BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20.318
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

5-AMINOLEVULINATO E 4,5-DIOXOVALERATO:
METABÓLITOS ENVOLVIDOS NAS
MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS DOS
DISTÚRBIOS PORFIRÍNICOS

Dissertação de Mestrado

Carlos Alberto Avellaneda Penatti

Orientador: Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara

São Paulo

2003

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005273

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P397c Penatti, Carlos Alberto Avellaneda
5-Aminolevulinato e 4,5-Dioxovalerato: metabólitos envolvidos
nas manifestações neurológicas dos distúrbios perifericos /
Carlos Alberto Avellaneda Penatti. -- São Paulo, 2003.
49p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Bechara, Etelvino José Henriques

1. Radical livre : Bioquímica teórica 2. Neuroquímica :
Fisiologia humana 3. Radical livre : Patologia fisiológica
I. T. II. Bechara, Etelvino José Henriques, orientador.

574.19282 CDD

“5-Aminolevulinato e 4,5-Dioxovalerato: Metabólitos Envolvidos nas Manifestações Neurológicas dos Distúrbios Porfirínicos”

CARLOS ALBERTO AVELLANEDA PENATTI

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PAOLO DI MASCIO
IQ – USP

Prof. Dr. RUI CURI
ICB – USP

SÃO PAULO
28 DE FEVEREIRO 2003.

"O artista é o criador de coisas belas.

Revelar a arte e ocultar o artista é a finalidade da arte.

O crítico é aquele que pode traduzir de um modo diferente,

ou por um novo processo, a sua impressão das coisas belas.

A mais elevada, como a mais baixa das formas de crítica, é uma espécie de autobiografia.

Os que encontram significações feias em coisas belas são corruptos sem serem encantadores.

Isto é um defeito.

Os que encontram belas significações em coisas belas são cultos.

Para estes, há esperança.

Existem os eleitos para os quais as coisas belas significam unicamente Belexa.

...

Quando os críticos divergem, o artista está de acordo consigo mesmo.

Podemos perdoar a um homem por haver feito uma coisa útil, contanto que não a admire.

A única desculpa de haver feito uma coisa inútil é admirá-la intensamente.

Toda a arte é completamente inútil."

Oscar Wilde

AGRADECIMENTOS

É impossível terminar tal tarefa sem lembrar do auxílio e engajamento de muitos. Agradecer é o ato de manter em nós a lembrança viva daqueles que nos são valiosos nos tropeços e alegrias da conquista. Quero no final desta etapa, portanto, registrar minha estima...

Aos colegas do meu laboratório e amigos de faculdade, pela convivência prazerosa e ajuda ímpar que proporcionaram;

Aos docentes do IQ e ICB – USP, com quem pude interagir e aprender e de quem inúmeras vezes usufruí das potencialidades dos seus laboratórios, em particular à Prof. Dra. Mari Cleide Sogayar, pelo uso das células empregadas, à Prof. Dra. Eugênia Costanzi-Strauss, pelo auxílio nos experimentos de viabilidade celular e ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto e Dra. Andréia Torrão, pelo aprendizado em imuno-histoquímica;

À Dra. Marilene Demasi, pela condução precisa da minha iniciação em prática de laboratório de pesquisa, através do conhecimento de inúmeras técnicas, uso de reagentes e apurada análise de resultados;

Ao Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori, cujo cuidado e dedicação estruturaram e engrandeceram minha formação em Neurologia;

Ao Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara, pelos anos de seu carinho e orientação, palavra que aqui pouco expressa seu significado grandioso, pois superou todas as expectativas de apoio e conhecimento a mim destinados, bagagem esta que esculpiu minha identidade no apreciar e fazer ciência;

E, finalmente à minha família, em especial, aos meus pais, avós, esposa e filha, com sua presença e participação constante no meu dia a dia e crença na minha vitória diante de qualquer circunstância.

ÍNDICE

RESUMO	I
ABREVIACÕES	IV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Ácido 5-aminolevulínico (ALA) e síntese do heme	1
1.2 O transporte de ALA no SNC	2
1.3 ALA e estresse oxidativo	4
1.4 ALA e receptores GABAérgicos	8
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Reagentes	12
3.1.1 Síntese de DOVA	13
3.2 Preparação de sinaptosomas	18
3.3 Determinação de cálcio livre intrassinaptosomal	18
3.4 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	19
3.5 Avaliação do consumo de oxigênio por mitocôndrias intrassinaptosomais	20
3.6 Ensaios de radioligação em sítios GABAérgicos	20
3.7 Cultura de células e aferição de taxa de mortalidade	21
3.8 Análise de imuno-histoquímica	21

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Efeito do ALA na captação sinaptosomal de cálcio	24
4.2 Efeito de ALA no consumo de oxigênio de mitocôndrias intrassinaptosomais	30
4.3 Efeito de ALA sobre o potencial transmembrânico mitocondrial	32
4.4 DOVA e sítios GABAérgicos: ensaio de radioligação	34
4.5 Estudos de viabilidade celular com ALA e DOVA	37
4.6 Ensaio de imuno-histoquímica com receptores GABA _A subunidade β em células WERI	40
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
<i>CURRICULUM VITAE</i>	i

RESUMO

As porfirias, síndromes associadas a deficiências de atividade enzimática da biossíntese do grupo heme, presente em quase todas células do organismo, com maior atividade no fígado e medula óssea, agrupam-se em formas hereditárias ou primárias e secundárias ou químicas. No caso das primárias ocorre déficit da expressão de enzimas ou inibição da atividade de outras. A variação dos metabólitos acumulados é o que tange o polimorfismo clínico. Dentre as secundárias, destacam-se o saturnismo (intoxicação por chumbo) e a tirosinemia subaguda ou crônica (onde o acúmulo de succinilacetona, intermediário da degradação de tirosina, inibe a ALA desidratase, enzima biossintética do grupo heme). Nestas últimas e na porfíria aguda intermitente (PAI), de herança autossômica dominante do cromossomo 11q, além de outros intermediários menores, ocorre o acúmulo do ácido 5-aminolevulínico (ALA) no sangue e outros tecidos.

O ALA é uma α -aminocetona passível de rápida enolização em pH fisiológico. Foi demonstrado que o enol formado sofre oxidação subsequente catalisada por complexos de ferro em pH fisiológico com formação de espécies reativas de oxigênio e ALA enoil radical. Este comportamento causa dano oxidativo em mitocôndria, lipossomos, DNA e proteínas. A formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) no meio promove liberação de ferro do retículo endoplasmático e de ferritina e *in vivo* aumenta significativamente a concentração de ferro não-hemínico em fígado de rato. Vários estudos se seguiram para demonstrar que ALA

acumulado nos distúrbios porfirínicos sofreria oxidação a partir do enol, tendo como produto final o ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA), e este comportamento seria o responsável pelas alterações neurobioquímicas encontradas: aumento da captação de cálcio em sinaptosomas, elevação de ferro total cortical e estriatal seguido por elevação secundária de ferritina, aumento da atividade CuZnSOD (cobre-zinco superóxido dismutase), bem como proteínas oxidadas e produtos de lipoperóxidos nos homogenatos totais de córtex de rato. *In vitro*, estes efeitos foram todos inibidos por agentes antioxidantes, químicos ou enzimáticos.

As evidências neuroquímicas clássicas para as manifestações neuropsiquiátricas supostamente promovidas pelo ALA apoiavam-se na similaridade estrutural ALA/GABA, proposta por Brennan e Cantrill em 1979. Nosso estudo modelo, utilizando membranas sinápticas, evidenciou através de ensaios de radioligação com ^3H -muscimol na presença de 10 mM de ALA ou após tratamento crônico com 40 mg/kg em ratos, alteração do Kd (constante de dissociação do complexo receptor-ligante), mas sem mudança no “pool” total de receptores.

Outro aspecto não esclarecido era se o DOVA afetaria o sistema GABAérgico, não pelo mecanismo oxidativo, mas através de um antagonismo farmacológico (similaridade estrutural com o GABA) ou através de sua reatividade ao formar adutos cíclicos com proteínas similar ao que acontece nos AGEs (“Advanced Glycation End Products”).

Nesta dissertação estudamos o mecanismo de captação de cálcio por sinaptosomas influenciada por ALA e DOVA. São discutidos os resultados dos ensaios de radioligação com ^3H -muscimol na verificação do efeito de

DOVA nos sítios GABAérgicos também em sinaptosomas corticais de ratos. Os estudos usando cultura de células transformadas de linhagem neuronal WERI (derivadas de retinoblastoma humano com mutação no gene *rb*) foram conduzidos para avaliar a citotoxicidade ao ALA e DOVA, bem como estender a análise da via GABAérgica, envolvida na fisiopatologia dos efeitos citados.

Nossos resultados demonstram o efeito de ALA, metabolito intermediário acumulado nas porfirias, em particular na PAI e saturnismo, como espécie pro-oxidante nociva ao sistema sinaptosomal. Seu efeito é mediado pela quebra na homeostade do cálcio desencadeando colapso energético mitocondrial, cujo efeito tem reversão parcial com o uso de antioxidantes e bloqueadores de canal de cálcio. Já o DOVA tem demonstrado seu efeito principalmente comprometendo a vitalidade celular não relacionada à homeostase do cálcio, mas com envolvimento do sistema GABAérgico de receptores ligados ao canal de cloreto. Tal efeito parece estar relacionado com a alteração do “pool” total de receptores celulares e sua citolocalização.

ABREVIações

ALA	ácido 5-aminolevulínico
BOC-	<i>tert</i> -butoxi-carbonil-
DMEM	meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DOVA	ácido 4,5-dioxovalérico
DTPA	ácido dietilenotriamonopentacético
DTT	ditiotreitól
EGTA	ácido etileno glicol-bis[β -aminoetil eter] <i>N,N,N',N'</i> -tetra- acético
Ficoll	polímero de sacarose
FURA 2-AM	marcador fluorescente de íons Ca^{2+}
GABA	ácido γ -aminobutírico
IRE-BP	“iron responsive element-binding protein”
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>d</i> -aspartato
PAI	porfiria aguda intermitente
POPOP	1,4-bis-[4-metil-5-fenil-2-oxazolil]benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
SFB	soro fetal bovino
SOD	superóxido dismutase
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico
“Trypan Blue”	corante para avaliação da viabilidade celular

INTRODUÇÃO

1.1 Ácido 5-aminolevulínico (ALA) e síntese do heme

As porfirias, síndromes associadas a deficiências de atividade enzimática da biossíntese do grupo heme em quase todas células do organismo, com maior atividade no fígado e medula óssea, agrupam-se em formas hereditárias ou primárias e secundárias ou químicas¹. No caso das primárias ocorre déficit da expressão de enzimas ou inibição da atividade de outras (Quadro I). A variação dos metabólitos acumulados é o que tange o polimorfismo clínico. Dentre as secundárias, destacam-se o saturnismo (intoxicação por chumbo) e a tirosinemia subaguda ou crônica (onde o acúmulo de succinilacetona, intermediário da degradação de tirosina, inibe a ALA desidratase, enzima biossintética do grupo heme)². Nestas últimas e na porfíria aguda intermitente (PAI), de herança ligada ao sexo, além de outros intermediários menores, ocorre o acúmulo de ALA. Sua detecção é feita no sangue e na urina. Nos pacientes com PAI durante as crises chega a 50 mg/dia (normal de 3-5 mg/dia) na urina e 40 vezes mais concentrado no sangue (10 μ M)^{3,4}.

O acometimento principal nas patologias citadas acima centra-se no sistema nervoso periférico (SNP) resultando em tetraparesias flácidas e dores abdominais nas crises agudas. Também nas crises, mas principalmente com a deterioração crônica, o sistema nervoso central (SNC) é envolvido, apresentando quadros de psicoses, crises convulsivas, transtornos de personalidade e do humor, além de *diabetes insipidus* ⁵. Outra doença que chama atenção pela sua incidência elevada nestes pacientes é o adenocarcinoma hepático⁶.

QUADRO I. Via biossintética do grupo heme e porfirias associadas⁵ **Enzimas Deficitárias:**

1. **Porfíria de Doss; Tirosinemia; Saturnismo**
2. **Porfíria Aguda Intermitente (PAI)**
3. **Porfíria Eritropoiética Congênita ou Doença de Gunther**
4. **Porfíria Cutânea Tarda, Porfíria Hepatoeritropoiética, Porfíria Tóxica (Hexaclorofeno)**
5. **Coproporfíria Hereditária; Saturnismo**
6. **Porfíria Variegata**
7. **Protoporfíria; Saturnismo**

1.2 O transporte de ALA no SNC

O carreamento de ALA para o SNC é motivo de controvérsia. A análise da captação tecidual de ALA exógena foi por muito tempo considerada baixa às custas da barreira hemato-encefálica⁷. No entanto, evidências mais recentes apontam para a captação do tecido cerebral na condição de concentrações elevadas de ALA endógena nos distúrbios

porfirínicos⁸. Frank Döring e colaboradores⁹ comprovaram que o transporte de ALA pode ser feito pelos transportadores peptídicos, tanto intestinal (PEPT-1) como renal (PEPT-2), localizados na face apical da membrana das células daqueles órgãos.

Estes transportadores absorvem di- e tripeptídeos, além de antibióticos β -lactâmicos, rapidamente nas células intestinais e renais, apresentando divergências cinéticas entre si. Os dois são co-transportadores acoplados a prótons, tendo o gradiente protônico eletroquímico transmembrânico como força motriz em pH ótimo de 6.0. A forma intestinal tem alta capacitância/baixa afinidade e a renal, baixa capacitância/alta afinidade pelo substrato. Os cDNA destes transportadores foram clonados de bibliotecas de cDNAs de intestino e rim de coelho, homem e rato¹⁰⁻¹⁶. A biodisponibilidade oral de ALA tem relevância na terapia fotodinâmica do câncer¹⁷. É descartada a competição pelo ácido γ -aminobutírico (GABA) ou glutamato no transporte de ALA, sinalizando para rotas independentes de acúmulo em outros tecidos⁹.

O fato de GABA, análogo estrutural de ALA, não ser transportado pelos receptores PEPT-1 e 2 sugere a exigência maior de 4 átomos de carbono no esqueleto molecular entre os grupos amino e carboxi-terminais para tornar-se substrato, como é o caso dos di- e tripeptídeos. A ligação peptídica pode ser substituída pela função cetometileno no carbono γ do ALA sem perda de afinidade do substrato¹⁸.

Explorando a presença destes transportadores em outros tecidos, foi verificada a exclusividade do PEPT-1 no intestino mais a ubiquidade do PEPT-2 em vários órgãos (glândula mamária, pâncreas, cólon, pulmões,

músculo esquelético e cérebro). A identificação do PEPT-2 foi feita por imunohistoquímica com anticorpos monoclonais, estudos eletrofisiológicos⁹ e determinação de mRNAs com hibridização *in situ*, este último em tecido cerebral humano e de coelho¹⁹. A distribuição autoradiográfica confere com a distribuição *in vitro* de ¹⁴C-ALA em tecidos de ratos, mostrando captação específica e restrita em neurônios e epitélio do plexo coróide, mas não na barreira glial hemato-encefálica^{20, 21}. Este sistema de transporte é afetado por metais pesados²².

Nenhuma das referências acima cita o DOVA (ácido 4,5-dioxovalérico), produto final da oxidação de ALA, como biomolécula “usuária” do sistema PEPT. O DOVA possui estrutura molecular para utilizar transportador de peptídeos e, através dele, alcançar órgãos-alvo, como o SNC e o SNP principalmente, e se acumular cronicamente. **Esta seria outra hipótese para a citotoxicidade encontrada nos órgãos acima, objetivo do presente estudo.** As evidências de um transporte específico e de alta afinidade para ALA impõem a hipótese de que os distúrbios porfirínicos sejam doenças metabólicas sistêmicas crônico-degenerativas a despeito das exacerbações clínicas agudas, sobretudo na PAI.

1.3 ALA e estresse oxidativo

Nosso grupo de pesquisa, orientado pelo Prof. Etelvino Bechara, tem-se dedicado nos últimos anos ao estudo das implicações fisiopatológicas em sistemas biológicos e biomoléculas do efeito pró-oxidante endógeno do ALA.

O ALA é uma α -aminoacetona (pKa 8,1) passível de rápida enolização. Foi demonstrado que o enol formado sofre oxidação subsequente catalisada por complexos de ferro em pH fisiológico, com formação de espécies reativas de oxigênio e radical ALA (enoil)^{23, 24} (Esquema I). Este comportamento pôde ser acoplado a dano oxidativo em mitocôndria^{25, 26}, lipossomos²⁷, DNA^{28, 29} e proteínas³⁰. A formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) no meio promove liberação de ferro do retículo endoplasmático³¹ e de ferritina e *in vivo* aumenta significativamente a concentração de ferro não-hemínico em fígado de rato³².

Vários estudos se seguiram para demonstrar que ALA acumulado nos distúrbios porfirínicos sofreria oxidação a partir de enol tendo como produto final DOVA (Esquema I) e este seria o mecanismo responsável pelas alterações neurobioquímicas encontradas: aumento da captação de cálcio em sinaptosomas, elevação de ferro total cortical e estriatal seguido por elevação secundária de ferritina, aumento da atividade CuZnSOD (cobre-zinco superóxido dismutase), bem como proteínas oxidadas e produtos de lipoperóxidos nos homogenatos totais de córtex de rato. Estes efeitos todos foram inibidos parcialmente por agentes antioxidantes³³.

A captação de cálcio por sinaptosomas corticais de ratos foi explorada por nós em virtude da excitotoxicidade glutamatérgica, via influxo de cálcio, ser um dos principais mecanismos de degradação e de

Esquema I: Oxidação aeróbica do ALA (ácido δ -aminolevulínico) ao DOVA (ácido 4,5-dioxovalérico) catalisada por complexos de ferro, com geração de espécies reativas de oxigênio.

condução à apoptose no SNC e no SNP^{34, 35}. Os aminoácidos excitatórios, como o glutamato e aspartato, são liberados no terminal nervoso e estimulam alguns subtipos de receptores, sendo os mais estudados os receptores NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato). A sequência clássica de eventos ativadores destes receptores determina a abertura de canais de cálcio, aumentando seus níveis intracelulares da ordem de 10 a 100 nM para 1 a 2 μM . Após a entrada de cálcio, segue-se o influxo de sódio, seguido de

água e cloreto. A exacerbação deste processo com a ativação mantida dos

Figura 1: Espectros de excitação (emissão 420 nm) e emissão (excitação 320 nm) do produto bruto da reação entre DOVA e BOC-Arginina em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1 :1)

receptores NMDA ocasionam posterior edema e mecanismos de degradação e apoptose neuronal. Outro subtipo de receptor, denominado metabotrópico, quando ativo aumenta os níveis de seus segundos mensageiros intracelulares: diacilglicerol e IP_3 (inositol trifosfato). Estes aumentam o cálcio intracelular, mobilizado de reservatórios internos (retículo endoplasmático e mitocôndria), e podem ativar enzimas do catabolismo celular (proteases, lipases, endonucleases) quando em

estimulação excessiva, depletando ATP e inibindo a síntese proteica³⁶. Não há, contudo, nenhum estudo avaliando a ação excitotóxica de DOVA, também acumulado naquelas doenças. Sendo um α -oxoaldeído, a ação do DOVA sobre a homeostase de cálcio poderia ser atribuída à sua reatividade com proteínas, levando à formação de bases de Schiff, semelhante ao metilglioxal, proposta do nosso grupo (Figura 1). Hoje se reconhece o envolvimento de α -oxoaldeídos no processo do envelhecimento e *diabetes mellitus*³⁷.

1.4 ALA e receptores GABAérgicos

As evidências neuroquímicas clássicas para as manifestações neuropsiquiátricas supostamente promovidas pelo ALA apoiavam-se na similaridade estrutural ALA/GABA

mostraram o antagonismo de ALA no receptor GABA_A³⁹, a liberação potencializada de glutamato⁴⁰, a dessensibilização de receptores noradrenérgicos na glândula pineal⁴¹ e diminuição do limiar convulsivo⁴².

Emanuelli e colaboradores⁴³ confirmaram a indução de convulsões após a administração intraestriatal de ALA em ratos. Também foi observada a assimetria da movimentação do dimídio contralateral nos mesmos. Neste estudo houve prevenção das convulsões com MK-801 e DNQX, respectivamente antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA não-competitivo e não-NMDA competitivo. No entanto, o agonista

GABAérgico muscimol somente diminuiu o número de convulsões em altas concentrações nos ratos tratados, bem como nos controles. O efeito farmacológico de ALA não seria esperado na presença de muscimol e contudo, a manutenção do efeito indicada pela persistência das convulsões poderia indicar uma modificação estrutural, talvez oxidativa, no próprio receptor ou na sua vizinhança lipídica.

Figura 2: Análise de Rosenthal do estudo de radioligação de ^3H -muscimol na preparação de membranas sinápticas de cérebro de ratos incubadas com ALA. A ligação total corresponde a concentrações de ^3H -muscimol variando de 1 a 10 nM. A ligação inespecífica foi determinada na presença de 1 mM de GABA. Os resultados representam a média de 2 experimentos independentes. A indica os ratos tratados cronicamente com ALA ($p < 0.001$, “one way” ANOVA) e B, a incubação *in vitro* com ALA 10 mM ($p < 0.01$, “one way” ANOVA) (retirado da Ref.33).

O modelo estudado por nós³³, utilizando membranas sinápticas, evidenciou através de ensaios de radioligação, com ^3H -muscimol na

presença de 10 mM de ALA ou após tratamento crônico com 40 mg/kg em ratos alteração do Kd (constante de dissociação do complexo receptor-ligante), mas sem mudança no “pool” total de receptores (Figura 2A e B retirada da Ref. 33). O aumento da constante se manteve mesmo após a retirada de ALA do meio, corroborando a ocorrência de lesão oxidativa no sítio GABAérgico. Não podemos até o momento inferir a localização da modificação química; se no receptor ou na vizinhança lipídica. Outro aspecto não esclarecido é se o DOVA afetaria o sistema GABAérgico, não pelo mecanismo oxidativo, mas através de um antagonismo farmacológico (similaridade estrutural com o GABA) ou através de sua reatividade em formar adutos cíclicos com proteínas similar ao que acontece nos AGEs (“Advanced Glication End Products”)⁴⁴.

A propósito, recentemente foi relatada a formação de adutos cíclicos resultantes da reação entre bases púricas de DNA e DOVA, o qual desempenha o papel de um agente alquilante eficiente da porção guanina, tanto dentro de nucleosídeos quanto do DNA isolado⁴⁵. Di Mascio e *col*⁴⁶, estudando o papel de ferritina, ALA e DOVA em danos ao DNA, relataram que ALA, em presença de ferritina, é capaz de aumentar a oxidação da porção guanina de 2-deoxigunosina (dGuo), sendo detectados os adutos DOVA-dGuo em DNA de fita dupla. Estes resultados embasaram a hipótese de que a hepatocarcinogênese aumentada em portadores de PAI, principalmente os do sexo feminino e que apresentaram várias crises agudas, possa resultar da lesão oxidativa ao DNA por DOVA⁴⁶ e radical hidroxil⁴⁷, oriundos de ALA.

2. OBJETIVO

Estudamos, nesta dissertação, os mecanismos pelos quais ALA e DOVA exercem seus efeitos nos sistemas nervoso central e periférico, utilizando sinaptosomas corticais de ratos e células de retinoblastoma humano (células WERI) como modelos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todos os solventes orgânicos citados abaixo foram de grau HPLC e os reagentes inorgânicos de grau analítico. A água utilizada foi deionizada pelo sistema MilliQ da Millipore.

Foram utilizados os seguintes reagentes da SIGMA: GABA (ácido γ -aminobutírico), albumina bovina, catalase, CuZnSOD (cobre-zinco superóxido dismutase); ácido 5-aminolevulínico.HCl, desferroxamina, digitonina, DTT (ditiotreitól), EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), EGTA (ácido etileno glicol-bis[β -aminoetil eter] N,N,N',N' -tetra-acético), Ficoll (polímero de sacarose), FURA 2-AM (marcador fluorescente de íons Ca^{2+}), glutathione redutase, Hepes (ácido N -[2-hidroxietil]piperazina- N' -[4-butano-sulfônico]), luminol (95-amino-2,3-dihidro-1,4-phtalozinodiona), manitol, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida), nifedipina (1,4-dihidropiridina), pepsina, peróxido de hidrogênio a 30%, POPOP (1,4-bis-[4-metil-5-fenil-2-oxazolil]benzeno), PPO (2,5-difeniloxazol), rotenona, sacarose, serotonina, succinato, Tris (tris[hidroximetil]aminometano), Triton X-100 (t-octilfenoxipoliétoxi-etanol), Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico), "Trypan Blue" (corante para avaliação da viabilidade celular), vermelho de rutênio e Vitamina E (α -tocoferol).

Merck: cloretos de cálcio; ferro (III); magnésio; manganês e potássio; N -etilmaleimida; fosfato de potássio mono e dibásico; hidróxidos de potássio e sódio; peróxido de hidrogênio; dimetilsulfóxido (DMSO); tolueno.

Amersham International: ^3H -muscimol (28,5 Ci/mmol)

Fisher: DMEM (meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco),
Permout, soro fetal bovino (SFB)

Santa Cruz: Anticorpo monoclonal feito em cabra contra a subunidade β do receptor GABA_A (ligado ao canal de cloreto)

Vector Labs.: kit ABC Elite (revelador da imunomarcação com avidina-biotina-peroxidase), anticorpo anti-cabra biotinilado feito em coelho

JENSEN: Ácido dietilenotriamonopentacético (DTPA)

3.1.1 Síntese de DOVA

DOVA foi sintetizado pela rota descrita no esquema II segundo Ihmels e colaboradores⁴⁸

Esquema II:

3.1.1.1 Preparação do Diazometano

Uma solução contendo 8,0 g de diazald[®] (*N*-metil-*N*-nitroso-4-toluenosulfonamida) em 100 mL de éter etílico foi preparada e transferida para uma aparelhagem de destilação desprovida de juntas esmerilhadas mantida a 0°C. A seguir adicionou-se rapidamente uma solução etanólica de KOH (5,0 g em 20 mL). Após adição, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional aquecida a 40°C permitindo a destilação do

diazometano, o qual foi recolhido em éter (~150 mL) a aproximadamente -78°C. A solução etérea amarela obtida foi mantida a -18°C sobre pastilhas de KOH durante 4 h para secagem.

3.1.1.2 Preparação da Diazocetona (**2**)

Após secagem e filtração do secante, a solução etérea do diazometano foi adicionada a 1,22 g (7,4 mmols) do cloreto de etil succinila (**1**) durante aproximadamente 10 min a -20 °C. A mistura reacional foi mantida sob agitação entre -10 °C e 0 °C durante 1 h e, a seguir aquecida até temperatura ambiente. Para eliminar o excesso de diazometano borbulhou-se N₂ durante 20 min. O produto bruto foi purificado através de coluna cromatográfica de SiO₂ (hexano/acetato de etila: 3:2, R_f=0,34) fornecendo **2** como um óleo viscoso amarelo.

Rendimento: 1,18 g (6,9 mmols, 93%).

IR (CH₂Cl₂ solution): 2109 cm⁻¹ (N=N)

RMN-¹H (CDCl₃, 200 MHz): 5,35 (br.s, 1H), 4,15 (q, 2H, J=6Hz), 2,65 (s, 4H), 1,25 (t, 3H, J=6Hz).

RMN-¹³C (CDCl₃, 50,3 MHz): 14,0 (C-7), 28,6 (C-6), 60,6 (C-3, C-4), 172,4 (C-2), 192,8 (C-5)

3.1.1.3 Preparação da Dimetildioxirana (DMD)

A aparelhagem necessária para a preparação consiste de um balão de 3 bocas de fundo redondo de 500 mL munido de agitador mecânico, funil de adição de sólido e um tubo vertical de vidro conectado a um dedo frio. O dedo frio foi conectado a um frasco coletor de 200 mL, sendo utilizados gelo seco e acetona para resfriar o dedo frio e o coletor. Acetona (120 mL), água destilada (180 mL) e bicarbonato de sódio (108 g) foram colocados no balão e agitados vigorosamente a 0 °C. Oxone (220 g) foi adicionado rapidamente através do funil de adição de sólido, sendo aplicado um vácuo de 50-100 mmHg, durante aproximadamente 2 h, permitindo a destilação de uma solução amarela de **DMD** em acetona. A solução de DMD foi mantida em “freezer” a -15°C “overnight” sobre peneira molecular de 4 Å.

3.1.1.4 Obtenção de DOVA

Uma solução de 170 mL (0,01 mol) de dimetildioxirana (0,06 M) em acetona foi adicionada durante 20 min. sobre a solução de diazocetona **2** (1,48 g, 8,7 mmols) em acetona (20 mL) a temperatura ambiente. Durante adição é possível observar o desprendimento de N₂. Após agitação durante 8 h a temperatura ambiente, o solvente foi evaporado, sendo obtido **DOVA** como um óleo incolor.

Rendimento: 95%

RMN-¹H (d₆-DMSO, 200 MHz, mistura de tautômeros): 1,25 (t, 3H), 2,8 (t, 2H), 3,2 (t, 2H), 4,2 (q, 2H), 4,8 (br.s, 1H), 5,2 (m, 1H), 6,8 (br.s, 1H), 8,2 (s, 1H).

Análise do espectro de RMN-¹H revela a presença de formas tautoméricas (hidratos), cujos sinais se sobrepõem ao do próprio DOVA (Esquema III).

Esquema III:

3.1.1.5 Formação da Quinoxalina derivada de DOVA

DOVA 100 mg (0,6 mmols) dissolvido em etanol foi misturado a quantidades estequiométricas de 1,2-fenilenodiamina (60 mg) em etanol e mantidos sob agitação durante 12 h. A mistura reacional tornou-se amarela imediatamente após a mistura das soluções. O solvente foi evaporado e o produto bruto, um óleo marrom escuro, foi recristalizado de hexano/diclorometano, resultando num sólido incolor em forma de agulhas.

RMN-¹H (CDCl₃, 200 MHz): 1,2 (t, 3H, J=8Hz), 2,9 (t, 2H, J=8Hz), 3,4 (t, 2H, J=8Hz), 4,2 (q, 2H, J=8Hz), 7,6-8,2 (m, 4H), 8,8 (s, 1H).

RMN ¹³-C (CDCl₃, 50.3 MHz): 14,2, 30,4, 32,4, 60,7, 128,4, 128,7, 129,7, 130,5, 145,5, 155,2, 172,6.

3.1.2 Reação entre DOVA e BOC-Arginina

3.1.2.1. Tentativa 1:

DOVA (0,158 g, 1 mM) foi incubado com BOC-Arginina (0,310 g, 1 mM) em tampão fosfato/500 mM, pH 7.4, durante 7 dias à temperatura ambiente. Ao final do período o solvente foi evaporado e o produto bruto extraído com metanol.

3.1.2.2 Tentativa 2:

Após um período de incubação durante 7 dias em solução tampão 100 mM, a mistura reacional foi tratada com HCl 0,1 M e mantida sob agitação durante 2 h. Após extração com éter etílico, secagem sob MgSO_4 , filtração e evaporação do solvente, o produto foi submetido a análises via HPLC, espectrofotométrica e espectrofluorimétrica.

3.1.2.3 Tentativa 3:

Após um período de incubação durante 15 dias em solução tampão 100 mM, a mistura reacional foi submetida a liofilização e re-suspensão em metanol. Análise através de HPLC nas seguintes condições: ácido acético 50 mM/0,1% metanol (fase A) e metanol (fase B) como eluentes (programa: 0 – 15 min: 0% B, 15 – 30 min: 10 – 50% B) possibilitou o isolamento de um pico em ~ 3,5 min. A grande vantagem da metodologia é a ausência de produtos secundários e os altos rendimentos globais obtidos, superiores a 80%.

Todo o procedimento de síntese de DOVA e sua detecção além da obtenção e caracterização dos adutos DOVA-BOC-arginina foi realizado

pela Dra. Ana Luiza Petillo Nery, testado em colaboração com o Prof. Dr. Waldemar Adam, sob supervisão do Dr. Heiko Ihmels na Universidade de Würzburg (Alemanha) foi reproduzido com sucesso em nosso laboratório, obtendo-se DOVA com um rendimento de aproximadamente 88%.

3.2 Preparação de sinaptosomas

Sinaptosomas foram preparados pelo método de Cotman e Matthews⁴⁹ de córtex cerebral. Ratos Wistar machos submetidos a ciclo claro-escuro normal de 2 meses de idade (180-220 g) alimentados regularmente, foram sacrificados por destroncamento cervical. O cérebro foi removido e o tecido imediatamente dissecado no gelo para preparação sinaptosomal. A concentração de proteína foi determinada com o kit da BIO RAD. Sinaptosomas foram ressuspensos em 0.32 M de sacarose tamponado com Hepes 10 mM, pH 7.4, e mantido a 4°C por no máximo 2 dias para os ensaios.

3.3 Determinação de cálcio livre intrassinaptosomal

O cálcio intrassinaptosomal foi determinado por espectros de fluorescência com FURA 2 - AM como descrito por Nachshein⁵⁰. Aliquotas sinaptosomais (10 mg de proteína/ml) foram incubadas em tampão Hepes - Krebs 10 mM, contendo NaCl 124 mM, KCL 5mM, KH₂PO₄ 1.24 mM, MgCl₂ 1.3 mM, e glicose 10 mM, às quais foi acrescentado FURA 2 - AM 2 µM por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, a suspensão sinaptosomal foi lavada 2 vezes por centrifugação a 14.000 g por 2 minutos em uma microcentrifuga Eppendorf. O “pellet” final foi ressuspensado no mesmo

tampão na concentração de 10 mg de proteína/ml e aliquotado para futuras incubações e medição da fluorescência em amostras de volume final 1 ml com 0,5 mg de proteína/ml. Os ensaios foram realizados em um espectrofluorímetro da Fluorolog Spex Model 1681, medindo-se emissão em 470 nm sob excitação de 340 nm.

3.4 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Esta técnica foi descrita por Lemasters e colaboradores⁵¹. Sinaptosomas isolados (0.8 mg/ml) foram ressuspensos em tampão Hepes - Krebs 10 mM pH 7.4, acrescido de albumina sérica bovina 2 mg/ml e 1 μ M de Rodamina 123. Após incubação em intervalos de tempo variados, alíquotas de 1 ml foram centrifugadas a 14.000 g por 2 minutos em uma microcentrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi removido, e o “pellet” contendo os sinaptosomas foram ressuspensos no mesmo tampão contendo 0.1% de Triton X-100. Após 10 minutos, as amostras foram novamente centrifugadas por 2 minutos. A liberação de Rodamina 123 no sobrenadante foi medida em um espectrofluorímetro da Fluorolog Spex Model 168. O corante liga-se na membrana mitocondrial interna quando a mitocôndria está acoplada e tem emissão fluorescente a 523 nm, cujo pico de excitação é 501 nm. Quando o potencial transmembrânico dissipa-se, a Rodamina 123 desprende-se para a matriz, acompanhada de queda na emissão fluorescente.

3.5 Avaliação do consumo de oxigênio por mitocôndrias intrassinaptosomais

Estas determinações foram realizadas tal como Scott e Nicholls⁵², em um oxígrafo Yellow Spring, modelo YSI 53, utilizando um eletrodo “standart” ISI 5331 a 37°C. Os sinaptosomas (1.5 – 2.0 mg de proteína/ml) foram incubados em tampão Hepes 10 mM, pH 7.4, contendo NaCl 124 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 1.24 mM, MgCl₂ 1.3 mM, CaCl₂ 1mM e glicose 10 mM. O registro do consumo foi iniciado e após 8 minutos outras adições foram feitas como indicado na legenda da figura.

3.6 Ensaios de radioligação em sítios GABAérgicos

Foram tomadas alíquotas das preparações de tecido (0,3 - 0,8 mg proteína) incubadas em triplicatas. No ensaio, os sinaptosomas foram incubados em tampão Tris 10 mM, pH 7.35 no gelo por 30 minutos na presença de ³H - muscimol em concentrações que variaram de 1 a 10 nM (ligação total) na ausência ou presença de GABA 1 mM (ligação inespecífica). As incubações foram terminadas pela filtração a vácuo das amostras em sistema de filtração múltipla, através de membranas GF/B Whatman. Após filtração, as membranas foram lavadas 2 vezes com 3 ml de tampão gelado. Os filtros foram secados a 50°C por 50 minutos, transferidos para o líquido de cintilação e feita a contagem. Todos os radioligantes e drogas utilizadas para estabelecimento da ligação inespecífica foram diluídas momentos antes do ensaio no tampão-padrão. Os dados foram plotados pelo método de análise de Scatchard para a

determinação do número máximo de ligação ($B_{\max}$) e da constante de dissociação do receptor (K_d)⁵³.

3.7 Cultura de células e aferição de taxa de mortalidade

Células de linhagem neuronal WERI (derivadas de retinoblastoma humano), provenientes de estoques celulares congelados em meio contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos em reservatório de nitrogênio líquido pertencentes a Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar do Departamento de Bioquímica, IQ-USP, foram cultivadas em frascos plásticos adequados, contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células WERI crescem em suspensão. O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica utilizando câmara úmida a 37°C sob atmosfera de CO₂ 5%. As células na densidade de 5x10⁵ células/ml foram expostas a diferentes concentrações de ALA e DOVA durante 48 horas sem troca do meio.

A taxa de mortalidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com “Trypan Blue”. Este corante acumula-se somente no citosol das células mortas, destacando-as pela coloração azul resultante, que posteriormente são contadas em um hemocitômetro (câmara de Neubauer).

3.8 Análise de imuno-histoquímica

A partir de cada condição de cultura, alíquotas de 200 µl (~1x10⁵ células) foram colocadas em lâminas gelatinizadas e deixadas para

secagem em plataforma aquecida a 40°C. Após a secagem, as células depositadas nas lâminas foram fixadas com paraformaldeído 2% em tampão fosfato (PB) 100 mM gelado durante 10 minutos e lavadas a seguir com PB 100 mM, pH 7.4 em temperatura ambiente. Mantendo as células úmidas com o tampão, adicionou-se sobre as lâminas a solução contendo o anticorpo primário contra a subunidade β do receptor GABA_A diluído a 1:1000 em PB 100 mM contendo Triton X-100 0.01% e soro normal (5%) de coelho de maneira a cobrir toda a lâmina. A incubação com o anticorpo primário foi feita por um período de 12 a 18 horas à temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, em câmara acrílica, não permitindo a secagem das células. Terminada a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas 3 vezes em PB 100 mM por 10 minutos cada sob agitação leve. Seguindo o mesmo procedimento do anticorpo primário, foi adicionada sobre as células a solução contendo o anticorpo secundário anti-cabra biotinilado feito em coelho (Vector Labs., Burlingame, CA), diluído a 1:200 em PB 100 mM contendo Triton X-100 0.01%, novamente de forma a cobrir toda a extensão da lâmina. A incubação com anticorpo secundário durou 2 horas, no mínimo. As células foram novamente lavadas como anteriormente descrito em PB 100 mM e incubadas com uma solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite, Vector Labs.) por 1 hora. A revelação da imunomarcação foi obtida com a reação com 0.05% de 3,3'-diaminobenzidina e uma solução 0.01% de peróxido de hidrogênio em PB 100 mM. As células foram desidratadas e as lâminas cobertas com lamínulas usando-se Permount. O material foi analisado em microscopia óptica convencional, as imagens coletadas utilizando o programa Image

1.59, distribuído pelo N.I.H. (USA) e montadas no programa Adobe Photoshop 5.0 (Deneba, CA, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do ALA na captação sinaptosomal de cálcio

Figura 3: Espectros de excitação do FURA 2 - AM (λ emissão 470nm) intrassinaptosomal refletindo a concentração citossólica do Ca^{++} com tampão Hepes-Krebs, pH 7.35 a 37°C obtidos com o sistema ALA/sinaptosomas. As incubações foram de 30 minutos com volume final de 1 ml por amostra na concentração de 0.5 mg de proteína/ml. O painel mostra as diferentes captações em concentrações crescentes de ALA e o painel B com DOVA nas concentrações de 0.5 a 5.0 mM sem ALA. Os espectros são representativos de 5 experimentos independentes. As condições do experimento estão discutidas no item 2.3 de Materiais e Métodos.

A concentração de cálcio intrassinaptosomal é dependente da concentração do mesmo no meio externo^{50, 54}. Como demonstrado na figura 2, a concentração de cálcio intrassinaptosomal respondeu de forma

crescente com o aumento de cálcio no meio externo, com elevação inicial lenta. Esta captação teve seu ritmo aumentado até a homeostase de cálcio ser alcançada com a concentração de cálcio externo de 1 mM, o que corresponde aos níveis fisiológicos séricos, e após, manteve saturação. Este resultado, além de mostrar que o sinaptosoma capta cálcio, revela a capacidade dele de controlar seus níveis internos, aproximando-se do modelo celular. Com este controle também comprovamos a qualidade da preparação utilizada e a fidedignidade dos resultados com ela obtidos relacionados com a homeostase de cálcio.

Fixando a concentração externa de cálcio em 1 mM no tampão, os sinaptosomas foram incubados na presença de concentrações crescentes de ALA e DOVA. ALA em concentrações de 0.5 a 5 mM estimulou a captação de cálcio na preparação sinaptosomal (0.5 mg/ml) incubado por 30 minutos com FURA 2 - AM mostrado na Figura 3A. Notamos a pequena variação na concentração intrassinaptosomal de cálcio nas concentrações de 0.5 e 1 mM de ALA (Figura 3A e 4). Isto provavelmente indica a capacidade do sistema em tentar manter a homeostase de cálcio para evitar a ativação de processos degradativos^{34, 36}. Com este ensaio controle, ao expormos a preparação sinaptosomal a concentrações equivalentes de DOVA, não há efeito (Figura 3B). Apesar de esta metodologia confirmar o efeito pró-oxidante de ALA na captação de cálcio sinaptosomal e descartar ação direta de DOVA, ela é incapaz de avaliar de modo definitivo se a reatividade de DOVA frente a resíduos proteicos possam também ter algum influência na homeostase de cálcio tecidual, pois a caracterização de adutos fluorescentes de DOVA com BOC-arginina (Figura 1) somente

ocorreu após 48 horas a 25°C. Este tempo de incubação nesta temperatura afeta a integridade do sinaptosoma. A emissão fluorescente lida a 420 nm é similar nas amostras de sinaptosomas controle sem DOVA e incubados com DOVA (0.5 a 5.0 mM) até por 1 hora a 37°C em tampão fosfato 100 mM, pH 7.35, indicando não haver participação de adutos tipo Schiff na exposição aguda de sistemas biológicos ao DOVA.

Tabela 1: Efeito de antioxidantes sobre a captação intrassinaptosomal de cálcio

	CONTROLE	ALA 2 mM	ALA 6 mM
Basal	120.0 ± 2.0	150.0 ± 4.0*	180.0 ± 4.0*
DTT 100 µM	121.0 ± 2.5	134.5 ± 3.0*	145.0 ± 3.0*
Trolox 100 µM	118 ± 3	NR	150.0 ± 3.5*
Catalase 2 µM	118 ± 2	134.5 ± 2.5*	150.0 ± 3.5*
SOD 200U	120 ± 2	NR	155.0 ± 4.0*
Desferoxamina 100 µM	121 ± 2	NR	150.0 ± 4.0*
Manitol 100 mM	122.0 ± 2.5	NR	155.0 ± 3.0
Vitamina E 100 µM	115.0 ± 1.5	129.0 ± 2.5	NR

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e estão expressos em nM de cálcio interno livre. As condições experimentais foram as mesmas descritas na legenda da Figura 1. A concentração de cálcio externo foi de 1 mM. NR, não realizado. * Diferença do controle para $p < 0.01$ (teste "Student's t ")

Figura 4 : Captação de cálcio livre intrassinaptosomal na presença de concentrações crescentes de ALA sob tensão variável de O_2 na presença e ausência de SOD no meio. As condições experimentais são as mesmas relatadas na legenda da Figura 3. Os resultados são os representativos de 3 experimentos independentes para cada condição acima.

O efeito estimulatório do ALA sobre a captação de cálcio pelos sinaptosomas é revertido parcialmente por vários antioxidantes e bloqueadores do canal de cálcio, apresentados na tabela 1. Desta forma, podemos afirmar a participação da lipoperoxidação e oxidação proteica no efeito estimulador de ALA sobre a captação de cálcio intrassinaptosomal.

No estudo anterior foi utilizado o éster etílico de DOVA (4,5-dioxoalato de etila). Para avaliar se a velocidade de oxidação de ALA a DOVA (forma ácida) influenciaria o efeito observado e tornando assim mais “fisiológico” o ensaio na obtenção de DOVA, foi utilizada solução estoque de ALA 100 mM em água deionizada, com pH acertado para 8 por adição de NaOH e submetida a oxidação exaustiva sob 3 condições de fluxo baixo de oxigênio ou ar, em sistema aberto de modo a evitar a perda de volume significativo por 3 horas: sob ar (O_2 a 21%), O_2 a 100% sem SOD e, O_2 a 100% com 200 U de SOD. A utilização de SOD e catalase (controles) justifica-se para prevenir a auto-oxidação de ALA enol, decorrente de geração de altas concentrações de $O_2^{\bullet-}$ que propaga o processo. As diferenças na captação de cálcio por ALA oxidado sob fluxo de ar comprimido e O_2 a 100% tiveram diferenças nas concentrações de 0.5 e 1 mM de ALA nas amostras. A diferença nas concentrações de ALA enol radical pode explicar tal efeito. Deve-se considerar que nesta faixa ainda de 0.5 e 1 mM há regulação do aporte sinaptosomal de cálcio, sob ar a concentração da forma enol e portanto do radical enol deve ser maior que na oxidação sob fluxo a 100% de O_2 potenciando assim seu efeito oxidativo. No entanto, no final as duas condições convergem (Figura 4). Possivelmente, nesta situação, o dano oxidativo promovido por ALA enol radical²³ estimule a captação de cálcio, enquanto o sinaptosoma tenta dispor de sua capacidade de transportar o cálcio para o meio externo, mantendo os níveis sob controle. Isto aconteceria até essa concentração

Figura 5: Estudo da captação de cálcio intrassinaptosomal estimulado por ALA oxidado a 100% de O_2 contendo SOD 200 U desde o início da oxidação de ALA, na presença e na ausência de catalase 2 μ M. As condições experimentais são as mesmas descritas na Figura 4. Os resultados acima são os representativos de 3 experimentos independentes com $p < 0.03$ em relação ao controle.

citossólica chegar à concentração em que a cascata de degradação celular se inicia (a partir de 2 mM de ALA) (Figura 7A e 7D). Surpreendentemente as amostras com ALA oxidado a O_2 100% com 200 U de SOD apresentaram níveis de captação maiores que nas outras condições, e não uma esperada redução (Figura 4). No entanto, a reprodução desta condição mais o acréscimo de 2 μ M de catalase na solução estoque de ALA

antes de iniciar a oxidação promoveu o retorno dos níveis de cálcio até abaixo dos estimulados por ALA 5 mM sob fluxo de ar (Figura 5), o que indica o envolvimento de H_2O_2 na captação intrasinaptosomal de cálcio estimulado por ALA (Esquema I).

4.2 Efeito de ALA no consumo de oxigênio de mitocôndrias intrassinaptosomais

Figura 6: Respiração mitocondrial. Sinaptosomas (1.5-2.0 mg de proteína/ml) foram incubados em tampão Hepes-Krebs a 37 °C em uma câmara com eletrodo sensível a oxigênio como descrito em Materiais e Métodos. Após pré-incubação por 8 min., adições sucessivas foram feitas como indicado: oligomicina 2 µg/mg (Oligo), Vitamina E 100 µM (Vit E), e digitonina 40 µM. A amostras A, B, C e E foram incubadas na presença de cálcio externo 1 mM. As amostras D foram incubadas em tampão livre de

cálcio. Os valores assinalados em parênteses representam as taxas respiratórias em nmol/mg de proteína sinaptosomal/min.

Esperava-se que o aumento de cálcio nos sinaptosomas tivesse papel citotóxico neste sistema. Para avaliar esta toxicidade relativa ao influxo de cálcio mediado por ALA foi estudado consumo de oxigênio das mitocôndrias intrassinaptosomais, como se segue.

Como todas as preparações de sinaptosomas são contaminadas em maior ou menor extensão com mitocôndrias livres, as determinações de consumo de oxigênio foram feitas em tampão contendo glicose 10 mM, condição esta que exclui a respiração de mitocôndrias extrassinaptosomais⁵². A amostra contendo sinaptosomas (1.5-2.0 mg de proteína/ml) foi incubada por 8 minutos. Após este tempo observando o consumo basal de oxigênio é colocado oligomicina 2 µg/ml (inibidora da porção F1 da ATP sintase mitocondrial) no sistema com significativa diminuição no consumo de oxigênio de 1.3 para 0.45 nmol/mg/min (Figura 6 A). Este ensaio garante a integridade da mitocôndria sinaptosomal desde que a fosforilação mitocondrial seja mantida. A análise do experimento em si mostrou que ALA 2 mM inibiu o consumo de oxigênio sinaptosomal de 1.7 para 0.45 nmol/mg/min (Figura 6 B). O efeito observado depende da lipoperoxidação e presença de cálcio externo, visto que a inibição do consumo por ALA foi parcialmente revertida na presença de um antioxidante de membrana (Vitamina E, 100 µM) (Figura 6C) e na ausência de cálcio (Figura 6 D). O ensaio com digitonina 40 µM, permeabilizante de membranas foi conduzido para mostrar máximo

bloqueio do consumo, principalmente mediado pelo consumo mitocondrial de cálcio.

4.3 Efeito de ALA sobre o potencial transmembrânico mitocondrial

Figura 7: Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial intrassinaptosomal. As amostras foram incubadas na presença de CaCl_2 1 mM e a fluorescência medida com as indicações de tempo e adições descritas acima. Os controles foram incubados na ausência de ALA. As condições experimentais de cada amostra se encontram descritas na seção 2.4 de Materiais e Métodos. DTT= ditioneitol, RR= vermelho de rutênio (inibidor do transportador mitocondrial de cálcio). Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes com $p < 0.05$

Em paralelo, foi avaliada a perda do potencial transmembrânico de mitocôndrias intrassinaptosomais induzidos pelo ALA, utilizando marcador fluorescente Rodamina-123.

A incubação dos sinaptosomas, com concentrações crescentes de ALA, resultou na liberação da Rodamina-123 já pré-incubada (ver Materiais e Métodos), mesmo após 15 minutos, com concentrações de 0.5 e 1.0 mM, e houve dissipação de 40% do potencial (Figura 7 A). Para determinar o colapso do potencial da membrana mitocondrial, 2 μ M de FCCP (desacoplador transmembrânico de potencial) foi adicionado ao meio na presença de 40 μ M de digitonina para permitir a entrada daquele. Nesta condição, a perda total observada foi similar à incubação de ALA 2 mM (dado não mostrado). A abolição do potencial mitocondrial do sinaptosoma promovido pelo ALA foi revertida parcialmente na presença de alguns antioxidantes: catalase, DTT, desferoxamina, vitamina E, Trolox (Figura 7 B). Destes, os antioxidantes que tiveram maior efeito na preservação do dano causado pelo ALA foram os lipossolúveis como a vitamina E 100 μ M (Figura 7 B). Este efeito é justificado pela capacidade de a vitamina E ser internalizada pelo sinaptosoma e atuar inserida na membrana mitocondrial, provável alvo da lesão radicalar gerada pelo ALA. Já o DTT (composto tiólico redutor) e o Trolox (análogo da vitamina E), ambos hidrossolúveis, não apresentaram proteção antioxidante sobre o potencial de membrana comparável à sua ação na captação de cálcio sinaptosomal (Tabela 1). Tal efeito foi similar ao de nifedipina, bloqueador de canal de cálcio tipo L da membrana plasmática.(Figura 7 C). No entanto, o influxo de cálcio mitocondrial tem papel relevante no colapso do

potencial transmembrânico. Houve preservação do potencial quando vermelho de rutênio 1 μM , inibidor do transportador mitocondrial de cálcio, foi incubado junto ao ALA 2 mM, mantendo assim o potencial praticamente igual ao controle sem ALA (Figura 7D).

4.4 DOVA e sítios GABAérgicos: ensaio de radioligação

Figura 8: Curva de radioligação de ^3H -muscimol em sinaptosomas, na presença e na ausência de DOVA 2 mM. A variação máxima até 250 nM (gráfico inserido) determinou os perfis de marcação de ligação total (esferas pretas), inespecífica (esferas azuis) e específicas (esferas vermelhas). Neste experimento controle, a faixa onde a ligação inespecífica é a menor situa-se entre 0 e 25 mM de ^3H -muscimol livre.

Como o DOVA não se mostrou atuante na homeostase do cálcio dos sinaptosomas, foram conduzidos estudos para avaliar sua possível influência sobre o sistema neuroquímico do GABA, mais precisamente se haveria alteração no perfil dos receptores GABA_A ligado ao canal de cloreto. Para averiguar a melhor faixa de concentração do ³H-muscimol, foi feito ensaio controle com sinaptosoma variando a concentração do ³H-muscimol de 5 a 250 nM. A faixa ótima de ligação, com menor relação de sítios não específicos para sítios específicos, foi obtida entre 5 e 25 nM (Figura 8).

Estabelecidas as condições experimentais, o ensaio de ligação com ³H-muscimol, na ausência e na presença de DOVA 2 mM, incubados no gelo por 30 minutos, mostrou deslocamento inferior da curva de ligação na presença de DOVA, significando uma diminuição da ligação nos sítios de 50% (Figura 9). O gráfico de Rosenthal⁵³, entretanto, não se mostrou linear como no experimento com membranas sinápticas por Demasi e cols³³. Ao invés, demonstrou-se curvilíneo, não sendo possível determinar pela análise de Scatchard o K_d (constante de dissociação ligante-receptor) nem o B_{max} (concentração de sítios específicos livres e expostos). Como o sinaptosoma é um sistema biológico organizado com organelas funcionantes, pressupomos que o perfil da curva seja decorrente de outros possíveis sítios de ligação GABAérgicos disponíveis com K_ds diferentes, obtidos pela inclinação das retas derivadas que compõem o gráfico curvilíneo⁵³ (subtipos de receptores GABA_A e até mesmo outros receptores distintos de GABA_A, como por exemplo os GABA_B ligados à proteína G⁵⁵).

A afinidade desses outros receptores pelo ^3H -muscimol é reduzida mas pode influenciar a determinação da ligação total.

Figura 9: Gráfico de Rosenthal. Ensaio de radioligação com ^3H -muscimol em sinaptosomas, na presença (esferas vermelhas) e na ausência (esferas azuis) de DOVA 2 mM. Observa-se a queda de B_{max} , representado pela diminuição de ^3H -muscimol ligado especificamente aos sítios gabaérgicos sinaptosomais (gráfico inserido). As condições experimentais são as mesmas das descritas na seção 2.6 de Materiais e Métodos.

O gráfico de Rosenthal, neste ensaio de radioligação, evidenciou que as amostras incubadas na presença e ausência de DOVA têm o mesmo perfil de curva, sugerindo cinética de ligação similar (mesmo K_d). Este resultado é diferente da modificação oxidativa observada no K_d de

receptores GABA_A em membranas sinápticas de córtex de ratos tratados com ALA 10 mM³³. Os sítios livres expostos, contudo, estão com diferentes valores, cerca de 50% de redução na concentração de ligação a DOVA 2 mM (redução de B_{max}), no entanto o mecanismo de tal efeito não pôde ser elucidado por esta técnica. Nesta etapa do trabalho, observamos a nítida diferença entre o mecanismo de ação de ALA e DOVA em sinaptosomas. O primeiro parece estar relacionado à quebra da homeostase de cálcio e colapso energético mitocondrial, e o segundo, interferindo no metabolismo da via GABAérgica, ambos na exposição aguda.

4.5 Estudos de viabilidade celular com ALA e DOVA, utilizando células WERI

Para explorar mais detalhadamente o possível papel patológico do DOVA relacionados aos distúrbios porfirínicos, utilizamos células transformadas de linhagem neuronal WERI (células de retinoblastoma humano com mutação no gene *rb*), que expressam receptores de GABA_A em suas membranas. Foram feitos testes de imunohistoquímica prévios à condução dos experimentos que se seguiram com aquelas células, confirmando a expressão de receptores GABA_A em suas membranas. Estes testes foram feitos com anticorpos monoclonais para o receptor GABA_A contra a subunidade β feito em cabra. Os experimentos com cultura celular e índice de mortalidade foram desenvolvidos no laboratório da Prof. Dra. Eugênia Costanzi-Strauss, Departamento de Embriologia e Histologia e os de imuno-histoquímica no laboratório do Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP.

Figura 10: Células WERI em cultura com meio DMEM e SFB a 10% expostas a ALA 10 mM e DOVA 1 e 10 mM. As células foram incubadas em câmara úmida sob atmosfera CO₂ 5%/Ar 95% a 37°C por 48 horas. Foram fotografados os achados representativos das culturas, sendo a incubação com ALA 1 mM similar ao controle. Os dados acima são representativos de 3 experimentos independentes.

Nesta etapa do trabalho foram incubadas as células WERI em meio DMEM e SFB a 10% por 48 h na presença de ALA ou DOVA, em concentrações 1 e 10 mM, respectivamente. As células em concentração inicial de 5×10^5 células/ml foram observadas sem troca de meio durante a incubação, utilizando câmara úmida com CO₂ 5%/Ar 95% a 37°C. Após 48 h, as células incubadas com ALA 10 mM e DOVA 1 mM perderam seu

aspecto de crescimento e disposição normais. Estas células, que normalmente crescem em suspensão, formando “cachos”, foram perdendo a citomorfologia típica, apresentando-se “grumadas” e destacando-se do agregado inicial. A membrana perdia sua refringência própria tornando-se pálida e pregueada, caracterizando sofrimento celular (Figura 10).

Figura 11: Mortalidade celular aferida em câmara de Neubauer pelo método de “Trypan Blue” após 48 horas de incubação em culturas com 5×10^5 células. As condições experimentais são as mesmas descritas na Figura 10. Amostras em duplicatas (* $p < 0.001$).

A exposição a ALA 1 mM não teve efeito visível. No grupo incubado com DOVA 10 mM, o efeito foi mais pronunciado, estando presente intensa balonização celular, precipitação de células mortas no fundo da cultura. Seu ambiente intracelular mostrava núcleo picnótico e organelas degradadas (Figura 10). No entanto, não foi possível quantificar a mortalidade suposta de ALA e DOVA pelo simples aspecto da cultura. Para tal, foi utilizada a técnica de “Trypan Blue” 0.2% para aferição de mortalidade, procedimento descrito em Materiais e Métodos.

Apesar de ALA e DOVA terem modificado a morfologia das células WERI em cultura, somente o DOVA 1 e 10 mM promoveram significativo aumento na mortalidade celular, com cerca de 48 e 84%, respectivamente, se comparado com 9, 13 e 12% de taxa de mortalidade do controle e das exposições de ALA 1 e 10 mM, respectivamente (Figura 11). Novamente resta ressaltar que este efeito na taxa de mortalidade é de natureza “tudo ou nada”, ou seja, não se pode inferir nada sobre o metabolismo energético celular, nem sobre seu perfil de sinalização bioquímica. Sob este prisma, o efeito do ALA no desarranjo citomorfológico não pôde ainda ser adequadamente avaliado, nem a cronicidade da exposição.

4.6 Ensaio de imuno-histoquímica com receptores GABA α subunidade β em células WERI

A imuno-histoquímica das células WERI para receptores GABA α subunidade β foi realizada após avaliação da taxa de mortalidade, utilizando alíquotas das mesmas células tratadas em cultura do experimento anterior. Desta maneira, a revelação da imunomarcagem foi

similar nas células controle e naquelas tratadas com ALA 1 e 10 mM e DOVA 1 mM. Somente o tratamento com DOVA 10 mM mostrou

Figura 12: Imuno-histoquímica utilizando anticorpos monoclonais contra a subunidade β dos receptores GABA_A em células WERI. As células foram coletadas em alíquotas do tratamento em cultura, descrito na Figura 10, e em Materiais e Métodos. Houve alteração de marcação significativa somente no tratamento com DOVA 10 mM, onde se detectam receptores “agrupados” no citosol destas células (destaque no quadrante superior direito).

modificação no padrão da disposição dos receptores GABA_A. Ao invés da distribuição homogênea dos receptores na membrana celular e aparentemente no citosol, houve uma aglomeração daqueles no citosol

(Figura 12). Este resultado sugere um efeito do DOVA na expressão ou na internalização dos receptores GABA_A pela célula. O efeito observado com os achados atuais indica mecanismo citotóxico específico ou parte do desarranjo global causado no sistema. Uma explicação mais completa deste resultado requer experimentos futuros destinados a verificar a funcionalidade dos sítios receptores, integrados ao sistema de sinalização e de síntese/degradação protéica celular.

5. CONCLUSÕES

5.1 A atividade metabólica deletéria de ALA, metabólito intermediário acumulado nas porfírias, em particular na PAI e Saturnismo, pode ser atribuída ao seu papel pró-oxidante sobre aos sistemas neurais, como os sinaptosomas;

5.2 A ação pró-oxidante de ALA tem como resultado final a quebra da homeostase de cálcio, promovendo colapso energético mitocondrial, efeito este que pode ser revertido *in vitro* parcialmente com a presença de antioxidantes e bloqueadores de canal de cálcio plasmáticos e mitocondriais;

5.3 A oxidação de ALA leva à formação de DOVA, cuja presença não altera a homeostase de cálcio em sinaptosomas, mas promove a diminuição de cerca de 50% dos sítios gabaérgicos livres em sinaptosomas;

5.4 A alteração observada dos sítios gabaérgicos, induzida por ALA, parece estar relacionada à viabilidade celular, mostrado pelo desarranjo morfológico da cultura de células WERI e pela citotoxicidade direta com o aumento da mortalidade celular;

5.5 O “pool” total de receptores GABA_A, ligados ao canal de cloreto, tem distribuição alterada nas células expostas ao DOVA, mas não ao ALA,

sendo que houve detecção de receptores intracelulares, cujo mecanismo ainda é incerto.

5.6 Este estudo, portanto, propõe que a ação citotóxica aguda de ALA a sistemas neurais ocorra pela via oxidativa, através do influxo de cálcio e do colapso energético mitocondrial e do DOVA, afetando o sistema de receptores GABA_A de membrana plasmática, associado ao aumento da taxa de mortalidade de células em cultura sob exposição aguda, efeito este independente de cálcio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Hindmarch, J.T. (1986) *Clin. Chem.* **32**, 1255-1263
- ² Ghiringhelli, P., Farfaglia, P. e Ghiringhelli, L. (1987) *Clin. Sci.* **38**, 63-72
- ³ Minder, E.I. (1986) *Clin. Chem.* **161**, 11-18
- ⁴ Gorshein, A. e Weber, R. (1984) *Clin. Sci.* **72**, 103-112
- ⁵ Kappas, A., Sassa, S. e Anderson, K.E. (1983) in *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., and Brown, M.S., Eds.), pp 1301 – 1384, McGraw-Hill, New York
- ⁶ Gubler, J.G., Bergetzi, M.J. e Meyer, U.A. (1990) *Am. J. Med.* **89**, 540-541
- ⁷ McGillion, F.B., Thompson, G.G. e Goldberg, A. (1975) *Biochem. Pharmacol.* **24**, 299-301
- ⁸ Juknat, A.A, Kotler, M.L. e Batlle, A.M.C. (1995) *Biochem. Physiol.* **111C**, 143-150
- ⁹ Döring, F., Walter, J., Will, J., Föcking, M., Boll, M., Amasheh, S., Clauss, W. e Daniel, H. (1998) *J. Clin. Invest.* **101**, 2761-2767
- ¹⁰ Boll, M., Markovich, D., Weber, W.M, Korte, H., Daniel, J. e Murer, H. (1994) *Pflueg. Arch. Eur. J. Physiol.* **429**, 146-149
- ¹¹ Boll, M., Herget, M., Wagener, M., Weber, W.M., Markovich, D., Biber, J., Clauss, W., Murer, H. e Daniel, H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 284-289

- ¹² Fei, Y.J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Romero, M.F., Singh, S.K., Boron, W.F. e Hediger, M.A. (1994) *Nature* **368**, 563-566
- ¹³ Liang, R., Fei, Y.J., Prasa, P.D., Ramamoorthy, S., Han, H., Yang-Fend, T.L., Hediger, M.A., Ganapathy, V. e Leibach, F.H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 6456-6463
- ¹⁴ Liu, W., Liang, R., Ramamoorthy, S., Fei, Y.J., Ganapathy, M.E., Hediger, M.A., Ganapathy, V. e Leibach, F.H. (1995) *Biochem. Biophys. Acta.* **1235**, 461-466
- ¹⁵ Saito, H., Okuda, M., Terada, T., Sasaki, S. e Inui, K.I. (1995) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 1631-1637
- ¹⁶ Miyamoto, K.I., Shiraga, T., Morita, K., Yamamoto, H., Haga, H., Taketani, Y., Tamai, I., Sai, Y., Tsuji, A. e Takeda, E. (1996) *Biochim. Biophys. Acta.* **1305**, 34-38
- ¹⁷ Peng, Q., Warloe, T., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, K.E. e Nesland, J.M. (1997) *Cancer* **79**, 2282-2308
- ¹⁸ Daniel, H. e Adibi, S.A. (1995) *FASEB J.* **8**, 753-759
- ¹⁹ Novotny, A., Xiang, J., Stummer, W., Teuscher, N.S., Smith, D.E. e Keep, R.F. (2000) *J. Neurochem.* **75**, 321-328
- ²⁰ Terr, L. e Weiner, L.P. (1983) *Exp. Neurol.* **79**, 564-568
- ²¹ Durko, I. e Juhasz, A. (1986) *Neurochem. Res.* **11**, 607-615
- ²² Daniel, H. e Adibi, S.A. (1995) *FASEB J.* **9**, 1112-1117
- ²³ Rocha, M.E., Ferreira, A.M.D.C. e Bechara, E.J.H. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 1272-1279

- ²⁴ Monteiro, H.P., Abdalla, D.S., Augusto, O. e Bechara, E.J.H. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 206-216
- ²⁵ Hermes-Lima, M., Valle, V.G.R., Vercesi, A.E. e Bechara, E.J.H. (1991) *Biochem. Biophys. Acta.* **1056**, 57-63
- ²⁶ Hermes-Lima, M., Castilho, R.F., Valle, V.G.R., Bechara, E.J.H. e Vercesi, A. E. (1992) *Biochem. Biophys. Acta.* **1180**, 201-206
- ²⁷ Oteiza, P. e Bechara, E.J.H. (1993) *Arch. Biophys. Acta.* **305**, 282-287
- ²⁸ Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H. e Di Mascio, P. (1993) *Biochem. Biophys. Acta* **1225**, 259-263
- ²⁹ Fraga, C.F., Onuki, J., Lucesoli, F., Bechara, E.J.H. e Di Mascio, P. (1994) *Carcinogenesis* **15**, 2241-2244
- ³⁰ Vercesi, A.E., Castilho, R.F., Meinicke, A.K., Valle, V.G.R., Hermes-Lima, M. e Bechara, E.J.H. (1994) *Biochem. Biophys. Acta* **1188**, 86-92
- ³¹ Minotti, G. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 189-198
- ³² Oteiza, P.I., Kleinman, C.G, Demasi, M. e Bechara, E.J.H. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 314-317
- ³³ Demasi, M., Penatti, C.A.A, DeLucia, R. e Bechara, E.J.H. (1996) *Free Radic. Biol. Med.* **20(3)**, 291-299
- ³⁴ Choi, D.W. (1994) *Prog. Brain. Res.* **100**, 47-51
- ³⁵ Jurgens, G., Lang, J. e Esterbauer, H. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **875**, 103-104
- ³⁶ Bondy, S.C. e LeBel, C.P. (1993) *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 633-642
- ³⁷ Tessier, F., Obrenovich, M. e Monnier, V.M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 161-168

- ³⁸ Brennan, M.J.W. e Cantrill, R.C. (1979) *Nature* **280**, 514-515
- ³⁹ Pierach, C.A. e Edwards, P.S. (1978) *Exp. Neurol.* **62**, 810-814
- ⁴⁰ Mello, C.F., Benigni, J., Jimenez-Bernal, M.A., Rubin, J., Bastiani, E., Costa, E. e Wajner, M. (1996) *Brain Res.* **72**, 120-125
- ⁴¹ Puy, H., Deybach, J.C., Bogdan, A., Callebert, J., Baumgartner, M., Pierre, V., Nordmann, Y. e Toulou, Y. (1996) *J. Clin. Invest.* **97**, 104-110
- ⁴² Lima, T.T.F, Begnini, J., Bastiani, J., Fialho, D.B., Jurach, A., Ribeiro, M.C.P., Wajner, M. e Mello, C.F. (1998) *Brain Res.* **802**, 55-60
- ⁴³ Emanuelli, T., Prauchner, C.A., Dacanal, J., Zeni, A., Reis, E.C., Mello, C.F. e Souza, D.O. (2000) *Brain Res.* **868**, 88-94
- ⁴⁴ Ledere, M.O. e Bühler, H.P. (1999) *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 1081-1088
- ⁴⁵ Di Mascio, P., Teixeira, P.C., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Dörnemann, D., Douki, T. e Cadet, J. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 368-374
- ⁴⁶ Douki, T., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Cadet, J. e Di Mascio, P. (1998) *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 150-157
- ⁴⁷ Douki, T., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Cadet, J. e Di Mascio, P. (1998) *FEBS Lett.* **428**, 93-96
- ⁴⁸ Ihmels, H., Maggini, M., Maurizio, P. e Scorrano, G. (1991) *Tetrahedron Lett.* **32**, 6215-6218
- ⁴⁹ Cotman, C.W. e Matthews, D.A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **240**, 380-395
- ⁵⁰ Nachshein, D.A. (1985) *J. Physiol.* **363**, 87-101
- ⁵¹ Lemasters, J.J, Nieminen, A.L., Chacon, E., Imberti, R., Gores, G.J., Reece, J.M. e Herman, B. (1993) *Meth. Toxicol.* **2**, 404-415

-
- ⁵² Scott, I.D. e Nicholls, D.G. (1980) *Biochem. J.* **186**, 21-33
- ⁵³ Bylund, D.B. e Yamamura, H.I. (1988) *Methods for Receptor Binding* Ed. Yamamura, H.I. Raven Press, New York, USA 1-35
- ⁵⁴ Ashley, R.H., Brammer, M.J. e Marchbanks, R. (1984) *Biochem. J.* **219**, 149-158
- ⁵⁵ Zulkan, S.R., Young, A.B. e Snyder, S.H. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4802-4807