Pedro Soares de Araujo

VIAS DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS EM MICROSSOMOS E A ATIVIDADE AZO-REDUTÁSICA

Tese de Doutoramento apresentada
ao Departamento de Bioquímica
do Instituto de Química da
Universidade de São Paulo

1971

PARA ISAIAS RAW

E LIGIA

Nessun maggior dolore
che ricordarsi del tempo felice
nella miseria...

(Dante - Inferno, Canto nº 5, Verso 121)

AGRADECIMENTOS

A ISAIAS RAW , amigo e mestre, pelo seu exemplo de dedicação irrestrita à Pesquisa e ao Ensino. Seu apoio e estímulo durante todos os anos em que orientou nossa formação científica foram inestimáveis. Sua obra educadional cujas raízes são sólidas, porque honesta e realista, há de frutificar amplamente, apesar de todos os percalços, cumprindo o seu destino original de diminuir nosso atrazo tecnológico.

A LÉLIA MENNUCCI que, quando ainda éramos acadêmicos, nos incutiu o método e o rigor científicos durante anos de trabalho conjunto.

A WALTER COLLI que substituiu a ISAIAS RAW na orientação desta pesquisa, pelo auxílio profissional, sugestões e discussões tão fecundas.

A HERNAN CHAIMOVICH pelas sugestões e críticas minuciosas dêste trabalho.

A APARECIDA YOSCHIKO HASHIKAWA pela colaboração prestada na parte técnica.

À CARMINHA pelo esmêro e exatidão com que datilografou esta tese.

A FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO pelo apoio financeiro que tornou possível a execução dêste trabalho.

ÍNDICE

		Pág.
1.	Introdução	13
2.	Material e métodos	25
2.1.	Material	25
2.2.	Animais	26
2.2.1.	Tratamento com fenobarbital	26
2.2.2.	Tratamento com 3-metilcolantreno	27
2.2.3.	Tratamento com DAB	27
2.3.	Métodos	27
2.3.1.	Preparação de microssomos de fígado	27
2.3.2.	Fracionamento dos microssomos com DOC	29
2.3.3.	Fracionamento dos microssomos com Nagarse	30
2.3.4.	Fracionamento dos microssomos com Lipase	30
2.3.5.	Dosagem das atividades enzimáticas	31
2.3.6.	Espectros do citocromo P-450	34
2.3.7.	Cromatografia em camada fina dos produtos de reação	36
2.3.8.	Hidroxilação de anilina	38
2.3.9.	Preparação de lípides de microssomos	39
2.3.10.	Dosagem de proteína	40
3.	Resultados	41
3.1.	Espectros do DAB	41
3.2.	Características gerais do sistema de azo-redutase	44
3.2.1.	Requisitos para a clivagem redutiva do DAB	44
3.2.2.	Efeito de CO e etanol	45

Pág.

3.2.3. Efeito de pirofosfato 47

3.2.4. Efeito de NADH e NADPH, adicionados simultâneamente 48

3.2.5. Estequiometria da reação de redução do DAB 49

3.2.6. Determinação de constantes cinéticas da reação 50

3.2.7. Determinação da energia de ativação da reação 50

3.2.8. Efeito de KCN 54

3.2.9. Efeito de mersalil 55

3.2.10. Efeito de anilina 56

3.3. Indução da atividade azo-redutásica e caracterização dos produtos de reação 57

3.3.1. Efeito do tratamento com 3-MC 58

3.3.2. Efeito do tratamento com PB 59

3.3.3. Efeito do tratamento com DAB 60

3.3.4. Análise dos produtos de reação 62

3.3.5. Hidroxilação de anilina 63

3.4. Espectros absolutos do citocromo P-450 68

3.5. Fracionamento dos microssomos 76

3.5.1. Fracionamento com DOC 76

3.5.2. Fracionamento com Nagarse 78

3.5.3. Fracionamento com Lipase 79

4. Discussão 81

5. Resumo e perspectivas 99

6. Bibliografia 101

ABREVIATURAS

DAB - 4-dimetilamino-azobenzeno

NAD - nicotinamida adenina dinucleotídio

NADH ($NADH_2$) - forma reduzida de NAD

NADP - nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

NADPH ($NADPH_2$) - forma reduzida do NADP

G6PD - glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)

G6P - glicose-6-fosfato

PB - fenobarbital

3-MC - 3-metilcolantreno

EDTA - etileno diamino tetraacetato de sódio

TCA - ácido tricloroacético

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

DOC - desoxicolato de sódio

PPDA - N,N-dimetil-p-fenilenodiamina

PAF - p-aminofenol

1. INTRODUÇÃO

O citoplasma celular é uma estrutura morfológicamente organizada. Os seus diferentes componentes permitem à célula viver e funcionar como tal, e representam subunidades de um sistema altamente complexo porém organizado.

Entre êstes componentes, o sistema de citomembranas que delimita compartimentos celulares, penetrando profusamente no citoplasma, constitui uma das mais complexas estruturas do ponto de vista morfológico e fisiológico (DALLNER, 1963).

Foram os estudos de microscopia eletrônica que revelaram que tôdas as porções do citoplasma das células animais nucleadas contêm estruturas tubulares e vesiculares limitadas por uma membrana simples (PORTER & BLUM, 1953; BANG & BANG, 1957).

Além de membranas, o retículo endoplasmático contêm grânulos, ricos em RNA, que atualmente são conhecidos como ribossomos (PALADE & SIEKEVITZ, 1956).

Portanto, o retículo endoplasmático é constituído por túbulos e vesículas de paredes "lisas" ou "rugosas" dependendo da presença de ribossomos associados às membranas (PALADE, 1956).

Estudando o fracionamento celular por centrifugação diferencial, CLAUDE (1943) verificou a presença no sobrenadante pós-mitocondrial de pequenas partículas cujo tamanho estimou entre 60 e 200 μm às quais denominou microssomos.

Com o trabalho de HOGEBOOM, SCHNEIDER & PALADE (1948) foi estabelecido, definitivamente, um método para fracionar a célula usando centrifugação diferencial em meio isotônico de sacarose. A fração isolada, após a precipitação das mitocôndrias, contém o material solúvel do citoplasma e fragmentos do retículo endoplasmático, quando se trabalha com célula hepática. Estes fragmentos colhidos por ultracentrifugação, compostos de membranas lisas e rugosas, são denominados de microssomos (PALADE & SIEKEVITZ, 1956).

A existência de enzimas associadas aos microssomos de células de fígado foi evidenciada por HOGEBOOM & SCHNEIDER (1950) que demonstraram a presença das atividades de NADH e NADPH citocromo c redutase.

Desde o trabalho pioneiro de KEILIN & HARTREE (1940), vários autores (SLATER, 1949 e YOSHIKAWA,1951), além de observarem a presença, em vários tecidos, de um citocromo do tipo B verificaram que suas propriedades espectrais diferiam daquelas do citocromo b. Em 1952, STRITTMATTER & BALL descreveram a presença em microssomos, de uma hemoproteína com as características de um citocromo do tipo B e que foi

denominado citocromo b_5 (PAPPENHEIMER & WILLIAMS, 1954; CHANCE & WILLIAMS, 1954).

Os microssomos de fígado contêm outra hemoproteína que, quando reduzida, pode formar um complexo com CO (KLINGENBERG, 1958; GARFINKEL, 1958) que apresenta no espectro diferencial contra microssomos reduzidos e não tratados com CO um pico de absorção em 450 nm (OMURA & SATO,1962). Este citocromo é fácilmente diferençável do citocromo b_5 pois êste não se combina com CO (STRITTMATTER & VELICK, 1956). O citocromo que forma um complexo com CO e que apresenta um pico de absorção em 450 nm foi chamado de citocromo P-450 por OMURA & SATO (1964).

Evidências acumuladas nos últimos anos demonstraram que o transporte de elétrons nos microssomos envolve o citocromo b_5 e o citocromo P-450 (SATO, OMURA & NISHIBAYASHI, 1965).

O citocromo b_5 foi isolado e caracterizado em suas propriedades físicas e químicas por uma série de autores, a partir de microssomos de fígado de boi(STRITTMATTER & VELICK, 1956; STRITTMATTER & OZOLS, 1966), de coelho(KAJIHARA & HAGIHARA, 1967), de rato (SARGENT & VADLAMUDI, 1968), de porco (GARFINKEL, 1957 e 1957a; RAW, MOLINARI, AMARAL & MAHLER, 1958; POLTORATSKY-BOIS & CHAIX, 1964), de galinha, de macaco e de homem (NÓBREGA, ARAUJO, PASETTO & RAW, 1969), conhecendo-se numerosos dados acêrca de sua estrutura e reatividade.

Considerava-se que o citocromo b_5 fôsse uma proteína típica de microssomos. Entretanto, RAW & MAHLER (1959) demonstraram a sua existência em mitocôndrias, apesar dos trabalhos anteriores de STRITTMATTER & BALL (1954) e de CHANCE & WILLIAMS (1955) indicarem que êste citocromo não existia nas mitocôndrias. SOTTOCASA, KUILENSTIERNA, ERNSTER & BERGSTRAND (1967) confirmaram o trabalho de RAW & MAHLER(1959) verificando a existência de citocromo b_5 associado à membrana externa das mitocôndrias.

STRITTMATTER & VELICK (1956a) isolaram de microssomos de fígado a NADH-citocromo b_5 redutase(EC 1.6.2.2) cujas propriedades foram bem estudadas (STRITTMATTER, 1963).

STRITTMATTER & VELICK (1957) já haviam demonstrado que essa enzima é capaz de reduzir citocromo c desde que quantidades catalíticas de citocromo b_5 sejam adicionadas ao meio de reação. Êsse resultado sugere uma transferência direta de elétrons do citocromo b_5 reduzido ao citocromo c, o que foi demonstrado pela adição "in vitro" de citocromo c oxidado a uma solução de citocromo b_5, prèviamente reduzido(STRITTMATTER & VELICK, 1956). Portanto, é possível medir quantitativamente a atividade da NADH-citocromo b_5 redutase (EC 1.6.2.2) pelo seguimento da redução de citocromo c adicionado. Essa atividade é denominada NADH-citocromo c redutase(EC 1.6.2.1). MAHLER, RAW, MOLINARI & AMARAL (1958) demonstraram que esta atividade enzimática também existe nas mitocôndrias.

Apesar do amplo conhecimento existente a respeito do citocromo b_5 e da sua redutase específica, a função dêste citocromo que representa 30% das hemoproteínas presentes nos microssomos (MASON, NORTH & VANNESTE, 1965) permaneceu por muito tempo totalmente obscura. OSHINO, IMAI & SATO (1966) e HOLLOWAY E WAKIL (1970) apresentaram evidências de que a dessaturação de ácidos graxos é dependente de NADH e envolve o citocromo b_5 e sua redutase. Essas evidências constituem-se num caminho para a elucidação da função do citocromo b_5.

Mais recentemente HILDEBRANDT & ESTABROOK (1971) apresentaram evidências de que o citocromo b_5 participa das reações de oxidação de função mista em microssomos de fígado. A conclusão de que o citocromo b_5 participa destas reações é baseada na observação de que há uma re-oxidação parcial do citocromo b_5 na presença de excesso de NADH e substrato(etilmorfina e aminopirina), quando reações de oxidação de função mista são iniciadas pela adição de NADPH. As variações do estado estacionário dos níveis de citocromo b_5 reduzido, nas condições supra-citadas, são dependentes da formação de produto e do consumo de oxigênio.

MASON (1957) definiu as oxidases de função mista como sendo "enzimas com duas atividades catalíticas interdependentes: a redução de um átomo de uma molécula de oxigênio acoplada a uma oxigenação ou hidroxilação com o outro átomo."

O citocromo P-450 dos microssomos tem sido indicado como a oxidase terminal para certas reações de oxidação de função mista envolvidas no metabolismo de drogas, hidrocarbonetos carcinogênicos e hormônios esteróides(ESTABROOK, COOPER & ROSENTHAL, 1963; COOPER, LEVIN, NARASIMHULU,ROSENTHAL & ESTABROOK, 1965) e está bem estabelecido que a flavoproteína NADPH-citocromo c redutase (EC 1.6.2.3) é necessária para o transporte de equivalentes redutores do NADPH para o citocromo P-450 (ORRENIUS & ERNSTER, 1964).

A NADPH-citocromo c redutase foi isolada de microssomos de fígado e caracterizada por WILLIAMS & KAMIN (1962) e por PHILLIPS & LANGDON (1962);KURIYAMA,OMURA,SIEKEVITZ & PALADE (1969) demonstraram, usando técnicas imunológicas, a identidade entre a enzima isolada de ratos contrôle e a enzima induzida após tratamento de ratos com fenobarbital.

O tratamento de ratos com fenobarbital induz o aumento nos microssomos da NADPH-citocromo c redutase e do citocromo P-450 coincidindo com o aumento da atividade das oxidases de função mista (ERNSTER & ORRENIUS, 1965). Esta evidência foi considerada pelos autores como indicativa da participação das duas enzimas nas reações de oxidação de função mista.

O citocromo P-450 considerado como importante componente das oxidases de função mista é muito lábil a uma série de tratamentos durante os quais é convertido na sua forma chamada P-420 (espectralmente diferente), que mantém a capacidade de combinar-se com CO, dando um complexo cujo pico de absorção está em 420 nm (OMURA & SATO,1964 e 1964a; MASON, NORTH & VANNESTE, 1965 e ICHIKAWA & YAMANO, 1967) perdendo porém a atividade de hidroxilação (OMURA & SATO,1962; GILLETTE, 1966).

Por causa dessa labilidade, os esforços no sentido de isolar e purificar o citocromo P-450 na sua forma nativa foram mal sucedidos (OMURA & SATO, 1964a). LU, JUNK & COON (1969) obtiveram citocromo P-450 "solubilizado" a partir de microssomos de fígado de rato usando DOC em um meio contendo glicerol. Entretanto, as tentativas de purificá-lo foram infrutíferas.

Em bactérias como *Rhizobium japonicum* (APPLEBY, 1969 e 1969a) e *Pseudomonas putida* (DUS, KATAGIRI, YU, ERBES & GUNSALUS, 1970) o citocromo P-450 é uma hemoproteína solúvel, podendo ser fácilmente isolado e purificado. YU & GUNSALUS (1970) obtiveram a cristalização do citocromo P-450 de Pseudomonas.

A importância da solubilização do citocromo P-450 está no fato de que permitiria a recomposição dos sistemas de elétrons a êle ligados possibilitando o estudo de

seus mecanismos. LU, JUNK & COON (1969) relataram a resolução do sistema responsável pela ω-hidroxilação de ácidos graxos em microssomos, obtendo três componentes: citocromo P-450, NADPH-citocromo c redutase e um fator termo-estável, de natureza lipídica, que posteriormente foi identificado como sendo fosfatidil-colina (STROBEL, LU, HEIDEMA & COON, 1970).

A correlação do efeito indutivo de certas drogas, das quais as mais usadas são PB e 3-MC (CONNEY,1967), com os níveis de citocromo P-450, tem sido utilizada como argumento para implicar a participação dêsse citocromo e da NADPH-citocromo c redutase nas reações de oxidação de função mista (GILLETTE, 1966).

Em virtude das dificuldades encontradas para solubilizar o citocromo P-450, a espectrofotometria diferencial das suspensões de microssomos tem sido usada amplamente no estudo dêste citocromo (NISHIBAYASHI & SATO, 1967). O espectro absoluto do citocromo P-450 apresenta muito interêsse por causa da evidência de que existem duas formas dêsse citocromo o que depende do tipo de drogas usadas na sua indução. Êsse fato foi descrito pela primeira vez por HILDEBRANDT, REMMER & ESTABROOK (1968) que compararam suspensões de microssomos de coelhos tratados e não tratados com 3-MC por espectrotometria diferencial.

Os estudos de IMAI & SATO (1966) e SLADEK & MANNERING (1966) baseados na banda Soret dupla obtida com o complexo do citocromo P-450 com isocianeto de etila já haviam sugerido a existência de duas formas diferentes dêste citocromo.

SLADEK & MANNERING (1969) sugeriram que em vez de duas formas de citocromo P-450, existiriam duas espécies moleculares diferentes, conclusões estas baseadas na aparente seletividade da indução de uma das formas usando hidrocarbonetos policíclicos (ALVARES, SCHILLING, LEVIN & KUNTZMAN,1967 e HILDEBRANDT, REMMER & ESTABROOK, 1968)e na indução seletiva da atividade de oxidase de função mista (SLADEK & MANNERING, 1969 e CONNEY, 1967).

Os estudos de SCHENCKMAN (1970) e de JEFCOATE, GAYLOR & CALABRESE (1969) mostraram que as alterações espectrais obtidas por interação de substratos do tipo I (por exemplo, fenobarbital) ou do tipo II (por exemplo, anilina)com o citocromo P-450 refletem a existência de duas formas dêsse citocromo. O citocromo P-450 tipo II é induzido por 3-MC apresentando no espectro de ressonância eletrônica paramagnética um novo sinal. Este novo sinal é um sinal de alta energia(g=6,6) sugerindo a presença de uma hemoproteína com ferro de "spin"alto. MASON, NORTH & VANNESTE (1965) haviam demonstrado que o espectro de ressonância eletrônica paramagnética de microssomos de fígados de ratos tratados com PB ou de ratos contrôle exibia sempre três linhas anisotrópicas (g=2,41,

2,25 e 1,91) que são típicas para ferro (Fe^{+++}) com um elétron não compartilhado (ferro de "spin" baixo). Esses resultados confirmam definitivamente a existência de duas formas do citocromo P-450 provàvelmente depdendentes do tipo de interação entre o ferro e a apoproteína.

Uma grande variedade de azo-corantes são clivados redutivamente no organismo formando aminas primárias (GILLETE, 1966).

STEVENSON, DOBRINER & RHOADS (1942) mostraram que o DAB, administrado a ratos era metabolizado em grande parte pela redução da ligação azo, pois encontraram na urina dêsses animais os derivados acetilados do p-aminofenol e p-fenilenodiamina.

Foram entretanto, os trabalhos do casal MILLER, discutidos em uma ampla revisão (MILLER & MILLER, 1953) que apresentaram uma série de dados a respeito do metabolismo dêste carcinogênico.

MUELLER & MILLER (1950) demonstraram que o fígado contêm enzimas dependentes de NADPH que formam aminas primárias a partir de DAB e localizaram esta atividade na fração microssômica.

HERNANDEZ, GILLETTE & MAZEL (1967) mostraram que a atividade azo-redutásica, usando neoprontosil como substrato, podia ser solubilizada de microssomos pelo tratamento com lipase, identificando-a como a NADPH-citocromo c redutase. HERNANDEZ, MAZEL & GILLETTE (1967) verificaram entretanto, que embora a atividade da NADPH-citocromo c redutase não fôsse inibida por CO, a redução de neoprontosil era parcialmente inibida por CO. Além do mais o tratamento com 3-MC, embora não induzisse aumento da NADPH-citocromo c redutase, induzia um aumento do citocromo P-450 acompanhado de um aumento da azo-redutase. Baseados nestes dados, os autores propuseram que o neoprontosil seria reduzido por três vias:

(a) uma via dependente do citocromo P-450, sensível a CO, e destruída por solubilização com lipase;

(b) uma via dependente só de NADPH-citocromo c redutase, insensível a CO, e que não é destruída por solubilização com lipase;

(c) uma via indutível com 3-MC que é sensível à solubilização por lipase e insensível a CO.

CONNEY, MILLER & MILLER (1956) e von der DECKEN & HULTIN (1960) mostraram que o tratamento de ratos com 3-MC induz um aumento da atividade azo-redutásica usando DAB como substrato.

NÓBREGA (1965) e WADA, HIGASHI, ICHIKAWA, TADA & SAKAMOTO (1964) mostraram que a administração oral de DAB a ratos promove um aumento no citocromo b_5 em microssomos de fígado.

Êsses dois últimos trabalhos levantaram a interessante possibilidade da participação do citocromo b_5 na redução do DAB, embora alguns contrôles fundamentais não tivessem sido feitos na época como, por exemplo, a análise do estado de proliferação do retículo endoplasmático que poderia estar sendo induzido indiscriminadamente pela administração dessa substância, com o consequente aumento dos níveis gerais das enzimas a êle associados.

Em face da potencialidade do problema passamos a fazer um estudo sistemático da redução do DAB por microssomos. Ao contrário do que postulamos, foram obtidas evidências da participação do citocromo P-450 no processo de redução, embora não tivesse sido possível excluir a participação do citocromo b_5.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

NAD, NADH, NADP e NADPH, albumina do sôro bovino (fração V) citocromo c (tipo III - de coração equino), glicose-6-fosfato, mersalil e 3-metil-colantreno foram comprados de Sigma Chemical Co.

Fenobarbital foi ofertado por Rhodia Indústrias Químicas e Texteis S/A - Divisão Farmacêutica.

Lipase (EC 3.1.1.3 - de pâncreas bovino, bruta) foi adquirida de Sigma Chemical Co.

Glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) foi obtida de Calbiochem Co. DTT foi comprado do mesmo laboratório.

Nagarse (proteinase cristalina de *Bacillus subtilis*, EC 3.4.4.16) foi comprada de Nagarse Co.

Desoxicolato de sódio foi obtido de Difco Labs. Todos os outros reagentes usados possuiam grau analítico.

Todos os solventes usados foram redestilados em nosso laboratório: PPDA ressublimado em "dedo-frio", foi generosamente ofertado pelo Prof. Dr. G. CILENTO; PAF foi recristalizado a partir de uma solução aquosa obtendo-se cristais orto-rômbicos com p.f. 190°C (TOSCANO, V.G., 1971).

DAB foi comprado de Fischer Co. e recristalizado a partir de uma solução etanólica a quente (TOSCANO,1970). A solução saturada a quente foi filtrada sob vácuo e deixada cristalizar a 4°C. Os cristais foram recolhidos e lavados com etanol-água 1:1. O processo foi repetido por duas vêzes e ao final, determinou-se o ponto de fusão que foi de 117°C Lit. (B 16^2, 151).

2.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos da raça Wistar, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O pêso médio dos animais empregados foi de 200 g, a não ser nos casos especificados. Os ratos utilizados foram sempre machos.

Após serem recebidos do biotério, os ratos foram mantidos por duas semanas em uma dieta contendo 20% de caseina, antes de serem sacrificados.

2.2.1. Tratamento com Fenobarbital.

Os ratos receberam diàriamente uma dose de PB dissolvido em solução salina (80 mg/kg de pêso) por via intraperitonial. Os ratos contrôle receberam também por via intraperitonial, 0,5 ml de solução salina isotônica (CONNEY, 1967).

O tratamento prolongou-se por 8 dias sendo sacrificados nos dias 0, 2, 4, 6 e 8, lotes de 3 animais tratados

e de 3 animais contrôle. Os microssomos foram preparados como descrito em Métodos 2.3.1.

2.2.2. Tratamento com 3-Metilcolantreno.

Os animais foram tratados essencialmente como descrito por HERNANDEZ, MAZEL & GILLETTE (1967). Foram usados ratos machos, da raça Wistar pesando 100 g. 3-MC foi dissolvido em óleo de milho com ligeiro aquecimento para uma concentração de 7 mg/ml e foi administrado por via intraperitonial (35 mg/kg) cada 24 horas durante 4 dias. O grupo contrôle recebeu diàriamente 0,5 ml de óleo de milho, intraperitonial.

2.2.3. Tratamento com DAB.

Os animais receberam misturados à dieta DAB na proporção de 0,6% (p/p) (MILLER & MILLER, 1953) por 18 e 33 dias. Os animais contrôle receberam a mesma dieta sem DAB.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Preparação de Microssomos de Fígado.

Para a preparação de microssomos, os ratos foram deixados em jejum alimentar, fornecendo-se água à vontade durante 24 horas anteriores ao sacrifício. Êste foi feito por concussão cerebral, e os fígados perfundidos "in situ", pela veia porta, com 100 ml de uma solução gelada de cloreto de potássio 0,15 M. Os fígados foram em seguida removidos e colocados em um banho de gêlo, e picados com uma tesoura de pontas finas.

Em tôdas as preparações, as etapas subsequentes foram efetuadas em câmara fria, constantemente a $4^{o}C$. O método usado foi o descrito por MITOMA,POSNER, REITZ & UDENFRIEND (1956), com ligeiras modificações.

Os fígados foram homogeneizados com 3 volumes de sacarose 0,25 M (contendo 1 mM Tris-HCl pH 7,5) com o auxílio de um homogeneizador tipo Potter, equipado com um pistilo de teflon, adaptado a um motor elétrico de baixa rotação. Nunca foram feitos mais de 3 movimentos com o instrumento a fim de não danificar as estruturas que se pretendia isolar.

Esta suspensão foi a seguir centrifugada em uma centrífuga International, modêlo PR-2, a 900xg por 10 minutos para remover núcleos e restos celulares. Após a centrifugação o sobrenadante foi filtrado em gaze, dobrada 4 vêzes, e desprezou-se o precipitado. O sobrenadante obtido foi centrifugado em uma centrífuga Sorvall RC-2B a 12.000xg por 20 minutos e o sobrenadante coletado após filtração em gaze dobrada 4 vêzes. O precipitado foi novamente desprezado.

O pH do sobrenadante foi verificado e caso necessário ajustado a 7,5 pela adição cuidadosa de NaOH 2N. Em seguida foi centrifugado na centrífuga Spinco, modêlo L, rotor 50 Ti, a 105.000xg, por 60 minutos, ou no caso das preparações mais volumosas no rotor 30, a 78.000xg por 120 minutos.

O precipitado obtido foi suspenso em uma solução de cloreto de potássio 0,15 M contendo 1 mM EDTA pH 7,5,de modo que o volume final fôsse de 120 ml, capacidade máxima do rotor 50 Ti, e novamente centrifugado a 105.000xg por 60 minutos.

O precipitado obtido foi suspenso, manualmente, em um tampão fosfato de potássio 0,1 M contendo glicerol 30% (v/v), DTT 1 mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,6 (Meio I) (NISHIBAYASHI & SATO, 1968) ou em um tampão citrato de sódio 0,1 M contendo 0,1 M de cloreto de potássio, glicerol 30% (v/v)e DTT 1 mM (Meio II) como descrito por LU, JUNK, COON (1969).

Após a determinação da quantidade de proteína a suspensão de microssomos foi guardada a -20°C, dividida em alíquotas pequenas para serem descongeladas uma única vez no momento do uso.

2.3.2. Fracionamento dos Microssomos com DOC.

Microssomos foram fracionados com DOC usando essencialmente o método descrito por LU & COON (1968).

A uma suspensão de microssomos em Meio II (vide Métodos 2.3.1.) contendo aproximadamente 15 mg/ml de proteína foi adicionado DOC (solução recente a 10% (p/v))até uma concentração final de 0,66%. A suspensão foi agitada a 4°C por 20 minutos e depois centrifugada a 105.000xg por 2 horas.

Separado o sobrenadante, límpido, o precipitado foi suspenso em Meio II, manualmente, em um homogeneizador tipo Potter equipado com pistilo de teflon.

2.3.3. Fracionamento dos Microssomos com Nagarse.

O fracionamento dos microssomos usando Nagarse foi executado essencialmente de acôrdo com o que foi descrito por NISHIBAYASHI & SATO (1968).

A uma suspensão de microssomos em Meio II (5 a 10 mg/ml) foi adicionada Nagarse, dissolvida no mesmo tampão para uma concentração final de 1,5 mg de enzima por 10 mg de proteína. A mistura foi colocada em anaerobiose repetindo-se vários ciclos de evacuação e preenchimento com N_2 e incubada a 0^oC por 15 horas.

Após a incubação, a mistura foi centrifugada por 2 horas a 150.000xg sem ter sido diluída para reduzir a viscosidade (JEFCOATE & GAYLOR, 1969).

O sobrenadante, límpido, foi separado por cuidadosa aspiração e o precipitado foi ressuspenso em Meio II.

2.3.4. Fracionamento dos Microssomos com Lipase.

O fracionamento dos microssomos foi feito essencialmente de acôrdo com o método de NÓBREGA, ARAUJO, PASETTO & RAW (1969).

A uma suspensão de microssomos contendo entre 10,0 e 15,0 mg/ml de proteína, em Meio II, foi adicionada lipase (EC 3.1.1.3) bruta, de pâncreas bovino (Sigma lote nº 30C-2800), suspensa em Meio II para atingir concentrações finais de 0,7; 2,0; 5,0; 7,0 e 10,0 mg por 100 mg de proteína dos microssomos.

A mistura foi homogeneizada manualmente em um homogeneizador tipo Potter, com pistilo de teflon; colocada em anaerobiose por repetidos ciclos de evacuação e preenchimento com N_2, e foi incubada a 30°C por 1 hora com agitação ocasional.

Após o término da incubação foi imediatamente resfriada em gêlo fundente e centrifugada a 150.000xg por 60 minutos. O sobrenadante, límpido, obtido foi separado por aspiração cuidadosa e o precipitado ressuspenso em Meio II.

2.3.5. Dosagens das Atividades Enzimáticas.

2.3.5.1. Atividade Azo-Redutásica.

A atividade azo-redutásica foi medida pelo decréscimo da absorbância a 415 nm em um espectrofotômetro Cary modêlo 14. A não ser nos casos especificados, tôdas as reações foram feitas a 37°C em Meio I ou Meio II.

A mistura de reação continha num volume final de 3 ml de 1,65 μMoles de NADPH ou 1,5 μMoles de NADP mais um sistema gerador de NADPH e a não ser nos casos especificados 100 nMoles de DAB.

O sistema gerador de NADPH continha em 1 ml 15 μMoles de $MgCl_2$, G6P 30 μMoles e 2 U de G6PD (1 U reduz 1 μMol de NADP por minuto a 25°C em pH 7,4 (HERNANDEZ, GILLETTE & MAZEL, 1967)). Quando o sistema gerador foi usado o meio de reação foi pré-incubado a 37°C por 5 minutos. A reação foi iniciada pela adição do DAB. A atividade da azo-redutase que produzia a redução de 1 nMol de DAB por minuto, nas condições do ensaio, foi definida como 1 U.

2.3.5.2. NADH-Citocromo c Redutase (EC 1.6.2.1).

A atividade de NADH-citocromo c redutase foi determinada em um espectrofotômetro Cary modêlo 14 pelo incremento da absorbância a 550 nm a 25°C como descrito por STRITTMATTER (1967).

As cubetas de 1 cm de caminho ótico continham: 125 μMoles de NADH (a cubeta de referência sem NADH), 40 nMoles de citocromo c, enzima, 940 μMoles de tampão fosfato pH 7,5 contendo 0,94 μMoles de KCN em um volume final de 1 ml. A reação foi iniciada pela adição de NADH. 1 U de atividade foi definida como a redução de 1 μMol de citocromo c por minuto nas condições do ensaio.

Para o cálculo do citocromo c reduzido usou se um coeficiente de extinção milimolar (red-ox)= 20,5 $cm^{-1}mM^{-1}$ (MARGOLIASH , FROHWIRT & WIERNER, 1959). As soluções dos nucleotídios piridínicos foram padronizadas espectrofotomètricamente a 340 nm, usando o coeficiente de extinção de 6,2 $cm^{-1}.mM^{-1}$ (BERGMEYER, 1963).

2.3.5.3. NADPH-Citocromo c Redutase (EC 1.6.2.3).

A atividade de NADPH-citocromo c redutase foi determinada em um espctrofotômetro Cary modêlo 14 pelo incremento da absorbância a 550 nm a 25°C como descrito por WILLIAMS & KAMIN (1962). As cubetas de 1 cm de caminho ótico continham 100 nMoles de NADPH(a cubeta de referência sem NADPH), 40 nMoles de citocromo c, enzima, 940 µMoles de tampão fosfato pH 7,5 contendo 0,94 µMoles de KCN, em um volume final de 1 ml. A reação foi iniciada pela adição de NADPH.

A atividade da redutase que produzia a redução de 1 µMol de citocromo c por minuto foi definida como 1 U, nas condições de ensaio (OMURA, SIEKEVITZ & PALADE,1967).

2.3.5.4. Citocromo P-450.

O citocromo P-450 foi determinado pelo seu espectro diferencial com monóxido de carbono após tratamento dos microssomos com ditionito de sódio a temperatura ambiente, usando um coeficiente de extinção para o incremento de absorbância entre 490 nm e 450 nm de 91 cm^{-1} mM^{-1} (OMURA & SATO, 1964). Pequenas quantidades de hemoglobina, presentes na preparação dos microssomos, não afetam apreciàvelmente esta determinação (NISHIBAYASHI & SATO, 1967).

A quantidade de hemoglobina contaminante presente nos microssomos foi determinada como descrito por NISHIBAYASHI & SATO (1967), a partir do espectro diferencial após tratamento com CO de microssomos tratados com $Na_2S_2O_4$, medindo-se a altura do ombro formado a 420 nm, usando-se um $\Delta\varepsilon$ de 93 cm^{-1} mM^{-1}. As preparações efetuadas segundo Métodos 2.3.1. revelaram-se essencialmente livres de hemoglobina contaminante.

2.3.5.5. Citocromo b_5.

O citocromo b_5 dos microssomos foi determinado pelo espectro diferencial obtido após redução da amostra pela adição de 13,7 nMoles de NADH, em um espectrofotômetro Cary modêlo 14. A existência de redução completa foi confirmada tratando-se a amostra em seguida com $Na_2S_2O_4$ e medindo-se o incremento de absorbância em 424 nm.

A quantidade de citocromo b_5 presente foi calculada usando-se um ε = 181 cm^{-1} mM^{-1} para o pico em 424 nm (NÓBREGA, ARAUJO, PASETTO & RAW, 1969).

2.3.6. Espectros do Citocromo P-450.

Os espectros do citocromo P-450 foram obtidos usando-se as partículas resultantes do tratamento dos microssomos com Nagarse (Métodos 2.3.3.). O citocromo b_5 que interferiria na determinação do citocromo P-450 e a NADPH-citocromo c redutase (EC 1.6.2.3) são totalmente removidos pelo tratamento

(NISHIBAYASHI & SATO, 1968). Estes espectros foram medidos em um espectrofotômetro Cary modêlo 14, especialmente calibrado, à temperatura ambiente (22°C), em partículas obtidas de microssomos de fígados de ratos normais e tratados com PB, 3-MC e DAB. Desde que as suspensões eram turvas foram usadas nas cubetas de referência suspensões descoradas de partículas que foram preparadas por uma modificação do método de HORIE, KINOSHITA & SIMAZONO (1966).

As suspensões de partículas resultantes do tratamento com Nagarse (5 a 10 mg/ml) foram adicionados perôxido de hidrogênio até uma concentração final de 0,44 M e azoteto de sódio até uma concentração final de 10 mM para evitar a decomposição do perôxido de hidrogênio. As suspensões foram mantidas à temperatura ambiente por 3 horas até ficarem totalmente descoradas. Estas suspensões foram diluídas com H_2O ao dôbro do volume inicial e centrifugadas por 45 minutos a 150.000xg.

Os precipitados foram ressuspensos em Meio II e não apresentaram picos de absorção na região entre 340 e 750 nm com exceção de um aumento gradual de absorção devido à turvação, próximo aos menores comprimentos de onda.

Estas suspensões assim obtidas foram cuidadosamente diluídas para apresentarem uma absorção de 0,140 a 700 nm tal que o espectro de absorção do complexo do citocromo P-450

com CO na região entre 620 e 650 nm não apresentasse absorção tornando-se horizontal (NISHIBAYASHI & SATO, 1968).

2.3.7. Cromatografia em Camada Fina dos Produtos de Reação Obtidos pela Incubação dos Microssomos com DAB e Anilina.

O método utilizado para incubar suspensões de microssomos com DAB e anilina foi uma modificação do que foi descrito por PETERS & FOUTS (1970).

O meio de incubação continha microssomos suspensos em Meio II (10 mg de proteína), $MgCl_2$ 15 µMoles, G6P 30 µMoles, NADP 1,5 µMoles, 2 U de G6PD, 0,5 µMoles de DAB ou 2,5 µMoles de anilina e tampão de tris-HCl 50 mM pH 7,5 q.s.p. 5 ml.

Este meio de reação foi incubado em um agitador de Dubnoff por 15 minutos a 37°C com oxigênio do ar como fase gasosa ou com CO após ter sido saturado com CO por 5 minutos. A velocidade de agitação foi de 100 r.p.m. e um caco de porcelana foi colocado em cada frasco para assegurar agitação eficiente.

Em todos os experimentos foram utilizados 2 tipos de contrôles simultâneamente. O contrôle nº 1 não continha o sistema gerador de NADPH. O contrôle nº 2 não continha substratos; após a paralização da reação foi adicionada uma mistura de padrões contendo 10 nMoles de DAB, 25 nMoles de PPDA,

25 nMoles de PAF e 50 nMoles de anilina.

Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 0,6 ml de TCA 50% (p/v). O material foi centrifugado a 1.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi separado por decantação e o precipitado foi desprezado.

O pH do sobrenadante foi acertado a 7,5-8,0 com a adição de NaOH 2 N e logo em seguida extraído por 3 vêzes com 2 ml de clorofórmio-metanol 99:1. Após cada extração, o material foi centrifugado a 1.000xg por 5 minutos e a fase orgânica separada por aspiração.

Os extratos foram reunidos e evaporados até a secagem sob um fino jato de N_2. O resíduo então foi suspenso em 50 µl de etanol e utilizado para a cromatografia em camada fina.

Em placas de vidro de 20x20 cm, recobertas com uma camada de 0,25 mm de espessura de Silica Gel G, foram aplicados 2 µl de soluções alcoólicas de padrões contendo 50 nMoles de PPDA, PAF ou anilina e 10 nMoles de DAB. Dos resíduos suspensos em etanol foram aplicados 10 µl.

A cromatografia ascendente foi desenvolvida usando-se butanol-ácido acético-H_2O 8:2:10, sistema de solventes descrito por RANDERATH (1966). O tempo de desenvolvimento foi de aproximadamente 90 minutos. Após a cromatografia, as

placas foram sêcas à temperatura ambiente e depois a 60°C por 15 minutos e foram reveladas usando o método descrito por RANDERATH (1966): as placas foram inicialmente aspergidas com uma solução recém-preparada de $NaNO_2$ a 5% (p/v) em HCl 0,2 N, e sêcas à temperatura ambiente por 10 minutos. Foram então aspergidas com uma solução de α naftol a 5% (p/v) em metanol e aquecidas por 10 minutos a 100°C. Depois dêste tratamento as manchas se revelaram coradas: DAB apresentou-se como uma mancha amarela, PAF purpúrea, PPDA azul e anilina, rósea.

2.3.8. Hidroxilação de Anilina.

A reação de hidroxilação enzimática do anel aromático da anilina foi executada essencialmente de acôrdo com o que foi descrito por GRAM, ROGERS & FOUTS (1967).

Uma suspensão de microssomos obtidos a partir de fígados de ratos normais ou tratados com PB, 3-MC e DAB (contendo 5 mg de proteína) foi incubada em um meio contendo $MgCl_2$ 15 μMoles, G6P 30 μMoles, NADP 1,5 μMoles, 2 U de G6PD, anilina 10 μMoles e tampão de tris-HCl 0,1 M pH 7,4 q.s.p. 2,5 ml.O sistema foi incubado em um agitador de Dubnoff por 30 minutos a 37°C com oxigênio do ar como fase gasosa. A velocidade de agitação foi de 100 r.p.m. Em todos os experimentos foram incluídos 2 contrôles: um não contendo substrato e outro ao qual após a paralisação da reação foram adicionados 250 nMoles de PAF. Após o término da incubação, a reação foi paralisada em gêlo fundente.

A dosagem de PAF formado foi feita segundo método descrito por KATO & GILLETTE (1965) modificado por GRAM, ROGERS & FOUTS (1967).

O meio de incubação foi saturado com NaCl, até a formação de um corpo de fundo e extraído 3 vêzes com 3 ml de éter livre de peróxido. Após cada extração, a mistura foi centrifugada a 1.000xg por 10 minutos para promover a separação de fases. A fase etérea foi coletada por aspiração. Os extratos etéreos foram reunidos e agitados com 3 ml de tampão KH_2PO_4 - K_2HPO_4 0,5 M pH 12,5 contendo 1% de fenol destilado. Após repousar para separação das fases, a fase etérea foi aspirada e desprezada. A fase aquosa foi mantida por 30 minutos à temperatura ambiente e a absorbância determinada a 620 nm. Os resultados expressos em nMoles de PAF formado foram determinados por meio de uma curva padrão construída pela adição de uma solução padrão de PAF a 3 ml de tampão fosfato 0,5 M pH 12,5 contendo 1% de fenol e que foi uma reta até 1.000 nMoles de PAF.

2.3.9. Preparação de Lípides de Microssomos.

Lípides totais de microssomos foram preparados de acôrdo com o que foi descrito por VANCE & SWEELEY (1967). Uma suspensão de microssomos (200 mg de proteína) foi centrifugada a 105.000xg por 60 minutos. O precipitado foi suspenso em 60 ml de clorofórmio-metanol 2:1, a mistura foi agitada por 15 minu-

tos à temperatura ambiente, filtrada em papel Whatman nº 1 e o resíduo foi lavado com 6 ml de clorofórmio-metanol 2:1. Ao filtrado foram adicionados 15 ml de água. Uma vez agitada, a mistura foi deixada por 15 horas a 4°C para a separação de fases.

A fase clorofórmica foi coletada por aspiração e evaporada sob vácuo até a secagem. Os lípides obtidos foram ressuspensos em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 contendo 30% (v/v) de glicerol,

2.3.10. Dosagem de Proteína.

As dosagens de proteína foram feitas pelo método de LOWRY, ROSEBROUGH, FARR & RANDALL (1951) usando albumina do sôro bovino como padrão.

3. RESULTADOS

3.1. Espectros do DAB.

A Figura 1 mostra os espectros do DAB em vários meios. Na Tabela I se encontram os valôres dos coeficientes de extinção e os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorção.

As polaridades dos solventes variaram desde a do éter de petróleo até a do tampão fosfato 0,1 M.Observou-se que em Meio II contendo microssomos quer com 1 mg/ml de proteína quer com 2 mg/ml o coeficiente de extinção foi o mesmo. Êsse foi usado para o cálculo das unidades da azo-redutase ao longo dêste trabalho.

Comparando-se os coeficientes de extinção do DAB em tampão fosfato (com ou sem glicerol) e em suspensão de microssomos, observa-se uma diferença que reflete a adsorção do DAB às membranas lipo-proteicas do retículo endoplasmático.

Quando se precipita, por centrifugação, uma suspensão de microssomos contendo 2 mg/ml de proteína à qual foi adicionado DAB até uma concentração final de 50 μM, o sobrenadante é incolor, permanecendo todo o corante adsorvido ao precipitado, confirmando os dados de WU & SMUCKLER (1969).

Evidentemente, aumentando-se a concentração de DAB pode-se saturar os microssomos com o corante, permanecendo DAB no sobrenadante.

Nestas condições o coeficiente de extinção tende a diminuir dependendo da quantidade de DAB não adsorvido aos microssomos.

Neste trabalho a concentração do DAB foi mantida sempre dentro de limites em que não ocorria a saturação dos microssomos. As suspensões de microssomos, nas determinações da atividade azo-redutásica, sempre contiveram 1,0-2,0 mg/ml de proteína.

TABELA I

Coeficientes de Extinção e Picos de Absorção do DAB em Vários Meios

MEIO	λ MÁXIMO nm	ε cm^{-1} mM^{-1}
Etanol Anidro Bidestilado	406	30,0
Éter de Petróleo Destilado p.e. 40-60°C	396	34,4
Tampão Fosfato de Potássio 0,1 M pH 7,4	450	12,0
Tampão Fosfato de Potássio 0,1 M pH 7,4 contendo glicerol 25% (v/v)	450	12,0
Suspensão de microssomos em Meio II - Proteína 1 mg/ml	415	18,0
Suspensão de microssomos em Meio II - Proteína 2 mg/ml	415	18,0

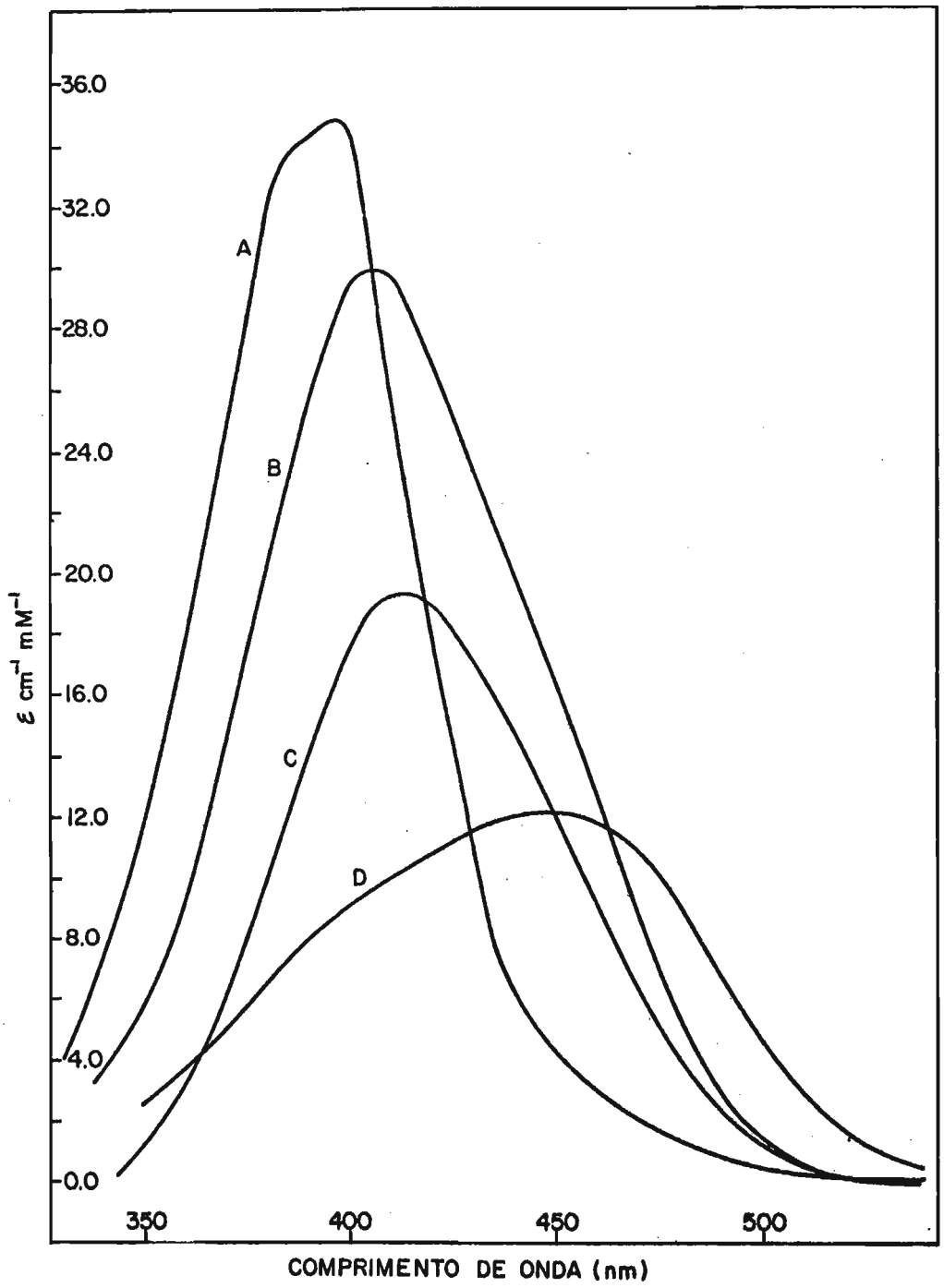

Fig. 1 - Espectros do DAB em vários meios. 25 nMoles de DAB em um volume final de 1 ml de cada meio. Temperatura ambiente (20°C). (a) éter de petróleo; (b) etanol; (c) suspensão de microssomos em Meio II - 1,0 e 2,0 mg/ml de proteína (concentração final); (d) tampão fosfato 0,1 M - pH 7,4 com e sem glicerol (25% - v/v).

3.2. Características Gerais do Sistema de Azo-Redutase.

3.2.1. Requisitos para a Clivagem Redutiva do DAB.

A clivagem redutiva do DAB leva à formação de anilina e N,N-dimetil-p-fenilenodiamina (MILLER & MILLER,

TABELA II

Requisitos da Azo-Redutase em Microssomos

ADIÇÕES AO SISTEMA MÍNIMO	AZO-REDUTASE (U/mg)
Nada	0,0
NADH	0,08
NADH + sobrenadante 0,22 mg	0,11
NADH + sobrenadante 0,56 mg	0,17
NADH + CO (40 seg.)	0,07
NADH + sobrenadante 0,56 mg (congelado e descongelado)	0,04
NADH + citocromo b_5 9,2 nMoles	0,09
NADPH	3,17
NADPH + CO (40 seg.)	4,70
NADPH + sobrenadante 0,56 mg	3,20
NADPH + citocromo b_5 9,2 nMoles	3,41

O sistema mínimo contém suspensão de microssomos (1 mg/ml de proteína) em Meio I. A atividade azo-redutásica foi dosada como em Métodos (2.3.5.). O sobrenadante é aquele obtido após a precipitação dos microssomos a 105.000xg contendo a fração solúvel do citoplasma. A concentração dos nucleotídios piridínicos foi de : NADH 625 µM e NADPH 550 µM.
O citocromo b_5 usado foi preparado a partir de fígado de rato usando-se o método descrito por NÓBREGA,ARAUJO,PASETTO & RAW (1969).

1953) que não apresentam espectro na região visível entre 340 nm e 700 nm. Assim esta reação pode ser acompanhada espetrofotomètricamente pelo decréscimo da absorbância do DAB. A Tabela II apresenta os resultados do uso de NADH e de NADPH como doadores de elétrons para a redução do DAB por microssomos.

Como se pode observar pela inspeção da Tabela II o sistema é totalmente dependente de NADPH como fonte de elétrons.

A adição do sobrenadante obtido durante a preparação dos microssomos, após a centrifugação a 105.000xg (Métodos 2.3.1.) e que contém a fração solúvel do citoplasma, não estimula a redução do DAB. O uso do citocromo b_5 externo aos microssomos tem o mesmo efeito. Monóxido de carbono não é inibidor para a reação dependente de NADPH.

3.2.2. Efeito de CO e Etanol sôbre a Azo-Redutase.

A Tabela III mostra os resultados do uso de NADPH ou de um sistema gerador de NADPH frente ao pré-tratamento de microssomos por monóxido de carbono em aero ou anaerobiose. Nos casos em que no sistema foram omitidos os microssomos, para se verificar a existência de redução não enzimática do DAB, o tempo de reação foi aumentado para 30 minutos. Investigou-se também o efeito da adição de etanol aos microssomos uma vez que êste foi o solvente usado no preparo de soluções de DAB e que pode ser oxidado por um sistema dependente de NADPH (RUBIN, GANG & LIEBER, 1971).

TABELA III

Efeito de Aerobiose, Anaerobiose, CO e Etanol sôbre a Atividade da Azo-Redutase

ENSAIO	AZO-REDUTASE (U/mg)			
	AEROBIOSE	+ CO	ANAEROBIOSE	+ CO
DAB	-	0,0	-	-
Microssomos + DAB	0,0	0,0	0,0	-
NADPH + DAB	0,0	0,0	0,0	-
Sistema gerador de NADPH + DAB	0,0	0,0	-	-
Microssomos + NADPH + DAB	4,4	4,6	4,3	4,65
Microssomos + sistema gerador de NADPH + DAB	4,6	4,8	4,25	-
Idem + 50 µl etanol	4,62	-	-	-
Idem + 200µl etanol	4,50	-	-	-
Idem + 500µl etanol	3,80	-	-	-

Os ensaios foram realizados em um volume final de 3 ml de Meio II a 37°C como descrito em Métodos. Suspensão de microssomos 2 mg/ml de proteína; DAB 33 µM; NADPH 550µM.
Sistema gerador de NADPH como descrito em Métodos (2.3.5.1.).
Os ensaios em anaerobiose foram realizados em uma cubeta de Thumberg com repetidos ciclos de evacuação e preenchimento com N_2. Nos ensaios em que se utilizou CO o meio de reação foi saturado com CO (por borbulhamento durante 1 minuto).

3.2.3. Efeito de Pirofosfato sôbre a Atividade Azo Redutásica.

O ensaio da atividade azo-redutásica em presença de pirofosfato de sódio nas concentrações de 10 e 20 mM final revelou uma atividade de 2,64 U/mg de proteína enquanto na ausência de pirofosfato o ensaio revelou uma atividade de 2,52 U/mg.

SASAME & GILLETTE (1970) referiram que a pirofosfatase presente nos microssomos, converte o NADP a produtos que inibem a atividade de NADPH-citocromo c redutase, inibindo consequentemente a atividade oxidásica de drogas pelos microssomos. Referem êstes autores que aproximadamente 50% da atividade pirofosfatásica de um homogenato de fígado de rato está contida na fração microssômica. Esta atividade pirofosfatásica pode ser inibida por pirofosfato (10 a 20 mM) resultando em máximo efeito estimulatório para a hidroxilação de drogas como anilina e hexobarbital.

A falta de estimulação da atividade azo-redutásica por pirofosfato indica que, em nosso sistema, os níveis de pirofosfatase são pouco importantes.

Provàvelmente isso possa ser explicado pelo trabalho de SASAME & GILLETTE (1970) que atribuem à atividade pirofosfatásica uma grande variabilidade, não só entre animais de uma mesma espécie como entre as várias espécies por êles estudadas.

Verificou-se também que a redução do citocromo b_5 dos microssomos por NADH foi inibida em 60% pela adição de pirofosfato 20 mM ao meio de reação. Isto confirma os resultados de STRITTMATTER & VELICK (1957) mostrando que a NADH-citocromo b_5 redutase purificada é inibida em 47% na presença de pirofosfato 10 mM e 67% em presença de 20 mM.

A redução do citocromo P-450 por NADPH em presença de pirofosfato 20 mM não foi afetada.

3.2.4. Efeito de NADH e NADPH, Adicionados Simultâneamente, sôbre a Atividade Azo-Redutásica.

Usando o ensaio para a atividade azo-redutásica como descrito em Métodos (2.3.5.) (experimentos em triplicata), com duas preparações diferentes obtivemos os seguintes resultados (expressos como média dos valores obtidos): atividade azo-redutásica em presença de sòmente sistema gerador de NADPH (NADP - 500 μM final) - 2,78 U/mg; e em presença de 125 μM final de NADH mais sistema gerador de NADPH - 2,95 U/mg.

COHEN & ESTABROOK(1971a) demonstraram o efeito sinérgico de NADH e NADPH na demetilação oxidativa de aminopirina. O uso simultâneo dos dois nucleotídios piridínicos apresentou uma estimulação desta reação de aproximadamente 100% (que não se devia à atividade de transdesidrogenase), em relação aos valores obtidos quando NADPH era usado

exclusivamente como doador de equivalentes redutores.

COHEN & ESTABROOK (1971b) verificaram o mesmo efeito sinérgico pela adição de NADH ao meio de reação usando um sistema gerador de NADPH.

Entretanto, OSHINO, IMAI & SATO (1966) usando concentrações iguais de NADH e NADPH, simultâneamente, não verificaram estimulação na reação de hidroxilação de anilina.

3.2.5. Estequiometria da Reação de Redução do DAB.

A estequiometria da reação de redução da ligação azo do DAB foi feita em anaerobiose para impedir o consu

TABELA IV

Estequiometria da Redução de DAB

EXPERIMENTO Nº	CONSUMO DE NADPH nMoles/ min	ATIVIDADE AZO-REDUTÁSICA U	nMoles NADPH/ nMoles DAB
1	8,5	2,5	3,4
2	12,5	3,75	3,35

A atividade azo-redutásica foi medida como descrito em Métodos (2.3.5.1.). O meio de reação continha: microssomos 2 mg/ml, NADPH 550 µM, DAB 33 µM. O consumo de NADPH foi medido pelo decréscimo da absorbância em 340 nm. (BERGMEYER, 1963). A reação foi iniciada pela adição do DAB. O meio de reação foi mantido em anaerobiose recobrindo-o com uma camada de aproximadamente 2 mm de espessura de Nujol. O consumo de NADPH pelos microssomos utilizando o oxigênio dissolvido no meio de reação foi acompanhdado até cessar completamente, indicando ter sido atingida a anaerobiose. O experimento foi então iniciado pela adição do DAB ao meio usando-se uma micro-seringa (Hamilton).

mo de NADPH pelos microssomos em presença de oxigênio.

A Tabela IV apresenta os resultados de dois experimentos com preparações diferentes. As determinações foram feitas em duplicata. Como se conclui pela observação da tabela há um consumo de 3 moles de NADPH por mol de DAB reduzido.

3.2.6. Determinação de Constantes Cinéticas da Reação.

A Figura 2 mostra a determinação do Km_{ap} do DAB usando-se o método gráfico de LINEWEAVER & BURK (1934). O Km_{ap} encontrado foi 19,4 μM e a $Vmax_{ap}$ nas condições do experimento foi de 6,25 U/mg de proteína.

3.2.7. Determinação da Energia de Ativação da Reação.

A Figura 3 apresenta os resultados da determinação da atividade azo-redutásica em várias temperaturas. O gráfico de Arrehnius mostra um evidente ponto de inflexão que corresponde à temperatura de 22,2°C como temperatura de transição.

As energias de ativação foram calculadas usando-se a equação de Arrehnius $E_a = -2{,}303\ R\ d\left(\frac{\log K}{T-1}\right)$ em que R é a constante dos gases perfeitos, K a velocidade de reação e T a temperatura.

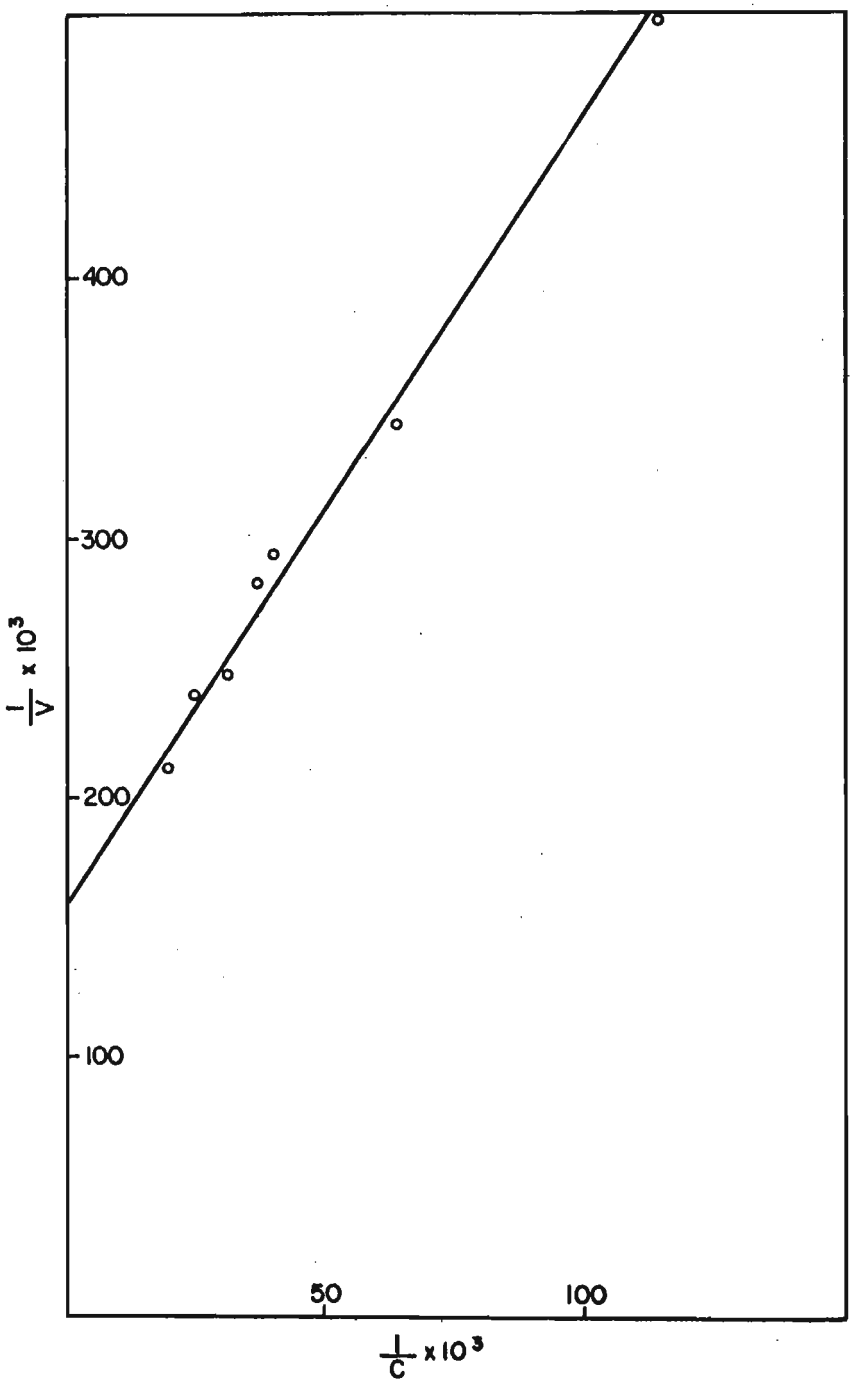

Fig. 2 - Determinação de Km_{ap} do DAB. O gráfico foi construído usando-se os recíprocos da atividade azoredutásica em ordenadas ($(U/mg)^{-1} x 10^3$), contra os recíprocos das concentrações de DAB em abcissas ($\mu M^{-1} x 10^3$).
Os meios de reação continham: microssomos(2 mg/ml) em Meio II, NADP 500 μM e sistema gerador de NADPH como descrito em Métodos. A reação foi iniciada pela adição do DAB. Temperatura 37°C.

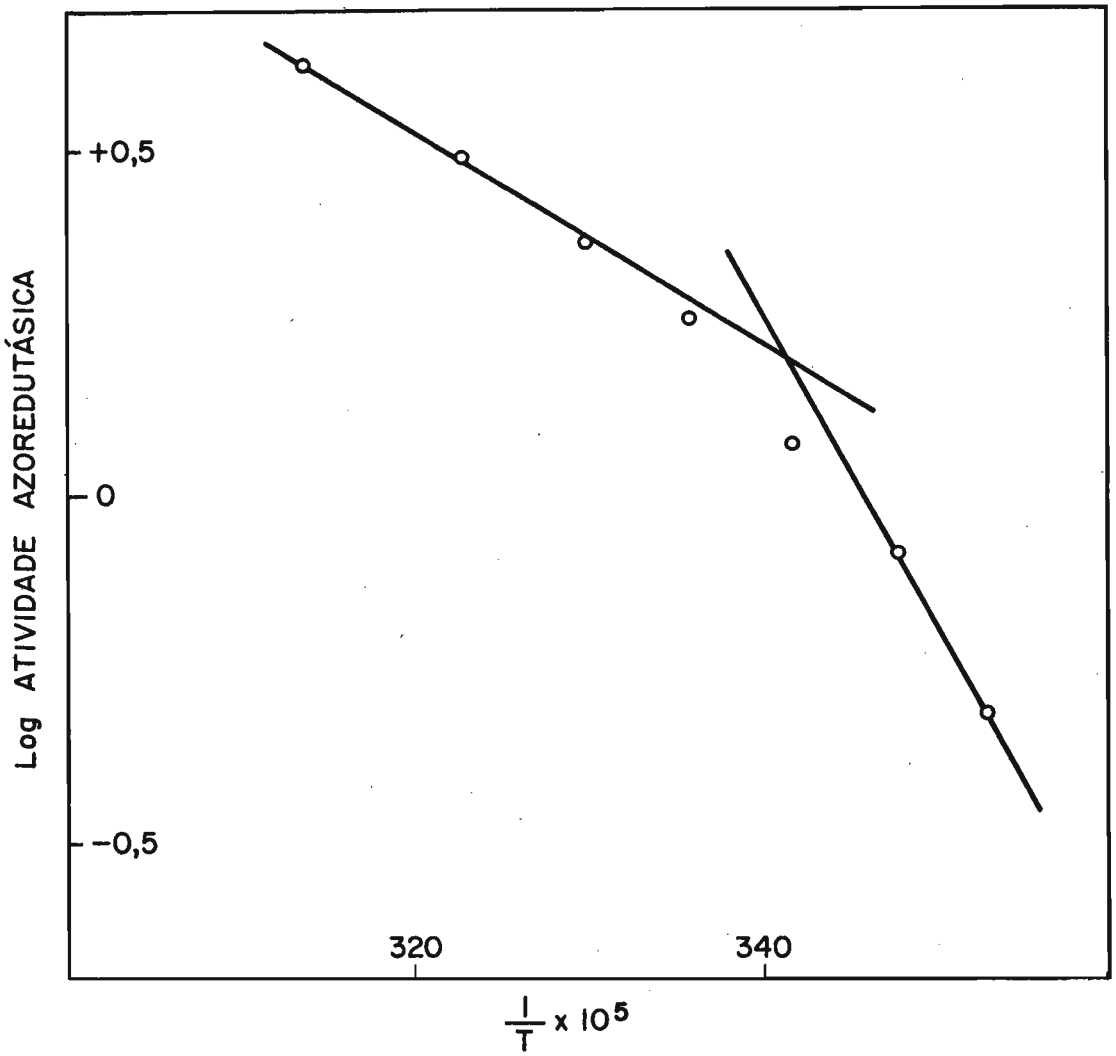

Fig. 3 - Determinação da atividade azo-redutásica em várias temperaturas. O gráfico foi construído usando-se o log da atividade azo-redutásica em ordenadas contra os recíprocos da temperatura ($T^{-1}x10^5$) em abcissas.
Os meios de reação continham: microssomos(2 mg/ml)em Meio II, NADP 500 μM, sistema gerador de NADPH como descrito em Métodos e DAB 33 μM. A reação foi iniciada pela adição do DAB. Temperaturas: 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C e 45°C.

Para temperaturas abaixo de 22°C o valor de E_a = 7.100 cal/mol e para temperaturas acima de 22°C o valor de E_a = 22.100 cal/mol.

3.2.8. Efeito de KCN.

A Tabela V apresenta os resultados obtidos nas determinações da atividade azo-redutásica quando foi adicionado KCN ao meio de reação. Como se evidencia pelo exame desta tabela com uma concentração de 1 mM de KCN obtem-se 50% de inibição da atividade azo-redutásica e com 3 mM de KCN, esta inibição é de 90%.

TABELA V

Inibição da Azo-Redutase por KCN

ADIÇÕES AO SISTEMA	AZO-REDUTASE (U/mg)
Nada	2,84
1 mM KCN	1,39
2 mM KCN	0,55
3 mM KCN	0,28

A atividade azo-redutásica foi medida como descrito em Métodos (2.3.5.1.). O sistema de reação continha microssomos(2 mg/ml), NADPH 550 μM e DAB 33 μM. A reação foi iniciada pela adição de DAB.

3.2.9. Efeito de Mersalil.

FRANKLIN & ESTABROOK (1971) verificaram que mersalil é inibidor da atividade de NADPH-citocromo c redutase, da atividade de NADPH-citocromo P-450 redutase e da demetilação de etilmorfina em microssomos de fígado de rato. 50% da inibição das três atividades citadas foi obtida quando o meio de incubação continha mersalil em concentrações de aproximadamente 25 nMoles/mg de proteína.

O Ki do mersalil indenpendia das condições de reação, ou seja, se a atividade da reação de hidroxi

TABELA VI

Inibição da Azo-Redutase por Mersalil

MERSALIL ADICIONADO nMoles/mg DE PROTEÍNA	AZO-REDUTASE U/mg
0	2,2
5	1,9
10	1,6
25	1,3
35	1,1
50	zero
70	zero

A atividade azo-redutásica foi medida em Meio I não contendo DTT. O meio de reação continha microssomos (2 mg/ml) em Meio I sem DTT, 500 μM NADP e um sistema gerador de NADPH. Os microssomos foram incubados por 1 minuto com mersalil nas concentrações indicadas antes da adição de NADP. A reação foi iniciada pela adição de DAB (33 μM).

lação tinha sido estimulada por NADH, ou por um aumento da fôr ça iônica do meio ou inibida por CO.

A Tabela VI apresenta os resultados da inibição da azo-redutase por mersalil.

Os dados apresentados mostram uma inibição de 50% da azo-redutase por mersalil em uma concentração de 35 nMoles/mg, próxima ao valor obtido por FRANKLIN & ESTABROOK (1971). Os dados da Tabela VI mostram,da mesma forma que para os autores citados, uma fase inicial resistente à ação de mersalil.

Também foi verificado que ao término da reação da azo-redutase em presença de mersalil (35 nMoles/mg) o citocromo P-450 se encontrava 50% reduzido e a atividade de NADPH-citocromo c redutase estava 50% inibida.

3.2.10. Efeito de Anilina.

A Tabela VII apresenta os resultados da determinação da azo-redutase em presença de anilina.

A anilina é hidroxilada a p-aminofenol por microssomos numa reação dependente de NADPH e oxigênio(OSHINO, IMAI & SATO, 1966). O citocromo P-450 é considerado como importante componente das oxidases de função mista envolvidas na hidroxilação de esteróides e xenobióticos (ESTABROOK, COOPER ROSENTHAL, 1963; COOPER, LEVIN, NARASIMHULU, ROSENTHAL & ESTABROOK, 1965).

TABELA VII

Azo-Redutase em Presença de Anilina

ANILINA ADICIONADA AO SISTEMA (μM)	AZO-REDUTASE (U/mg)
0,0	2,64
8,3	2,50
25,0	2,15
100,0	2,15

A atividade azo-redutásica foi medida como em Métodos(2.3.5.1.). O meio de reação continha: microssomos (2 mg/ml) em Meio II,NADPH 550 μM e DAB 33 μM. A reação foi iniciada pela adição de DAB.

Como se pode observar pela inspeção da Tabela VII o máximo de inibição obtido é de 18% com uma concentração de anilina de 25 μM. Este valor não se altera mesmo quando esta concentração é aumentada de quatro vêzes. Nas condições do ensaio, no qual a concentração de NADPH não é limitante para ambas as reações, os resultados não revelam um padrão de inibição competitiva.

3.3. Indução da Atividade Azo-Redutásica e Caracterização dos Produtos da Reação.

A indução das atividades enzimáticas dos sistemas responsáveis pela transformação de drogas, localizados nos microssomos tem sido obtida por diversos autores quando animais são tratados com várias drogas, inseticidas e carcinogênicos e

tem sido utilizada como uma arma para os estudos dos componentes dêste sistema (CONNEY, 1967).

Os estudos realizados por CONNEY, MILLER & MILLER (1956) e por von der DECKEN & HULTIN (1960) mostram que o tratamento dos ratos com 3-MC induz o aumento da atividade das enzimas de microssomos de fígado responsáveis pela redução da ligação azo de amino azo corantes.

3.3.1. Efeito do Tratamento com 3-MC.

A Tabela VIII mostra os resultados do tratamento de ratos com 3-MC como descrito em Material e Métodos. Foram utilizados lotes de quatro animais recebendo o grupo contrôle sòmente o diluente de 3-MC por via intraperitonial.

TABELA VIII

Efeito de Tratamento com 3-MC

	CONTRÔLES	RATOS TRATADOS COM 3-MC
Azo-redutase (U/mg)	2,30	4,85
Citocromo P-450 (nMoles/mg)	1,07	2,58
Citocromo b_5 (nMoles/mg)	0,60	0,72
NADPH-citocromo c redutase (U/mg)	0,106	0,071
NADH-citocromo c redutase (U/mg)	0,51	0,49

As atividades foram dosadas como em Métodos (2.3.5.). Os valores apresentados representam o valor médio de três experimentos. Os valores individuais não apresentaram uma variação maior que 15% do valor médio.

Como se pode verificar pela inspeção da Tabela VIII o aumento percentual da atividade azo-redutásica acompanha o aumento do citocromo P-450. Não houve indução das atividades de NADPH e NADH-citocromo c redutase concordando com os dados de von der DECKEN & HULTIN (1960).

3.3.2. Efeito do Tratamento com Fenobarbital.

A Tabela IX mostra os resultados obtidos pelo tratamento de ratos com PB como descrito em Material e Méto-

TABELA IX

Efeito do Tratamento com PB

DIAS DE TRATAMENTO		AZO-REDUTASE (U/mg)	NADPH-CIT. c RED. (U/mg)	NADH-CIT. c RED. (U/mg)	CIT. b_5 (nMoles/mg)	CIT. P-450 (nMoles/mg)
0		2,22	0,082	0,42	0,56	0,88
2	Contrôles	2,78	0,108	0,55	0,59	1,23
	Tratados	2,80	0,131	0,50	0,55	1,94
4	Contrôles	2,50	0,101	0,59	0,59	1,20
	Tratados	2,50	0,143	0,55	0,68	2,25
6	Contrôles	2,38	0,098	0,55	0,52	1,18
	Tratados	3,06	0,168	0,46	0,90	2,65
8	Contrôles	2,34	0,094	0,57	0,60	1,22
	Tratados	2,23	0,195	0,50	0,97	2,80

CIT. = citocromo; RED. = redutase

As atividades foram medidas como descrito em Métodos (2.3.5.).

dos. Como se pode observar pelo tratamento com PB há um aumento do citocromo P-450 e da atividade de NADPH-citocromo c redutase não acompanhado pelo aumento da atividade azo-redutásica.

O aumento observado nos níveis de citocromo b_5 parece corresponder à proliferação do retículo endoplasmático (KURIYAMA, OMURA, SIEKEVITZ & PALADE, 1969).

Contrôles feitos por microscopia eletrônica e a comparação do pêso médio dos fígados de ratos tratados (com 6 dias de tratamento; 7,9 g de fígado por 100 g de pêso corpóreo para o lote de ratos tratados contra 6,1 g de fígado por 100 g de pêso corpóreo para o lote dos ratos contrôle) corroboram os dados dos autores citados.

Estes mesmos autores verificaram por estudos da vida média dos componentes do retículo endoplasmático que o aumento de citocromo b_5 se deve à diminuição da velocidade de degradação dêste citocromo durante o tratamento com PB.

3.3.3. Efeito do Tratamento com DAB.

A Tabela X mostra os resultados dos tratamentos de dois lotes de ratos com DAB na dieta por 18 e 33 dias como descrito em Material e Métodos.

TABELA X

Efeito do Tratamento com DAB

	18 DIAS		33 DIAS	
	NORMAIS	TRATADOS	NORMAIS	TRATADOS
Azo-redutase (U/mg)	4,6	0,125	2,42	0,062
NADPH-citocromo c redutase (U/mg)	0,075	0,052	0,067	0,056
NADH-citocromo c redutase (U/mg)	0,48	0,49	0,56	0,55
Consumo de NADPH (nMoles/min/mg)	2,21	2,02	1,13	1,16
Citocromo P-450 (nMoles/mg)	1,11	1,08	0,94	1,22
Citocromo b_5 (nMoles/mg)	0,55	0,70	0,63	0,83

O consumo de NADPH pelos microssomos em presença de oxigênio do ar foi medido pelo decréscimo da absorbância a 340 nm (BERGMEYER, 1963). O meio de reação continha microssomos (2 mg/ml) em Meio II e NADPH 183 μM. Temperatura 37°C. As demais atividades foram dosadas como em Métodos (2.3.5.) O número de dias refere-se ao período de tratamento com DAB, misturado à dieta (0,6% p/p).

Os dados de WADA, HIGASHI, ICHIKAWA, TADA & SAKAMOTO (1964) e os de NÓBREGA (1965), indicam que há um aumento dos níveis de citocromo b_5 pelo tratamento oral com DAB. Os resultados apresentados confirmam êste dado. Com 18 dias de tratamento o nível do citocromo b_5 em ratos tratados é 1,25 vêzes maior que nos contrôles e com 33 dias 1,35 vêzes.

Entretanto, os contrôles feitos com microscopia eletrônica juntamente com o aumento do pêso médio dos fígados dos ratos tratados indicam que tal aumento se deve a uma proliferação do retículo endoplasmático. Com 33 dias de tratamento o pêso médio dos fígados dos ratos tratados foi de 10 g/100 g de pêso corpóreo contra 5,5 g/100 g para os contrôles.

Pelo tratamento oral com DAB há um nítido efeito de inibição da atividade azo-redutásica, entretanto, o consumo de NADPH pelo microssomos manteve-se inalterado. Os níveis das demais atividades não apresentaram variações de monta.

3.3.4. Análise dos Produtos de Reação.

A demonstração dos produtos reação de redução da ligação azo do DAB, empregando-se cromatografia em camada fina, foi executada com dois objetivos:

(a) a comprovação de que realmente o método empregado para a determinação da atividade azo-redutásica (decréscimo da absorbância a 415 nm) refletia a redução do DAB com a formação de aminas primárias ou seus derivados;

(b) a comprovação pelo uso de anilina, cuja hidroxilação foi amplamente demonstrada na literatura (PETERS & FOUTS, 1970; HOLTZMAN, GRAM,GIGON & GILLETTE, 1968; GILLETTE, 1966), que o sistema das oxidases de função mista dos microssomos era ativo nas preparações em que a azo-redutase era ativa.

As Figuras 4 e 5 mostram o resultado típico de cromatografias em presença de oxigênio do ar (Fig. 4) ou em presença de CO saturante (Fig. 5).

3.3.5. Hidroxilação de Anilina.

Também com o objetivo de verificar a atividade do sistema responsável pela hidroxilação de drogas em micros

TABELA XI

Hidroxilação de Anilina

EXPERIMENTOS Nº	CONTRÔLES	3-MC	DAB	PB
1	16,2	25,2	7,45	19,4
2	13,1	23,4	7,8	18,7
3	16,1	28,6	6,95	20,8
Citocromo P-450 nMoles/mg)	0,94	2,58	1,22	2,65

As atividades de hidroxilação de anilina por microssomos foram determinadas como descrito em Métodos. As atividades são expressas em nMoles de PAF formado/30 min/mg de proteína. O meio de reação continha microssomos (5 mg), NADP 500 μM e sistema gerador de NADPH como descrito em Métodos; anilina 10 μMoles e tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 q.s.p. 2,5 ml. A reação foi iniciada pela adição de anilina.

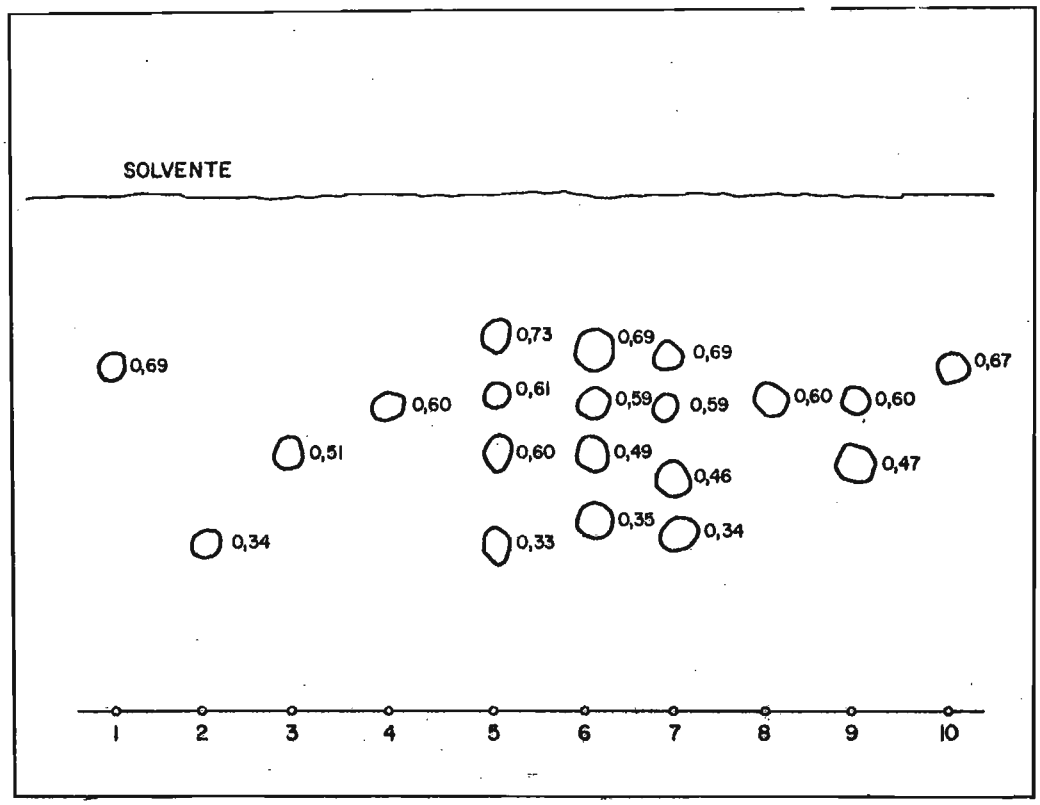

Fig. 4 - A incubação, extração e cromatografia dos produtos da redução do DAB e da hidroxilação de anilina foram feitas como descrito em Métodos. Os números ao lado direito de cada mancha indicam os valores dos Rfs. A fase gasosa foi oxigênio do ar.
(1) DAB 10 nMoles; (2) PPDA 25 nMoles; (3) PAF 25 nMoles; (4) Anilina 50 nMoles; (5) mistura de padrões: DAB 10 nMoles, PPDA 25 nMoles, PAF 25 nMoles e anilina 50 nMoles; (6) Contrôle II - ao meio de reação foi adicionada a mistura de padrões (como em 5) após a paralisação da reação - 10µl de resíduo da extração; (7) Amostra - microssomos incubados com DAB - 10 µl do resíduo da extração; (8) Contrôle I - microssomos incubados com anilina sem sistema gerador de NADPH - 10 µl do resíduo da extração; (9) Amostra - microssomos incubados com anilina - 10 µl do resíduo de extração; (10) Contrôle I - microssomos incubados com DAB sem sistema gerador de NADPH - 10 µl do resíduo da extração.

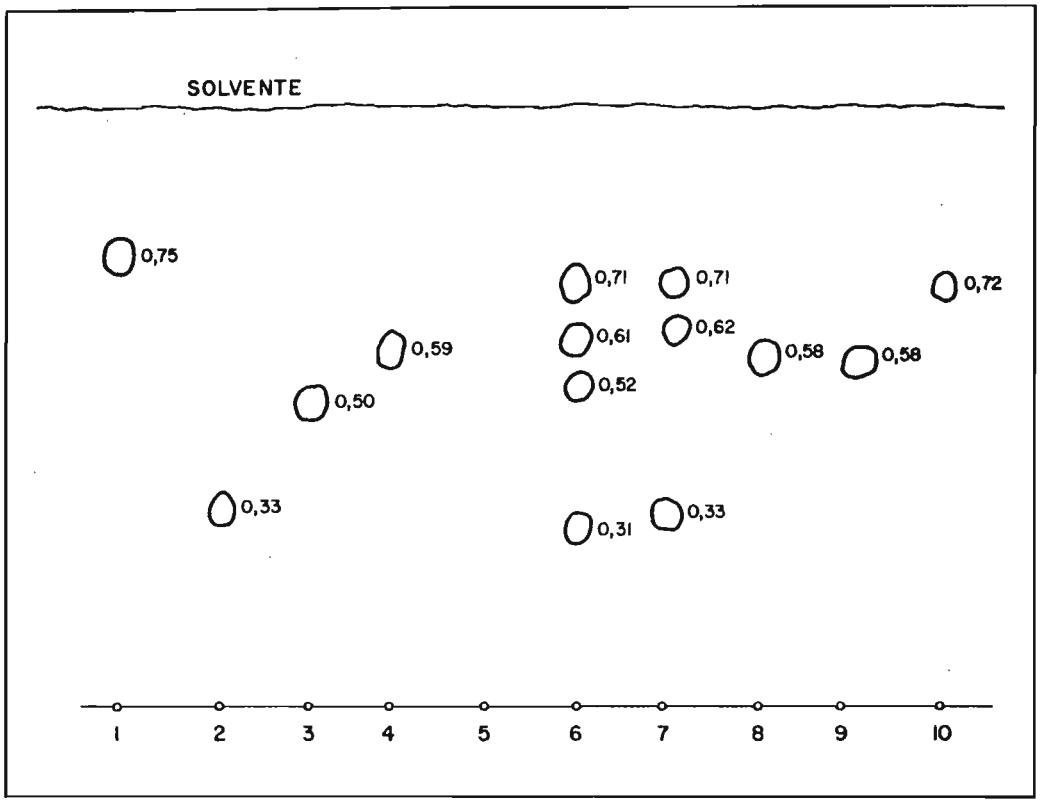

Fig. 5 - A incubação, extração e cromatografia dos produtos da redução do DAB e da hidroxilação de anilina foram feitas como descrito em Métodos. Os números ao lado direito de cada mancha indicam os valores dos Rfs. A fase gasosa foi CO com o meio de reação saturado com CO.
(1) DAB 10 nMoles; (2) PPDA 25 nMoles; (3) PAF 25 nMoles; (4) Anilina 50 nMoles; (5) Mistura de padrões: DAB 10 nMoles, PPDA 25 nMoles, PAF 25 nMoles e anilina 50 nMoles; (6) Contrôle II - ao meio de reação foi adicionada a mistura de padrões (como em 5) após a paralisação da reação - 10 µl de resíduo da extração; (7) Amostra - microssomos incubados com DAB - 10 µl do resíduo da extração; (8) Contrôle I - microssomos incubados com anilina sem sistema gerador de NADPH - 10 µl do resíduo da extração; (9) Amostra - microssomos incubados com anilina - 10 µl do resíduo de extração; (10) Contrôle I - microssomos incubados com DAB sem sistema gerador de NADPH - 10 µl do resíduo da extração.

somos, foram determinadas as atividades de hidroxilação de anilina em microssomos obtidos de fígados de ratos normais e tratados com PB (6 dias), 3-MC (4 dias) e DAB (18 dias). Os resultados são apresentados na Tabela XI.

A inspeção da Tabela XI mostra a existência de atividade de oxidase de função mista nos microssomos normais e tratados e que esta atividade é induzida pelo tratamento com 3-MC ou PB, sendo inibida pelo tratamento com DAB.

Apesar da indução existente com PB o efeito mais evidente é com 3-MC, o que seria de esperar uma vez que a anilina é um substrato do tipo II e o tratamento com 3-MC induz a síntese de citocromo P-450 tipo II (JEFCOATE & GAYLOR, 1969).

3.4. Espectros Absolutos do Citocromo P-450.

As Figuras 6, 7, 8 e 9 mostram os espectros absolutos do citocromo P-450 obtidos usando-se subpartículas de microssomos preparados pelo tratamento com Nagarse como descrito em Métodos (2.3.6.).

Os resultados obtidos confirmam os dados apresentados por NISHIBAYASHI & SATO (1968) para o espectro do citocromo P-450 obtido com subpartículas de microssomos tratados com Nagarse, preparados de fígados de ratos pré-tratados com PB.

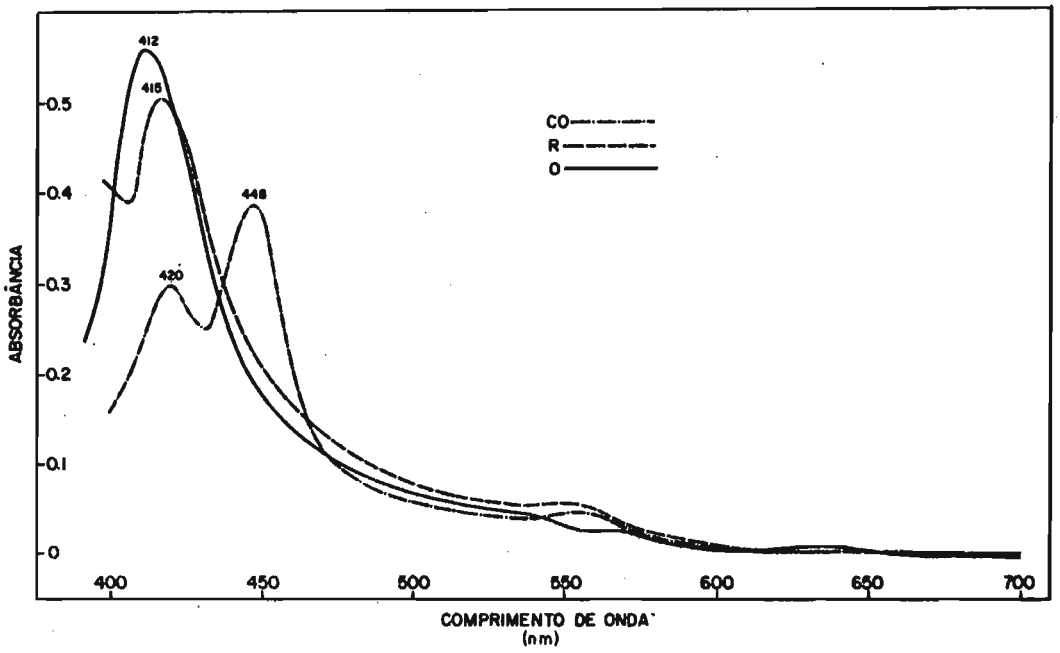

Fig. 6 - Espectro de citocromo P-450 obtido com subpartículas de microssomos obtidos de ratos normais como descrito em Métodos. Proteína 2 mg/ml (——) oxidado, (---) reduzido, (-·-·-) reduzido tratado com CO.

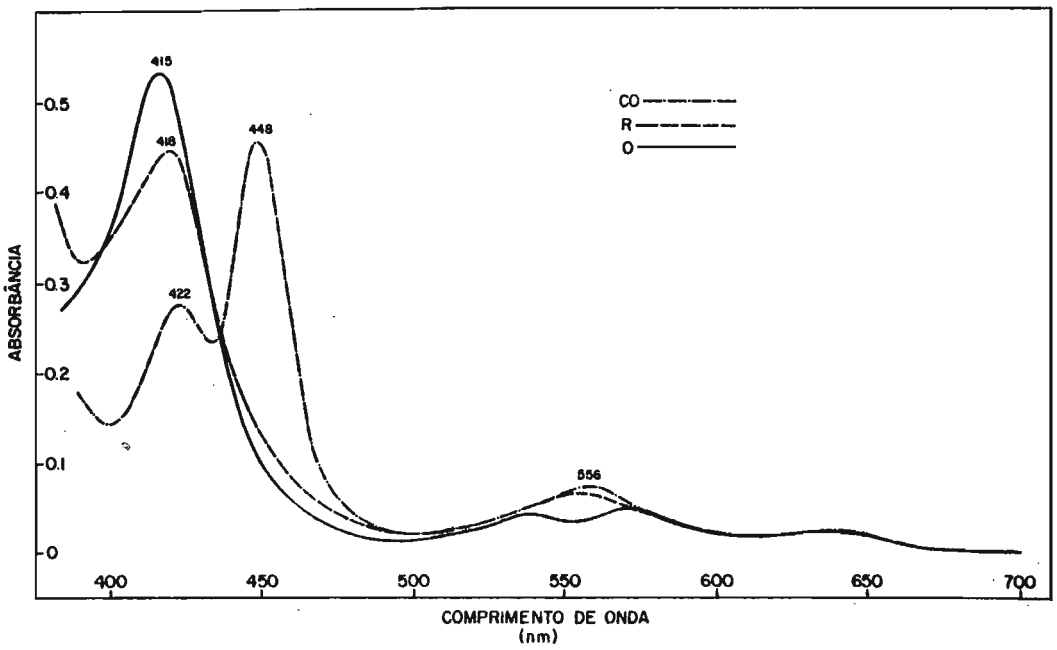

Fig. 7 - Espectro de citocromo P-450 obtido com partículas de microssomos obtidos de fígados de ratos pré-tratados com PB. Proteína 2 mg/ml (——) oxidado, (---) reduzido, (-·-·) reduzido tratado com CO.

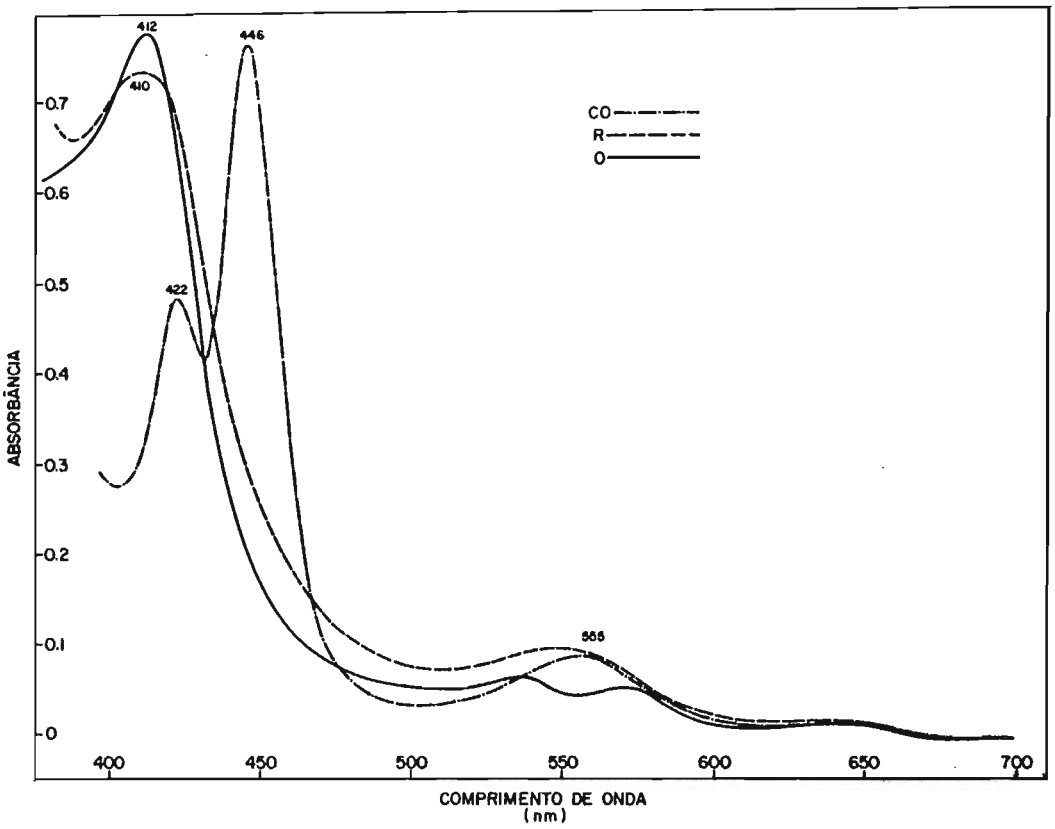

Fig. 8 - Espectro do citocromo P-450 obtido com partículas de microssomos obtidos de fígados de ratos pré-tratados com 3-MC. Proteína 2 mg/ml (——) oxidado, (---) reduzido, (-·-·-) reduzido tratado com CO.

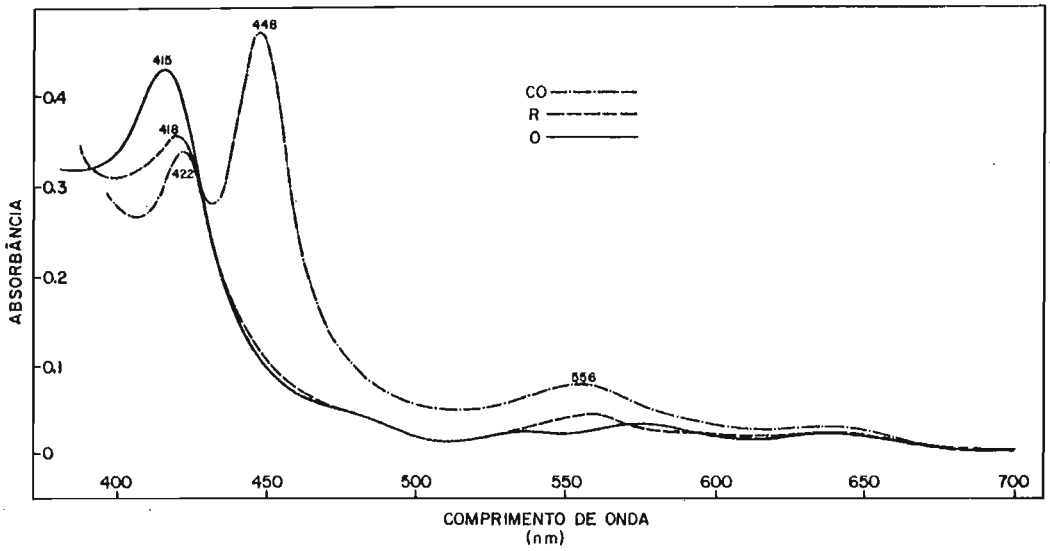

Fig. 9 - Espectro do citocromo P-450 obtido com partículas de microssomos obtidos de fígado de ratos pré-tratados com DAB. Proteína 2 mg/ml (____)oxidado,(- - -) reduzido, (-·-·-) reduzido tratado com CO.

Também são confirmados os resultados de JEFCOATE & GAYLOR (1969) para os espectros do citocromo P-450 obtidos com subpartículas de microssomos, quer tratados com Lubrol quer tratados com Nagarse, preparados de fígados de ratos pré-tratados com PB e com 3-MC.

É interessante observar que o espectro do citocromo P-450 obtido com subpartículas de microssomos de fígados de ratos pré-tratados com DAB apresenta as mesmas características daquele obtido a partir do pré-tratamento com PB.

Os espectros apresentados representam resultados típicos de experimentos executados em triplicata e confirmados em cada caso em duas preparações diferentes.

3.5. Fracionamento dos Microssomos.

Com o objetivo de obter uma fração de microssomos que contivesse a atividade azo-redutásica e que permitisse a separação de seus componentes e sua identificação, foi tentado o fracionamento dos microssomos.

Os resultados foram todos negativos demonstrando a grande labilidade do sistema da azo-redutase.

3.5.1. Fracionamento dos Microssomos com DOC.

A Tabela XII apresenta um resultado típico do tratamento de microssomos com DOC descrito em Métodos (2.3.2.). O experimento foi realizado por três vêzes com coincidência de resultados.

TABELA XII

Fracionamento dos Microssomos com DOC

	MICROSSOMOS	SOBR.	PPT.	SOBR. + PPT.
Azo-redutase U/mg	4,86	0,0	0,0	0,0
NADPH-citocromo c redutase (U/mg)	0,073	0,047	0,025	-
Citocromo P-450 nMoles/mg	1,04	0,29	0,62	-
Citocromo b_5 nMoles/mg	0,62	0,57	0,10	-

SOBR. = sobrenadante; PPT. = precipitado

O fracionamento dos microssomos e a medida das atividades enzimáticas foi feito como descrito em Métodos (2.3.2.e 2,3.5.).

LU, JUNK & COON (1969) referiram que o sobrenadante obtido após o tratamento dos microssomos com DOC continha de 30 a 50% da atividade de ω-hidroxilação de ácidos graxos originalmente presente nos microssomos. Este sobrenadante podia ser separado (por cromatografia em DEAE-celulose) em três componentes: NADPH-citocromo c redutase, citocromo P-450 e uma fração termoestável de natureza lipídica. Pela combinação destas 3 frações recompunha-se a atividade de hidroxilação de ácidos graxos que nenhuma das três frações isoladas apresentava.

Entretanto, aplicando o mesmo método de fracionamento, não se recupera a atividade azo-redutásica no sobrenadante dos microssomos tratados com DOC. A adição de lípides totais de microssomos preparados como em Métodos (2.3.9.) também não faz recuperar a atividade perdida pelo tratamento com DOC, quer no sobrenadante, quer no precipitado (resíduo de microssomos).

3.5.2. Fracionamento dos Microssomos com Nagarse.

Microssomos foram tratados com Nagarse de acôrdo com o que foi descrito em Métodos (2.3.3.).A Tabela XIII apresenta um resultado típico dêste experimento.

TABELA XIII

Fracionamento dos Microssomos com Nagarse

	MICROSSOMOS	MICROSSOMOS APÓS NAGARSE	SOBR.	PPT.
Azo-redutase (U/mg)	2,84	0,0	0,0	0,0
NADPH-citocromoc redutase (U/mg)	0,065	0,043	0,045	0,097
Citocromo P-450 (nMoles/mg)	1,03	0,55	0,0	0,42
Citocromo b_5 (nMoles/mg)	0,55	0,54	0,44	0,05

SOBR. = sobrenadante, PPT. = precipitado
O fracionamento com Nagarse e as medidas das atividades enzimáticas foram feitos como descrito em Métodos (2.3.3. e 2.3.5.).

3.5.3. Fracionamento dos Microssomos com Lipase.

Microssomos suspensos em Meio II foram tratados com lipase, bruta, como descrito em Métodos (2.3.4.).

A Tabela XIV apresenta os resultados dêste tratamento.

Os sobrenadantes obtidos após o tratamento com lipase, adicionados de lípides totais de microssomos (2 mg de proteína com 10 mg de lípides) também não recuperaram a atividade azo-redutásica.

Sobrenadante de microssomos (8 ml) tratados com lipase contendo 49 mg de proteína e NADPH-citocromo c redutase 0,118 U/mg foram liofilizados para reduzir o volume e dialisados para reduzir a concentração de glicerol contra Meio II sem glicerol. Foram obtidos 1,5 ml de solução contendo 38,0 mg de proteína e NADPH-citocromo c redutase 0,098 U/mg (3,7 U totais). Esta solução foi incubada com DAB 100 nMoles e sistema gerador de NADPH num volume final de 3 ml como descrito em Métodos (2.3.5.1.),e não apresentou atividade azo-redutásica num ensaio em que o tempo de incubação a 37°C foi de 30 minutos.

Êste experimento foi feito em duplicata com sobrenadante, após tratamento com lipase de microssomos de três preparações diferentes.

TABELA XIV

Fracionamento de Microssomos com Várias Concentrações de Lipase[a]

	PROTEÍNA (mg)	AZO-REDUTASE	NADPH-CIT.c REDUTASE	NADH-CIT.c REDUTASE	CITOCROMO b_5 nM TOTAIS	CITOCROMO P-450 nM TOTAIS
Microssomos	113,0	277,98	6,91	38,05	66,67	150,29
Sobr. 0,7 mg%	26,40	0,0	2,94	9,96	8,37	14,52
Ppt. 0,7 mg%	46,25	145,94	2,75	20,12	15,72	38,62
Sobr. 2,0 mg%	34,30	0,0	3,92	11,27	11,66	26,75
Ppt. 2,0 mg%	38,00	96,73	1,21	14,60	15,96	52,82
Sobr. 5,0 mg%	34,20	0,0	3,51	7,62	13,00	21,89
Ppt. 5,0 mg%	35,28	56,43	1,08	10,13	11,99	37,04
Sobr. 7,0 mg%	39,20	0,0	5,81	15,68	21,56	29,40
Ppt. 7,0 mg%	42,16	0,0	0,60	22,38	14,33	48,06
Sobr.10,0 mg%	44,10	0,0	5,28	12,97	28,22	29,33
Ppt. 10,0 mg%	34,65	0,0	0,46	16,17	7,97	7,69

Sobr. = sobrenadante; CIT. = citocromo; Ppt. = precipitado

(a) as atividades enzimáticas estão expressas em U totais.

O números ao lado dos nomes das frações indicam a concentração de lipase usada. O fracionamento e a dosagem das atividades enzimáticas foram feitas como descrito em Métodos(2.3.4.e 2.3.5.).

4. DISCUSSÃO

Uma grande variedade de azo-corantes é clivada redútivamente "in vivo" levando à formação de aminas primárias aromáticas. Alguns exemplos clássicos dêste tipo de via metabólica foram descobertos por TRÉFONÉL, TRÉFONÉL, NITTI & BOVET (1935) mostrando que prontosil é reduzido formando sulfanilamida, que azobenzeno (ELSON & WARREN, 1944) e DAB (STEVENSON, DOBRINER & RHOADS, 1942) são reduzidos dando origem a anilina e p-fenilenodiamina no primeiro caso e a anilina e N,N-dimetil-p-fenilenodiamina no segundo.

Seria, entretanto, incorrer em êrro supor que todos os azo-corantes sofrem redução no organismo. GILLETTE (1966) cita exemplos de azo-corantes que não são metabolizados através da redução da ligação azo, como a tartrazina, corante usado correntemente para colorir produtos alimentícios e que não sofre clivagem quando administrada a ratos por via intraperitonial. Após administração oral, entretanto, observa-se a excreção dos produtos da clivagem redutiva da ligação azo, mas foi sugerido que esta redução seria devida a ação de azo-redutases das bactérias presentes no trato digestivo (GILLETTE, 1966).

Usando homogenatos de fígado, foi demonstrada a existência de um sistema enzimático,dependente de NADPH, que reduz a ligação azo do DAB (MUELLER & MILLER, 1950), do prontosil e do azobenzeno (FOUTS, KAMM & BRODIE, 1957).

Embora, FOUTS, KAMM & BRODIE (1957) tenham indicado que êste sistema se localiza na fração solúvel do citoplasma, hoje está estabelecido que êle se localiza no retículo endoplasmático (GILLETTE, 1966).

FOUTS, KAMM & BRODIE (1957) verificaram a presença da atividade azo-redutásica em outros órgãos além do fígado como no rim e pulmão, mas em menores quantidades.

Em microssomos de fígado de rato, o sistema da azo-redutase é completamente dependente de NADPH (Tabela II), o que está de acôrdo com os dados de WU & SMUCKLER (1969)e os de HERNANDEZ, GILLETTE & MAZEL (1967).

A adição do sobrenadante obtido após a precipitação dos microssomos a 105.000xg não apresenta nenhum efeito estimulatório sôbre a atividade azo-redutásica como se verifica na Tabela II. Entretanto, HERNANDEZ, GILLETTE & MAZEL (1967) usando neoprontosil como substrato verificaram que a adição do sobrenadante fervido, dobrava a atividade azo-redutásica, e concluiram que no sobrenadante existe um fator não identificado necessário para se obter a atividade ótima. Porém êstes

mesmos autores verificaram que a adição de EDTA para uma concentração final de 10^{-3} M, apresentava o mesmo efeito, o que indica a presença de traços de metais pesados contaminando o meio de reação e inibindo a atividade azo-redutásica.

Por outro lado, a presença de um fator desconhecido no sobrenadante fervido, como foi indicado por HERNANDEZ, GILLETTE & MAZEL (1967), nos parece muito duvidosa, pois no processo de preparação dos microssomos, o tampão usado contém EDTA 10^{-3}M e, portanto, o sobrenadante obtido após a precipitação dos microssomos a 105.000xg também conterá EDTA. O efeito estimulatório obtido por êsses autores com sobrenadante fervido, leva à conclusão de que o fator descolhecido é o próprio EDTA, e que o efeito observado não reflete uma estimulação da atividade azo-redutásica e sim proteção contra uma inibição por metais.

A verificação de que a adição de citocromo b_5 ao meio de reação não estimula a azo-redutase (Tabela II), não significa necessàriamente que o citocromo b_5 não participe do sistema. O citocromo b_5 usado foi preparado a partir de fígados de rato usando o método descrito por NÓBREGA, ARAUJO, PASETTO & RAW (1969), em que o citocromo solubilizado representa a porção da molécula resistente ao tratamento com tripsina, denominada por STRITTMATTER & OZOLS (1966), de heme-peptídio central.

SATO, NISHIBAYASHI & ITO (1969) mostraram que, usando detergentes, o citocromo b_5 podia ser isolado sem quebra de ligações peptídicas, e que êste citocromo exibia propriedades físico-químicas bem diferentes das do heme-peptídio central.

O citocromo b_5 obtido por solubilização com detergentes é insolúvel em água, pelo fato de conter fosfolípides associados, e uma vez libertado dos lípides por tratamento com acetona tende a formar polímeros cujo pêso molecular foi estimado em tôrno de 120.000 (SATO, NISHIBAYASHI & ITO, 1969), enquanto o heme-peptídio central do citocromo b_5 tem um pêso molecular estimado em tôrno de 13.000 (NÓBREGA, ARAUJO, PASETTO & RAW, 1969).

Interessante é notar que o potencial de redox do citocromo b_5 obtido por solubilização com detergentes (forma monomérica, após remoção de fosfolípides, pêso molecular estimado 25.000) não difere pràticamente do valor encontrado para o citocromo b_5 solubilizado por tratamento dos microssomos com tripsina (SATO, NISHIBAYASHI & ITO, 1969).

VELICK & STRITTMATTER (1956) determinaram o potencial de redox do citocromo b_5 por vários métodos, encontrando um valor de + 0,02 volt a pH 7,0, o que é mais de 0,1 volt maior que o valor referido para êsse citocromo quando ligado aos microssomos (STRITTMATTER & BALL, 1952 e YOSHIKAWA, 1951).

VELICK & STRITTMATTER (1956) sugerem que esta diferença encontrada nos valores do potencial de redox do citocromo b_5 pode ser devida a uma interação dêsse citocromo com algum componente de microssomos.

Em vista dos dados apontados acima e considerando o trabalho em que HILDEBRANDT & ESTABROOK (1971) apresentam uma série de evidências da participação do citocromo b_5 juntamente com o citocromo P-450 em reações de hidroxilação de drogas, os nossos resultados (Tabela II), que não revelam uma estimulação da atividade azo-redutásica em presença de citocromo b_5, não afastam completamente a possibilidade de que êsse citocromo participe do sistema da azo-redutase.

A evidência definitiva da participação ou não do citocromo b_5 na atividade azo-redutásica só poderá ser obtida quando êsse sistema fôr resolvido nas suas espécies moleculares, o que permitirá a recomposição da atividade azo-redutásica.

A inibição de uma série de reações dependentes de NADPH por CO tem sido utilizada como indicação da participação do citocromo P-450 nestas reações.

Reações de hidroxilação como a hidroxilação de anilina e de hexobarbital são inibidas por CO (GILLETTE, 1966). ESTABROOK, COOPER & ROSENTHAL (1963) demonstraram, de maneira elegante, que a inibição da hidroxilação de esteróides

por CO pode ser revertida pela ação fotoquímica de luz monocromática de comprimento de onda de 450 nm.

GILLETTE & GRAM (1969) mostraram que a inibição da atividade azo-redutásica por CO é de apenas 35%, usando prontosil como substrato. HERNANDEZ, MAZEL & GILLETTE (1967) mostraram que apenas a atividade azo-redutásica, cujo aumento era induzido por pré-tratamento dos ratos com PB, era inibida por CO. Os mesmos autores mostraram que a azo-redutase,cujo aumento era induzido por 3-MC, não era inibida por CO.

A atividade azo-redutásica dos microssomos, usando DAB como substrato, mostrou-se completamente insensível à ação de CO, em condições de saturação do meio de reação por CO (Tabela III). Mesmo em anaerobiose, em que o efeito complexante do CO passa a não depender da relação CO/O_2(ESTABROOK, COOPER & ROSENTHAL, 1963 e OMURA, SATO, COOPER, ROSENTHAL & ESTABROOK, 1965), a atividade azo-redutásica mostrou-se completamente insensível à ação de CO. Entretanto, KIESE (1965) mostrou que CO não inibe a N-hidroxilação de anilina e GILLETTE (1966)refere que a sulfo-oxidação de diamino-difenil sulfeto não é inibida por CO.

A constatação de que a atividade azo-redutásica (usando DAB como substrato) não é inibida por CO não exclui necessariamente a participação do citocromo P-450 nesta reação.

Condiserando-se os dados obtidos por HERNANDEZ, GILLETTE & MAZEL (1967) (usando neoprontosil como substrato) e comparando-os com os dados obtidos quando usamos DAB, uma série de diferenças podem ser apontadas.

O DAB não é reduzido não enzimàticamente por NADPH e nem por NADH. Entretanto, quando se verificam os resultados dêsses autores, pode-se constatar uma redução não enzimàtica do neoprontosil por NADPH, que chega até a 20% da atividade azo-redutàsica total. Também deve-se notar que HERNANDEZ, MAZEL & GILLETTE (1967) relatam a redução de neoprontosil por NADH em presença de NADH-citocromo b_5 redutase, em presença ou ausência de citocromo b_5.

Ora, êsse efeito, quando considerado juntamente com a constatação de que a atividade azo-redutàsica descrita por êsses autores pode ser solubilizada de microssomos, pela incubação com lipase,e purificada, atividade essa que os autores identificaram como sendo a NADPH-citocromo c redutase, sugere que a redução de neoprontosil seja uma reação inespecífica, mormente quando se considera o valor de Km_{ap} de 4mM obtido por êstes autores. O Km_{ap} para a redução de DAB por microssomos foi de 19,4 μM (Fig. 2), que é cêrca de duzentas vêzes menor que o valor citado.

Por outro lado, a inexistência de efeito sôbre a azo-redutase da adição de pirofosfato ao meio de reação, não só sugere que a atividade pirofosfatàsica de nossas

preparações era baixa, bem como que a inibição observada na redução do citocromo b_5 dos microssomos em presença de pirofosfato corresponde ao dado de STRITTMATTER & VELICK (1957) que mostram que a NADH-citocromo b_5 redutase é inibida por pirofosfato.

Essa inibição sugere que a atividade azo-redutásica não seja dependente de NADH-citocromo b_5 redutase.

Considerando a inibição da azo-redutase por KCN (Tabela V), a possibilidade de que essa atividade nos microssomos possa depender exclusivamente de NADPH-citocromo c redutase como foi sugerido por HERNANDEZ, GILLETTE & MAZEL (1967) tem que ser posta em dúvida. Prova isso o experimento realizado com sobrenadante de microssomos tratados com lipase contendo 3,7 U de NADPH-citocromo c redutase(Resultados 3.5.3.), que mostra que a atividade azo-redutásica, usando DAB como substrato, não pode depender exclusivamente dessa enzima. Entretanto, HERNANDEZ, GILLETTE & MAZEL (1967) haviam indicado a NADPH-citocromo c redutase como uma das enzimas responsáveis pela atividade azo-redutásica. Só podemos atribuir as discrepâncias entre os resultados dêsses autores e os nossos aos diferentes substratos utilizados.

Como se pode verificar pela Tabela V há uma inibição da atividade azo-redutásica de 50% para 1 mM KCN e de 90% para 3 mM KCN.

PHILLIPS & LANGDON (1962) e WILLIAMS & KAMIN (1962) mostraram que a NADPH-citocromo c redutase não é inibida por KCN o que confirmamos em nossas preparações, não só dosando a atividade NADPH-citocromo c redutásica em presença de KCN (vide Métodos), bem como pela verificação de que não havia inibição dessa atividade no ensaio em que a atividade azo-redutásica estava inibida por KCN.

Portanto, o efeito da adição de KCN, bloqueando a atividade azo-redutásica, deve ser em algum ponto da via de transporte de elétrons posterior à NADPH-citocromo c redutase.

OSHINO, IMAI & SATO (1966), comparando a dessaturação de ácidos graxos com a hidroxilação de anilina, verificaram uma série de dados muito interessantes:

(a) a hidroxilação de anilina é dependente de NADPH e o citocromo P-450 certamente está envolvido nessa reação pois ela é inibida por CO e por isocianeto de etila. A hidroxilação de anilina não é inibida por KCN. Pelo uso de um anti-sôro preparado contra a NADPH-citocromo c redutase de microssomos de rato foi possível inibir a reação de hidroxilação de anilina nesses microssomos (OMURA, 1969), evidenciando a participação dessa enzima na reação.

(b) a dessaturação de estearil-CoA é dependente de NADH ou de NADPH indiferentemente; não é inibida por CO quer com NADH ou com NADPH como doadores de elétrons e o mesmo acontece com isocianeto de etila.

(c) comparando o efeito inibidor de menadiona sôbre a dessaturação dependente de NADPH com o efeito inibidor sôbre a hidroxilação de anilina, os autores concluem que a mesma flavoproteína específica para NADPH age em ambos os casos. Já na dessaturação dependente de NADH o efeito inibidor da menadiona é insignificante.

(d) ambas as reações de dessaturação, tanto a dependente de NADH como a de NADPH, são completamente inibidas por cianeto na concentração de 1 mM.

Em face dos fatos acima expostos OSHINO, IMAI & SATO (1966) concluiram que a dessaturação de ácidos graxos é um processo dependente de NADH ou NADPH, com consumo de oxigênio e que provàvelmente não depende de citocromo P-450, postulando a existência de um fator sensível a cianeto.

HOLLOWAY & WAKIL (1970) verificaram que a dessaturação de estearil-CoA, dependente de NADH, podia ser solubilizada pelo uso de DOC e demonstraram que essa via era composta pela NADH-citocromo b_5 redutase, pelo citocromo b_5 e pela enzima "dessaturase", que provàvelmente continha o fator sensível a cianeto de OSHINO, IMAI & SATO (1966).

Porém GAYLOR, MOIR, SEIFREID, JEFCOATE (1970) isolaram de microssomos de fígado de ratos uma proteína que chamaram de proteína de ligação com cianeto que pelas características espectrais assemelha-se ao citocromo P-450.

Foi possível a êstes autores separarem essa proteína dos citocromos b_5 e P-450 por tratamento com Nagarse e solubilização com DOC, a qual exibia uma constante de associação com cianeto de 0,5 mM.

Pelo ensaio das atividades de metil-esterol oxidase e de estearil-CoA dessaturase (ambas inibidas por cianeto) foi possível a êstes autores indicar uma correlação entre o fator sensível a cianeto e a proteína de ligação com cianeto.

Infelizmente, como referem os autores, esta proteína exibe uma extrema labilidade, tendo uma vida média(medida espectralmente) de cêrca de 3 horas.

Os fatos apontados acima apresentam uma série de semelhanças com os dados obtidos para a azo-redutase de microssomos de fígado.

A azo-redutase é inibida por cianeto em concentrações similares às reportadas para a dessaturação de estearil-CoA e não é inibida por monóxido de carbono, exibindo também uma extrema labilidade comprovada nos tratamentos com DOC, lipase ou Nagarse.

A estequiometria da reação de redução da ligação azo do DAB revelou uma relação de 3 para 1 entre o NADPH consumido e DAB reduzido (Tabela IV).

Teõricamente o esperado para reduzir a ligação azo seria uma relação de 2 para 1. Duas são as possibilidades para explicar êste resultado:

(a) apenas 2 NADPH seriam utilizados na reação de redução do DAB e o outro seria gasto em reações desconhecidas;

(b) apesar das medidas terem sido feitas em anaerobiose, as reações de hidroxilação da anilina formada e de demetilação do DAB podem ter ocorrido simultâneamente, levando a um aumento do NADPH consumido, o que é muito pouco provável porque em vista dessa possibilidade as condições de anaerobiose foram rigorosamente controladas.

Nossos resultados não permitem saber qual o destino do par de elétrons excedente. É interessante lembrar, entretanto, que COHEN & ESTABROOK (1971) estudando a demetilação de aminopirina encontraram uma estequiometria igualmente discrepante e comprovaram a participação do citocromo b_5 nas reações de oxidação de função mista como aceptor dos elétrons excedentes na estequiometria da reação(COHEN & ESTABROOK, 1971a e 1971b; HILDEBRANDT & ESTABROOK, 1971).

A análise do efeito da temperatura sôbre a reação da azo-redutase mostra que há uma temperatura de transição em tôrno de 22°C, havendo uma variação considerável na energia de ativação do sistema acima desta temperatura. Tratando-se de um sistema complexo como o que é estudado,não só do ponto de

vista estrutural como pela falta de conhecimento exato dos seus constituintes, fica realmente difícil interpretar possíveis alterações conformacionais face a um número desconhecido de variáveis existentes.

A inibição por mersalil da atividade azo-redutásica sugere a existência de grupos SH na reação. O valor obtido para 50% de inibição é próximo do valor obtido por FRANKLIN & ESTABROOK (1971) para a reação de demetilação de etilmorfina. A verificação de que a redução do citocromo P-450 ao término da reação da azo-redutase (em presença de 35 nMoles de mersalil por mg de proteína) também estava 50% inibida, enquanto a redução do citocromo b_5 estaria 50% inibida em concentrações superiores (42 nMoles/ml -FRANKLIN & ESTABROOK, 1971) sugere a participação do citocromo P-450, entendido como uma ou mais formas dêsse citocromo na reação da azo-redutase.

A inibição da atividade azo-redutásica por anilina não revelou um padrão de inibição competitiva, o que seria de se esperar se o mesmo citocromo P-450 estivesse envolvido na reação. Na possibilidade de tal hipótese ser uma realidade esta discrepância fica esclarecida quando se compara o Km_{ap} para a hidroxilação da anilina, 40 μM, (SCHENCKMAN, BALL & ESTABROOK, 1967) com o Km_{ap} para a redução do DAB, 19,4 μM.

O resultado mais sugestivo para a participação do citocromo P-450 na atividade azo-redutásica foi obtido após o tratamento dos ratos com 3-MC indicando uma indução da

atividade azo-redutásica paralela à indução do citocromo P-450 (Tabela VIII). Êsses resultados ampliam os de CONNEY, MILLER & MILLER (1956) e os de von der DECKEN & HULTIN (1960), que verificaram um aumento da atividade azo-redutásica em microssomos pelo tratamento de ratos com 3-MC.

Verfica-se pelos espectros obtidos com subpartículas de microssomos que o citocromo P-450 induzido pelo tratamento com 3-MC (Fig. 8) corresponde ao citocromo P-450 tipo II (JEFCOATE & GAYLOR, 1969). Isto sugere fortemente a possibilidade de que a atividade azo-redutásica dependa desta forma de citocromo P-450.

Os resultados obtidos, quando foi medida a reação de hidroxilação de anilina, típicamente um substrato do tipo II, obtendo-se a máxima atividade de hidroxilação com microssomos de fígados de ratos tratados com 3-MC (Tabela XI), vêm reforçar essa indicação. Ao mesmo tempo, se considerados juntamente com os resultados da cromatografia dos produtos das reações de azo-redução e hidroxilação de anilina, vêm mostrar que o citocromo P-450 era funcionalmente ativo em nossas preparações.

O tratamento dos animais com PB, que induz um aumento do citocromo P-450 do tipo I, (SLADEK & MANNERING, 1969) não induz nenhuma alteração sôbre a atividade azo-redutásica (Tabela IX). O espectro absoluto obtido para o citocromo P-450 com partículas obtidas por tratamento com Nagarse de mi-

crossomos após pré-tratamento com PB, corresponde aos espectros apresentados por JEFCOATE & GAYLOR (1969) e por NISHIBAYASHI & SATO (1968).

O tratamento dos ratos com DAB demonstrou que DAB não funciona como substância indutora da atividade azo-redutásica e que ao contrário houve uma marcada inibição da azo-redutase, e esta inibição foi específica (Tabela X). O aumento observado nos níveis do citocromo b_5 paralelamente à inibição da atividade azo-redutásica sugerem que êsse citocromo não participa da reação. Por outro lado, o aumento dos níveis do citocromo b_5, provàvelmente, corresponde à proliferação do retículo endoplasmático. KURIYAMA, OMURA, SIEKEVITZ & PALADE (1969) mostraram que o aumento nos níveis de citocromo b_5, durante o tratamento de ratos com PB, corresponde à proliferação do retículo endoplasmático e é devido à diminuição da velocidade de degradação dêsse citocromo. O resultado dêsses autores sugere uma explicação para os nossos resultados obtidos com o tratamento com DAB.

O tipo de espectro obtido (Fig. 9) com partículas de microssomos de ratos pré-tratados com DAB, semelhante ao obtido para o citocromo P-450, tipo I, ao lado da constatação de que durante o tratamento com DAB não houve variação nos níveis de citocromo P-450, leva à especulação sôbre a possibilidade de ter havido uma inibição de um terceiro composto, não identificado, que participaria da atividade azo-redutásica.

Por outro lado, o efeito inibidor do tratamento com DAB sôbre a azo-redutase vem fornecer mais uma indicação sôbre o efeito carcinogênico dêste composto.

MILLER & MILLER (1953) mostraram que o efeito carcinogênico do DAB é menor que o do N-monometil p-amino-azobenzeno (MAB) e seus estudos pela análise dos produtos do metabolismo de azo-corantes "in vivo" sugerem que a reação de demetilação precede a reação de clivagem da ligação azo.

WU & SMUCKLER (1969) em um sistema "in vitro", usando microssomos em um meio de reação muito semelhante ao usado neste trabalho, mostraram que a reação de demetilação é muito mais lenta que a de redução.

Reunindo êstes dados, surge a possibilidade de que o efeito carcinogênico do DAB se manifeste graças à inibição da azo-redutase permitindo o acúmulo de N-monometil p-amino-azobenzeno ou de seus derivados que exibiriam o efeito carcinogênico.

Analisando o espectro obtido em subpartículas de microssomos de fígados de ratos pré-tratados com DAB, verifica-se que o citocromo P-450 mostra espectralmente um padrão que se aproxima muito do citocromo P-450 tipo I cujo aumento foi induzido pelo pré-tratamento com PB.

Se a inibição da azo-redutase ocorresse pela inibição da síntese do citocromo P-450 tipo II, êste efeito seria explicável, juntamente com o resultado espectral obtido, desde que existissem ao lado de mecanismos de indução seletiva (SLADEK & MANNERING, 1969), mecanismos de inibição seletiva.

Os resultados totalmente negativos obtidos nas tentativas de fracionamento dos microssomos com DOC mostram que a labilidade da atividade azo-redutásica deve ser maior que outras atividades de oxidases de função mista já obtidas em frações dos microssomos como o que foi descrito por LU, JUNK & COON (1969).

Entretanto, se considerarmos as semelhanças da atividade azo-redutásica com a dessaturação de ácidos graxos e a existência de um novo tipo de citocromo "P-450" descrito por GAYLOR, MOIR, SEIFREID & JEFCOATE (1970), extremamente lábil, teremos uma explicação para o nosso insucesso.

Recentemente LU, KUNTZMAN, WEST & CONNEY (1971) publicaram uma nova modificação do método de fracionamento dos microssomos usando DOC e que chegou a nossas mãos quando êste trabalho já estava sendo redigido.

O novo método preconizado emprega a desintegração dos microssomos por ultra-som, e a concentração final de DOC é muito menor que a do método de LU, JUNK & COON(1969)e portanto poderá vir a ser uma preciosa indicação de como fracio

nar o sistema da azo-redutase no prosseguimento dêsse trabalho.

Em resumo, as evidências obtidas nesse trabalho indicam com bastante probabilidade que o citocromo P-450 está envolvido na redução do DAB mas não afastam definitivamente a possibilidade da participação do citocromo b_5 neste processo.

De qualquer forma, foi possível demonstrar uma reação em microssomos que apresenta uma característica até agora não relatada, qual seja, a redução de um composto exógeno totalmente independente de oxigênio que provàvelmente utiliza enzimas de oxidação de função mista.

Essa reação tem como características interessantes o fato de ser altamente específica e ser inibida por KCN.

O estudo dessa reação levantou a possibilidade da participação de substâncias ainda não identificadas nos processos de transporte de elétrons no retículo endoplasmático.

5. RESUMO E PERSPECTIVAS

Verificou-se que microssomos de fígado apresentam uma atividade azo-redutásica completamente dependente de NADPH, usando DAB como substrato.

Ao contrário de outros sistemas já descritos, a atividade azo-redutásica não pode ser identificada com a NADPH-citocromo c redutase, embora nossos resultados indiquem que esta enzima participa da reação.

Não se pode excluir definitivamente a participação do citocromo b_5 apesar de uma série de observações afastando essa possibilidade.

Verificou-se que a atividade azo-redutásica pode ser induzida por tratamento com 3-MC, paralelamente à indução do citocromo P-450 tipo II. Isto sugere fortemente a participação dêsse citocromo na reação apesar desta não ser inibida por CO.

O citocromo P-450 induzido por tratamento com 3-MC era funcionalmente ativo.

A atividade azo-redutásica foi inibida especificamente pelo tratamento oral com DAB, possibilitando a formulação de uma hipótese sôbre a ação carcinogênica dêste composto.

Uma série de resultados mostra que a azo-redutase estudada é altamente específica podendo ser inibida por KCN e por mersalil.

Face aos fatos expostos acima, as perspectivas do sistema parecem muito interessantes.

A possibilidade do uso de novos métodos de fracionamento dos microssomos pode levar à resolução do sistema da azo-redutase.

As semelhanças com a dessaturação de ácidos graxos, aliadas às indicações da existência de um novo tipo de citocromo P-450 que se combina com KCN, permitem descortinar maior amplitude para os limites do sistema da azo-redutase.

Enfim, trata-se de uma reação de redução de um composto exógeno, com características até agora não relatadas, envolvendo processos biológicos de importância e cujo estudo terá prosseguimento.

6. BIBLIOGRAFIA

1. APPLEBY,C.A. (1969) Biochim. Biophys. Acta: 172, 71
2. APPLEBY,C.A. (1969a) Biochim. Biophys. Acta: 172, 88
3. ALVARES, A.P., SCHILLING,G., LEVIN, W. & KUNTZMAN, R. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun.: 29,521
4. BANG, B.G. & BANG, F.B. (1957). J. Ultrastruct. Res.: 1, 138
5. BERGMEYER, H.C. (1963) in Methods of Enzimatic Analysis p. 1030, Verlag-Chemie-Acad. Press, New York
6. CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. (1954) J. Biol. Chem.: 209, 945
7. CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. (1955) J. Biol. Chem.: 217, 395
8. CLAUDE, A. (1943) Science : 97, 451
9. COHEN, B.S. & ESTABROOK, R.W. (1971) Arch. Biochem. Biophys. : 143, 37
10. COHEN, B.S. & ESTABROOK, R.W. (1971a) Arch. Biochem. Biophys. 143, 46
11. COHEN, B.S. & ESTABROOK, R.W. (1971b) Arch. Biochem. Biophys. : 143, 54
12. CONNEY, A.H. (1967) Pharmacol. Rev. :19, 317
13. CONNEY, A.H., MILLER, E.C. & MILLER, J.A. (1956) Cancer Res. : 16, 450
14. COOPER, D.Y., LEVIN, S., NARASIMHULU, S., ROSENTHAL, O. & ESTABROOK, R.W. (1965) Science :147 , 400

15. DALLNER,G. (1963) Acta Pathol. et Microbiol. Scand.: (suppl) 166

16. von der DECKEN, A. & HULTIN, T. (1960) Arch. Biochem. Biophys.: 90, 201

17. DUS, K., KATAGIRI, M., YU, C.A., ERBES, D.L. & GUNSALUS, I.C. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun.: 40, 1423

18. ELSON, L.A. & WARREN, F.L. (1944) Biochem. J.: 38 , 217

19. ERNSTER, L. & ORRENIUS, S. (1965) Fed. Proc.: 24, 1190

20. ESTABROOK,R.W., COOPER, D.Y. & ROSENTHAL, O. (1963) Biochem. Z.: 338, 741

21. FOUTS, J.R., KAMM, J.J. & BRODIE, B.B. (1957) J.Pharmacol. Exptl. Therap. : 120, 291

22. FRANKLIN, M.E. & ESTABROOK, R.W. (1971) Arch. Biochem. Biophys. : 143, 318

23. GARFINKEL, D. (1957) Arch. Biochem. Biophys.: 71, 100

24. GARFINKEL, D. (1957a) Arch. Biochem. Biophys. : 71, 111

25. GARFINKEL, D. (1958) Arch. Biochem. Biophys. : 77, 493

26. GAYLOR, J.L., MOIR, N.J., SEIFREID, H.J. & JEFCOATE, C.R.E (1970) J. Biol. Chem. : 245, 5511

27. GILLETTE, J.R. (1966) Advan. Pharmacol. : 4, 219

28. GILLETTE, J.R. & GRAM, T.E. (1969) in Microssomes and Drug Oxidations p. 134, Acad. Press, New York

29. GRAM, T.E., ROGERS, L.A. & FOUTS, J.R. (1967) J.Pharmacol. Exptl. Therap. : 155, 479

30. HERNANDEZ, P.H., GILLETTE, J.R. & MAZEL, P. (1967) Biochem Pharmacol. : 16, 1859

31. HERNANDEZ, P.H., MAZEL, P. & GILLETTE, J.R. (1967) Biochem Pharmacol. : 16, 1877

32. HILDEBRANDT, A. & ESTABROOK, R.W. (1971) Arch. Biochem. Biophys. : 143, 66

33. HILDEBRANDT, A., REMMER, H. & ESTABROOK, R.W. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. : 30, 607

34. HOGEBOOM, G.H., SCHNEIDER, W.C. & PALADE, G.E. (1948) J.Biol. Chem. : 172, 619

35. HOGEBOOM, G.H. & SCHNEIDER, W.C. (1950) Nature : 166, 302

36. HOLLOWAY, P.W. & WAKIL, S.J. (1970) J. Biol. Chem. : 245, 1862

37. HOLTZMAN, J.L., GRAM, T.E., GIGON, P.L. & GILLETTE, J.R. (1968) Biochem. J. : 110, 407

38. HORIE, S.,KINOSHITA, T. & SIMAZONO, J. (1966) J. Biochem. Tokyo : 60, 660

39. ICHIKAWA Y. & YAMANO, T. (1967) Biochim. Biophys. Acta : 147, 518

40. IMAI, Y. & SATO, R. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun.: 23, 5

41. JEFCOATE, C.R.E., GAYLOR, J.L. & CALABRESE, R.L. (1969) Biochemistry : 8, 3455

42. JEFCOATE, C.R.E. & GAYLOR, J.L. (1969) Biochemistry : 8, 3464

43. KAJIHARA, T. & HAGIHARA, B. (1967) in Symposium on Cytochromes : Structural and Chemical Aspects of cytochromes p. 297, University of Tokyo Press

44. KATO, R. & GILLETTE, J.R. (1965) J. Pharmacol. Exptl.Therap.: 150, 279

45. KEILIN, D. & HARTREE, E.F. (1940) Proc. Roy. Soc. B. : 129, 277

46. KIESE, M. (1965) Ann. N.Y. Acad. Sci. : 123, 141

47. KLINGENBERG, M. (1958) Arch. Biochem. Biophys. : 75, 376

48. KURIYAMA, Y. OMURA T., SIEKEVITZ, P. & PALADE, G.E. (1969) J. Biol. Chem. : 244, 2017

49. LINEWEAVER, H. & BURK, D. (1934) J. Amer. Chem. Soc.: 56, 658

50. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem. : 193, 265

51. LU, A.Y.H. & COON, M.J. (1968) J. Biol. Chem. : 243,1331

52. LU, A.Y.H., JUNK, K.W. & COON, M.J. (1969) J, Biol.Chem.: 244, 3714

53. LU, A.Y.H., KUNTZMAN, R., WEST, S. & CONNEY, A.H. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 1200

54. MAHLER, H.R., RAW, I., MOLINARI, R. & AMARAL, D.F.(1958) J. Biol. Chem. : 233, 230

55. MARGOLIASH, E., FROHWIRT, N. & WIENER, E. (1959) Biochem. 71, 570

56. MASON, H.S. (1957) Advan. Enzymol. : 19, 79

57. MASON, H.S., NORTH, J.C. & VANNESTE, M. (1965) Fed. Proc. 24, 1172

58. MILLER, J.A. & MILLER, E.C. (1953) Advan. Cancer Res.: 1, 340

59. MITOMA, C., POSNER, H.S., REITZ, H.C. & UDENFRIEND, S. (1956) Arch. Biochem. Biophys.: 61, 431

60. MUELLER, G.C. & MILLER, J.A. (1950) J. Biol. Chem. : 185, 145

61. NISHIBAYASHI, H. & SATO, R. (1967) J. Biochem., Tokyo : 61, 491

62. NISHIBAYASHI, H. & SATO, R. (1968) J. Biochem., Tokyo : 63, 766

63. NÓBREGA, F.G. (1965) resultados não publicados

64. NÕBREGA, F.G., ARAUJO, P.S., PASETTO, M. & RAW, I.(1969) Biochem. J. : 115, 849

65. OSHINO, N.,IMAI, Y. & SATO, R. (1966) Biochim. Biophys. Acta. : 128, 13

66. OMURA, T. (1969) in Microsomes and Drug Oxidations p.161, Acad. Press, New York

67. OMURA, T. & SATO, R. (1962) J. Biol. Chem. : 237, 1375

68. OMURA, T. & SATO, R. (1964) J. Biol. Chem. : 239, 2370

69. OMURA, T. & SATO, R. (1964a) J. Biol. Chem. : 239, 2379

70. OMURA, T., SATO, R.,COOPER, D.Y., ROSENTHAL, O. & ESTABROOK, R.W. (1965) Fed. Proc. : 24, 1181

71. OMURA, T., SIEKEVITZ, P. & PALADE, G.E. (1967) J. Biol. Chem. : 242, 2389

72. ORRENIUS, S. & ERNSTER, L. (1964) Biochem. Biophys, Res. Commun. : 16, 60

73. PALADE, G.E. (1956) J. Biophys. Biochem. Cytol. :(suppl) 2, 85

74. PALADE, G.E. & SIEKEVITZ, P. (1956) J. Biophys. Biochem. Cytol. : 2, 171

75. PAPPENHEIMER, A.M. & WILLIAMS, C.M. (1954) J. Biol. Chem.: 209, 915

76. PETERS, M.A. & FOUTS, J.R. (1970) Biochem. Pharmacol. : 19, 533

77. PHILLIPS, A.H. & LANGDON, R.G. (1962) J. Biol. Chem.: 237, 2652

78. POLTORATSKY-BOIS, R. & CHAIX, P. (1964) Bull. Soc. Chim. Biol., Paris : 46, 867

79. PORTER, K. & BLUM, J. (1953) Anat. Rec. : 117, 685

80. RANDERATH, K. (1966) in Thin Layer Chromatography p. 106, Verlag-Chemie-Acad. Press, New York

81. RAW, I. & MAHLER, H.R. (1959) J. Biol. Chem. : 234, 1867

82. RAW, I., MOLINARI, R., AMARAL, D.F. & MAHLER, H.R.(1958) J. Biol. Chem. : 233, 225

83. RUBIN, E., GANG, H. & LIEBER, C.S. (1971) Biochem.Biophys. Res. Commun. : 42, 1

84. SARGENT, J.R. & VADLAMUDI, B.P. (1968) Biochem. J.: 107, 839

85. SASAME, H.A. & GILLETTE, J.R. (1970) Arch. Biochem. Biophys. : 140, 113

86. SATO, R., NISHIBAYASHI, H. & ITO, A. (1969) in Microsomes and Drug Oxidations p. 111, Acad. Press, New Yorl

87. SATO, R., OMURA, T. & NISHIBAYASHI, H. (1965) in Oxidases and Related Redox Systems vol. 2, p. 861, J.Wille New York

88. SCHENCKMAN, J.B., BALL, J.A. & ESTABROOK, R.W. (1967)Bioche Pharmacol. : 16, 1071

89. SCHENCKMAN, J.B. (1970) Biochemistry : 9, 2081

90. SLADEK, N.E. & MANNERING, G.J. (1966) Biochem. Biophys, Re: Commun. : 24, 668

91. SLADEK, N.E. & MANNERING, G.J. (1969) Mol. Pharmacol. : 5, 186

92. SLATER, E.C. (1949) Biochem. J. : 45, 1

93. SOTTOCASA, G.L, KUILENSTIERNA, B., ERNSTER, L. & BERGSTRANI A. (1967) J. Cell. Biol. : 32, 415

94. STEVENSON, E.S., DOBRINER, K. & RHOADS, C.P. (1942) Cancer Res. : 2, 160

95. STRITTMATTER, C.F. & BALL, E.G. (1952) Proc. Nat.Acad. Sci. U.S. : 38, 19

96. STRITTMATTER, C.F. & BALL, E.G. (1954) J. Cellular Comp. Physiol. : 43, 57

97. STRITTMATTER, P. (1963) in The Enzymes, vol. 8, p. 113, 2nd. ed. Acad. Press, New York

98. STRITTMATTER, P. (1967) in Methods in Enzymology, vol.10, p. 561, Acad. Press, New York

99. STRITTMATTER, P. & OZOLS, J. (1966) J. Biol. Chem. : 241, 4787

100. STRITTMATTER, P. & VELICK, S.F. (1956) J. Biol. Chem.: 221, 253

101. STRITTMATTER, P. & VELICK, S.F. (1956a) J. Biol. Chem.: 221, 277

102. STRITTMATTER, P. & Velick, S.F. (1957) J. Biol. Chem.: 228, 785

103. STROBEL, H.W., LU, A.Y.H., HEIDEMA, J. & COON, M.J. (1970) J. Biol. Chem. : 245, 4851

104. TOSCANO, V.G. (1970) comunicação pessoal

105. TOSCANO, V.G. (1971) comunicação pessoal

106. TREFONEL, J., TREFONEL, Mme. J., NITTI, F. & BOVET, D. (1935) Compt. Rend. Soc. Biol. : 120, 765

107. VANCE, D.E. & SWEELEY, C.C. (1967) J. Lipid Res. : 8, 622

108. VELICK, S.F. & STRITTMATTER, P. (1956) J. Biol. Chem.: 221, 265

109. WADA, F., HIGASHI, T., ICHIKAWA, Y., TADA, K. & SAKAMOTO, Y. (1964) Biochim. Biophys. Acta : 88, 654

110. WILLIAMS, C.H. & KAMIN, H. (1962) J. Biol. Chem.: 237,587

111. WU, S-Y. & SMUCKLER, E.A. (1969) in Microsomes and Drug Oxidations p. 189, Acad. Press, New York

112. YOCHIKAWA. H. (1951) J. Biochem., Tokyo: 38, 1

113. YU, C-A. & GUNSALUS, I.C. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. : 40, 1431