado ao extrato de coração	27,3 $\pm$ 7,8

3. *Influência do Dinitrofenol sobre o sistema de fosforilases do músculo cardíaco.*

Tendo sido observado que o aumento de ácido láctico do músculo cardíaco de animais envenenados, poderia envolver um aumento de fosforólise do glicogênio no mesmo músculo e levando ainda em consideração que o sistema de fosforilases está obrigatoriamente participando desse processo, experiências foram realizadas para se determinar o conteúdo de fosforilase a, fosforilase total, bem como, da fosforilase b quinase, em animais envenenados. Desta forma, grupos de 10 ratos foram utilizados, tomando-se a precaução de submeter os extratos ao tratamento prévio com Norit A, de modo a reter nucleotídeos que interferem nas determinações e que de acordo com CORNBLATH et al. (1963), conferem resultados imprecisos e discutíveis.

A tabela IV mostra que o conteúdo de fosforilase a está cerca de tres vezes aumentado em relação aos animais controles. Ao mesmo tempo a atividade da fosforilase b quinase encontra-se mais elevada. A razão fosforilase a/fosforilase total x 100 da tabela representa a percentagem de fosforilase a nos extratos, que também se encontra elevada.

TABELA IV

Conteúdo de fosforilase a, fosforilase total e fosforilase b quinase. A atividade de fosforilase a e total estão expressas em unidades de acordo com CORI et al. (1955), por grama de músculo. A atividade de fosforilase b quinase está expressa em unidades de fosforilase a formada a partir de fosforilase b em 15 minutos, de acordo com FISCHER e KREBS, (1962).

DETERMINAÇÕES	RATOS CONTROLES	RATOS ENVENENADOS COM DNF
Fosforilase <u>a</u>	7,0 ± 1,7	25,2 ± 3,1
Fosforilase total (+AMP)	67,2 ± 7,1	85,2 ± 13,0
$\frac{\text{Fosforilase } \underline{a}}{\text{Fosforilase total}} \times 100$	10,4 ± 1,1	30,7 ± 6,5
Fosforilase <u>b</u> quinase	1346 ± 480	3384 ± 334

4. Efeito do Dinitrofenol sobre fosforilase b quinase purificada

Como a ação glicogenolítica do DNF sobre o músculo cardíaco se mostrou semelhante a do músculo esquelético, experiências foram realizadas para se avaliar o efeito da droga sobre preparações purificadas da fosforilase b quinase. Desta maneira, a enzima purificada, na forma inativa, foi ativada como descrito em "MATERIAL E MÉTODOS", na presença de diferentes concentrações de DNF.

A figura 1, mostra que o DNF não tem efeito sobre a ativação da enzima purificada em doses equivalentes às encontradas no músculo esquelético de animais envenenados em nossas condições. Em doses elevadas, evidente inibição da ativação pode ser constatada.

5. Efeito do Dinitrofenol sobre o conteúdo de fosforilase a e total em corações perfundidos.

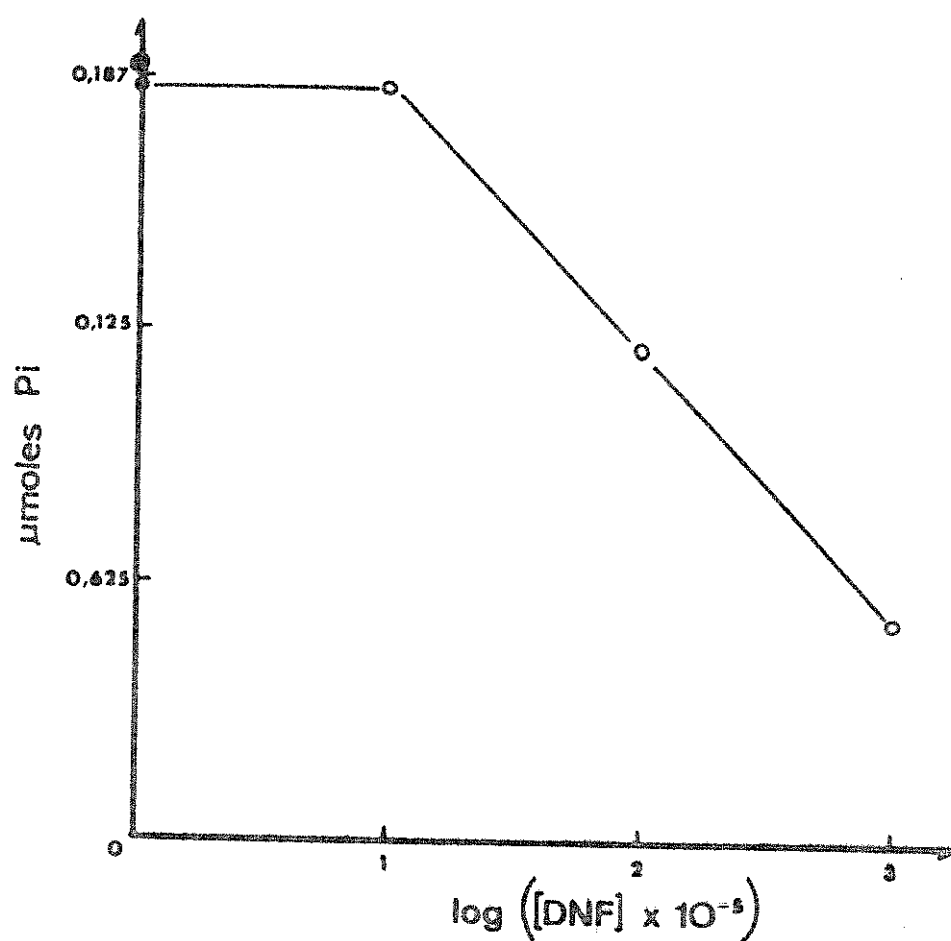


Fig. 1 - Ativação de fosforilase b quinase purificada por ATP e Mg^{++} na presença de diferentes concentrações de DNF. A atividade da enzima está expressa em ordenada, por moles de Pi liberado pela ação da fosforilase a formada na reação de conversão. O ponto circundado representa a atividade da quinase na ausência do DNF.

Como somente em animais intáctos o efeito ativante de fosforilase b quinase podia ser observado, procuramos trabalhar com preparações de corações perfundidos onde não era esperado interferência de catecolaminas circulantes ou de produtos de redução do DNF pelo fígado.

Com esta finalidade, animais eram sacrificados e os respectivos corações eram submetidos a perfusão durante 10 minutos com solução de Krebs-Henseleit, na presença ou não de DNF $10^{-5}M$. Em média 10 corações eram utilizados como controles e 10 eram submetidos a ação do DNF. A tabela V mostra que nos órgãos perfundidos, o aumento do conteúdo de fosforilase a continua evidente pela ação da droga. Os números mostrados nessa tabela são maiores que os da tabela IV. É importante salientar que a facilidade da para da imediata dos processos metabólicos do coração pela imersão do órgão em nitrogênio líquido, torna desnecessário o tratamento prévio dos extratos, a serem ensaiados por Norit A, que além de adsorver nucleotídeos, adsorve também parte das fosforilases, in fluindo no valor absoluto dos resultados.

TABELA V

Conteúdo de fosforilase a e fosforilase total em corações perfundidos, submetidos a DNF $10^{-5}M$. A atividade de fosforilase está expressa como anteriormente.

DETERMINAÇÕES	CONTROLES	DNF
Fosforilase <u>a</u>	$18,0 \pm 4,5^*$	$72,0 \pm 11,5$
Fosforilase total (+AMP)	$168,0 \pm 21,0$	$192,3 \pm 25,0$
$\frac{\text{Fosforilase } \underline{a}}{\text{Fosforilase total}} \times 100$	$10,7 \pm 1,8$	$37,3 \pm 7,4$

* Desvio padrão

A razão fosforilase a/fosforilase total $\times 100$, isto é, a porcentagem de fosforilase ativa na ausência de AMP encontra-se cerca

de quatro vezes mais elevada nos corações perfundidos submetidos ao DNF.

6. *Efeito do Dinitrofenol sobre o conteúdo de fosforilase a e fosforilase total em corações perfundidos de animais reserpinizados.*

O fato do DNF apresentar o mesmo efeito glicogenolítico em corações perfundidos sugeria a possibilidade de produtos do metabolismo desta droga, pelo fígado não estarem implicados no problema, porém a possibilidade de interferência de catecolaminas não estava afastada, uma vez que as catecolaminas endógenas do próprio coração poderiam estar em quantidade suficientemente elevadas para acelerar o processo. Para avaliar esta última possibilidade procuramos utilizar ratos reserpinizados nas experiências. Em algumas delas utilizamos em lugar de ratos reserpinizados, corações perfundidos com propranolol, com o mesmo objetivo. A tabela VI mostra que, quando os animais eram cronicamente reserpinizados, o DNF continuava exercendo sua ação glicogenolítica, sugerindo que catecolaminas não interferiam no mecanismo de ação da droga.

TABELA VI

Conteúdo de fosforilase a e fosforilase total em corações perfundidos de ratos reserpinizados com injeções intraperitoneais de 1 mg/kg de peso do animal, durante 5 dias.

DETERMINAÇÕES	CONTROLES	DNF
Fosforilase <u>a</u>	7,2* $\pm$ 2,5	26,5 $\pm$ 6,5
Fosforilase total	183 $\pm$ 19	209 $\pm$ 24
$\frac{\text{Fosforilase } \underline{a}}{\text{Fosforilase total}} \times 100$	4,5 $\pm$ 1	13 $\pm$ 3

* Nos animais reserpinizados, de acordo com o esquema de CORNBLATH et al. (1963), os níveis basais de fosforilase a se apresentaram baixos em relação aos animais normais.

A tabela VII mostra os resultados de experiências realizadas em corações perfundidos nas quais se adicionava ou não ao perfusato um bloqueador de receptor β -adrenérgico, o Propanolol. Os resultados corroboram os da tabela VI

TABELA VII

Conteúdo de fosforilase a e fosforilase total em corações perfundidos com solução de Krebs-Henseleit, contendo $2 \mu\text{g}$ de Propanolol por ml, na presença ou não de DNF 10^{-5}M .

DETERMINAÇÕES	CONTROLES	DNF
Fosforilase <u>a</u>	$17,5 \pm 3$	66 ± 14
Fosforilase total (+AMP)	$247 \pm 9,3$	276 ± 11
$\frac{\text{Fosforilase } \underline{a}}{\text{Fosforilase total}} \times 100$	$7 \pm 1,5$	23 ± 6

7. *Efeito do Dinitrofenol sobre o conteúdo de adenosina 3'-5' fosfato cíclico em preparações de músculo esquelético.*

Uma vez afastada a possibilidade de ação indireta do DNF, tornou-se necessário verificar se o conteúdo de AMPc, conhecido mediador da atividade de fosforilase b quinase, estava aumentado. Este aumento poderia ocorrer, mesmo com níveis de catecolaminas normais, como no caso das metilxantinas, por exemplo.

Assim, procuramos estudar, ambos, o conteúdo de AMPc e de fosforilase a em animais envenenados com a droga. Inicialmente estabelecemos uma curva de progresso da reação catalisada por fosforilase b quinase na presença e ausência de AMPc. A figura 2 mostra o estímulo causado pelo AMPc sobre a velocidade de ativação da quinase. A partir da curva de progresso da figura 2, estabelecemos uma curva padrão de AMPc usando diferentes concentrações do nucleotídeo e tempo de 10 minutos de reação da quinase. Este tempo se mostrou mais adequado, uma vez que em 10 minutos de reação, a ativação pelo AMPc é máxima nas nossas condições. A figura 3 representa uma curva padrão, onde em ordenadas está expressa a

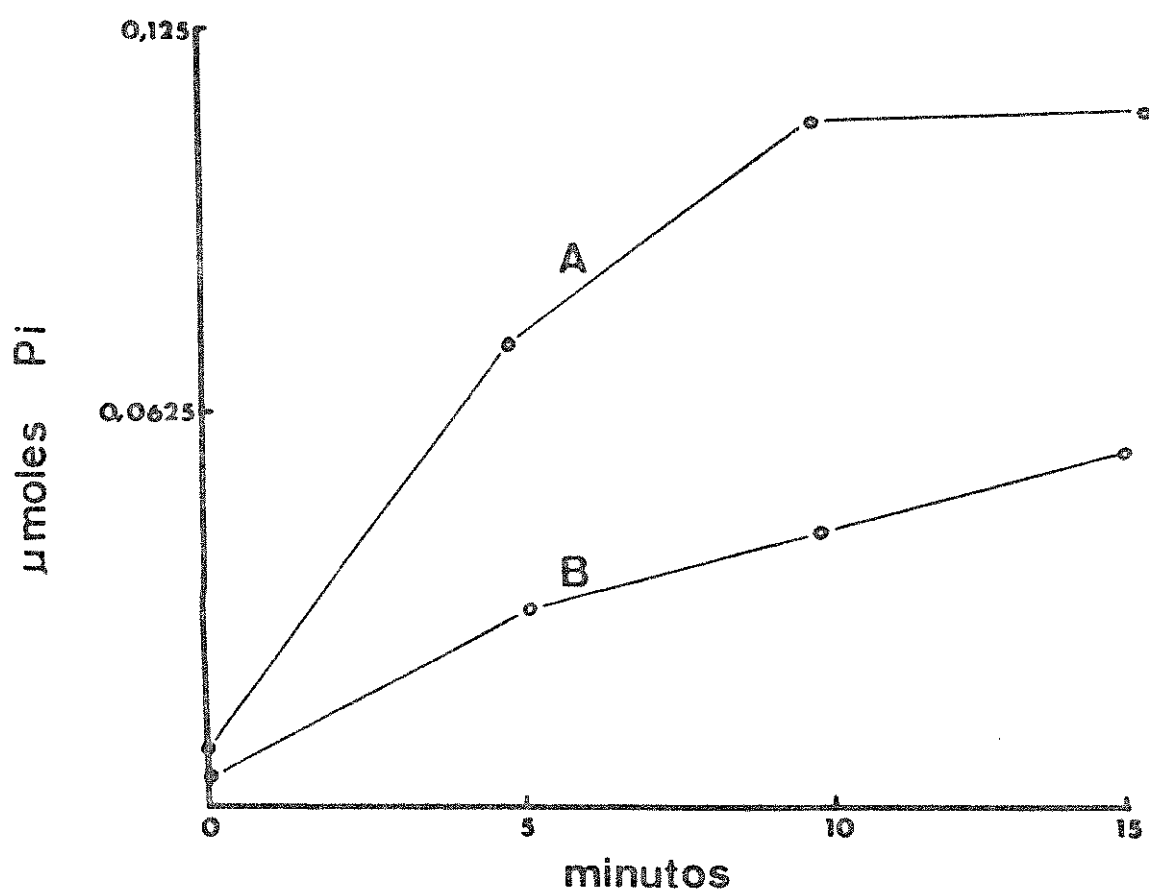


Fig. 2 - Ativação da fosforilase b quinase pelo ATP $1,8 \times 10^{-3}M$, Mg^{++} $6 \times 10^{-4}M$, na presença (curva A) e ausência (curva B) de AMPc $10^{-6}M$. A atividade da quinase está expressa em ordenada pela quantidade de Pi liberado pela ação da fosforilase a formada a partir de fosforilase b, em reação catalisada pela fosforilase b quinase.

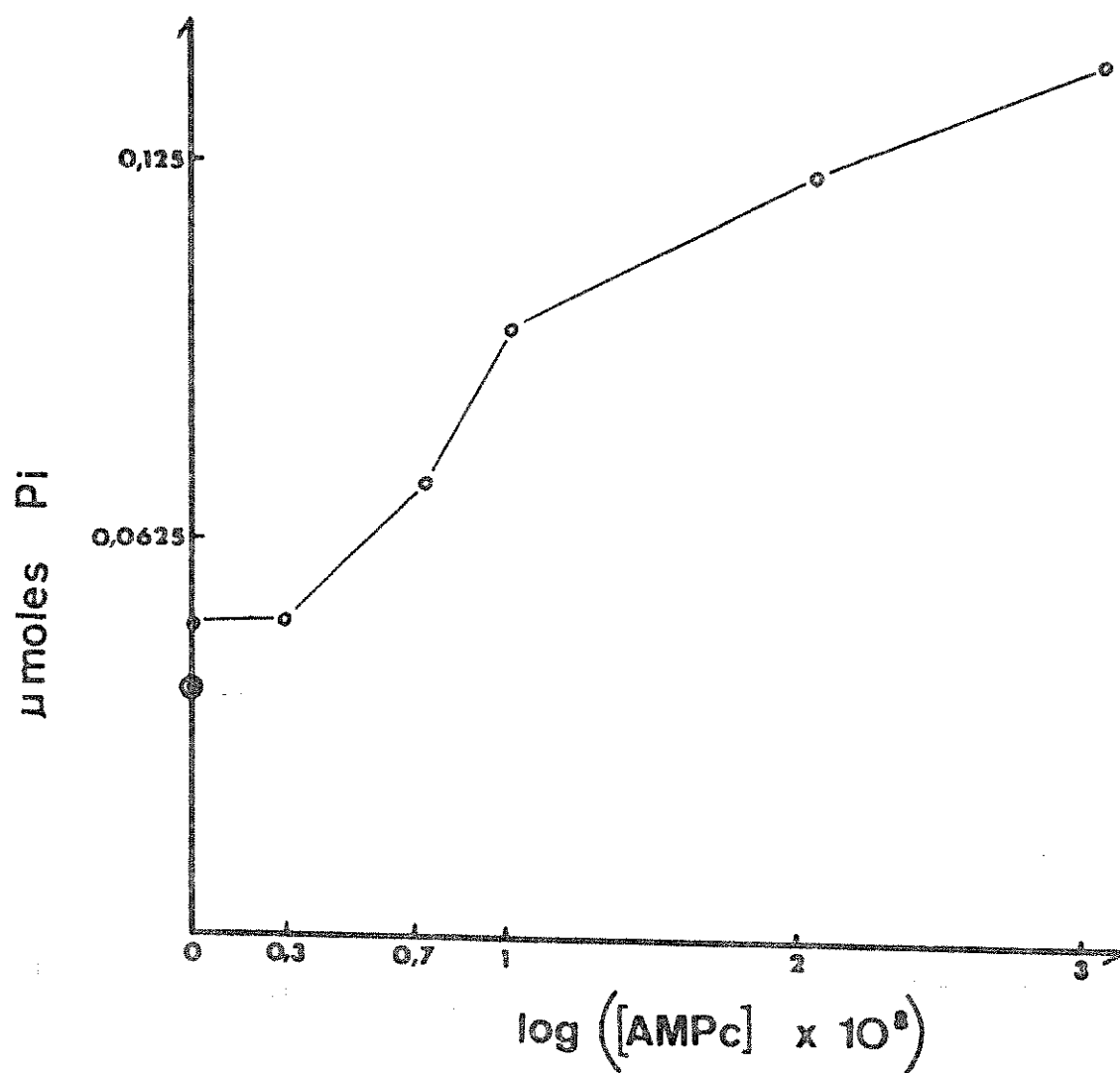


Fig. 3 - Curva padrão de AMPc. Em abcissas o log da concentração de AMPc $\times 10^8$ na mistura de reação de ativação de fosforilase b quinase. O ponto circundado corresponde a ativação causada pelo ATP e Mg^{++} na ausência de AMPc.

quantidade de fosfato inorgânico liberado pela ação da fosforilase a formada através da reação: fosforilase b $\longrightarrow$ fosforilase a, catalisada pela fosforilase b quinase. O AMPc acelera a ativação da fosforilase b quinase causada por ATP e Mg^{++} .

De posse de método adequado para o ensaio de AMPc em nossas preparações, procuramos estudar o conteúdo deste nucleotídeo bem como o de fosforilase a em animais submetidos a ação do DNF. Com fins comparativos, os animais foram submetidos também a ação da adrenalina onde as trocas estudadas são amplamente conhecidas.

Nestas experiências eram utilizadas preparações de músculo esquelético uma vez que amostras de músculo deveriam ser colhidas do mesmo animal para melhor avaliação dos resultados. Dessa forma, os músculos das patas posteriores de ratos adultos anestesiados com Nembutal, eram expostos bilateralmente. Após a exposição, uma porção de músculo de cerca de 200 mg era retirada e imediatamente imersa em Nitrogênio líquido. Em seguida o animal era submetido a injeção intracardíaca de adrenalina (10 $\mu g/kg$) e após um minuto da injeção de adrenalina, nova porção de músculo de cerca de 200 mg era retirada e imersa em Nitrogênio líquido como anteriormente. Após 15 minutos da injeção de adrenalina, uma injeção intraperitoneal de DNF (2,5 mg/100g) era efetuada. Finalmente uma hora após a injeção de DNF uma última amostra de músculo era colhida e tratada como anteriormente.

As amostras colhidas no animal anestesiado (controle), após a injeção de adrenalina e após a injeção de DNF, eram divididas e o conteúdo de fosforilase a e de AMPc determinados.

A figura 4 mostra que a adrenalina como era esperado, eleva o conteúdo de fosforilase a cerca de seis vezes e o conteúdo de AMPc de tres vezes, isto é, enquanto o conteúdo de fosforilase a nos animais injetados passava de 53 ues para 350 ues/g, o conteúdo de AMPc passava de 0,4 $\mu moles$ por grama, para 1,2 $\mu moles/g$. O DNF por sua vez aumentava somente o conteúdo de fosforilase a de 53 ues para 165 ues/g e não alterava significativamente o conteúdo de AMPc no músculo.

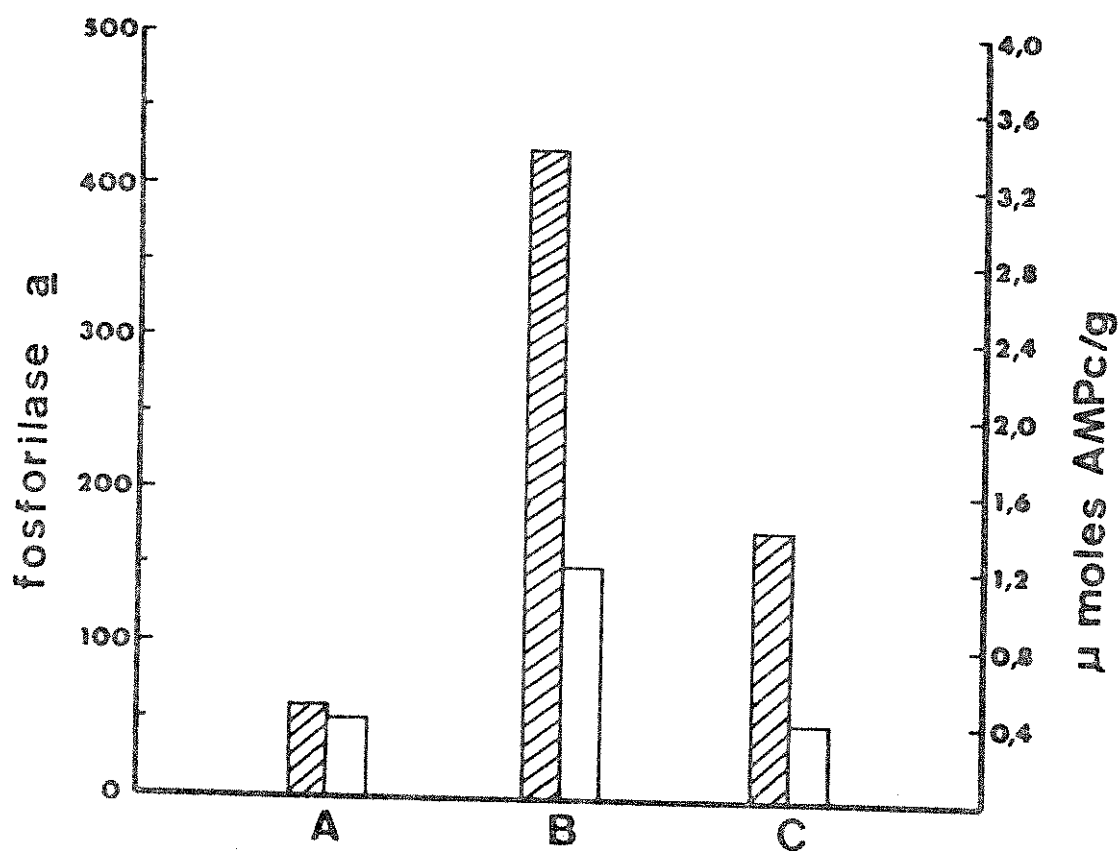


Fig. 4 - Efeito da adrenalina e do DNF em músculo esquelético de ratos normais. O conteúdo de fosforilase a (barra achucada) e de AMPc (barra vazia), eram determinados nos animais normais (A), nos animais submetidos a ação da adrenalina (B) e nos animais submetidos ao DNF (C).

8. *Efeito do Dinitrofenol sobre o conteúdo de nucleotídeos adenílicos e glicose-6-fosfato em músculo cardíaco e esquelético.*

Uma vez que nenhuma alteração no nível de AMPc pode ser constatada em nossas condições, experiências foram realizadas no sentido de se verificar se outras enzimas controladoras da glicogenólise estavam envolvidas no mecanismo de ação do DNF. A fosfofrutoquinase, enzima controlada pela razão ATP/ADP, teve especial interesse no problema. Sua atividade "in vivo" pode ser verificada através da determinação dos fatores que interferem em suas propriedades catalíticas. Assim, os níveis de nucleotídeos adenílicos, bem como os níveis de G-6-P eram determinados em animais submetidos a ação do DNF. As determinações eram efetuadas tanto no músculo esquelético "in vivo" como em corações perfundidos.

A figura 5 mostra que animais ou corações perfundidos submetidos a ação do DNF, apresentavam uma razão ATP/ADP diminuída e os níveis de AMP aumentados no músculo cardíaco. A mesma figura, mostra que as alterações dos níveis de AMP não eram relevantes no músculo esquelético. Aliás, o conteúdo de AMP no músculo esquelético é relativamente baixo, comparado com o conteúdo no músculo cardíaco e usualmente os extratos devem ser concentrados para que o nucleotídeo seja evidenciado e os métodos de avaliação não são suficientemente sensíveis.

Os baixos níveis de ATP encontrados na célula, sugerem que a fosfofrutoquinase esteja ativada nos animais envenenados. Esta ativação se reflete evidentemente nos níveis do substrato, frutose-6-fosfato, da enzima, e conseqüentemente nos de G-6-P, ester imediatamente anterior na sequência metabólica. A figura 6 mostra o resultado das determinações de G-6-P em corações perfundidos sujeitos a ação de DNF $10^{-5}M$ adicionado ao perfusato. O que se nota é que no decorrer do tempo de perfusão, os níveis de G-6-P diminuíam até 1 1/2 minuto, enquanto que a razão fosforilase a/fosforilase total x 100 aumentava progressivamente até 5 minutos de perfusão. É importante observar que após 10 minutos de perfusão, os níveis de G-6-P aumentavam, sem contudo, alcançar os níveis normais e embora ainda houvesse um sensível aumento do conteúdo

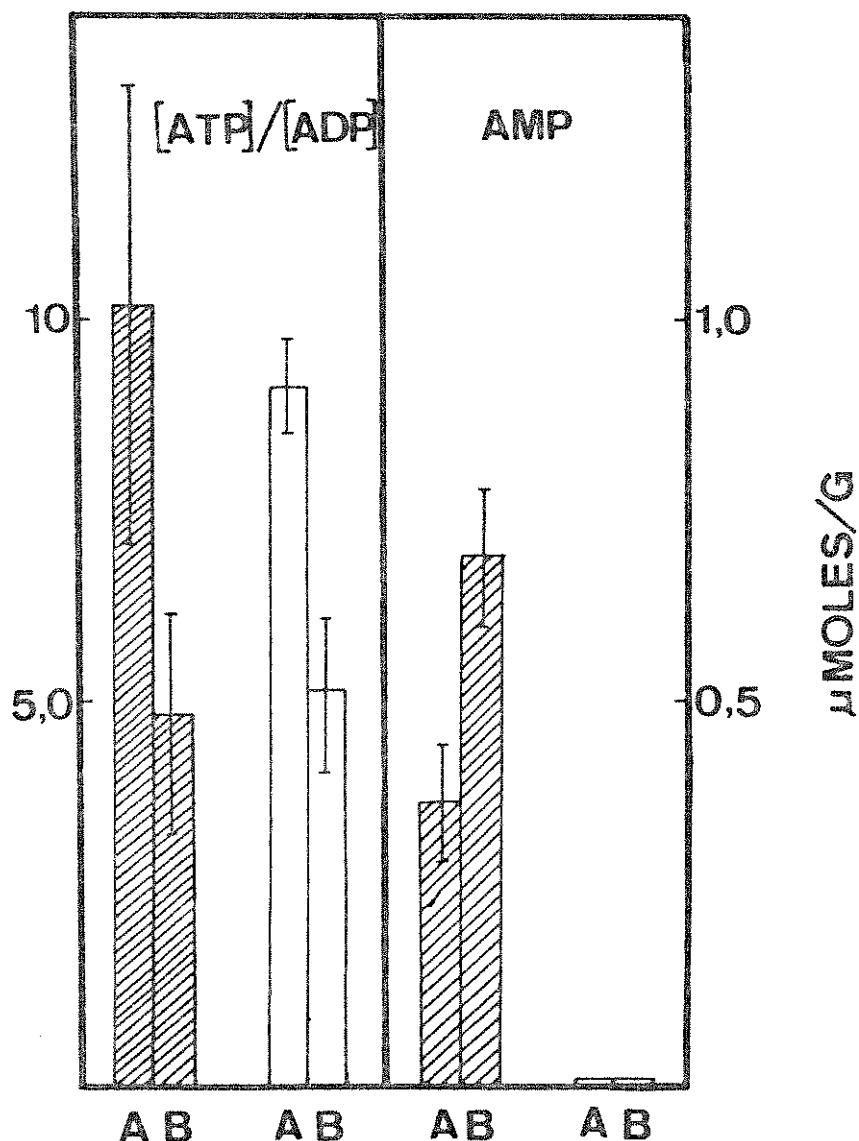


Fig. 5 - Razão ATP/ADP e conteúdo de AMP em músculo cardíaco e esquelético. As barras achureadas representam determinações em corações perfundidos. As barras vazias, representam as determinações em músculo esquelético "in vivo". Os animais ou os corações perfundidos eram submetidos a determinações descritas antes (A), e após a adição de DNF (B). Os nucleotídeos eram determinados enzimaticamente de acordo com método descrito anteriormente.

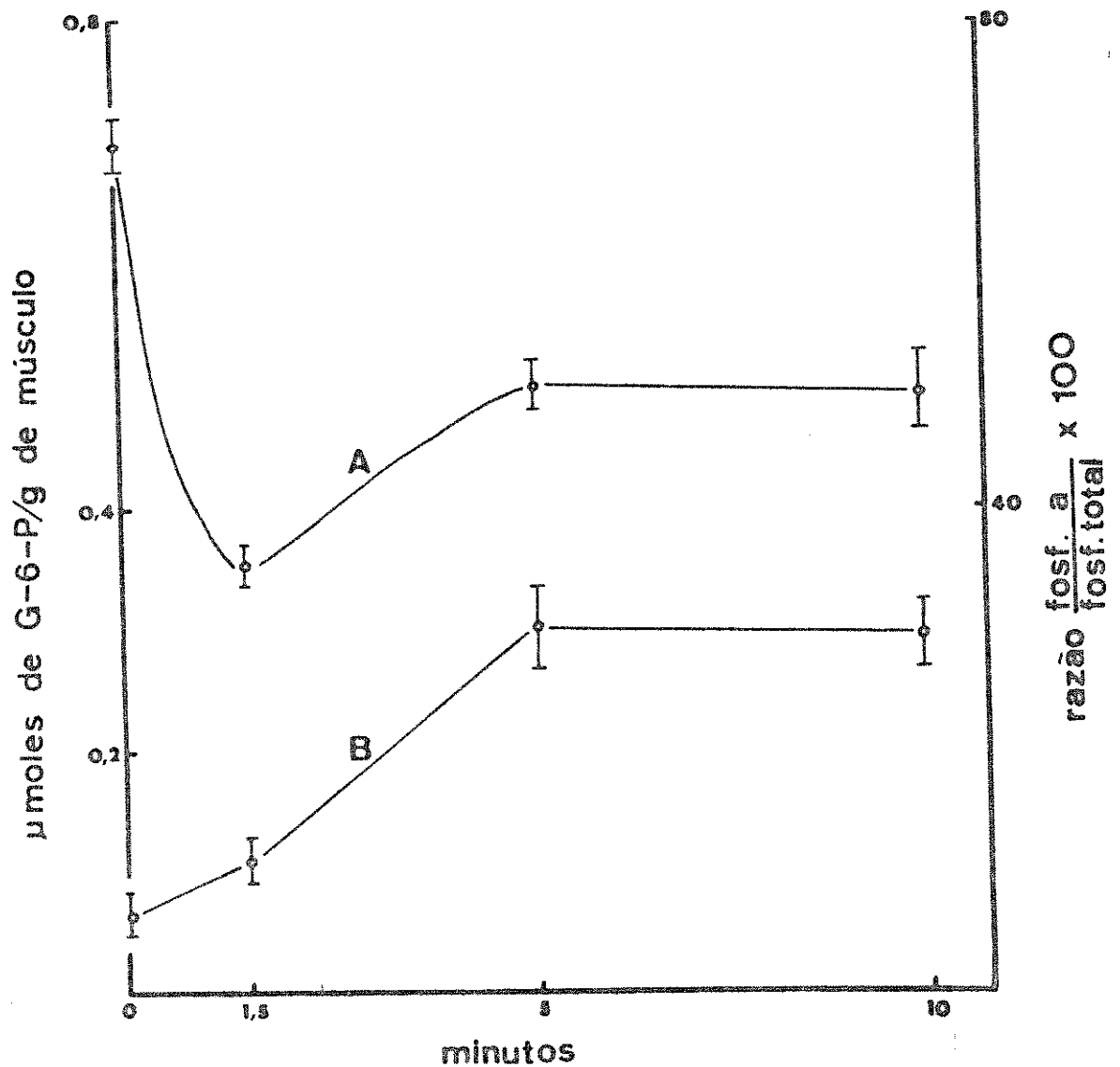


Fig. 6 - Efeito de DNF $10^{-5}M$ sobre o conteúdo de G-6-P e sobre a percentagem de fosforilase a do músculo cardíaco perfundido com solução de Krebs-Henseleit. A curva A representa as determinações de G-6-P e a curva B as determinações da percentagem de fosforilase a.

de fosforilase a no órgão.

Paralelamente, experiências eram realizadas para comparar os achados de outros autores com relação à adrenalina. O nível de G-6-P, com efeito, estava sensivelmente elevado, isto é, passava de $0,69 \pm 0,03$ para $1,84 \pm 0,03$ $\mu\text{moles/g}$ de músculo nos corações perfundidos, 5 minutos após a adição do hormônio.

Desses resultados pode-se sugerir que tanto o DNF como a adrenalina promovem um aumento definido do conteúdo de fosforilase a nos corações dos animais. A adrenalina primariamente age sobre o sistema de fosforilases, o que parece não ser o caso do DNF.

9. *Inibição de fosforilase b quinase por Glicose-6-fosfato.*

O conhecido efeito inibidor deste ester sobre fosforilase b quinase está demonstrado nas figuras 7 e 8. A figura 7, mostra que o 6-ester inibe a reação de ativação da quinase por ATP e Mg^{++} . A figura 8 mostra que a quinase parcialmente ativada por diferentes concentrações de ATP e Mg^{++} é também inibida por G-6-P. Pela análise das figuras 7 e 8, pode-se assumir que a G-6-P não só inibe o processo de ativação da fosforilase b quinase mas que ela também impede a ação da enzima independentemente do conteúdo de sua forma ativa na célula.

10. *Efeito do Dinitrofenol sobre as trocas de ions Ca^{++} e de protons na célula muscular.*

Com fim de estudar, em nossas condições, as trocas entre ions Ca^{++} e protons ao nível da membrana mitocondrial, experiências foram realizadas com preparações de mitocôndrias nas quais a fosforilação oxidativa era ensaiada usando como substrato o succinato de sódio 2 mM na solução. A eficiência da fosforilação oxidativa era analisada pelo consumo de O_2 na célula através do eletrodo de membrana de Clark. A concentração de ions H^+ era avaliada simultaneamente através de um eletrodo de vidro.

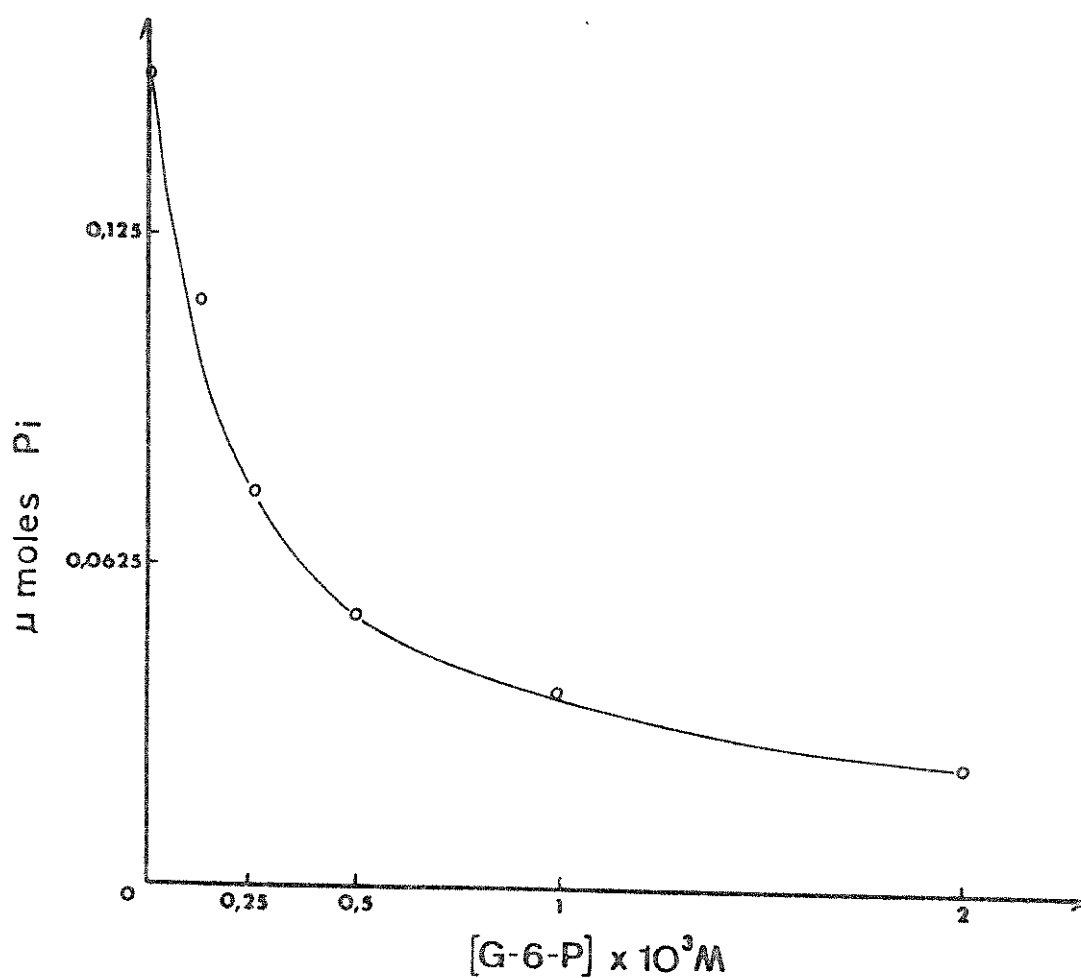


Fig. 7 - Efeito de G-6-P em diferentes concentrações sobre reação de ativação da fosforilase b quinase. A atividade da enzima está expressa, em ordenadas, em função do P_i liberado da G-1-P pela fosforilase a formada na reação de conversão.

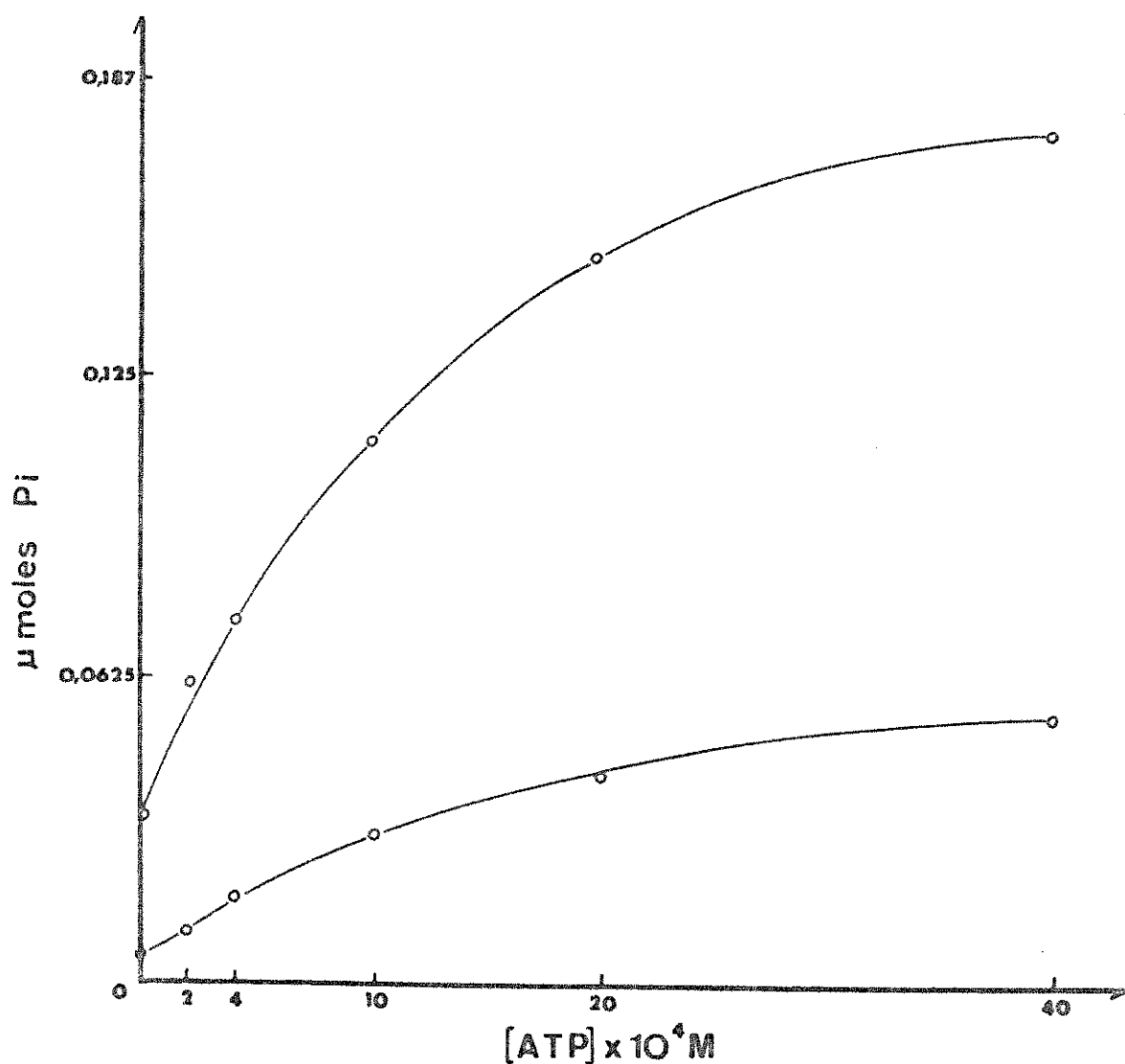


Fig. 8 - Efeito de G-6-P $2 \times 10^{-3}M$ sobre a reação de conversão de fosforilase b em a, catalisada pela fosforilase b quinase, parcialmente ativada por diferentes concentrações de ATP, mantendo-se constante a concentração de ions Mg^{++} . A atividade da quinase foi determinada como descrito na figura 7.

A figura 9-A, mostra as trocas observadas no meio extramitocondrial. O consumo de O_2 pela cadeia respiratória é estimulado pela adição de ions Ca^{++} , ao mesmo tempo uma significativa diminuição do pH ocorre. Depois de certo tempo o consumo de O_2 volta ao estado inicial. Pela adição do DNF, novo estímulo do consumo de O_2 é observado, desta feita contudo, há uma elevação do pH extramitocondrial até os níveis iniciais. A figura 9-B, mostra que quando do DNF é adicionado à preparação de mitocôndria, o consumo de O_2 aumenta sem variação de pH correspondente. Adição de ions Ca^{++} à mitocôndria sob a ação do DNF diminui o consumo de O_2 da mesma, porém, a variação de pH que ocorre é pequena e transitória comparada àquela que ocorre na figura 9-A.

Desses resultados pode-se sugerir, de acordo com outros autores, que os ions Ca^{++} estimulam o consumo de O_2 pela cadeia respiratória e ao mesmo tempo, quantidade estequiométrica de protons fluem da mitocôndria para o citoplasma. Pela adição do DNF há um estímulo da cadeia respiratória e uma entrada de protons para dentro da mitocôndria e a concentração de ions Ca^{++} no citoplasma aumenta estequiometricamente. Na figura 9-A o que se observa é um consumo de O_2 aumentado pela adição do DNF. Na figura 9-B, pode-se notar que quando o DNF é adicionado à preparação, nenhuma troca entre ions Ca^{++} e protons pode ser constatada. De qualquer forma o DNF ou impede as trocas entre ions Ca^{++} e protons aos níveis da parede mitocôndrial, ou faz acumular ions Ca^{++} no compartimento extramitocondrial.

11. *Efeito glicogenolítico de outros desacopladores da fosforilação oxidativa.*

Com finalidade de estender os achados do efeito glicogenolítico do DNF a outros desacopladores da fosforilação oxidativa, tres agentes classicamente descritos na literatura foram utilizados : Salicilato de sódio, Pentaclorofenol e 3,4-Di-tert-butyl-4-hydroxy-benzylidenemalononitrile (SF-6847). Este último teve especial interesse por ter sido demonstrado por MURAOKA e TERADA (1972), ser o mais potente desacoplador da fosforilação oxidativa conhe-

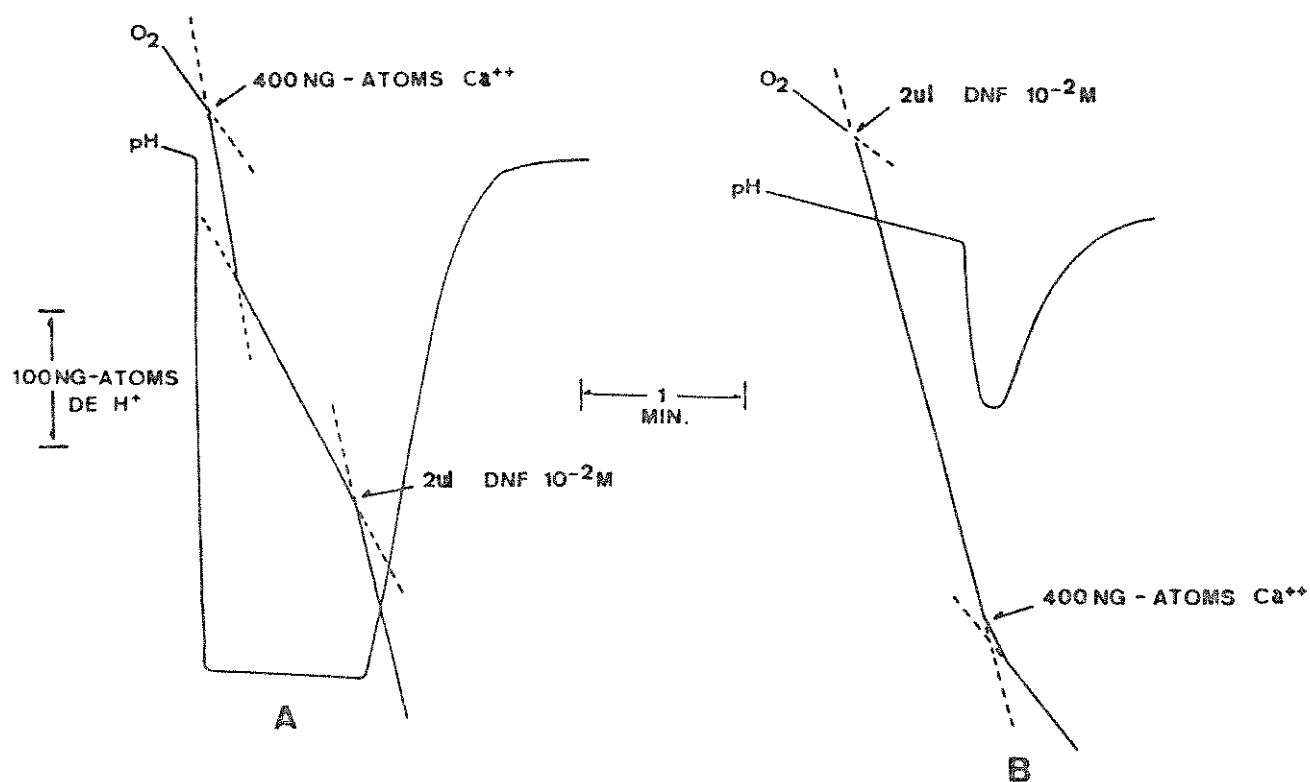


Fig. 9 - Efeito do DNF sobre o consumo de Ca⁺⁺ e ejeção de H⁺ em mitocôndria de coração de rato. A célula (2,0 ml) contém KCl 120 mM, succinato 2,0 mM, tampão HEPES 3,0 mM (pH 7,2), fosfato 0,5 mM, mitocôndria (2,5 mg de proteína/ml), DNF (quando adicionado), 10⁻⁵M.

cido. Desta forma, concentrações muito baixas do SF-6847, tem efeito desacoplador e os efeitos colaterais da droga são evitados tornando-a altamente específica. Estes desacopladores, a exemplo do DNF, eram injetados nos animais via intra peritoneal, em doses descritas como eficientes na literatura. Os sintomas clínicos eram observados nos animais tratados e se apresentavam bem evidentes. O conteúdo de fosforilase a e fosforilase total era determinado em músculo esquelético destes animais, uma hora após a injeção dos desacopladores.

A tabela VIII, representa uma síntese do efeito glicogenolítico dos desacopladores da fosforilação oxidativa descritos e do DNF para efeito comparativo e mostra que os níveis de fosforilase a estão grandemente elevados em todos os casos. O conteúdo de ácido láctico, todavia, excetuando o caso do SF-6847, não se encontra tão elevado como no caso do DNF. Mesmo o SF-6847 com alta potência desacoplante, elevando para os níveis mais altos a fosforilase a, o conteúdo de ácido láctico apesar de estar elevado com relação aos outros desacopladores estudados, não alcança os níveis encontrados pela injeção de DNF nos animais. Na mesma tabela, observa-se que a G-6-P, foi determinada no músculo cardíaco dos animais envenenados com Pentaclorofenol. Neste caso os níveis do 6-ester se apresentaram elevados com relação aos dos animais controles. Estes dados nos parecem do maior interesse e serão objeto de considerações na "DISCUSSÃO", da presente Tese.

TABELA VII

Comparação dos efeitos glicogenolíticos de alguns desacopladores de fosforilação oxidativa e do efeito do dinitrofenol em animais envenenados

DETERMINAÇÕES	CONTROLE	SALICILATO 30mg/100 g	PCF 3mg/100 g	SF-6847 0,3mg/100 g	DNF 2,5mg/100 g
Fosforilase <u>a</u>	58,9 ± 10,0	210,0 ± 11	171,5 ± 13,0	249,1 ± 28,0	156,5 ± 10,0
Fosforilase total (+ATP)	384,0 ± 90,0	388,0 ± 60	402,5 ± 67,0	394,4 ± 56,0	384,0 ± 90,0
$\frac{\text{Fosforilase a}}{\text{Fosforilase total}} \times 100$	15,0 ± 3,00	54,0 ± 2,5	52,6 ± 6,00	67,5 ± 5,5	40,0 ± 11,0
Lactato	1,7 ± 0,09	2,67 ± 0,3	2,71 ± 0,10	4,38 ± 0,4	7,0 ± 2,00
G-6-P	0,695 ± 0,03	-	1,24 ± 0,12	-	0,49 ± 0,03

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A ação glicogenolítica do Dinitrofenol vem sendo objeto de controvérsias há longo tempo. Os autores, que estudaram o fenômeno, explicavam o aumento do fluxo glicogenolítico observado nos animais envenenados ou nas preparações de tecidos isolados, assumindo as mais variadas hipóteses, muitas vezes em contrastante oposição com fatos fisiológicos bem estabelecidos, (HASS, 1947 ; THER e MUELLER, 1950; CORI e ILLINGWORTH, 1956; SEGAL e BLAIR, 1959). Essas contradições, cremos, surgiram principalmente pelo fato de estar a fosforilase a menos ativa ou em menor concentração nos animais ou tecidos tratados por DNF, cujo efeito glicogenolítico era incontestável, avaliado pelos baixos níveis de glicogênio e alto conteúdo de lactato encontrados. Pelas experiências com outras substâncias glicogenolíticas ou agentes físicos, não restava dúvida ser a fosforilase a uma das enzimas controladoras mais importantes da glicogenólise.

O objetivo da presente Tese, foi esclarecer o mecanismo glicogenolítico do DNF. Todas as nossas experiências foram consequência dos achados de FOCESI et al. (1969). Estes autores, bloqueando a transformação de fosforilase a $\rightleftharpoons$ fosforilase b, através de EDTA e fluoreto, e diluindo os extratos de animais envenenados, de forma a evitar os seus efeitos colaterais que poderiam interferir no ensaio dessas enzimas, demonstraram que, na realidade, a droga estimulava a produção de fosforilase a às custas de uma ativação da fosforilase b quinase. Tal efeito, na época, só pode ser encontrado "in vivo".

Com a preocupação de explicar o fato do DNF não apresentar efeito glicogenolítico "in vitro", aventamos várias hipóteses e aquela da droga estar agindo de maneira indireta foi por nós abordada inicialmente. Com efeito, a possibilidade do DNF agir através de seus produtos de catabolismo hepático, uma vez que ele é reduzido no fígado em velocidade relativamente alta (PARKER, 1952), ou através da liberação de catecolaminas na circulação, nos pare

cia possível. Para averiguar a validade desta hipótese nos propu-
zemos a trabalhar com corações isolados, onde os efeitos indire-
tos citados estariam abolidos. Entretanto, era necessário antes
de mais nada, verificar se este órgão se comportava como o múscu-
lo esquelético, em relação ao efeito glicogenolítico do DNF. Pe-
los resultados, foi verificado não só que o conteúdo de ácido
láctico no coração estava aumentado, mas também que este aumento
poderia ser explicado através da glicogenólise aumentada no pró-
prio órgão, uma vez que a fosforólise do glicogênio também esta-
va estimulada.

Sabendo que a enzima responsável pela fosforólise do glicogênio
é a fosforilase, determinamos tanto os níveis de fosforilase a
como de fosforilase b nos animais envenenados. Inicialmente os
resultados foram dificultados pela grande quantidade de fosfori-
lase a encontrada no coração. Isto se devia provavelmente ao rã-
pido aumento do conteúdo de AMP, coenzima da fosforilase b, con-
dicionado pela manipulação do órgão durante sua extração cirúrgi-
ca (CORNBLATH et al. 1963). Evidentemente, a atividade da fosfo-
rilase ensaiada na ausência de AMP que, deveria corresponder ex-
clusivamente à fosforilase a, era na realidade, uma somatória das
atividades das duas enzimas: fosforilase a e fosforilase b. Pelo
tratamento adsorvente com Norit A, pudemos excluir o nucleotídeo
das preparações e encontrar o conteúdo provável das duas enzimas.
Embora o carvão adsorvesse parte das proteínas dos extratos, fi-
cou bem estabelecido que a fosforilase a estava aumentada no co-
ração cerca de tres vezes em relação aos animais controles. Além
disso, a atividade de fosforilase b quinase também foi encontra-
da aumentada. Com esses resultados, ficou reproduzido efeito
glicogenolítico do DNF no coração.

As experiências com corações isolados, perfundidos, que também
demonstraram o efeito estimulante do DNF sobre o sistema de fos-
forilases, afastavam totalmente a possibilidade de interferência
dos produtos de catabolismo da droga no fígado, bem como a hipó-
tese aventada de ser sua ação mediada por uma possível liberação
de catecolaminas na circulação sanguínea. Contudo, a interferên-

cia das catecolaminas propriamente ditas, não estava excluída, uma vez que o DNF poderia promover a liberação daquelas presentes nos reservatórios endógenos do coração. Todavia, acreditamos que, quando trabalhamos com corações de ratos reserpinizados ou quando bloqueamos os receptores β -adrenérgicos pelo uso de propranolol, afastamos também esta última possibilidade.

Dos resultados encontrados e discutidos, um achado pelo menos era persistente, isto é, o DNF "per se", de alguma forma, deveria agir sobre o sistema de fosforilase b quinase, uma vez que a enzima se encontrava sistematicamente estimulada nas experiências. Esta ação não se fazia, evidentemente, através dos mecanismos expostos. Foi por isso que nos propusemos a determinar uma possível ativação direta da fosforilase b quinase por DNF. A enzima purificada não foi estimulada pelo agente, quando este era usado nas mesmas concentrações das experiências em animais ou corações perfundidos; ao contrário, evidente inibição foi encontrada por concentrações elevadas da droga. É interessante observar que esses achados podem explicar aqueles de CORI e ILLINGWORTH, (1956). Estes autores verificaram que o DNF não alterava os níveis de fosforilase a em preparações de diafragma de ratos quando usado em baixas concentrações, porém, evidente diminuição do conteúdo da enzima era encontrado quando a droga era usada em concentrações mais elevadas, da ordem de $10^{-3}M$. A figura 1 mostra o que poderia estar ocorrendo nas experiências destes autores, uma vez que fosforilase b quinase é a enzima responsável pela formação de fosforilase a.

Como o DNF não agia diretamente em preparações purificadas de fosforilase b quinase, ocorreu-nos de imediato, que o agente poderia causar uma maior produção de AMPc na célula e este último seria o verdadeiro estimulador da enzima em nossas condições. Foi assim, que procuramos verificar os níveis de AMPc nos animais envenenados. Este nucleotídeo poderia estar em níveis elevados através de uma ativação da adenil ciclase, diretamente, ou através de uma inibição da fosfodiesterase, a exemplo do que acontece com metilxantinas. Este parece não ter sido o caso, uma

vez que animais tratados com DNF não apresentavam qualquer aumento de AMPc; apesar de serem persistentes os níveis elevados de fosforilase a

Pelas presentes considerações, fica pois estabelecido que o DNF não pertence àquela classe de substâncias representadas pela adrenalina, glucagon e metilxantinas que proporcionam aumento da atividade da enzima através do acúmulo celular de AMPc. Por esta razão, começou-se aventar novas hipóteses, desta vez, sobre a possível ação da droga em outros níveis da via glicogenolítica, com consequências indiretas no sistema de fosforilases. Desta forma, a fosfofrutoquinase, enzima controladora das mais eficientes, foi objeto dos nossos estudos subsequentes.

Considerando que a fosfofrutoquinase é inibida por altas concentrações de ATP e estimulada por ADP, AMP e Pi, e considerando ainda que o DNF, devido ao seu efeito ATPásico, podia condicionar, alterações nos níveis normais destes metabolitos na célula, imaginou-se que a droga poderia estar agindo ao nível desta enzima e, como consequência disso, de alguma forma, sobre a fosforilase b quinase. Com efeito, a ativação da fosfofrutoquinase parecia bem provável, uma vez que os fatores controladores da atividade da enzima (ATP, ADP, AMP e Pi) quando determinamos, estavam alterados no sentido de proporcionar maior atividade à mesma. Como consequência disso, os níveis de G-6-P deveriam estar diminuídos o que aliás, foi também demonstrado. A figura 5, mostra que de fato os níveis de G-6-P estão diminuídos já nos primeiros minutos de perfusão do coração pela ação do DNF.

A viabilidade da diminuição da G-6-P estar implicada na ativação de fosforilase b quinase, foi portanto considerada. De fato, a G-6-P revelou-se potente inibidor desta última enzima, fato este que nos permitiu imaginar que, estando o éster em baixas concentrações nos corações perfundidos com DNF, uma "desinibição" de fosforilase b quinase poderia ocorrer. Assim, o nível de fosforilase a encontrado nessas condições estaria consequentemente elevado. Esse mecanismo, com efeito, poderia estar contribuindo pa-

ra explicação da ação glicogenolítica do DNF. Convém mencionar que estudos recentes de SCHOLNICK et al. (1973); GOSH e SLOVITER (1973), em sistemas glicolíticos, como culturas de reticulócitos e de células de tumor de Ascite, corroboram o modelo do mecanismo proposto, uma vez que estes autores mostraram resultados semelhantes quanto aos níveis de nucleotídeos, G-6-P e lactato, quando adicionavam DNF ou outros inibidores da fosforilação oxidativa às preparações e concluíram que o estímulo glicogenolítico verificado naquelas condições poderia ser consequência do estímulo da atividade da fosfofrutoquinase.

Foi assim, que consideramos uma vez mais demonstrada a diferença entre o mecanismo de ação do DNF e da adrenalina ou do glucagon. Os hormônios levam a uma estimulação do sistema de fosforilases com grande acúmulo de G-6-P. A diferença parece ocorrer devido a ação estimuladora do DNF, primariamente sobre a fosfofrutoquinase, devido as alterações que ele provoca nos níveis dos metabólitos discutidos. Os baixos níveis iniciais de G-6-P encontrados nos corações perfundidos conduziu-nos a conjecturar que, nestas condições, a fosforilase b quinase seria solicitada a fim de garantir suprimento de substrato adequado para a atividade da fosfofrutoquinase. É isto, na verdade, o que se pode imaginar pelo exame da experiência descrita na figura 5, onde se constatou que os níveis de G-6-P diminuem nos primeiros segundos de perfusão e com o decorrer do tempo a concentração do éster vai aumentando gradativamente até níveis próximos ao normal.

Apesar da diminuição dos níveis de G-6-P poder explicar o estímulo inicial da atividade da fosforilase b quinase, não explica o conteúdo aumentado de fosforilase a após os primeiros minutos de ação do DNF, uma vez que os níveis dessa enzima continuam altos mesmo quando a G-6-P já voltou a níveis praticamente normais, condições em que a fosforilase b quinase apresentaria novamente inibição, de acordo com o que ficou postulado.

À luz dessa observação, outros mecanismos deveriam estar envolvidos na posterior ativação da fosforilase b quinase. Entre eles, o

que nos pareceu mais importante foi o da ativação da enzima por ions Ca^{++} . Nesse sentido, e baseado nos resultados de vários autores (CARAFOLI et al. 1969; REYNAFARJE e LEHNINGER, 1969; CARAFOLI e LEHNINGER, 1971; REYNAFARJE e LEHNINGER, 1973), experiências foram realizadas para avaliar os níveis de ions Ca^{++} em compartimentos celulares que pudessem estar implicados na ativação da enzima. De acordo com CHANCE, (1965), esta avaliação pode ser feita através da medida de pH em preparações de mitocôndrias. As trocas de concentração hidrogeniônica entre estas organelas e o líquido extramitocôndrial refletem trocas estequiométricas de ions Ca^{++} no sentido inverso. Para cada ion Ca^{++} absorvido pela mitocôndria, de um a dois ions de hidrogênio são ejetados pela mesma, no citoplasma, dependendo da natureza e função dos ânions presentes no meio. Nossos resultados sugerem que o DNF aumenta os níveis de Ca^{++} no citoplasma, tanto por promover a diminuição de seu consumo pela mitocôndria, como por proporcionar liberação de Ca^{++} da organela para o citoplasma.

À guisa de explicação das trocas de ions que ocorrem na presença do DNF, pode-se sugerir, de acordo com a Teoria Quemiosmótica de MITCHELL, (1961), que o transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória é acompanhado pela ejeção de ions H^+ para o exterior da membrana interna da mitocôndria, dando origem assim, a um gradiente quemiosmótico, com capacidade de gerar energia livre para transportes ativos aos níveis dessa membrana. O DNF e de sacopladores similares, por serem ácidos fracos aromáticos, lipossolúveis, seriam adsorvidos na fase lipídica da membrana e permitiriam o livre trânsito de prótons para o exterior da mitocôndria (CARAFOLI e ROSSI, 1967). O resultado final seria, pois, concentrações iguais desses ions nos dois lados da membrana. Evidentemente, nessas condições, há impedimento termodinâmico para realização de trabalho, uma vez que o sistema se encontra em e-quilíbrio e as trocas de energia livre (ΔG) é igual a zero. Em consequência, o transporte de Ca^{++} estaria interrompido no sentido inverso, isto é, para o interior da mitocôndria, permanecendo no espaço extramitocôndrial. Além disso, independentemente de qualquer transporte ativo, o Ca^{++} passa livremente para fora da mitocôndria.

A figura 9, exprime experimentalmente a ação do DNF que está, com efeito, de pleno acordo com a Teoria Quemiosmótica da fosforilação oxidativa de MITCHELL.

Com relação às trocas de Ca^{++} ao nível da mitocôndria, devemos salientar ainda que, de acordo com LEHNINGER, (1970), no músculo cardíaco e esquelético vermelho, a mitocôndria tem papel relevante na regulação do Ca^{++} citoplasmático, possivelmente superando o papel do retículo sarcoplasmático. Isto nos leva a crer que o papel desacoplador do DNF tem implicações diretas em sua função glicogenolítica, pois, o Ca^{++} aumentado no citoplasma promoveria estímulo de fosforilase b quinase, e conseqüentemente, acúmulo de fosforilase a no tecido muscular.

Se essas assertivas são verdadeiras, outros desacopladores da fosforilação oxidativa devem ser ativadores da fosforilase b quinase, uma vez que eles promovem também um acúmulo de Ca^{++} em compartimentos extramitocondriais. A tabela VII resume várias determinações em animais envenenados com desacopladores da fosforilação oxidativa e compara-os com o DNF. Do exame da tabela, torna-se evidente que todos os desacopladores estudados condicionam substancial aumento do conteúdo de fosforilase a nos animais envenenados e, além disso, que a potência glicogenolítica destes, quando avaliada através do conteúdo de lactato, é muito menor que a do DNF, embora os níveis de fosforilase a estejam tão elevados ou mais, em relação aos níveis encontrados pela ação deste último. Por outro lado, os níveis de G-6-P, de acordo com a tabela, estão diminuídos para o caso do DNF, enquanto que no caso do Pentaclorofenol, os níveis celulares do éster estão elevados com relação aos animais controles. Resultados recentes de FOCESI, (1974), revelam que tanto o salicilato quanto o SF-6847 também condicionam níveis altos de G-6-P nos animais envenenados.

Estes resultados finais nos pareceram muito importantes, pois nos possibilitaram concluir que os desacopladores da fosforilação oxidativa, de um modo geral, podem promover estímulo da glicogenólise através do sistema Ca^{++} fosforilase b quinase, prima-

riamente. Este estímulo acarreta níveis altos de G-6-P na célula. Nesse particular, os desacopladores assemelham-se à ação da adrenalina estimulando, primariamente, fosforilase b quinase, porém, através do aumento extramitocondrial de Ca^{++} e não de AMPc.

Os dados apresentados e discutidos acima levaram-nos a sugerir pelo menos dois mecanismos para explicar o efeito glicogenolítico do DNF. O primeiro seria devido ao seu efeito ATPásico que, levando o ATP a níveis extremamente baixos, condicionaria um estímulo da fosfofrutoquinase, uma vez que este nucleotídeo, além de co-substrato é também inibidor alostérico da enzima. Em consequência do estímulo da enzima, os níveis de G-6-P estão diminuídos. O segundo, através de aumento de ions Ca^{++} , conhecido ativador da fosforilase b quinase. Este último parece comum para os desacopladores da fosforilação oxidativa.

Experiências de SHOLNICK et al. (1973), reforçaram nossos resultados. Estes autores, usando DNF em preparações de células tumorais, conseguiram verificar que o efeito glicogenolítico do DNF fica grandemente diminuído quando as células são previamente tratadas por rutamicina. Rutamicina, é um potente inibidor da atividade ATPásica do DNF e, nestas condições, somente o efeito desacoplador da droga é manifestado nas células, e a velocidade de formação de ácido láctico diminui significativamente.

Quando comparamos o efeito glicogenolítico do DNF com aqueles apresentados por células submetidas a condições de anóxia, vários pontos comuns podem ser evidenciados. Na verdade, é difícil definir diferenças marcantes entre os dois fenômenos, pois, em condições de anóxia, as células não podem oxidar adequadamente seus substratos e os níveis energéticos da mesma devem ser mantidos, e o são, principalmente através de glicogenólise, no fenômeno conhecido como Efeito Pasteur. Nos animais envenenados com DNF, as oxidações são, ao contrário da anóxia, aceleradas, porém, o conteúdo energético da célula encontra-se extremamente diminuído devido não só a seu efeito desacoplador da fosforilação oxidativa, como também a seu efeito ATPásico. O resultado final é, como nas

condições de anóxia, uma maior velocidade de glicogenólise para suprir as necessidades energéticas da célula.

A anóxia dos tecidos determina grande aumento da atividade da via glicogenolítica dos mesmos e, pelo menos, dois componentes estão implicados nesse mecanismo. Um componente adrenérgico transitório, abolido pelo uso de β -bloqueadores e um outro componente, talvez mais importante, resistente aos β -bloqueadores. Este último tem sido objeto de muita discussão, embora a implicação do AMPc neste processo esteja definitivamente afastada (ROBINSON et al. 1967). WOLLENBERGER et al. (1968), estudando o efeito glicogenolítico da anóxia em corações submetidos a hipóxia, previamente tratados com Pronethalol (bloqueador β -adrenérgico) concluíram que os ions Ca^{++} poderiam estar envolvidos no processo de ativação glicogenolítica observado. Nenhuma evidência experimental, contudo, trazia suporte a esta conclusão.

Para comparar os efeitos glicogenolíticos do DNF com os da anóxia, construímos a tabela VIII, cujos dados foram obtidos de nossos resultados para o caso do DNF, e dos resultados de outros autores para o caso da anóxia com o componente adrenérgico abolido por tratamento prévio das preparações com Pronethalol ou reserpina. Embora as determinações, em algumas vezes, tenham sido feitas em diferentes condições e apresentadas em diferentes unidades, os níveis das alterações provocadas pelos agentes são evidentemente proporcionais. O exame da tabela VIII, demonstra os efeitos muito semelhantes encontrados pelas determinações nas duas condições, revelando que o músculo cardíaco dos animais envenenados com DNF comporta-se da mesma forma que o músculo cardíaco dos animais submetidos à hipóxia. Essas afirmações finais, embora com reservas, nos pareceram altamente significantes, pois possibilitaram postular um mecanismo para explicar pela primeira vez, com base em alterações energéticas aos níveis de membrana mitocondrial, o rápido fluxo glicogenolítico encontrado nos animais submetidos a anóxia, e ainda nos permitiu estabelecer base para futuras investigações. Neste contexto, pretendemos não terminar aqui nossas experiências, pois estamos seguros, de que mui

TABELA VIII

Efeito do DNF e da anóxia em músculo cardíaco. As determinações no caso da anóxia foram feitas em corações tratados com Pronethalol ou reserpinizados (componente adrenergico abolido). Os números representados na última coluna, são os valores extremos encontrados pelos autores.

DETERMINAÇÕES	CONTROLE	DNF 2,5 mg/100g	ANÓXIA (Pronethalol)
Fosforilase $\frac{a}{b}$ total x100	10,2 ± 1* (10,7 ± 1,8)	(37,5 ± 7,4)	39,9 ± 3,7*
Fosforilase $\frac{b}{quinase}$	0,12 ± 0,03** (1346 ± 480)	(3384 ± 334)	0,36 ± 0,03**
ATP/ADP	4,43*** (11,6 ± 3,2)	(4,8 ± 1,5)	1,55***
AMP	0,197 ± 0,014*** (0,377 ± 0,08)	(0,69 ± 0,1)	0,548 ± 0,083***
G-6-P	0,115 ± 0,025*** (0,139 ± 0,03)	(0,07 ± 0,015)	0,085 ± 0,015***
Lactato	0,6 ± 0,30* (1,4 ± 0,2)	(6,00 ± 0,4)	7,8 ± 1,5*

As determinações da presente Tese, estão entre parenteses

* CORNBATH et al. (1963)
 ** KRAUSE e WOLLENBERGER, (1967)
 *** MAYER et al. (1967)

to ainda há por se fazer para se lançar propostas definitivas a respeito de um fenômeno tão universal e importante como aquele insistentemente referido: o Efeito Pasteur.

RESUMO

O mecanismo do efeito glicogenolítico do dinitrofenol foi estudado em músculo esquelético e em corações, onde este efeito pareceu bem evidente. As hipóteses do efeito indireto da droga através de seus produtos de redução no fígado ou através do aumento na produção de catecolaminas nos animais, foram afastadas. Os dados experimentais que indicaram aumento do conteúdo de fosforilase a através da maior atividade da fosforilase b quinase, bem como os níveis de adenosina trifosfato e Glicose-6-fosfato, diminuídos nos primeiros minutos da ação da droga, proporcionaram uma explicação para o seu efeito nestas condições iniciais. Assim, o efeito do Dinitrofenol sobre a Adenosina trifosfatase condicionava os baixos níveis de Adenosina trifosfato, que por sua vez promoviam aumento da atividade da fosfofrutoquinase e consequentemente baixos níveis de Glicose-6-fosfato na célula. Nestas condições a fosforilase b quinase tinha sua ação facilitada (Glicose-6-fosfato é inibidor da enzima), e os níveis de fosforilase a foram encontrados elevados. Após certo tempo de ação da droga, os níveis de Glicose-6-fosfato voltam ao normal enquanto que os níveis desta última enzima continuam aumentados. Neste caso parece, a exemplo de outros desacopladores da fosforilação oxidativa, que o Dinitrofenol condiciona acúmulo de íons Ca^{++} em compartimentos celulares, onde a fosforilase b quinase está preferencialmente alojada, proporcionando aumento de sua atividade. A ação glicogenolítica do Dinitrofenol, foi pois explicada, com base nestas considerações. A presente Tese também contribuiu para a explicação do mecanismo do efeito glicogenolítico dos desacopladores da fosforilação oxidativa e da anóxia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATRA, S. The role of mitochondrial calcium uptake in contraction of human myometrium. B.B.A., 305: 428-432, 1973.
- BARANOWISKI, T.; ILLINGWORTH, B.; BROWN, D.H. and CORI, C.F. The isolation of pyridoxal-5'-phosphate from crystalline muscle phosphorylase. B.B.A., 25: 16-21, 1957.
- BUTCHER, R.W.; ROBINSON, G.A.; HARDMAN, J.G. and SUTHERLAND, E.W. The role of cyclic AMP in hormone actions. Adv.Enz.Regul., 6: 375-389, 1968.
- _____ and SUTHERLAND, E.W. Adenosine 3'-5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3'-5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3'-5'-phosphate in human urine. J.Biol.Chem., 237: 1244-1250, 1962.
- CARAFOLI, E. and LEHNIGER, A.L. A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. In: Biochem.J., 122: 681-690, 1971.
- _____; PATRIARCA, P. and ROSSI, C.S. A comparative study of the role of mitochondria and the sarcoplasmic reticulum in the uptake and release of Ca^{++} by the rat diaphragm. J.Cell Physiol., 74: 17-30, 1969.
- _____; and ROSSI, C.S. The effect of dinitrophenol permeability of the mitochondrial membrane. Bioch.Bioph. Res.Comm., 29: 153-157, 1967.
- CHANCE, B. The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. J.Biol.Chem., 240: 2729-2748, 1965.
- COLOWICK, S.P. and KALKAR, H.M. The role of myokinase in transphosphorylation of hexoses by adenylyl pyrophosphate. J.Biol.Chem., 148: 117-126, 1943.

- CORI, C.F. and CORI, G.T. The activity and crystallization of phosphorylase b. J.Biol.Chem., 158: 341-345, 1945.
- _____ and _____ Mechanisms of formation of hexose-mono-phosphate ester. Proc.Soc.Biol.Med., 34: 702-705, 1936.
- _____ and ILLINGWORTH, B. The prosthetic group of phosphorylase. In: Proc.Natl Acad.Sci. (Wash.), 43: 547-553, 1957.
- CORI, C.P.; CORI, G.T. and GREEN, A.A. Crystalline muscle phosphorylase III kinetics. J.Biol.Chem., 151: 39-55. 1943.
- CORI, G.T. and CORI, C.F. The enzymatic conversion of phosphorylase a to b. J.Biol.Chem., 158: 321-332, 1945.
- _____ and ILLINGWORTH, B. The effect of epinephrine and other glycogenolytic agents on the phosphorylase a content of muscle. B.B.A., 21: 105-110, 1956.
- _____; _____ and KELLER, P.J. Muscle phosphorylase. In: COLOWICK, S.P., ed. Methods in Enzymology. New York, Academic, 1955. v. 1, 200-205.
- CORNBLATH, M.; RANDLE, P.J.; PARMGGIANI, A. and MORGAN, H.E. Regulation of glycogenolysis in muscle: effects of glucagon and anoxia on lactate production, glycogen content and phosphorylase activity in the perfused isolated rat heart. In: J.Biol.Chem., 238: 1592-1597, 1963.
- DANFORTH, W.H.; HELMREICH, E. and CORI, C.F. The effect of contraction and of epinephrine on the phosphorylase activity of frog sartorius muscle. In: Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.), 48: 1191-1199, 1962.
- DAUDOVA, G.M. and SHVETS, M.A. Oxidative phosphorylation in rabbit skeletal muscles after administration of 2-4-dinitrophenol. Biochemistry (Biokhimiya), 38: 249-252, 1973.

- DRUMOND, G.I. and DUNCAN, L. Activation of cardiac phosphorylase b kinase. J.Biol.Chem., 241: 5893-5898, 1966.
- _____ and _____. Studies on the mechanism of activation of phosphorylase b kinase by calcium. J.Biol.Chem., 243: 5532-5538, 1968.
- _____; _____ and FRIESEN, A.J.D. Some properties of cardiac phosphorylase b kinase. J.Biol.Chem., 240: 2778-2785, 1965.
- _____; HAWOOD, J.P. and POWELL, C.A. Studies on the activation of phosphorylase in skeletal muscle by contraction and by epinephrine. J.Biol.Chem., 244: 4235-4240, 1969.
- EBASHI, S.; ENDO, M. and OTHSUKI, I. Control of muscle contraction. Rev.Biophys., 2: 351-383, 1969.
- FISCHER, E.H. Binding of vitamin B6-coenzymes and labelling of active site of enzymes by sodium borohydride reduction. In: GOODWIN, T.W., ed. Structure and activity enzymes. New York, Academic, 1964. 111-120.
- _____; APPLEMAN, M.M. and KREBS, E.G. The structure of phosphorylase. In: WHELAN, W.J., ed. Control of glycogen metabolism. Boston, Little Brown, 1964. 94-103 (Ciba Foundation Symposium).
- _____; KENT, A.B.; SNEIDER, E.R. and KREBS, E.G. The reaction of sodium borohydride with muscle phosphorylase. J.Am.Chem.Soc., 80: 2906-2915, 1958.
- _____ and KREBS, E.G. Muscle phosphorylase b. In: COLOWICK, S.P., ed. Methods in Enzymology. New York, Academic, 1962. v. 5, 369-373.
- _____ and _____. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. J.Biol.Chem., 216: 121-132, 1955.

- _____ and _____. The isolation and crystallization of rabbit skeletal muscle phosphorylase b. J.Biol.Chem., 231: 65-71, 1958.
- _____; POKER, A. and SAARI, J.C. The structure, function and control of glycogen phosphorylase. In: CAMPBELL, P.N., ed. Essays in biochemistry. New York, Academic, 1970. v. 6, 23-68.
- FOCESI JR., A. Comunicação pessoal. 1974.
- _____; TAHIN, Q.S.; EL-GUYND, M.M. e VERCESI, A.E. Ação do 2,4-dinitrofenol sobre a atividade de fosforilase b quinase "in vitro". Res. XXI Reun.An.SBPC, 522, 1969 b.
- _____; _____; _____ and _____. Effect of 2-4-Dinitrophenol on the phosphorylases system of the skeletal muscle "in vivo". Experientia, 25: 1243-1245, 1969 a.
- GERBACH, E.; DEUTICKE, B. and DREISBACH, R.H. Der Nucleotidabbau in Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine Mogliche bedeutung fur die coronardurchblutung. Naturwissenschaften, 50: 228-229, 1963.
- GHOSH, A. and SLOVITER, H.A. Glycolysis and the Pasteur effect in rat reticulocytes. J.Biol.Chem., 248: 3035-3040, 1973.
- GONÇALVES, J.M. and FOCESI JR., A. Inhibition of skeletal muscle phosphorylase a and b by 1, 2, 4- α -dinitrophenol. In: STULBERG, M. ed. Enzymatic aspects of metabolic regulation, International symposium, Mexico, 1966. Maryland, Health Service, 1967. 71-80. (National Cancer Institute Monograph, 27).
- GREN, A.A. and CORI, G.T. Crystalline muscle phosphorylase; preparation properties and molecular weight. J.Biol.Chem. 151: 21-29, 1943.

- GUIRARD, B.M. and SNELL, E.E. Vitamin B6 function in transamination and decarboxylation reactions. In: FLORKIN, M. and STOTZ, E.H. Comprehensive biochemistry. Amsterdam, Elsevier, 1964. v. 15, 138-199.
- HAAS, H.T.A. Über die stonung des Kohlehy-drastoffwechsels und pervitin und ihre beeinflussung durch Askorbinsaure und nebennierenrinden hormon. Ark.Exp.Path.U.Pharmakol., 209: 110-129, 1947.
- HAMMERMEISTER, K.E.; YUNIS, A.A. and KREBS, E.G. Studies on phosphorylase in the heart. J.Biol.Chem., 240: 986-991, 1965.
- HAUGAARD, N.; HAUGAARD, E.S.; LEE, N.H. and HORN, R.S. Possible role of mitochondria in regulation of cardiac contractility. Fed.Proc., 28: 1657-1662, 1969.
- HELMREICH, E. and CORI, C.F. Regulation of glycolysis in muscle. Adv.Enz.Regul., 3: 91-107, 1965.
- _____, KARPATKIN and CORI, C.F. Regulation of glycolysis in skeletal muscle. In: WHELAN, W.J., ed. Control of glycogen metabolism. Boston, Little Brown, 1964. 211-216. (Ciba Foundation Symposium).
- HESS, B. and BOITEUX, A. Oxillatory phenomena in biochemistry. In: Ann.Rev.Bioch., 40: 237-258, 1971.
- HORECKER, B.L. and WOOD, W.A. D-glucose-6-phosphate. In: COLOWICK, S.P., ed. Methods in Enzymology. New York, Academic, 1957. v. 3, 152-154.
- HURD, S.S. Phosphorylase phosphatase; its purification and use in the study of the molecular properties of rabbit muscle glycogen phosphorylase. Ph., D. Thesis, Univ. Wash., 1967.
- HUSTON, R.B. and KREBS, E.G. Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase by Ca^{++} . II. Identification of the

kinase activating factor as a proteolytic enzyme.

Biochemistry, 7: 2116-2122, 1968.

HUXLEY, H.E. The mechanism of molecular contraction.

Science, 164: 1356-1366, 1969.

ILLINGWORTH, B. and CORI, G.T. Crystalline muscle phosphorylase. In: Bioch. preparations. New York, Willey, 1953, v. 3.

_____; JANSZ, H.S.; BROWN, D.H. and CORI, C.F. Observations on the function of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase.

In: Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.), 44: 1180-1191, 1958.

KALCKAR, H.M. Adenyl pirophosphatase and myokinase.

Biol.Chem., 153: 355-367, 1944.

_____. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. III. Studies of the enzymes of purine metabolism. J.Biol.Chem., 167: 461-475, 1947 a.

_____. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. II. Determinations of specific enzymes. J.Biol.Chem., 167: 445-459, 1947 b.

_____. The role of myokinase in transphosphorylations. II. The enzymatic action of myokinase on adenine nucleotides. In: J.Biol.Chem., 148: 127-137, 1943.

KELLER, P.J. and CORI, G.T. Purification and properties of the phosphorylase-rupturing enzyme. J.Biol.Chem., 214: 127-134, 1955.

KRAUSE, E.G. und WOLLENBERGER, A. Über die aktivierung der phosphorylase b kinase im akut ischamischen myokard.

Acta Biol.Med. (German.), 19: 381-393, 1967.

KREBS, E.G. and FISCHER, E.H. Phosphorylase b kinase from rabbit skeletal muscle. In: COLOWICK, S.P., ed. Methods in Enzymology. New York, Academic, 1962, v. 5, 373-376.

_____; GRAVES, D.J. and FISCHER, E.H. Factors affecting

the activity of muscle phosphorylase b kinase. J.Biol. Chem., 234: 2867-2873, 1959.

_____; HUSTON, R.B. and HUNKELER, F.L. Properties of phosphorylase b kinase and its control in skeletal muscle. Adv.Enz.Regul., 6: 245-255, 1969.

_____; GONZALES, C.; POSNER, J.B.; BRATVOLD, G.E. and FISCHER, E.H. Interconversions of muscle phosphorylase b and a. In: WHELLAN, W.J., ed. Control of glycogen metabolism. Boston, Little Brown, 1964. 200-210. (Ciba Foundation Symposium).

_____; LOVE, D.S.; BRATVOLD, G.E.; TRAYSER, K.A.; MEYER, W. L. and FISCHER, E.H. Purification and properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b kinase. Biochemistry, 3: 1022-1033, 1964.

KREBS, H.A. und HENSELEIT, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tier Körper. Hoppe-Seyler's Zeit. fur Phys.Chemie, 210: 33-66, 1932.

KRISHNAM, P.S. Potato apyrase. In: COLOWICK, S.P., ed. Methods in Enzymology. New York, Academic, 1955. v. 2, 591-593.

KUMON, A.; NISHIYAMA, K.; YAMAMURA, H. and NISHIZUKA, Y. Multiplicity of adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinases from rat liver and mode of action of cAMP. In: J.Biol.Chem., 247: 3726-3735, 1972.

LARDY, H.A. and WELLMAN, H. The catalytic effect of 2,4-DNF on adenosinetriphosphate hydrolysis by cell particles and soluble enzymes. J.Biol.Chem., 201: 357-370, 1953.

_____ and _____ Oxidative phosphorylations; role of inorganic phosphate and receptor systems in control of metabolic rats. In: J.Biol.Chem., 195: 215-224, 1952.

LEHNINGER, A.L. Mitochondria and calcium ion transport.

Biochem.J., 119: 129-138, 1970.

LOHMANN, K. and JENDRASSIK, L. Kolorimetrische phosphorsaurebestimmungem muskelextrakt. In: Biochem.Z., 178: 419-426, 1926.

LOOMINS, W.F. and LIPMANN, F. Reversible inhibition of the coupling between phosphorylations and oxidation. In: J.Biol.Chem., 173: 807-808, 1948.

LOWRY, H.O.; PASSONNEAU, J.V.; HASSELBERGER, F.X. and SCHULZ, D. W. Effect of ischemia on known substrats and cofactors on the glycolytic pathway in brain. J.Biol.Chem., 239: 18-30, 1964.

MANNERS, D.J. and RYLEY, W.D. Studies on the metabolism of the protozoa. 2. The glycogen of the ciliate tetrahymena pyriformis (glamona piriformis). Biochem.J., 52: 480, 1952.

MANSOUR, T.E. Phosphofrutokinase activity in skeletal muscle extracts following administrations of epinephryne. J. Biol.Chem., 247: 6059-6066, 1972.

MARBACH, E.P. and WEIL, M.H. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Clin.Chem., 13: 314, 1967.

MAYER, S.E.; WILLIAMS, B.J. and SMITH, J.M. Adrenergic mechanism in cardiac glycogen metabolism. Ann. N.Y.Acad. Sci., 139: 686-702, 1967.

MEYER, W.L.; FISCHER, E.H. and KREBS, E.G. Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase by Ca^{++} . Biochemistry, 3: 1033-1039, 1964.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, 191: 144-148, 1961.

MOMMAERTS, W.F.H.M.; ILLINGWORTH, B.; PEARSON, C.M.; GUILLORY, R.J. and SERAYDARIAN, K. A functional disorder of muscle

associated with the absence of phosphorylase. Proc.Natl. Acad.Sci. (U.S.A.), 45: 791-797, 1959.

MORGAN, H.E.; HENDERSON, M.J.; REGEN, D.M. and PARK, C.R.

Regulation of glucose Uptake in muscle. I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in isolated, perfused heart of normal rats. J.Biol.Chem. 236: 253-261, 1961.

_____ and PARMEGGIANI, A. Effect of glucagon and anoxia on glycogenolysis in the perfused rat heart; effect of adenine nucleotides, glucose 6-phosphate and inorganic phosphate on muscle phosphorylase activity. In: WHELLAN, W.J., ed. Control of glycogen metabolism. Boston, Little Brown, 1964. 254-272 (Ciba Foudation Symposium).

_____ and _____ Regulation of glycogenolysis in muscle. III. Control of muscle glycogen phosphorylase. J.Biol. Chem., 239: 2440-2445, 1964.

MUNCH-PETERSEN, A. and KALCKAR, H.M. Determination of ATP and ADP in tissue filtrates. In: COLOWICK, S.P., ed. Methods in Enzymology, New York, Academic, 1957. v. 3, 869-871.

MURAD, F.; CHI, Y.M.; RALL, T.W. and SUTHERLAND, E.W. Adenylcyclase. III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine-3'-5'-phosphate by preparations from cardiac muscle and liver. J.Biol.Chem., 237: 1233-1238, 1962.

MURAOKA, S. and TERADA, H. 3,5-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene malonitrile; a new powerful uncoupler of respiratory-chain phosphorylation. B.B.A., 275: 271-275, 1972.

MURPHY, J.B. and KIES, M.W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. B.B.A., 45: 382-384, 1960.

NAMM, D.H.; MAYER, S.E. and MALTBIE, M. The role of potassium and calcium ions in the effect of Epinephrine on cardiac

- cyclase adenosine 3'-5'-monophosphate, phosphorylase kinase and phosphorylase. In: Mol.Pharmacol., 4: 522-530, 1968.
- NIKIFOROUK, G. and COLOWICK, P. 5'-Adenylic acid deaminase from muscle. In: COLOWICK, S.P., ed. Methods in Enzymology. New York, Academic, 1955, v. 2, 469-473.
- OZAWA, G.; HOSOI, K. and EBASHI, S. Reversible stimulation of muscle phosphorylase b kinase by low concentrations of calcium ions. J.Biochem. (Tokio), 61: 531-533, 1967.
- PANDE, S.V. and BLANCHARD, M.C. Reversible inhibition of mitochondrial adenosine diphosphate phosphorylation by long chain acyl coenzyme A. Esters. In: J.Biol.Chem., 246: 402-411, 1971.
- PARKER, V.H. Enzymic reduction of 2,4- α -dinitrophenol by rat-tissue homogenates. Biochem. J., 51: 363, 1952.
- PARNAS, M.J.K. et MOCHNACK, I. Le role de l'acide inosique dans la glycogenolyse musculaire. C.R.Soc.Riol., 123: 1173-1175, 1936.
- PASSONNEAU, J.V. and LOWRY, H.O. The role of phosphofructokinase in metabolic regulation. Adv.Enz.Regul., 2: 265-274, 1964.
- _____ and _____. Phosphofructokinase and the Pasteur effect. Biochem.Biophys.Res.Comm., 7: 10-15, 1962.
- PEACHEY, L.D. Muscle. Rev.Physiol., 30: 401-440, 1968.
- PEISS, C.N. and FIELD, J. A comparison of the influence of 2-4-DNF on the oxygen consumption of rat brain slices and homogenates. J.Biol.Chem., 175: 49-55, 1948.
- PFLUGER, E.F.W. Pflüger's Arch., 102: 305, 1904.
- POSNER, J.B.; HAMMERMEISTER, K.E.; BRATVOLD, G.E. and KREBS, E.G. The assay of adenosine-3'-5'-phosphate in skeletal muscle. In: Biochemistry, 3: 1040-1044, 1964.

- POSNER, J.B.; STERN, R. and KREBS, E.G. Effects of electrical stimulation and epinephrine on muscle phosphorylase, phosphorylase b kinase, and adenosine 3'-5'-phosphate. J.Biol.Chem., 240: 982-985, 1965.
- RALL, T.W. and SUTHERLAND, E.W. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. J.Biol.Chem., 232: 1065-1076, 1958.
- _____ and WEST, T.C. The potentiation of cardiac inotropism responses to norepinephrine by theophylline. In: J. J.Pharmacol., 139: 269-274, 1963.
- REGEN, D.M.; DAVIS, W.W.; MORGAN, H.E. and PARK, C.R. The regulation of hexokinase and phosphofructokinase activity in heart muscle. Effects of alloxan diabetes, growth hormone, cortisol and anoxia. J.Biol.Chem., 239: 43-49, 1964.
- REYNAFARJE, B. and LEHNINGER, A.L. Ca^{++} transport by mitochondria from L1310 mouse ascites tumor cells. Proc. Natl.Acad.Sci. (U.S.A.), 70(6): 1744-1748, 1973.
- _____ and _____ High affinity and low affinity binding of Ca^{++} by rat liver mitochondria. In: J.Biol.Chem., 244: 584-594, 1969.
- RILEY, W.D.; DELANGE, R.J.; BRATVOLD, G.E. and KREBS, E.G. Reversal of phosphorylase b kinase activation. In: J.Biol.Chem., 243: 2209-2215, 1968.
- ROBINSON, G.A.; BUTCHER, R.W.; ØYE, I.; MORGAN, H.E. and SUTHERLAND, E.W. The effect of epinephrine on adenosine 3'-5'-phosphate levels in the isolated perfused rat heart. Mol.Pharmacol., 1: 168-177, 1965.
- _____; _____ and SUTHERLAND, E.W. Cyclic AMP. Rev. Biochem., 37: 149-174, 1968.
- _____; _____ and _____ Adenyl cyclase as adrenergic receptor. Ann.N.Y.Acad.Sci., 139: 703-722, 1967.

- SCHOLNICK, P.; LANG, D. and RACKER, E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. IX. Stimulation of aerobic glycolysis by energy-linked ion transport and inhibition by dextran sulfate. J.Biol.Chem., 248: 5175-5182, 1973
- SCHWERT, G.W.; MILLAR, D.B.S. and TAKENAKA, Y. Preparation of crystalline lactic dehydrogenase from beef heart. J.Biol.Chem., 237: 2131-2134, 1962.
- SEERY, V.L.; FISCHER, E.H. and TELLER, D.C. A reinvestigation of the molecular weight of glycogen phosphorylase. Biochemistry, 6: 3315-3327, 1967.
- SEGAL, S. and BLAIR, A. Effect of salicylate on muscle phosphorylase. Nature, 4675:1609-1610, 1959.
- SUTHERLAND, E.W. and RALL, T.W. The relation of adenosine 3'-5'-phosphate and phosphorylase to the action of catecholamines and other hormones. Pharmacol.Rev., 12: 265-299, 1960.
- THER, L. und MUELLER, M. Kinetik der Glycogen phosphorylierung bei neben Niereninsulffizienz und Dinitrophenol vergiftung. In: Arch.Exp.Path.U.Pharmacol., 209: 194-203, 1950.
- WALSH, D.A.; PERKINS, J.P. and KREBS, E.G. An adenosine 3'-5'-monophosphate dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. J.Biol.Chem., 243: 3763-3765, 1968.
- WOLLENBERGER, A. and KRAUSE, E.G. Metabolic control characteristics of the acutely ischemic myocardium. Am.J.Cardiol. 22: 349-359, 1968.
- _____; _____ and HEIER, G. Stimulation of 3'-5'-cyclic AMP formation in dog myocardium following arrest of blood flow. Biochem.Biophys.Res.Comm., 36: 664-670, 1969.