



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PAOLA ROCHA GONÇALVES

INDUÇÃO DE DANOS OXIDATIVOS EM CÉLULAS DE MAMÍFERO POR ISOPROTERENOL E COBRE

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Paola Rocha Gonçalves e aprovada pela Comissão Julgadora

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann

Doc 1 023 44

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE	OC
N.º CHAMADA:	TL UNICAMP
	G586i
V.	Ex.
TOMBO BC/	43820
PROC.	16-392701
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	20/02/01
N.º CPD	

CM-00154290-5

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

G586i **Gonçalves, Paola Rocha**
 Indução de danos oxidativos em células de mamífero por isoproterenol e cobre / Paola Rocha Gonçalves. --Campinas, SP.[s.n.], 2001.
 132f. illus.

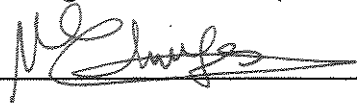
Orientadora: Maria Edwiges Hoffmann
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Catecolamina. 2. Cobre. 3. Toxicidade. I. Hoffmann, Maria Edwiges. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

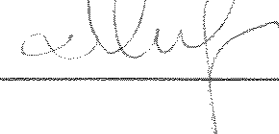
DATA DA DEFESA: 10/01/2001

Banca Examinadora:

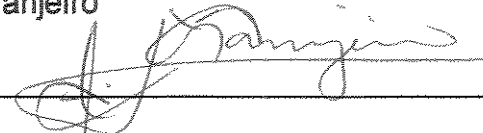
Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann (orientadora)



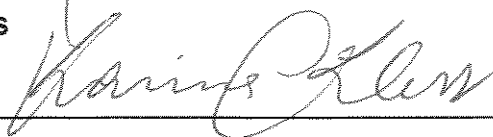
Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho



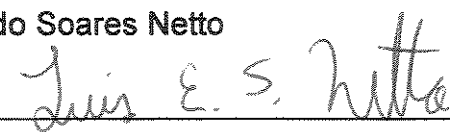
Prof. Dr. José Mauro Granjeiro



Profa. Dra. Karina Ckless



Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto



Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Profa. Dra. Satie Hatsushika Ogo

Parte deste trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Embriologia e Histologia da USP, e orientado pela **Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli**.

Aos meus pais queridos, Sônia e Paulo, por toda dedicação e paciência a mim empenhadas, fornecendo-me ensinamentos fundamentais sobre o amor, o respeito, a dignidade, a honestidade e a humildade. Aos meus irmãos Leo e Mônica pelo amor que sempre me deram.



Ao Ary, O GRANDE AMOR DA MINHA VIDA, que me possibilitou e me possibilita a todo momento aprender a calar, a escutar, a compreender... a ousar...e assim, me possibilita "ver a vida com outros olhos".

• Esta é para você:

MONTE CASTELO (Renato Russo)

Ainda que eu falasse a língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Sem amor eu nada seria.
É só o amor, é só o amor
Que conhece o que é verdade
O amor é bom, não quer o mal
Não sente inveja ou se envaidece
Amor é fogo que arde sem se ver
É ferida que dói e não se sente
É um contentamento descontente
É dor que desatina sem doer
Ainda que eu falasse a língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Sem amor eu nada seria.

Um não querer mais que bem querer
É solitário andar por entre a gente
É um não contenta-se de contente
É cuidar que se ganha em se perder
É um estar-se preso por vontade
É servir a quem vence, o vencedor
É um ter com quem nos mata a lealdade
Tão contrário a si é o mesmo amor
Estou acordado e todos dormem
Agora vejo em parte
Mas então veremos face a face
É só o amor, É só o amor
Que conhece o que é verdade
Ainda que eu falasse a língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Sem amor eu nada seria.



“Dizem que a mãe de Sócrates era parteira, e o próprio Sócrates costumava comparar a atividade que exercia com a de uma parteira. Não é a parteira quem dá à luz o bebê. Ela só fica por perto para ajudar durante o parto. Sócrates achava, portanto, que sua tarefa era ajudar as pessoas a “parir” uma opinião própria, mais acertada, pois

O VERDADEIRO CONHECIMENTO TEM DE VIR DE DENTRO

e não ser obtido “espremendo-se” os outros.

**SÓ O CONHECIMENTO QUE VEM DE DENTRO É CAPAZ DE
REVELAR O VERDADEIRO DISCERNIMENTO.”**

SÓCRATES em “O Mundo de Sofia” (Jostein Gaarder)



Agradecimentos...

Para mim, agradecer é uma tarefa muito difícil de efetuar, pois em todos os momentos de minha vida, principalmente durante esta jornada que estou finalizando agora (pois Deus é Pai e não Padrasto!), surgem pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente para o meu crescimento pessoal e profissional. A estas pessoas, mesmo aquelas que não estiverem com o seus nomes aqui citados, eu só posso lhes deixar um enorme **MUITO OBRIGADA!**

*** Mas...como manda o “figurino”:**

Em primeiro lugar agradeço ao Divino que tenho dentro de mim que me dá a força e a perseverança necessárias para trilhar o meu caminho.

À CAPES, ao CNPq e principalmente à FAPESP por me possibilitarem desenvolver este trabalho, fornecendo-me o apoio financeiro essencial durante os anos trabalho.

Ao relator da FAPESP pelas leituras e observações feitas a cada relatório submetido, incentivando-me a continuar o meu trabalho.

À Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann que acreditou em mim mesmo sem me conhecer... pela sua orientação, carinho, amizade e confiança, que me fizeram amadurecer não só profissionalmente, mas sobretudo, fizeram de mim uma pessoa melhor.

À Dra. Maria Inês Harris pelo seu grande incentivo e amizade nos primeiro passos deste meu trabalho e pela atenção recebida nos momentos mais difíceis que passei, logo que cheguei em Campinas.

À Profa. Dra. Gláucia Santelli que me acolheu com tanto carinho em seu laboratório, dando-me a oportunidade de enriquecer bastante este trabalho, com uma visão celular.

Aos Profs. Drs. Fernanda Gadelha, Hernandes de Carvalho e Luis Netto pela participação da minha banca prévia e exame de qualificação.

Aos Profs. Drs. Hernandes de Carvalho, José Mauro Granjeiro, Karina Ckless, Luis Eduardo Netto, Maria Edwiges Hoffmann, Nelci Höehr e Satie Ogo pela participação da minha banca final.

Ao Departamento de Biologia Funcional e Molecular – IB/UNICAMP pela credibilidade que depositaram em mim, permitindo-me passar direto do Mestrado ao Doutorado.

Ao Departamento de Botânica – IB/UNICAMP por me permitirem usar o fotomicroscópio Olympus PM-CD20 (Micronal).

Ao pessoal da biblioteca, da secretária de pós-graduação e do xerox da Biologia pelo pronto atendimento e amizade.

Ao Ary por toda a contribuição que deu para o desenvolvimento deste trabalho, principalmente pela análise estatística dos dados e pela leitura do texto.

Ao Luis por todas as muitas dicas, no decorrer deste trabalho.

A Renata Manelli pela importantíssima ajuda na confecção dos ensaios de imunofluorescência e no uso do microscópio confocal.

Ao Roberto Cabado pela fundamental ajuda no uso do microscópio confocal e pela pronta disposição durante a preparação das figuras deste trabalho.

Ao Danilo Lourenço pelo importante auxílio técnico, fotografando os núcleos ao microscópio.

A Simone de Pádua pelo importante auxílio técnico, fotografando ao microscópio e lendo os textos.

Às meninas do laboratório de toxicologia celular – IB/UNICAMP: Edu, Cláudia, Denise, Neusinha, Maribel e agora a Renata que me deram tanto apoio em muitos momentos complicados que surgiram durante todo o trabalho, e ainda, pelas alegrias e festas compartilhadas dentro do lab.

Aos colaboradores Juliana, Luciana, Rafael, Aline, Tarcísio e Acaiene pelo entusiasmo do querer aprender e pela pronta disposição em ajudar... e com o principal, sempre com muita alegria!!!

A todos do laboratório de Biologia Celular do Departamento de Embriologia e Histologia/USP...Gláucia, Renata, Adriana, Roberto, Marisa, Marisinha, Danilo e Marta... pelo enorme carinho e amizade com os quais me receberam.

Ao pessoal do Departamento de Botânica e "agregados", especialmente Andréia Spina, Ângela, Ariadna, Fatinha, Maria Fernanda, Isabela, Ingrid, Ique, Renato, Rodrigo, Simone de Pádua, Tchesca e Zé pelo companheirismo, por me proporcionarem momentos muitos felizes e por me ensinarem a apreciar ainda mais a beleza das plantas e animais, e suas relações.

A todos do Departamento de Biologia Funcional e molecular, professores, alunos e funcionários: ...Lu, Paula Beline, Paulo Granjeiro, Paulo Castilho, Dani, Zeca, Eduardo, Armindo, Patrícia, Adriana, Márcio, Carmem, Mauro, Rose, Baiki, Eneida, Bayardo, Denise, Renata, Ana Paula, Kiko, Elzira, Chico, Ju, Nilce, Hiroshi, Bonafé, Satie, Camilo, Andréia, Miriam, Marina...enfim, a todos aqui presentes ou não, agradeço pelo carinho e respeito com que sempre me trataram.

A Ana Paula Demasi pela amizade e pelas quebras de galho, dando-me dicas nos experimentos com o DNA.

A Domingas por todo o apoio e cuidado que sempre teve comigo.

A Fernanda Gadelha por toda a amizade e apoio durante um período muito importante de minha vida.

"A melhor, a maior e a mais atrevida!" A minha irmã do coração Vanessa pelo seu carinho, amizade e alegria, fazendo-me dar liberadoras gargalhadas, não me deixando desanimar.

Às amigas do peito: Ana Lúcia Pereira, Simone Fanan e Simone de Pádua pelos muitos momentos felizes que passamos juntas e por todas as "barras" seguradas...vocês moram no meu coração!



	ÍNDICE
LISTA – Tabelas	12
LISTA – Esquemas e Figuras	13
ABREVIATURAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
CAPÍTULO I – Introdução	19
OBJETIVOS	31
CAPÍTULO II – Materiais e Métodos	35
2.1. Soluções e reagentes	36
2.1.1. catecolaminas	36
2.1.2. cobre	36
2.1.3. salina tamponada com fosfato – PBS-A	36
2.1.4. reagentes especiais	36
2.1.5. meio de cultura (DMEM)	37
2.1.6. tripsina	37
2.1.7. esterilização e armazenamento	37
2.2. A oxidação do isoproterenol	37
2.2.1. espectrofotometria da oxidação	37
2.2.2. medidas de consumo de oxigênio	38
2.3.2. dosagem de radicais ânion superóxido	39
2.3 Danos causados em biomoléculas in vitro	39
2.3.1. determinação dos teor de carbonilas em BSA	39
2.3.2. eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	40
2.3.3. determinação de 8-OH-desoxiguanosina	41
2.4. Efeitos citotóxicos	42
2.4.1. culturas de células	42
2.4.2. avaliação da proliferação celular	42
2.4.3. determinação da perda da adesão celular	43
2.4.4. avaliação da perda da viabilidade celular	44
2.4.5. análise das alterações morfológicas	44
2.4.6 avaliação do citoesqueleto	44
2.4.7. avaliação dos núcleos celulares	46
2.4.8. análises de imagens	47
2.4.9. quantificação de DNA por análise de imagem	47
2.5. Análise estatística	48

CAPÍTULO III - O Cobre e a Oxidação do Isoproterenol	49
3.1. Espectrofotometria da oxidação do isoproterenol	50
3.1.1. O efeito de íons de metais de transição	50
3.1.2. O efeito de íons Cu^{+2} na oxidação de outras catecolaminas	53
3.1.3. O efeito de antioxidantes na oxidação de IP/ Cu^{+2}	55
3.2. Análise da produção de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot -}$ por IP/ Cu^{+2}	56
3.2.1. formação de peróxido de hidrogênio por IP/ Cu^{+2}	56
3.2.2. Produção de radicais ânion superóxido por IP/ Cu^{+2}	57
CAPÍTULO IV – Danos em Biomoléculas Gerados por Isoproterenol e /Cu^{+2}	59
4.1. Danos em proteína In vitro	60
4.1.1. formação de carbonilas na BSA	60
4.1.2. fragmentação do esqueleto protéico da BSA	62
4.2. Danos em DNA In vitro	63
4.2.1. formação de 8-OH-dG em DNA de timo bovino	63
CAPÍTULO V – Efeitos Citotóxicos do Isoproterenol e Cu^{+2} : uma Abordagem Funcional	67
5.1. Efeitos do Isoproterenol sobre a Proliferação Celular	68
5.2. Efeitos do Sistema Oxidativo sobre a Adesão Celular	70
5.3. Efeitos do Sistema Oxidativo sobre a Viabilidade Celular	74
CAPÍTULO VI - Efeitos Citotóxicos do Isoproterenol e Cu^{+2} : Uma Abordagem Morfológica	77
6.1. Alterações Morfológicas Gerais	78
6.2 Alterações Morfológicas Específicas	81
6.2.1. Efeitos de IP/ Cu^{+2} sobre o citoesqueleto de células V79	81
6.2.2. Efeitos de IP/ Cu^{+2} sobre os núcleos de células V79	87
CAPÍTULO VII – Discussão	95
CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

TABELA I. Conteúdo de cobre em alguns fluidos e tecidos do corpo de humanos adultos.

TABELA II. Velocidade de produção de aminocromo (nmoles/min), em relação ao IP livre de metal.

TABELA III. Velocidade de produção de aminocromo (nmoles/min), em relação ao IP associado ao íon de Cu^{+2} .

TABELA IV. Detecção espectrofotométrica do O_2^- produzido durante a oxidação de IP comparado a outras catecolaminas.

TABELA V. Matriz de probabilidades.

TABELA VI. Parâmetros estatísticos das análises de regressão linear e não linear.

TABELA VII. Parâmetros estatísticos das análises de regressão linear e não linear.

TABELA VIII. Análise de imagem pelo software CIREs/Kantron de núcleos corados por Feulgen.

TABELA IX. Percentagens de núcleos anômalos contados em 1000 células coradas por Feulgen.

TABELA X. Diâmetro de núcleos corados com iodeto de propídeo e lâmina nuclear de células expostas ao PBS-A e IP/ Cu^{+2} em PBS-A.

ESQUEMA 1. Reação de Fenton produzindo radicais hidroxila.

ESQUEMA 2. Reação de Haber-Weiss produzindo radicais hidroxila.

ESQUEMA 3. Estruturas de catecolaminas e derivados.

ESQUEMA 4. Estrutura do IP e alguns de seus derivados de oxidação.

ESQUEMA 5 Possível mecanismo de adição de proteínas em o-quinonas.

ESQUEMA 6. Possível mecanismo para a oxidação sítio-específica em proteínas, catalisadas por metais de transição.

ESQUEMA 7. Papel da ceruloplasmina como uma ferroxidase. Cp – ceruloplasmina.

ESQUEMA 8. Mecanismo de lesão em proteína por oxidação sítio-específica, em reação catalisadas pelo cobre.

ESQUEMA 9. Mecanismo proposto para a oxidação de IP mediada por Cu^{+2} .

FIGURA 1. Cinética da oxidação do IP na presença de íons metálicos.

FIGURA 2. Espectro de absorção do IP em solução.

FIGURA 3. Efeito da concentração de Cu^{+2} sobre a oxidação de IP.

FIGURA 4. Efeito do cobre sobre a cinética de oxidação de catecolaminas.

FIGURA 5. Efeito de antioxidantes sobre a oxidação de IP.

FIGURA 6. Cinética do consumo de oxigênio durante a oxidação de IP.

FIGURA 7. Determinação do teor de carbonilas produzidas em BSA.

FIGURA 8. Determinação do teor de carbonilas produzidos em BSA pelo sistema IP/ Cu^{+2} .

FIGURA 9. Gel de SDS-poliacrilamida da BSA exposta ao IP/ Cu^{+2} .

FIGURA 10. Cromatograma de dG e 8-OH-dG.

FIGURA 11. Formação de 8-OH-dG em DNA por IP/Cu⁺².

FIGURA 12. Efeito de IP/Cu⁺² sobre a proliferação de fibroblastos V79.

FIGURA 13. Efeito do tempo de incubação após tratamento com IP/Cu⁺² sobre a adesão celular.

FIGURA 14. Efeito da concentração de IP e Cu⁺² sobre a adesão celular.

FIGURA 15. Perda da viabilidade celular de fibroblastos V79 expostos ao sistema IP/Cu⁺².

FIGURA 16. Alterações morfológicas de células V79 expostas ao IP/Cu⁺².

FIGURA 17. Alterações morfológicas de células V79 expostas ao IP/Cu⁺², GSH e tiouréia.

FIGURA 18. Alterações da vimentina de células V79, expostas ao IP/Cu⁺².

FIGURA 19. Alterações em filamentos de actina de células V79 expostas ao IP/Cu⁺².

FIGURA 20. Alterações na α -tubulina de células V79 expostas ao IP/Cu⁺².

FIGURA 21. Alterações na lamina B de células V79 expostas ao IP/Cu⁺².

FIGURA 22. Alterações nucleares com IP/Cu⁺² de células V79 coradas por Feulgen.

FIGURA 23. Distribuição das freqüências de ploidia de células V79, expostas ao IP/Cu⁺².

FIGURA 24. Alterações nucleares em células V79, expostas ao IP/Cu⁺².

FIGURA 25. Vista ortogonal dos núcleos de células V79, expostas ao IP/Cu⁺².

8-OH-dG	8-OH-2'-desoxiguanosina
ANOVA	análise de variância
ASC	ascorbato de sódio
BSA	albumina de soro bovino
CAT	catalase
CIRES	"Cell Image Retrieval and Evaluation System"
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DA	cloridrato de 3-hidroxitiramina (dopamina)
DE	deteção eletroquímica
DEP	cloridrato de desoxiepinefrina
dG	2'-desoxiguanosina
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	N, N-dimetilformamida
DOC	desoxicolato de sódio
EDTA	sal dissódico do ácido etileno diamino tetra acético
EP	cloridrato de (±) epinefrina
ERO	espécies reativas de oxigênio
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GSH	glutathiona
IP	cloridrato de (±) isoproterenol
NaBH₄[³H]	borohidreto de sódio tritiado
NBT	"nitro blue tetrazolium" (azul de nitrotetrazólio)
NEP	cloridrato de (±) norepinefrina
·OH	radical hidroxila
O₂⁻	radical ânion superóxido
PBS-A	salina tamponada com fosfato
PBS-Ca⁺²	salina tamponada com fosfato acrescida de 1 mM de CaCl ₂
POPOP	1,4-bis[5-fenil-2-oxazol]benzeno; 2-2'-p-fenileno-bis[5-feniloxazol]
PPO	2,5-difenil-oxazol
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	tetrametilenodiamina

O isoproterenol (IP) é uma catecolamina sintética de grande interesse farmacológico, por ser o mais potente agonista β -adrenérgico conhecido. Recentes trabalhos revelaram o envolvimento das reações de oxidação de IP em mecanismos de cardiotoxicidade. O cobre é um microelemento essencial que possui um papel fundamental no metabolismo dos organismos vivos. Em excesso, o cobre é muito tóxico, fato este ilustrado em disfunções neurodegenerativas como: Doenças de Menkes e Wilson. Os estudos de oxidação do IP mostraram que os metais de transição, principalmente, Cu^{+2} são catalisadores da reação. Neste trabalho são apresentados alguns efeitos tóxicos de IP associado ao Cu^{+2} , sobre proteína e DNA *in vitro*, e em cultura de fibroblastos de pulmão de hamster chinês. O complexo IP/ Cu^{+2} induziu a formação de carbonilas em aminoácidos e fragmentação da cadeia polipeptídica da BSA, e a formação de 8-OH-2'-desoxiguanosina em DNA de timo bovino. O sistema contendo IP até $7,0\mu\text{M}$, associado ao Cu^{+2} ($25\mu\text{M}$), inibiu totalmente a proliferação celular. A oxidação de IP/ Cu^{+2} promoveu outras alterações funcionais, como a perda da adesão celular às placas de cultura e a perda da viabilidade celular. Em condições contendo IP isolado do metal não foram encontrados efeitos significativos. Alterações morfológicas foram encontradas nas células tratadas com IP/ Cu^{+2} , gerando perda da morfologia típica dos fibroblastos que inclui achatamento celular, evidenciando os núcleos e nucléolos, e surgimento de bolhas. Os antioxidantes CAT e GSH reduziram parcial ou totalmente a velocidade de reação de IP/ Cu^{+2} , respectivamente. A GSH impediu a indução de lesões morfológicas nas células pela ação de IP/ Cu^{+2} . Também foi verificado que o sistema oxidativo gerou a destruição de todos os filamentos estudados do citoesqueleto (vimentina, actina, α -tubulina e lamina B) e induziu ao aparecimento de drásticas alterações nucleares, como o aumento do índice de DNA e o surgimento de núcleos picnóticos. Em conjunto, os resultados evidenciaram o papel crítico do cobre II na toxicidade de IP. Os efeitos citotóxicos observados indicam uma provável ocorrência de bloqueio do ciclo celular e morte celular por apoptose nas células V79 tratadas.

Isoproterenol (IP) is a synthetic catecholamine of great pharmacological interest, as it is the most potent β -adrenergic known agonist. Recent works revealed the involvement of IP oxidation reactions in cardiotoxicity mechanisms. Copper is an essential microelement which has a fundamental role in living organisms metabolism. In high concentration copper is extremely toxic, as illustrated by neurodegenerative dysfunctions such as Menkes and Wilson diseases. Studies on IP oxidation have shown that transition metals, specially Cu^{2+} , are effective catalysers of such reaction. This research presents some toxic effects of IP associated to Cu^{2+} on protein and on DNA *in vitro*, and on V79 Chinese hamster lung fibroblasts culture. IP/ Cu^{2+} complex induced carbonils formation in aminoacids and fragmentation of BSA polipeptidic chain, as well as formation of 8-OH-2'-deoxiguanosine in Calf thimus DNA. System containing up to 7,0 μM IP, associated to Cu^{2+} (25 μM) totally inhibited cellular proliferation. Oxidation of IP/ Cu^{2+} caused other functional alterations, such as loss of cellular adhesion to culture plates and loss of cellular viability. Conditions containing IP isolated from the metal did not produce significative effects. Morphological alterations were found in cells treated with IP/ Cu^{2+} , generating loss of fibroblasts typical morphology, mainly by bubbles appearance and cellular spreading which evidenciated nuclei and nucleolus. Antioxidants CAT and GSH respectively inhibited partially or completely the reaction of IP/ Cu^{2+} . GSH prevented lesions in cells morphology induced by IP/ Cu^{2+} . It was also verified that the oxidant system leads to destruction of all citoskeleton filament analysed (vimentine, actine, α -tubuline and lamin B) and to appearance of drastic nuclear alterations, like increase in DNA index and appearance of picnotic nuclei. Obtained results demonstrated the critical role of copper II on IP toxicity. Observed citotoxic effects suggest a probable interruption of cellular cycle and cellular death from apoptosis on V79 treated cells.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

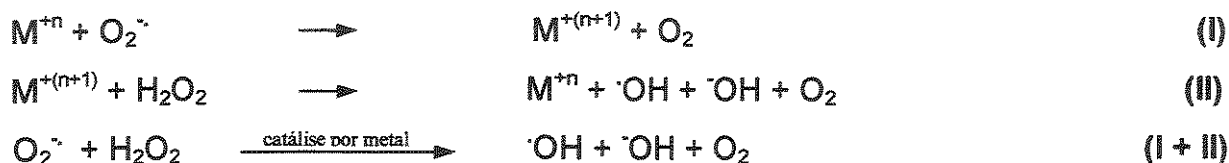
1.1. CATECOLAMINAS E ESTRESSE OXIDATIVO:

O surgimento de seres aeróbicos foi um marco importante durante o processo evolutivo da vida na Terra, abrindo a possibilidade de um maior aproveitamento de energia da matéria orgânica pela utilização do oxigênio. Esta aquisição evolutiva trouxe também uma grande desvantagem para estes organismos - a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), durante reações de oxi-redução incompletas; ocorrendo no metabolismo normal, por exemplo: na cadeia respiratória, na biotransformação de drogas e na reação inflamatória (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Estes intermediários de reação podem ser radicalares como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$), o óxido nítrico (NO), e não radicalares como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2), uma espécie eletronicamente excitada (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O $\cdot OH$ é a forma mais reativa e portanto, a mais lesiva das ERO conhecidas. Reações como a de Fenton, formulada em 1894, (ESQUEMA 1) e as de Haber-Weiss, postuladas em 1934, (ESQUEMA 2) descrevem os mecanismos mais aceitos para produção desta espécie, que dependem da ação catalítica de íons de metais de transição, como por exemplo Fe^{+2} e Cu^{+2} (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



ESQUEMA 1. Reação de Fenton produzindo radicais hidroxila.



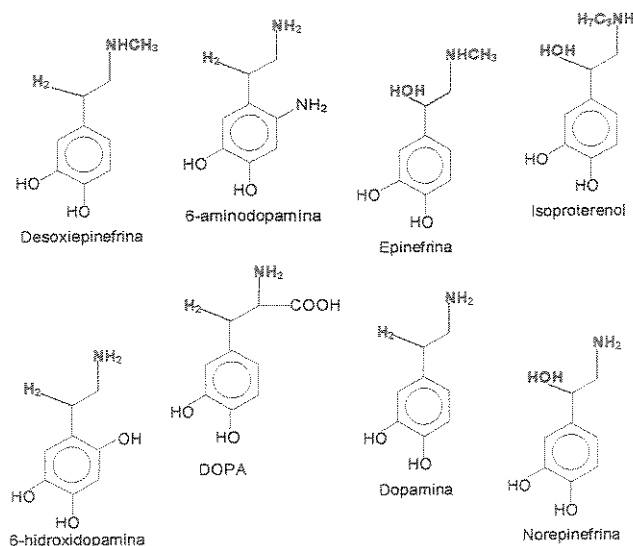
ESQUEMA 2. Reação de Haber-Weiss produzindo radicais hidroxila.

As ERO, por serem extremamente reativas, podem atacar diferentes tipos de moléculas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), podendo levar a severas lesões

oxidativas em biomoléculas, tais como: quebras de DNA (MELLO-FILHO *et al.*, 1984); peroxidação de fosfolipídios (GUTTERIDGE, 1982); modificações oxidativas em proteínas (DAVIES, 1987) e inibição da atividade de enzimas (ARMSTRONG & BUCHANAN, 1978), entre outros. Nesta situação, as ERO tornam-se uma grande ameaça contra a integridade celular, podendo representar, portanto, a causa primária para o desenvolvimento de numerosos processos patológicos (GUTTERIDGE, 1993) e degenerativos associados ao envelhecimento (HARMAN, 1992).

As catecolaminas são moléculas formadas por um anel aromático dissustituído por hidroxilas vicinais (anel catecólico) e uma cadeia lateral contendo um grupamento amino. Algumas destas moléculas são endógenas (3,4-dihidroxifenilalanina – DOPA, epinefrina, dopamina, e norepinefrina) e possuem uma ampla atividade fisiológica (WEINER & MOLINOFF, 1993 e PROSSER, 1991).

Estas moléculas podem participar do metabolismo da glicose devido a sua ação hormonal e podem atuar nas sinapses nervosas de neurônios adrenérgicos e dopaminérgicos, tendo uma ação direta no pulmão, no coração e no sistema nervoso central (WEINER & MOLINOFF, 1993 e PROSSER, 1991). No **ESQUEMA 3** estão relacionadas algumas estruturas de catecolaminas e derivados de importância biológica.



ESQUEMA 3. Estruturas de catecolaminas e derivados.

A presença do anel catecólico inclui as catecolaminas na coleção de moléculas capazes de sofrer oxidação através de mecanismos de fotoxidação, de autooxidação/oxidação química e enzimática (KALYANARAMAN *et al.*, 1985). Estes processos podem levar à produção de ERO, de semiquinonas e de quinonas. Por sua vez, as o-quinonas podem sofrer ciclização intramolecular e gerar aminocromos (TSE *et al.*, 1976 e HARRISON *et al.*, 1968).

De acordo com SPENCER *et al.* (1994), a oxidação de catecolaminas pode ser catalisada por íons metálicos como os de ferro, cobre e manganês, produzindo ERO por mecanismos de reação tipo Fenton e Haber-Weiss (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999 e SUTTON & WINTERBOURN, 1989). Hoje, é conhecido que as catecolaminas estão envolvidas em diversos processos patológicos como em cardiopatias após isquemia seguida por reperfusão (ALLEN *et al.* 1994 e REDDY *et al.*, 1989) e em doenças neurodegenerativas - Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer (SPENCER *et al.*, 1994), e Manganismo, uma patologia resultante do envenenamento pelo manganês (RIOS *et al.*, 1995 e ARCHIBALD & TYREE, 1987).

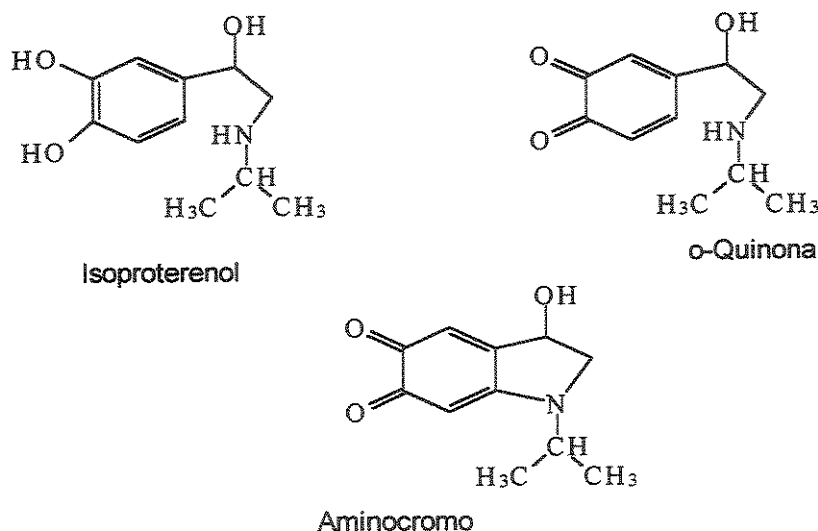
A geração de estresse oxidativo pelas catecolaminas tem sido tema para importantes estudos que tentam elucidar os mecanismos pelos quais se processam os efeitos tóxicos de seus produtos de oxidação.

A demonstração dos efeitos cardiotoxicos e neurotóxicos das catecolaminas despertou o nosso interesse na investigação de seus possíveis mecanismos de citotoxicidade. Assim, elegemos o isoproterenol como a catecolamina modelo para os nossos experimentos, pelo seu grande interesse farmacológico e facilidade de aquisição.

O Isoproterenol (IP) é uma catecolamina sintética de grande aplicação farmacológica, sendo o mais potente agonista β -adrenérgico conhecido e muito utilizado na terapêutica contra a asma brônquica (FRIEDEL & BROGDEN, 1988). Como posologia o IP tem sido administrado por inalação, tabletes sublinguais e injeções intravenosas (PARFITT, 1999). Apesar de seu interesse farmacológico, uma série de estudos indicam que o IP pode induzir efeitos cardiotoxicos, como arritmias (TOSAKI *et al.*, 1990) e necrose do miocárdio (BRODOWICZ & LAMB, 1991).

Algumas hipóteses foram sugeridas para explicar os mecanismos pelos quais se processam os danos celulares causados por IP. Assim como para outras catecolaminas, foram levadas em consideração duas principais vias que explicam a sua ação tóxica, uma por eventos mediados pela ligação fármaco-receptor, envolvendo o aumento de AMP cíclico intracelular (HORI *et al.*, 1994 e LOUIS *et al.*, 1992) e a outra por danos gerados pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (TOSAKI *et al.*, 1990 e WHEATLEY *et al.*, 1985).

Outros autores como PERSOON-ROTHERT *et al.* (1989) e SINGAL *et al.* (1983) mostraram que o efeito cardiotóxico de IP é causado pela ação de radicais livres formados durante a sua oxidação e não pela ativação de β -adrenoreceptores. Estes fatos foram observados em miócitos tratados com soluções de IP na presença ou ausência de antioxidantes como ácido ascórbico, trolox, superóxido dismutase e catalase (PERSOON-ROTHERT *et al.*, 1989). Além disso, diferentemente de outras catecolaminas, IP não é um substrato para a monoamina oxidase (BOWMAN & RAND, 1980). Com isto, a sua toxicidade não parece ter relação direta com os processos que envolvam oxidações enzimáticas e sim com suas reações de oxidação. No **ESQUEMA 4** é mostrado a estrutura do IP e de alguns de seus produtos de oxidação.



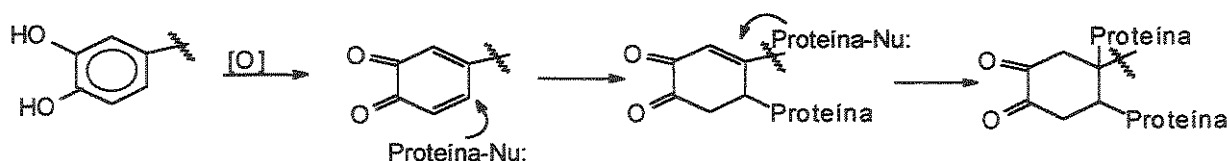
ESQUEMA 4. Estrutura do IP e alguns de seus derivados de oxidação.

Mais recentemente, SOJAKKA *et al.* (1999) mostraram que IP tem efeito sobre a endocitose de miócitos, sugerindo que esta catecolamina pode atuar também no aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} e na redução do pH citoplasmático.

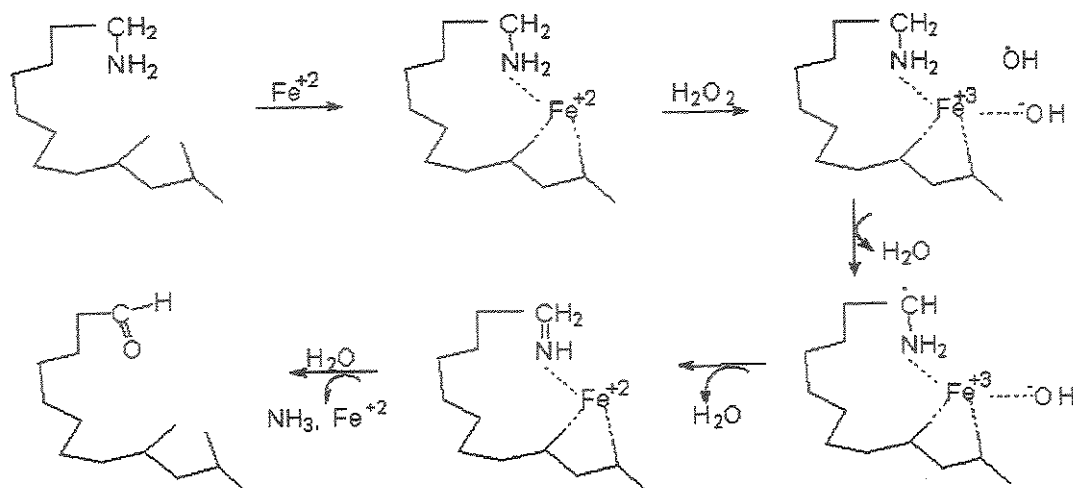
Os estudos pioneiros de COHEN & HEIKKILA (1974) revelaram alguns aspectos da toxicidade do produto final da oxidação da dopamina, a 6-hidroxi-dopamina, demonstrando a sua capacidade de oxidar resíduos -SH de proteínas e de catalisar desaminações em aminoácidos. Mais recentemente foi demonstrado que o adrenocromo (aminocromo da adrenalina) atua na fosforilação oxidativa e no influxo de Ca^{+2} em células cardíacas, prejudicando o relaxamento do miocárdio (NAPOLITANO *et al.*, 1995 e RUMP & KLAUS, 1995).

É sabido que as quinonas são tóxicas para células de mamíferos por serem capazes de reagir com biomoléculas, principalmente proteínas e DNA, através de dois mecanismos: 1) formação de adutos por adição nucleofílica à molécula e 2) formação de danos oxidativos por ERO (BRUNMARK & CADENAS, 1989). Segundo ROSSI *et al.* (1986) o caminho pelo qual se forma a lesão vai depender da estrutura química de cada quinona envolvida no processo.

Exemplificando o primeiro mecanismo, STANWELL *et al.* (1996) mostraram que as o-quinonas podem ser adicionadas às proteínas através de adição nucleofílica (ESQUEMA 5). Quanto às lesões oxidativas, as reações de oxidação das quinonas podem gerar carbonilação de aminoácidos em proteínas, via $\cdot\text{OH}$, na presença de metais de transição que catalisam as reações do tipo sítio-específica (STADTMAN, 1993 e STADTMAN, 1990) (ESQUEMA 6).



ESQUEMA 5 Possível mecanismo de adição de proteínas em o-quinonas.



ESQUEMA 6. Possível mecanismo para a oxidação sítio-específica em proteínas, catalisadas por metais de transição.

MASSERANO *et al.* (1996) mostraram a indução de apoptose numa linhagem de neurônios catecolaminérgicos derivados do sistema nervoso central, caracterizada por fragmentação de DNA após exposição a dopamina, norepinefrina, epinefrina, isoproterenol e alguns derivados de catecolaminas.

Baseando-se nestes dados, consideramos que os estudos sobre a citotoxicidade de catecolaminas em células não diferenciadas podem contribuir significativamente para elucidar os mecanismos de sua toxicidade dentro de células especializadas, como as do miocárdio e de cérebro. Embora não sejam originários dos sistema cardíaco e nervoso, os fibroblastos de pulmão de hamster chinês se mostraram bastante susceptíveis aos efeitos tóxicos da dopamina, representando ser um modelo válido para a investigação da toxicidade de catecolaminas (SNYDER & FRIEDMAN, 1998). Estes autores mostraram uma grande relação entre os íons de metais de transição, como os de manganês e cobre, com o aparecimento de efeitos citotóxicos e clastogênicos de dopamina e L-DOPA.

1.2. COBRE:

O cobre é um microelemento essencial que possui um papel fundamental no metabolismo de todos os organismos vivos (HARRIS & GITLIN, 1996 e LINDER & HAZEZH-AZAM, 1996). De acordo com HARRIS & GITLIN (1996) este metal pesado

atua como cofator enzimático de proteínas como: a citocromo oxidase, superóxido dismutase (SOD), a dopamina β -hidroxilase, (DBH), a lisil oxidase e a ceruloplasmina.

Em excesso, o cobre é muito tóxico, sendo este fato sensivelmente ilustrado pelas disfunções neurodegenerativas como: Doenças de Menkes e Wilson, em que são encontradas sérias perturbações na homeostase neuronal deste metal (SUZUKI & GITLIN, 1999; WAGGONER *et al.*, 1999 e SCHEINBERG & STERNLIEB, 1996).

Os íons de cobre possuem uma ampla distribuição endógena (LINDER & HAZEGH-AZAM, 1996) (TABELA I) e grande função fisiológica, podendo atuar em diversas e importantes situações como no crescimento infantil, nos mecanismos de defesa, na maturação de células sangüíneas, na resistência óssea, no transporte de ferro, no metabolismo do colesterol e da glicose, na contração do miocárdio e no desenvolvimento cerebral (HARRIS & GITLIN, 1996 e OLIVARES & UAUY, 1996).

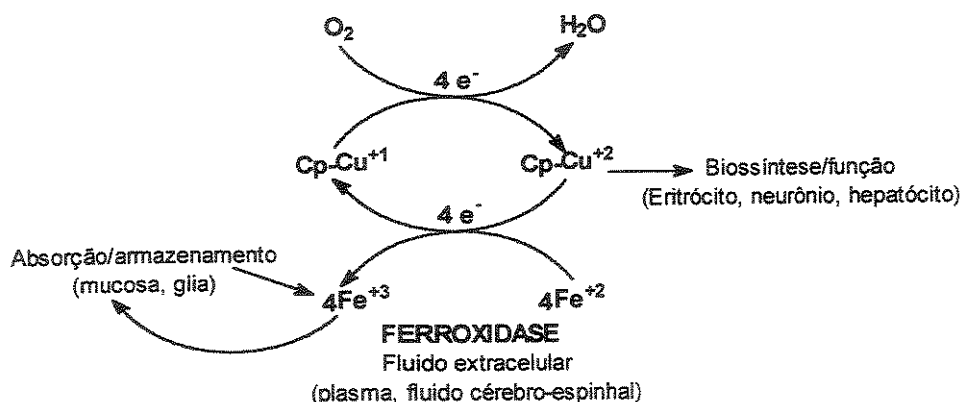
TABELA I. Conteúdo de cobre em alguns fluidos e tecidos do corpo de humanos adultos.

FLUIDOS E TECIDOS	[Cu] $\mu\text{g/g}$
saliva	0,22
suco gástrico	0,39
bile	4,0
urina	0,02-0,05
fluido cérebro-espinhal	5,0
sangue	1,1
plasma	1,05
rim	12
cérebro	5,2
fígado	6,2
coração	4,8
músculo esquelético	0,9
cabelo	20

De acordo com HARRIS & GITLIN (1996) mais que 95 % do cobre sérico dos vertebrados é ligado à ceruloplasmina. Esta proteína é uma multicobre azul oxidase

sintetizada e secretada pelos hepatócitos; contém uma cadeia polipeptídica com 1046 aminoácidos e 6 átomos de cobre incorporados à molécula durante o seu processo de biossíntese (HARRIS & GITLIN, 1996). As concentrações plasmáticas de ceruloplasmina e de cobre podem ser encontradas mais altas do que o normal em situações como processos inflamatórios, gravidez, uso de contraceptivos orais e câncer (LÖNNERDAL, 1996).

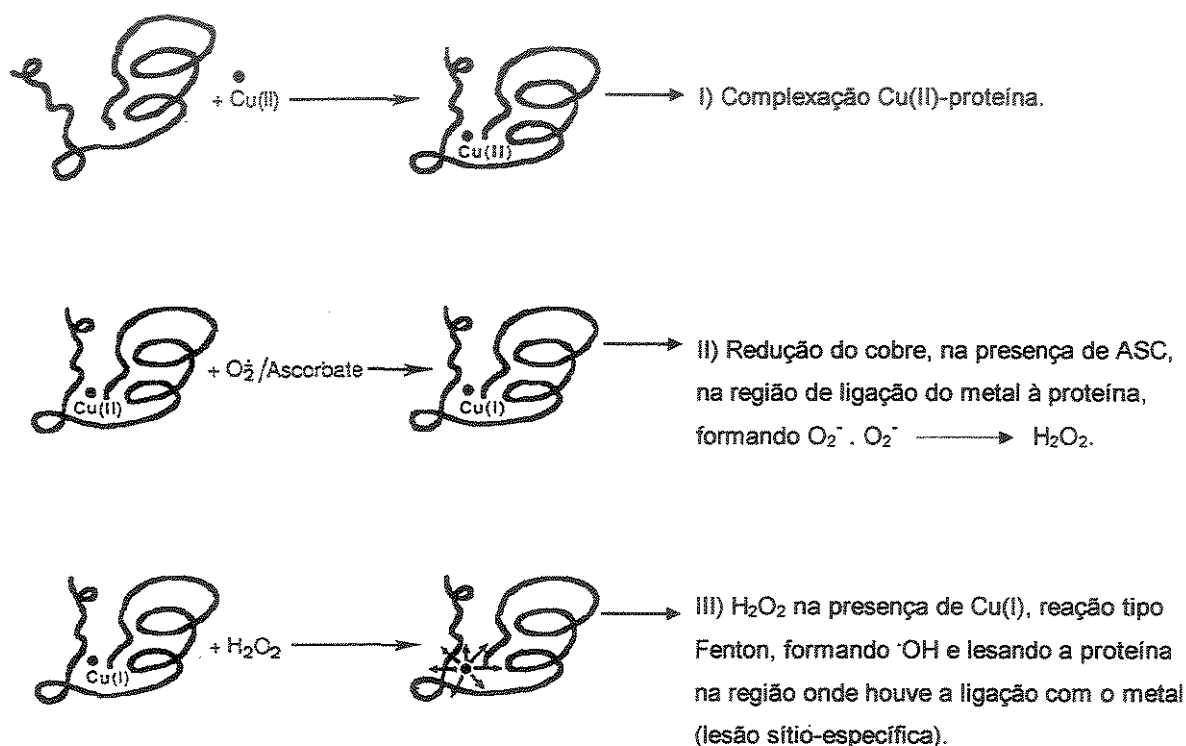
A ceruloplasmina atua também como uma ferroxidase que mobiliza o ferro dos hepatócitos e participa do metabolismo deste metal, através de reações de oxirredução completas não geradoras de ERO (**ESQUEMA 7**) (HARRIS & GITLIN, 1996). Por esta atividade, estes mesmos autores relacionaram a aceruloplasminemia com lesões de células da glia e de neurônios através de radicais livres oriundos de reações tipo Haber-Weiss, em função do acúmulo de íons ferrosos no líquido cérebro-espinhal.



ESQUEMA 7. Papel da ceruloplasmina como uma ferroxidase. Cp – ceruloplasmina.

MÄNTTÄRI *et al.* (1994) associaram o surgimento de doenças coronarianas, como a aterosclerose, com a elevação dos níveis de ceruloplasmina. Estas doenças estão relacionadas a condições de estresse oxidativo, HALLIWELL & GUTTERIDGE (1999) e WINYARD *et al.* (1989) sugeriram que em condições de estresse as propriedades físico-químicas da ceruloplasmina podem estar modificadas. SWAIN *et al.* (1994) revelaram que o estresse oxidativo gerado por peroxinitrito pode levar a uma progressiva liberação de cobre da ceruloplasmina em plasma sanguíneo, tendo esta uma implicação direta com a doença aterosclerótica.

Na revisão de LUZA & SPEISKY (1996) ficou claro que existem várias teorias que tentam explicar o mecanismo ou os mecanismos pelos quais o cobre induz toxicidade celular, propondo uma interação deletéria entre o seu íon livre e macromoléculas. Um exemplo disto é a oxidação sítio-específica de proteínas na presença de $O_2^{\cdot -}$ e agentes redutores como ascorbato (ASC) (CHEVION, 1988) (ESQUEMA 8). Estes íons livres são conhecidos como promotores de danos oxidativos por levarem à formação de radicais livres e lesão em biomoléculas como lipoproteínas, DNA, enzimas contendo grupos tióis, membranas, organelas e células intactas, incluindo hepatócitos (LUZA & SPEISKY, 1996; MOSINGER, 1995).



ESQUEMA 8. Mecanismo de lesão em proteína por oxidação sítio-específica, em reação catalisadas pelo cobre.

O cobre livre tem sido postulado como um ligante direto de grupos tióis, afetando irreversivelmente a atividade catalítica de enzimas, inclusive de enzimas antioxidantes como a glutathiona redutase (LUZA & SPEISKY, 1996).

A glutathiona redutase possui uma alta afinidade pelo íon de Cu^{+1} , formando complexos estáveis. A habilidade desta enzima em se ligar ao cobre, mantendo intactas as suas propriedades antioxidantes, está intimamente relacionada com a disponibilidade de glutathiona redutase em células, principalmente nos hepatócitos onde o metal é armazenado e metabolizado (LUZA & SPEISKY, 1996 e HANNA & MASON, 1992).

É conhecido que os íons de metais de transição, principalmente cobre, ferro e manganês, estão envolvidos diretamente na oxidação de várias moléculas, inclusive antioxidantes como o ácido ascórbico (CHEVION, 1988), flavonóides (CAO *et al.*, 1997) e catecóis endógenos (PICKLO *et al.*, 1999), sendo cruciais na definição de um comportamento pró ou antioxidante destas moléculas. Um exemplo disto são os estrogênios catecólicos que aumentam substancialmente o teor de danos em DNA quando estão na presença de cobre (MOBLEY *et al.*, 1999). De acordo com ONDRIAS *et al.* (1998) o íon de Cu^{+2} induz a capacidade pró-oxidante de catecolaminas, como o isoproterenol e a adrenalina, gerando lipoperoxidação em lipoproteína de baixa densidade (LDL).

Considerando a ampla disponibilidade do cobre; a grande possibilidade deste metal ser liberado da ceruloplasmina, o seu mais importante transportador; a sua importância fisiológica e o seu grande poder pró-oxidante nos propusemos a investigar os danos oxidativos causados em fibroblastos V79 durante a oxidação do isoproterenol catalisada por este metal.

OBJETIVOS

- **OBJETIVO GERAL:**

Constitui o principal objetivo deste trabalho investigar a formação de danos oxidativos em células de mamífero quando expostas ao isoproterenol, analisando os efeitos do íon Cu^{+2} nesses processos. Assim é proposto a investigação dos efeitos citotóxicos do sistema IP/ Cu^{+2} em fibroblastos em cultura, buscando identificar os alvos celulares da ação deste sistema, bem como caracterizar as lesões moleculares por ele geradas. Dentre as várias alternativas de linhagens celulares de mamíferos disponíveis, a linhagem V79 de fibroblastos de hamster chinês tem sido amplamente utilizada em ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade (CLOTHIER *et al.*, 1995; FRY *et al.*, 1993 e BRADLEY *et al.*, 1981), devido a sua rápida proliferação celular *in vitro* e manutenção das suas características após criopreservação. Esta linhagem celular já vem sendo utilizada rotineiramente no laboratório, onde foi feito o trabalho, para o desenvolvimento de estudos de estresse oxidativo (ARÉVALO *et al.*, 1996 e SOUZA-PINTO *et al.*, 1996).

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Analisar os efeitos de metais de transição na reação de oxidação do isoproterenol. Para isto, foi analisada a cinética da reação de oxidação/autooxidação do isoproterenol na presença de vários íons de metais de transição visando a escolha do sistema mais apropriado para os experimento de citotoxicidade.
2. Detectar efeitos sobre biomoléculas gerados pelo sistema isoproterenol na presença de cobre II. Tendo caracterizado o íon Cu^{+2} como o mais eficiente catalisador da oxidação do IP, foi decidido analisar as lesões geradas pelos sistemas IP/ Cu^{+2} em proteína e DNA *in vitro*, utilizando como modelo a albumina de soro bovino e o DNA de timo bovino, respectivamente.

3. Investigar as alterações funcionais em fibroblastos V79 tratados com isoproterenol e cobre II. Estudos de citotoxicidade de IP/Cu⁺² foram feitos, utilizando como parâmetros a inibição da proliferação celular, a perda da capacidade de adesão das células sobre um substrato sólido e a perda da viabilidade celular.
4. Investigar as alterações morfológicas induzidas por isoproterenol e cobre, nas células V79. A observação ao microscópio ótico do surgimento de grandes alterações morfológicas nas células V79 tratadas por IP/Cu⁺² foi um parâmetro para a busca de um maior detalhamento destes tipos de lesões. Assim, estudos extensos foram feitos abrangendo desde uma análise mais geral da morfologia celular após tratamento com isoproterenol e cobre II, vista por microscopia de Normarski; até um aprofundamento dos estudos através da caracterização das modificações morfológicas, por microscopia confocal, em quatro filamentos do citoesqueleto e no núcleo celular.

CAPÍTULO II

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. SOLUÇÕES E REAGENTES:

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza analítico.

2.1.1. CATECOLAMINAS:

Cloridrato de ($\pm$) isoproterenol, cloridrato de ($\pm$) epinefrina, cloridrato de desoxiepinefrina, cloridrato de ($\pm$) norepinefrina e cloridrato de 3-hidroxitiramina (dopamina) foram adquiridos da Sigma. As soluções estoque de isoproterenol (IP) continham diferentes concentrações (5-50 mM) e foram preparadas diariamente em HCl 0,1 N (Merck); o teor final desta solução ácida nos tratamentos sempre foi inferior a 1%.

2.1.2. COBRE:

Soluções a 2 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck) foram preparadas diariamente em água desionizada.

2.1.3. SALINA TAMPONADA COM FOSFATO – PBS-A:

As soluções de ensaio foram diluídas em tampão salina fosfato (pH = 7,2-7,4) constituído por: 137 mM de cloreto de sódio; 2,68 mM de cloreto de potássio; 1,47 mM de fosfato diácido de potássio e 8,1 mM de fosfato monoácido de sódio. Este tampão continha aproximadamente 6 ppb de íon Cu^{+2} como contaminante. *PBS- Ca^{+2}* : PBS-A acrescido de 1 mM de cloreto de cálcio.

2.1.4. REAGENTES ESPECIAIS:

Os anticorpos monoclonais anti- α -tubulina e anti-vimentina monoclonal, IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e rodamina-faloidina foram obtidos da Boehringer-Mannheim. O anticorpo policlonal anti-lamina B e IgG de cabra marcado com FITC foram obtidos da Biotech. O iodeto de propídeo, catalase de fígado bovino (CAT – E.C. 1.11.1.6), glutationa (GSH), albumina de soro bovino (BSA –

A-9647) e DNA de timo bovino foram obtidos da Sigma. O “anti-fading” utilizado foi o VectaShield (Vector Laboratories).

2.1.5. MEIO DE CULTURA (DMEM):

O meio de cultura utilizado foi meio de Eagle modificado por Dulbecco que corresponde a 13,45 g/l do pó comercial (ICN Flow Biomedicals Inc.), acrescido de 1,2 g/l de NaHCO_3 e 10 ml/l de solução de antibióticos (Nutricell) constituída por: 10.000 UI/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina e 0,9% de NaCl, obtendo-se uma concentração final no meio cultura de 100 UI/ml de penicilina e 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina (pH=7,2-7,4). Para os cultivos, ao meio de cultura foi adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) da Cultilab.

2.1.6. TRIPSINA:

Soluções de tripsina 0,1% (m/v) foram preparadas em PBS-A, acrescidas de 1 mM de EDTA.

2.1.7. ESTERILIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO:

As soluções de PBS- Ca^{+2} , DMEM e tripsina foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore ($\phi = 0,22 \mu\text{m}$). O tampão PBS-A foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 min. Todas as soluções foram armazenadas entre 4 e 5 °C, com exceção da tripsina que foi estocada a - 20 °C.

2.2. A OXIDAÇÃO DO ISOPROTERENOL:

2.2.1. ESPECTROFOTOMETRIA DA OXIDAÇÃO:

Experimentos com leitura espectrofotométrica foram feitos a fim de determinar a cinética da oxidação de IP em seu cromóforo, o N-isopropil-noradrenocromo (BINDOLI *et al.*, 1992). De acordo com NÚÑEZ-DELICADO *et al.* (1996), o pico de absorção máxima do aminocromo no visível é de 490 nm ($\epsilon = 0,00407 \times \mu\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), sendo este o comprimento de onda utilizado na maioria dos estudos espectrométricos da oxidação

de IP. As cinéticas da oxidação das soluções de IP em PBS-A foram feitas em espectrofotômetro METROLAB SF-1700, nas condições descritas abaixo:

A) Efeito de íons de metais de transição: A oxidação espontânea de 50 μM de IP foi acompanhada, na ausência e na presença de 25 μM de CuSO_4 , CuCl_2 , FeCl_3 e FeCl_2 por 45 min, registrados em intervalos de 5 min.

B) Espectro de absorção da oxidação de IP/ Cu^{+2} : O espectro de absorção de 200 a 600 nm da oxidação de 20 μM de IP na presença de 15 μM de Cu^{+2} foi obtido, através de leituras a cada 15 min, durante 45 min.

C) Efeito da concentração de Cu^{+2} : A oxidação espontânea de 50 μM de IP foi acompanhada, na presença de 10 a 50 μM de CuSO_4 por 15 min, registrados em intervalos de 5 em 5 min.

D) Efeito do Cu^{+2} na oxidação de outras catecolaminas – estudo comparativo: A oxidação espontânea de 200 μM soluções tamponadas de isoproterenol (IP), epinefrina (EP), desoxiepinefrina (DEP), norepinefrina (NEP) e dopamina (DA) (em PBS-A) foi monitorada espectrofotometricamente, a cada 3 min, por 15 min. Após este período, foi adicionado ao meio reacional 150 μM de CuSO_4 , prosseguindo a reação por mais 15 min.

E) Efeito de antioxidantes na oxidação de IP/ Cu^{+2} : A oxidação espontânea de 50 μM de IP acrescido de 25 μM de CuSO_4 foi acompanhada por 30 minutos, na presença de GSH 2 mM e CAT 250 UI/ml, registrados em intervalos de 5 em 5 min.

2.2.2. MEDIDAS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO:

As medidas de consumo de oxigênio foram determinadas através de um oxígrafo composto por uma câmara de vidro de capacidade igual a 1,7ml, equipada com agitador magnético e conectada a um eletrodo de Clarck (Yellow Springs Instruments

Co.). O sinal elétrico gerado foi medido em amperímetro acoplado a um registrador potenciométrico (ROBINSON & COOPER, 1970). O estudo foi feito pela detecção do consumo de oxigênio por soluções de IP 50 μM na presença do íon Cu^{+2} 25 μM , diluídos em PBS-A, durante 10 min. Ao final deste tempo, 250 UI/ml de CAT foram adicionadas ao meio reacional e o teor de oxigênio contido na câmara foi detectado por mais 5 min.

2.2.3. DOSAGEM DE RADICAIS ÂNION SUPERÓXIDO:

A dosagem de radicais ânion superóxido, produzidos pela oxidação de soluções tamponadas de IP, foi feita segundo BEAUCHAMP & FRIDOVICH (1971), com base na ação redutora do O_2^- sobre 250 μM de azul de nitrotetrazólio (NBT - Sigma), na ausência e na presença de 500 μM Cu^{+2} . A incubação dos meios reacionais foi feita à temperatura ambiente, por 90 minutos, sendo esta interrompida pela adição de 200 μl de HCl 0,1 N. Depois disto, o formazan azul produzido foi recolhido por centrifugação e solubilizado em 1 ml de dimetilformamida (Merck) e sua quantificação foi feita a 560 nm em espectrofotômetro METROLAB SF-1700. Os brancos continham todos os reagentes com exceção do NBT. O ensaio foi realizado em comparação com outras quatro catecolaminas (EP, NEP, DEP e DA), nas mesmas condições utilizadas para IP.

2.3. DANOS CAUSADOS EM BIOMOLÉCULAS IN VITRO:

2.3.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBONILAS EM BSA:

Para padronização da metodologia de detecção do teor de carbonilas foi utilizado um sistema modelo constituído por BSA e ácido L-(+) ascórbico (ASC - 5 mM) (Merck) acrescido de CuSO_4 50 μM (UCHIDA & KAWAKISHI, 1993).

O tratamento foi realizado em PBS-A (1 ml) contendo 500 $\mu\text{g/ml}$ de BSA incubando-se por 1 h a 37 °C. O tratamento com as soluções IP (12,5-700 μM) na presença de 100 μM de Cu^{+2} foi realizado nas mesmas condições utilizadas para o sistema padrão.

Após a incubação, a proteína foi precipitada pela adição de 100 µl de solução 0,05% de desoxicolato de sódio (Aldrich), por 10 min à temperatura ambiente, seguida por acidificação do meio com 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) (Merck) 72%, em banho de gelo por 30 min (PETERSON, 1977). Depois de precipitada, a proteína foi separada por centrifugação e ressuspensa em 56 µl de solução tamponada contendo 107mM de Tris-HCl (Sigma) e 1,07mM de EDTA (Qeel). Alíquotas de 6 µL foram retiradas para dosagem da proteína pelo método de PETERSON (1977) e os valores obtidos foram relacionados com uma curva de calibração feita a cada dosagem.

As modificações oxidativas formadas nos resíduos de aminoácidos da BSA foram determinadas pela medida do teor de carbonilas segundo LEVINE *et al.* (1990). Os grupos carbonila foram reduzidos pela adição de 2,0 mCi/ml de NaBH₄[³H] (ICN-FLOW) à 50 µl de suspensão protéica oxidada, seguida de incubação por 30 min a 37°C. Após a redução, a proteína foi precipitada e lavada com 300 µl de TCA 10% (30 min, 0 °C) para a eliminação do material radioativo não incorporado. Os precipitados foram ressuspensos em 100 µl de TCA a 10%, e em seguida, transferidos para papéis de filtro tipo WHATMANN nº 17 (2 x 2cm). As amostras foram sucessivamente lavadas com TCA a 5%, álcool 96°GL e acetona, em banho de gelo. A radioatividade incorporada foi determinada por cintilação líquida em coquetel de toluol contendo PPO/POPOP (0,4% e 0,01% respectivamente), no contador de cintilação líquida BECKMAN LS-6000. Os valores encontrados foram expressos em CPM/µg de BSA.

2.3.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS:

A análise de fragmentação da BSA foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS segundo LIU *et al.* (1977). Amostras de BSA foram expostas ao sistema oxidativo IP/Cu⁺² como descrito no item 2.3.1 e depois solubilizadas em tampão Tris pH 7,4, em condições desnaturantes contendo 5% de dodecil sulfato de sódio (SDS - Sigma); 250 mM de trizma base (Sigma); 10 mM de EDTA (Qeel) e 1,25 M de sacarose (Synth).

O gel de resolução continha 12% de acrilamida (Sigma), 375 mM de Tris-HCl pH 8,8 e 0,1% de SDS. O gel de empacotamento, com 3,5% de acrilamida continha 125

mM de Tris-HCl pH 6,8 e 0,1% de SDS. A polimerização química de ambos os géis foi feita pela adição de 0,075% de persulfato de amônio (Ecibra) e 0,06% de tetrametilenodiamina (TEMED). As amostras de 50 µl contendo 5 µg de proteína foram aplicadas ao gel e a corrida eletroforética foi desenvolvida por cerca de 12 h, aplicando-se 30 V. Após a corrida a proteína foi fixada ao gel com solução de 50% de etanol 96 °GL, 12% de ácido acético (Ecibra) e formaldeído 0,02% (Chemco), por 2 h a 4 °C. A revelação foi feita por impregnação de prata ao gel de poliacrilamida segundo BLUM *et al.* (1987).

2.3.3. DETERMINAÇÃO DE 8-OH-DESOXIGUANOSINA EM DNA:

O DNA de timo bovino foi oxidado pelo sistema oxidativo IP/Cu⁺² e o conteúdo de 8-OH-dG foi medido de acordo com DOUKI *et al* (1995). Assim, 150 mg de DNA foram expostas ao IP (25-300 µM) na presença ou ausência de Cu⁺² 100 µM (em PBS-A, 1 h, 37 °C). Ao final do tratamento oxidativo, o DNA foi precipitado com etanol gelado e separado do meio por centrifugação. O DNA foi então hidrolisado e o teor da guanosina oxidada foi medido como descrito abaixo:

- *Hidrólise enzimática do DNA:* O DNA foi hidrolisado por 12-16 h com 10 U de nuclease P1 (Pharmacia) em tampão acetato de sódio acrescido de ZnSO₄ (pH = 8,0). Em seguida procedeu-se a hidrólise por 1 h com fosfatase alcalina (Sigma) em tampão tris-EDTA (pH = 8,3). Após as hidrólises, a porção protéica foi extraída com clorofórmio e separada por centrifugação.
- *Deteção de 8-OH-dG por CLAE-DE:* Para investigar a formação de bases alteradas foram retirados 150 µl de cada amostra de DNA hidrolisada que foram submetidos à análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção eletroquímica (DE), nas condições de análise abaixo relacionadas:
fase estacionária (coluna): "ODS-hypersil" (4,6 mm; 5 µm; 100 mm).

fase móvel: solução aquosa de acetato de sódio (50 mM) e EDTA (100 mg/l), acrescido de metanol 0,8 %.

temperatura: 40 °C.

fluxo: 1ml/min.

detecção eletroquímica (8-OH-dG, tempo de retenção ($t_R \sim 10$ min): + 650 mV

detecção UV (desoxiguanosina (dG), $t_R \sim 6,4$ min): $\lambda = 280$ nm.

2.4. EFEITOS CITOTÓXICOS:

2.4.1. CULTURA DE CÉLULAS:

Fibroblastos de pulmão de hamster chinês da linhagem V79, clone M8, foram fornecidos pelo laboratório do Dr. Rogério Meneghini (IQ – USP) e rotineiramente cultivados em DMEM contendo 100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina, acrescido de 10% SFB. As culturas foram mantidas em garrafas, em estufa (37°C) com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. Na manutenção da linhagem foram feitos repiques periódicos através de lavagem da monocamada celular com PBS-A, seguida por seu descolamento com tripsina 0,1% e suspensão em meio de cultura. Aliquotas desta a suspensão foram transferidas para outras garrafas contendo meio de cultura fresco.

2.4.2. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR:

Para determinar os efeitos do IP sobre a proliferação celular foi utilizado método desenvolvido em nosso laboratório (SOUZA-PINTO *et al.*, 1996), onde as células eram tratadas com o agente oxidante na fase exponencial de crescimento e sub-cultivadas por um período de 24 h, logo após o tratamento. Assim, foram semeadas 3×10^4 células/poço em placas de 24 poços (Corning), crescidas por 44-48 h em DMEM contendo 10% de SFB, em seguida, as culturas foram tratadas com soluções em PBS-A de Cu⁺² (1-50 µM), IP (0,1-50 µM) e IP (0,1-50 µM) acrescido de 10 µM de Cu⁺² (30 min, 37 °C em estufa de CO₂). Foram realizados ensaios em triplicatas para cada dose, sendo 6 controles expostos ao PBS-A. Ao término do tratamento, as células foram

lavadas com PBS-A e 3 poços-controle foram fixados com TCA 5%; aos poços restantes foi adicionado meio de cultura e as placas foram novamente incubadas por mais 24h. Após este período, as culturas foram lavadas, fixadas com TCA 5%, lisadas com NaOH 0,5 M (1 h, 37 °C) e a população celular foi estimada pela detecção espectrofotométrica dos lisados celulares a 260 nm, cujos valores de absorbância são diretamente proporcionais ao teor de células que resistiram ao tratamento, descrevendo uma função linear (GESZTESI, 1990).

2.4.3. DETERMINAÇÃO DA PERDA DA ADESÃO CELULAR:

Para a avaliação da perda da adesão celular foram feitos experimentos utilizando fibroblastos V79 na sua fase exponencial de crescimento, expostos ao sistema oxidativo, como descrito no item 2.4.2. Foram semeadas 3×10^4 células/poço em placas com 24 poços e incubadas por 48-50 h em DMEM. Após este período os fibroblastos foram expostos aos tratamentos em três condições diferentes:

A) Avaliação da perda da adesão celular em função do tempo de incubação, após tratamento: as células foram expostas a 200 μ M de IP em PBS-A, acrescido de 100 μ M de Cu^{+2} . Ao fim do tratamento e lavagem das células, 3 poços controle foram fixados e os outros 21 foram repostos com DMEM fresco, e incubados por períodos crescentes de 1-5 h.

B) Análise da perda da adesão celular em função da concentração do Cu^{+2} : as células foram expostas a 100 μ M de IP na presença de Cu^{+2} (5-100 μ M). Após o tratamento e lavagem, os fibroblastos foram repostos com meio de cultura fresco e incubados em estufa de CO_2 por 3 h; foram feitos controles na ausência e na presença de IP.

C) Análise da perda da adesão celular em função da concentração do IP: os fibroblastos foram expostos ao IP (25-400 μ M) na presença de 25 μ M de Cu^{+2} . Em seguida, as células foram submetidas às mesmas condições utilizadas para o íon Cu^{+2} ; sendo feitos controles na ausência e na presença de 25 μ M do íon metálico.

Ao término de cada processo, os fibroblastos foram fixados com TCA 5% e lisados com NaOH 0,5 M (1 h, 37 °C) e a população celular foi estimada pela detecção espectrofotométrica dos lisados celulares a 260 nm (item 2.4.2).

2.4.4. AVALIAÇÃO DA PERDA DA VIABILIDADE CELULAR:

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante vital azul de tripan (RENZI *et al.*, 1993) que é excluído pelas células que possuem íntegras as membranas citoplasmáticas (células viáveis), e é retido por aquelas que sofreram alteração na sua permeabilidade (células não viáveis). Assim, fibroblastos V79 crescidos por 48-50h foram tratados com IP (25-400 μ M) e 25 μ M de Cu^{+2} . Ao final do tratamento as células foram descoladas do substrato com tripsina 0,1%, recolhidas em tubo tipo *ependorff*, centrifugadas e ressuspensas em 50 μ l de PBS-A. O número de células não viáveis e viáveis foi contado em câmara de *Newbauer*, depois de feita a contagem, foram feitos os cálculos das porcentagens de células não viáveis coradas, em relação às células viáveis que não se coram.

2.4.5. ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS:

Para os experimentos de avaliação geral da morfologia dos fibroblastos foi utilizado microscopia de contraste diferencial de fase por interferência de Normarski, segundo BERLYN & MIKSCH (1976). Células V79 cultivadas em placas de Petri (ϕ = 5 cm) por 48-50 h foram expostas a soluções de IP (25-400 μ M) em PBS-A, na presença de 25 μ M Cu^{+2} . As alterações morfológicas ocasionadas nos fibroblastos foram observadas em fotomicroscópio Olympus PM-CD20 (Micronal) e fotografadas em seguida ao tratamento oxidativo. Em uma outra situação as células foram fotografadas após serem tratadas com soluções tamponadas de IP (50 μ M) acrescidas de 25 μ M de Cu^{+2} , na presença e na ausência de GSH (2 mM) ou tiouréia (10 mM).

2.4.6. AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO:

Para as análises das alterações do citoesqueleto, células V79 foram semeadas em placas de Petri contendo lamínulas. Após o cultivo por 48 horas os fibroblastos

foram tratados (30 min a 37°C) com solução de IP (50µM), em PBS-A, acrescida de Cu^{+2} (25 µM); depois, as células foram fixadas com formol 3,7% (30min) e lavadas com PBS-A. Após a fixação, foi feita a permeabilização celular com triton X-100 (0,5%) à temperatura ambiente por 10min. A marcação de quatro dos filamentos do citoesqueleto foi feita por ensaios imunocitoquímicos de acordo com Matsui & Machado-Santelli (1997), como descrito abaixo:

A) *filamentos intermediários de vimentina*: as células permeabilizadas foram expostas ao anticorpo primário contra vimentina (0,5mg/ml) por 3h, em câmara úmida e temperatura ambiente. Após este período as lamínulas foram lavadas com PBS-A, seguindo-se por uma segunda incubação com o anticorpo secundário anti-*mouse* IgG, marcado com FITC (1:30h) e tratamento com iodeto de propídio (1:1000, 15 min).

B) *filamentos de actina*: as células permeabilizadas foram incubadas com RNAase (10 µg/ml por 30 min) e após lavagens foram submetidas à incorporação de rodamina-faloidina (15 min).

C) *microtúbulos com a α -tubulina*: as células permeabilizadas foram expostas ao anticorpo primário contra α -tubulina (0,5mg/ml) por 3h, em câmara úmida e temperatura ambiente. Após este período as lamínulas foram lavadas com PBS-A e expostas a uma segunda incubação com o anticorpo secundário anti-*mouse* IgG, marcado com FITC (1:30h), e tratadas com iodeto de propídio (1:1000, 15 min).

D) *filamentos da lâmina nuclear*: as células permeabilizadas foram lavadas com PBS-A contendo BSA (0,05 %, por 15 min) e em seguida, os fibroblastos foram incubados com anticorpo primário contra lamina B (0,5mg/ml) por 3h, em câmara úmida e temperatura ambiente. Após este período as lamínulas foram lavadas com PBS-A, seguindo-se por uma segunda incubação com o anticorpo secundário anti-*mouse* IgG, marcado com FITC (1:30h).

Ao final de cada imunoensaio, os fibroblastos foram lavados com PBS-A e as lamínulas montadas sobre lâminas com "anti-fading" e analisadas ao microscópio confocal.

2.4.7. AVALIAÇÃO DOS NÚCLEOS CELULARES:

Para análise de imagem dos núcleos dos fibroblastos V79 cultivados sobre lamínulas e tratados com IP (50 μ M) + Cu^{+2} (25 μ M) foi utilizada marcação citoquímica com iodeto de propídeo (1:1000) (VILLA *et al.*, 1994) durante 15 min, em câmara úmida, à temperatura ambiente (após a lavagem do anticorpo secundário utilizado para o citoesqueleto). Alguns lotes de células foram submetidos a uma segunda marcação nuclear utilizando-se o método de Feulgen (MELLO & VIDAL, 1978). Assim, as lamínulas foram fixadas com etanol-ácido acético (3:1) por 30 min; secas ao ar livre e aderidas em lâminas com resina. Por fim, as lâminas foram lavadas com água destilada (3 min) e mantidas em HCl 5 N (30 min) para a hidrólise do DNA. Logo após, as mesmas foram lavadas em água corrente (3 min) e colocadas no escuro em reativo de Schiff por 1:30 h (reação de Feulgen). Ao final deste período, as lâminas foram lavadas até a retirada do excesso de reagente, e secas ao ar livre. Alguns lotes de células coradas por Feulgen tiveram incubações de 0, 3 e 24 h (em DMEM) após os tratamentos com o sistema IP/ Cu^{+2} .

Após a montagem e coloração, as lâminas foram submetidas à análise de imagens por microscopia confocal e à quantificação do DNA, ou fotografadas em microscópio de luz Nikon com objetiva de 40x. Todas as imagens foram obtidas e comparadas com controles de células expostas ao PBS-A.

Para avaliar a homogeneidade, volume e diâmetro nuclear; e diâmetro da lamina nuclear foi utilizado análise de imagem por confocal dos núcleos fixados logo após o tratamento e após 24h de incubação, para isto, a fluorescência emitida foi selecionada pelo filtro LP505nm, com laser de argônio. Em seguida, foram obtidas vistas ortogonais dos campos selecionados em objetiva de 40x, sendo as reconstruções 3D elaboradas através do software *LSM 510 for Zeiss*.

2.4.8. ANÁLISES DE IMAGENS:

As imagens dos filamentos do citoesqueleto (vimentina, actina, α -tubulina e lamina B) foram obtidas no laboratório da Profa. Dra. Gláucia M. Machado-Santelli, do Departamento de Embriologia e Histologia (ICB - USP), segundo PAWLEY (1995). A microscopia confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510) foi feita em ligado a um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 100M, usando objetiva de imersão com aumento de 63x. Para todos os elementos observados, inclusive o núcleo corado com iodeto de propídeo e Feulgen, a fluorescência emitida foi selecionada pelos filtros LP560nm (vermelho) e BP505-530 nm (verde), com laser de hélio/neônio $\lambda = 543\text{nm}$ e de argônio $\lambda = 488\text{nm}$, exibidas com uma resolução de 512x512 pixels em modo RGB.

2.4.9. QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR ANÁLISE DE IMAGEM:

O conteúdo de DNA nuclear foi quantificado em preparações citológicas fixadas em etanol:ácido acético (3:1) e coradas pelo método de Feulgen, como descrito no item 2.4.7. Os núcleos foram quantificados por um software (CELL IMAGE RETRIEVAL AND EVALUATION SYSTEM (CIRES)/Kontron) que integra os valores de densidade ótica, capturados por uma câmara de vidro (RGB) acoplada a um computador. Este software utilizou como plataforma o Windows para grupos 3.11. Os valores de densidade ótica integrados (IOD) obtidos foram convertidos em valores de ploidia pelo próprio software. Para isto em cada bateria de coloração foi colocada uma lâmina de células V79 sem tratamento, cujo conteúdo de DNA já é conhecido (diplóide) e nela foram quantificados 300 núcleos. Os valores de IOD encontrados permitiram estabelecer os valores de 2c e a sua relação com os de IOD da preparações de fibroblastos V79 tratados (300 núcleos), possibilitando a construção de um histograma de distribuição do DNA que nos forneceu os índices de DNA médio e do pico.

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

As comparações múltiplas entre tratamentos foram feitas por análise de variância seguida por testes de comparação a posteriori segundo ZAR (1996).

As relações de dose-resposta foram avaliadas por análise de regressão por métodos lineares e não lineares. Foram feitas normalizações da distribuição das proporções de proliferação, perda de adesão e viabilidade celular através de transformação angular arcoseno, para corrigir a assimetria em torno das médias, inerente aos conjuntos de dados de proporções (ZAR, 1996). As análises de diâmetro nuclear e lâmina nuclear foram feitas com base nos teste *t* em amostras independentes. Para as análises foram utilizados os *softwares* ORIGIN 5.0 e SYSTAT 5.0.

CAPÍTULO III

***O COBRE NA OXIDAÇÃO DO
ISOPROTERENOL***

3.1. ESPECTROFOTOMETRIA DA OXIDAÇÃO DO ISOPROTERENOL:

3.1.1 O EFEITO DE ÍONS DE METAIS DE TRANSIÇÃO:

Procuramos, inicialmente, investigar a influência de metais de transição sobre a velocidade de oxidação de IP. Para isto, analisamos este processo oxidativo por espectrofotometria no visível a 490 nm, o que corresponde ao pico máximo de absorção do N-isopropil-noradrenocromo de acordo com NÚÑEZ-DELICADO *et al.* (1996).

Na análise cinética da oxidação de IP, a presença dos íons de metais de transição como os de Cu^{+1} , Cu^{+2} , Fe^{+2} e Fe^{+3} alterou de maneira diferente a velocidade de reação (FIGURA 1).

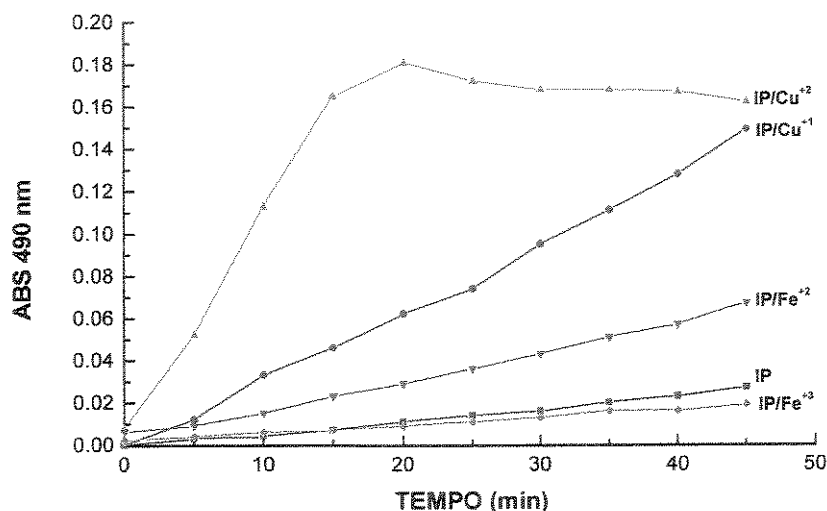


FIGURA 1. Cinética da oxidação do IP na presença de íons metálicos. A oxidação de uma solução a 50 μM de IP (PBS-A, temperatura ambiente) foi acompanhada em intervalos 5 min, a 490nm por 45 min, em espectrofotômetro METROLAB SF1700, na ausência e na presença de 25 μM dos íons: Cu^{+1} , Cu^{+2} , Fe^{+2} e Fe^{+3} .

Os íons de ferro III não modificaram significativamente a velocidade de oxidação de IP, quando comparado ao fármaco livre. Os íons de cobre I e ferro II aceleraram a velocidade da reação, porém os íons de cobre II foram os mais potentes catalisadores

da reação de oxidação de IP. Tomando-se como referência o produto formado nos primeiros 15 min de reação de oxidação de IP puro foi possível calcular as velocidades de oxidação na presença dos íons metálicos. Na **TABELA II** pode se observar que a presença do íon de cobre divalente aumentou em cerca de 16,4 vezes a velocidade da oxidação desta catecolamina ao meio reacional, que atingiu a estabilização da reação após 15 min de reação. Neste mesmo período os íons de Cu^{+1} aumentaram a velocidade de reação em aproximadamente 5,2 vezes, os íons de Fe^{+2} em 2,2 vezes e os de Fe^{+3} mantiveram os níveis do aminocromo gerados iguais ou menores do que àqueles produzidos pela oxidação de IP livre de metais.

TABELA II. Velocidade de produção de aminocromo (nmoles/min), em relação ao IP livre de metal.

SISTEMA	A490 (Δ médio)	V (nmoles $\times$ $\text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	Razão V_a / V_c
IP	0,0033	0,16	1,0
IP/ Fe^{+3}	0,002	0,10	0,6
IP/ Fe^{+2}	0,007	0,35	2,2
IP/ Cu^{+2}	0,0523	2,62	16,4
IP/ Cu^{+1}	0,0166	0,83	5,2

A oxidação de 50 μM de IP (PBS-A, temperatura ambiente) foi acompanhada em intervalos de 5min, a 490 nm por 45 min, em espectrofotômetro METROLAB SF1700, na ausência e na presença de 25 μM dos íons: Cu^{+1} , Cu^{+2} , Fe^{+2} e Fe^{+3} . As velocidades de produção do aminocromo foram obtidas através do $\epsilon = 0,00407 \times \mu\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

V_a = Velocidade de reação da amostra (IP+ metal) e V_c = Velocidade de reação do controle (IP).

Através destes dados foi possível estabelecer uma escala crescente de classificação dos íons de metais de transição utilizados, quanto à potência catalítica para a autooxidação de IP: $\text{Fe}^{+3} \leq \text{IP puro} < \text{Fe}^{+2} < \text{Cu}^{+1} < \text{Cu}^{+2}$. Estes dados também indicaram que o melhor catalisador da oxidação de IP foi o cobre, e que os íons divalentes (Cu^{+2}) foram muito mais efetivos do que os íons monovalentes (Cu^{+1}) para potencializar este processo.

A investigação da oxidação de IP na presença de cobre II foi feita através da obtenção do seu espectro de absorção (**FIGURA 2**). A partir deste espectro pode ser constatado o aparecimento de três picos característicos dos produtos de oxidação de

IP na presença de Cu^{+2} : dois picos no ultra-violeta (UV), em 211 nm e 290 nm, e um terceiro no visível a 490 nm. O aumento da intensidade dos três picos de absorção, com o tempo, reflete o aumento do teor de aminocromo no meio reacional. Ao final de 30 minutos, a reação parece ter consumido todo o IP disponível, como indicado pela estabilização do espectro.

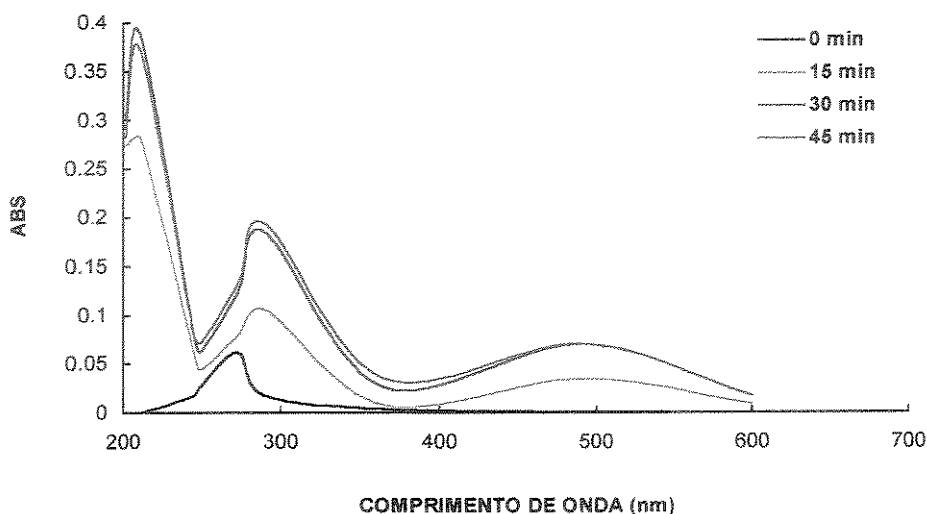


FIGURA 2. Espectro de absorção do IP em solução. A oxidação de uma solução a 20 μM de IP (PBS-A, temperatura ambiente) foi acompanhada pela medida da absorbância (ABS) da solução em espectrofotômetro METROLAB SF1700 (200 a 600 nm) em intervalos de 15 min, na presença de 15 μM do íon Cu^{+2} .

Após a confirmação da expressiva ação catalítica de Cu^{+2} sobre a oxidação de IP, foi analisado a influência de diferentes concentrações deste íon no processo. Assim, pela **FIGURA 3** foi possível constatar que a presença de pequenas quantidades do metal de transição (10 μM) já foram suficientes para aumentar a velocidade de oxidação de IP e que este processo foi crescente com a adição de quantidades cada vez maiores de metal. Verificou-se que o sistema oxidativo IP/ Cu^{+2} contendo 50 μM do íon atingiu níveis máximos de produto formado com apenas 10 min de reação, indicando que a maior velocidade de reação é obtida com quantidades equimolares dos reagentes.

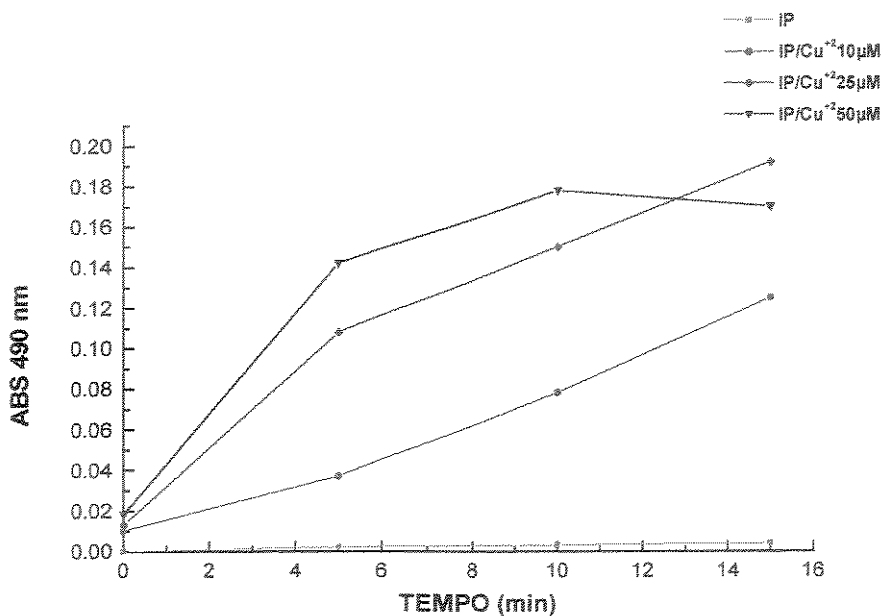


FIGURA 3. Efeito da concentração de Cu^{+2} sobre a oxidação de IP. A oxidação de uma solução a 50 μM de IP (PBS-A, temperatura ambiente) foi acompanhada em intervalos de 5 min, a 490nm por 15 min, em espectrofotômetro METROLAB SF1700, na ausência e na presença de Cu^{+2} (10-50 μM).

3.1.2. O EFEITO DE ÍONS Cu^{+2} NA OXIDAÇÃO DE OUTRAS CATECOLAMINAS:

O efeito do íon de cobre II foi investigado na oxidação de outras quatro catecolaminas, distintas quimicamente por substituições na cadeia alifática e no grupamento amino (vide introdução - **ESQUEMA 3**), sendo estas velocidades, posteriormente, comparadas a do IP/ Cu^{+2} nas mesmas condições. Assim, como na oxidação de IP, a adição do íon Cu^{+2} após 15 min de reação aumentou a velocidade de reação de todas as moléculas (**FIGURA 4**).

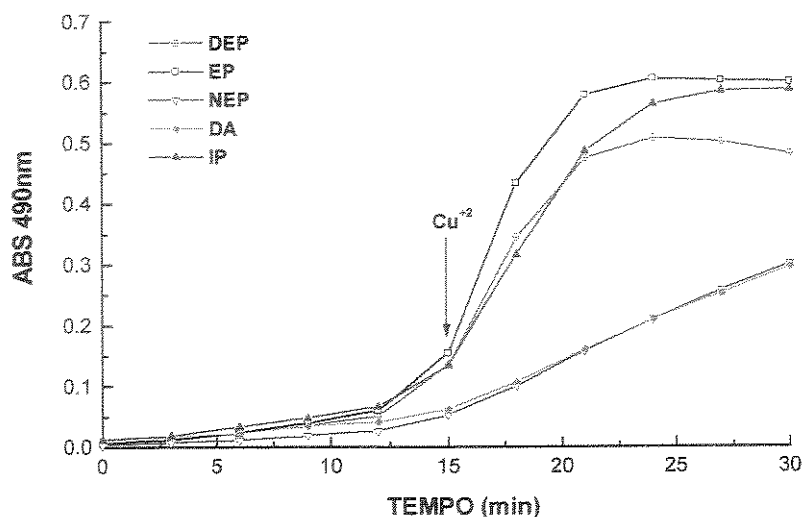


FIGURA 4. Efeito do cobre sobre a cinética de oxidação de catecolaminas. A oxidação espontânea de soluções a $200\mu\text{M}$ de catecolaminas (PBS-A, temperatura ambiente) foi acompanhada a 490nm em espectrofotômetro Metrolab SF1700 durante 15 min. Ao final dos 15 min de reação, foi adicionado ao meio reacional $150\mu\text{M}$ de Cu^{+2} , seguindo-se a cinética da decomposição das catecolaminas por mais 15 min, também em intervalos de 3 min.

As velocidades de reação foram diferenciadas exatamente no momento de adição de íon metálico, dos níveis basais obtidos com as catecolaminas puras. Quando foram comparadas as velocidades obtidas das outras catecolaminas com a velocidade de IP/Cu^{+2} na presença de metal constatou-se que as velocidades de NEP e DA são menores e que as de DEP e EP são próximas a do IP (TABELA III).

TABELA III. Velocidade de produção de aminocromo (nmoles/min), em relação ao IP associado ao íon de Cu^{+2} .

SISTEMA	A490 (Δ médio)	V (nmoles $\times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	Razão V_a / V_c
IP/ Cu^{+2}	0,176	14,41	1,0
DEP/ Cu^{+2}	0,169	13,84	0,96
EP/ Cu^{+2}	0,211	17,27	1,2
NEP/ Cu^{+2}	0,053	4,34	0,3
DA/ Cu^{+2}	0,0495	4,05	0,28

A oxidação espontânea de soluções a $200\mu\text{M}$ de catecolaminas (PBS-A, temperatura ambiente) foi acompanhada a 490nm em espectrofotômetro Metrolab SF1700 durante 15 min. Ao final dos 15 min de reação, foi adicionado ao meio reacional $150\mu\text{M}$ de Cu^{+2} , seguindo-se a cinética da decomposição das catecolaminas por mais 15 min, também em intervalos de 3 min. As velocidades de produção do aminocromo foram obtidas através do $\epsilon = 0,00407 \times \mu\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

V_a = Velocidade de reação da amostra (IP+ metal) e V_c = Velocidade de reação do controle (IP).

3.1.3. O EFEITO DE ANTIOXIDANTES NA OXIDAÇÃO DE IP/ Cu^{+2} :

Para concluir o estudos espectrofotométricos da oxidação de IP foi analisada a influência de antioxidantes, adicionados ao meio reacional, sobre a velocidade de decomposição daquela catecolamina. Assim, a **FIGURA 5** mostra que os antioxidantes Glutathiona (GSH) e catalase (CAT) alteraram expressivamente a velocidade de oxidação do sistema IP/ Cu^{+2} . Enquanto a CAT retardou a velocidade da reação em pelo menos 2 vezes já nos primeiros 10 minutos, a GSH inibiu completamente a oxidação de IP.

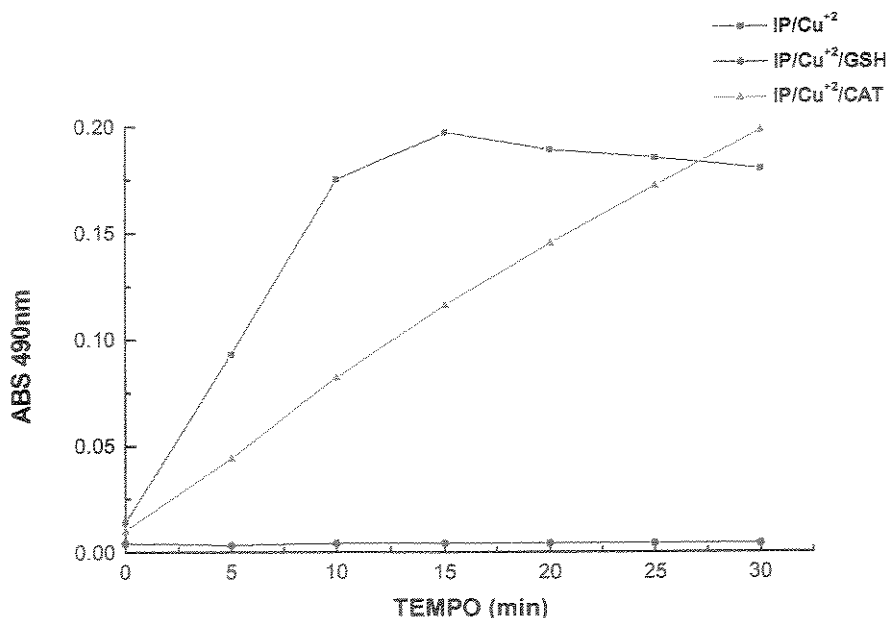


FIGURA 5. Efeito de antioxidantes sobre a oxidação de IP. A oxidação de uma solução a 50 μM de IP (PBS-A, temperatura ambiente) acrescida de Cu^{+2} 25 μM foi acompanhada em espectrofotômetro METROLAB SF1700, a 490nm por 30 min, na presença de GSH 2 mM e CAT 250 UI/ml.

3.2. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE H_2O_2 E O_2^- POR IP/Cu^{+2} :

3.2.1. FORMAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR IP/Cu^{+2} :

O estudo sobre o consumo de oxigênio pelas soluções de IP contendo Cu^{+2} (**FIGURA 6**) mostrou que o conteúdo de O_2 dissolvido foi completamente consumido no decorrer de 10 min de reação e que a adição de CAT restabeleceu parcialmente o oxigênio consumido. Um minuto após a adição da enzima ao meio reacional, o teor de O_2 em solução foi aumentado para cerca de 26 nmol/ml. A concentração máxima de O_2 atingida com a adição de CAT foi de 38,0 nmol/ml, detectados no décimo quarto minuto antes do fim da leitura em oxígrafo, o que correspondia a concentração de 76 mM de H_2O_2 disponível no meio reacional naquele momento.

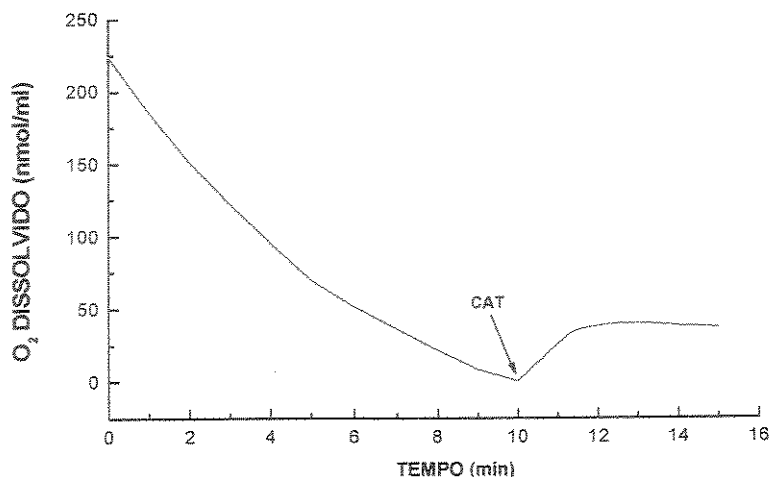


FIGURA 6. Cinética do consumo de oxigênio durante a oxidação de IP. O consumo de oxigênio de uma solução IP (50 μM) na presença Cu^{+2} (25 μM) (PBS-A, temperatura ambiente) foi medido por 10 min em oxígrafo composto por câmara de vidro (1,7mL), equipada com agitador magnético e conectada a um eletrodo tipo Clarck. A seta indica a adição de CAT 250 UI/ml ao meio de reação.

3.2.2. PRODUÇÃO DE RADICAIS ÂNION SUPERÓXIDO POR IP/ Cu^{+2} :

Na ausência de metal a oxidação de IP não levou a formação de O_2^- , enquanto que a presença de cobre II estimulou em 6,5 vezes a produção deste radical livre durante a degradação oxidativa de IP. Nas mesmas condições utilizadas para o IP o Cu^{+2} potencializou a produção daquele radical para todas as demais catecolaminas, de duas a cinco vezes, quando comparado com a oxidação das respectivas catecolaminas livres do íon metálico (**TABELA IV**). Na presença de Cu^{+2} , a ANOVA mostrou diferenças altamente significativas quanto à produção de O_2^- pelas catecolaminas ($p < 0,01$; $R = 0,99$; $R^2 = 0,97$).

TABELA IV. Detecção espectrofotométrica do $O_2^{\cdot -}$ produzido durante a oxidação de IP comparado a outras catecolaminas.

Catecolamina	A_{560nm}	
	- Cu^{+2}	+ Cu^{+2}
DA	0.011 ± 0.002	0.034 ± 0.008^a
NEP	0.011 ± 0.001	0.022 ± 0.002^a
DEP	0.026 ± 0.003	0.102 ± 0.009^b
EP	0.018 ± 0.002	0.099 ± 0.004^b
IP	0.013 ± 0.003	0.085 ± 0.004^c

Redução do NBT pelo $O_2^{\cdot -}$ detectado em espectrofotômetro a 560 nm. A detecção de $O_2^{\cdot -}$ foi feita após 90 min de oxidação de 500 μ M de catecolaminas, na presença ou ausência de Cu^{+2} 500 μ M (em PBS-A, temperatura ambiente). As letras diferentes indicam valores significativamente diferentes, segundo o teste de Scheffè.

CAPÍTULO IV
DANOS EM BIOMOLÉCULAS
GERADOS POR
ISOPROTERENOL E Cu^{+2}

4.1. DANOS EM PROTEÍNA IN VITRO:

4.1.1. FORMAÇÃO DE CARBONILAS NA BSA:

A investigação sobre as lesões geradas em biomoléculas pela oxidação de IP/ Cu^{+2} teve como primeiro alvo a oxidação de proteínas, começando pela análise de formação de carbonilas nos resíduos de aminoácidos da albumina de soro bovino (BSA), através da redução dos resíduos de aminoácidos oxidados com $\text{NaBH}_4[^3\text{H}]$ e detecção pela marcação isotópica da proteína com ^3H .

A primeira etapa da otimização do método foi a definição das concentrações de BSA e de íon cúprico a serem utilizadas. Experimentos com diversas proporções de BSA/ Cu^{+2} foram realizados, encontrando-se a proporção de 500 $\mu\text{g/ml}$ de BSA e 100 μM de Cu^{+2} como a condição de melhor rendimento (dados não apresentados).

O teor de carbonilas formadas nos resíduos de aminoácidos da BSA foi expresso em CPM/ μg de BSA, com o teor protéico determinado a cada experimento através de uma curva de calibração ($y = 0,06577[\text{BSA}] + 0,00658$, $R^2 = 0,993$, $p < 0,01$).

IP/ Cu^{+2} se mostrou um potente sistema oxidante causador da oxidação dos resíduos de aminoácidos da BSA. Esta afirmativa teve como alicerce o estudo comparativo entre IP/ Cu^{+2} e o conhecido sistema padrão ASC/ Cu^{+2} (FIGURA 7). A análise ANOVA ($p < 0,01$; $gl = 23$; $R = 0,94$ e $R^2 = 0,88$) mostrou que os tratamentos com o sistema IP/ Cu^{+2} produziram o mesmo teor de carbonilas que o sistema padrão (TABELA V, $p > 0,05$). Na concentração de 200 μM de IP, o teor de carbonilas aumentou cerca de 1,5 vezes em relação ao ASC/ Cu^{+2} (FIGURA 7, TABELA V, $p < 0,01$).

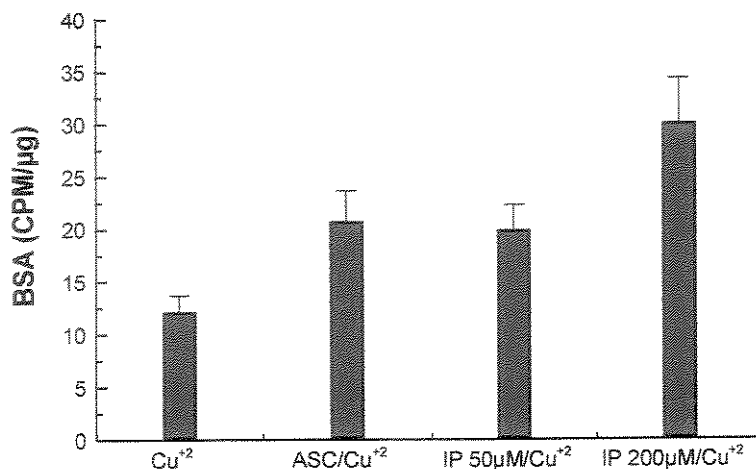


FIGURA 7. Determinação do teor de carbonilas produzidas em BSA. 500 μg/ml de BSA foram tratadas com: ASC (5mM) + Cu^{+2} (50μM); IP (50μM) + Cu^{+2} (100μM) e IP (200μM) + Cu^{+2} (100μM).

TABELA V. Matriz de probabilidades.

CONDIÇÃO	CONDIÇÃO				
		1	2	3	4
	1	1			
	2	0 ($p < 0,01$)	1		
	3	0 ($p < 0,01$)	0,975 ($p > 0,05$)	1	
	4	0 ($p < 0,01$)	0,001 ($p < 0,01$)	0 ($p < 0,01$)	1

Diferenças entre os tratamentos de 500 μg/ml de BSA, determinadas pelo teste de Sheffé, sendo os resultados de $p > 0,05$ – não significativos; $p \leq 0,05$ – significativos e $p \leq 0,01$ – altamente significativos. Onde: 1 – Cu^{+2} 100 μM, 2 – ASC 5 mM + Cu^{+2} 50 μM, 3 – IP 50μM + Cu^{+2} 100 μM e 4 – IP 200 μM + Cu^{+2} 100 μM.

A **FIGURA 8** mostrou uma relação de dose-dependência entre a concentração de IP e o teor de grupos carbonilas em BSA. Pela análise por regressão não linear ($y = 6,8\ln([\text{IP}] + 5,55)$; $\chi^2=35,3$; $p < 0,01$; $gl = 35$; R^2 total = 0,97 e R^2 corrigido = 0,84) ficou demonstrado o aumento da produção de carbonilas nos resíduos de aminoácidos daquela proteína com o aumento progressivo da concentração de IP. A **FIGURA 8** indica uma estabilização do teor de carbonilas produzido, em concentrações de IP superiores a 200 μM.

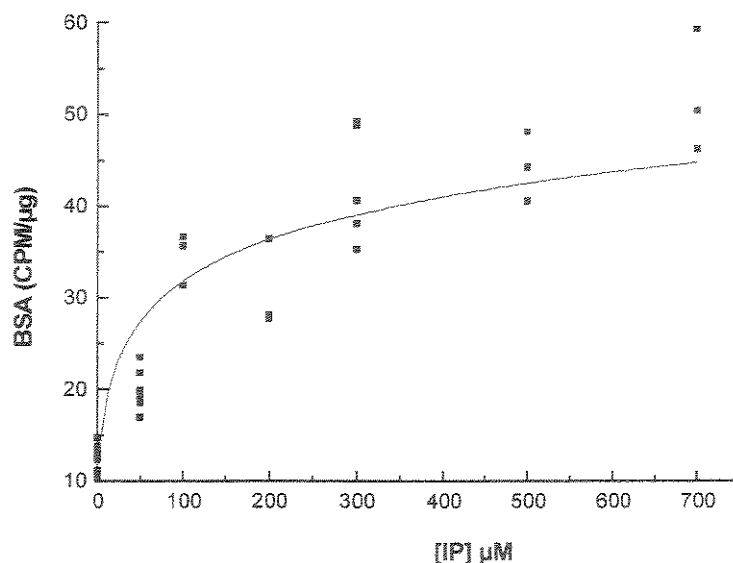


FIGURA 8. Determinação do teor de carbonilas produzidos em BSA pelo sistema IP/ Cu^{+2} . 500 $\mu\text{g/ml}$ de BSA foram incubadas com IP (50-700 μM), na presença de 100 μM de Cu II (em PBS-A, 1 h, 37°C). A oxidação da proteína foi determinada pela medida da incorporação de ^3H nos grupos carbonilas reduzidos, em contador de cintilação líquida BECKMAN LS6000.

4.1.2. FRAGMENTAÇÃO DO ESQUELETO PROTÉICO DA BSA:

Um segundo aspecto abordado na avaliação da integridade de proteínas, *in vitro*, foi a análise fragmentação protéica pela exposição ao sistema IP/ Cu^{+2} . No gel de SDS-poliacrilamida (**FIGURA 9**) foi possível constatar que o tratamento da BSA com IP/ Cu^{+2} levou à oxidação da proteína com consequente fragmentação de sua cadeia polipeptídica, visto pelas **linhas D a I**. Esta fragmentação pôde ser percebida pelo aparecimento progressivo de pequenas bandas ao longo do gel, chegando a pesos moleculares próximos de 14 kd. Estes fatos podem ser comparados aos controles negativos vistos pelas **linhas A a C**.

A extensão da fragmentação da BSA mostrou ser dose dependente. Esta mesma relação também foi constatada pelo evidente espalhamento da banda principal da BSA que aumenta de tamanho a medida que a concentração de IP aumenta.

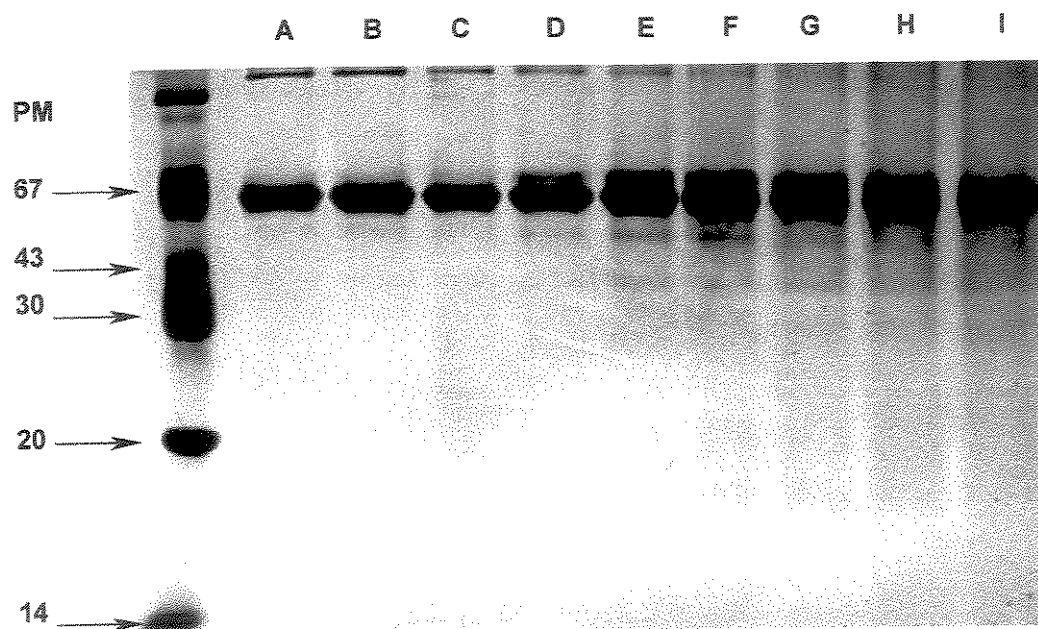


FIGURA 9. Gel de SDS-poliacrilamida da BSA exposta ao IP/ Cu^{2+} . Amostras contendo 5 μg de BSA tratadas (em PBS-A, 1 h, a 37°C) foram aplicadas ao gel de corrida com 12% de acrilamida, linhas: A. proteína não tratada; B. 100 μM Cu^{2+} ; C. 400 μM IP; D. 12,5 μM IP + 100 μM Cu^{2+} ; E. 25 μM IP + 100 μM Cu^{2+} ; F. 50 μM IP + 100 μM Cu^{2+} ; G. 100 μM IP + 100 μM Cu^{2+} ; H. 200 μM + 100 μM Cu^{2+} ; I. 400 μM IP + 100 μM Cu^{2+} .

4.2. DANOS EM DNA IN VITRO:

4.2.1. FORMAÇÃO DE 8-OH-DG EM DNA DE TIMO BOVINO:

A busca pelos danos oxidativos gerados em DNA de timo bovino pela exposição ao IP/ Cu^{2+} foi o segundo enfoque na investigação de lesões causados em biomoléculas *in vitro*. Através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acessada pela detecção eletroquímica (DE) foi possível detectar a guanosina oxidada (8-OH-guanosina) no DNA tratado.

Nos cromatogramas (**FIGURA 10**) foram caracterizados os picos dos padrões de 8-OH-dG (TR = 10,037) e da dG (TR = 6,945). O teor de guanosina oxidada foi definido através de uma curva de calibração ($p \leq 0,01$) e os valores encontrados foram relacionados ao teor de dG encontrado. A **FIGURA 11** mostra que o sistema IP/ Cu^{2+} foi capaz de induzir a oxidação da guanosina numa relação de dose dependência ($y =$

0,118ln (IP-17,314); $\chi^2 = 0,0017$; $p < 0,01$; $gl = 22$; $R^2 \text{ total} = 0,994$ e $R^2 \text{ corrigido} = 0,935$).

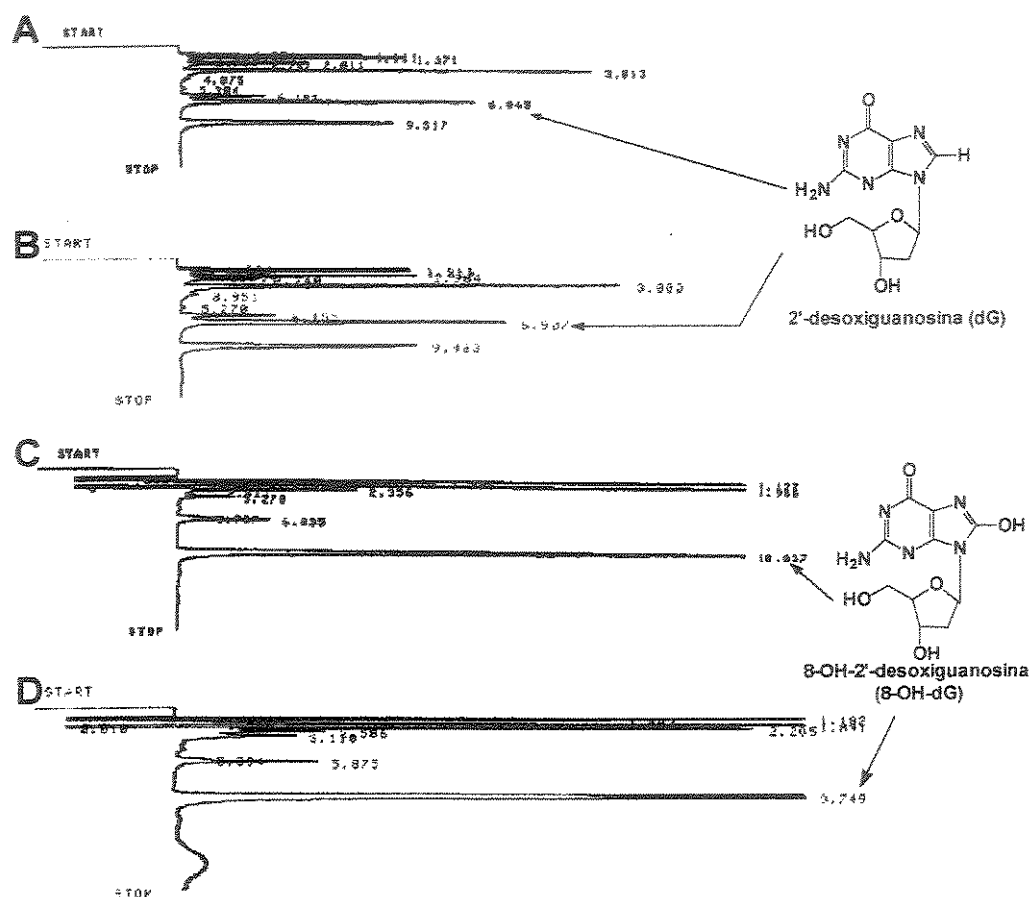


FIGURA 10. Cromatograma de dG e 8-OH-dG. Em A e B dG, C e D 8-OH-dG, sendo A e C os padrões de dG e 8-OH-dG respectivamente e, B e D os tratamentos do DNA de timo bovino com IP (100 μM) e Cu^{+2} (100 μM).

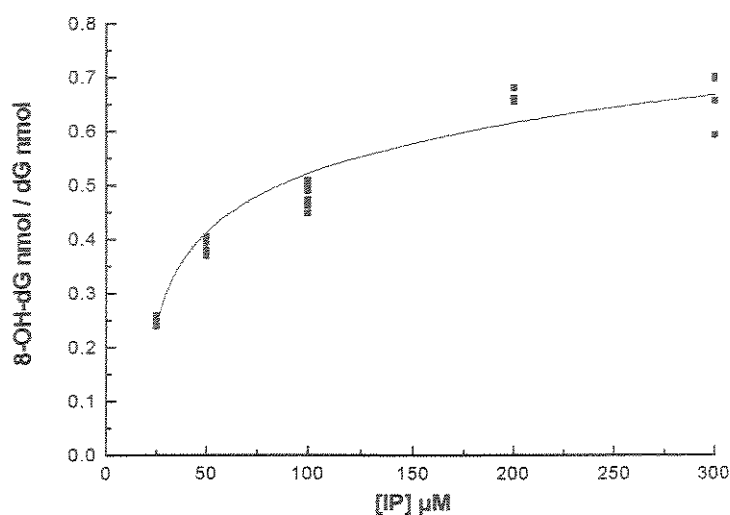


FIGURA 11. Formação de 8-OH-dG em DNA por IP/ Cu^{+2} . DNA de timo bovino foi tratado com IP + Cu^{+2} 100 μM (PBS-A, 1 h, 37°C). Em seguida, o DNA foi hidrolisado e a quantidade de 8-OH-dG e dG foi determinada por CLAE-DE e CLAE-UV. Os valores de 8-OH-dG obtidos foram transformados em escala logarítmica.

CAPÍTULO V
***EFEITOS CITOTÓXICOS DO
ISOPROTERENOL E Cu^{+2} :
UMA ABORDAGEM FUNCIONAL***

5.1. EFEITOS DO ISOPROTERENOL SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR:

Os estudos da citotoxicidade do IP associado ao íon Cu^{+2} foram iniciados com a avaliação do seu efeito sobre a proliferação celular de fibroblastos V79. Para isto, células em fase exponencial de crescimento foram tratadas com IP/ Cu^{+2} e subcultivadas após o tratamento por 24 h, para análise dos efeitos do sistema sobre o crescimento celular.

A **FIGURA 12B** mostra uma severa influência de IP/ Cu^{+2} sobre a proliferação dos fibroblastos V79, inibindo o crescimento celular em doses de 0,1 a 7,0 μM de IP. Este gráfico deixa evidente que o efeito foi dependente da presença do sistema oxidativo completo, já que isolados IP e o íon Cu^{+2} (**FIGURA 12 A e B**) não interferiram significativamente ($p > 0,05$) na proliferação celular. A porção linear da curva exponencial (**FIGURA 12B**) caracterizou uma regressão altamente significativa, ($p < 0,01$) equação: $y = 0,672 - 0,096[\text{IP}]$ ($gl = 20$; $R = 0,98$ e $R^2 = 0,96$) e através desta equação pôde ser encontrada a dose de IP correspondente a 3,5 μM que causou uma inibição de 50% da proliferação celular (ID50).

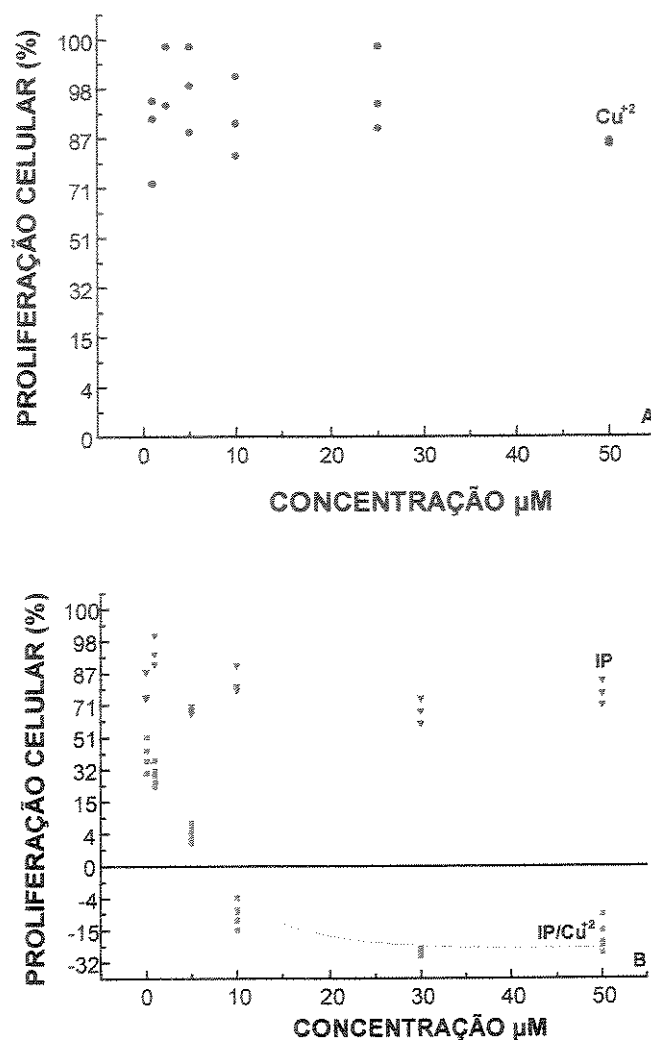


FIGURA 12. Efeito de IP/Cu^{+2} sobre a proliferação de fibroblastos V79. Células V79 em fase exponencial de crescimento foram tratadas (30 min, 37 °C) com: **PAINEL A** - íon Cu^{+2} (1-50 μM), e **PAINEL B** - IP (0,1-50 μM) e IP/Cu^{+2} (IP - 0,1-50 μM e Cu^{+2} - 10 μM). Depois, as células foram lavadas e incubadas com DMEM por mais 24h. Após este tempo os fibroblastos foram fixados, lisados e o conteúdo celular foi detectado em 260 nm. As porcentagens de proliferação celular foram expressas em relação aos controles tratados com PBS-A e transformadas em escala arcoseno.

Os parâmetros estatísticos confirmando (**TABELA VI**) os efeitos dos tratamentos sobre a proliferação dos fibroblastos demonstraram que não foram significativas as regressões tanto para os dados de IP quanto para Cu^{+2} isoladamente, sendo a proliferação celular nestes tratamentos inalterada em comparação ao controle (PBS-A).

TABELA VI. Parâmetros estatísticos das análises de regressão linear e não linear.

EFEITO	MODELOS	SIGNIFICÂNCIA	COEFICIENTES
Cu^{+2}	Linear: $y = a + bx$ Polinômio de 2ª ordem: $y = a + bx + cx^2$ Polinômio de 3ª ordem: $y = a + bx + cx^2 + dx^3$	$F = 1,92; p = 0,18$ $F = 1,36; p = 0,29$ $F = 0,48; p = 0,18$	Não Significativos
IP	Linear: $y = a + bx$ Polinômio de 2ª ordem: $y = a + bx + cx^2$ Polinômio de 3ª ordem: $y = a + bx + cx^2 + dx^3$	$F = 2,08; p = 0,17$ $F = 2,63; p = 0,10$ $F = 1,64; p = 0,22$	Não Significativos
IP/ Cu^{+2}	Exponencial: $y = (a \exp(-x/t)) + y_0$	$\chi^2 = 0,02; p < 0,01$ $R^2 = 0,93$ $R^2 \text{ ajustado} = 0,93$	Valores $\pm$ Erro Padrão ($p = 0,05$) $a = 1,19 \pm 0,06$ $t = 7,97 \pm 0,94$ $y_0 = 0,52 \pm 0,04$

Teste do efeito do Cu^{+2} , IP e IP/ Cu^{+2} sobre a proliferação de celular de células V79.

Acima da concentração IP (7,0 μM) que causa o máximo de inibição ocorreu uma diminuição do número inicial de células, sugerindo um efeito adicional de IP/ Cu^{+2} sobre a adesão celular dos fibroblastos nas placas de cultura.

5.2. EFEITOS DO SISTEMA OXIDATIVO SOBRE A ADESÃO CELULAR:

Para confirmar a interferência do sistema IP/ Cu^{+2} na adesão celular foram desenvolvidos experimentos de quantificação das células remanescentes nas placas de cultura após o tratamento oxidativo. A medida de perda da adesão celular foi feita pelas absorbâncias dos lisados das células remanescentes nas placas de cultura e as porcentagens obtidas em relação aos controles foram transformadas em arco-seno, como feito nos experimentos de proliferação celular.

Num primeiro momento, foi estudada a perda da adesão celular de fibroblastos V79 tratados com IP/ Cu^{+2} , em função do tempo de incubação após o tratamento. Pela

FIGURA 13 foi constatado que ocorreu uma grande perda celular com o aumento do tempo de incubação após o tratamento. Imediatamente após o tratamento não houve descolamento celular, observando-se uma progressiva perda da adesão celular sobre as placas de cultura que chegou a um limite máximo de 60% de descolamento após 3 h de incubação. Este tempo, foi então, selecionado para dar continuidade aos outros estudos sobre a perda de adesão celular dos fibroblastos tratados por IP na presença de Cu^{+2} .

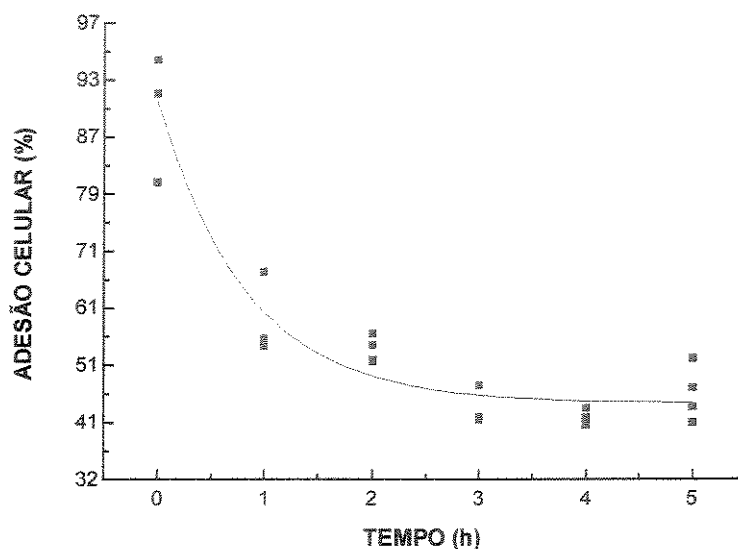


FIGURA 13. Efeito do tempo de incubação após tratamento com IP/ Cu^{+2} sobre a adesão celular. Células V79 em fase exponencial de crescimento foram tratadas com IP (200 μM) e Cu^{+2} (100 μM) (30 min, a 37°C, em PBS-A); em seguida as células foram lavada e incubadas em meio de cultura fresco, a 37°C por 0-5 h. Após a incubação, as placas foram lavadas e as populações celulares aderidas às mesmas foram determinadas pelas absorbâncias dos lisados celulares a 260 nm. As percentagens de células remanescentes foram expressas em relação ao controle tratado com PBS-A e transformadas em escala arco-seno.

Em seguida, foi avaliada a influência da concentração do íon Cu^{+2} no processo. Pela **FIGURA 14A** foi constatado que a redução da adesão celular foi dependente da concentração do íon metálico, pois na ausência de cobre, o IP isolado não afetou a adesão celular (dado não apresentado). A adição de metal ao meio foi um fator determinante para desencadear uma significativa perda celular a partir de concentrações baixas como 10 μM , após as 3 h de incubação, atingindo um máximo de descolamento em torno de 60 % com 50 μM de Cu^{+2} . Para os outros experimentos foi utilizada a concentração de 25 μM de Cu^{+2} , já que nesta condição foi observado uma perda celular de quase 50 %.

Na última etapa deste estudo foi analisada a influência da concentração de IP sobre a adesão celular. Nesta análise não foram encontradas relações de dose-dependência desta catecolamina no efeito, pois encontrou-se um efeito máximo de aproximadamente 65 % de perda celular nas menores concentrações de IP testadas (**FIGURA 14B**).

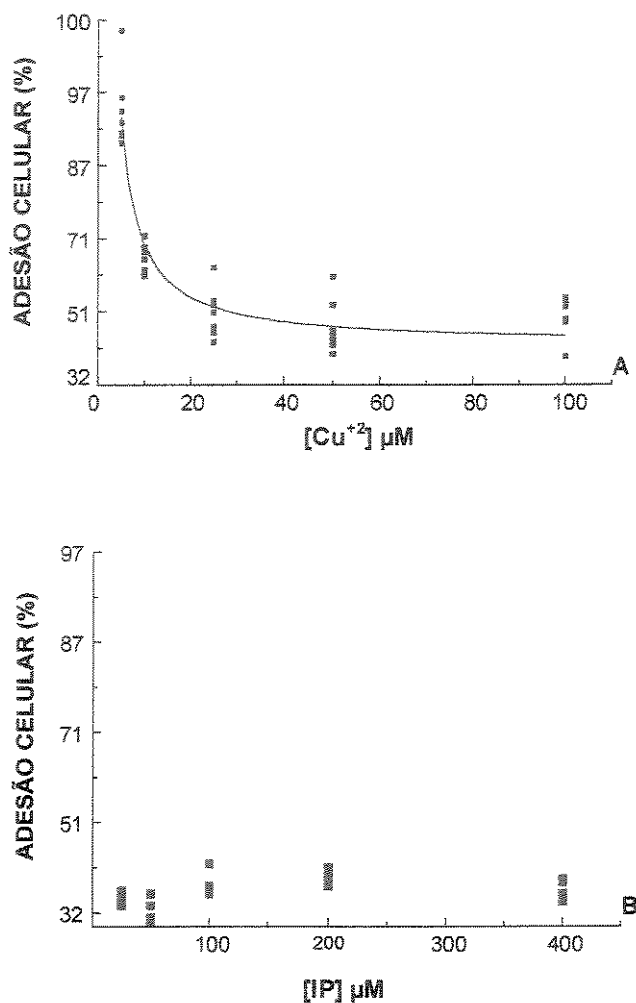


FIGURA 14. Efeito da concentração de IP e Cu^{+2} sobre a adesão celular. Células V79 em fase exponencial de crescimento foram tratadas (30 min, a 37 °C, em PBS-A) com: A. 100μM de IP + Cu^{+2} (5-100 μM) e B. IP (25-400 μM) + 25 μM de Cu^{+2} . Após os tratamentos, as células foram incubadas por 3 h em DMEM fresco. Ao final da incubação, as placas foram lavadas e as populações celulares aderidas às mesmas foram determinadas pelas absorbâncias dos lisados celulares a 260 nm. As percentagens de células remanescentes foram expressas em relação ao controle tratado com PBS-A e transformadas em escala arcoseno.

Os parâmetros estatísticos confirmam os efeitos do tempo de incubação pós-tratamento e da concentração de Cu^{+2} sobre a perda da adesão dos fibroblastos, sendo altamente significativas as regressões com ajuste exponencial descendente ($p \leq 0,01$) (TABELA VII). Quando analisamos a variação da concentração da catecolamina observamos que a regressão não foi significativa, não obtendo-se uma relação dose-

dependente de IP, pelo fato de não ser monotônica. Nesta situação, várias vezes foi obtido um mesmo valor de proporção de adesão celular para diferentes valores de concentração de IP.

TABELA VII. Parâmetros estatísticos das análises de regressão linear e não linear.

EFEITO	MODELOS	SIGNIFICÂNCIA	COEFICIENTES
Tempo	Exponencial: $y = a + b \exp(-x/c)$	$\chi^2 = 0,003; p < 0,01$ $R^2 = 0,99$ R^2 ajustado = 0,92	Valores $\pm$ Erro Padrão ($p = 0,05$) $a = 0,73 \pm 0,02$ $b = 0,53 \pm 0,03$ $c = 0,83 \pm 0,15$
$[\text{Cu}^{+2}]$	Exponencial: $y = a \exp(b/x)$	$\chi^2 = 0,005; p < 0,01$ $R^2 = 0,99$ R^2 ajustado = 0,91	Valores $\pm$ Erro Padrão ($p = 0,05$) $a = 0,71 \pm 0,01$ $b = 3,12 \pm 0,15$
[IP]	Polinômio de 2ª ordem: $y = a + bx + cx^2$	$F = 5,24; p = 0,02$ $R^2 = 0,38$ R^2 ajustado = 0,31	Significativos mas de ajuste desprezível aos dados
	Polinômio de 3ª ordem: $y = a + bx + cx^2 + dx^3$	$F = 3,49; p = 0,04$	Não Significativos

Teste do efeito do tempo de incubação pós-tratamento, da variação da concentração de Cu^{+2} e da variação da concentração de IP sobre a adesão celular de fibroblastos V79.

5.3. EFEITOS DO SISTEMA OXIDATIVO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR:

Em seguida, foi avaliada a viabilidade das células V79 imediatamente após a exposição ao sistema oxidativo IP/ Cu^{+2} , afim de verificar se havia perda da viabilidade celular antes de ocorrer o evento da perda da adesão celular. Para isto foi feito a coloração dos fibroblastos com azul de tripan logo após a remoção do meio de tratamento (**FIGURA 15**). Neste gráfico, foi constatado um elevado conteúdo de células inviáveis (73-88%), após o tratamento. O efeito máximo de perda da viabilidade celular foi obtido com 50 μM de IP, e acima desta concentração ocorreu uma flutuação nos dados, com características semelhantes às obtidas na avaliação da perda de adesão celular da **FIGURA 14B**.

A distribuição destas proporções de células não viáveis, também transformadas em arco-seno, ocorreu de maneira independente da dose de IP adicionada ao meio de tratamento, obtendo-se também numa relação não monotônica conforme foi demonstrado na **FIGURA 14B**, com ajuste polinomial de 3ª ordem ($F = 5,44$; $p = 0,01$; $R^2 = 0,60$; R^2 ajustado = 0,49).

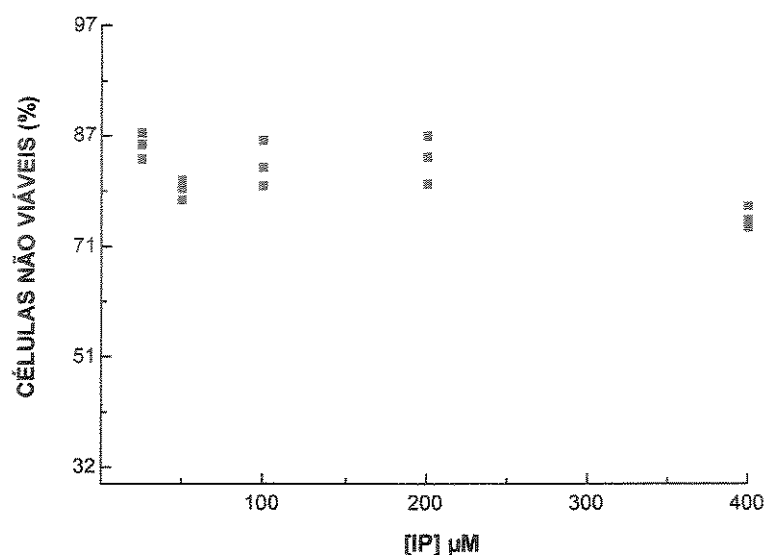


FIGURA 15. Perda da viabilidade celular de fibroblastos V79 expostos ao sistema IP/ Cu^{+2} . Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas a IP (25-400 μM), acrescido de 25 μM de Cu^{+2} (em PBS-A, 30 min, 37°C). Após o tratamento, as células não viáveis foram coradas com azul de tripan e contadas em câmara de *Newbauer* e as suas proporções foram retiradas contra um controle tratado com PBS-A (não corado) e transformadas em escala arco-seno.

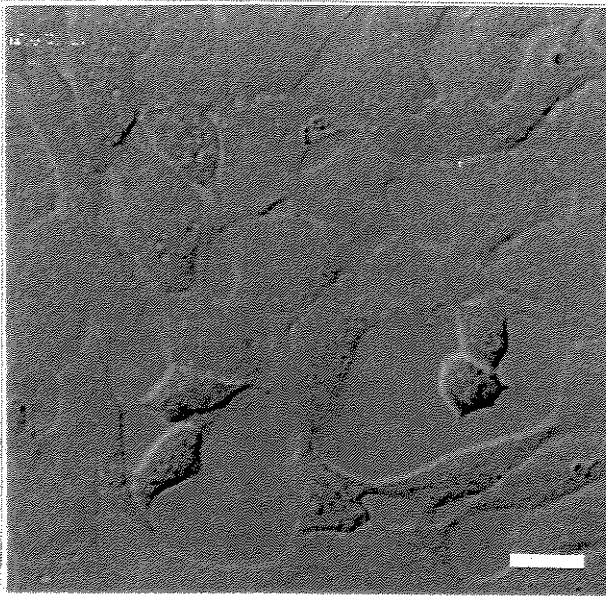
CAPÍTULO VI
EFEITOS CITOTÓXICOS DO
ISOPROTERENOL E Cu^{+2} :
UMA ABORDAGEM MORFOLÓGICA

6.1. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS GERAIS:

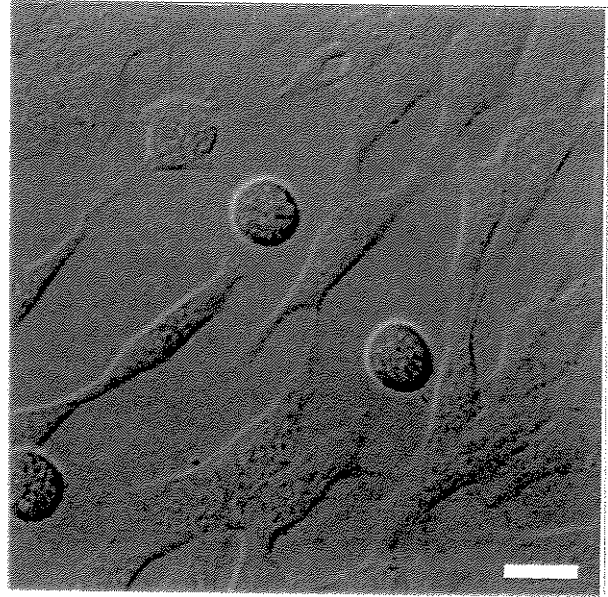
Considerando que o tratamento com o IP/ Cu^{+2} provocou: inibição da proliferação celular, perda da adesão celular e redução da viabilidade celular, foi decidido avaliar os efeitos deste sistema oxidativo sobre a morfologia geral dos fibroblastos V79. As alterações morfológicas encontradas revelaram a presença de modificações que comprometem tanto o citoplasma quanto o núcleo.

As alterações morfológicas induzidas em fibroblastos V79 por soluções de IP acrescidas de íon Cu^{+2} foram analisadas através de microscopia por contraste diferencial de fase de Normarski, imediatamente após a exposição ao sistema oxidativo. Em seguida aos 30 minutos de tratamento, as células expostas ao Cu^{+2} (FIGURA 16B) e IP (FIGURA 16C) não apresentaram alterações da morfologia típica de fibroblastos, quando comparadas às células controle, tratadas com tampão (FIGURA 16A). Entretanto, drásticas alterações foram encontradas na morfologia de fibroblastos V79 tratados com o sistema IP/ Cu^{+2} (FIGURA 16D) que perderam totalmente a morfologia normal, caracterizada por eventos como: vacuolização citoplasmática, segmentação nuclear e achatamento celular, evidenciando os núcleos e nucléolos. Bolhas (“projeções citoplasmáticas”) também foram encontradas nas células expostas ao sistema, o que sugere perda da integridade da membrana celular.

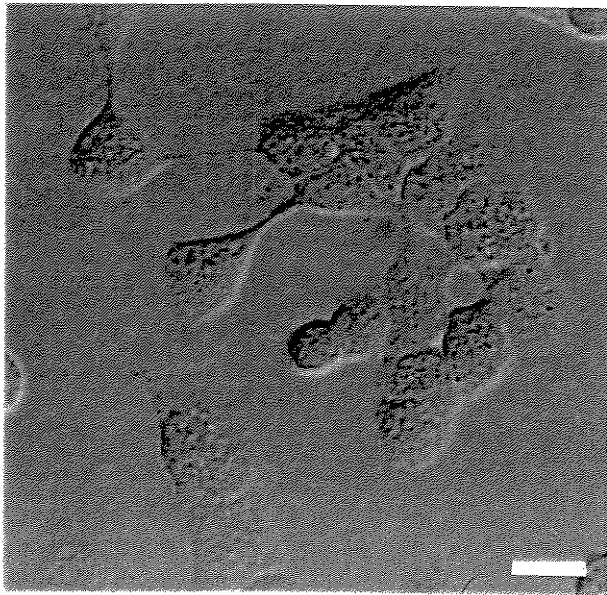
A adição de antioxidantes ao tampão de exposição das células contendo IP/ Cu^{+2} inibiu os danos causados pelo sistema. Assim, a glutathione (FIGURA 17B) evitou completamente a ação do sistema sobre os fibroblastos, enquanto que a tiuréia (FIGURA 17C) não impediu a geração das alterações morfológicas, observadas na FIGURA 17A nos fibroblastos tratados com IP/ Cu^{+2} livres de antioxidantes.



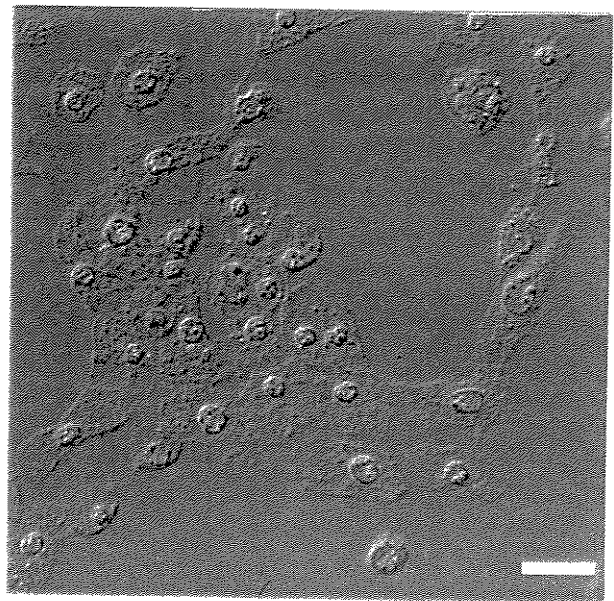
A



B

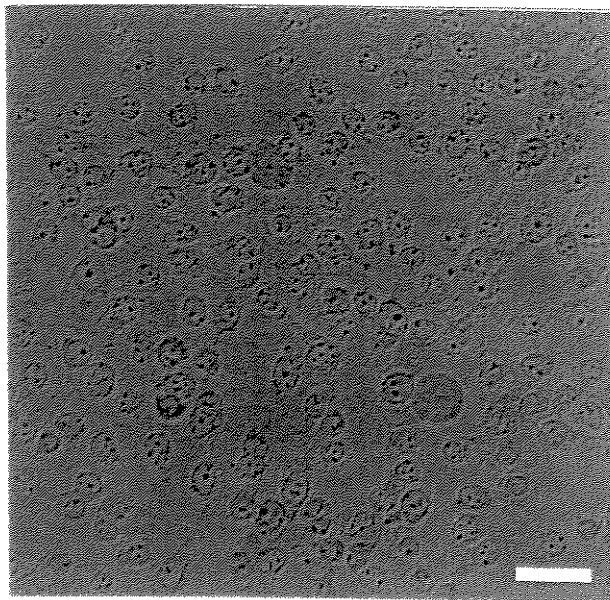


C

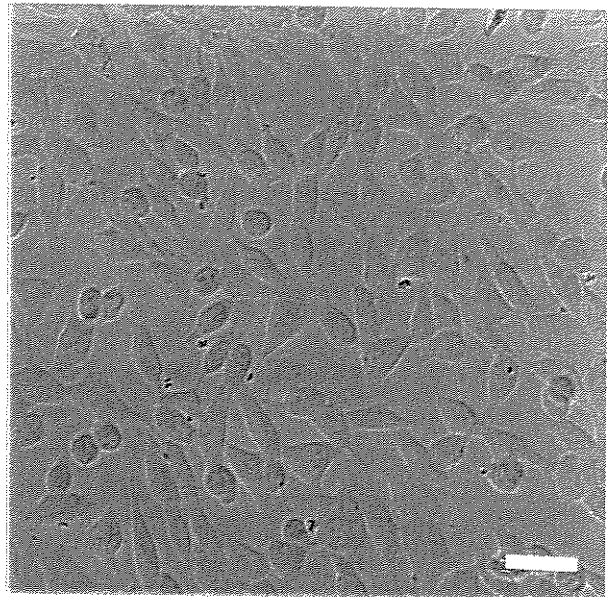


D

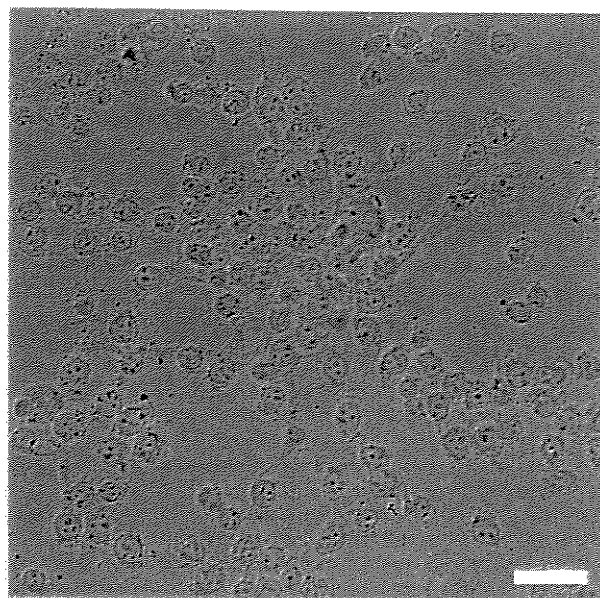
FIGURA 16. Alterações morfológicas de células V79 expostas ao IP/Cu⁺². Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas ao Cu⁺² (25 µM), IP (50 µM) e IP/Cu⁺² (50 µM / 25 µM), em PBS-A, por 30 min, a 37°C. Imediatamente após o tratamento, as células foram fotografadas por microscopia de contraste diferencial de Nomarski: **A.** Controle em PBS-A (ℓ = 13 µm), **B.** Cu⁺² 25 µM (ℓ = 5 µm), **C.** IP 50 µM (ℓ = 5 µm) e **D.** IP 50 µM + Cu⁺² 25 µM (ℓ = 13 µm).



A



B



C

FIGURA 17. Alterações morfológicas de células V79 expostas ao IP/Cu⁺², GSH e tiouréia. Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas ao IP/Cu⁺² acrescido de GSH e tiouréia (PBS- A, 30 min, 37°C). Imediatamente após o tratamento, as células foram fotografadas por microscopia de contraste diferencial de Nomarski: **A.** IP (50 μM) + Cu⁺² (25 μM), **B.** IP (50 μM) + Cu⁺² (25 μM) + GSH (2 mM) e **C.** IP (50 μM) + (Cu⁺² 25 μM) + tiouréia (10mM). Todas as barras correspondem a 13 μm.

6.2. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ESPECÍFICAS:

6.2.1. EFEITOS DE IP/Cu^{+2} SOBRE O CITOESQUELETO DE CÉLULAS V79:

Visando aprofundar os estudos dos efeitos sobre a morfologia dos fibroblastos V79 após tratamentos com IP associado ao Cu^{+2} , procurou-se detectar as alterações sobre o citoesqueleto e o núcleo celular. As análises por microscopia confocal mostraram drásticas mudanças na organização do citoesqueleto das células V79 tratadas pelo sistema oxidativo, sendo estes os filamentos intermediários de vimentina e lamina B, os filamentos de actina e os microtúbulos (α -tubulina).

Assim, o primeiro filamento observado nos fibroblastos V79 foi a vimentina. Na **FIGURA 18A** foram mostradas as células expostas ao tampão fosfato, enquanto que na **FIGURA 18** as células tratadas com IP/Cu^{+2} que apresentaram a vimentina com um aspecto bastante pulverizado, levando a um achatamento celular e uma completa destruição da morfologia fibroblástica.

O segundo grupo de filamentos estudados foram os filamentos de actina, que mostraram-se também totalmente modificados pelo tratamento com IP/Cu^{+2} . Nas células controles, tratadas apenas com PBS-A (**FIGURA 19A**) pode ser observado uma disposição ordenada dos filamentos de actina. Após exposição dos fibroblastos V79 ao IP/Cu^{+2} (**FIGURA 19B**) foi constatado que houve uma reorganização deste filamento, gerando uma nova forma celular bastante diferente da observada no controle. Além disto, o sistema reduziu a marcação da actina nas células tratadas, percebida pela diminuição da intensidade de coloração dos filamentos. A actina marcada apresentou uma tendência à retração e as células mostraram-se mais arredondadas.

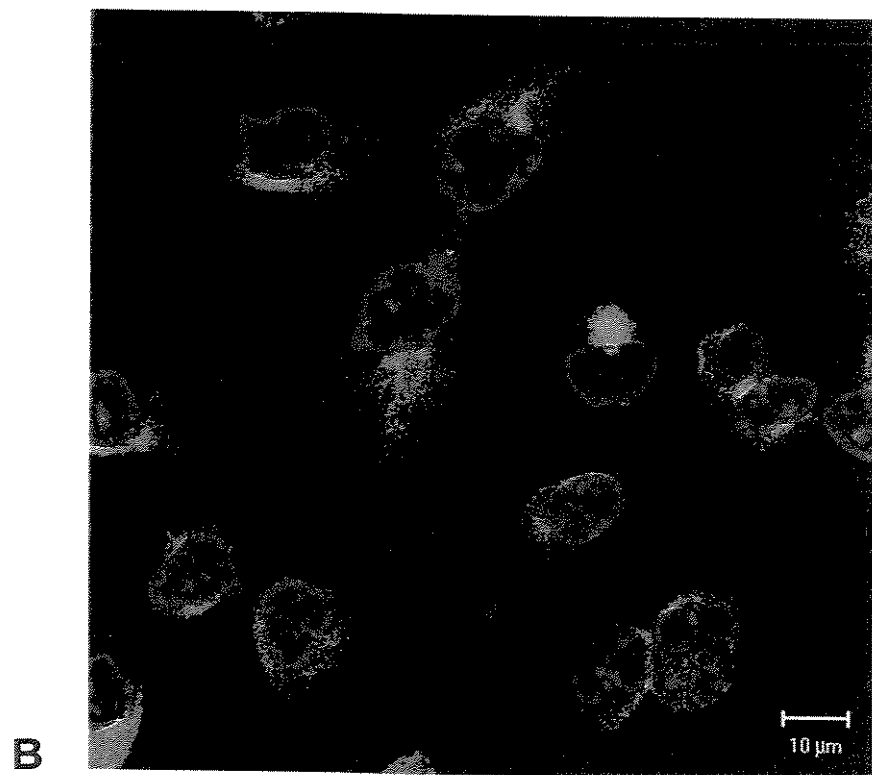


FIGURA 18. Alterações da vimentina de células V79, expostas ao IP/Cu²⁺. Células V79 crescidas sobre lamínulas foram tratadas com IP/Cu²⁺ (30min, 37°C, em PBS-A), e fixadas com formol (3,7%). Em seguida, o citoesqueleto foi marcado com anticorpo contra vimentina e os núcleos foram corados por iodeto de propídeo, então, as células foram analisadas por microscopia confocal de varredura a laser: **A.** fibroblastos V79 tratados com PBS-A. **B.** fibroblastos V79 tratados com IP (50μM) acrescido 25μM de Cu²⁺.

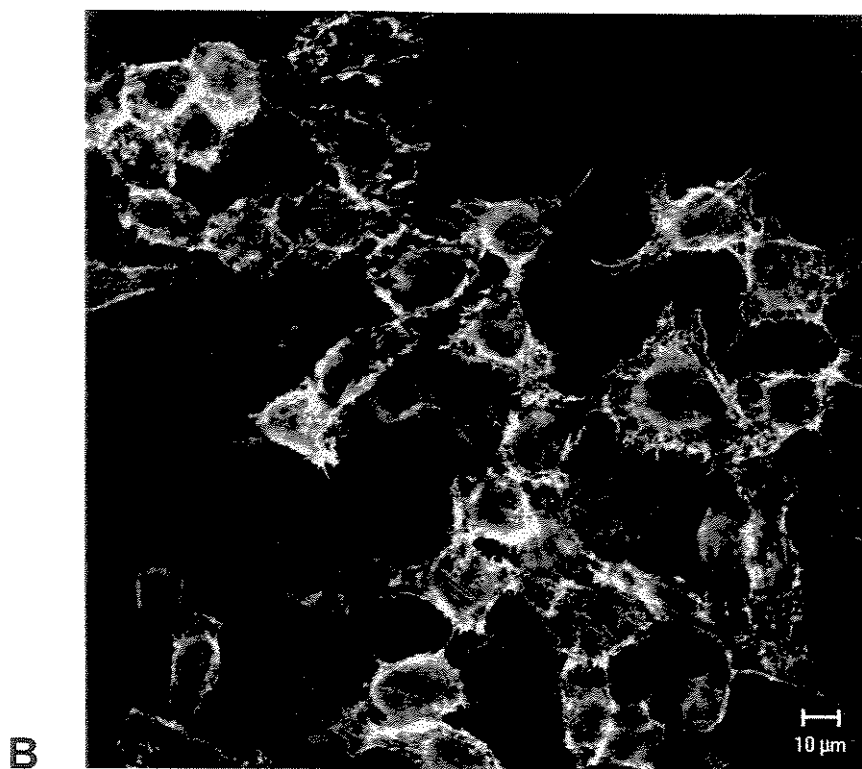
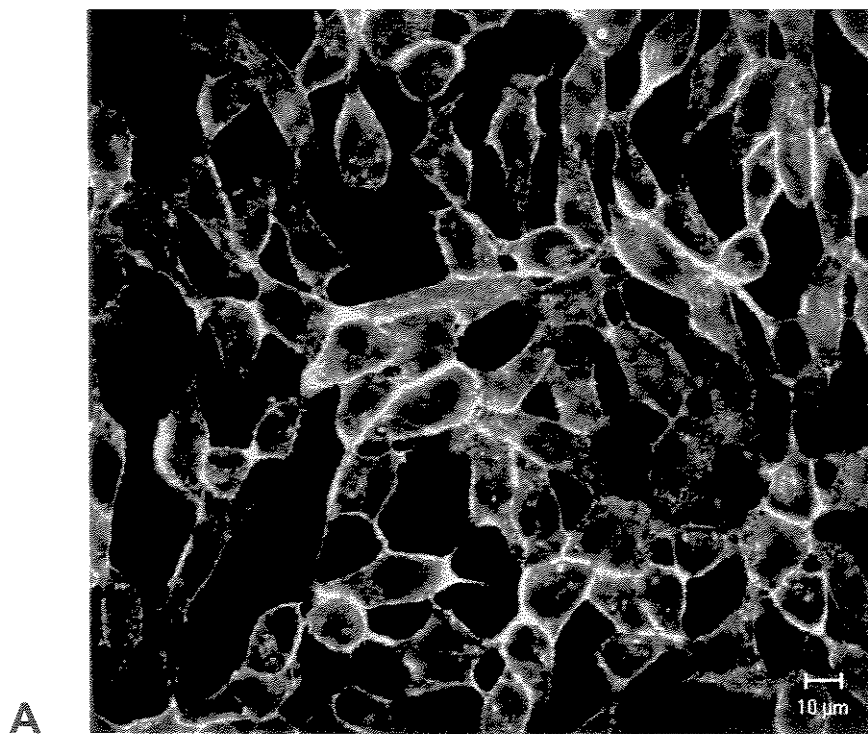


FIGURA 19. Alterações em filamentos de actina de células V79 expostas ao IP/Cu²⁺. Células V79 crescidas sobre lamínulas foram tratadas com IP/Cu²⁺ (30min, 37°C, em PBS-A), e fixadas com formol (3,7%). Em seguida, o citoesqueleto foi marcado com anticorpo rodamina-faloidina (actina) e então, analisado por microscopia confocal de varredura a laser. **A.** fibroblastos V79 controles (PBS-A) e **B.** fibroblastos V79 tratados com IP (50μM) acrescido 25μM de Cu²⁺.

Também foram detectadas alterações na organização de microtúbulos do citoesqueleto dos fibroblastos V79, através de imunoenaios para α -tubulina. A **Figura 20A** mostrou a disposição da α -tubulina e dos núcleos dos fibroblastos controle, tratados apenas com PBS-A. Enquanto que na **Figura 20B**, as células expostas ao IP/ Cu^{+2} apresentaram profundas mudanças na organização dos microtúbulos, mostrando-se também bastante pulverizados.

Um outro tipo de filamento analisado foi a lamina B que compõe a lâmina nuclear. Comparando-se as lâminas nucleares das células expostas apenas ao tampão (**FIGURA 21A**), com as células tratadas com IP/ Cu^{+2} foi possível mostrar que este sistema oxidativo gerou uma completa despolimerização da lamina B, levando a uma dispersão destes filamentos pelo citoplasma dos fibroblastos tratados (**FIGURA 21B**).

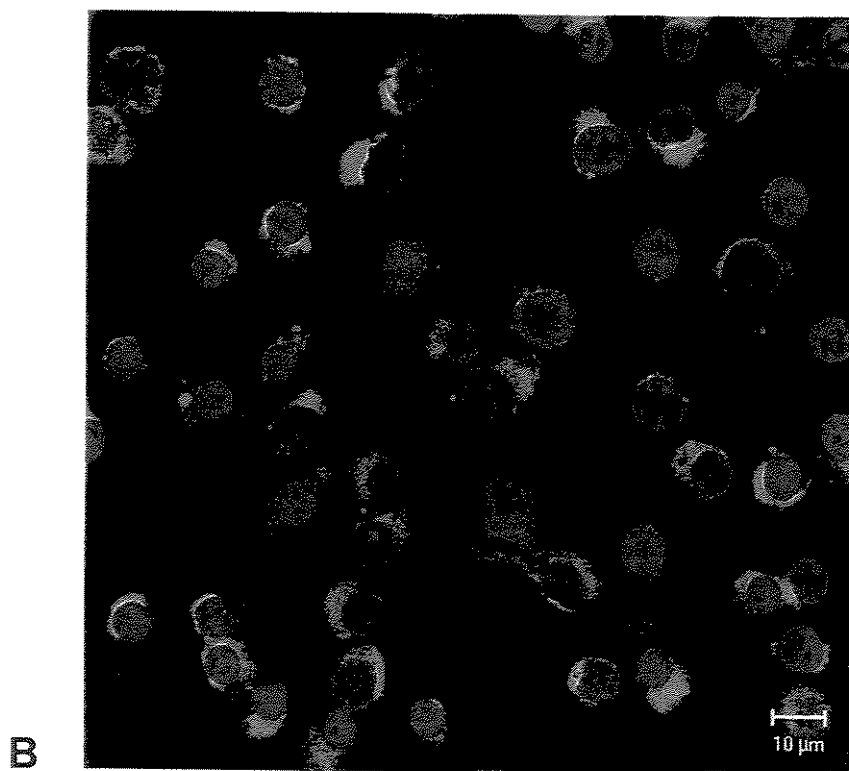
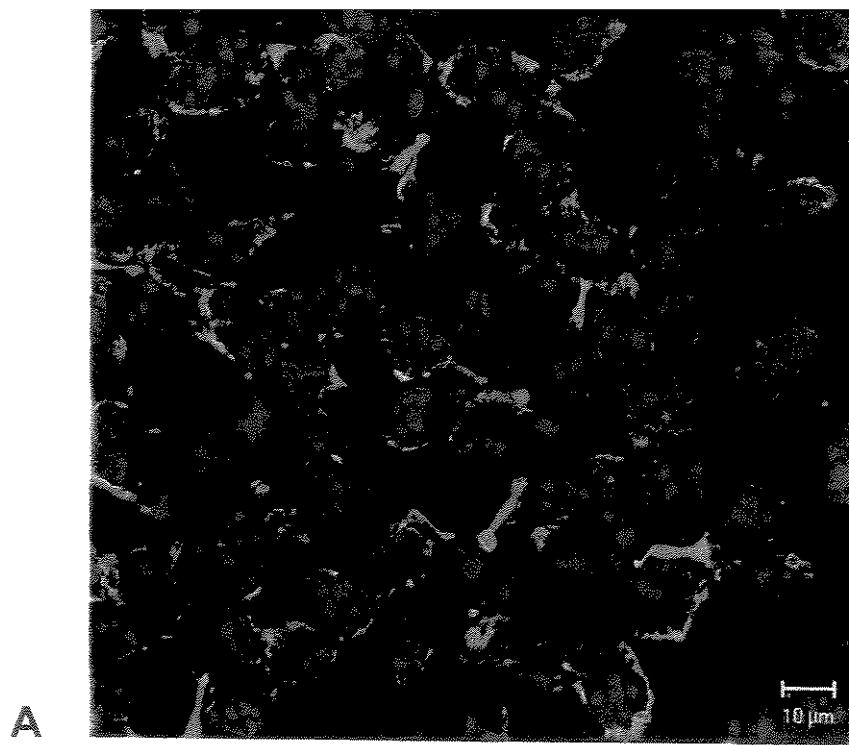


FIGURA 20. Alterações na α -tubulina de células V79 expostas ao IP/Cu⁺². Células V79 crescidas sobre lamínulas foram tratadas IP/Cu⁺² (30min, 37°C, em PBS-A) e fixadas com formol (3,7%). Em seguida, o citoesqueleto foi marcado com anticorpo contra α -tubulina e então, analisado por microscopia confocal de varredura a laser. **A.** fibroblastos V79 controles (PBS-A) e **B.** fibroblastos V79 tratados com IP (50 μ M) acrescido 25 μ M de Cu⁺². Os núcleos foram marcados com iodeto de propídeo (vermelho).

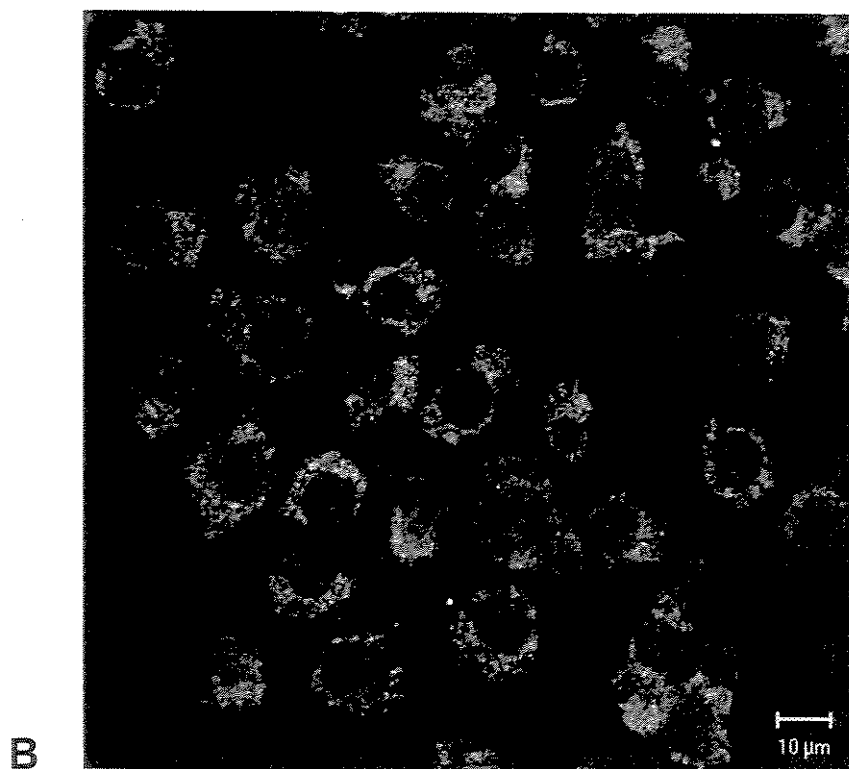
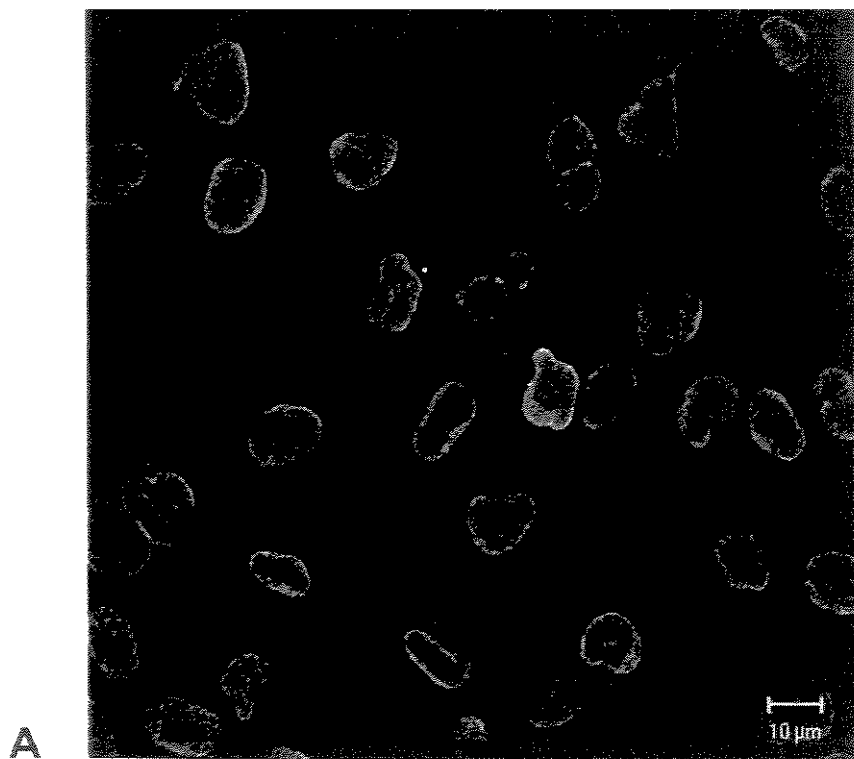


FIGURA 21. Alterações na lamina B de células V79 expostas ao IP/Cu⁺². Células V79 crescidas sobre lamínulas foram tratadas IP/Cu⁺² (30min, 37°C, em PBS-A) e fixadas com formol (3,7%). Em seguida, o citoesqueleto foi marcado com anticorpo contra lamina B, e então, analisado por microscopia confocal de varredura a laser. **A.** fibroblastos V79 controles (PBS-A) e **B.** fibroblastos V79 tratados com IP (50μM) acrescido 25μM de Cu⁺².

6.2.2. EFEITOS DE IP/ Cu^{+2} SOBRE OS NÚCLEOS:

O primeiro dado que constatou a geração de alterações nucleares nos fibroblastos V79 foram detectados através da coloração com o iodeto de propídeo, observados nas **FIGURAS 18 e 20**, apresentando um aumento aparente do tamanho do núcleo com evidenciamento dos nucléolos, quando comparado às células sem tratamento (controle). A ação do sistema IP/ Cu^{+2} levou a uma modificação da morfologia nuclear, causando a sua fragmentação e dando origem ao surgimento de células binucleadas, micronúcleos e polinucleações (**FIGURAS 18 e 20**).

Em seguida à identificação dos núcleos corados pelo iodeto de propídeo, os núcleos celulares foram corados pelo método de Feulgen para caracterizar a disposição do DNA dentro no núcleo. Nas análises de imagem feitas dos núcleos corados por Feulgen foram apresentados os núcleos tratados com PBS-A (**FIGURA 22A**), sendo a exposição celular ao IP associado ao íon metálico geradora de um evidente arredondamento e fragmentação nuclear, originando micronúcleos e binucleações (**FIGURA 22B**), e reproduzindo as imagens observadas após coloração com iodeto de propídeo.

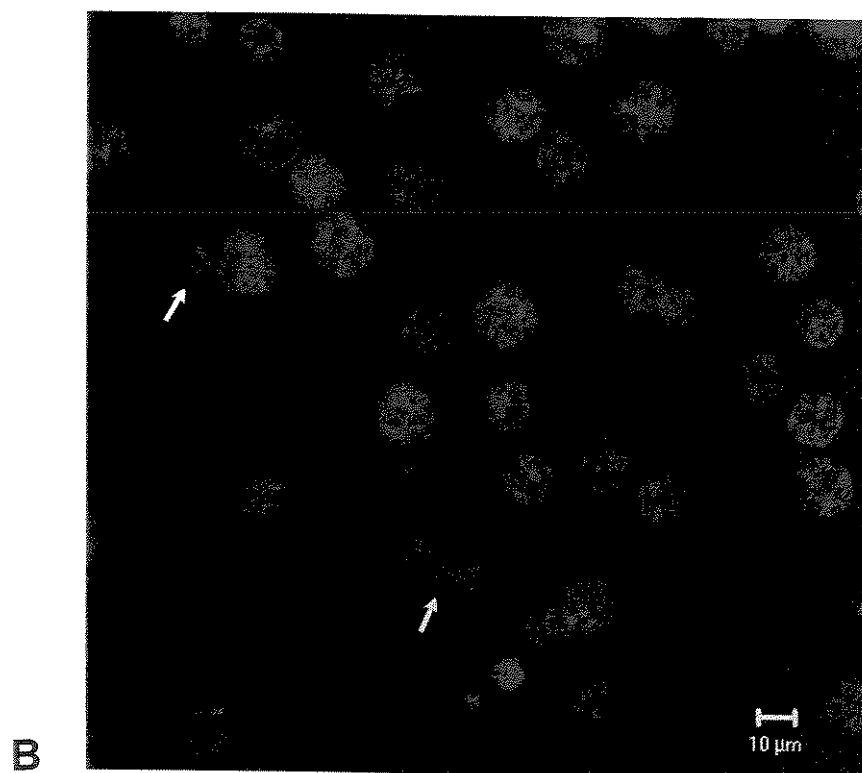
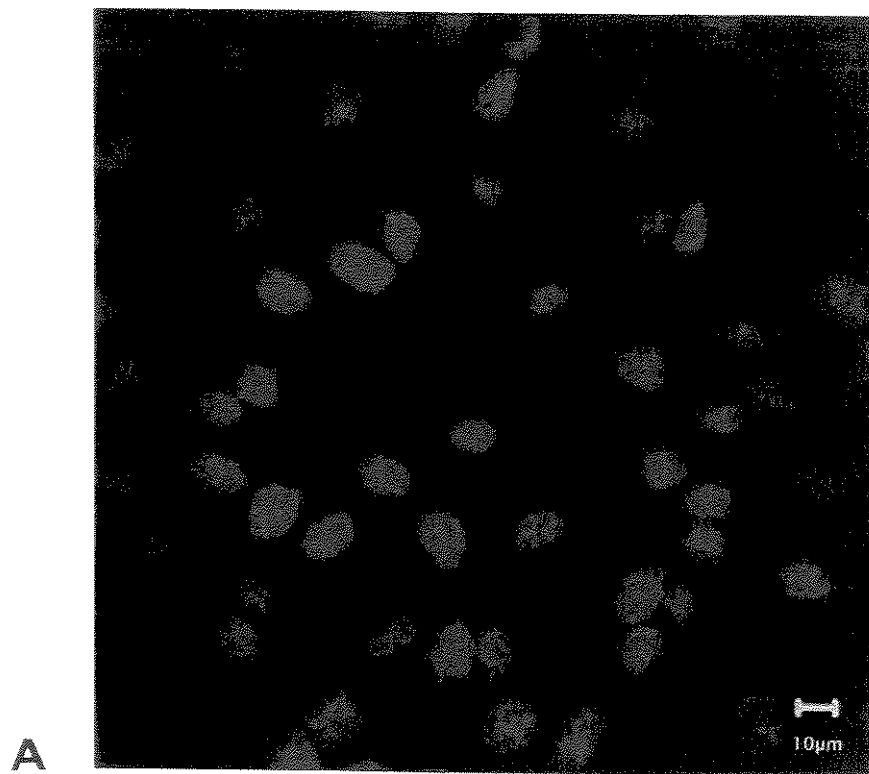


FIGURA 22. Alterações nucleares com IP/Cu²⁺ de células V79 coradas por Feulgen. Células V79 crescidas sobre lamínulas foram tratadas (30min, 37°C, em PBS-A), e fixadas com etanol:acético (3:1). Em seguida, os núcleos celulares foram corados pela reação de Feulgen e analisados por microscopia confocal de varredura a laser. **A.** núcleos de células controle (PBS-A) e **B.** núcleos de células tratadas com IP (50μM) acrescido 25μM de Cu²⁺. As setas mostram células micronucleada (branca) e binucleada (amarela).

Um dado complementar sobre as alterações nucleares foi a quantificação do DNA dos núcleos corados pela reação de Feulgen por análise de imagem. Por este tipo de análise, também foi possível detectar as características morfológicas dos núcleos analisados e as diferenças nos níveis de condensação cromatínica. Nesta avaliação foram utilizados como controle fibroblastos V79 diplóides, não tratados. Observou-se que o índice médio de DNA das células expostas somente ao tampão se manteve bem próximo ao obtido nas células não tratadas, enquanto as células expostas ao sistema oxidativo IP/ Cu^{+2} tenderam a aumentar o índice de DNA. Avaliando o índice de DNA (pico em $2n$) foi verificado que o tratamento não causou alteração do número de células diplóides (TABELA VIII). Pela FIGURA 23 foi constatado que IP/ Cu^{+2} gerou um deslocamento na cauda do histograma de distribuição de ploidia no sentido de níveis iguais ou superiores a $4n$, sendo este fato confirmado pelo aumento do desvio de $2c$ da TABELA VIII.

TABELA VIII. Análise de imagem pelo software CIREs/Kontron de núcleos corados por Feulgen.

CONDIÇÃO	n	ÍNDICE DE DNA (MÉDIO)	ÍNDICE DE DNA (PICO)	DESVIO DE $2c$
S/TRATAMENTO	300	1,21	0,99	1,08
PBS-A	300	1,11	0,86	0,58
IP/ Cu^{+2} EM PBS-A	300	1,43	0,86	1,70

Células V79 crescidas sobre laminulas foram tratadas (30min, 37°C , em PBS-A) ou não, e fixadas com etanol:acético (3:1). Em seguida, os núcleos celulares foram corados pela reação de Feulgen e o índice de DNA foi quantificado pelo software CIREs/Kontron.

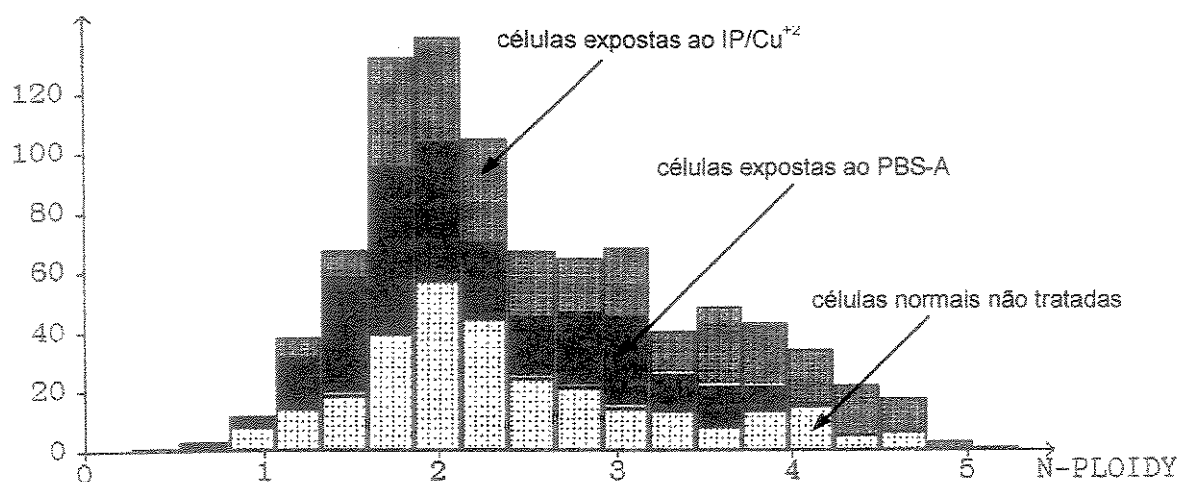


FIGURA 23. Distribuição das frequências de ploidia de células V79, expostas ao IP/Cu⁺². Células V79 crescidas sobre lamínulas foram tratadas (30min, 37°C, em PBS-A) ou não, e fixadas com etanol:acético (3:1). Em seguida, os núcleos celulares foram corados pela reação de Feulgen e o DNA quantificado pelo software CIREs/Kontron.

A respeito das modificações nucleares geradas pelos tratamentos com IP/Cu⁺² foram estabelecidos três diferentes tempos de incubação dos fibroblastos, tratados com o sistema oxidativo, com o objetivo de detalhar tais modificações nucleares. O primeiro (0h) nos mostra a morfologia nuclear em seguida ao tratamento, o segundo (3h) no momento em que ocorre o máximo descolamento celular, e o terceiro (24h); o momento em que foi avaliada a proliferação celular. Assim, quando comparou-se os núcleos controles (**Figura 24A**), fixados logo após o tratamento (0h), com os tratados com IP/Cu⁺², percebemos uma modificação da sua morfologia (**Figura 24B**), caracterizada por um aumento do volume nuclear, arredondamento, e em alguns, condensação cromatínica. Após 3h de incubação, os núcleos tratados apresentavam-se menores e em crescente processo de condensação cromatínica (**Figura 24D**). Depois de 24h de incubação, observamos que a maioria dos núcleos eram picnóticos¹ (**Figura 24F**). As **Figuras 24C** e **24E** são referentes aos controles expostos ao tampão, e posteriormente incubados por 3h e 24 h respectivamente.

¹ picnose – extrema condensação cromatínica

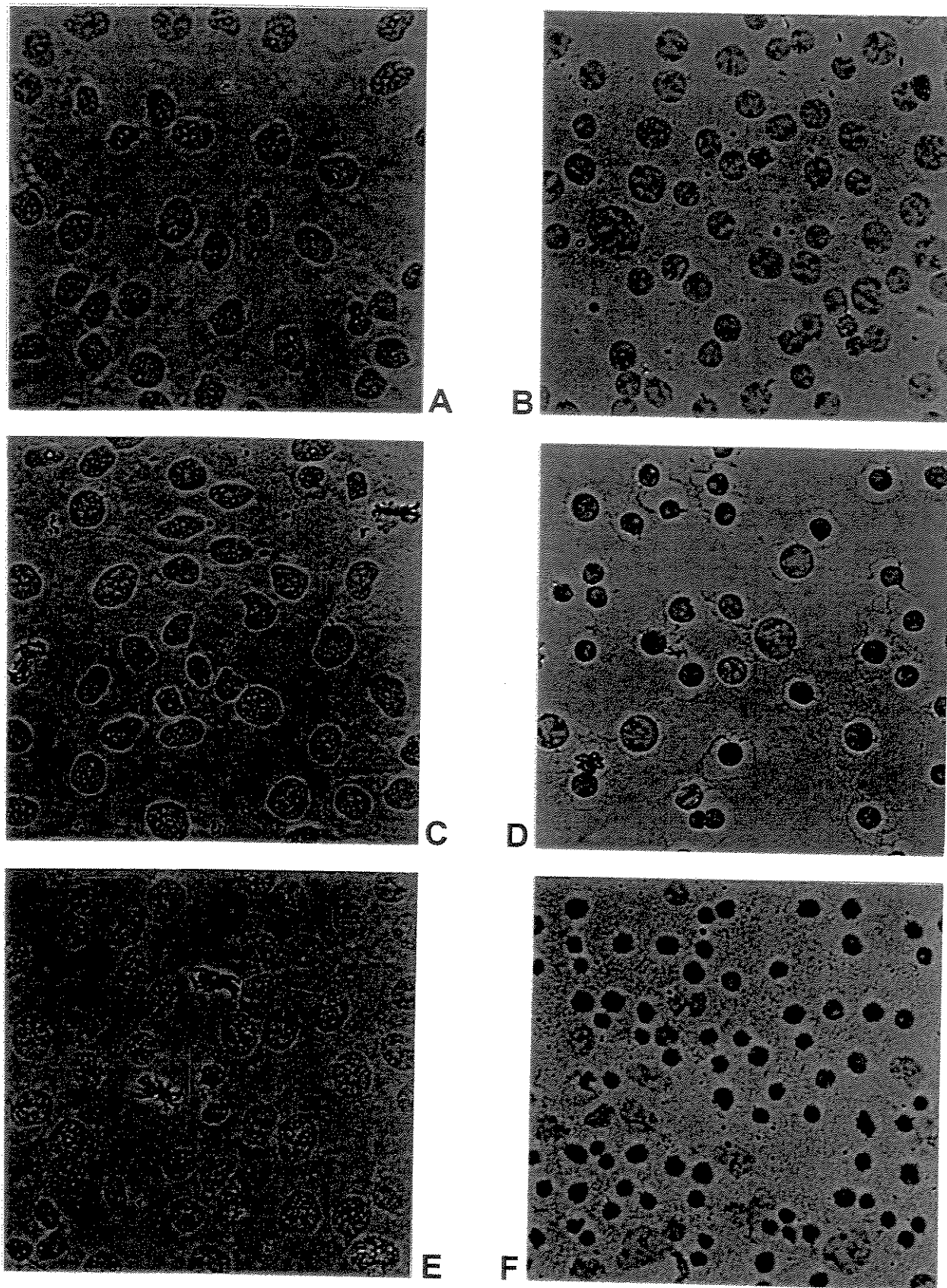


FIGURA 24. Alterações nucleares em células V79, expostas ao IP/Cu²⁺. Células V79 crescidas sobre laminulas foram tratadas com IP/Cu²⁺ (30min, 37°C, em PBS-A), incubadas por períodos de 0h, 3h e 24h, e fixadas com etanol-ácido acético. Em seguida, os núcleos foram corados pelo método de Feulgen, analisados ao microscópio de luz e fotografados em objetiva de 20x. **A.** fibroblastos V79 controles (PBS-A) (0h), **B.** fibroblastos V79 tratados com IP (50µM) acrescido de Cu²⁺ (25µM) (0h), **C.** fibroblastos V79 controles (PBS-A) (3h), **D.** fibroblastos V79 tratados com IP (50µM) acrescido de Cu²⁺ (25µM) (3h), **E.** fibroblastos V79 controles (PBS-A) (24h) e **F.** fibroblastos V79 tratados com IP (50µM) acrescido de Cu²⁺ (25µM) (24h).

Pela TABELA IX mostramos que o evento de picnose supera o surgimento das outras anomalias nucleares, sendo este processo correlacionado positivamente com o tempo de incubação pós-tratamento. Ao final das 24h, 74% dos núcleos se apresentavam picnóticos e, no restante, a cromatina exibía sinais de desorganização, como se estivessem em processo de degeneração nuclear.

TABELA IX. Percentagens de núcleos anômalos contados em 1000 células coradas por Feulgen.

CONDIÇÃO	Núcleos picnóticos (%)	Núcleos ligados por um pedúnculo de cromatina (%)	binucleadas, micronucleadas, multinucleadas, brotos (%)
Controle – 0h*	0	0	2
IP/ Cu^{+2} – 0h	4	3	4
IP/ Cu^{+2} – 3h	61	0	0
IP/ Cu^{+2} – 24h	74	0	0

*Os controles corresponderam às células fixadas sem incubação posterior ao tratamento (0h).

Células V79 crescidas sobre lamínulas foram tratadas com IP/ Cu^{+2} (30min, 37°C, em PBS-A), incubadas por períodos de 0h, 3h e 24h, e fixadas com etanol:ácido acético. Em seguida, os núcleos foram marcados pelo método de Feulgen e as percentagens de núcleos anômalos foram retiradas para cada uma das condições.

Nas observações feitas em microscópio ótico em objetiva de 20x, comparando-se com os controles incubados nos mesmos períodos, foi possível perceber a redução de núcleos mitóticos no decorrer destes períodos de incubação, chegando a ausência total após 24 h.

Através da vista ortogonal constatamos que os núcleos das células tratadas com IP/ Cu^{+2} (FIGURA 25B) estavam realmente em picnose, apresentando menor volume e maior homogeneidade, quando comparado à vista ortogonal dos núcleos controles (FIGURA 25A).

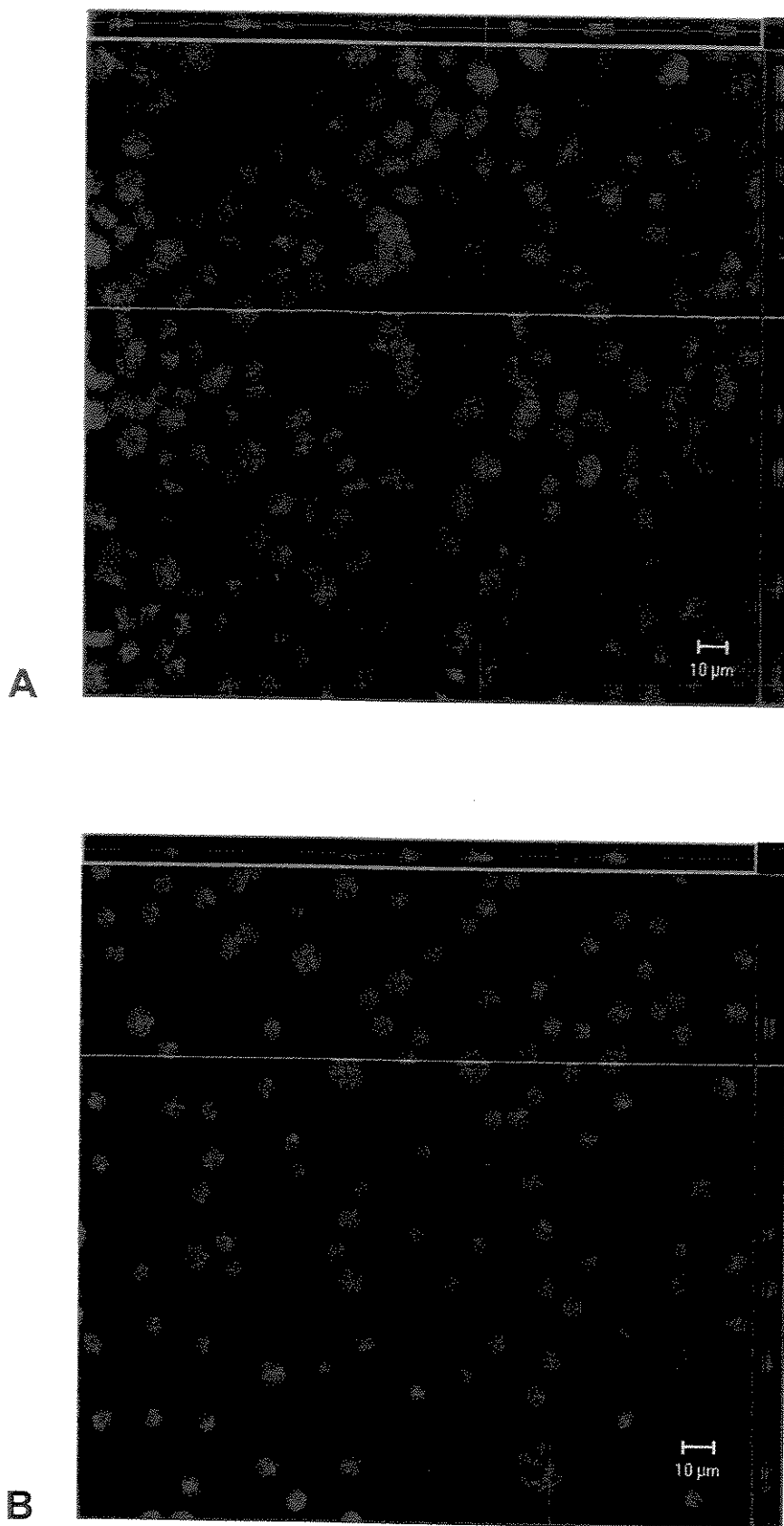


FIGURA 25. Vista ortogonal dos núcleos de células V79, expostas ao IP/Cu⁺². Células V79 crescidas sobre lamínulas foram tratadas com IP/Cu⁺² (30min, 37°C, em PBS-A), incubadas em DMEM por 24h e fixadas com em etanol-ácido acético. Em seguida, os núcleos foram marcados pelo método de Feulgen, e então, analisados por microscopia confocal de varredura a laser. As vistas ortogonais foram obtidas dos campos selecionados em objetiva de 40x, sendo as reconstruções 3D elaboradas através do *software* LSM 510 for Zeiss. **A.** fibroblastos V79 controles (PBS-A) e **B.** fibroblastos V79 tratados com IP (50μM) acrescido de Cu⁺²(25μM) .

A obtenção dos diâmetro dos núcleos e área ocupada pela marcação de lamina B (TABELA X) nos mostrou que quando comparado às células controle, o sistema IP/ Cu^{+2} aumentou o tamanho da lâmina nuclear e reduziu o tamanho do núcleo dos fibroblastos de uma forma altamente significativa ($p < 0,01$), vista pelo teste T. Confirmando os dados obtidos pelas análise nucleares dos núcleos corados por Feulgen, onde mostram a indução de picnose pelo sistema oxidativo IP/ Cu^{+2} .

TABELA X. Diâmetro de núcleos corados com iodeto de propídeo e lamina nuclear de células expostas ao PBS-A e IP/ Cu^{+2} em PBS-A.

CONDIÇÃO	núcleos corados com iodeto de propídeo (μm)	área de lamina B (μm)
CONTROLE	$11,21 \pm 1,33$	$10,63 \pm 1,53$
IP/ Cu^{+2}	$8,90 \pm 1,52$	$15,78 \pm 2,29$

Células V79 crescidas sobre lamínulas foram tratadas com IP/ Cu^{+2} (30min, 37°C , em PBS-A), e fixadas com formol (3,7%), em seguida, alguns lotes de células tiveram seus núcleos corados por iodeto de propídeo e outros tiveram marcação da lamina B. Ao final, das marcações as lâminas foram montadas e os diâmetros dos núcleos e das lâminas nucleares foram obtidos microscopia confocal de varredura a laser, obtendo-se os diâmetros através do software *LSM 510 for Zeiss*.

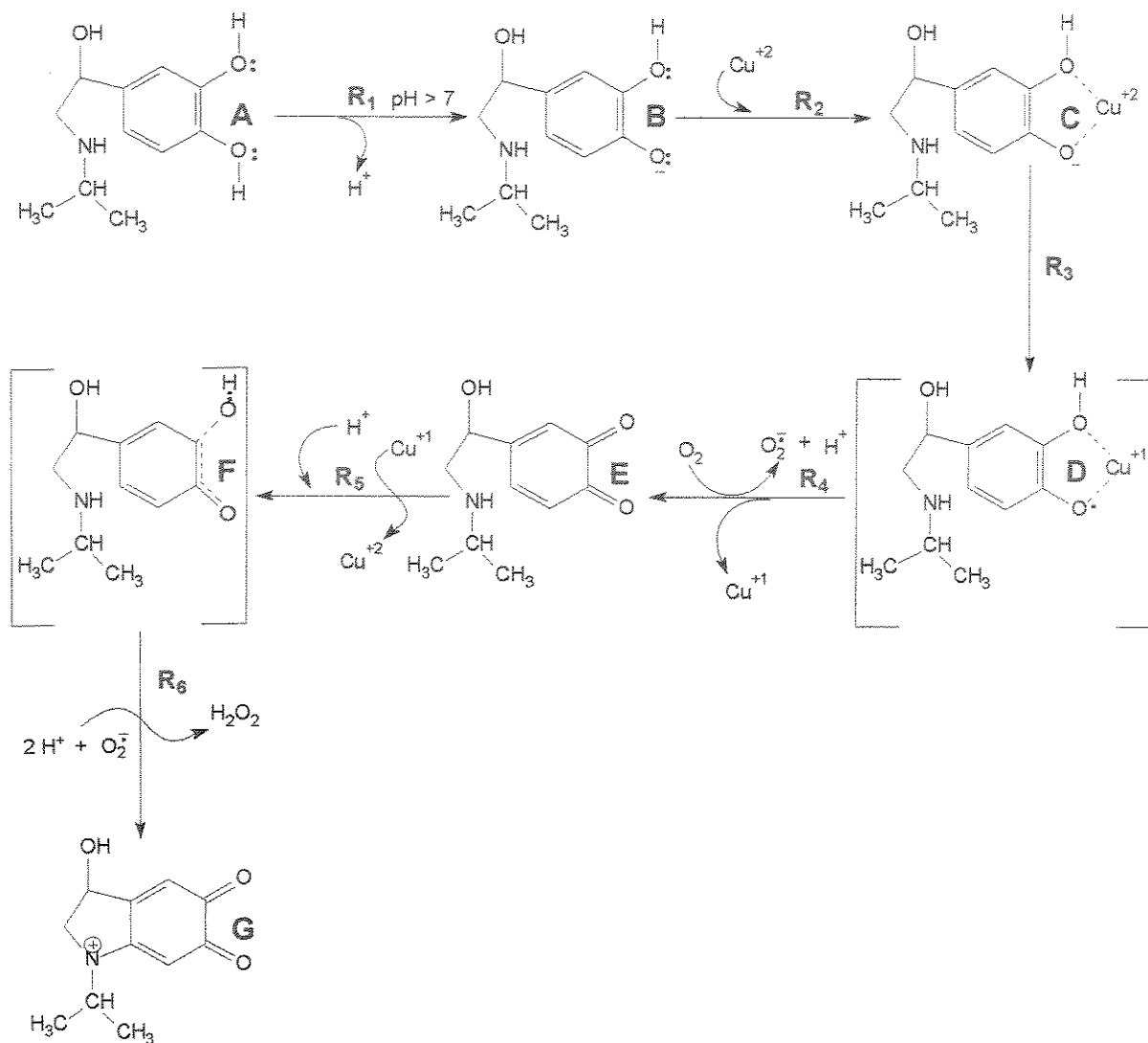
CAPÍTULO VII

DISCUSSÃO

O início deste trabalho foi reservado à análise do papel de íons metálicos na catálise da reação de oxidação do isoproterenol. Segundo MILLER *et al.* (1985) os processos de autooxidação verdadeira de biomoléculas não ocorrem espontaneamente dentro de sistemas biológicos. Tais processos são mediados pela presença de metais de transição ligados a estas moléculas levando a sua oxidação. De acordo com SUTTON & WINTERBOURN (1989) e AUST *et al.* (1985) os principais íons de metais de transição envolvidos nestes processos são os de cobre e ferro que participam de reações do tipo Fenton e Harber-Weis, produzindo ERO. Com base nestas informações, elegeu-se os íons destes dois metais (Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+1} e Cu^{+2}) para serem analisados os seus efeitos catalíticos sobre a oxidação de IP. Nestes estudos, foi tomado o devido cuidado com o pH das soluções fazendo uso das mesmas em pH fisiológico, pois KLEGERIS *et al.* (1995), em suas investigações com a dopamina, mostraram que esta catecolamina é oxidada mais facilmente em pH neutro a alcalino.

Os resultados apresentados neste trabalho, mostraram que os íons metálicos divalentes foram específicos na catálise da oxidação de IP, sendo o íon de Cu^{+2} o mais efetivo neste processo. A catálise desta reação pelo íon Cu^{+1} , ocorre de forma menos intensa do que com Cu^{+2} e sugere que a oxidação de IP se processa através de mecanismos de transferências de elétrons entre as formas iônicas, levando à oxidação da molécula. Hoje, já é bastante conhecida a transição iônica entre $\text{Cu}^{+2} \rightleftharpoons \text{Cu}^{+1}$ dentro de reações de oxidação de biomoléculas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Com base nos estudos de BINDOLI *et al.* (1992) sobre as vias e produtos de oxidação de catecolaminas é apresentado aqui, através do **ESQUEMA 9**, um mecanismo de oxidação de IP na presença de Cu^{+2} .



ESQUEMA 9. Mecanismo proposto para a oxidação de IP mediada por Cu^{+2} .
Em:

- A. Isoproterenol
- B. Forma desprotonada do isoproterenol.
- C. Complexo IP/ Cu^{+2} .
- D. Radical o-semiquinona complexado com o Cu^{+1} (intermediário de reação).
- E. o-quinona.
- F. Forma enólica (instável).
- G. N-isopropil-noradrenocromo.

O mecanismo proposto (**ESQUEMA 9**) pode ser sintetizado nas seguintes reações principais: em R_1 , ocorre a desprotonação do IP; é conhecido que a desprotonação é necessária para a oxidação de catecolaminas, como a dopamina (KALYANARAMAN *et al.*, 1985), sendo favorecida em pH neutro a alcalino e inibida em pH ácido. Em R_2 , o complexo IP/Cu⁺² é formado; segundo MILLER *et al.* (1985) compostos com ligantes de oxigênio, como as catecolaminas, são capazes de formar complexos com metais de transição levando à sua oxidação; em R_3 , o anel catecóico é oxidado por transferência monoelétrica intramolecular, reduzindo o Cu⁺² ao Cu⁺¹, e gerando o radical o-semiquinona complexado ao Cu⁺¹ transientemente. Radicais o-semiquinona são formados como intermediários de oxidação de catecolaminas (BINDOLI *et al.* 1992). Esta oxidação é atribuída, geralmente, ao oxigênio molecular. No entanto, na presença de Cu⁺² esta reação deve ocorrer, preferencialmente, através da redução do metal ao Cu⁺¹, pois o E° da dupla Cu⁺²/Cu⁺¹ é maior do que de O₂/O₂⁻ (0,15 V e -0,33 V, respectivamente) (MILLER *et al.*, 1985). Isto justifica a catálise da reação pelo cobre.

Na próxima etapa do mecanismo (R_4) o complexo radicalar transfere um elétron para o oxigênio molecular formando o radical O₂⁻ e sua correspondente o-quinona, liberando o íon metálico reduzido; em R_5 , o Cu⁺¹ do meio induz à redução da o-quinona a uma forma enólica instável, sendo reoxidado ao Cu⁺². A reoxidação do cobre deixa este íon disponível para a ligação com outra molécula de IP. Finalmente, em R_6 , a forma enólica sofre uma ciclização intramolecular, formando o aminocromo, na oxidação enzimática de IP (NÚÑEZ-DELICADO *et al.*, 1996 e PERSOON-ROTHERT *et al.*, 1989). Esta reação ocorre concomitantemente com a redução do O₂⁻ formando H₂O₂. Os dados do consumo de oxigênio pelas soluções de IP/Cu⁺², na presença de CAT, confirmam produção desta ERO. O N-isopropilnoradenocromo formado é detectado por espectrofotometria a 490nm (NÚÑEZ-DELICADO *et al.*, 1996).

Nos espectros de absorção do produto de oxidação do IP aparecem três picos característicos do aminocromo desta catecolamina: dois picos no ultra-violeta (UV), em 211 nm e 290 nm, e um terceiro no visível a 490 nm. De acordo com SOLOMONS

(1988), compostos que possuem oxigênio com dupla ligação ao carbono conjugado com dupla ligação entre carbonos apresentam dois picos de absorção no ultra-violeta (UV): um deles em torno de 211 nm, relativo à transição $n \rightarrow \pi^*$, e o outro em 290nm, relativo à transição $\pi \rightarrow \pi^*$. O aumento no nível de conjugação na molécula do derivado corado pode ser demonstrado pelo pico no visível a 490nm, sendo este espectro de absorção UV-visível muito semelhante ao do adrenocromo (aminocromo da adrenalina), cujos picos de absorção máxima ocorrem em 220, 302 e 485 nm (WINDHOLZ *et al.*, 1976).

A oxidação de IP catalisada pelo o íon Cu^{+2} foi comparada à oxidação de outras quatro catecolaminas, nas mesmas condições utilizadas para IP, na presença deste íon metálico. Nestas condições o Cu^{+2} influenciou a velocidade de oxidação de todas as catecolaminas, sugerindo que o mecanismo proposto para a oxidação de IP pode ser utilizado, também, para outras moléculas que possuam em sua estrutura um anel catecólico. Embora todas as velocidades de reação das catecolaminas tenham sofrido de forma expressiva a influência do Cu^{+2} no meio reacional, a cadeia lateral destas moléculas teve um papel importante no controle desta catálise. Esta diferença entre as velocidades levou ao estabelecimento de uma classificação das catecolaminas em dois grupos:

I) Catecolaminas que se degradam mais rapidamente - EP, DEP e IP.

II) Catecolaminas que se degradam mais lentamente - NEP e DA.

Esta divisão pode ser justificada pelos substituintes da cadeia lateral. Assim, as moléculas do primeiro grupo têm substituintes eletropositivos ligados ao seu grupamento amino, aumentando a disponibilidade eletrônica do anel catecólico, favorecendo a oxidação. Neste grupo a oxidação do IP teve velocidade intermediária, provavelmente pelo impedimento estérico do seu substituinte do $-\text{NH}_2$, um grupo isopropila. O grupo amino livre das moléculas do grupo II confirma o fato de que a oxidação de catecolaminas, catalisada pelo Cu^{+2} , depende da densidade eletrônica disponível no anel catecólico, onde se ligará o metal.

A ação de antioxidantes sobre a oxidação de IP foi outro aspecto abordado neste trabalho. Constatou-se que a GSH inibiu totalmente a oxidação de IP, enquanto

que a CAT inibiu apenas parcialmente, retardando a velocidade de reação. Embora ambos os antioxidantes decomponham o H_2O_2 do meio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), a ação de GSH também pode ser melhor explicada pela sua capacidade de formar um complexo com Cu^{+1} (HANNA & MASON, 1992). Desta forma, a inibição total da reação pela GSH mostra que este antioxidante possui uma maior afinidade pelo Cu^{+1} do que IP. Isto permite à GSH retirar este íon do ciclo redox, impedindo a progressão do processo oxidativo de IP até o seu aminocromo, como sugerido pelo **ESQUEMA 9**. A ação bloqueadora da GSH enfatiza a relevância da transição entre $Cu^{+2} \rightleftharpoons Cu^{+1}$ dentro das reações de oxidação da catecolamina.

O efeito da CAT sobre a oxidação de IP/ Cu^{+2} observado neste trabalho foi um evento inesperado. Como foi salientado acima, a CAT decompõe o H_2O_2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) e pelo **ESQUEMA 9** um dos subprodutos da oxidação de IP é o H_2O_2 . Seria esperado, então, que a retirada desta ERO do meio reacional desviasse o equilíbrio da reação no sentido de formação do aminocromo.

Entretanto, observou-se uma desaceleração do processo oxidativo, que pode ser possivelmente explicada pela complexação da proteína com o metal, removendo o cobre livre do meio, evitando que o mesmo exerça seu papel crítico dentro da oxidação de IP e retardando o prosseguimento da reação.

O estudo sobre a oxidação de IP em comparação a outras catecolaminas possibilitou ainda mostrar a formação de $O_2^{\cdot-}$ durante as reações. A detecção espectrofotométrica deste radical livre acompanhou a ordem estabelecida para o processo de degradação das moléculas, encontrando-se:



Como na velocidade de oxidação, IP ficou também em posição intermediária, quanto à produção de $O_2^{\cdot-}$. Embora tenha sido detectada a presença do radical durante o processo, estas quantidades foram muito pequenas, quando comparadas ao rendimento obtido pela oxidação de uma outra quinona, a tetrahidroxi-quinona (HOFFMANN *et al.*, 1987). Esta constatação é ainda melhor fundamentada quando se considera o tempo de detecção do radical (após 90 minutos de reação). Este período é muito superior aos 30 minutos previstos para que o máximo da reação seja atingindo

(FIGURA 2). Assim, após 90 minutos de reação, pode ter ocorrido a redução de quase todo o $O_2^{\cdot -}$ disponível, impossibilitando a sua detecção. Este fato pode ser explicado pelo **ESQUEMA 9** que mostra a formação de uma forma enólica durante o processo de oxidação de IP. A instabilidade desse composto, possivelmente, induz uma nova oxidação da molécula, formando o aminocromo e reduzindo rapidamente o $O_2^{\cdot -}$ ao H_2O_2 .

Os estudos de ONDRIAS *et al.* (1998) mostraram que as catecolaminas, adrenalina e isoproterenol, possuem capacidade pró-oxidante na presença dos íons Fe^{+2} , Fe^{+3} ou Cu^{+2} levando à peroxidação lipídica.

Esta capacidade pró-oxidante de catecolaminas é concordante com o interesse em investigar as modificações oxidativas geradas em proteínas pelo sistema IP/ Cu^{+2} . Neste sentido, foi realizada a avaliação do teor de carbonilas formadas pela oxidação da BSA. A primeira etapa para esta avaliação foi a padronização do método para a detecção de carbonilas, através do estabelecimento de um controle positivo ASC (5 mM) acrescido de Cu^{+2} (50 μM). Assim, foi possível observar que o teor de carbonilas formadas na BSA pelo sistema IP/ Cu^{+2} , contendo: 50 μM de IP e 100 μM de Cu^{+2} , foi próximo ao teor obtido com o controle positivo ASC/ Cu^{+2} . Entretanto, quando a concentração de IP foi aumentada para 200 μM , observou-se que o teor de carbonilas formadas quase dobrou, superando o rendimento do sistema padrão. Este fato reflete a maior capacidade oxidativa do sistema IP/ Cu^{+2} em relação ao sistema padrão ASC/ Cu^{+2} , que contém uma concentração muito maior de reagente oxidante (ASC - 5mM).

O aumento do teor de carbonilas encontrado na BSA pode ser devido à formação do $\cdot OH$ pela redução do H_2O_2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), produzido na oxidação de IP/ Cu^{+2} (**ESQUEMA 9**). Esta lesão exemplificada pelo **ESQUEMA 6** ocorre normalmente, por reações do tipo sítio-específicas, nos sítios de ligação do metal à proteína na presença de H_2O_2 (STADTMAN, 1990). Esta possibilidade não exclui a atuação dos outros derivados da oxidação de IP nas lesões de proteínas. Neste contexto, foi recentemente mostrado que a semiquinona e quinona formadas durante a oxidação de dopamina promovem a formação de conjugados

tiólicos por oxidação de proteínas (SPENCER *et al.*, 1998). Outras modificações oxidativas geradas em proteínas incluem a inibição da atividade enzimática, as modificações nos resíduos de aminoácidos e a fragmentação da cadeia polipeptídica (STADTMAN, 1990).

Além da formação de carbonilas por IP/Cu⁺², a fragmentação da cadeia da BSA também foi observada, durante a oxidação de IP na presença de Cu⁺². Esta fragmentação foi dose-dependente da concentração da catecolamina. Embora a formação das lesões em proteínas geradas pelo sistema oxidativo ainda não esteja elucidada, o envolvimento de reações do tipo sítio-específica (STADTMAN, 1990) pode ser sugerido como um provável mecanismo. Vale ressaltar que os complexos com metais intensificam a oxidação das proteínas. Entretanto o potencial oxidante do complexo metálico frente a determinada proteína é dependente da afinidade existente entre eles (OGINO & OKADA, 1995; MIURA *et al.*, 1993 e STADTMAN, 1990).

Um outro efeito lesivo gerado pelo sistema oxidativo IP/Cu⁺² em biomoléculas apresentado neste trabalho foi a formação de 8-oxo-dG em DNA *in vitro*, de forma dose-dependente da concentração de IP. DIZDAROGLU *et al.* (1991) e SHIGENAGA & AMES (1991) mostraram que a 8-hidroxi-2-desoxiguanosina é produzida através da oxidação da guanina por $\cdot\text{OH}$, representando, assim, um marcador de danos oxidativos no DNA. Por isto, os métodos de detecção desta base oxidada estão sendo intensamente investigados (HELBOCK *et al.*, 1998; HERBERT *et al.*, 1996 e ADCHI *et al.*, 1992).

Pelas informações dadas anteriormente, pode-se concluir que o complexo IP/Cu⁺² é capaz de oxidar proteínas e DNA *in vitro*. As lesões encontradas nestas biomoléculas são lesões tipicamente geradas pela ação do $\cdot\text{OH}$ e formadas, muito provavelmente, por reações do tipo sítio-específicas (DIZDAROGLU *et al.*, 1991 e STADTMAN, 1990). Este conjunto de informações, associado ao estudo da oxidação de IP/Cu⁺², converge para a hipótese de que este sistema oxidativo é capaz de gerar ERO e por isto, de induzir estresse oxidativo *in vivo*. Isso conduziu as investigações deste trabalho em direção à avaliação do potencial citotóxico do sistema, sobre modelos mais complexos como as células em cultura.

Para avaliar a citotoxicidade deste sistema oxidativo foram analisadas as alterações em funções celulares, como a inibição da proliferação celular, a perda da adesão células ao substrato e a perda da viabilidade celular. Numa primeira abordagem destes estudos, foi medida a taxa de inibição da proliferação celular, um parâmetro utilizado como indicador eficiente dos efeitos sobre a divisão celular (SOUZA-PINTO *et al.*, 1996). Os resultados obtidos nestes ensaios foram expressos em porcentagens, calculadas em relação aos controles de cada lote de experimentos. Os dados foram submetidos à transformação angular arco-seno, com o objetivo de normalizar as distribuições das proporções que são caracteristicamente assimétricas. Desta forma, evita distorções nas análises estatísticas que sustentam os testes de hipóteses (ZAR, 1996).

Nos estudos sobre a citotoxicidade de IP/Cu⁺², os fibroblastos tratados tiveram um comportamento proliferativo significativamente diferente do observado na exposição ao IP e ao íon metálico em separado. Estes dois últimos grupos celulares tiveram sua proliferação inalterada, independentemente dos tratamentos, o que foi confirmado pelas análises estatísticas dos dados obtidos. A inibição da taxa de proliferação celular foi bastante expressiva nos tratamentos com o sistema oxidativo completo, chegando a 100% em concentrações de IP muito baixas, próximas a 7,0 µM. Esta inibição, observada com concentrações bem pequenas de IP, demonstra que o efeito citotóxico do complexo IP/Cu⁺² é bastante potente.

Na proliferação celular foi observado ao microscópio, paralelamente, o surgimento de um outro fenômeno, nas concentrações mais elevadas de IP, que foi a perda da adesão celular sobre as placas de cultura. Este fenômeno foi melhor avaliado em experimentos programados para medir a adesão celular. Constatamos que o sistema oxidativo IP/Cu⁺², em concentrações superiores a 7,0 µM de IP, promove também o descolamento das células do substrato.

O descolamento das células das placas de cultura é, provavelmente, uma consequência da morte celular. Foi verificado que este efeito foi máximo 3h após o tratamento, sugerindo que a morte celular resulta de um dano induzido durante o tratamento, e que é processado durante a incubação pós-tratamento.

Assim como no caso de proliferação celular, foi constatado que o efeito tóxico de IP é dependente da presença de Cu^{+2} . Estes dados sugerem que a toxicidade do sistema IP/ Cu^{+2} não é causada por vias dependentes de estimulação de receptor, como esperado para um agonista β -adrenérgico como o IP (HORI *et al.*, 1994). Parece mais provável que a citotoxicidade do complexo IP/ Cu^{+2} resulte da indução de lesões oxidativas irreversíveis em biomoléculas e em estruturas celulares.

A indução de danos oxidativos durante o tratamento foi evidenciada pela intensa perda da viabilidade celular, imediatamente após a exposição das células ao sistema IP/ Cu^{+2} (73-88%). RENZI *et al.* (1993) sugerem que a análise da viabilidade celular pela exclusão do azul de tripan, associada à observação da morfologia celular, permite avaliar precisamente a integridade das estruturas celulares. O primeiro, pela análise da integridade da membrana citoplasmática, podendo quantificar as células vivas; e o segundo, pela possibilidade de observar as alterações estruturais nas células por microscopia. Assim, a análise da morfologia dos fibroblastos após tratamento com IP/ Cu^{+2} veio complementar as investigações contidas neste trabalho sobre a citotoxicidade do complexo.

Para a avaliação das modificações morfológicas geradas nas células V79, após tratamento com IP/ Cu^{+2} foram utilizadas a microscopia por contraste diferencial de Normarski e a microscopia confocal. Com Normarski foi possível obter uma visão geral da morfologia celular, enquanto que, no confocal foi obtido um maior detalhamento da morfologia, enfocando o citoesqueleto e os núcleos celulares.

Uma outra questão discutida neste trabalho foi a quantificação do DNA pela análise de imagem dos núcleos corados pela reação de Feulgen. Este método também tem sido utilizado para estabelecer relações entre ciclo celular e apoptose (MARIA, 1998).

Nas análises da morfologia celular por Normarski constatou-se que o sistema oxidativo estudado causou diversas e intensas alterações na forma dos fibroblastos, incluindo a formação de bolhas nas membranas celulares. O tempo de incubação pós-tratamento não alterou significativamente estas modificações (dados não apresentados), confirmando a sugestão anterior, de que as lesões são promovidas pelo

sistema durante o tratamento, e paulatinamente, as células vão sendo liberadas das placas. O artigo ROGERS *et al.* (1989) suporta os resultados, demonstrando que o citoesqueleto é susceptível ao estresse oxidativo, levando ao aparecimento de "bolhas" na membrana e à lise celular.

Um outro aspecto que se relaciona intimamente aos dados de proliferação celular é o fato das alterações morfológicas serem dependentes da presença de ambos os agentes que compõem o sistema oxidativo (IP/Cu⁺²), uma vez que tanto o metal quanto IP isolados não alteraram significativamente a morfologia celular.

É importante ressaltar que o tampão fosfato por si só causou um sutil achatamento das células. Isto sugere que uma sensibilização dos fibroblastos pelo tampão pode contribuir para o efeito citotóxico do sistema IP/Cu⁺². A presença de GSH inibiu completamente as lesões morfológicas das células tratadas com o sistema oxidante, possivelmente, pela completa inibição da reação de IP/Cu⁺², fato este observado nos experimentos de oxidação.

Embora a GSH tenha evitado a ação citotóxica do sistema oxidativo, a tiuréia não conferiu proteção contra esse efeito. Este fato não exclui a participação dos radicais $\cdot\text{OH}$ na ação citotóxica do complexo IP/Cu⁺², pois estes radicais podem estar sendo formados muito próximos aos seus sítios de ação, desencadeando assim, reações do tipo sítio-específica (STADTMAN, 1990).

A análise do citoesqueleto por microscopia confocal revelou o aparecimento de drásticas alterações na estrutura dos três tipos de filamentos: intermediários, de actina e microtúbulos, após tratamento das células com IP/Cu⁺². Estes resultados estão de acordo com os relatos de SAFIEJKO-MROCZKA & BELL (1998), em que um sincronismo das mudanças na organização do citoesqueleto ocorre através de eventos que resultam em alterações de todos os tipos de filamentos simultaneamente.

Os filamentos intermediários são importantes componentes do citoesqueleto e da lâmina nuclear da maioria das células eucarióticas, sendo formados por um grupo heterogêneo de proteínas fibrosas e alongadas que se dispõem ao longo do citoplasma ou como uma estrutura compacta entrelaçada abaixo do envelope nuclear (HEINS & AEBI, 1994 e ALBERS & FUCHS, 1992).

Estudos sobre o citoesqueleto são bastante relevantes, já que este é conhecido como um importante regulador das funções celulares (RAO & COHEN, 1991), participando da regulação da proliferação celular (PAVLATH *et al.*, 1993). Isto sugere que as alterações detectadas estão diretamente relacionadas a inibição da proliferação celular aqui discutida, uma vez que alterações em filamentos do citoesqueleto levam à alteração dos processos proliferativos (PAVLATH *et al.*, 1993).

Consta na literatura que os filamentos de actina do citoesqueleto ocupam, principalmente, a região do córtex celular, logo abaixo da membrana citoplasmática, e que sua distribuição e orientação dependem fundamentalmente de sítios de nucleação na membrana celular, podendo ser induzidos a uma reorganização a partir de sinais extracelulares (ALBERTS *et al.*, 1997). Estas informações e as evidências da perda da integridade da membrana celular, vista pela coloração com azul de tripan, levam a crer que o alvo primário do sistema oxidativo IP/Cu⁺² é a membrana citoplasmática. A desorganização do citoesqueleto dos fibroblastos V79 poderia constituir um segundo evento no mecanismo de citotoxicidade do isoproterenol, combinado ao Cu⁺², conduzindo gradualmente à expressão de eventos irreversíveis como a morte celular. Além disto, pode existir uma correlação entre a inibição do crescimento celular observada em baixas doses de IP e a alteração do citoesqueleto. Essa hipótese é fundamentada na evidência da relação direta entre o citoesqueleto e a regulação de vários processos celulares, incluindo a proliferação (PAVLATH *et al.*, 1993; RAO & COHEN, 1991).

As alterações na organização de citoesqueleto detectadas nos imunoenaios para α -tubulina, correspondem a uma profunda mudança na distribuição destes filamentos, marcada pelo encolhimento dos microtúbulos. Este fenômeno pode ser relacionado à perda de subunidades de tubulina (ALBERTS *et al.*, 1997).

O fato de que o complexo IP/Cu⁺² causa alterações profundas e simultâneas na organização dos três tipos de filamentos do citoesqueleto sugere que este sistema oxidativo não só é capaz de gerar distúrbios estruturais, como também induz drásticas mudanças funcionais nas células. Tanto os microtúbulos quanto os filamentos de actina são componentes chaves do citoesqueleto de células eucarióticas, sendo a

organização de suas redes responsáveis pela distribuição espacial de organelas (WADE & HYMAN, 1997).

Portanto, uma vez que o sistema IP/Cu^{+2} causou drásticas alterações em proteínas do citoesqueleto de fibroblastos V79, levando à desorganização de seus filamentos, sugere-se que estes eventos estão relacionados com a perda da adesão celular, observada nas células tratadas com IP/Cu^{+2} . De acordo com YAMADA & GEIGER (1997), a região de adesão celular consiste em um complexo protéico multimolecular, de receptores de adesão transmembrânicos ancorados em proteínas do citoesqueleto e em moléculas de transdução de sinal.

Um outro tipo de filamento intermediário do citoesqueleto foi a lamina B que compõe a lâmina nuclear. A lâmina nuclear é formada por uma camada fina de filamentos de subunidades de lamina (A, B e C) que se ancoram na membrana interna do núcleo, conferindo forma e estabilidade ao envelope nuclear (ALBERTS, *et al.*, 1997). Nestes estudos detectou-se uma completa desestruturação dos filamentos de lamina B em células tratadas com IP/Cu^{+2} , quando comparadas às lâminas de células expostas apenas ao tampão. Apesar da total degeneração da lâmina nuclear, os núcleos parecem íntegros. Entretanto, esta integridade pode ser irreal, já que os diâmetros dos núcleos foram reduzidos e a extensão da área marcada com lamina B ampliada, confirmando a sua total degeneração e sugerindo uma dispersão de subunidades desta proteína para o interior do citoplasma dos fibroblastos V79, logo após o tratamento com sistema IP/Cu^{+2} .

A capacidade do complexo IP/Cu^{+2} de oxidar proteínas *in vitro* permite sugerir que a oxidação de proteínas da membrana e do citoesqueleto constitui o dano primário no mecanismo de lesão celular. Tais lesões oxidativas levariam a uma severa desorganização da membrana citoplasmática e de filamentos protéicos do citoesqueleto. Entretanto, estudos adicionais se fazem necessários para comprovar as possíveis lesões oxidativas geradas em proteínas *in vivo* pelo IP/Cu^{+2} .

As lesões celulares causadas por IP/Cu^{+2} se estendem até o núcleo dos fibroblastos V79. Neste trabalho foi mostrado que o sistema oxidativo é capaz de modificar o aspecto geral da morfologia nuclear e de levar ao surgimento de algumas

anomalias nucleares, como micronúcleos e binucleações, descritas na classificação estabelecida por TOLBERT *et al.* (1992). O surgimento de micronúcleos em células de embrião expostas à cafeína e aos raios X foi associado por MUELLER, (1993) a uma discreta assincronia de estágios do ciclo celular durante o tratamento, na duração do reparo ou mesmo na inibição do processo de reparo pela cafeína.

Os micronúcleos e as binucleações encontradas nos núcleos das células tratadas não constituem os principais efeitos nucleares gerados por IP/Cu⁺², pois é a picnose nuclear o evento predominante dentro das anomalias encontradas. Este processo está diretamente relacionado ao tempo de incubação pós-tratamento. Ao final das 24h, 74% dos núcleos se apresentam picnóticos e, no restante, a cromatina exibia sinais de desorganização, como se estivessem em plena degeneração nuclear. A presença de núcleos picnóticos é um aspecto importante na avaliação da toxicidade de IP associado ao Cu⁺², já que a picnose é um indicador morfológico importante na identificação de morte celular por apoptose (WALKER *et al.*, 1994).

Através da vista ortogonal, constatamos que os núcleos das células tratadas com IP/Cu⁺² são realmente picnóticos, apresentado menor volume e maior homogeneidade, quando comparadas à vista ortogonal dos núcleos controles. A heterogeneidade entre os núcleos tratados com o sistema oxidativo deve ser em função do estágio do ciclo celular no qual as células se encontravam, já que estas não estavam sincronizadas.

Neste trabalho foram detectados o surgimento de núcleos picnóticos e a destruição da lâmina nuclear, suportando a hipótese de que IP/Cu⁺² pode ser um sistema capaz de induzir apoptose. MANELLI-OLIVEIRA (2000) considerou a picnose e a condensação da cromatina como estágios da apoptose ou necrose. Durante a apoptose a membrana nuclear interna se fragmenta e a lamina B é destruída por proteólise em seus estágios tardios, embora a dispersão da membrana possa ser subsequente a da lamina B. Isto causa alteração da morfologia nuclear, em que a cromatina aparece condensada e a lamina B e a membrana nuclear dispersas

(DUBAND-GOULET *et al.*, 1998), eventos muito similares aos encontrados nos núcleos dos fibroblastos V79 tratados com o sistema oxidativo IP/Cu⁺².

Segundo ISHIDA *et al.* (1992) a avaliação da perda da viabilidade celular seguida de análises estruturais e morfológicas do DNA são indicativos primários da indução de apoptose. No caso de catecolaminas, estudos recentes mostraram que são capazes de induzir apoptose em células neuronais (MASSERANO *et al.*, 1996).

Na quantificação do DNA foi constatado que IP/Cu⁺² desviou o diagrama de frequências de ploidia. Fenômeno similar foi descrito para a novantrona, uma droga que causa aumento do nível de ploidia em células da linhagem CHO por acúmulo de células nos períodos S e G₂ do ciclo celular (TRAGANOS *et al.*, 1991). Isto indica que o sistema oxidativo IP/Cu⁺² gera aumento no conteúdo de DNA, não por formação de aneuploidias, mas, por interferência na divisão celular com o retardo na fase pré-mitótica (G₂) do ciclo.

Apesar de não ter sido quantificado o teor de núcleos mitóticos nas células V79, foi possível perceber ao microscópio ótico que o sistema IP/Cu⁺² reduz a quantidade de núcleos mitóticos nas células. Isto é mais um indicativo do bloqueio do ciclo celular durante a transição G₂-M.

Os resultados obtidos até o momento indicam a ocorrência de uma interrupção do ciclo celular em células expostas ao sistema IP/Cu⁺². Assim, a destruição da lâmina nuclear, associada às severas modificações em outros filamentos do citoesqueleto, poderia levar ao bloqueio da progressão do ciclo celular. Estes dados são suportados pelos estudos de WARD & KIRCHNER (1990) e PETER *et al.* (1990) que mostraram o papel determinante da lâmina nuclear na progressão do ciclo celular. Esses autores mostraram que a fosforilação da lamina causaria a despolimerização da rede filamentosa, levando ao rompimento do envelope nuclear. Recentemente, PANAGIOTOU *et al.* (1999) relataram o envolvimento das modificações de filamentos de actina e tubulina no bloqueio específico durante a transição G₂ – M.

Embora tenha sido detectada a formação da base oxidada 8-oxo-dG em DNA de timo bovino tratado com IP/Cu⁺², a mesma base não foi detectada em células tratadas com o sistema oxidativo (dados não apresentados). FISCHER-NIELSEN *et al.* (1993) demonstraram a produção de 8-oxo-dG em células V79 expostas à luz UV. Isto demonstra que os fibroblastos V79 estão sujeitos à formação deste tipo de dano oxidativo em DNA. O fato do complexo IP/Cu⁺² não ter induzido a formação de 8-oxo-dG em quantidades detectáveis nas células V79 pode ser atribuído a: (1) esta lesão ser um dano minoritário e (2) a lesão da guanina ser eficientemente reparada. Esta segunda possibilidade é justificada por JARUGA & DIZDAROGLU (1996) que revelaram a existência de mecanismos de reparo eficientes para a excisão guanina oxidada. É possível supor, ainda, que a quantidade de 8-oxo-dG formada em DNA *in vitro* seja muito maior do que *in vivo*, já que a alteração do DNA no interior celular é dificultada pela grande compactação da cromatina, encontrando-se menos exposto à ação sistema oxidante IP/Cu⁺².

Os estudos aqui apresentados abrem várias perspectivas para a elucidação dos mecanismos de citotoxicidade do complexo IP/Cu⁺², tornando-se relevante uma maior investigação para caracterizar outras lesões em DNA, tais como, a fragmentação do DNA e o surgimento de apoptose.

A avaliação dos níveis intracelulares de AMPc poderia ser uma outra alternativa na investigação dos mecanismos citotóxicos envolvidos na oxidação do IP na presença de Cu⁺². Este regulador celular pode estar aumentado na célula, não só pela ação adrenérgica, através da ativação da adenilato ciclase, como pela inativação da fosfodiesterase, similar à cafeína (ELGJO & REICHEL, 1994). Como o mecanismo citotóxico parece não estar vinculado à ação adrenérgica de IP, estes dados possibilitam investigar a ocorrência do acúmulo de AMPc nos fibroblastos após o tratamento com o sistema oxidativo IP/Cu⁺², levando à inibição da fosfodiesterase. Isto é fundamentado pelo fato do AMPc ser um importante regulador de diversos processos metabólicos, que incluem a ativação e a repressão gênica da síntese de proteínas estruturais e reguladoras, assim como de outras proteínas envolvidas na sinalização do processo de divisão celular (YANG & FARIDY, 1989 e ENOMOTO *et al.*, 1984).

Concluindo, os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a combinação de isoproterenol e Cu^{+2} é bastante tóxica para os fibroblastos V79, pois afeta tanto o citoesqueleto quanto o núcleo celular, levando a graves alterações das funções vitais destas células. A grande susceptibilidade celular aos efeitos tóxicos do complexo IP/ Cu^{+2} e a ampla distribuição do cobre nos tecidos, notadamente no coração e no fígado (**TABELA I**) (LINDER & HAZEGH-AZAM, 1996), indicam o possível papel deste metal nos efeitos cardio e hepatotóxicos do isoproterenol. Os fatos aqui apresentados apoiam o uso deste sistema oxidativo como um bom modelo para investigação dos mecanismos de citotoxicidade e genotoxicidade de catecolaminas. Além disso, o conhecimento dos mecanismos relacionados à ação citotóxica do complexo IP/ Cu^{+2} pode contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos nos efeitos adversos das catecolaminas de importância fisiológica.

CONCLUSÕES

- ¹ A reação de oxidação de IP é catalisada por íons de metais de transição, sendo os íons divalentes os mais efetivos nesta catálise.
- ² A eficiência do cobre na catálise da oxidação de IP é maior que a do ferro. Tendo-se observado a seguinte ordem de eficácia: $\text{Cu}^{+2} > \text{Cu}^{+1} > \text{Fe}^{+2} > \text{Fe}^{+3}$.
- ³ A formação de H_2O_2 e do aminocromo durante a oxidação de IP indica a ocorrência de transferência eletrônica entre as formas iônicas do cobre, levando à oxidação da molécula.
- ⁴ GSH inibe totalmente a oxidação de IP, enquanto que a CAT inibe parcialmente a velocidade da reação.
- ⁵ O complexo IP/ Cu^{+2} causa a oxidação da BSA *in vitro*, levando à formação de carbonilas em resíduos de aminoácidos e fragmentação da cadeia polipeptídica de forma dose dependente da concentração de IP.
- ⁶ O maior rendimento obtido de carbonilas na BSA pela ação do sistema IP/ Cu^{+2} indica um poder oxidante superior deste sistema, em relação ao sistema oxidante conhecido ASC/ Cu^{+2} .
- ⁷ O sistema oxidativo é capaz de induzir a produção de 8-oxo-dG em DNA *in vitro*, indicando a formação de $\cdot\text{OH}$ durante a oxidação de IP/ Cu^{+2} .
- ⁸ O sistema oxidativo gera drásticas lesões em fibroblastos V79, como a alteração da proliferação celular, a perda da adesão ao substrato e a redução da viabilidade celular.

- ⁹ IP/Cu⁺² gera severas alterações da morfologia dos fibroblastos V79, observadas por microscopia de Normarski.
- ¹⁰ A GSH impede a formação das alterações morfológicas das células expostas ao tratamento oxidativo, indicando que intermediários e/ou produtos de oxidação do IP são responsáveis pelos danos oxidativos.
- ¹¹ As células tratadas com IP/Cu⁺² apresentaram perda simultânea da organização de quatro filamentos do citoesqueleto: vimentina, tubulina, actina e lamina B, levando, inclusive, à despolimerização dos filamentos protéicos.
- ¹² O sistema oxidativo aumenta o conteúdo de DNA das células tratadas.
- ¹³ IP/Cu⁺² gera alteração da morfologia nuclear, causando, principalmente, indução de picnose dos núcleos dos fibroblastos V79.
- ¹⁴ As lesões causadas pelo IP em biomoléculas e em fibroblastos V79 são dependentes da presença do íon Cu⁺², indicando o papel crítico deste íon na citotoxicidade do IP.
- ¹⁵ As alterações observadas na proliferação celular, no citoesqueleto e conteúdo de DNA sugerem que o complexo IP/Cu⁺² induz ao bloqueio da progressão do ciclo celular e a morte dos fibroblastos V79.
- ¹⁶ O sistema oxidativo IP/Cu⁺² representa um modelo válido para estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de catecolaminas em geral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, S.; ZEISIG, M. & MÖLLER, L. (1995). Improvements in the analytical method for 8-hydroxyguanosine in nuclear DNA. *Carcinogenesis*, **16**(2): 253-258.
- ALBERS, K. & FUCHS, E. (1992). The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int. Rev. Cytol.*, **134**: 243-279.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. D. (1997). *Citoesqueleto*. In: *Biologia Molecular da Célula*. Artes Médicas. Porto Alegre. pp. 786-861.
- ALLEN, D. R.; WALLIS, G. L. & MCCAY, P. B. (1994). Catechol adrenergic agents enhance hydroxyl radical generation in xanthine oxidase systems containing ferritin: Implications for ischemia/reperfusion. *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**(2): 235-243.
- ARCHIBALD, F. S. & TYREE, C. (1987). Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Arch. Biochem. Biophys.*, **256**(2): 638-650.
- ARÉVALO, A. M.; SOUZA-PINTO, N. C.; COSTA, A. D. T. & HOFFMANN, M. E. (1996). Mechanisms of tetrahydroxy-1,4-benzoquinone toxicity to V79 cells: Involvement of free radicals produced by its autoxidation. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, **48**(1/2): 103-108.
- ARMSTRONG, D. A. & BUCHANAN, J. D. (1978). Reactions of O_2^- , H_2O_2 and other oxidants with sulfhydryl enzymes. *Photochem. Photobiol.*, **28**: 743-755.
- AUST, S. D.; MOREHOUSE, L. A. & THOMAS, C. E. (1985). Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Rad. Biol. & Med.*, **1**: 3-25.
- BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **44**: 276-287.
- BERLYN, G. P. & MIKSCHE, J. P. (1976). Types of Microscopy In: *Botanical Microtechnique and Cytochemistry*. The Iowa State University Press. 5 ed., p. 151-216.

- BERNHARD, E. J.; MAITY, A.; MUSCHEL, R. J. & MCKENNA, W. G. (1995). Effects of ionizing on cell progression : A review. *Rad. Environ. Bioph.*, **34(2)**: 79-83.
- BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P. & DEEBLE, D. J. (1971). Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Rad. Biol. & Med.*, **13**: 391-405.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**: 93-99.
- BOWMAN, W. C. & RAND M. J. (1980). *Peripheral adrenergic mechanisms. Textbook of Pharmacology*. Black-Well Sci. Pub.. Oxford. pp. 11-17.
- BRADLEY, M. O.; BHUYAN, B.; FANCIS, M. C.; LANGENBACH, R.; PETERSON, A. & HUBERMAN, E. (1981). Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. *Mutat. Res.*, **87**: 81-142.
- BRODOWICZ, G. R. & LAMB, D. R. (1991). Exercise training, indomethacin, and isoproterenol-induced myocardial necrosis in the rat. *Basic Res. Cardiol.*, **86**: 40-48.
- BRUNMARK, A. & CADENAS, E. (1989). Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Arch. Biochem. Biophys.*, **7**: 435-477.
- CAO, G.; SOFIC, E. & PRIOR, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant Behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. & Med.*, **22(5)**: 749-760.
- CHEVION, M. (1988). A sitio-specific mechanism for free radical induced biological damage: The essential role of redox-active transition metals. *Free Rad. Biol. & Med.*, **5**: 27-37.
- CLOTHIER, R. H.; ATKINSON, K. A.; GARLE, M. J.; WARD, R. K. & WILLSHAW, A. (1995). The development and evalution of *in vitro* tests by the FRAME alternatives laboratory. *ATLA*, **23**: 75-90.

- COHEN, G. & HEIKKILA, R. E. (1974). The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid and related cytotoxic agents. *J. Biol. Chem.*, **249**(8): 2447-2452.
- DAVIES, K. J. A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, **262**(20): 9895-9901.
- DIZDAROGLU, M.; NACKERDIEN, Z.; CHAO, B-C.; GAJEWSKI, E. & RAO, G. (1991). Chemical nature of *in vivo* DNA base damage in hydrogen peroxide-treated mammalian cells. *Arch. Biochem. Bioph.*, **285**(2): 388-390.
- DOUKI, T.; BERGER, M.; RAVANAT, J-L. & CADET, J. (1995). Determination of 8-oxo-purines in DNA by CLAE using amperometric detection in *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Favier *et al.* eds., Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, p.213.
- DUBAND-GOULET, I.; COURVALIN, J. C. & BUENDIA, B. L. B. R. (1998). A chromatin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at late stages of apoptosis. *J. Cell Sci.*, **111**: 1441-1451.
- ELGJO, K. & REICHELT, K. L. (1994). Beta-receptor blockade by propanolol modifies the effect of the inhibitory endogenous epidermal pentapeptide on epidermal cell flux at the G-2-M transition but not at the G-1-S transition. *Epithelial Cell Biology*, **3**(1): 32-37.
- ENOMOTO, T.; MARTEL, N.; KANNO, Y. & YAMASAKI, H. (1984). Inhibition of cell communication between Balb/c 3T3 cells by tumor promoters and protection by cyclic AMP. *J. Cell. Physiol.*, **121**(2): 323-333.
- FISCHER-NIELSEN, A.; LOFT, S. & JENSEN, K.G. (1993). Effect of ascorbate and 5-aminosalicylic acid on light-induced 8-hydroxyguanosine formation in V79 Chinese Hamster cells. *Carcinogenesis*, **14**(11): 2431-2433.

- FRIEDEL, H. A. & BROGDEN, R. N. (1988). Bitolterol. A preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in reversible obstructive airways disease. *Drugs* **35**(1): 22-41.
- FRY, J. F.; HAMMOND, A. H.; GARLE, M. J. & LAL, K. (1993). Comparison of xenobiotic-mediated cytotoxicity in rat hepatocytes and V79 chinese hamster lung fibroblast cell line: Can metabolically-activated hepatotoxins be identified by selective cytotoxicity to hepatocytes? *ATLA*, **21**: 8-12.
- GESZTESI, J. L. (1990). Ação de ésteres de sacarose em cultura de tecidos. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 139p.
- GUTTERIDGE, J. M. C (1993). Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free Rad. Res. Comms.*, **19**(3): 141-158.
- GUTTERIDGE, J. M. C. (1982). The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalysed by iron salts. *FEBS Lett.*, **150**(2): 454-458.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford. University Press. 3 ed.
- HANNA, P. M. & MASON, R. P. (1992). Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique. *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**(1): 205-213.
- HARMAN, D. (1992). Free radical theory of aging. *Mutat. Res*, **275**: 257-266.
- HARRIS, Z. L. & GITLIN, J. D. (1996). Genetic and Molecular basis for copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**: 836S-841S.

- HARRISON, W. H.; WHISLER, W. W. & HILL, B. J. (1968). Catecholamine oxidation and ionization properties indicated from the H^+ release, tritium exchange, and spectral changes which occur during ferricyanide oxidation. *Biochem.*, **7**(9): 3089-3094.
- HEINS, S. & AEBI, U. (1994). Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**: 25-33.
- HELBOCK, H. J.; BECKMAN, K. B.; SHIGENAGA, M.K.; WALTER, P.B.; WOODALL, A. A.; YEO, H. C. & AMES, B. N. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 288-293.
- HERBERT, K. E.; EVANS, M. D.; FINNEGAN, M. T. V.; FAROOQ, S.; MISTRY, N.; PODMORE, I. D.; FARMER, P. & LUNEC, J. (1996). A novel HPLC procedure for the analysis of 8-oxoguanine. *Free Rad. Biol. Med.*, **20**(3): 467-473.
- HOFFMANN, M. E.; CIAMPI, D. B. & DURAN, N. (1987). The autooxidation of 2,3,5,6-tetrahydroxy-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione under physiological conditions. *Experientia*, **43**: 217-220.
- HORI, M.; SATO, H.; KITAKAZE, M.; IWAI, K.; TAKEDA, H.; INOUE, M. & KAMADA, T. (1994). β -Adrenergic stimulation disassembles microtubules in neonatal rat cultured cardiomyocytes through intracellular Ca^{+2} overload. *Circ. Res.*, **75**(2): 324-334.
- ISHIDA, Y; FURUKAWA, Y; DECAPRIO, J. A.; SAITO, M. & GRIFFIN, J. D.(1992). Treatment of myeloid leukemic cells with the phosphatase inhibitor okadaic acid induces cell cycle arrest at either G_1/S or G_2M depending on dose. *J. Cell. Physiol.*, **150**(3): 484-492.
- JARUGA, P. & DIZDAROGLU, M. (1996). Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Research.*, **24**(8): 1389-1394.
- KALYANARAMAN, B.; FELIX, C. C. & SEALY, R. C. (1985). Semiquinone anion radicals of catechol(amine)s, catechol estrogens, and their metal ion complexes. *Environ. Health Perspect.*, **64**: 185-198.

- KALYANARAMAN, B. (1990). Characterization of o-semiquinones radicals in biological systems. *Methods Enzymol.*, **186**: 333-343.
- KLEGERIS, A., KORKINA, L. G. & GREENFIELD, S. A. (1995). Autoxidation of dopamine: A comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. *Free Rad. Biol. & Med.*, **18**(2): 223-230.
- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S. & STADTMAN, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, **186**: 464-478.
- LINDER, M. C. & HAZEGH-AZAM, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**: 797S-811S.
- LIU, S. C.; FAIRBANKS, G. & PALEK, J. (1977). Spontaneous reversible protein cross-linking in the human erythrocyte membrane, temperature and pH dependence. *Biochem.*, **16**: 4066-4074.
- LÖNNERDAL, B. (1996). Bioavailability of copper. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**: 821S-829S.
- LOUIS, J-C.; MAGAL, E. & VARON, S. (1992). Receptor-mediated toxicity of norepinephrine on cultured catecholaminergic neurons of the rat brain stem. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**(3): 1274-1283.
- LUZA, S. C. & SPEISKY, (1996). Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**: 812S-820S.
- MANELLI-OLIVEIRA, R. (2000). Citoesqueleto e alterações nucleares em células tumorais: uma abordagem tridimensional ao microscópio confocal. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, USP, 74p.

- MÄNTTÄRI, M.; MANNINEN, V.; HUTTUNEN, J. K.; PALOSUO, T.; EHNHOLM, C.; HEINOMEN, O. P. & FRICK, M. H. (1994). Serum ferritin and ceruloplasmin as coronary risk factors. *Eur. Heart J.*, **15**: 1599-1603.
- MARIA, S. S. (1998). Estudo citoquímico, imunocitoquímico e de análise de imagem de células fibroblásticas em proliferação e apoptose na ausência e na presença de colágeno tipo I hiperpolimerizado. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 73p.
- MASSERANO, J. M; GONG, L.; KULAGA, H.; BAKER, I. & WYATT, R. J. (1996). Dopamine induces apoptotic cell death of a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Mol. Pharmacol.*, **50**(5): 1309-1315.
- MATSUI, D & MACHADO-SANTELLI, G. M. (1997). Alterations in F-actin distribution in cells treated with melatonin. *J. Pineal Res.*, **23**: 169-175.
- MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E. & MENEHINI, R. (1984). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.*, **218**: 273-275.
- MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. (1978). A reação de Feulgen. *Ciência e Cultura* **30**(6): 665-676.
- MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R. & AUST, S. D. (1985). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Rad. Biol. & Med.*, **8**: 95-108.
- MIURA, T; MURAOKA, S. & OGISO, T. (1993). Inhibition of hydroxyl radical- induced protein damages by trolox. *Bioch. Molec. Biol. Internat.*, **31**(1): 125-133.

- MOBLEY, J. A.; BHAT, A. S. & BRUEGGEMEIER, R. W. (1999). Measurement of oxidative DNA damage by catechol estrogens and analogues in vitro. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**(3): 270-277.
- MOSINGER, B. J. (1995). Copper-induced and photosensitive oxidation of serum low-density lipoprotein. The relation to cholesterol level and inter-species differences. *Biochim. et Biophys. Acta*, **1270**: 73-80.
- MUELLER, W. U.; KASPER, C & STREFFER, C. (1993). Relation between rate of cell proliferation and formation of micronuclei after combined treatment with X-rays and caffeine. *Rad. Environ. Bioph.*, **32**(3): 239-249.
- NAPOLITANO, A.; CRESCENZI, O.; PEZZELA A. & PROTA, G. (1995). Generation of the neurotoxin 6-hydroxydopamine by peroxidase/H₂O₂: Oxidation of dopamine. *J. Med. Chem.*, **38**: 917-922.
- NÚÑEZ-DELICADO, E.; PÉREZ-GILABERT, M.; SÁNCHEZ-FERRER, A. & GARCÍA-CARMONA, F. (1996). Hydroperoxidase activity of lipoxygenase: a kinetic study of isoprotefenol oxidation. *Biochim. et Biophys. Acta*, **1293**: 17-22.
- OGINO, T. & OKADA, S. (1995). Oxidative damage of bovine serum albumin and other enzyme proteins by iron-chelate complexes. *Biochim. et Biophys. Acta*, **1245**: 359-365.
- OLIVARES, M. & UAUY, R. (1996). Copper as an essential nutrient. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**: 791S-796S.
- ONDRIAS, K.; STASKO, A.; GERGEL, D.; HROMADOVA, M. & MISIK, V. (1998). Antioxidant and pro-oxidant effects of epinephrine and isoprenaline on peroxidation of LDL and lipid liposomes. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**: 791S-796S.

- PANAGIOTOU, S.; BAKOGEORGOU, E.; PAPAKONSTANTI, E.; HATZOGLOU, A.; WALLET, F.; DUSSERT, C.; STOURNARAS, C.; MARTIN, P-M.; & CASTANAS, E. (1999). Opioid agonists modify breast cancer cell proliferation by blocking cells to the G₂/M phase of the cycle: Involvement of cytoskeletal elements. *J. Cell. Biochem.*, **73**: 204-211.
- PARFITT, K. (1999). *Martindale: The complete drug reference*. London. Pharmaceutical Press. 32 ed.
- PAVLATH, G. K.; SHIMIZU, Y. & SHIMIZU, N. (1993). Cytoskeletal active drugs modulate signal transduction in the protein kinase c pathway. *Cell Struc. Funct.*, **18**: 151-160.
- PAWLEY, J. B. (1995). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2 ed., Plenum Press, New York.
- PERSOON-ROTHERT, M.; van der VALK-KOKSHOORN, J. M.; EGAS-KENNIPHAAS, J. M.; MAUVE, I. & van der LAARSE, A. (1989). Isoproterenol-induced cytotoxicity in neonatal rat heart cell cultures is mediated by free radical formation. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **21**: 1285-1291.
- PETER, M.; NAKAGAWA, J.; DORÉE, M.; LABBÉ, J. C.; & NIGG E. A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, **61**: 591-602.
- PETERSON, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*: Which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **83**: 346-356.
- PICKLO, M. J.; AMARNATH, V.; GRAHAM, D. G. & MONTINE, T. J. (1999). Endogenous catechol thioethers may be pro-oxidant or antioxidante. *Free Rad. Biol. & Med.*, **27(3-4)**: 271-277.

- PROSSER, C. L. (1991). Excitable Membranes; Synaptic Transmission and Modulation. In: *Neural and Integrative Animal Physiology*. New York. Wiley-Liss. 4 ed., p. 1-66.
- RAO, K. M. K. & COHEN, H. J. (1991). Actin cytoskeleton network in aging and cancer. *Mut. Res.*, **256**: 139-148.
- REDDY, B. R., KLONER, R. A. & PRZYKLENK, K. (1989). Early treatment with deferoxamine limits myocardial ischemic/reperfusion injury. *Free Rad. Biol. & Med.*, **7**: 45-52.
- RENZI, D.; VALTOLINA, M. & FORSTER, R. (1993). The evaluation of multi-endpoints cytotoxicity assays system. *ATLA*, **21**: 89-96.
- RIOS, C.; ALVAREZ-VEGA, R. & ROJAS, P. (1995). Depletion of copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice. *Pharmacol. & Toxicol.*, **76**: 348-352.
- ROBINSON, J. & COOPER, J. M. (1970). Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal. Biochem.*, **33**: 390-399.
- ROGERS, K. R.; MORRIS, C. J. & BLAKE, D. R. (1989). Cytoskeletal rearrangement by oxidative stress. *Int. J. Tiss. Reac.*, **XI(6)**: 309-314.
- ROSSI, L.; MOORE, G. A.; ORRENIUS, S.; O'BRIEN, P. J. (1986). Quinone toxicity in hepatocytes without oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**: 25-35.
- RUMP, A. F. E. & KLAUS, W. (1995). Functional effects of adrenochrome in isolated rabbit heart. *Pharmacol. & Toxicol.*, **77**: 102-105.
- SAFIEJKO-MROCZKA, B. & BELL, P. B. Jr. (1998). Distribution of cytoskeletal proteins in neomycin-induced protrusions of human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **242**: 495-514.

- SCHEINBERG, I. H. & STERNLIEB, I. (1996). Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**: 842S-845S.
- SHIGENAGA, M. K. & AMES, B. (1991). Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Free Rad. Biol. & Med.*, **10**: 211-216.
- SINGAL, P. K., BEAMISH, R. E. & DHALLA, N. S. (1983). Potencial oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **161**: 391-401.
- SNYDER, R. D. & FRIEDMAN, M. B. (1998). Enhancement of cytotoxicity and clastogenicity of L-DOPA and dopamine by manganese and copper. *Mut. Res.* **405**: 1-8.
- SOJAKKA, K.; PUNNONEN, E-L. & MARJOMÄKI, V. S. (1999). Isoproterenol inhibits fluid-phase endocytosis from early to late endosomes. *Eur. J. Cell Biol.*, **78**: 161-169.
- SOLOMONS, T. W. G. (1988). Visible and ultraviolet spectroscopy. In: *Organic Chemistry*. New York. John Wiley & Sons. 4 ed., p.568-573.
- SOUZA-PINTO, N. C., VERCESI, A. E. & HOFFMANN, M. E. (1996). Mechanism of tetrahydroxy-1,4-quinone cytotoxicity: Involvement of Ca^{+2} and H_2O_2 in the impairment of DNA replication and mitochondrial function. *Free Rad. Biol. & Med.*, **20**(5): 657-666.
- SPENCER, J. P.; JENNER, P.; DANIEL, S. E.; LEES, A. J.; MARSDEN, D. C. & HALLIWELL, B. (1998). Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J. Neurochem.*, **71**(5): 2112-2122.

- SPENCER, J. P. E.; JENNER, A.; ARUOMA, O. I.; EVANS, P. J.; KAUR, H.; DEXTER, D. T.; JENNER, P.; LEES, A. J.; MARSDEN, D. C. & HALLIWELL, B. (1994). Intense oxidative DNA damage promoted by L-DOPA and its metabolites: Implications for neurodegenerative disease. *FEBS Lett.*, **353**: 246-250.
- STADTMAN, E. R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**: 797-821.
- STADTMAN, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. & Med.*, **9**: 315-325.
- STANWELL, C.; YE, B.; YUSPA, S. H. & BURKE, Jr. T.R. (1996). Cell protein cross-linking by erbstatin and related compounds. *Biochem. Pharmacol.*, **52**: 475-480.
- SUTTON, H. C. & WINTERBOURN, C. C. (1989). On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Rad. Biol. & Med.*, **6**: 53-60.
- SUZUKI, M. & GITLIN, J. D. (1999). Intracellular localization of the Menkes and Wilson's disease proteins and their role in intracellular copper transport. *Pediatr. int.*, **41(4)**: 436-442.
- SWAIN, J. A.; DARLEY-USMAR, V. & GUTTERIDGE, J. M. C. (1994). Peroxynitrite releases copper from caeruloplasmin: implications for atherosclerosis. *FEBS Letters*, **342**: 49-52.
- TOLBERT, P. E.; SHY, C. M. & ALLEN, J. W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mut. Res.*, **271**: 69-77.
- TOSAKI, A.; WOODWARD, B.; YAMAMOTO, F. & HEARSE, D. J. (1990). Isoproterenol and the genesis of reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart: Adrenoceptor or free radical-mediated mechanisms?. *J. Cardiol. Pharmacol.*, **15**: 398-407.

- TRAGANOS, F.; KAMINSKA, E. & DARZYNKIEWICZ, Z. (1991). Caffeine reverses the cytotoxic and cell kinects effects of novantrone (mitoxantrone). *Cell Proliferat.*, **24**(3): 305-320.
- TSE, D. C. S.; MCCREERY, R. L. & ADAMS, R. N. (1976). Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *J. Med. Chem.*, **19**(1): 37-40.
- UCHIDA, K. & KAWAKISHI, S. (1993). 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Lett.*, **332**(3): 208-210.
- VILLA, R.; ZAFFARONI, N.; GORNATI, D.; COSTA, A. & SILVESTRINI, R. (1994). Lack of a correlation between micronucleus and radiosensitivity in established and primary cultures of human tumors. *British J. Cancer*, **70**(6): 1112-1117.
- WADE, R. H. & HYMAN, A. A. (1997). Microtubule structure and dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, **9**: 12-17.
- WAGGONER, D. J.; BARTNIKAS, T. B. & GITLIN, J. D. (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.*, **6**(4): 221-230.
- WALKER, P. R.; WEAVER, V. M.; LACH, B.; LEBLANC, J. & SIKORSKA, M. (1994). Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp. Cell Res.*, **213**: 100-106.
- WARD, G. E. & KIRSCHNER (1990). Identification of cell-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell*, **61**: 561-577.
- WEINER, N. & MOLINOFF, P.B. (1993). Catecholamines. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. New York. Raven Press. 5 ed., p. 261-281.

- WHEATLEY, A. M.; THANDROYEN, F. T.; & OPIE, L. H. (1985) Catecholamine-induced myocardial cell damage: catecholamines or adrenochrome. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **17**: 349-359.
- WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; STROUMTSOS, L & FERTING, M. N. (1976). *The Merck Index: An encyclopedia of chemicals and drugs*. Rahway. Merck & CO., INC. 9 ed.
- WINYARD, P. G.; HIDER, R. C.; BRAILSFORD, S.; DRAKE, A. F.; LUNEC, J. & BLAKE, D. R. (1989). Effect of oxidative stress on some physicochemical properties of caeruloplasmine. *Biochem. J.*, **258**: 435-445.
- YAMADA, K. M. & GEIGER, B. (1997). Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**: 76-85.
- YANG, W. Z. & FARIDY, E. E. (1989). Role of cyclic AMP in proliferation of lung tissue in organ culture. *Exp. Lung Res.*, **15(4)**: 527-536.
- ZAR, J. H. (1996). *Biostatistical Analysis*. New Jersey. Prentice Hall. 4 ed.

