SECRETARIA DE PÓS GRADUAÇÃO

NADJA CRISTHINA DE SOUZA PINTO

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Nadja Cristhina de Souza Pinto
e aprovada pela Comissão Julgadora.

12/02/93

ENVOLVIMENTO DO CÁLCIO NO MECANISMO DE CITOTOXICIDADE DO PRÓ-OXIDANTE TETRAHIDROXIBENZOQUINONA (THQ)

ORIENTADOR : *Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann*

CO-ORIENTADOR : *Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi*

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Bioquimica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, para obtenção do Titulo de Mestre em Ciências.

CAMPINAS - 1993

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

P658e
I8960/BC

Ao meu pai e a minha mãe

"Foi no nosso tempo que a Biologia perdeu sua inocência multissecular. Dantes, ela contava os segmentos dos artrópodes e as inflorescências das fanerogâmas. Descrevia a anatomia e fisiologia dos corpos, mas estava inocente da maldade dos espíritos.

Mas um dia, começou a entrar na pele dos seres vivos, a estudar a química das sensações e a dissecar as moléculas da hereditariedade. Descobriu que, desde o primeiro átomo de hidrogênio até a mente humana, toda a universal diverssidade é trespassada por um fio de unidade elementar. Através dele, foi penetrando no mundo do pensamento, e acabou por se ver envolvida nos problemas sociais, filosóficos, religiosos e políticos dos homens.

De inocente, a Biologia passou a ser considerada responsável por boa parte dos caminhos que trilha nossa civilização."

Luis J. Archer

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann, pela orientação, pela oportuidade de pertencer ao seu grupo de pesquisa, pela amizade e por tudo que me ensinou neste período, significando um exemplo de pesquisadora e docente.

Ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi, pela co-orientação, pela oportunidade de poder ter realizado parte deste trabalho em seu laboratório, pela amizade e pelas enriquecedoras discussões.

Às Profas. Dras. Nilce Correa Meireles, Marcela Haun e Satie Ogo, pelas colobarações na banca prévia deste trabalho.

Ao Luis, por ter me suportado na pior fase da realização deste trabalho.

À Claudia, Dona Maria Alice, Ana e Daniel, por todas as colaborações e companheirismo na rotina do nosso laboratório.

À todos do Depto. de Bioquímica, por toda a ajuda prestada diariamente.

À Si, Cris, Tchela, Marianne, Lole, Maria Rosa, Vanira e todos os outros amigos que sempre me deram tanta força. Agradecimentos especiais à Stela, pela revisão ortográfica desta

dissertação; e a Grasiela pela ajuda na montagem final da tese.

À CAPES e ao FAEP, pelos auxílios concedidos.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO . . . . . 1 - 9

1. Objetivos . . . . . 9 - 10

2. Estresse oxidativo e citotoxicidade . . . . . 10 - 14

3. Quinonas e citotoxicidade . . . . . 14 - 15

4. Cálcio e citotoxicidade . . . . . 16 - 18

4. Danos mitocondriais induzidos por EAO e Ca^{2+} . . . . . 18 - 20

II. MATERIAIS E MÉTODOS . . . . . 21 - 35

1. Reagentes e Soluções . . . . . 21 - 22

1.1 Reagentes 21- 22

1.2. Soluções Especiais . . . . . 23 - 24

2. Métodos . . . . . 25 - 35

2.1. Cultura de Células 25

2.2. Medida da taxa de proliferação celular . . . . . 25 - 26

2.3. Medida da concentrção intracelular de Ca^{2+} em células V79 . . . . . 26 - 28

2.4. Medida da formação de quebras de fita simples de DNA . . 28 - 30

2.5. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato (MFR) . . . . 30 - 31

2.6. Medida da captação de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de fígado de rato . . . . . 31 - 32

2.6.1. Determinação da captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de células V79 <u>in situ</u> . . . . . 32 - 33

2.7. Determinação do potencial elétrico de membrana de MFR . . . . . 33 - 35

III.RESULTADOS.....36 - 66
1. Estudo do mecanismo da ação tóxica da THQ para células V79 .....36 - 48
1.1. Determinação da citotoxicidade da THQ para células V79 .....36 - 37
1.2. Estudo do envolvimento do íon Ca^{2+} na citotoxicidade da THQ para células V79.....38 - 40
1.2.1. Estudo do efeito do quelante intracelular de Ca^{2+} FURA 2 na inibição da proliferação celular induzida pela THQ.....40 - 42
1.3. Estudo do envolvimento de espécies transientes geradas pela THQ na inibição da proliferação celular.....42 - 44
1.4. Estudo do envolvimento de EAO na inibição da proliferação celular induzida pela THQ.....44 - 48
2. Estudo da ação genotóxica da THQ para células V79.....48 - 51
2.1. Estudo do envolvimento do íon Ca^{2+} na formação de quebras de fita simples de DNA induzida pela THQ.....49 - 50
2.2. Estudo do reparo das quebras de fita simples de DNA induzidas por THQ e Ca^{2+}.....51
3. Estudo do efeito da THQ na concentração intracelular de Ca^{2+} em células V79.....51 - 53
4. Estudo da ação da THQ em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....53 - 63
4.1. Efeito da THQ na captação de Ca^{2+} por MFR.....55 - 56
4.2. Estudo do envolvimento de espécies transientes na ação de THQ sobre o $\Delta\Psi$ de MFR.....57 - 58
4.3. Estudo do envolvimento das EAO na ação da THQ sobre o $\Delta\Psi$ de MFR.....59 - 60

4.4. Estudo do envolvimento do íon Ca^{2+} no colapso de $\Delta\Psi$ induzido pela THQ em MFR.....61 - 63

5. Estudo da ação da THQ sobre mitocôndrias de células V79 *in situ*.....64 - 66

IV. DISCUSSÃO.....67 - 79

V. SUMÁRIO.....80

VI. SUMMARY.....81

VII. BIBLIOGRAFIA.....82 - 95

I.INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é um estado originalmente definido por SIES, 1985, como um desbalanço entre espécies pró-oxidantes e anti-oxidantes, em favor das primeiras. Neste estado, a geração de espécies oxidantes excede a capacidade de defesa das células, o que torna as estruturas celulares acessíveis ao ataque oxidativo. Atualmente vários processos patológicos e degenerativos têm sua etiologia associada a uma condição de estresse oxidativo, como o câncer (CERUTTI, 1985), o envelhecimento (HARMAN, 1981), o processo inflamatório (FLOHÉ, 1985), as lesões decorrentes de hiperoxia (JAMIESON, 1989), as lesões pós-isquêmicas (SIMPSON e col, 1987) e a toxicidade de drogas como as quinonas (POWIS, 1989). Em decorrência do envolvimento do estresse oxidativo nestes vários processos, existe atualmente um grande interesse em relação aos mecanismos moleculares operantes na citotoxicidade induzida por espécies pró-oxidantes.

As espécies pró-oxidantes são moléculas ou átomos que necessitam receber elétrons para se estabilizarem e por isso atacam outras moléculas, abstraindo um ou mais elétrons destas últimas. Elas são normalmente espécies radicalares, que possuem um elétron desemparelhado no último orbital molecular. As principais espécies oxidantes de importância biológica são derivadas do oxigênio molecular, às quais se denomina Espécies Ativadas de

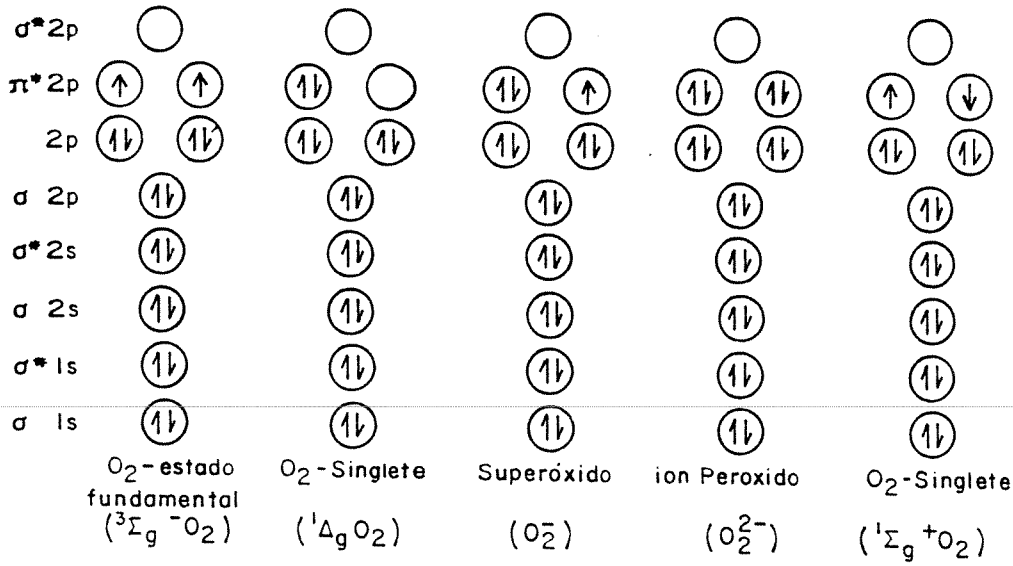
Oxigênio (EAO) (SIES, 1985). Além destas, outros radicais - como os centrados em carbono ou enxofre - podem induzir a formação de lesões em estruturas biológicas (HALLIWELL e GUTERIDGE, 1989).

As principais EAO são os radicais superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroxila ($HO^{\cdot}$), alquóxi ($RO^{\cdot}$), peróxi ($ROO^{\cdot}$) e a configuração sigma do oxigênio singlete ($^1\Sigma g^+ O_2$). Também estão aí incluídos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os peróxidos orgânicos (ROOH) e a configuração delta do oxigênio singlete ($^1\Delta gO_2$), que não são espécies radicalares mas possuem característica de pró-oxidante (SIES, 1985).

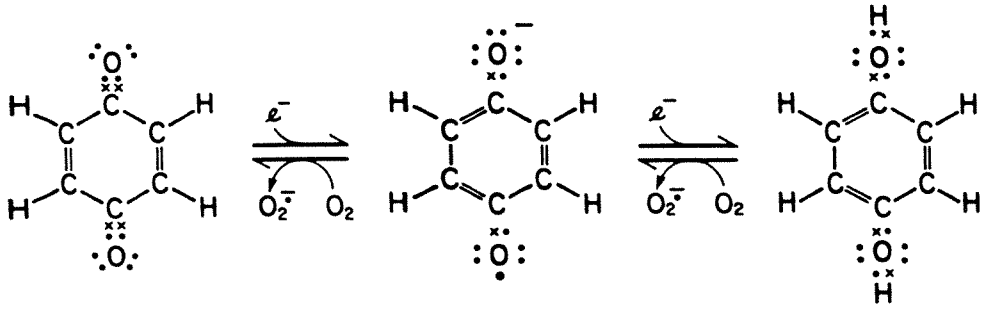
O oxigênio molecular possue em seu estado fundamental triplete dois elétrons desemparelhados no último orbital molecular, que apresentam mesmo número quântico de spin. Esta configuração eletrônica dificulta a redução direta desta molécula pelo recebimento de um par de elétrons, uma vez que ambos deveriam ter mesmo número de spin, uma configuração relativamente rara naturalmente. Desta forma o oxigênio molecular é reduzido preferencialmente em passos monoeletrônicos, com espécies paramagnéticas, espécies doadoras de elétrons, com a luz ou com metais de transição (GREEN e HILL, 1985). As reduções monoeletrônicas do O_2 formam EAO de acordo com o seguinte esquema (MENGHIHI, 1988):

$$O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^{\cdot -} \xrightarrow{e^-} H_2O_2 \xrightarrow{e^-} OH^{\cdot} \xrightarrow{e^-} H_2O$$
$$OH^-$$

As configurações eletrônicas do oxigênio molecular e das principais EAO são apresentadas no esquema abaixo (NAQUI e col, 1986) :



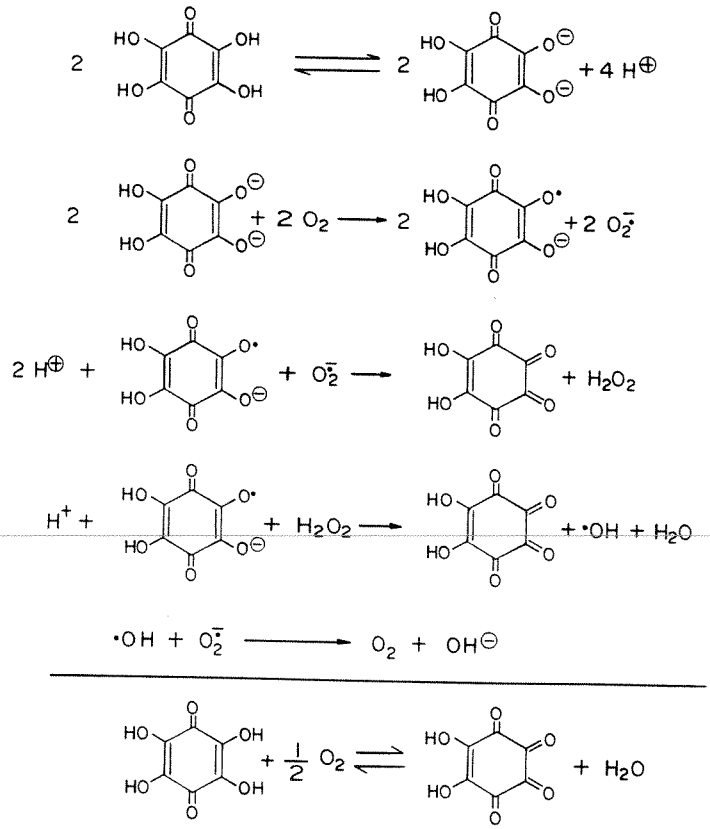
Dentre as várias classes de compostos químicos com características pró-oxidantes estão as quinonas. Estas moléculas são dicetonas cíclicas, contendo um ou mais anéis (BRUNMARK e CADENAS, 1989) (Estrutura I do esquema abaixo). As quinonas são largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas também em poluentes ambientais como as fumaças do cigarro e da combustão do petróleo (POWIS, 1987). Entretanto, o grande interesse biológico destas moléculas decorre do fato delas representarem o segundo maior grupo de compostos químicos aprovados para uso clínico como quimioterápicos (POWIS, 1989).



I II III

As quinonas sofrem facilmente reações de transferência de elétrons, em passos mono ou bieletrônicos que formam respectivamente um radical semiquinona ou uma hidroquinona (Estruturas II e III do esquema acima). O radical semiquinona pode ser rapidamente atacado pelo oxigênio molecular, que recebe um elétron desta espécie formando o radical ânion superóxido. Desta forma, a redução de uma quinona ao radical semiquinona e sua subseqüente oxidação à quinona parental produzem EAO, num mecanismo conhecido como ciclo redox, que consiste no ciclo de oxidação-redução não estequiométrico com transferência de elétrons para o oxigênio molecular. Esta propriedade química de realizar ciclos de oxidação-redução está relacionada tanto às funções fisiológicas quanto à processos não fisiológicos, e conseqüentemente tóxicos, induzidos por estas moléculas (NOHL e col, 1986). O ciclo redox da benzoquinona - uma quinona derivada do benzeno - é apresentado no esquema acima (SMITH e col, 1985).

A tetrahidroxibenzoquinona (THQ), ou 2,3,5,6-tetrahidroxi-2,5-ciclohexadieno- 1,4-diona, é uma quinona derivada da benzoquinona que possue quatro hidroxilas substituintes nas posições 2,3,5 e 6 do anel. FLAIG e col (1968) sugerem que os grupos OH substituintes afetam a estrutura de ressonância dos compostos quinóides, facilitando as reações de transferência de elétrons. Desta forma, a THQ é uma quinona particular que sofre auto-oxidação em condições fisiológicas pela transferência de elétrons para o oxigênio molecular (HOFFMANN e col, 1987). A produção de EAO pela THQ ocorre diretamente pela oxidação da hidroxiquinona a radical semiquinona, e deste a ácido rodizônico, sem a participação de redutores endógenos, como geralmente requerido para outras quinonas (BRUNMARK e CADENAS, 1989). Esta propriedade, aliada ao fato de a THQ ser uma molécula pequena, relativamente solúvel, que parece não sofrer barreiras de permeabilidade, uma vez que atravessa livremente a parede celular e a membrana plasmática de leveduras (SERIS e BRU, 1962), justificam sua utilização como modelo para estudos do mecanismo citotóxico das quinonas e do estresse oxidativo. O esquema a seguir apresenta o mecanismo de auto-oxidação da THQ (HOFFMANN e col, 1987).



Em solução aquosa, a THQ auto-oxida imediatamente após a dissolução, com o desaparecimento do seu pico característico de absorbância (307 nm) e o aparecimento do pico característico do ácido rodizônico (RDZ) - o primeiro produto de oxidação da THQ - na região de 480 nm (RETORI e HOFFMANN, dados não publicados). É detectada também, na solução a presença do radical semiquinona, do peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila (HOFFMANN e col, 1987). Desta forma, esta quinona funciona como geradora de um surto de EAO, formadas durante sua auto-oxidação. Além deste surto inicial, o ácido rodizônico pode continuar a produção de EAO por um mecanismo tipo ciclo redox, como demonstrado acima.

Nosso laboratório já vem estudando há algum tempo o mecanismo citotóxico da THQ para células de mamíferos como modelo de estresse oxidativo. Sua ação citotóxica foi relacionada às EAO produzidas durante sua auto-oxidação, uma vez que a citotoxicidade da THQ para linfócitos humanos é dependente de peróxido de hidrogênio (HOFFMANN e col,1984). Em adição a isto, ARéVALO, 1990, demonstrou a ação genotóxica desta quinona para fibroblastos em cultura, evidenciando uma ação inibitória sobre a replicação semiconservativa do DNA, num mecanismo dependente de peróxido de hidrogênio, onde o radical hidroxila representa a espécie oxidante crítica. Esta autora também demonstrou a formação de quebras de fitas simples de DNA em células expostas a altas concentrações de THQ.

Quanto ao mecanismo molecular da genotoxicidade da THQ, a cinética de desaparecimento do efeito inibitório sobre a replicação do DNA de soluções estocadas de THQ, aliada a detecção do radical semiquinona na solução e a ausência de efeito protetor por quelantes de ferro sugerem a participação do radical semiquinona na redução homolítica do peróxido de hidrogênio a radical hidroxila, e conseqüentemente no mecanismo genotóxico desta quinona (ARéVALO, 1990).

Evidências recentes da literatura (NICOTERA e col, 1992; CANTONI e col, 1989; NICOTERA e col, 1988) têm apresentado um novo enfoque para a citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo. Segundo esta nova hipótese, o desenvolvimento das alterações funcionais e estruturais relacionadas à citotoxicidade de

pró-oxidantes está associado a distúrbios na concentração citosólica de cálcio livre, e não apenas ao ataque direto das EAO a biomoléculas.

Inicialmente, SCHANNE e col, 1979, demonstraram que a morte celular induzida por vários agentes químicos era dependente da presença de Ca^{2+} no meio extracelular, o que levou à proposição de que este íon devesse desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento das alterações estruturais e funcionais relacionadas à morte celular (CAMPBELL, 1983). Atualmente, fortes evidências associam um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} ao desenvolvimento de vários processos tóxicos, entre eles a citotoxicidade de quinonas, como revisado por NICOTERA (NICOTERA e col, 1992).

NICOTERA e col, 1988 encontraram uma correlação entre o aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} e a citotoxicidade da menadiona - uma naftoquinona que gera estresse oxidativo - para hepatócitos. Em adição a isto, CANTONI e col, 1989, preveniram a ação tóxica de peróxido de hidrogênio para fibroblastos com a utilização do quelante intracelular de Ca^{2+} 2-[(2-bis-[carboximetil] amino-5-metilfenoxi) -metil]-6-metoxi-8-bis [carboximetil] aminoquinolina (QUIN 2). Estes resultados levaram à proposição deste novo enfoque para o mecanismo citotóxico de espécies pró-oxidantes, que propõe que o estresse oxidativo provoca um aumento não fisiológico na concentração intracelular de Ca^{2+}, o que funciona como sinal para a ativação de processos enzimáticos catabólicos dependentes de

Ca^{2+} (ORRENIUS e col, 1989).

A mitocôndria é uma organela fundamental no metabolismo celular, sendo a responsável pelo equilíbrio energético da célula e o sítio onde ocorrem a maioria das reações de transferência de elétrons intracelulares. Já há algum tempo, LEHNINGER e col, 1978, demonstraram que algumas funções mitocondriais, como a liberação de Ca^{2+}, eram controladas pelo estado redox dos nucleotídeos de piridina intramitocondriais. Posteriormente, foi demonstrado que a presença de Ca^{2+} e pró-oxidantes exerce um efeito tóxico sobre mitocôndrias isoladas, com várias consequências estruturais e funcionais como queda do potencial de membrana, liberação de Ca^{2+} para o meio extramitocondrial, aumento do volume mitocondrial e da velocidade de consumo de oxigênio (VERCESI e col, 1989).

As alterações mitocondriais induzidas por Ca^{2+} e pró-oxidantes foram observadas também em mitocôndrias de células expostas ao oxidante terc-butil hidroperóxido, o que levou MASAKI e col, 1989, a sugerirem que a mitocôndria representa um alvo celular crítico na morte de hepatócitos isolados expostos a este agente.

1. OBJETIVOS

Dentro do contexto apresentado acima interessou-nos avaliar o envolvimento do íon Ca^{2+} na citotoxicidade induzida por pró-oxidantes, utilizando a exposição de células de mamíferos a

THQ como modelo de uma situação de estresse oxidativo. Nós objetivamos investigar a participação do íon Ca^{2+} e das EAO nos efeitos deletérios da THQ para fibroblastos V79 em cultura.

Este estudo foi realizado utilizando as seguintes abordagens:

1. Determinação do efeito citotóxico da THQ para fibroblastos V79. Análise da inibição da proliferação celular e do papel do cálcio e das EAO neste processo.

2. Determinação do efeito da THQ sobre a integridade estrutural do DNA de células V79. Análise da fragmentação do DNA e do envolvimento do cálcio neste processo. Determinação da capacidade celular de reparo de quebras de DNA.

3. Determinação da concentração intracelular de Ca^{2+} livre em células V79. Comprovação da capacidade da THQ em aumentar a $[Ca^{2+}]$ intracelular.

4. Determinação da capacidade da THQ em produzir alterações estruturais e funcionais ao nível das mitocôndrias. Análise dos seus efeitos sobre funções mitocondriais, como o transporte de cálcio pela membrana mitocondrial interna e a capacidade da mitocôndria em construir e manter um potencial elétrico transmembrânico em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e em mitocôndrias de células V79 <u>in situ</u>. Análise da participação das EAO e do cálcio nestes processos.

2. ESTRESSE OXIDATIVO E CITOTOXICIDADE

As EAO passaram a despertar interesse na área biológica a

partir do final da década de 50, quando foi evidenciada a potencialização dos efeitos tóxicos da radiação ionizante pelo oxigênio molecular. No entanto, foi a descoberta da enzima superóxido dismutase, no final da década de 60 (McCORD e FRIDOVICH, 1969), que demonstrou que as EAO devem desempenhar um papel relevante no metabolismo normal, criando então um interesse na investigação da participação destas espécies em processos patológicos e fisiológicos.

O radical ânion superóxido é, normalmente, a primeira EAO gerada em sistemas biológicos, mas sua produção pode levar à formação de peróxido de hidrogênio, num mecanismo de dismutação, que em condições fisiológicas é catalisado pela enzima superóxido dismutase (1).

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad (1)$$

O radical superóxido pode também reagir com o peróxido de hidrogênio, o que leva à cisão homolítica deste com produção de radical hidroxila. Esta reação é conhecida como reação de HABER-WEISS (2).

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \longrightarrow HO^{\cdot} + OH^- + O_2 \qquad (2)$$

A cisão homolítica do peróxido de hidrogênio pela reação com radical superóxido, apesar de termodinamicamente possível, é cineticamente muito lenta. Em sistemas biológicos a produção do radical hidroxila por este mecanismo envolve a catálise por

metais de transição como o ferro e o cobre (HALLIWELL, 1978) numa reação conhecida como reação de Fenton (4). Neste sistema, o radical superóxido participa como redutor de Fe^{3+}, regenerando o Fe^{2+} consumido na reação (3).

$$O_2^{\cdot -} + Fe^{3+} \text{ ------} \rangle Fe^{2+} + O_2 \qquad (3)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \text{ -------} \rangle HO^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+} \qquad (4)$$

Em sistemas biológicos as EAO podem ser formadas durante o metabolismo de xenobiontes, pela atividade de algumas enzimas como a xantina oxidase e a NADPH oxidase, ou por um desvio de elétrons da cadeia respiratória (BOVERIS e col, 1972).

A citotoxicidade das EAO está relacionada a sua alta reatividade com biomoléculas. Enquanto o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio são considerados oxidantes fracos, o radical hidroxila é um oxidante forte, reagindo numa distância de 1 a 5 diâmetros moleculares de seu local de formação (PRYOR, 1986). Esta propriedade levou à proposição de que a produção desta espécie seja o evento crítico da toxicidade do estresse oxidativo (JAMIESON, 1986).

O DNA constitui um alvo celular fundamental ao ataque das EAO, principalmente do radical hidroxila (PRYOR, 1988). Este ataque pode produzir extensivos danos nesta molécula, que incluem a formação de quebras de fita simples (HOFFMANN e MENEGHINI, 1979), a formação de bases modificadas (SHULTE-FROHLIND e VON SONTAG, 1985) e a formação de adutos de bases com pró-oxidantes;

que podem, como evento final, produzir mutação e câncer (CERUTTI, 1985).

Além da formação de danos no DNA, o estresse oxidativo induz uma série de outros eventos moleculares relacionados com a citotoxicidade e a morte celular, como alterações no citoesqueleto com conseqüente formação de "blebs" (MIRABELA e col, 1989), depleção de metabólitos como o ATP (HALLECK e col, 1992) e a glutationa (REED, 1990), e também lipoperoxidação, que causa a perda funcional das membranas biológicas (KAPPUS, 1985) e a produção de intermediários tóxicos, principalmente com ação genotóxica (PARK e FLOYD, 1992).

Em função de estarem constantemente expostos a níveis basais de EAO, os organismo vivos desenvolveram sistemas de proteção contra estas espécies. Estes mecanismos podem ser tanto enzimáticos quanto não enzimáticos. Os mecanismos anti-oxidantes não enzimáticos são constituídos por pequenas moléculas com a característica de reagirem com espécies radicalares inativando-as, ou também proteínas que quelam metais de transição impedindo-os de participarem de reações redox (SIES, 1985).

Os mecanismos anti-oxidantes enzimáticos envolvem, além da superóxido dismutase, a catalase que degrada peróxido de hidrogênio (5); a glutationa peroxidase que degrada peróxidos orgânicos usando glutationa (GSH) - um tripeptídeo contendo enxofre - como poder redutor (6); a glutationa redutase que mantém o nível de glutationa reduzido (7) (SIES, 1985); e a DT-diaforase,

que catalisa a redução bieletrônica das quinonas, impedindo a ocorrência de ciclo redox (POWIS, 1987).

$$H_2O_2 + 2\ H^+ \xrightarrow{CAT} 2\ H_2O \qquad (5)$$

$$ROOH + 2\ GSH \xrightarrow{GSHpx} ROH + H_2O + 2\ GSSG \qquad (6)$$

$$GSSG + NADPH_2 \longrightarrow 2\ GSH + NADP^+ \qquad (7)$$

3. QUINONAS E CITOTOXICIDADE

A toxicidade das quinonas está diretamente relacionada às suas propriedades químicas, como sua característica de realizar reações de transferência de elétrons, como citado anteriormente. Em condições fisiológicas, estas reações ocorrem normalmente catalizadas por flavoproteínas, por reações com centros nucleofílicos ou espécies radicalares. A sequência de reações envolvidas na produção de EAO pelas quinonas é mostrada a seguir (8 a 12) (POWIS, 1989).

$$NADH + E\text{-}flav + H^+ \longrightarrow NAD^+ + E\text{-}flavH_2 \qquad (8)$$

$$E\text{-}flavH_2 + Q \longrightarrow E\text{-}flavH^{\cdot} + HQ^{\cdot} \qquad (9)$$

$$HQ^{\cdot} + O_2 \longrightarrow Q + O_2^{\cdot -} + H^+ \qquad (10)$$

$$HQ^{\cdot} + O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \longrightarrow Q + H_2O_2 \qquad (11)$$

$$HQ^{\cdot} + H_2O_2 \longrightarrow Q + HO^{\cdot} + OH^- \qquad (12)$$

A reação 12 é conhecida como reação de Fenton orgânica, e foi

evidenciada como produtora do radical hidroxila no mecanismo tóxico do herbicida paraquat (WINTERBOURN, 1981), e na produção deste radical pela mitocôndria (NOHL e JORAN, 1987).

Além de reações de transferência de elétrons, as quinonas podem também sofrer reações de adição a centros nucleofílicos, caracterizadas como adições 1,4-redutivas formando adutos de hidroquinona, que podem ser oxidados a adutos de quinona. Em condições fisiológicas, as quinonas podem formar adutos com nucleófilos de oxigênio, nitrogênio ou enxofre, o que lhes confere a propriedade de efetuar adições com vários tipos de biomoléculas. Neste sentido, a toxicidade de algumas quinonas está diretamente relacionada a sua capacidade de alquilar componentes intracelulares (O'BRIEN, 1991).

É provável que durante o desenvolvimento do fenômeno de toxicidade das quinonas, mais de um mecanismo dos citados acima esteja operando, colaborando de maneira mais ou menos efetiva para induzir a formação de danos celulares. No entanto, parece haver uma correlação entre o potencial de oxido-redução do par quinona/semiquinona e a indução preferencial de um tipo de mecanismo tóxico, de tal maneira que se observa que quanto menor o potencial redox de uma quinona, mais favorecida está a formação de EAO por esta quinona (O'BRIEN, 1991) e, conseqüentemente, o ataque oxidativo às estruturas celulares em detrimento a alquilação de alvos celulares.

4. CÁLCIO E CITOTOXICIDADE

O íon Ca^{2+} desempenha um papel relevante no metabolismo normal, atuando como mensageiro intracelular que traduz informações vindas do meio extracelular. Associado a este aspecto, existe um alto gradiente de concentração de Ca^{2+} entre o meio interior e o meio exterior das células, com concentrações normalmente da ordem de 10^{-7} M para o interior, e 10^{-3} M para o exterior. Desta forma, a inativação dos mecanismos que mantêm este gradiente provoca um intenso aumento da concentração intracelular deste íon.

A concentração intracelular de Ca^{2+} livre é controlada por vários mecanismos de transporte, que atuam tanto transportando este íon para o exterior da célula, quanto compartimentalizando-o em algumas organelas celulares. O Ca^{2+} entra na célula a favor do gradiente de concentração, e é liberado por dois transportadores independentes daqueles de aporte, um trocador Na^{+}/Ca^{2+} e uma Ca^{2+} ATPase (CARAFOLI, 1987).

No interior das células este íon é compartimentalizado tanto na mitocôndria quanto no retículo endoplasmático. Na mitocôndria o Ca^{2+} entra em resposta ao potencial elétrico negativo criado pela cadeia transportadora de elétrons e é liberado por um transportador tipo "antiporter", que pode trocar Ca^{2+} por Na^{+} ou por prótons. Várias evidências indicam que em condições fisiológicas o Ca^{2+} cicla através da membrana interna da mitocôndria (CARAFOLI, 1987). Entretanto, a mitocôndria acumula

pouco Ca^{2+} em condições fisiológicas.

Por sua vez, o retículo endoplasmático capta Ca^{2+} ativamente, através de uma Ca^{2+} ATPase, com alta afinidade e alta capacidade de transporte. THOR e col, 1985, sugerem que a atividade desta enzima é dependente do estado reduzido de grupos SH presentes em seu sítio ativo. Esta organela é considerada o principal sítio de acúmulo de Ca^{2+}, sendo fundamental na manutenção da homeostase intracelular deste íon (CARAFOLI, 1987).

Estudos recentes mostram que também o envelope nuclear possui uma Ca^{2+} ATPase que capta este íon ativamente, sugerindo a existência de um sistema próprio de controle da homeostase intranuclear de Ca^{2+} (NICOTERA e col, 1992).

A hipótese que relaciona a citotoxicidade de pró-oxidantes a um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} propõe que as EAO atuam diretamente sobre os mecanismos de controle da homeostase deste íon. Como conseqüência, o aumento da concentração deste íon no citosol ativa várias enzimas, como proteases, fosfolipases e endonucleases, as quais seriam as responsáveis finais pela formação de lesões nas estruturas celulares (ORRENIUS e col, 1989).

Neste sentido, McCONKEY e col, 1989, demonstraram que a fragmentação do DNA em hepatócitos expostos a menadiona foi prevenida por um agente que inibe a atividade de uma endonuclease dependente de Ca^{2+}. Em adição a isto, CANTONI e col, 1989,

preveniram a fragmentação do DNA de fibroblastos expostos a peróxido de hidrogênio com o quelante de Ca^{2+} QUIN 2. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} parece estar, ainda, associado a formação de lesões nas mitocôndrias, com conseqüente desbalanço energético nas células (HOLMSEN e ROBKIN, 1977)), como será discutido no ítem 5.

Quanto ao mecanismo pelo qual o estresse oxidativo provoca um aumento na concentração citosólica de Ca^{2+}, ORRENIUS e col, 1989, propõe que as EAO oxidam grupos SH essenciais das proteínas envolvidas no controle da homeostase deste íon. Com isto, estas proteínas são inativadas e o Ca^{2+} se acumúla no citosol. Estes autores sugerem ainda que este aumento pode ser causado apenas pela liberação deste íon dos reservatórios intracelulares, principalmente do retículo endoplasmático, sem a necessidade do aporte de Ca^{2+} do meio extracelular.

5. *ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS INDUZIDAS POR EAO E* Ca^{2+}

A permeabilização de mitocôndrias isoladas por Ca^{2+} e pró-oxidantes é um evento descrito a longo tempo (LEHNINGER e col, 1978), que entretanto ainda desperta grande controvérsia quanto aos mecanismos moleculares envolvidos neste processo. Vários grupos tem apresentado diferentes hipóteses mecanísticas, que envolvem a ADP-ribosilação de proteínas da membrana mitocondrial (FREI e col, 1988), a estimulação da fosfolipase A_2 com acúmulo de lisofosfolipídeos (BEATRICE e col, 1984), a ocorrência de

lipoperoxidação com desarranjo da membrana mitocondrial interna (CARBONERA e AZZONE, 1988), a abertura de um poro protéico não específico (CROMPTON e COSTI, 1988), e a produção de danos inespecíficos na membrana pela formação de pontes dissulfeto entre proteínas vizinhas (FAGIAN e col, 1990).

Neste contexto, a hipótese apresentada pelo grupo de VERCESI foi a primeira a relacionar diretamente a permeabilização mitocondrial com a ação das EAO, através da oxidação de grupos SH de proteínas (FAGIAN e col, 1990). Comprovando esta hipótese, VALLE, 1992, demonstrou que este processo é dependente de peróxido de hidrogênio, uma vez que a permeabilização de mitocôndrias isoladas expostas a oxidantes de grupos SH como terc-butil hidroperóxido ou diamida é prevenida pela adição de catalase.

Além de provocar a permeabilização da membrana mitocondrial interna, a presença de Ca^{2+} e pró-oxidantes causa uma severa queda nos níveis intramitocondriais de glutationa (HALLBERG e RYDSTRON, 1989). Os autores sugerem que este evento desempenha um papel significativo na formação de lesões mitocondriais, uma vez que esta molécula é a responsável pela manutenção do estado reduzido dos grupos SH de proteínas da membrana mitocondrial.

CHACON e ACOSTA, 1991, sugerem que o fluxo de Ca^{2+} pela membrana mitocôndrial interna induzido por pró-oxidantes estimula a produção de EAO por esta organela, colaborando para a citotoxicidade de agentes que permeabilizam a membrana mitocondrial interna. Estes autores preveniram a ação tóxica da

doxorubicina - uma antraquinona - com vermelho de rutênio, um agente que impede o aporte de Ca^{2+} para a matrix mitocondrial.

A correlação entre alterações mitocondriais e a citotoxicidade de moléculas que geram um estresse oxidativo ainda é controversa. Entretanto, trabalhos recentes (HALLECK e col, 1992) indicam a queda nos níveis endógenos de ATP, causada pela perda funcional da mitocôndria como o evento crítico na citotoxicidade do peróxido de hidrogênio.

II.MATERIAIS E MÉTODOS

1. *REAGENTES E SOLUÇÕES*

1.1. REAGENTES

Os reagentes utilizados possuem grau de pureza analítico (PA)

- Reagentes obtidos da Sigma :

Catalase de Fígado Bovino (CAT) 20000 U/mg

Digitonina

EDTA, sal dissódico do ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA, ácido [etileno bis(oxietilenonitrilo)] tetra-acético

Glutationa, forma reduzida

Hepes, ácido 4-(2-hidroxietil) aminometano

NaH_2PO_4, fosfato dibásico de sódio

Peroxidase de Rabanete (HRP), tipo IV

MOPS, ácido 3-[N-Morfolino]propenesulfônico

Rotenona

SDS, lauril sulfato de sódio

Succinato, sal dipotássico

Superóxido Dismutase (SOD) 3100 U/mg

Tetrahidroxi 1,4-benzoquinona

TRIS, (hidroximetil)aminometano

Triton X-100

- Reagentes obtidos da Merck :

$CaCl_2$, cloreto de cálcio

DMSO, dimetilsulfóxido

oFenantrolina (1, 10 - orto - Fenantrolina)

Glicose

HCl, ácido clorídrico

KCl, cloreto de potássio

KI, iodeto de potássio

- Reagentes obtidos da Reagen :

$MgCl_2$, cloreto de magnésio

NaOH, hidróxido de sódio

Sacarose

NaCl, cloreto de sódio

TCA, ácido tricloroacético

- Os seguintes reagentes foram obtidos das seguintes firmas : FURA 2-AM da Calbiochem; KH_2PO_4, fosfato dibásico de potássio da Carlo Erba; SFB, soro fetal bovino, da Cultilab; Tripsina (1:250) da Difco; H^3-Tdr, timidina tritiada, 82,2 Ci/mmol da DuPont; H_2O_2, peróxido de hidrogênio da Ecibra; DMEM, meio de Eagle modificado por Dulbecco, da Flow; Solução de Penicilina/Streptomicina da Laborclin; Instagel da United Technologies Packard; TPP, tetrafenilfosfônio, da Aldrich.

1.2. SOLUÇÕES ESPECIAIS :

-Meio de Eagle modificado por Dulbecco : a mistura comercial (pó) foi dissolvida em volume adequado de água deionizada, à qual foi adicionado 14,3 mM de $NaHCO_3$ e a solução de antibióticos. Os meios preparados foram estereilizados por filtração e guardados em geladeira até a utilização. A adição do SFB foi realizada 48 horas antes da utilização e os meios incubados a 37 ^{o}C durante este período, para verificar possíveis contaminações.

-Tampão Salina Fosfato (PBS-A) : NaCl 137mM; KCl 26,8mM; Na_2HPO_4 8,1mM; KH_2PO_4 1,47mM; pH 7,2-7,4. PBS-Ca^{2+} = PBS-A + $CaCl_2$ 1mM.

-Solução Estoque de FURA 2-AM : a solução estoque de FURA 2-AM, na concentração de 2mM, foi preparada pela dissolução da droga em DMSO e estocada em freezer, protegida da luz, até o momento da utilização.

-Solução de H_2O_2 : a solução de H_2O_2 foi preparada por diluições sucessivas da solução comercial (cerca de 10M) em tampão apropriado, e estocada em geladeira. No momento da utilização, a concentração foi dosada, segundo o método de COTTON e DUNFORD, 1973, através de sua reação com o iodeto na presença de peroxidase. A formação de iodo molecular foi seguida espectroscopicamente a 353nm, adotando-se ε de 2,55 x 10^4 M^{-1} cm^{-1}.

-Solução de Tripsina : a solução de tripsina foi preparada pela dissolução em PBS-A, numa concentração de 0,1% (m/v) contendo 1mM de EDTA. As soluções foram estereilizadas por filtração e guardadas em freezer até o momento da utilização.

-Solução de Catalase : a solução de Catalase foi preparada imediatamente antes da utilização, por dissolução em tampão apropriado. A atividade de cada solução foi medida de acordo com o procedimento da Sigma Chemical Company, onde 1 U decompõe 1μM de H_2O_2 por minuto (pH 7,0, 25 ^{o}C), quando a concentração de peróxido cai de 10,3 para 9,2 μmol/ml na mistura de reação. Utilizou-se uma solução de H_2O_2 com A_{240}nm de aproximadamente 0,52. Após a adição da enzima, cronometrou-se o tempo de decréscimo da A_{240} de 0,45 para 0,40, o que corresponde à decomposição de 3,45 μmoles de H_2O_2.

-Todas as outras soluções foram preparadas no momento da utilização, pela dissolução dos compostos nos tampões especificados.

2. MÉTODOS

2.1. CULTURA DE CÉLULAS

Fibroblastos de pulmão de Hamster chinês, linhagem V79/M8, obtidos do laboratório do Prof. Rogério Meneghini, IQ, USP, foram cultivados em placas de Petri (10 cm Ø), em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 100 U/ml de penicilina, 100μg/ml de estreptomicina e 10% (v/v) de SFB.

As culturas, em estufa de CO_2, à temperatura de 37 ^{o}C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2, foram mantidas por subcultivos periódicos, descolando-se as células do substrato sólido pela adição de tripsina, e transferindo a suspensão de células para outra placa em menor densidade.

2.2. MEDIDA DA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A taxa de proliferação celular foi medida como o aumento da população celular em um período de 24 horas, durante a fase exponencial de crescimento subsequente ao tratamento com os agentes em teste.

Células V79 foram semeadas numa densidade de 3×10^4 células/poço, em placas de 24 poços (1,6 cm de Ø) Costar, e cultivadas por 44 horas, a 37 ^{o}C, em atmosfera umidificada de 5% de CO_2. Ao final deste, as células foram lavadas em PBS-A e foi

adicionado a cada poço 1 ml das soluções teste. O tratamento se processou por 30 minutos, a 37 ^{o}C, após o que as células foram lavadas três vezes com tampão. Seguiu-se uma incubação de 24 horas, 37^{o}C, em DMEM contendo 10% de SFB. Alternativamente, as células foram cultivadas durante 24 horas na presença dos compostos de interesse.

Ao final das 24 horas de crescimento, as células foram lavadas com tampão, fixadas com TCA (ácido tricloroacético) 5% e lisadas em 1 ml de NaOH 0,5 N. A população celular foi estimada através da medida da absorbância a 260 nm. Este parâmetro é um indicador da população celular, uma vez que a relação entre os valores de A_{260} e o número de células em um lisado descrevem uma função linear (GESZTESI, 1990).

A proliferação relativa da população celular no período de 24 horas foi calculada em função da diferença entre a população inicial e final (ΔA_{260}). A variação obtida para as células controle foi considerada 100% de proliferação e para as tratadas foi relativa ao aumento do controle. Os valores médios de ΔA_{260} foram de 0,5 unidades de absorbância para células controle. O índice de proliferação, que indica o número de duplicações da população durante o período de incubação, variou entre 2,5 e 3,5.

2.3. MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE Ca^{2+} EM CÉLULAS V79

A [Ca^{2+}] livre intracelular foi determinada pelo uso do

indicador específico de Ca^{2+} FURA 2 (GRYNKIEWICS e col, 1985) que muda seu espectro de excitação quando se liga a este íon. A forma livre de Ca^{2+} apresenta pico de emissão (em 510 nm) quando excitada a 380 nm, enquanto que a forma complexada com Ca^{2+} desloca o pico de excitação para 350 nm. As células foram carregadas com o acetóxi-metiléster de FURA 2 (FURA 2-AM), que não se liga ao íon Ca^{2+} e atravessa a membrana livremente. No interior das células o acetóxi-metiléster é hidrolizado por esterases endógenas, liberando o FURA 2, que é capaz de se ligar ao Ca^{2+}. Este complexo é quantizado fluorimetricamente.

Culturas semi-confluentes de células V79 (placas de 10 cm de 0) foram lavadas com tampão PBS-A e incubadas com o FURA 2-AM, em tampão de carregamento (A) contendo NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, $MgSO_4$ 0,8 mM, Glicose 5,5 mM, Hepes 50 mM pH 7,2, Sacarose 1,5 % e FURA 2-AM 3 μM. O carregamento se processou por 30 minutos, a 37 ^{o}C. Ao final destes, as células foram lavadas duas vezes com PBS-A e expostas a quinona. O tratamento com 0,5mM de THQ, dissolvida em PBS contendo ou não 1mM de Ca^{2+}, foi realizado a 37 ^{o}C, por 30 minutos. Ao final as células foram lavadas duas vezes com PBS-A.

Após o tratamento, uma suspensão das células foi preparada pela adição de tripsina e inativação com SFB. O precipitado celular obtido por centrifugação a 1000 g, 4 ^{o}C, 5 min, foi submetido a duas lavagens em tampão de leitura (tampão A, sem sacarose). A suspensão final foi preparada em tampão de leitura e o número de células foi estimado por contagem em Câmara de Neubauer, na presença de Azul de Tripano como indicador de

viabilidade celular. A viabilidade das culturas utilizadas variou entre 95 e 100%, tanto para placas controle como para placas tratadas.

Os espectros de excitação foram obtidos em espectrofluorímetro Aminco (modo "ratio"), com λ fixo de emissão de 510 nm, numa densidade de 10^6 células/ensaio de 2,5 ml. Calibrações internas para cada experimento foram realizadas para à obtenção dos valores de intensidade de fluorescência correspondentes a concentrações conhecidas de Ca^{2+}, em cada condição de ensaio. O espectro de fluorescência máxima foi obtido pela lise das células com digitonina 130μM. O espectro de fluorescência mínimo foi obtido pela adição de EGTA 1mM. As calibrações foram realizadas com microadições de $CaCl_2$ 0,1M, para obtermos as seguintes concentrações de Ca^{2+} na cubeta : 50, 100, 200, 300 e 500 nM.

2.4. MEDIDA DA FORMAÇÃO DE QUEBRAS DE FITA SIMPLES DE DNA

A formação de quebras de fita simples no DNA foi quantizada pela medida da precipitação diferencial de material isotopicamente marcado, segundo OLIVE, 1988. O DNA de alto peso molecular é precipitado em meio alcalino, juntamente com as nucleoproteínas, na presença de SDS e baixa força iônica, enquanto o DNA fragmentado é liberado no sobrenadante.

Células V79 foram semeadas numa densidade de 3 x

10^4células/poço, em placas de 24 poços (1,6 cm Ø) Costar e incubadas a 37°C, por 22 horas. A marcação isotópica com ^{3}H-Tdr (0,5 μCi/ml, 82,2 Ci/mmol) se processou por 20 horas, seguida de um período de recuperação de 2 horas, em meio fresco.

As células foram, então, lavadas com PBS-A e submetidas ao tratamento por 30 minutos, a 37 °C, ao final do que foram lavadas duas vezes com PBS-A gelado. A lise das células procedeu-se por um minuto, à temperatura ambiente, pela adição de 0,3 ml de um meio contendo 2% SDS, 10 mM EDTA, 10 mM Tris e 50 mM NaOH (pH 12,4) a cada poço. Os lisados foram transferidos para tubos Eppendorf contendo 0,3 ml de uma solução 0,12 M de KCl, em banho de gelo, e em seguida incubados em banho-maria a 65 °C por 10 minutos. A precipitação do complexo nucleoprotéico foi promovida pelo resfriamento dos tubos em banho de gelo.

O precipitado foi separado por centrifugação a 1500 g, a 4 °C, 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para frascos de contagem de cintilação contendo 0,2 ml de HCl 0,1 N e os precipitados suspensos em 0,8 ml de H_2O bidestilada a 65 °C. Após a solubilização destes, foram transferidos para frasco de contagem. A cada frasco foi adicionado 8 ml de Instagel para medida da radioatividade em contador de cintilação líquida da Beckman.

A percentagem de DNA fragmentado foi obtida através da seguinte equação :

$$\% \text{ DNA fragmentado} = \frac{\text{cpm sobrenadante} \times 100}{\text{cpm precipitado} + \text{cpm sobrenadante}}$$

2.5. *ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO (MFR)*

As mitocôndrias de fígado de rato (MFR) foram isoladas por centrifugações diferenciais do homogenado de fígado, segundo uma modificação do método de SCHNEIDER e HOGEBOOM (1950). Os animais utilizados foram ratos Wistar fêmeas, pesando entre 200-250g, mantidos em jejum por 12 horas e sacrificados por decapitação.

O fígado, retirado imediatamente após a morte do animal, foi submetido a duas lavagens em uma solução contendo sacarose 250mM, EGTA 0,5mM e Hepes 2,0mM pH 7,2. O material foi picado com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, os fragmentos suspensos no tampão de lavagem, em um volume correspondente ao dobro da massa e levados a um homogeinizador do tipo Potter-Elvehjem.

O sobrenadante obtido após duas centrifugações do homogenado a 800 g, 5 minutos, foi submetido a uma nova centrifugação a 12000g, por 10 minutos, 4^{o}C. O precipitado obtido desta separação foi suspenso em um tampão contendo sacarose 250mM, EGTA 0,3mM e Hepes 1,0mM pH 7,2, e submetido a nova centrifugação nas mesmas condições da anterior. O precipitado mitocondrial foi supenso em um tampão de sacarose 250mM, Hepes 1,0mM pH 7,2, num volume contendo aproximadamente 100mg de proteína mitocondrial por ml de suspensão final.

A dosagem da concentração de proteína da preparação mitocondrial foi realizada de acordo com o método do biureto (GORNALL e col, 1949), modificado pela adição de colato 1%. O padrão de concentração de proteína utilizado foi uma solução 1% de soro albumina bovina.

Todos os experimentos realizados com mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram repetidos com pelo menos duas preparações mitocondriais distintas.

2.6. DETERMINAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE Ca^{2+} POR MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

A captação de Ca^{2+} por MFR foi determinada seguindo-se a variação de Ca^{2+} livre no meio de incubação. Esta variação é medida usando-se um eletrodo seletivo (Calcium Selectrode F2112, Radiometer). Os sinais são amplificados através de um acessório de alta impedância (Incibrás) ligado a um registrador potenciométrico (Linear Inst. Corp.). A calibração do eletrodo em cada experimento foi realizada por adições sucessivas de EGTA 1mM, que produzem concentrações de Ca^{2+} livre entre 10 e 0,25 μM, considerando-se o Kd para o complexo Ca^{2+}-EGTA de $4,5 \times 10^{-6}$ M, a 30°C e pH 7,2.

Os experimentos foram realizados em cubeta apropriada, à temperatura de 28°C termostatizada, em 1 ml de um meio contendo sacarose 125 mM; KCl 65 mM; Hepes 3 mM (pH 7,2); $MgCl_2$ 1 mM; KH_2PO_4 1 mM e succinato 5 mM, sob agitação. Após a adição de uma

alíquota da solução estoque de THQ (dissolvida em meio de reação) as medidas foram iniciadas pela adição de uma alíquota da suspensão de mitocôndrias correspondente a concentração final de 1 mg/ml de proteína em cada ensaio. A incubação com a droga se processou pelo tempo de registro do experimento, 20 minutos.

2.6.1. DETERMINAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE Ca^{2+} POR MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS V79 in situ

Usando o mesmo sistema elétrico que para mitocôndrias isoladas, a captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de células V79 in situ foi medida pela variação da concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação, após a adição de digitonina, uma saponina que permeabiliza seletivamente a membrana plasmática sem afetar outros sistemas de membrana intracelulares, como o retículo e a mitocôndria (FISKUM e col, 1980).

As suspensões de células V79 foram preparadas pela adição de tripsina a placas confluentes e inativação com meio de cultura. A densidade celular foi estimada através da contagem do número de células em câmara de Neubauer, na presença de Azul de Tripano. Apenas suspensões com viabilidade superior a 90% foram utilizadas.

Desta preparação foi tomado um volume contendo 2×10^6 células, que foram sedimentadas por centrifugação a 1000 g, 5 minutos, e submetidas a duas lavagens em tampão contendo KCl 130 mM e Hepes 10 mM pH 7,2. O precipitado final de células foi

suspenso em 0,25ml de meio de reação contendo KCl 130mM, Hepes 10mM pH 7,2, $MgCl_2$ 2mM, KH_2PO_4 1mM, succinato de potássio 5mM, transferido para cubeta apropriada, a 28 ^oC termostatizada. As medidas da captação de Ca^{2+} foram iniciadas pela adição de 0,01% de digitonina.

O tratamento com THQ foi realizado pela suspensão direta do precipitado celular em uma solução da quinona dissolvida em meio de reação, durante o tempo de duração das medidas.

Alternativamente, culturas semi-confluentes de células V79 (placas de 10 cm de Ø) foram tratadas com THQ, enquanto aderidas ao substrato sólido. Para isto, as células foram lavadas duas vezes com PBS-A e expostas a soluções de THQ 0,5mM dissolvida em PBS-Ca^{2+}, por 30 minutos, ao final dos quais as culturas foram lavadas duas vezes com PBS-A.

A suspensão de células foi preparada pela adição de tripsina e inativação como SFB. Em seguida procedeu-se como descrito para células expostas a THQ em suspensão. As taxas de viabilidade celular variaram entre 95 e 100%.

2.7. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA DE MFR

O potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) de MFR foi determinado seguindo-se a distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP^+) através da membrana mitocondrial interna, utilizando-se um

eletrodo sensível ao TPP^+ construído no laboratório do Prof. Vercesi, segundo KAMO e col, 1979. Este eletrodo é preenchido internamente com uma solução de TPP^+ 10 mM. A diferença da força eletromotriz (E) entre o eletrodo e um eletrodo de referência é medida por um potenciômetro ligado a um registrador potenciométrico (Linear Inst. Corp.).

Os valores de $\Delta\Psi$ são calculados usando-se a equação:

$$\Delta\Psi = \frac{2,3\ RT\ \log (v)}{F} - \frac{2,3\ RT\ \log (10^{F\Delta E \backslash 2,3RT} - 1)}{F}$$

onde v, V e E representam, respectivamente, o volume mitocondrial, o volume do meio de reação e o potencial do eletrodo fornecido pelo gradiente de concentração de TPP^+ ($[TPP^+]_{in} \backslash [TPP^+]_{ex}$) através da membrana do mesmo. Os valores de ΔE em cada experimento são calculados pela equação:

$$\Delta E = \frac{2,3\ RT}{F} \log \frac{(TPP^+)in}{(TPP^+)ex}$$

onde $(TPP^+)_{ex}$ refere-se à concentração de TPP^+ no meio de reação. Os sinais do eletrodo são quantificados com o auxílio de uma curva de calibração construída com adições conhecidas de TPP^+ ao meio de reação. O volume mitocondrial considerado foi de 1,4 μl/mg de proteína para mitocôndrias de fígado.

Os experimentos foram realizados em cubeta apropriada, à

temperatura de 28°C termostatizada, em 1 ml de meio contendo sacarose 125 mM; KCl 65 mM; Hepes 3 mM pH 7,2; $MgCl_2$ 1 mM; KH_2PO_4 1 mM e rotenona 5 μM. O tratamento com a quinona foi realizado na própria cubeta de ensaio. Uma aliquota de THQ recém dissolvida (em meio de reação) correspondente a concentração final desejada foi adicionada a cubeta. Após 1 minuto, foi adicionada a suspensão mitocondrial numa concentração de proteínas de 1mg/ml de meio de reação, no ensaio. As medidas foram iniciadas pela adição de succinato 5mM, após 5 minutos de incubação.

III. RESULTADOS

1. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICA DA THQ PARA CÉLULAS V79

1.1. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA THQ PARA CÉLULAS V79

A partir do estabelecimento da ação tóxica da THQ para linfócitos humanos (HOFFMANN e col, 1984), interessou-nos avaliar o potencial citotóxico da THQ para fibroblastos de mamíferos em cultura. O parâmetro utilizado como indicador da citotoxicidade foi a medida da inibição da taxa de proliferação celular. Células em cultura apresentam curvas de crescimento características, com tempos de duplicação da população em fase exponencial de crescimento definidos para cada linhagem. Desta forma, variações no aumento do número de células na fase exponencial de crescimento de uma dada linhagem constituem um indicador de citotoxicidade.

A linhagem estabelecida V79, oriunda de pulmão de Hamster chinês, possui algumas características pelas quais tem sido largamente utilizada para a realização de estudos de toxicidade (NESTMANN e col, 1991). Além de apresentar rápida velocidade de divisão com tempo de duplicação entre doze e dezesseis horas, esta linhagem possui alta eficiência de clonagem, estabilidade cariotípica e manutenção das características clonais após criopreservação.

A figura 1 apresenta a proliferação relativa de fibroblastos

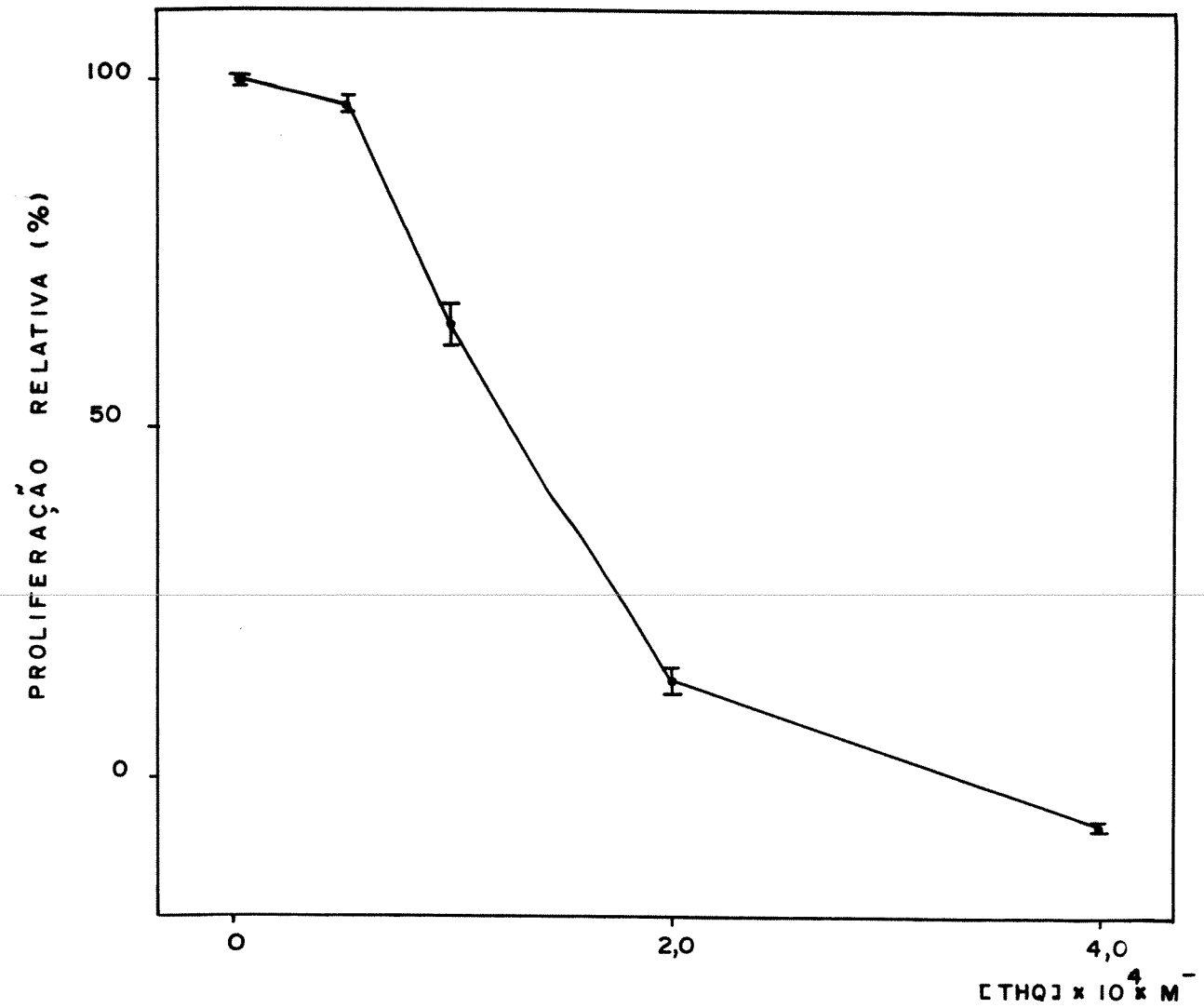


FIGURA 1 : INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS V79 POR THQ

Células V79 em fase exponecial de crescimento foram incubadas por 24 horas (37 ^{o}C) com diferentes concentrações de THQ dissolvida em DMEM + 10% SFB. Ao final do tratamento, as células foram fixadas e lisadas, e a A_{260} dos lisados foi medida. A proliferação relativa foi expressa como uma função do ΔA_{260} em relação a placas controle, como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.2.

O gráfico representa valores médios de ensaios em triplicata, de um experimento típico. Os desvios da média de cada ponto são apresentados.

V79 expostos à diferentes concentrações de THQ, por tempo longo (24 horas). Observamos uma inbição da proliferação celular dependente da dose empregada entre 0,01 e 0,35 mM de THQ. A partir desta dose, a exposição a THQ causa descolamento e perda de células, o que corresponde a um valor negativo da taxa de proliferação celular. A curva obtida nestas condições de exposição apresenta um comportamento cinético trifásico.

A ID_{50}, concentração de composto que inibe 50% da proliferação celular, obtida pela curva corresponde a 0,13 mM de THQ.

1.2. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO íON CÁLCIO NA CITOTOXICIDADE DA THQ PARA CÉLULAS V79

As evidências mostrando o envolvimento do íon cálcio no mecanismo de citotoxicidade de hepatócitos expostos ao estresse oxidativo (NICOTERA e col, 1988), nos levaram a analisar o envolvimento do íon Ca^{2+} na inibição da proliferação celular induzida pela THQ.

Para a realização desses estudos tornou-se necessário o estabelecimento de um protocolo com tratamento por tempo curto (30 minutos), para que a exposição celular pudesse ser realizada em tampão contendo ou não 1 mM de Ca^{2+}.

A figura 2 apresenta a proliferação relativa de células V79 expostas a THQ dissolvida em tampão PBS, na presença ou ausência

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL

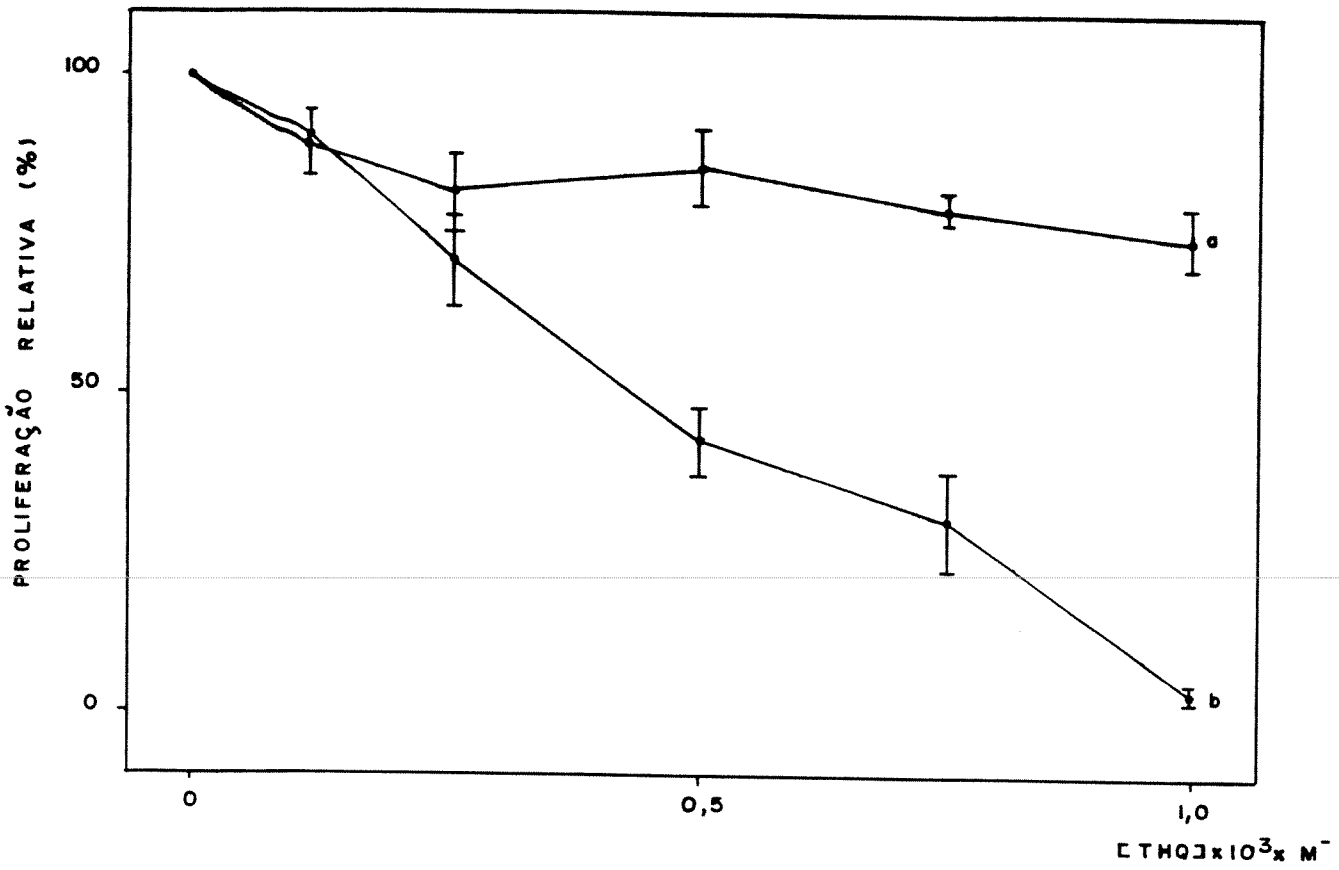


FIGURA 2 : PROLIFERAÇÃO RELATIVA DE CÉLULAS V79 EXPOSTAS A THQ NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE Ca^{2+}

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas por curto tempo (30 minutos, 37 ^{o}C) a diferentes concentrações de THQ, dissolvida em PBS-A (*a*) ou PBS-Ca^{2+} (*b*). Após o tratamento as células foram incubadas em DMEM + 10% SFB por um período de 24 horas, ao final do qual foram fixadas, lisadas e a A_{260} foi medida. A proliferação relativa foi calculada como no experimento anterior, tomando-se o ΔA_{260} durante as 24 horas de crescimento como estimativa da variação do número de células (como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS).

O gráfico representa valores médios de dois experimentos distintos, cujos ensaios foram realizados em triplicata. Os desvios da média de cada ponto são apresentados.

de Ca^{2+}. A curva a representa a proliferação relativa de células tratadas na ausência de Ca^{2+}. Observamos apenas uma pequena inibição da proliferação celular, que aumenta com a dose entre 0,1 e 1,0 mM de THQ e atinge um máximo de inibição em 25%. Células tratadas na presença de 1mM de Ca^{2+} (curva *b*) apresentam uma inibição da proliferação também dependente da dose empregada, com máximo de inibição de 96% para a concentração de 1,0 mM.

1.2.1. ESTUDO DO EFEITO DO QUELANTE DE Ca^{2+} FURA 2 NA INIBIÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELA THQ

As diferenças na inbição da proliferação celular obtidas na presença ou ausência de Ca^{2+} exógeno nos levaram a investigar se esses efeitos estavam associados a alterações na homeostase intracelular de Ca^{2+}. Para isso realizamos estudos de proteção utilizando o quelante intracelular de cálcio FURA 2, que apresenta alta seletividade pelo Ca^{2+} e praticamente não quela outros íons divalentes como o magnésio (GRYNKIEWICS e col, 1985).

No experimento apresentado na figura 3 as células foram pré-incubadas na presença ou ausência de FURA 2-AM, por 30 minutos e depois submetidas ao tratamento com 0,5mM de THQ. Tanto o carregamento com o quelante quanto a exposição a quinona foram realizados em tampão contendo 1mM de Ca^{2+}. Nas condições de pré-incubação utilizadas ocorre o carregamento efetivo das células com o quelante, o que foi evidenciado fluorimetricamente pelo deslocamento do pico de excitação do FURA 2 após a hidrólise do acetóxi-metiléster (dados não apresentados).

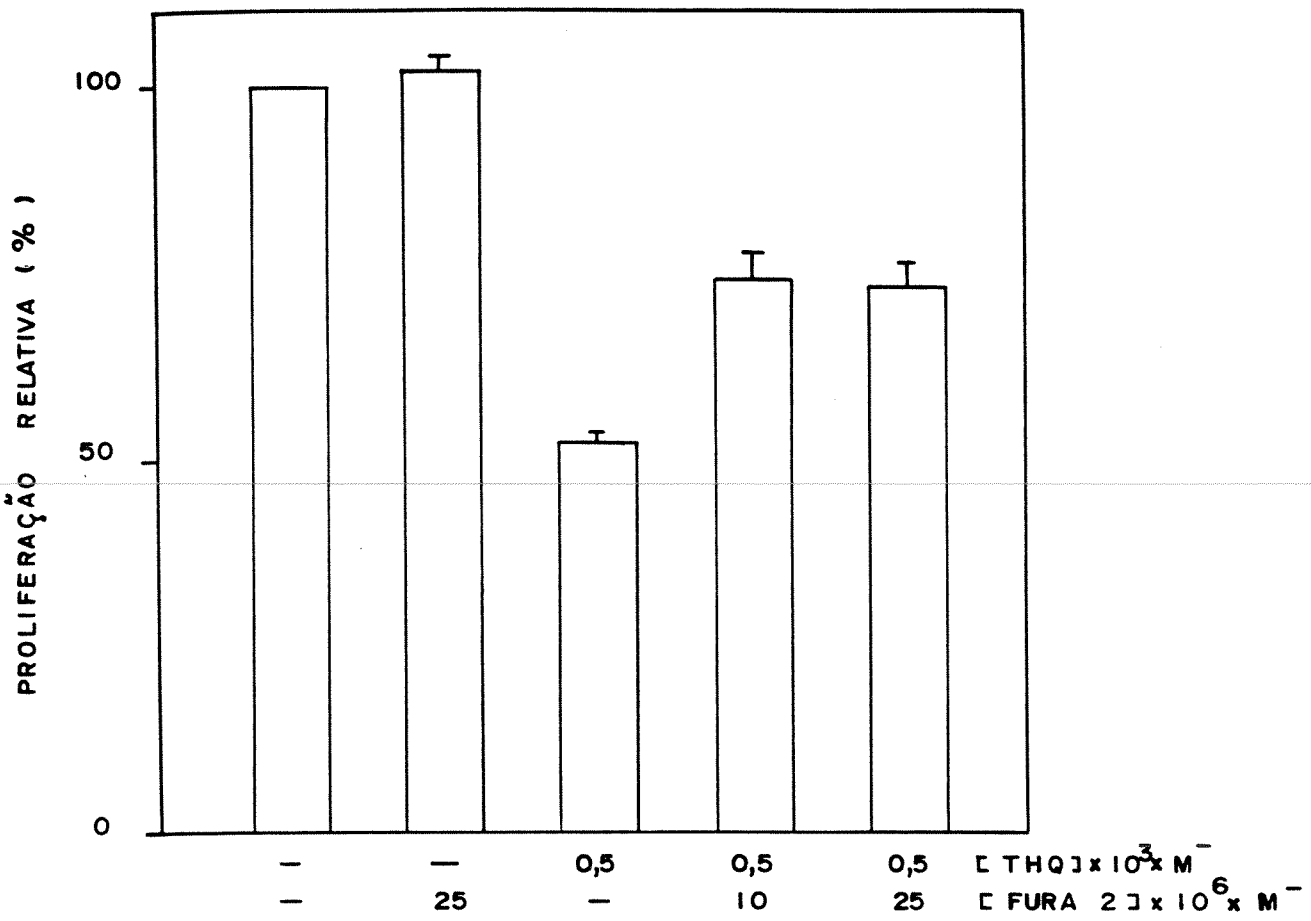


FIGURA 3 - EFEITO DO QUELANTE INTRACELULAR DE Ca^{2+} FURA 2 NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR THQ + Ca^{2+}

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram incubadas com FURA 2-AM (10 e 25μM, PBS-Ca^{2+}, 30 minutos, 37 ^{o}C), e subsequentemente submetidas ao tratamento com THQ 0,5mM (PBS-Ca^{2+}, 30 minutos, 37 ^{o}C). Após o tratamento as células foram crescidas e lizadas como no experimento anterior, e a variação da A_{260} foi tomada como estimativa da população celular.

O gráfico representa valores médios de ensaios realizados em triplicata, de um experimento típico. Os desvios da média de cada ensaio são apresentados.

Observamos que células pré-carregadas com FURA 2 sofrem uma inibição menor da proliferação celular que as células expostas somente a THQ, respectivamente de 22 e 48%. Não foram obtidas diferenças de proliferação entre células carregadas com 10 ou 25μM de FURA 2.

1.3. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DE ESPÉCIES TRANSIENTES GERADAS PELA THQ NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Tendo em vista que a auto-oxidação da THQ em condições fisiológicas gera um surto de espécies transientes, como espécies ativas de oxigênio e radicais semiquinona (HOFFMANN e col, 1987), passamos a estudar o envolvimento destas espécies no mecanismo de inibição da proliferação celular induzida por esta hidroquinona. A transitoriedade destas espécies já foi estabelecida, sendo que o radical semiquinona não é mais detectado após meia hora de estocagem da solução e o radical hidroxila após duas horas de estocagem (ARÉVALO,1990).

Para esclarecer se o efeito inibitório da THQ estava associado à espécies transientes ou produtos estáveis de sua oxidação realizamos experimentos onde as células foram expostas a soluções de THQ estocadas por diferentes tempos após sua dissolução. A figura 4 apresenta a proliferação dos fibroblastos V79 em função do tempo de estocagem da solução de THQ, de concentração inicial 0,5mM.

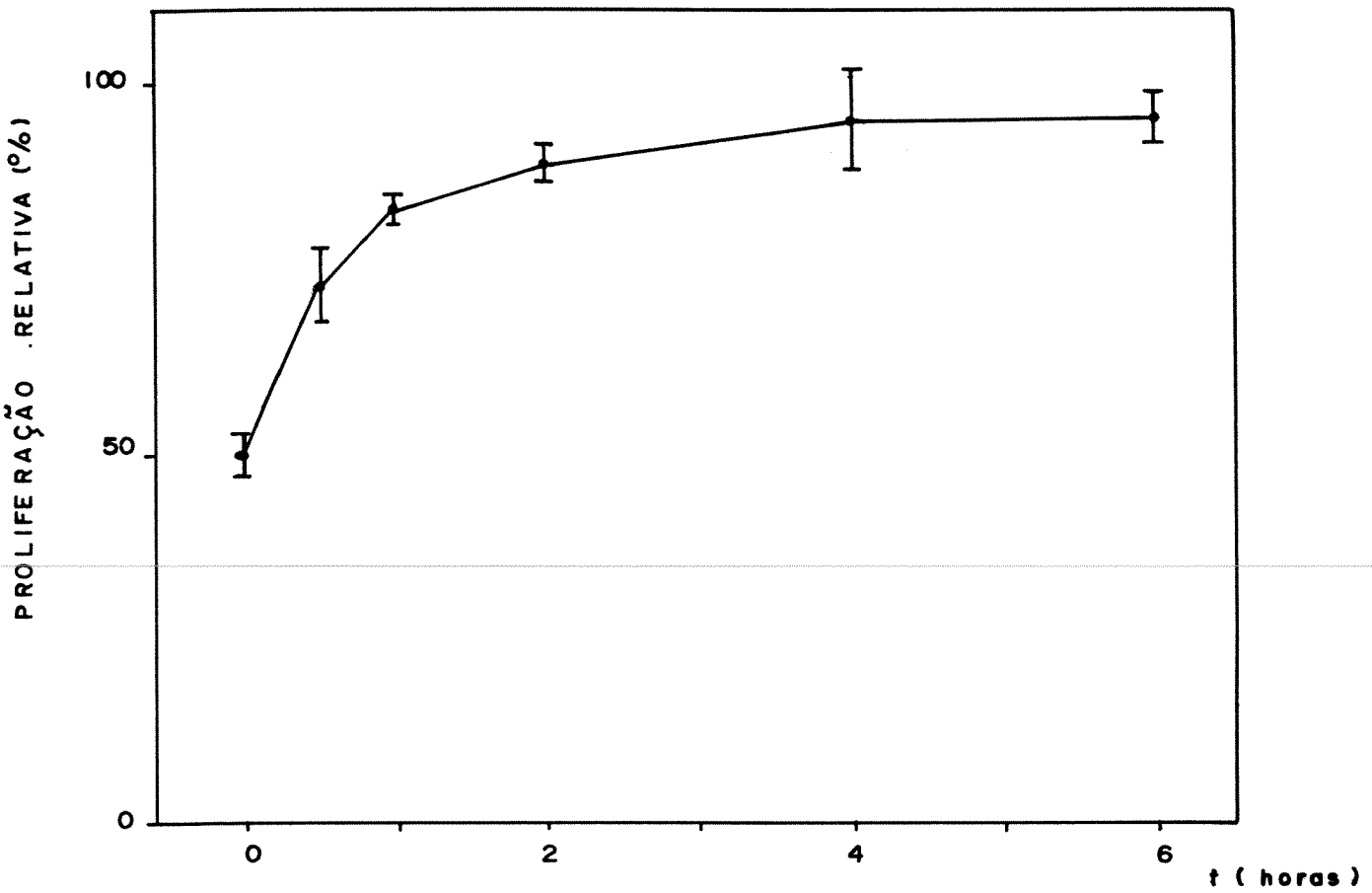


FIGURA 4 : EFEITO DA ESTOCAGEM DA SOLUÇÃO DE THQ NA INIBIÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR THQ + Ca^{2+}

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas a soluções de THQ 0,5mM (PBS-Ca^{2+}, 30 minutos, 37 ^{o}C) estocadas por diferentes tempos, a temperatura ambiente, no escuro. Após o tratamento, procedeu-se o crescimento e a lise das células como descrito na figura 2, e o ΔA_{260} foi considerado como estimativa do aumento da população celular. A proliferação relativa foi calculada como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.2.

O gráfico apresenta valores médios de ensaios realizados em triplicata, de um experimento típico. Os desvios da média são apresentados.

Observamos uma diminuição progressiva da inibição da proliferação celular induzida por THQ em função do tempo de estocagem da solução. A inbição inicial de 50% produzida por uma solução recém dissolvida diminue rápida e progressivamente com o tempo de estocagem , praticamente desaparecendo após 4 horas.

A curva mostra um comportamento bifásico, com uma rápida queda na inibição durante a primeira hora de estocagem, e uma queda mais lenta nas 5 horas seguintes.

1.4. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DE EAO NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR THQ

Buscando evidenciar a participação de EAO no mecanismo citotóxico da THQ, investigamos o papel protetor das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase. Utilizamos também ofenantrolina, um quelante específico de Fe^{2+}, que é capaz de entrar nas células (NUNEZ e col, 1983) e impedir a redução de H_2O_2 por estes íons (BURGESS e PRINCE, 1965). Para avaliar a participação do radical hidroxila utilizamos benzoato de sódio e manitol, dois sequestradores desta espécie.

Nos experimentos apresentados nas figuras 5,6 e 7 as células foram expostas a THQ isoladamente, ou na presença dos antioxidantes citados. Observamos que catalase (250 U/ml) exerceu uma protetor total da inibição da proliferação celular induzida por THQ 0,5mM, uma vez que células expostas a THQ na sua presença proliferam em níveis similares às controle (figura 5).

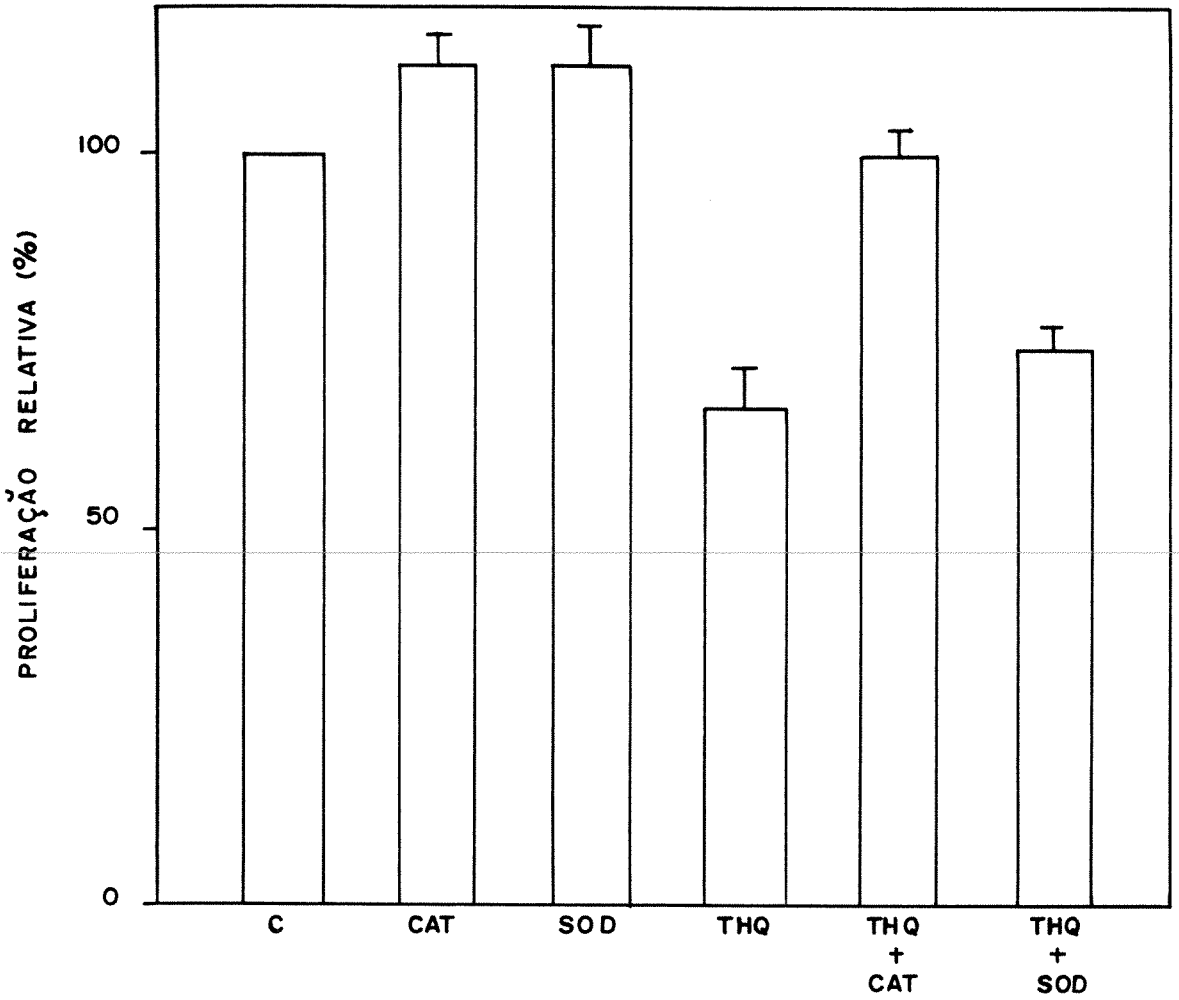


FIGURA 5 : EFEITO DE CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR THQ + Ca^{2+}

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas a THQ 0,5mM (PBS-Ca^{2+}, 30 minutos, 37 ^{o}C) isoladamente, ou na presença de catalase (CAT) 250 U/ml ou superóxido dismutase (SOD) 100 U/ml. Após o tratamento procedeu-se ao crescimento e lise das células como descrito na figura 2, e a proliferação relativa foi calculada como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.2..

Os valores apresentados representam a média de dois experimentos independentes, cujos ensaios foram realizados em triplicata. Os desvios da média de cada ponto são apresentados.

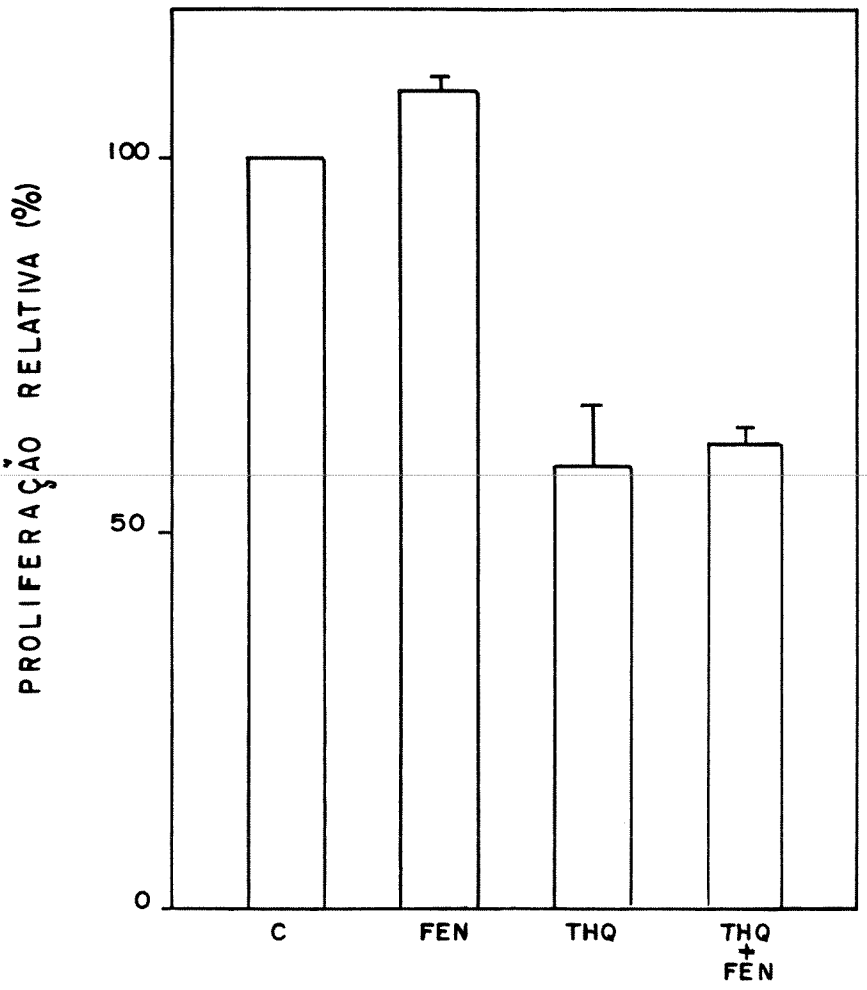


FIGURA 6 : EFEITO DE o-FENANTROLINA NA INIBIÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR THQ + Ca^{2+}

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas a THQ 0,5mM (PBS-Ca^{2+}, 30 minutos, 37 ^{o}C) isoladamente, ou na presença de o-fenantrolina (FEN) 0,1mM. O experimento foi, então, conduzido como o anterior, e a proliferação relativa calculada como descrito.

Os valores apresentados representam valores médios de ensaios realizados em triplicata, de um experimento típico. Os desvios da média são apresentados.

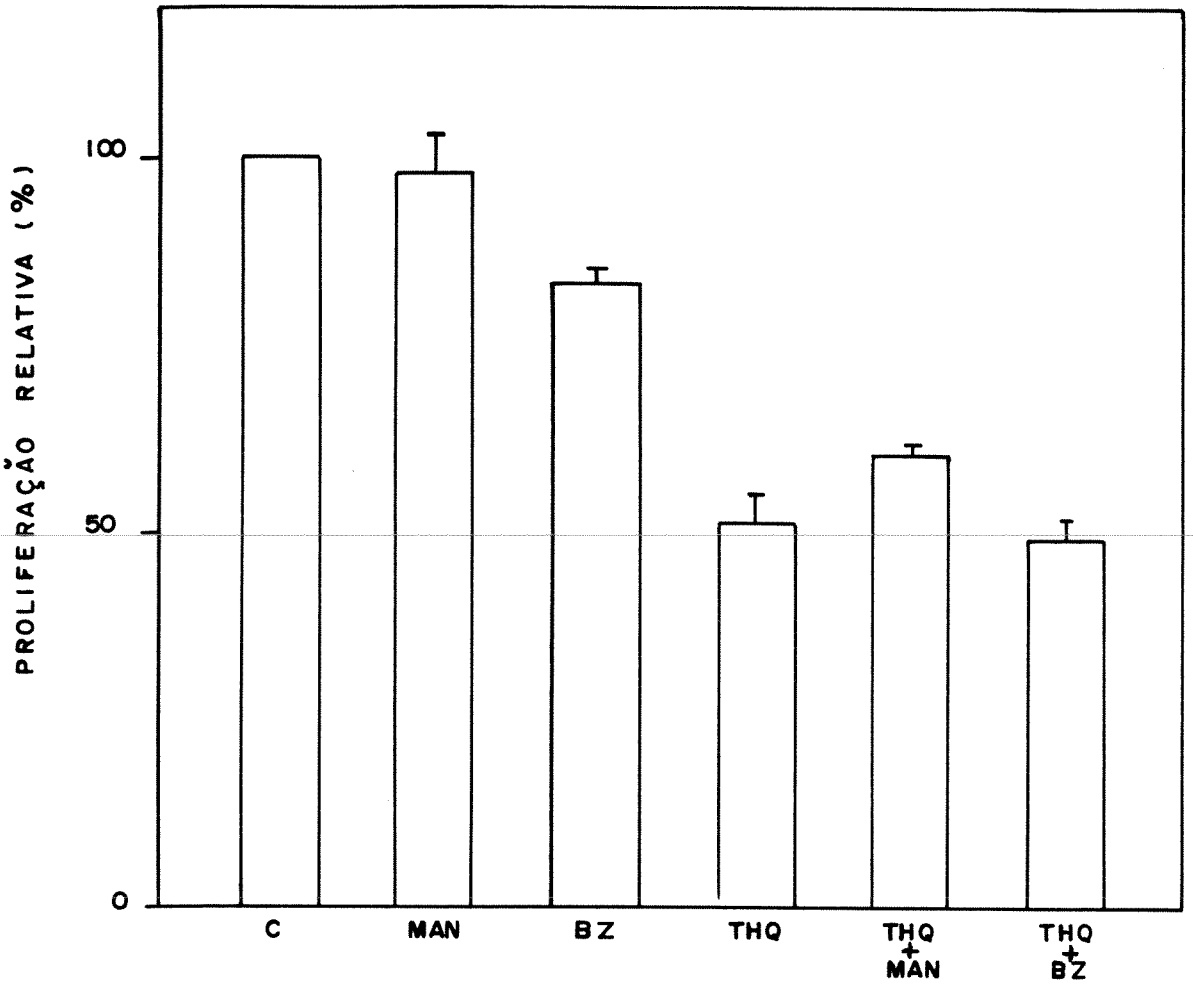


FIGURA 7 : EFEITO DE MANITOL E BENZOATO DE SÓDIO NA INIBIÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR THQ + Ca^{2+}

Num experimento conduzido como os anteriores, células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas a THQ 0,5mM (PBS-Ca^{2+}, 30 minutos, 37 ^{o}C) isoladamente, ou na presença de manitol (MAN) 50mM ou benzoato de sódio (BZ) 50mM. Após o tratamento, procedeu-se como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.2.

Os valores apresentados representam a média de ensaios realizados em triplicata, de um experimento típico. São apresentados também, os desvios da média para cada ensaio.

Superóxido dismutase (100 U/ml) diminui levemente a inibição da proliferação celular, que passou de 35 para 25% na sua presença (figura 5).

Células tratadas na presença de o-fenantrolina 0,1mM não apresentaram diferenças nas taxas de proliferação em relação às expostas a THQ isoladamente (figura 6). O mesmo comportamento foi observado na presença de benzoato de sódio 50mM (figura 7). Por sua vez, manitol apresentou um efeito protetor de apenas cerca de 10%.

2. ESTUDO DA AÇÃO GENOTÓXICA DA THQ PARA CÉLULAS V79

A detecção dos efeitos de THQ e cálcio na proliferação celular nos levou a investigar a ocorrência de danos na molécula de DNA, uma vez que : i) a reprodução celular é um processo altamente regulado, onde um dos pontos principais de controle é o início da replicação do DNA (HARTWELL e WEINERT, 1989); ii) o processo de replicação do DNA é inibido por lesões nesta molécula (CLEAVER, 1984; PAINTER, 1977). A lesão estrutural de DNA analisada foi a formação de quebras de fita simples (qfs), decorrentes da clivagem hidrolítica das ligações fosfodiéster, que constituem o tipo de lesão majoritária induzida por espécies ativas de oxigênio (MENEGHINI, 1988). Procuramos estabelecer uma correlação entre os mecanismos de inibição da proliferação celular e a genotoxicidade da THQ.

2.1. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO ÍON Ca^{2+} NA FORMAÇÃO DE QUEBRAS DE FITA SIMPLES DE DNA INDUZIDAS PELA THQ

Nestes experimentos, medimos a formação de qfs em meio alcalino, que indicam não apenas a formação real de quebras nas ligações fosfodiéster, como também a ocorrência de modificações de bases, que constituem sítios álcali-lábeis (LYNDAHL e NYBERG, 1972).

A fragmentação do DNA foi medida em células expostas a THQ em tampão PBS contendo ou não 1mM de Ca^{2+}. A figura 8 apresenta a percentagem de DNA fragmentado em função da dose de THQ. Observamos fragmentação do DNA tanto na ausência quanto na presença de Ca^{2+} exógeno.

Na ausência de Ca^{2+}, a THQ causa fragmentação do DNA de maneira limitada, atingindo cerca de 30% de fragmentação com 0,1 mM de THQ, não variando significativamente esse nível em concentrações mais elevadas. Na presença de Ca^{2+} ocorre intensa fragmentação do DNA, de maneira dependente da dose, atingindo o patamar de saturação na concentração de 0,25 mM.

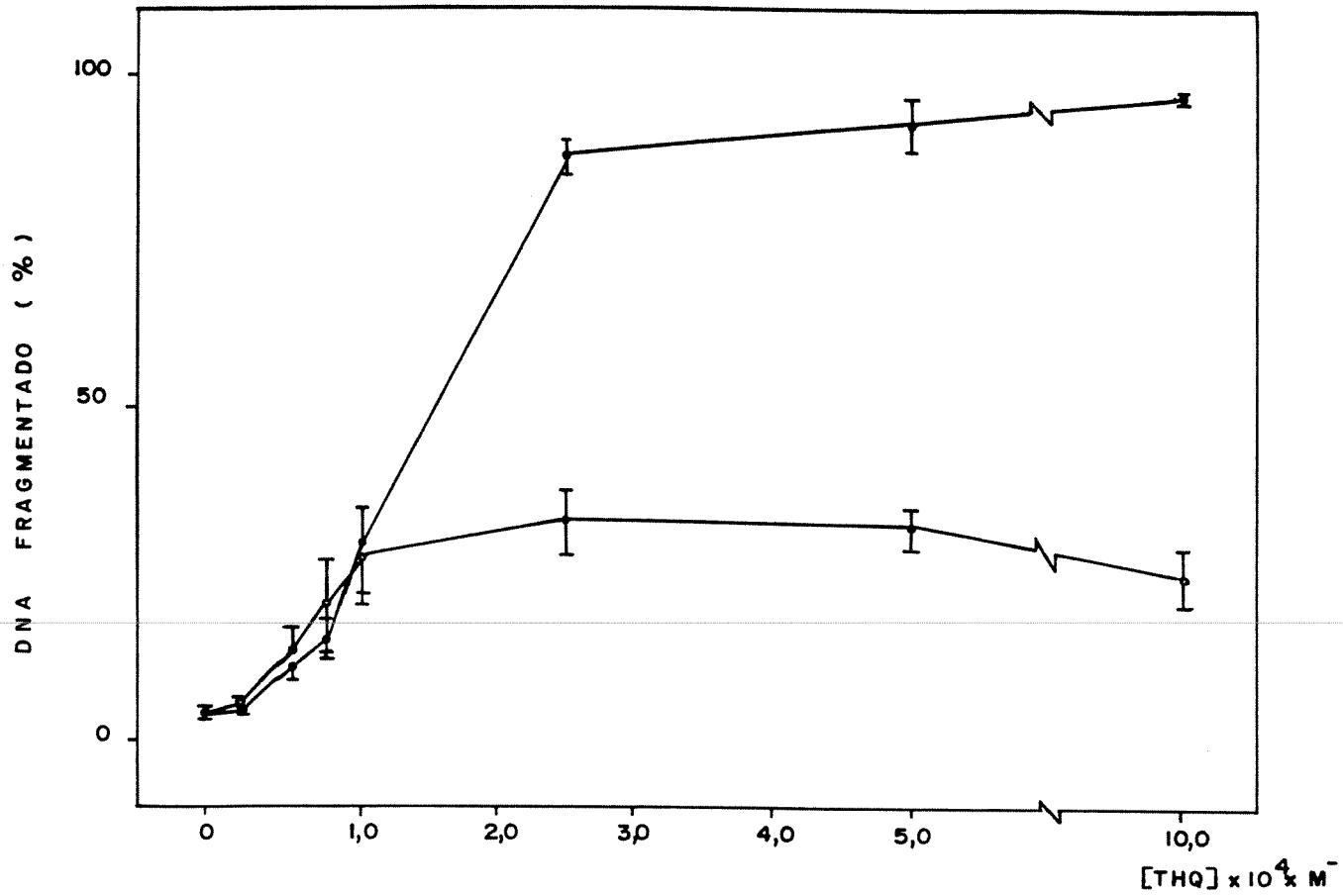


FIGURA 8 : FORMAÇÃO DE QUEBRAS DE FITA SIMPLES DE DNA NA PRESENÇA DE THQ E Ca^{2+}

Células V79 em fase exponencial de crescimento, com o DNA isotópicamente marcado com timidina tritiada (^{3}H-Tdr, 0,5μCi/ml, 20 horas), foram expostas (30 minutos, 37 ^{o}C) a diferentes concentrações de THQ, dissolvida em tampão PBS contendo (●) ou não (O) Ca^{2+} 1mM. Após o tratamento procedeu-se a lise celular, e a precipitação diferencial do DNA em meio alcalino contendo 1% SDS e 0,06 M NaOH, como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.4. A formação de quebras de fita simples de DNA foi expressa como a porcentagem de DNA fragmentado em cada ensaio.

O gráfico representa os valores médios de ensaios realizados em tripicata, onde são apresentados também os desvios da média. Um experimento típico é apresentado.

2.2. ESTUDO DO REPARO DAS QUEBRAS DE FITA SIMPLES DE DNA INDUZIDAS POR THQ E Ca^{2+}

Para investigar se as lesões induzidas no DNA pela THQ na presença de Ca^{2+} são reverssíveis ou não, analisamos a cinética de recuperação da fragmentação do DNA. Esta resposta é importante em termos da definição do significado do DNA como um alvo crítico no mecanismo de citotoxicidade da THQ.

A figura 9 apresenta o gráfico da percentagem de DNA que restou fragmentado em função do tempo de recuperação em meio de cultura, após a exposição das células a uma concentração de THQ (0,5mM) onde praticamente todo o DNA celular está fragmentado. Observamos que em duas horas a percentagem de DNA fragmentado cai de 88 para 49%, e que após 24 horas cerca de 20% do DNA ainda está fragmentado. Nas culturas controle correpondentes a cada ponto observamos sempre um baixo índice de fragmentação. Esta curva apresenta duas fases, uma onde a recuperação é rápida (2 horas iniciais) e outra lenta (de 2 a 24 horas).

3. ESTUDO DO EFEITO DA THQ NA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE Ca^{2+} EM CÉLULAS V79

Para verificar se a THQ causa alterações na homeostase intracelular de Ca^{2+}, medimos a concentração citosólica de Ca^{2+} livre utilizando o indicador fluorescente FURA 2-AM, procurando estabelecer uma correlação entre o aumento da concentração intracelular deste íon e a citotoxicidade da THQ.

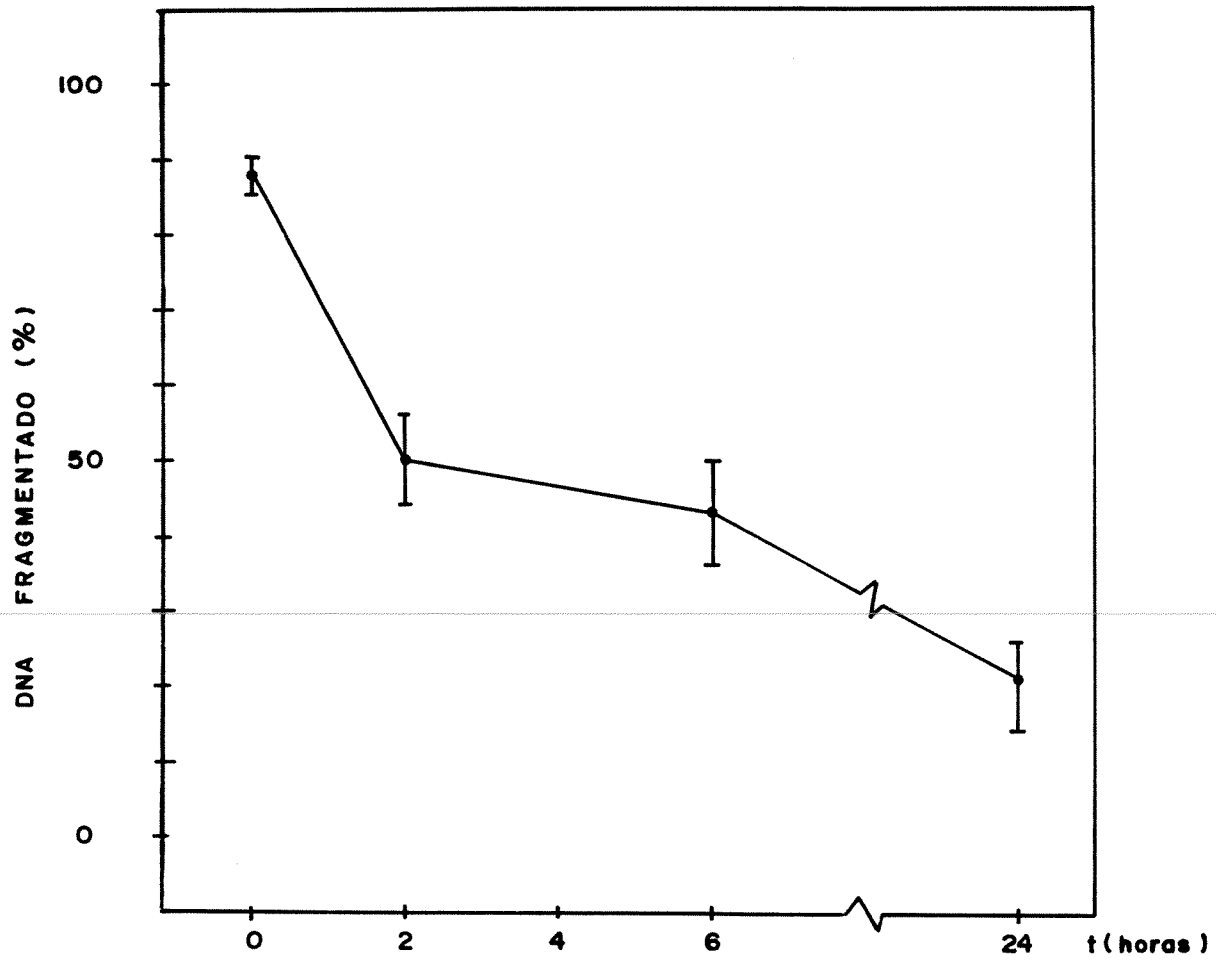


FIGURA 9 : CINÉTICA DA RECUPERAÇÃO DAS QUEBRAS DE FITAS SIMPLES DE DNA INDUZIDAS POR THQ E Ca^{2+}

Células V79 em fase exponencial de crescimento, com o DNA isotópicamente marcado com timidina tritiada (^{3}H-Tdr, 0,5μCi/ml, 20 horas), foram expostas a THQ 0,5mM (PBS-Ca^{2+}, 30 min., 37 ^{o}C). Após o tratamento procedeu-se a lise e precipitação diferencial de DNA como descrito na figura 8, e em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.4. A formação de quebras de fitas simples foi expressa pela porcentagem de DNA fragmentado em cada ensaio.

O gráfico representa os valores médios de ensaios realizados em triplicata, de um experimento típico, onde são também apresentados os desvios da média.

Medimos a concentração intracelular de Ca^{2+} em células expostas a THQ 0,5mM na ausência ou presença de Ca^{2+} no tampão de tratamento. Na figura 10 observamos que células controle expostas somente a PBS-Ca^{2+} (curva *a*), carregadas com FURA 2, apresentam um espectro de fluorescência característico, com pico de emissão máxima em 350nm. O espectro de células expostas a THQ na presença de Ca^{2+} exógeno mostra um aumento da intensidade de fluorescência nesta região (curva *b*). Esse aumento corresponde a uma elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} de 70nM para cerca de 500nM. O espectro de fluorescência de células tratadas com THQ na ausência de Ca^{2+} exógeno (curva *d*) não difere do obtido para células controle expostas somente a PBS-A (curva *c*), e a concentração intracelular deste íon, nesta condição, é de cerca de 50nM. Esses valores foram determinados a partir das curvas de calibração obtidas com concentrações conhecidas de Ca^{2+}, entre 50 e 500nM (não apresentadas).

4. ESTUDO DA AÇÃO DA THQ EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

Investigamos a ação da THQ sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato (MFR), procurando caracterizar possíveis alterações da integridade funcional desta organela, induzidas em condições de estresse oxidativo na presença de Ca^{2+}. Esta abordagem pretende definir o significado da mitocôndria como alvo celular da ação citotóxica da THQ. Estes experimentos foram realizados em tampão contendo Ca^{2+} contaminante (10μM).

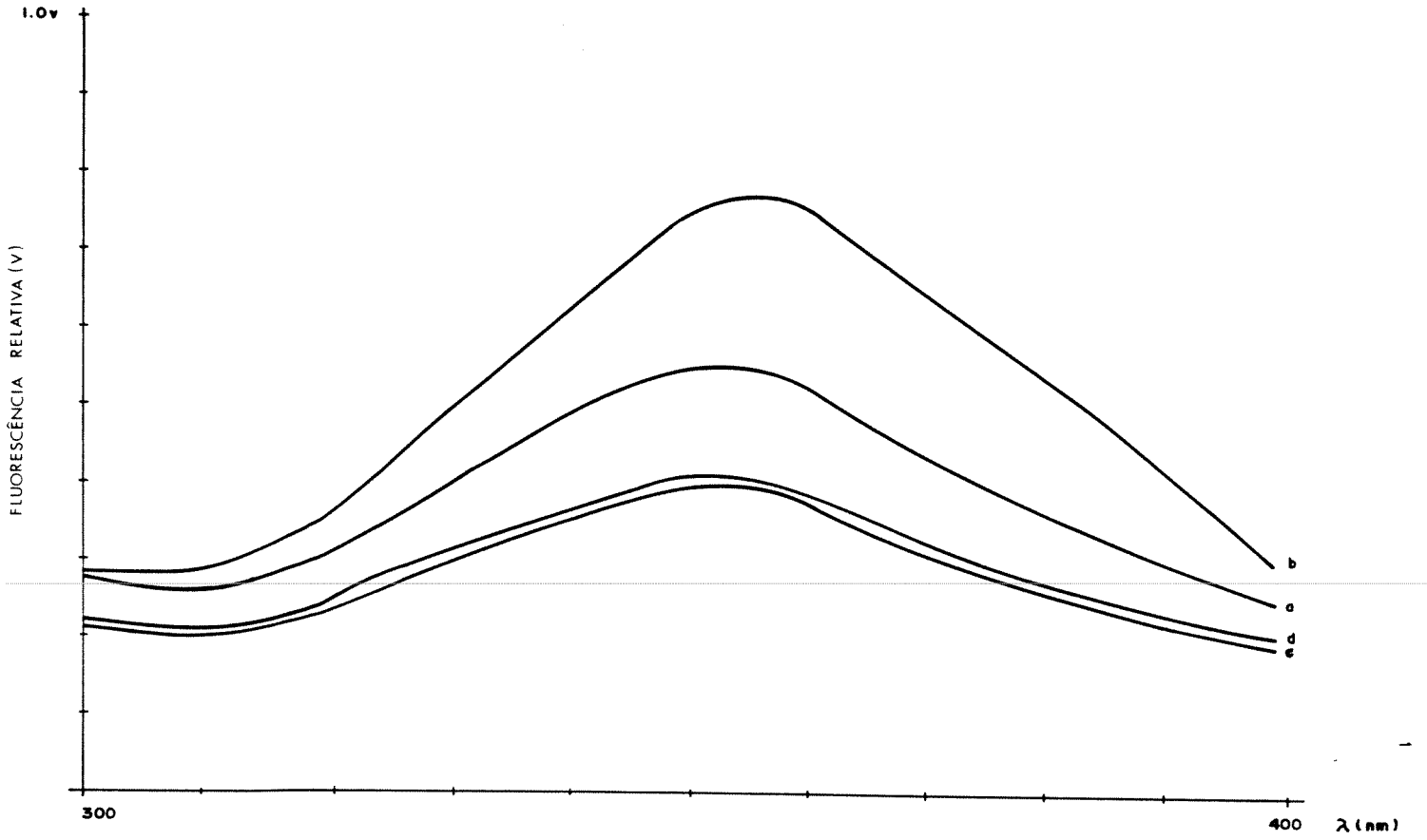


FIGURA 10 : MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE Ca^{2+} EM CÉLULAS V79 TRATADAS COM THQ NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE Ca^{2+}

Células V79 foram carregadas com o indicador específico de Ca^{2+} FURA 2-AM (30 minutos, 37 ^{o}C), e posteriormente expostas a THQ 0,5mM (30 min., 37 ^{o}C), na presença (curvas *a* e *b*) ou na ausência (curvas *c* e *d*) de $CaCl_2$ 1mM, como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.3. A figura apresenta os espectros de excitação de células controle (curvas *a* e *c*) e tratadas (curvas *b* e *d*), com máximo de emissão a 510nm, medidos em espectrofluorímetro Aminco, modo "ratio", em ensaios de 2,5ml contendo 10^6 células, como descrito no ítem 2.3.

O gráfico representa um experimento típico, realizado em duplicata.

Utilizamos dois parâmetros para esta avaliação : i) a capacidade da organela captar e reter Ca^{2+} do meio externo; ii) a capacidade de construir e manter um potencial elétrico transmembrânico ($\Delta\Psi$). Estas funções são dependentes tanto da integridade da membrana quanto da atividade metabólica da mitocôndria (NICHOLS e CROMPTON, 1980).

4.1. EFEITO DA THQ NA CAPTAÇÃO DE Ca^{2+} POR MFR

A figura 11 apresenta as curvas de captação de Ca^{2+} por MFR energizadas com succinato, expostas a diferentes concentrações de THQ recém dissolvidas.

Mitocôndrias controle (curva *a*) captam Ca^{2+} do meio externo rapidamente, e mantêm a concentração de Ca^{2+} no meio tamponada entre 1,0 e 0,5μM durante o período de duração das medidas (cerca de 20 minutos). A exposição a THQ incapacita as mitocôndrias a captarem e manterem o Ca^{2+} captado nos níveis das controle. MFR expostas a 0,2mM de THQ captam Ca^{2+} do meio até uma concentração de Ca^{2+} livre próxima de 1,5μM e mantêm esse nível de Ca^{2+} durante o tempo de medida (curva *b*). Mitocôndrias expostas a 0,5mM de THQ captam menor quantidade de Ca^{2+} (até uma concentração de 2,5μM de Ca^{2+} no meio externo), liberando rapidamente o Ca^{2+} captado (curva *c*). O mesmo comportamento foi encontrado para mitocôndrias expostas a 1,0mM de THQ, onde a captação de Ca^{2+} foi ainda mais reduzida, até uma concentração externa de 5,0μM (curva *d*).

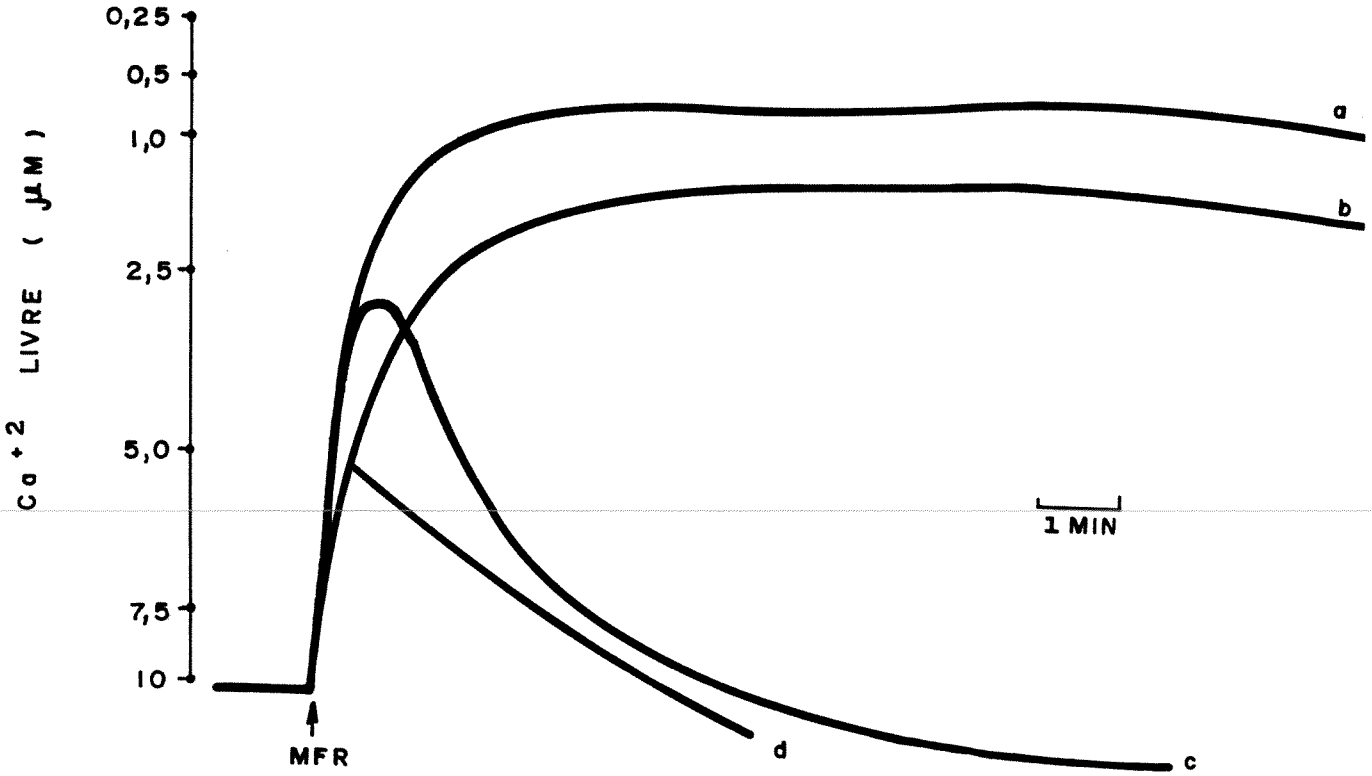


FIGURA 11 : EFEITO DE THQ NA CAPTAÇÃO DE Ca^{2+} POR MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FíGADO DE RATO (MFR)

Mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1 mg de proteína) foram incubadas durante o tempo de medida (20 minutos, 28 ^{o}C), em 1 ml de meio de reação contendo sacarose 125mM, KCl 65 mM, Hepes 3mM (pH 7,2), $MgCl_2$ 1mM, KH_2PO_4 1mM e succinato de potássio 5mM, com diferentes concentrações de THQ. A captação de Ca^{2+}, iniciada pela adição das mitocôndrias, sinalizada pela flecha, foi medida usando-se um eletrodo seletivo para cálcio, como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.6. As curvas apresentadas representam as seguintes condições de incubação : *a* = controle; *b* = THQ 0,2mM; *c* = THQ 0,5mM e *d* = THQ 1,0mM.

O gráfico representa um experimento típico, realizado em duplicata.

4.2. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DE ESPÉCIES TRANSIENTES NA AÇÃO DA THQ SOBRE O $\Delta\Psi$ DE MFR

Os resultados anteriores, indicando que a THQ induz permeabilização da membrana interna da mitocôndria para Ca^{2+}, nos levaram a investigar seu efeito sobre a capacidade da mitocôndria construir e manter um potencial elétrico transmembrânico ($\Delta\Psi$), atividade esta dependente da integridade estrutural da membrana.

Como abordado anteriormente, analisamos primeiramente o efeito do tempo de auto-oxidação da solução de THQ, e depois das EAO formadas durante este processo. Na figura 12 apresentamos os perfis de formação de $\Delta\Psi$ obtidos quando as mitocôndrias foram expostas a soluções de THQ 0,5mM estocadas por diferentes tempos.

Mitocôndrias controle, na presença de succinato como substrato respiratório, constroem um potencial de membrana de aproximadamente 134mV e mantêm este potencial durante o tempo de medida (curva *a*). Mitocôndrias expostas a uma solução recém dissolvida de THQ 0,5mM constroem um potencial de cerca de 113mV, que é rápida e progressivamente colapsado, até ser dissipado após 15 minutos de incubação (curva *b*). Nos ensaios com soluções de THQ estocadas por quinze e setenta e cinco minutos (curvas *c* e *d*, respectivamente) observamos efeitos de menor intensidade, uma vez que o potencial inicialmente construído é mais alto, e sua dissipação é mais lenta que nos ensaios com THQ recém dissolvida.

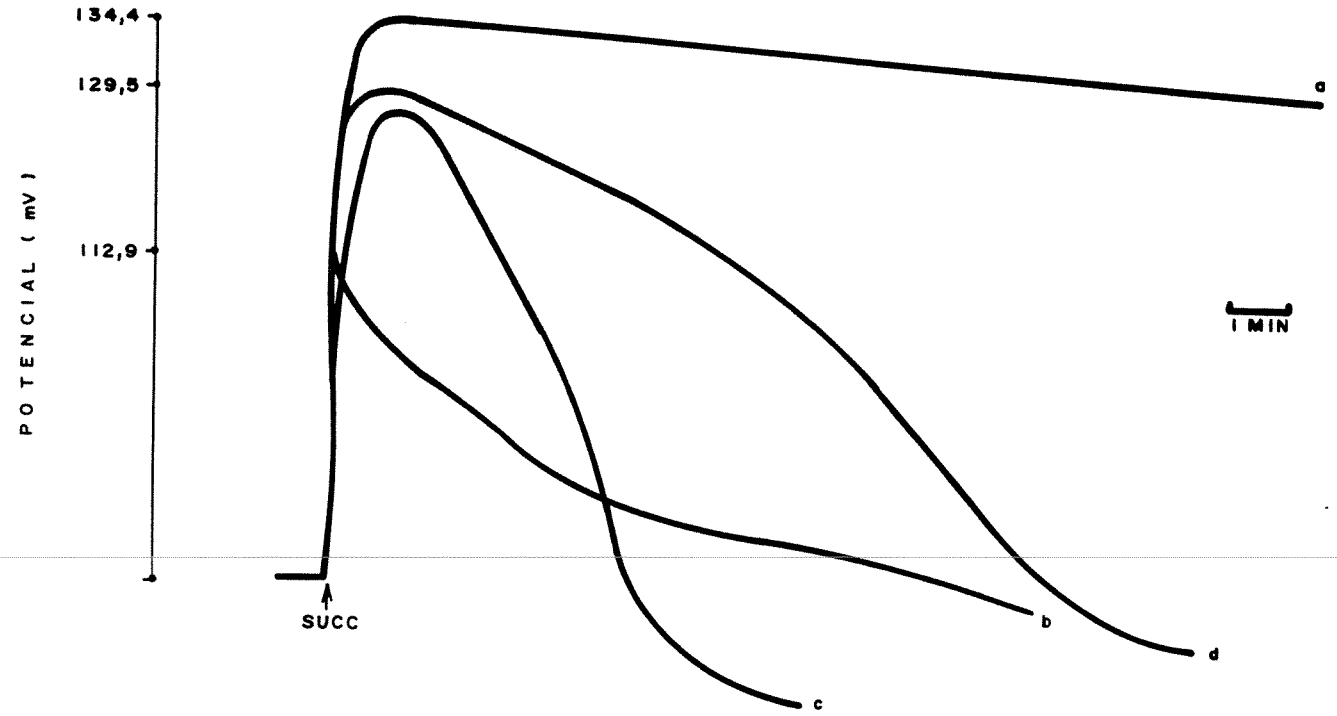


FIGURA 12 : EFEITO DA ESTOCAGEM DA SOLUÇÃO DE THQ NO COLAPSO DE $\Delta\Psi$ DE MFR

Mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1 mg de proteína) foram incubadas durante durante 5 minutos em 1 ml de meio de reação contendo sacarose 125mM, KCL 65mM, Hepes 3mM (pH 7,2), $MgCl_2$ 1mM, KH_2PO_4 1mM e rotenona 5μM, contendo soluções de THQ 0,5mM estocadas por diferentes tempos a temperatura ambiente, no escuro. A medida do potencial de membrana, iniciada pela adição de succinato de potássio 5mM (representada pela flecha), foi realizada durante 20 minutos, através de um eletrodo seletivo ao cátion lipofílico TPP, como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.7. As curvas representam as seguintes condições : *a* = controle; *b* = THQ 0,5mM recém dissolvida; *c* = THQ 0,5mM estocada por 15 minutos; *d* = THQ 0,5mM estocada por 75 minutos.

O gráfico representa um experimento típico realizado em duplicata.

4.3. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DAS EAO NA AÇÃO DE THQ SOBRE O $\Delta\Psi$ DE MFR

Para evidenciar o envolvimento das EAO geradas pela auto-oxidação da THQ no colapso do $\Delta\Psi$ analisamos o efeito protetor das enzimas anti-oxidantes catalase e superóxido dismutase, e do quelante de ferro *o*fenantrolina. A figura 13 apresenta as curvas de formação de $\Delta\Psi$ por MFR expostas somente a THQ 0,5mM ,ou na presença destes anti-oxidantes.

Observamos nesta figura que o potencial de membrana das mitocôndrias controle é mantido em cerca de 160mV durante a medida (curva *a*), enquanto que no caso das mitocôndrias expostas a THQ 0,5mM o potencial inicial de 136mV é rapidamente colapsado até a dissipação completa (curva *b*). Na presença de THQ e CAT as mitocôndrias constroem um $\Delta\Psi$ em níveis compatíveis com as controle, porém não o mantêm estável durante o tempo de medida (curva c). Ofenantrolina não altera o efeito da THQ sobre o $\Delta\Psi$ (curva *d*), como indicado pela semelhança entre as curvas *b* e *d*. Por outro lado, a adição de SOD potencializa o efeito de THQ isoladamente, uma vez que o $\Delta\Psi$ atinge um valor de apenas 117mV, sendo rapidamente colapsado em seguida (curva *e*).

As diferenças entre os valores do potencial de membrana observadas entre os experimentos apresentados são devidas à utilização de preparações mitocondriais distintas, um acontecimento usual quando se trabalha com mitocôndrias isoladas.

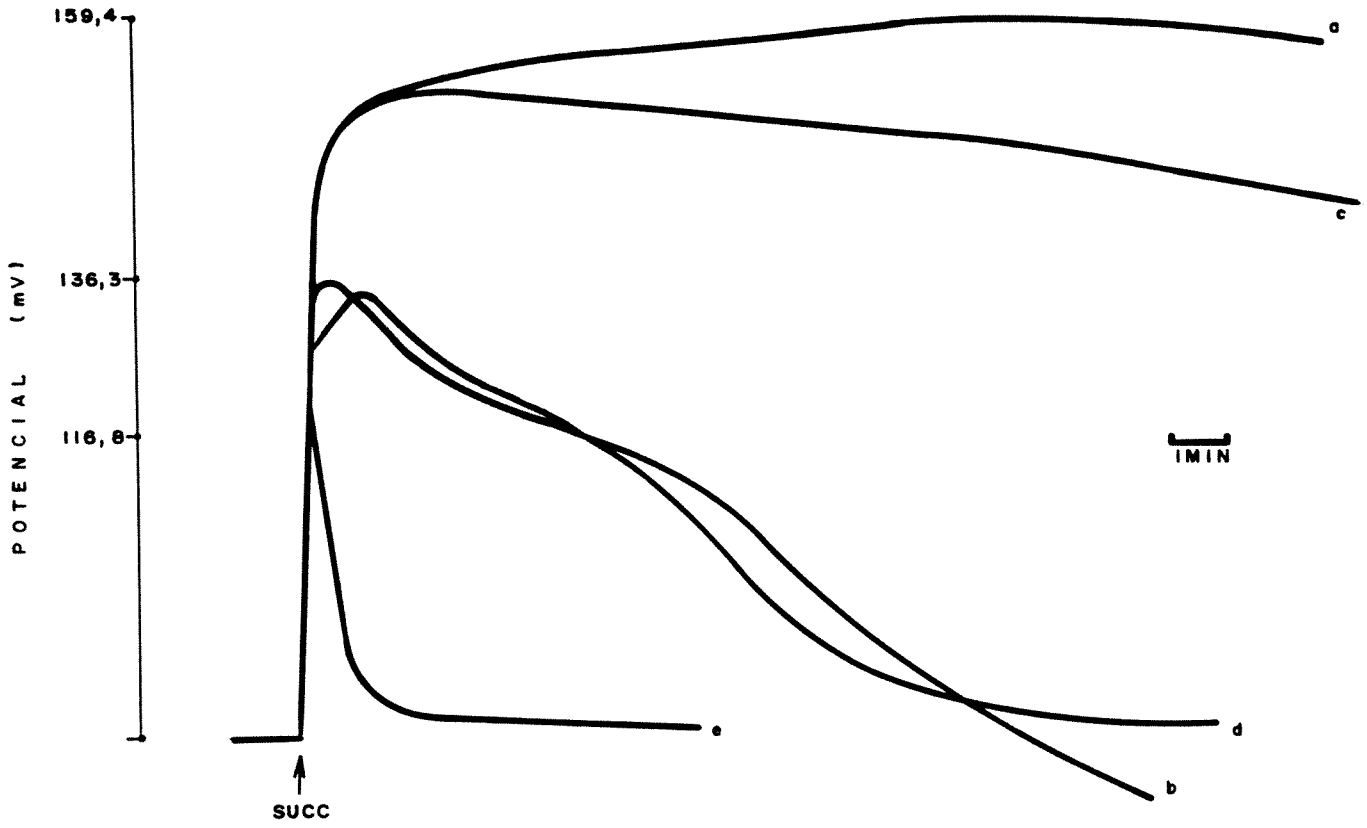


FIGURA 13 : EFEITO DE CATALASE, SUPERóXIDO DISMUTASE E *o*FENANTROLINA NO COLAPSO DE $\Delta\Psi$ DE MFR INDUZIDO POR THQ

Mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram incubadas nas condições descritas na figura 12, na presença de THQ 0,5mM isoladamente (curva *b*), ou de THQ com as seguintes adições : *c* = catalase 250 U/ml; *d* = *o*fenantrolina 0,1mM e *e* = superóxido dismutase 100 U/ml. A curva *a* representa mitocôndrias controle. Após uma pré-incubação de 5 minutos com THQ, foi iniciada a medida do potencial de membrana pela adição de succinato de potássio 5mM (flecha), prosseguindo-se por 20 minutos a 28 ^{o}C, como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.7.

O gráfico representa um experimento típico, realizado em duplicata.

4.4. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO íON Ca^{2+} NO COLAPSO DE $\Delta\Psi$ INDUZIDO PELA THQ EM MFR

Visando evidenciar a participação do íon Ca^{2+} na formação das lesões mitocondriais induzidas pela THQ, procuramos detectar uma inibição ou intensificação de seus efeitos sobre o $\Delta\Psi$, adicionando o quelante de Ca^{2+} - EGTA, ou Ca^{2+}extra ao meio de reação, respectivamente.

Na figura 14 observamos que o forte efeito da THQ 0,5mM sobre o potencial de membrana (parte inicial da curva *b*) é prevenido completamente quando o ensaio é realizado na presença de EGTA 1mM (curva *c*), uma vez que o $\Delta\Psi$ construído é similar ao da curva controle (curva *a*). Além disto, a adição de EGTA 1mM após a dissipação total do $\Delta\Psi$ (4 minutos) reverte completamente este efeito (parte final da curva *b*). A pequena diferença entre os valores de $\Delta\Psi$ ao final da curva *b* e a curva *a* não é significativa, pois é devida a alterações no volume mitocondrial durante o colapso do potencial de membrana (curva *b*, parte inicial).

Verificamos também que, contrariamente ao EGTA, a adição de Ca^{2+} extra ao meio de reação aumenta a velocidade do colapso do potencial de membrana induzido pela THQ, como mostrado na figura 15 (curvas *b*,*c* e *d*). Observamos que este efeito é dependente da quantidade de Ca^{2+} adicionado : tanto o valor inicial de $\Delta\Psi$ é menor, quanto sua dissipação é mais rápida com a adição de 30nmoles de Ca^{2+} (curva *d*) do que com 20nmoles (curva *c*).

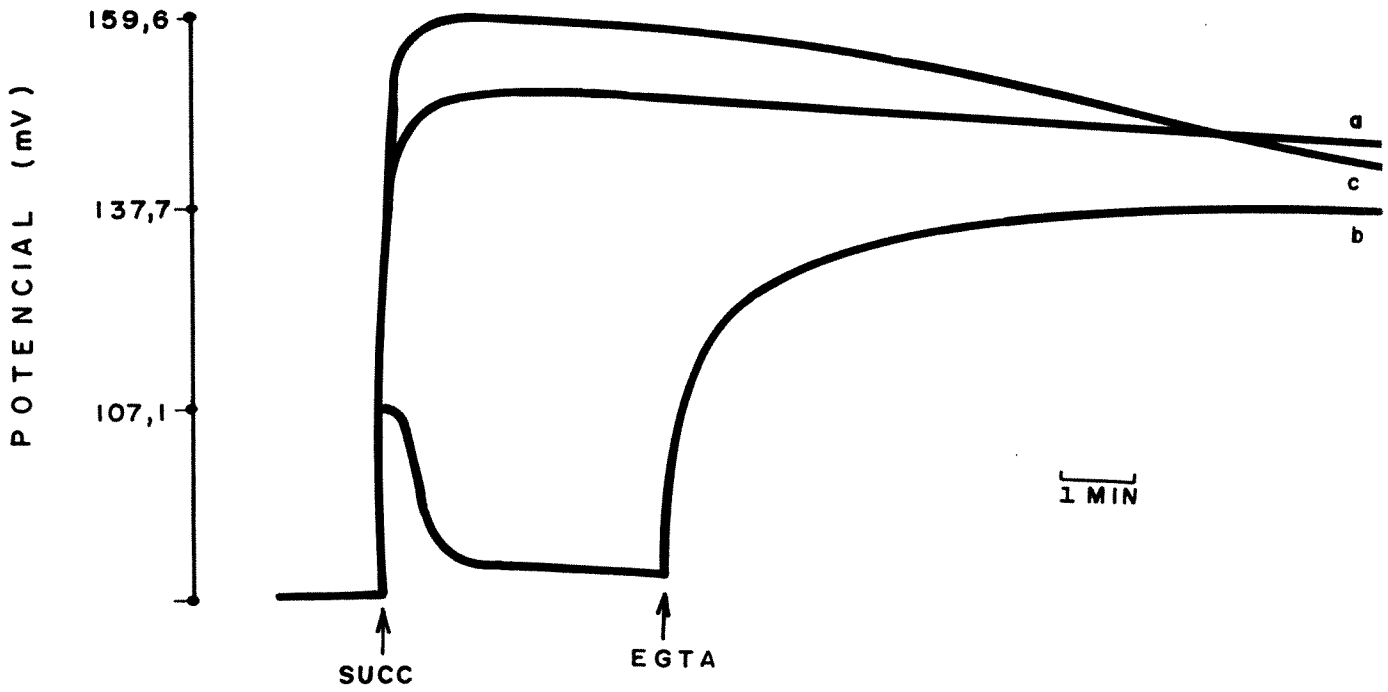


FIGURA 14 : EFEITO DO QUELANTE DE Ca^{2+} EGTA NO COLAPSO DE $\Delta\Psi$ DE MFR INDUZIDO POR THQ

Mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram incubadas, nas mesmas condições descritas na figura 12, durante 5 minutos, com soluções de THQ 0,5mM na presença ou ausência de EGTA 1,0mM. A medida do $\Delta\Psi$ foi iniciada pela adição de succinato de potássio 5mM (representada pela flecha), prosseguindo por 20 minutos a 28 ^{o}C. As curvas representam as seguintes condições de incubação : *a* = controle; *b* = THQ 0,5mM isoladamente, seguida da adição de EGTA 1mM após 4 minutos (seta) e *c* = THQ 0,5mM + EGTA 1mM.

O gráfico representa um experimento típico, realizado em duplicata.

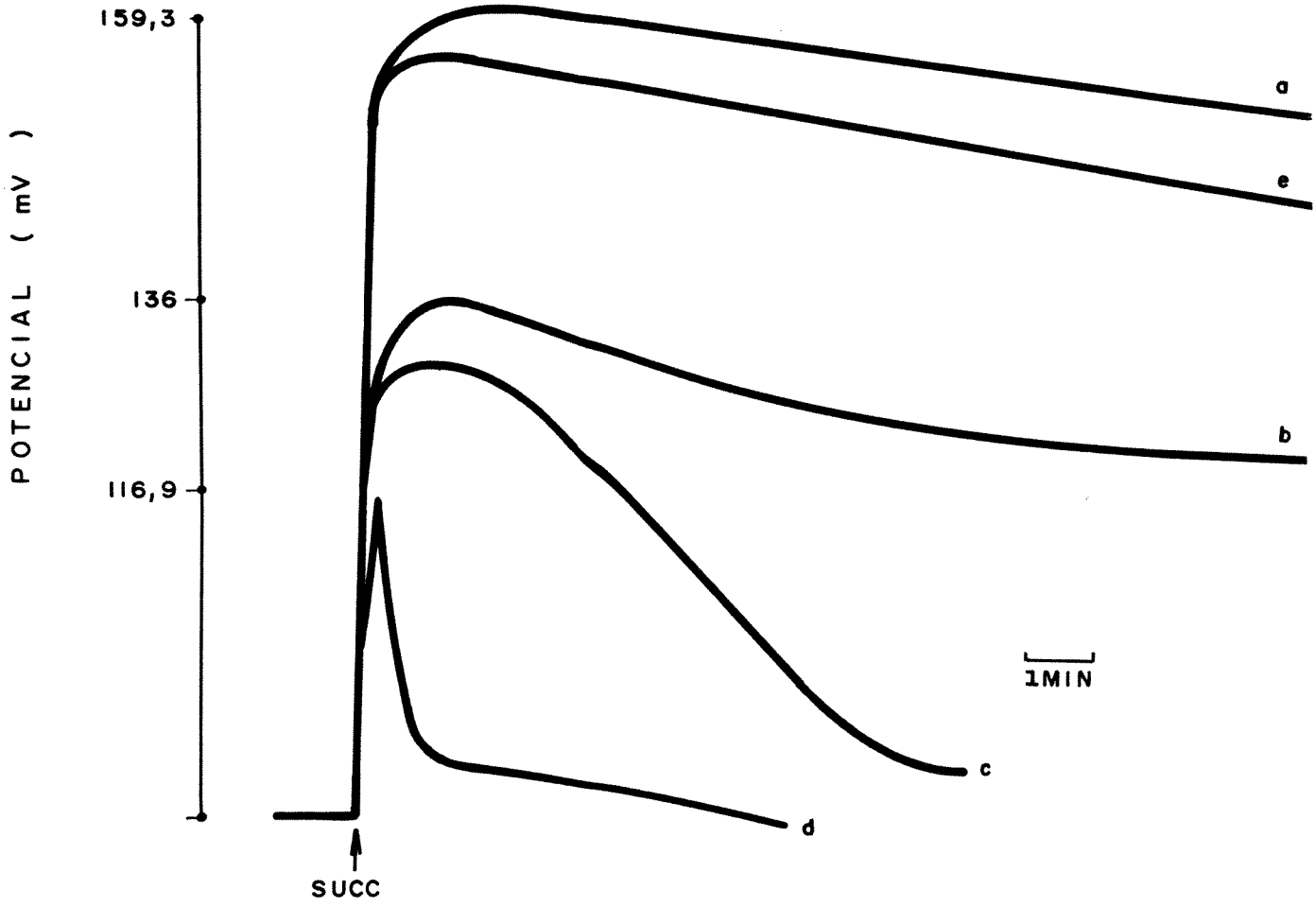


FIGURA 15 : EFEITO DE Ca^{2+} NO COLAPSO DE $\Delta\Psi$ DE MFR INDUZIDO POR THQ

Mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram incubadas, nas mesmas condições descritas na figura 12 durante 5 minutos, com soluções de THQ 0,5mM isoladamente, ou com microadições de $CaCl_2$. A medida do potencial de membrana foi iniciada pela adição de succinato de potássio 5mM (representada pela flecha), seguindo-se as medidas por 20 minutos a $28^{o}C$. As curvas representam as seguintes condições : *a* = controle; *b* = THQ; *c* = THQ + 20nmoles de Ca^{2+}; *d* = THQ + 30nmoles de Ca^{2+} e *e* = 30 nmoles de Ca^{2+}.

O gráfico representa um experimento típico realizado em duplicata.

5. *ESTUDO DA AÇÃO DA THQ SOBRE MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS V79 in situ*

Os estudos com mitocôndrias isoladas nos levaram a procurar detectar os efeitos da THQ de células intactas. Esse estudo foi realizado com células V79 permeabilizadas com digitonina, medindo-se a captação de Ca^{2+} em duas condições : 1) em células em suspensão expostas a THQ durante as medidas do transporte de Ca^{2+}; 2) em células expostas a THQ ainda aderidas nas placas de cultura e posteriormente suspensas para a medida do transporte de Ca^{2+}. As figuras 16 e 17 apresentam os perfis de captação de Ca^{2+} obtidos nas duas condições experimentais acima.

Na figura 16 observamos que células V79 em suspensão captam Ca^{2+} do meio externo, tamponando este íon entre 1,0 e 0,5μM por cerca de 20 minutos (curva *a*). Células tratadas com THQ 0,5mM em suspensão captam Ca^{2+} nos mesmos níveis que as controle, mas no entanto, liberam rapidamente o íon para o meio extracelular (curva *b*).

Entretanto, quando as células são expostas a THQ nas placas de cultura, previamente à realização da medida do transporte de Ca^{2+}, não se detecta o efluxo de Ca^{2+} das mitocôndrias, como mostrado na figura 17. Nessas condições de exposição, a cinética de captação de Ca^{2+} por células tratadas com THQ 0,5mM (curva *b*) é similar à de células controle (curva *a*).

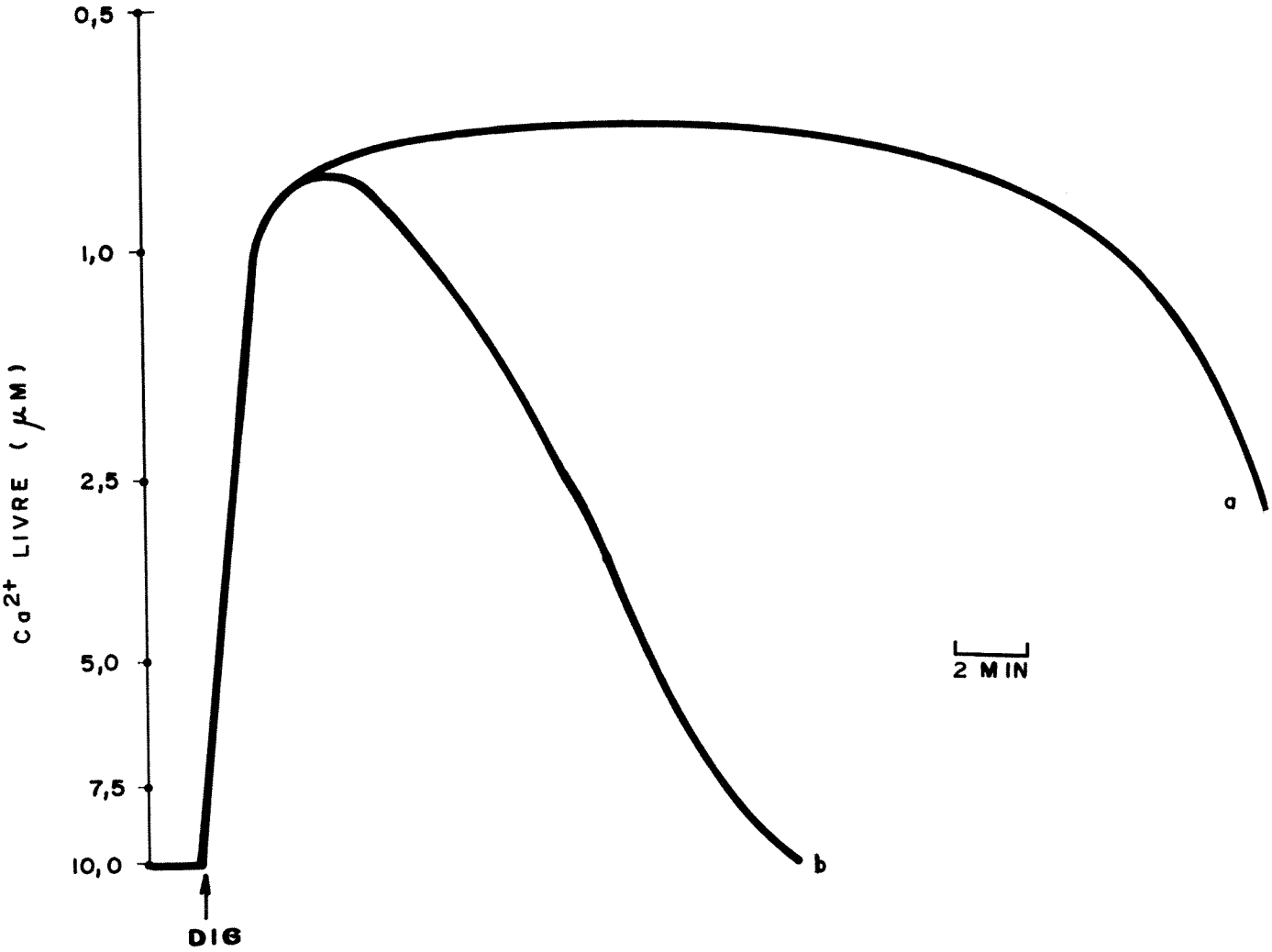


FIGURA 16 : EFEITO DA THQ SOBRE A CAPTAÇÃO DE Ca^{2+} POR MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS V79 EM SUSPENSÃO

Ensaios contendo 2 x 10^6 células em 0,25 ml de meio de reação (KCl 130mM, Hepes 10mM (ph 7,2), $MgCl_2$ 2mM e KH_2PO_4 1mM) foram incubados na ausência (curva *a*) ou presença (curva *b*) de THQ 0,5 mM durante o tempo de medida da captação de Ca^{2+} (20 minutos, 28 ^oC). A captação de Ca^{2+}, iniciada pela adição de digitonina 0,01% (representada pela flecha), foi medida através do emprego de um eletrodo seletivo para cálcio, como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS, ítem 2.6.1.

O gráfico representa um experimento típico, realizado em triplicata.

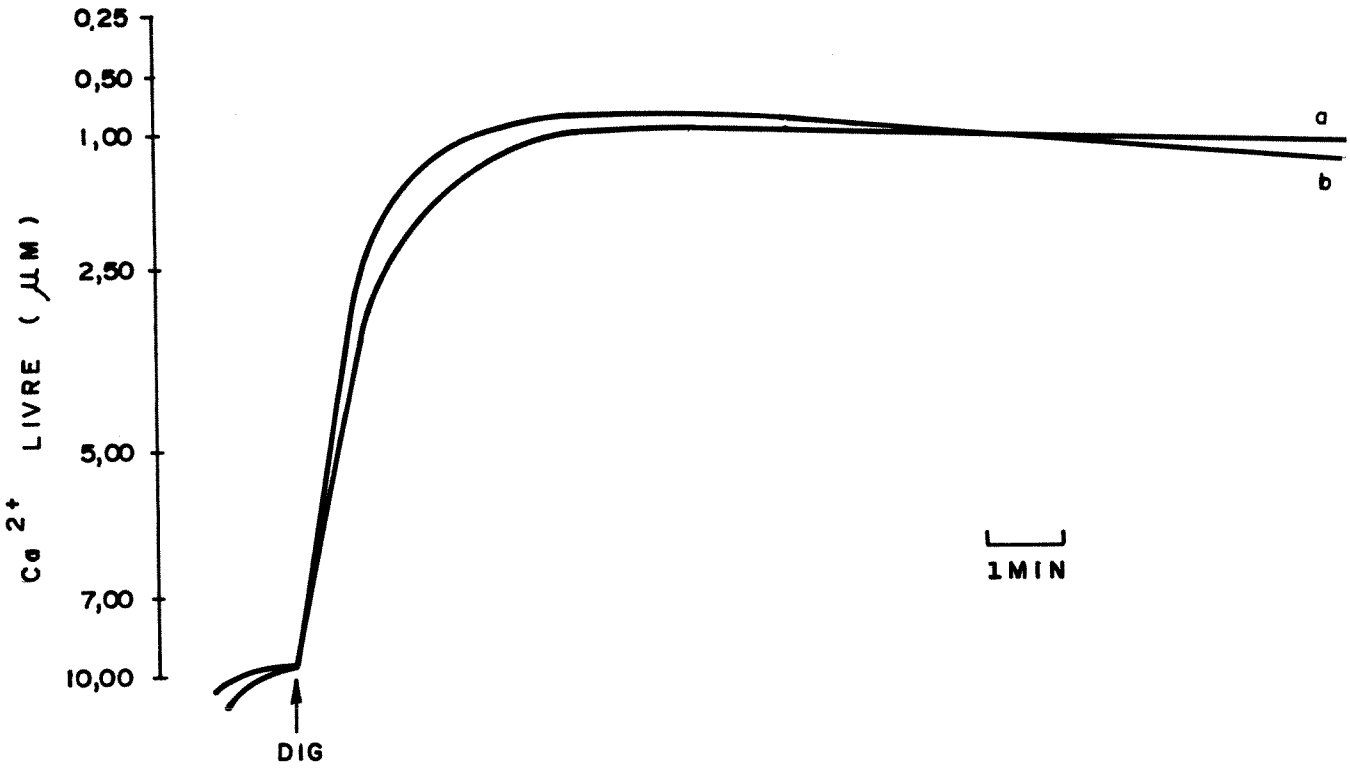


FIGURA 17 : CAPTAÇÃO DE Ca^{2+} POR MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS V79 *in situ* APÓS A EXPOSIÇÃO A THQ

Culturas semi-confluentes de células V79 foram incubadas na ausência (curva *a*) ou presença (curva *b*) de THQ 0,5mM (PBS-Ca^{2+}, 30 min., 37 ^{o}C), após o que as células foram descoladas por tripisinização, e então suspensas em meio para a realização dos ensaios de medida da captação de Ca^{2+}, como descrito na figura anterior.

O gráfico representa um experimento típico, realizado em duplicata.

IV. DISCUSSÃO

A citotoxicidade de um grande número de xenobióticos está claramente relacionada com suas estruturas de quinonas, dentre eles a grande maioria dos quimioteráticos antitumorais (POWIS, 1989). Entretanto os estudos dos mecanismos de ação desses compostos são dificultados pela complexidade estrutural e reatividade química das moléculas. Neste sentido, a simplicidade estrutural das benzoquinonas as qualifica como modelos adequados para o desenvolvimento de estudos mecanísticos. Dentre os derivados da benzoquinona, aqueles contendo hidroxi-substituíntes apresentam maior velocidade de auto-oxidação, com conseqüente aumento na produção de EAO (BRUNMARK e CADENAS, 1989). A demonstração de que a THQ, uma benzoquinona que possui 4 hidroxi-substituíntes, realmente apresenta alta velocidade de auto-oxidação produzindo um surto de EAO (HOFFMANN e col, 1987), caracterizou esta molécula como modelo interessante para o desenvolvimento de estudos sobre o mecanismo de ação de quinonas e sobre o estresse oxidativo.

Neste trabalho, mostramos primeiramente que a THQ é altamente tóxica para fibroblastos em cultura. A citotoxicidade da THQ foi evidenciada pela sua capacidade de inibir a proliferação celular de fibroblastos V79 (figura 1). A faixa de concentração efetiva se situa em valores relativamente baixos (0,05 a 0,35mM), obtendo-se

uma ID_{50} de 0,13 mM, nas condições deste tipo de experimento. Essas condições de exposição (24 horas em meio de cultura) são similares aquelas usadas por SHOPSIS e col. (1985), para avaliar a toxicidade de diversas drogas, comparativamente, através da determinação da "dose mais alta tolerada" (HTD) por fibroblastos 3T3, acima da qual ocorrem alterações morfológicas nas células. A ID_{50} da THQ se situa numa faixa de concentração correspondente a agentes classificados como tóxicos severos, como o hipoclorito de sódio (HTD= 1,0 mM) e o nitrato de prata (HTD= 0,01 mM). Em concentrações inferiores a 0,05 mM a THQ não causa inibição significativa da proliferação celular, provavelmente devido à uma baixa incidência de lesões e/ou à eficiência de seu reparo pelas células. Em concentrações superiores a 0,33 mM (proliferação relativa = 0,0) verifica-se o descolamento de células mortas das placas de cultura, obtendo-se índices de proliferação negativos. A exposição das células em meio de cultura, embora mais adequada em termos de comparação com as condições de sistemas <u>in vivo</u>, é um fator complicador nos estudos de mecanismo de ação, devido a possíveis interferências dos componentes do soro e do próprio meio na reatividade de uma substância (STARK e col, 1986).

Visando a realização de experimentos para esclarecer o papel do cálcio e das EAO na citotoxicidade da THQ tornou-se necessário realizar a exposição das células em tampão (PBS), e reduzir o tempo de tratamento (30 minutos) com a droga. Nessas condições, verificamos que o Ca^{2+}, em concentrações fisiológicas (1 mM), potencializa intensamente o efeito inibitório da THQ sobre a

proliferação (figura 2). O aumento da inibição da proliferação celular na presença de Ca^{2+}, observado a partir de 0,1 mM de THQ, é máximo (cerca de 4 vezes) em concentrações entre 0,5 e 1,0 mM. Assim, por exemplo, enquanto que a inibição causada por THQ 1,0 mM isoladamente é de apenas 25%, ela é quase total na presença de 1 mM de Ca^{2+}. Em acordo com este resultado, verificamos que o quelante intracelular de Ca^{2+} FURA 2 confere proteção parcial da inibição da proliferação celular causada por THQ 0,5 mM, indicando que a diminuição da concentração intracelular de Ca^{2+} livre leva a uma diminuição da toxicidade da THQ para fibroblastos V79.

Estudos sobre o mecanismo de citotoxicidade de uma série de derivados da benzoquinona (ROSSI e col, 1986) mostraram que a hepatotoxicidade de algumas dessas moléculas era realmente mediada pela indução de um estresse oxidativo, mas de outras, era dependente da ocorrência de reações de adição nucleofílica a glutationa e/ou proteínas. No caso da THQ, a comprovação da formação de EAO em solução sugere a predominância do primeiro tipo de mecanismo. O desaparecimento do efeito inibitório da THQ sobre a proliferação celular pela estocagem da solução (figura 4) mostra que, o efeito citostático é dependente de espécies transientes da reação de auto-oxidação. O envolvimento das EAO neste processo foi evidenciado pela proteção total da inibição da proliferação celular conferida pela catalase (figura 5) indicando o papel central do peróxido de hidrogênio nesse mecanismo. Entretanto, essa inibição não pode ser atribuída a uma ação direta deste oxidante, uma vez que a diminuição do efeito inibitório com a

estocagem da solução (figura 4) não é acompanhada por uma queda paralela da concentração de peróxido de hidrogênio nas soluções estocadas de THQ (ARÉVALO, 1990). Em adição a isto, esta espécie é considerada um oxidante fraco, e a maior parte de seus efeitos biológicos são atribuídos à sua capacidade de gerar radical hidroxila (PRYOR, 1986). Entretanto, não conseguimos evidenciar diretamente a participação deste radical no processo de inibição da proliferação celular utilizando sequestradores específicos, como o manitol e o benzoato de sódio (figura 7), uma vez que, apenas o manitol apresentou um pequeno efeito protetor. Consideramos entretanto, que esta ausência de efeito protetor não exclui a participação dos radicais hidroxila no processo, devido as restricões de difusão dos sequestradores através da membrana plasmática, e ao pequeno tempo de vida do radical hidroxila associado a sua alta reatividade. Resultados similares obtidos por YOUNGMAN e ELSTENER (1981) com paraquat levou-os a propor a formação de radicais HO· presos ("crypto OH·"), muito próximos dos seus sítios de ação. Também no caso da inibição da síntese de DNA por THQ só foi possível detectar proteção deste efeito com o sequestrador de HO· etileno glicol, em células permeabilizadas com digitonina (ARÉVALO, 1990).

A ausência de proteção da inibição da proliferação celular por ofenantrolina (figura 6), numa condição em que é capaz de proteger efetivamente as células contra a toxicidade do peróxido de hidrogênio (MELLO-FILHO e col, 1984), sugere que a produção de radicais hidroxila a partir de THQ não ocorre pela reação de

Fenton, a principal via de formação destes radicais em sistemas biológicos (MENEGHINI, 1988). Resultados similares foram obtidos por ARÉVALO (1990), levando a proposição da ocorrência da reação de Fenton orgânica, entre o peróxido de hidrogênio e o radical semiquinona, como a principal via de produção dos radicais hidroxila durante o processo de inibição da replicação do DNA por THQ. Esta reação foi primeiramente proposta para explicar o mecanismo de cardiotoxicidade da quinona adriamicina (NOHL e JORDAN, 1983), e posteriormente, sugerida como a fonte de produção fisiológica de radicais hidroxila através do ciclo redox de quinonas biológicas (NOHL e JORDAN, 1986).

Embora o radical semiquinona não seja mais detectado na solução de THQ após 30 minutos da dissolução, ele pode estar sendo gerado intracelularmente através do ciclo redox do ácido rodizônico. Esta hipótese é amparada por dados espectroscópicos que mostram que a transformação completa da THQ em ácido rodizônico ocorre em poucos minutos (2 minutos) de reação (RETTORI e HOFFMANN, dados não publicados).

A ausência de proteção por superóxido dismutase (figura 5) descarta a participação direta de radicais superóxido extracelulares na inibição da proliferação celular por THQ, uma vez que este oxidante não atravessa livremente as membranas biológicas (HALLIWELL e GUTERIDGE, 1989). Entretanto, não descartamos um possível envolvimento de radicais superóxido gerados intracelularmente através do ciclo redox do ácido

rodizônico.

O efeito citostático da THQ aqui evidenciado, aliado à demostração de sua ação genotóxica (ARéVALO, 1990), sugere que o genoma constitue um alvo celular importante no mecanismo de ação desta hidroxiquinona. Buscando estabelecer uma correlação entre o efeito citostático e clastogênico da THQ, analisamos a participação do Ca^{2+} na fragmentação do DNA de células V79. A figura 8 mostra que, também a produção de quebras de fita simples no DNA é fortemente potencializada por Ca^{2+} exógeno. AS figuras 2 e 8 mostram que, tanto a inibição do crescimento, como a fragmentação do DNA, ocorrem de maneira limitada (máximo de 25%) na ausência de Ca^{2+}. As curvas mostram também que a intensificação dos dois processos é dependente de Ca^{2+}, sugerindo que alterações da homeostase intracelular deste íon possam constituir um sinal comum para o desencadeamento de ambos os processos.

Em favor desta hipótese, mostramos que ocorre efetivamente uma elevação da concentração citosólica de Ca^{2+} em células V79 expostas a THQ em presença de cálcio (figura 10), passando de cerca de 70 nM em células controle para 500 nM em células tratadas. Esse influxo de Ca^{2+} extracelular para o citosol não acontece, provavelmente, em conseqüência de alterações da permeabilidade da membrana plasmática nas células expostas a THQ, uma vez que essa hidroxiquinona não é capaz de causar alterações da integridade da membrana de eritrócitos (ARéVALO, 1990). É mais provável que o maior influxo de cálcio seja conseqüência da

indução de alterações estruturais em proteínas da membrana, particularmente aquelas envovidas com o transporte de Ca^{2+} através da membrana plasmática. Esta hipótese encontra suporte na observação de que a atividade da Ca^{2+}ATPase da membrana plasmática de hepatócitos é dependente do estado reduzido de seus grupos SH (BELLOMO e col, 1983). Desta forma, a oxidação de proteínas transportadoras de Ca^{2+} por EAO geradas pela THQ poderia causar sua inativação, com conseqüente alteração da homeostase intracelular de Ca^{2+}.

Nossos dados estão de acordo com resultados da literatura recente, que mostram a relação entre alterações da homeostase intracelular de Ca^{2+} e a citotoxicidade e/ou genotoxicidade de pró-oxidantes. Essa relação foi reportada por NICOTERA e col. (1988), que verificaram que a citotoxicidade dos oxidantes mendiona e terc-butil hidroperóxido para hepatócitos de rato ocorre em paralelo a um aumento na concentração citosólica de Ca^{2+}. Também com o peróxido de hidrogênio, foi verificada uma proteção total do efeito citotóxico e genotóxico para fibroblastos 3T3 com o quelante intracelular de Ca^{2+} QUIN 2 (CANTONI e col, 1989). Recentemente, utilizando diferentes oxidantes, LEANDERSON e TAGESSON (1992) mostraram que a formação de quebras de fita simples no DNA de células de pulmão humano é prevenida com a utilização do quelante intracelular de Ca^{2+} BAPTA, e do ácido aurintricarboxilico (AT), um inibidor específico de uma endonuclease dependente de Ca^{2+} (COHEN e DUKE, 1984). A participação do íon Ca^{2+} em processos genotóxicos foi também

recentemente evidenciada pela ativação de oncogenes em células epiteliais de rato expostas ao estresse oxidativo gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase (MAKI e col, 1992).

Outro enfoque do nosso trabalho consistiu na investigação do possível papel da mitocôndria como alvo da toxicidade da THQ. Os suportes principais desta idéia foram duas linhas de evidências : 1) o fato de que pró-oxidantes na presença de Ca^{2+} causam danos estruturais e funcionais em mitocôndrias isoladas (MACEDO e col, 1988; CARBONERA e AZZONE, 1988); e 2) as evidências de que as mitocôndrias representam alvos críticos na morte de hepatócitos em condições de estresse oxidativo (MASAKI e col, 1989).

Analisando os efeitos da THQ em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, verificamos que esta hidroxiquinona realmente induz alterações da integridade funcional e estrutural da membrana interna mitocôndrial, causando permeabilização para o Ca^{2+} de maneira dependente da dose (figura 11). As mitocôndrias perdem progressivamente a capacidade de captação e retenção do Ca^{2+} a medida que se aumenta a concentração de THQ no meio de reação, de 0,2 a 1,0 mM.

O aumento da permeabilidade da membrana mitocôndrial interna para o Ca^{2+} é acompanhado por um rápido declínio do potencial elétrico de membrana, nas mitocôndrias expostas a concentrações tóxicas de THQ (0,5 mM). A dissipação do $\Delta\Psi$ ocorre com maior velocidade em mitocôndrias expostas a soluções recém dissolvidas

de THQ do que a soluções previamente estocadas por 15 ou 75 minutos (figura 12), indicando o envolvimento de espécies transientes da reação de auto-oxidação. Evidenciamos que o peróxido de hidrogênio desempenha um papel central no mecanismo de alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, uma vez que a catalase conferiu proteção total deste efeito (figura 13). Nas mesmas condições, a superóxido dismutase intensifica o efeito da THQ, o que pode ser explicado pela formação adicional de peróxido de hidrogênio pela dismutação de radicais superóxido. O íon ferro não parece estar envolvido na permeabilização mitocondrial pela THQ, como sugerido pela ausência de proteção na presença de *o*fenantrolina (figura 13), como anteriormente observado nos experimentos de proliferação celular.

Mostramos também que o processo de permeabilização da membrana mitocôndrial interna pela THQ é um evento completamente dependente de Ca^{2+}, como evidenciado por : a) a proteção total do colapso de $\Delta\Psi$ conferida por EGTA (figura 14, curvac); b) a restauração completa do $\Delta\Psi$ colapsado após a remoção do íon Ca^{2+} do meio (figura 14, curva *b*); c) a potencialização do efeito da THQ sobre o $\Delta\Psi$ por adição de Ca^{2+} extra (figura 15).

Nossos resultados com mitocôndrias isoladas estão de acordo com outros obtidos pelo grupo do Dr. Vercesi (FAGIAN e col, 1990; VALLE, 1992), demonstrando a dependência de Ca^{2+} para a indução da permeabilização da membrana mitocôndrial interna por pró-oxidantes, como o terc-butil hidroperóxido e a diamida. Esse

fenômeno foi explicado com base na produção de agregados protéicos na membrana mitocondrial interna, pela oxidação de grupos SH de proteínas por EAO (FAGIAN e col, 1990), cuja formação seria facilitada e estabilizada por mudanças conformacionais induzidas em proteínas da membrana pelo íon Ca^{2+} (PEREIRA e col, 1992). Além disso, foi evidenciado que o íon Ca^{2+} pode atuar na regulação da produção de EAO por mitocôndrias de células expostas a quinona doxorubicina (CHACON e ACOSTA, 1991).

Procurando estabelecer o papel das mitocôndrias como alvo crítico do estresse oxidativo nas células, analisamos a captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de fibroblastos V79 expostos a THQ. A medida do transporte de Ca^{2+} in situ requer a utilização de células em suspensão permeabilizadas com digitonina. Nessas condições, as células V79 captam Ca^{2+} do meio de reação, tamponando a concentração extracelular entre 0,5 e 1,0 μM, como mitocôndrias isoladas, durante cerca de 20 minutos (figura 16, curva *a*). O tratamento de células em suspensão com THQ, durante o tempo de medida do transporte de Ca^{2+}, causa alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, como evidenciado pela liberação de cálcio, imediatamente após sua captação (figura 16, curva *b*).

Entretanto, quando a exposição a THQ é realizada previamente à medida do transporte de Ca^{2+}, com células intactas e metabolicamente ativas, não se observam alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial, como mostrado pela

similaridade da cinética de transporte de Ca^{2+} das células controle e tratadas (figura 17). Como nessas condições a THQ causa uma elevação da concentração citosólica de Ca^{2+} (figura 10), a explicação do fato acima pode residir na rápida reversão das modificações estruturais da membrana em células metabolicamente competentes, e/ou na rápida recompartimentalização do cálcio citosólico, após o desaparecimento do estresse oxidativo. É possível que esta reversibilidade esteja relacionada com a eficiência de dois tipos de mecanismos : de um lado a indução de lesões, e de outro, a operação dos mecanismos celulares de defesa. É possível que, em função do grande número de células neste tipo de experimento, a concentração de THQ tenha sido relativamente baixa, causando um número de lesões suficientemente pequeno capaz de ser eficientemente revertido pelas células. Recentemente, o problema da reversibilidade dos eventos causados pelo estresse oxidativo foi discutido por HALLECK e col. (1992), que mostraram a ocorrência de eventos transientes e permanentes, em função da concentração utilizada de peróxido de hidrogênio. Esses autores propuseram que a morte celular é causada por uma elevação permanente da concentração intracelular de Ca^{2+} e uma diminuição permanente dos níveis celulares de ATP.

A definição dos eventos deletérios que constituem os eventos letais nas células expostas a THQ é um problema bastante complexo, cujo esclarecimento requer uma análise da contribuição efetiva de cada tipo de lesão na indução da morte celular. Aqui, será importante considerar em cada caso, a natureza da lesão bem como

os mecanismos de sua formação e reversão nas células.

Nesse sentido, iniciamos os estudos de reversibilidade das lesões induzidas pela THQ analisando a cinética de reparo das quebras causadas no DNA. Verificamos que a recuperação do DNA após a fragmentação induzida por THQ é rápida, e quase total no período de 24 horas (figura 9). O fato de que na concentração de THQ utilizada (0,5 mM) ocorre um decrescimo da população celular de cerca de 50% no período de 24 horas subseqüente ao tratamento (figura 2), nos leva a considerar que são as lesões que não são revertidas nesse intervalo de tempo que constituem os eventos responsáveis pela inibição do crescimento e morte celular. Assim, parece-nos que as quebras de fita simples no DNA não constituem eventos letais na toxicidade da THQ para fibroblastos V79. Entretanto, isto não descarta a possibilidade de que o DNA constitua um alvo importante no mecanismo de ação da THQ, uma vez que, outras lesões oxidativas, como alterações de bases do DNA, podem estar sendo produzidas pelas EAO geradas. Diversas alterações de bases do DNA já foram identificadas em condições oxidativas (DIZDAROGLU, 1991), o que abre novas perspectivas de estudo sobre o significado de cada uma na indução de mutagênese, carcinogênese e morte celular.

Nossos resultados não finalizam os estudos sobre o mecanismo de ação da THQ, mas pelo contrário, abrem diversas e interessantes perspectivas de sua continuidade. Pretendemos definir prioritariamente os tipos de alterações e as condições em que são

induzidas irreversivelmente, visando estabelecer sua significância no mecanismo de morte celular.

Acreditamos que o esclarecimento do mecanismo de ação da THQ deverá contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação de outras quinonas biologicamente ou farmacologicamente importantes, como os quimioterápicos antitumorais. Além disto, os estudos de toxicidade celular de quinonas são importantes para o entendimento dos efeitos colaterais destes quimioterápicos. Neste sentido, e em concordância com nossos resultados, foi recentemente evidenciado que lesões em mitocôndrias induzidas por EAO e Ca^{2+} podem estar relacionadas com os efeitos cardiopáticos de quinonas usadas como quimioterápicos (CHACON e ACOSTA, 1991; PARAIDATHATHU e col, 1992).

V.SUMÁRIO

A THQ é uma hidroxiquinona que auto-oxida rapidamente em solução gerando radicais semiquinona e espécies ativadas de oxigênio, o que produz uma situação de estresse oxidativo. Neste trabalho, investigamos a participação do íon Ca^{2+} no mecanismo de citotoxicidade da THQ, e analisamos o possível papel do DNA e da mitocôndria como alvos celulares da ação da THQ. Demonstramos que a reação de auto-oxidação da THQ causa efeitos tóxicos em células de mamíferos (linhagem V79), como : i) a inibição da proliferação celular; ii) a fragmentação do DNA celular; e iii) a alteração da membrana mitocondrial interna. Estudos de proteção evidenciaram que a espécie oxidante responsável pelo efeito citostático e pelas alterações mitocondriais é o peróxido de hidrogênio, e que esses efeitos são provavelmente causados pela reação do H_2O_2 com os radicais semiquinona, gerando radicais hidroxila. Mostramos também que o íon Ca^{2+} tem um papel fundamental na citotoxicidade da THQ, participando dos 3 mecanismos acima descritos. Enquanto que nos dois primeiros processos se observa uma potencialização dos efeitos da THQ na presença de Ca^{2+}, a produção das alterações mitocondriais é completamente dependente de sua presença. Finalmente, evidenciamos que células V79 possuem mecanismos para reverter tanto as quebras de DNA quanto as lesões mitocondriais . Isto sugere que a indução dessas lesões deverá interferir com o crescimento celular somente quando os sistemas celulares responsáveis por sua reversão estiverem saturados, caracterizando uma condição de irreversibilidade que conduz a morte celular.

VI.SUMMARY

THQ is a hydroxyquinone wich autoxidases readily in aqueous solution producing semiquinone radicals and active oxygen species, that leeds to a condition of oxidative stress. In this work we describe the involvement of Ca^{2+} in the mechanism of THQ induced cytotoxicity and analyse the possible roles of DNA and mitochondria as critical targets for THQ toxicity. Our studies show that during THQ autoxidation deleterious effects are generated in mammalian fybroblasts (V79 line), such as : i) inhibition of cell proliferation; ii) induction of DNA breaks; and iii) alteration of inner mitochondrial membrane permeability. Protection experiments with antioxidants showed that both, growth inhibition and mitochondrial damage results from hydrogen peroxide dependent and metal independent reactions, probably via hydroxyl radical generation. We also report here the crucial role of Ca^{2+} on THQ cytotoxicity, increasing the inhibition of cell proliferation and the levels of DNA breakage. In addition, our results evidenciated that mitochondrial membrane permeability by THQ results from a Ca^{2+} dependent mechanism. It is also showed that V79 cells are able to repair the THQ induced DNA breaks and restore mitochondrial functions. It is hypothesized that irreversible oxidant injury occurs when the cellular antioxidant mechanisms ocerwhelmed and the cell is no longer able to survive.

VII.BIBLIOGRAFIA

-ARÉVALO, A.M. (1990). Estudo da ação citotóxica da Tetrahidroxibenzoquinona (THQ) como modelo de estresse oxidativo. Tese de Mestrado apresentada ao Depto. de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

-BEATRICE, M.C.; STIERS, D.L. e PFEIFFER, D.R. (1984). The role of glutathione in the retantion of Ca^{2+} by liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, *259* : 1279 - 1287.

-BELLOMO, G.; JEWELL, S.A.; THOR, H. e ORRENIUS, S. (1982). Regulation of intracellular calcium compartmentation : studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. *Proc. Natl. Acd. Sci. USA*, *79* : 6842 - 6846.

-BELLOMO, G.; MIRABELLI, F.; RICHELMI, P. e ORRENIUS, S. (1983). Critical role of sulfydryl group(s) in the ATP-dependent Ca^{2+} sequestration by the plasma mebrane fraction from rat liver. *FEBS Lett.*, *163* : 136 - 139.

-BOVERIS, A.; OSHINO, N. e CHANCE, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, *128* : 617 - 630.

-BRUNMARK, A. e CADENAS, E. (1989). Redox and addition chemistry

of quinoid compounds and its biological implications. *Free Rad. Biol. & Med.*, 7 : 435 - 477.

-BURGESS, J. e PRINCE, R.H. (1965). Kinetics of reaction of ligant-substituted Tris-(2,2 bipyridil) iron II complexs. *J. Chem. Soc.*, V : 6061 - 6066.

-CAMPBELL, A.K. (1983). Intracellular Ca^{2+} : its universal role as regulator. John Wiley and Sons, Ltda., London.

-CANTONI, O.; SESTILI, P.; CATABENI, F.; BELLOMO,G.; POU, S.; COHEN, M. e CERUTTI, P. (1989). Calcium chelator QUIN-2 prevents hydrogen-peroxide-induced DNA breakage and cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*, *182* : 209 - 212.

-CARAFOLI, E. (1987). Intracellular calcium homeostases. *Ann. Rev. Biochem.*, *56* : 395 - 433.

-CARBONERA, D. e AZZONE, G.F. (1988). Permeability of inner - mitochondrial membrane and oxidative stress. *Biochem. Biophys. Acta*, *943* : 245 - 255.

-CERUTTI, P. (1985). Prooxidant state and tumor promotion. *Science*, *227* : 375 - 381.

-CHACON, E. e ACOSTA, D. (1991). Mitochondrial regulation of superoxide by Ca^{2+} : an alternate mechanism for the cardiotoxicity of doxorubicin. *Toxicol. and Applied*

Pharmacol., *107* : 117 - 128.

-CLEAVER, J.E. (1984). DNA repair and replication. em "Biochemical Mechanisms of Genetic Disorders". BENKE, P.J. Ed., Dekker, New York.

-COHEN, J.J. e DUKE, R.L. (1984). Glucocorticoid-activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Imunnol.*, *132* : 38 - 42.

-COLEMAN, J.B.; GILFOR, D. e FARBER, J.L. (1989). Dissociation of the accumulation of single-strand breaks in DNA from the killing of cultured hepatocytes by an oxidative stress. *Mol. Pharmacol.*, *36* : 193 - 200.

-COTTON, M.L. e DUNFORD, H.B. (1973). Studies on horseradish peroxidase XI. On the nature of compounds I and II as determined from kinetics of the oxidation of ferrocyanide. *Can. J. Chem.*, *51* : 582 - 587.

-CROMPTON, M. e COSTI, A. (1988). Kinetic evidences for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+}, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial disfunction during cellular Ca^{2+} overload. *Eur. J. Biochem.*, *178* : 489 - 501.

-DIZDAROGLU, M. (1991). Chemical determination of free radical induced damage to DNA. *Free Rad. Biol. Med.*, *10* : 225 - 242.

-DiMONTE, D.; BELLOMO, G.; THOR, H.; NICOTERA, P. e ORRENIUS, S. (1984). Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alterations in intracellular Ca^{2+} homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.*, *235* : 343 - 350.

-FAGIAN, M.M.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; MARTINS, I.S. e VERCESI, A.E. (1990). Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. *J. Biol. Chem.*, *265* : 19995 - 19960.

-FISKUM, G.; CRAIG, S.W.; DECKER, G.L. e LEHNINGER, A. (1980). The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *77* : 3430 - 3434.

-FLOHÉ, L.; BECKMANN, R.; GIERTZ, H. e LOSCHEN, G. (1985). Oxygen -centered free radicals as mediators os inflammation. em "Oxidative Stress", SIES, H. Ed., Academic Press, London, cap. 17.

-FLAIG, W.; BEUTELSPACHER, H.; RIEMER, H.; KÄLKE, E. (1968). Einfluss von substituinten auf das redox potential substituerter benzochinone-(1,4). *Liebigs. Ann. Chem.*, *719* : 96 - 111.

-GORNAL, A.G.; BARDWILL, C.J. e DAVID, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, *177* : 751.

-GREEN, M.J. e HILL, H.A.O. (1984). Chemistry of dioxygen. *Meth. Enzimol.*, *105* : 3 - 22.

-GUNTER, T. e PFEIFFER, D.R. (1990). Mechanism by wich mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.*, *258* : C755 - C786.

-HALLBERG, E. e RYDSTRON, J. (1989). Selective oxidation of mitochondrial glutathione in cultured rat adrenal cells and its relation to policiclic aromatic hydrocarbon - induced cytotoxicity. *Arch. Biochem. Biophys.*, *270* : 662 - 671.

-HALLECK, M.M; RICHBURG, J.H. e KAUFFMAN, F.C. (1992). Reversible and irreversible oxidant injury to PC12 cells by hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. & Med.*, *12* : 137 - 144.

-HALLIWELL, B. (1978). Superoxide-dependent formation of hydroxil radicals in the presence od iron chelates. Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Lett.*, *92* : 321 - 326.

-HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J.M.C. (1989). "Free Radicals in Biology and Medicine ", 2ª Ed., Clarendon Press, Oxford.

-HARMAN, D. (1981). The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *78* : 7124 - 7128.

-HARTWELL, L.H. e WEINERT, T. (1989). Checkpoints : controls that

ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246 : 629 - 634.

-HOFFMANN, M.E. e MENEGHINI, R. (1979). Action of hydrogen peroxide on human fibroblasts in culture. *Photochem. Photobiol.*, 30 : 151 - 155.

-HOFFMANN, M.E.; CIAMPI, D.B. e DURAN, N. (1984). Cytotoxicity and DNA damage activities of Tetrahydroxy-1,4 Quinone : mediation of hydrogen peroxide. *IV Congresso PAABS*, Buenos Aires, Argentina, 4 a 8 novembro.

-HOFFMANN, M.E.; CIAMPI, D.B. e DURAN, N.(1987). The autooxidation of 2,3,5,6, tetrahydroxy-2,5-cyclohexadiene 1,4 dione under physiological conditions. *Experimentia*, 43 : 217 - 220.

-HOLMSEN, H.; ROBKIN, L. (1977). Hydrogen peroxide lowers ATP levels in platelets without altering adenilate energy charge and platelet function. *J. Biol. Chem.*, 252 : 1752 - 1757.

-JAMIESON, D.; CHANCE, B.; CADENAS, E. e BOVERIS, A. (1986). The relation of free radical production to hiperoxia. *Ann Rev. Physiol*, 48 : 703 - 719.

-JAMIESON, D. (1989). Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolism in mammals. *Free Rad. Biol. & Med.*, 7 : 87 - 108.

-KAMO, N.; MARATSUGU, M.; HONGOH, R. e KOBATAKE, J. (1979).

Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenilphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Memb. Biol.*, 49 : 105 - 121.

-KAPPUS, H. (1985). Lipid peroxidation : mechanisms, analysis, enzimology and biochemical relevance. em "Oxidative Stress", SIES, H. Ed, Academic Press, London.

-LEANDERSON, P. e TAGESSON, C. (1992). Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells : role of hydroxyl radicals and endonulease activation. *Chem.-Biol. Interac.*, 81 : 197 - 208.

-LEHNINGER, A.L.; VERCESI, A.E. e BABABUNMI, E.A. (1978). Regulation of Ca^{2+} realease from mitochondria by the oxidation-reduction state of piridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 : 1690 - 1694.

-LINDAHL, T. e NYBERG, B. (1972). Rate of depurination of native deoxiribonucleic acid. *Biochemistry*, 11 : 3610 - 3618.

-MACEDO, D.V.; FERRAZ, V.L.; PEREIRA-DA-SILVA, L. e VERCESI,A.E. (1988). em "Integration of Mitochondrial Functions". LEMASTER, J.J. Ed., Plenum Publishing Corporation, New York, pp 535 - 542.

-MAKI, A.; BEREZESKY, I.K.; FARGNOLI, J.; HALBROOK, N.J. e TRUMP,

B.F. (1992). Role of $[Ca^{2+}]_i$ in induction of c-fos, c-jun, and c-myc mRNA in rat PET after oxidative stress. *FASEB J.*, 6 : 919 - 924.

-MASAKI, N.; KYLE, M.E.; SERRONI, A. e FARBER, J.L. (1989). Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultered hepatocytes by tert-Butyl hydroperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, *270* : 672 - 680.

-McCONKEY,D.; HARTZELL, P.; NICOTERA, P. e ORRENIUS, S. (1989). Calcium-acticated DNA fragmentation kills imature thymocytes. *FASEB J.*, 3 : 1843 - 1849.

-McCORD, J.M. e FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, *244* : 6049 - 6055.

-MELLO-FILHO, A.C.; HOFFMANN, M.E. e MENEGHINI, R. (1984). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracllular iron. *Biochem. J.*, *218* : 273 - 275.

-MENEGHINI, R. (1988). Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. *Mut. Research*, *195* : 215 - 230.

-MIRABELA, F.; SALIS, A.; VAIRETTI, M.; BELLOMO, G.; THOR, H. e ORRENIUS, S. (1989). Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and Ca^{2+}-dependent mechanisms. *Arch. Biochem. Biophis.*, *270* : 478 - 488.

-MOORE, G.A.; O'BRIEN, P.J. e ORRENIUS, S. (1986). Menadione (2-methyl-1,4-naphtoquinone)-induced Ca^{2+} release from rat liver mitochondria is caused by NAD(P)H oxidation. *Xenobiotica*, *16* : 873 - 882.

-NAQUI, A.; CHANCE, B. e CADENAS, E. (1986). Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.*, *55* : 137 - 166.

-NICHOLS, D.G. e CROMPTON, M. (1980). Mitochondrial calcium transport. *FEBS Lett.*, *111* : 261 - 268.

-NICOTERA, P.; McCONKEY, D.; SVENSSON, S-Ä; BELLOMO, G. e ORRENIUS, S. (1988). Correlation between cytosolic Ca^{2+} concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology*, *52* : 55 - 63.

-NICOTERA, P.; BELLOMO,G. e ORRENIUS, S. (1992). Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *32* : 449 470.

-NOHL, H. e JORDAN, W. (1983). $OH^{\cdot}$ generation by adriamycin semiquinone and H_2O_2 : an explanation for the cardiotoxicity of antracycline antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Comunn.*, *114* : 197 - 205.

-NOHL, H. e JORDAN, W. (1987). The involvement of biological quinones in the formation of hydroxyl radicals via the

Harber-Weiss reaction. *Bioorganic Chem.*, *15* : 374 - 382.

-NOHL, H.; JORDAN, W. e YOUNGMAN, R.J. (1986). Quinones in biology: functions in electron transfer and oxygen activation. *Adv. in Free Rad. Biol. & Med.*, *2* : 211 - 279.

-NUNEZ, M.T.; COLE, E.S. e GLASS, J. (1983). The reticulocyte plasma membrane pathway of iron uptake as determined by the mechanism of 2,2-dipyridyl inhibition. *J. Biol. Chem.*, *258* : 1146 - 1151.

-O'BRIEN, P.J. (1991). Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem. - Biol. Interac.*, *80* : 1 - 41.

-OLIVE, P. (1988). DNA precipitation assay : a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutag.*, *11* : 487 - 495.

-ORRENIUS, S.; McCONKEY, D.J. e NICOTERA, P. (1989). Role of calcium in oxidative cell injury. em "Cell Calcium Metabolism : physiology, biochemical, pharmacology and clinical implications. Cap. 47. FISKUM, G. Ed. Plenum Press, New York.

-PAINTER, R.B. (1977). Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature*, *265* (5595) : 650 - 651.

-PARAIDATHUTHU, T.; GROOT, H. e KEHER, J.P. (1992). Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat

heart tissue. *Free Rad. Biol. Med.*, *13* : 289 - 298.

-PARK, J.-W. e FLOYD, R.A. (1992). Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Rad. Biol. & Med.*, *12* : 245 - 250.

-PEREIRA, R.S.; BERTOCHI, P.F. e VERCESI, A.E. (1992). The protective effect of trifluoperazine on the mitochondrial damage induced by Ca^{2+} plus prooxidants (submetido).

-POWIS, G. (1987). Metabolism and reactions of quinoid anticancer agents. *Pharmacol. & Therap.*, 35 : 57 - 162.

-POWIS, G. (1989). Free radical formation by antitumor quinones. *Free Rad. Biol. & Med.*, *6* : 63 - 101.

-PRYOR, W.A. (1986). Oxyradicals and related species : their formation, lifetimes and reactions. *Ann. Rev. Phisiol.*, *48* : 657 - 667.

-PRYOR, W.A. (1988). Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA ? Hypothesis : it has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity and a mode of production that can occur near DNA. *Free Rad. Biol. & Med.*, *4* : 219 - 233.

-REED, D.J. (1990). Glutathione : toxicological implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *30* : 603 - 631.

-RICHTER, C. e FREI, B. (1988). Ca^{2+} realese from mitochondria induced by prooxidants. *Free Rad. Biol. & Med.*, 4 : 365 - 375.

-ROSSI, L.; MOORE, G,A.; ORRENIUS, S. e O'BRIEN, P.J. (1986). Quinone toxicity in hepatocyets without oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.*, *251* : 25 - 35.

-SCHANNE, F.A.X.; KANE, A.B.; YOUNG, E.E. e FARBER, J.L. (1979). Calcium dependence of toxic cell death : a final common pathway. *Science*, *206* : 700 - 702.

-SCHNIEDER, W.C. e HOGEBOOM, G.H. (1950). Intracellular distribution of enzymes. V-further studies on distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, *183* : 123 - 128.

-SERIS, J.-L. e BRU, A. (1962). Sur le mécanism de la protection des céllules de levedure contre la action des rayons X par la tetrahydroxyquinone et les composés voisins. *Compt. Rend.*, *255* : 1027 - 1029.

-SHOPSIS, C.; BORENFREUND, E.; WALBERG, W. e STARK, D.M. (1985). A battery of potential alternatives to the Draize test : uridine uptake inhibition, morphological cytotoxicity, macrophage chemotaxis and exfoliative cytology. *Fd. Chem. Toxic.*, *23* (2) : 259 - 266.

-SHULTE-FROHLIND, D. e VON SONTAG, C. (1985). Radiolysis of DNA and model system in the presence of oxygen. em "Oxidative Stress", SIES, H. Ed, Academic Press, London.

-SIES, H. (1985). Oxidative stress : introductory remarks. em "Oxidative Stress". Cap. 1, pp 1 - 8. SIES, H. Ed., Academic Press, London.

-SIMPSON, P.J.; FANTONE, J.C. e LUCCHESI, B.R. (1987). Myocardial ischemia and reperfusion injury : oxygen radicals and the role of neutrophil. *Oxygen Radicals and Tissue Injury*, Proceedings of an Upjohn Symposium, 63 - 77.

-SMITH, M.T.; EVANS, C.G.; THOR, H. e ORRENIUS, S. (1985). Quinone induced oxidative injury to cells and tissue. em "Oxidative Stress", SIES, H. Ed., Cap. 5, pp 91 - 113, Academic Press, London.

-STARK, D.M.; SHOPSIS, C.; BORENFREUND, E. e BABICH, H. (1986). Progress and problems in evaluating and validating alternatives assays in toxicology. *Fd. Chem. Toxicol.*, 24 : 449 - 455.

-THOR, H.; HARTZELL, P.; SVENSSON, S.-Ä.; ORRENIUS, S.; MIRABELLA, F.; MARIONI, V. e BELLOMO, G. (1985). On the role of thiol groups in the inhibition of liver microssomal Ca^{2+} sequestration by toxic agents. *Bichem. Pharmacol.*, 34 : 3717 - 3723.

-VALLE, V.G.R. (1992). Participação de espécies reativas de oxigênio e tióis de proteínas no mecanismo de permeabilização da membrana mitocondrial interna por cálcio e prooxidantes. Tese de Doutorado apresentada ao Depto. de Biologia Molecular da Escola Paulista de Medicina.

-VERCESI, A.E.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; MARTINS, I.S.; CARNIERI, E.G.S.; BERNARDES, C.F. e FAGIAN, M.M. (1989). Ca^{2+} transport by liver and plant mitochondria. em "Cell Calcium Metabolism : physiology, biochemistry, pharmacology and clinical implications", FISKUM, G. Ed, Cap. 12, Plenum Press, New York.

-YOUNGMAN, R.J. e ELSTENER, E.F. (1981). Oxygen species in paraquat toxicity : the crypto-OH radical. *FEBS Lett.*, *129* : 265 - 268.

-WINTERBOURN, C.C. (1981). Production of hydroxyl radical from paraquat radical and H_2O_2. *FEBS Lett.*, *128* : 339 - 342.