OHARA AUGUSTO

METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS:
FORMAÇÃO DE RADICAIS DE CARBONO E
SUAS IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS E TOXICOLÓGICAS

Tese de Livre Docência apresentada
ao Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da Universidade
de São Paulo.

São Paulo - 1983

To M.D. Arsedo,

as an acknowledgment for the crazy love,
as an excuse for the rational end.

Agradeço:

A todos aqueles que me propiciaram condições de aprendizagem e crescimento, particularmente a:

Roseli P. Schnetzler

Oswaldo Augusto

Anna M. Augusto

Giuseppe Cilento

P.R. Ortiz de Montellano

Alex Quintanilha

Kent L. Kunze

Richard C. Zimler

Roberto Casadei de Baptista

Iracema Fagã

Beatriz R. Castellani

Shirley Schreier

Etelvino J.H. Bechara

Lester Packer

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

ÍNDICE

	Pag.
ABREVIATURAS	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Apresentação	2
1.2. Metabolismo de Xenobióticos: Visão Geral	3
1.3. Citocromo P ₄₅₀ : Propriedades e Mecanismo de Catálise	11
1.4. Detecção de Radicais Livres em Sistemas Biológicos: Método do Captador de Spin	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1. Materiais	35
2.2. Métodos	36
a. Microsossomos Hepáticos	36
b. Dosagem da Proteína Microssomal	36
c. Estudos com Citocromo P ₄₅₀ "in vitro"	36
d. Análise de Metabólitos	37
e. Purificação e Caracterização do Aduto de Heme	39
f. Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica	40
g. Purificação e Caracterização do Aduto Etil-POBN	41
h. Purificação e Caracterização do Aduto de POBN derivado da Fenelzina	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1. Efeito dos Captadores de Spin sobre o Metabolismo Microssomal: Isolamento Bioló-	

lógico do Aduto Etil-POBN	45
a. Efeito dos Captadores de Spin Sobre o Me- tabolismo Microsossomal	48
b. Ligação dos Captadores de Spin ao Citocro- mo $\bar{P}_{450}$	48
c. Isolamento e Propriedades Espectroscópi- cas do Aduto Radical Etil-POBN	53
d. Conclusões	56
 3.2. Formação de Radicais de Carbono Durante o Metabolismo da Fenelzina: Implicações Toxicológicas e Terapêuticas	58
a. Metabólitos da Fenelzina	60
b. Destruição do Citocromo P_{450} e sua Rela- ção com a Formação de Metabólitos	61
c. Estrutura do Produto da Inativação do Ci- tocromo P_{450} pela Fenelzina	64
d. Formação de Radicais Livres Durante o Me- tabolismo da Fenelzina	70
e. Identificação do Radical Aduto de POBN obtido a partir da Fenelzina	75
f. Implicações Terapêuticas e Toxicológicas	81
 4. CONCLUSÕES GERAIS	90
5. SUMÁRIO <i>Resumo</i>	93
6. SUMMARY	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

ABREVIATURAS

Heme - Ferro protoporfirina IX, independentemente do estado de oxidação do metal

RPE - Ressonância paramagnética eletrônica

PBN - α - fenil N-tércio-butilnitrona

DMPO - 5,5 - dimetil - 1 - pirrolina - N - Óxido

T-BN - tercio-nitrosobutano; 2-nitroso -2- metilpropano

POBN - α (4 - piridil - 1 - Óxido) N - tercio - butilnitrona

DDEP - (3,5 - bis - etoxicarbonil)- 4 - etil - 2,6 -dimetil - 1,4 -diidropiridina

Fenelzina - 2 - feniletildrazina

SOD - Superóxido dismutase

DETAPAC - Ácido dietilenotriaminopentaacético

SKF 525 - A - 2- dietilaminoetil 2,2 - difenilpentanoato

RMN - Ressonância magnética nuclear

1. INTRODUÇÃO

1.1. APRESENTAÇÃO

Nos últimos anos temos nos dedicado ao estudo da formação de intermediários reativos durante o metabolismo de xenobióticos. Nosso maior interesse vem sendo a detecção de radicais livres centrados no carbono e o estabelecimento de seus mecanismos de interação com sistemas biológicos, pelo possível envolvimento dessas espécies nos efeitos terapêuticos e/ou tóxicos associados aos xenobióticos.

A maioria dos estudos sobre as interações entre radicais livres e sistemas biológicos tem se concentrado nos aspectos benéficos e tóxicos dos radicais de oxigênio. Tal tendência é facilmente explicável pelo papel central do oxigênio na vida dos organismos aeróbicos e pela demonstração inequívoca da formação daqueles radicais em sistemas biológicos. Já os radicais livres centrados no carbono tem sido de difícil detecção durante o metabolismo normal e, embora tenham sido sugeridos há muito tempo como intermediários na degradação de xenobióticos, só mais recentemente tem sido diretamente demonstrados. Um fator importante para essa comprovação, tem sido a aplicação da técnica do captador de spin (spin trapping) em sistemas biológicos. Embora a técnica apresente os problemas comuns às abordagens experimentais indiretas, ela pode fornecer valiosas informações quando criteriosamente empregada e, complementada por outros dados.

Acreditamos que demos uma contribuição importante para o emprego judicioso dessa técnica em estudos do meta

bolismo microssomal. Podemos então, não só demonstrar a formação de radicais de carbono durante o metabolismo de alguns xenobióticos, como, secundados por outras abordagens experimentais, identificá-los e estabelecer os seus mecanismos de interação com hemoproteínas. Nesta tese, pretendemos apresentar essa nossa contribuição e uma de suas aplicações, inserindo-a no contexto geral dos processos biológicos de destoxicação e toxicação.

1.2. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS: VISÃO GERAL

O termo xenobiótico vem sendo utilizado para se referir a qualquer composto químico, natural ou manufaturado, que seja exógeno ao metabolismo normal do organismo. Embora o termo tenha sido introduzido recentemente, pode-se concluir que o conhecimento dos efeitos das interações entre substâncias exógenas e sistemas biológicos remonta aos primórdios da civilização, logo que o homem toma contacto com toxinas naturais de origem vegetal ou animal (1).

Apesar de sua longa história, o estudo da interação entre compostos químicos e sistemas biológicos continua importantíssimo na atualidade, quando a ênfase desloca-se das substâncias naturais para o incomensurável número de compostos sintetizados e utilizados pela sociedade industrial. São inúmeras as implicações sociais e econômicas da compreensão das bases moleculares dessas interações; somente ela poderá fornecer abordagens racionais para o desenvolvimento de remédios, herbicidas e inseticidas que sejam mais efetivos e específicos.

cos em suas ações.

A busca da toxidez seletiva enfatiza a importância de estudos paralelos sobre os processos de destoxicação e toxicação, cujas diferenças entre as espécies seria conveniente explorar. Também, numa mesma espécie, a relação existente entre a desintoxicação e a intoxicação é bastante estreita, como tão bem documentado para drogas que podem exercer efeitos terapêuticos ou efeitos tóxicos, dependendo da dosagem e outras variáveis (2,3).

De fato, a interação entre os xenobióticos e os sistemas biológicos que os transformam é irônica. A ação do sistema de destoxicação é potencialmente um perigo para os organismos vivos. Sua função normal, protetora, pode ser subvertida e o resultado pode ser o dano reversível ou irreversível.

A maioria dos xenobióticos que atingem os tecidos são lipofílicos, uma propriedade que permite a sua penetração através das regiões lipídicas das membranas e seu subsequente transporte nos fluídos biológicos por lipoproteínas. Uma vez no organismo, tais compostos podem permanecer inalterados, sofrer transformações espontâneas, ser enzimaticamente metabolizados. Essas últimas transformações, catalisadas por enzimas relativamente não específicos, são as que mais frequentemente ocorrem, constituem o metabolismo dos xenobióticos e estão divididas em duas fases (1-3).

Durante a fase I, constituída principalmente pelas oxidações microssomais, um grupo polar é introduzido na molécula o que aumenta a solubilidade em água e transforma o

xenobiótico num substrato mais adequado para as reações da fase II.

Essas são reações de conjugação, nas quais o xenobiótico ou um seu metabólito da fase I, contendo grupos funcionais como hidroxila, amino, carboxila, epóxido ou halogênio, liga-se covalentemente a aceptores endógenos. Desses, os mais importantes são a glutathione, o ácido uridina difosfato glicurônico, a adenosina 3' - fosfato - 5' - fosfossulfato e a acetil coenzima A, destacando-se a glutathione que está presente na maioria dos tecidos a uma concentração aproximada de 5 mM (4).

Os produtos das reações na fase II são, em geral, mais polares, menos lipossolúveis, menos tóxicos e mais facilmente excretáveis pelo organismo via, principalmente, os sistemas urinário e biliar (1-4).

Como descrita acima, essa sequência de reações é um mecanismo de destoxicação. Contudo, em determinadas condições, esses processos que seriam protetores, convertem os xenobióticos em derivados mais tóxicos que eles próprios. Estão bem documentados na literatura casos em que os efeitos tóxicos, teratogênicos, necróticos, mutagênicos e carcinogênicos de certos compostos resultam da ativação metabólica de grupos funcionais inócuos a intermediários extremamente reativos e lesivos (5).

Um exemplo é apresentado no Esquema 1 para o metabolismo do acetaminofeno, um analgésico amplamente utilizado (6,7). Em altas doses, esse composto induz necrose hepática em animais experimentais e no homem, sendo a toxidez media

da por um metabólito reativo, formado durante a sua oxidação microsossomal.

A baixas doses, o intermediário reativo pode ser eficientemente destoxicado pela glutathione; em doses altas ou em outras condições intracelulares, nas quais a concentração da glutathione não seja suficiente para a reação de conjugação, o intermediário pode reagir com outras biomoléculas levando à necrose celular (Esquema 1).

O exemplo apresentado no Esquema 1 enfatiza dois pontos importantes para os nossos interesses de pesquisa e para o desenvolvimento desta introdução. O primeiro é a estreita relação entre os processos de destoxicação e os de toxicação, o que torna o estudo do metabolismo de um determinado xenobiótico uma necessidade para a compreensão, ao nível molecular, de seus possíveis efeitos tóxicos. O segundo é que intermediários reativos, formados, em geral, durante a oxidação microsossomal, são normalmente postulados como os desencadeadores de efeitos tóxicos e/ou terapêuticos; contudo, a alta reatividade desses intermediários tem dificultado a sua identificação e, consequentemente, o estabelecimento das bases moleculares de suas ações. Apesar dos problemas experimentais envolvidos, em muitos casos tem sido possível identificar os metabólitos reativos, examinar as suas interações com biomoléculas e caracterizar os fatores celulares que facilitam e modulam tais interações. O que fica evidente é que muitos desses intermediários reativos são radicais livres formados durante o metabolismo microsossomal. Passaremos, assim, a abordar o sistema microsossomal de transporte de elétrons e os problemas envolvidos na detecção de radicais livres em sistemas biológicos.

Fase II
(Destoxificação)

Conjugação

Acetaminofeno

Fase I
(Destoxicação e
Toxicação)

Sistema microsomāl
(Cit. P₄₅₀)

Intermediários Reativos Postulados

Fase II
(Destoxicação)

GSH

Toxicação

Ligação Covalente a Biomoléculas

Necrose Celular

(ESQUEMA 1)

1.3. SISTEMA MICROSSOMAL DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS

O retículo endoplasmático é uma rede contínua de membranas lipoproteicas que se estende da membrana plasmática ao núcleo e mitôcondria da célula. Suas funções biológicas incluem o metabolismo de esteróides, ácidos graxos e xenobióticos, a síntese de colesterol, fosfolipídeos, triglicerídeos e proteínas, bem como o transporte desses produtos. No hepatócito de rato pode-se estimar que 19% da proteína, 48% dos fosfolipídeos e 58% do RNA da célula estão associados a essa organela (8).

Contrariamente a outras organelas como mitôcondria, cloroplastos e lisossomos, o retículo endoplasmático sofre extensiva ruptura por homogeneização formando vesículas fechadas, os chamados microssomos. Estes podem ser isolados por vários métodos como precipitação com CaCl_2 , cromatografia de coluna e a clássica centrifugação diferencial, que continua sendo o método mais empregado (8).

O retículo endoplasmático da maioria dos tecidos, conseqüentemente os microssomos dele derivados, contém flavoproteínas e citocromos firmemente ligados à membrana que funcionam em reações de transporte de elétrons dependentes de oxigênio e coenzimas piridínicos reduzidos (9). Uma visão simplificada dessas reações aparece no Esquema 2, e as enzimas envolvidas são consideradas abaixo, principalmente quanto ao seu papel no metabolismo de xenobióticos.

(ESQUEMA 2)

Proteína de Ferro não Hemínica - A enzima estearil CoA dessaturase, recentemente purificada, contém um átomo de ferro que parece ser cataliticamente ativo pela rápida redução que sofre em presença de citocromo b_5 . A proteína está envolvida no metabolismo de ácidos graxos, promovendo preferencialmente a dessaturação nas posições 9,10 de derivados de acil CoA contendo de 12 a 19 átomos de carbono (10).

Flavoproteínas - A mais extensivamente estudada é a NADPH- citocromo P_{450} redutase (E.C. 1.6.2.4) (FP_1), também denominada NADPH - citocromo c redutase. O enzima hepático tem um peso molecular de 78.000 daltons e possui um mol de FAD e um de

FMN como grupo prostético. Em contraste com a multiplicidade de isoenzimas de citocromo P_{450} , parece existir apenas uma única forma de redutase em um dado tecido. Além de reduzir o citocromo P_{450} , tendo um papel fundamental no metabolismo de xenobióticos, a proteína é capaz de transferir elétrons para aceptores externos como o citocromo c, certos corantes e várias drogas. Existem também evidências que esse enzima participa na iniciação da peroxidação de lipídios e na degradação oxidativa do heme, via íon superóxido formado durante sua re-oxidação aeróbica (9,11).

Uma outra flavoproteína é a NADH-citocromo b_5 redutase (E.C. 1.6.2.2.) (FP_2), que contém FAD como grupo prostético. Ela transfere elétrons do NADH ao citocromo b_5 e também a aceptores externos como ferricianeto. Seu papel essencial na oxidação de ácidos graxos está bem estabelecido, havendo discussões quanto ao seu possível papel no metabolismo de xenobióticos (9,10,12).

A terceira flavoproteína microsomal (FP_3) é de caracterização relativamente recente e contém FAD como grupo prostético. Ela pode receber elétrons tanto do NADH como do NADPH e participa ativamente do metabolismo de xenobióticos, promovendo a oxigenação de aminas secundárias e terciárias e de compostos contendo enxofre (13,14).

Hemoproteínas - Além do citocromo P_{450} , que será extensivamente abordado no item 1.4., está presente o citocromo b_5 que é reduzido por elétrons provenientes do NADH, via NADH citocromo b_5 redutase, ou do NADPH, via a NADPH-citocromo P_{450} redutase. O fato de que certas oxidações microsomais respondem sinergisticamente à presença de NADH e NADPH, sugere

re um possível envolvimento do citocromo b_5 na transferência do segundo elétron ao citocromo P_{450} (Esquema 2). A não generalidade do efeito sinérgico, bem como estudos com sistemas reconstituídos, tornam ainda discutível esse possível papel do citocromo b_5 no metabolismo de xenobióticos (9,11,12).

1.4. CITOCROMO P_{450} : PROPRIEDADES E MECANISMO DE CATÁLISE

O termo citocromo P_{450} é utilizado para se referir a um grupo de hemoproteínas cuja característica marcante, é formarem complexos com CO cujo máximo de absorção de luz ocorre por volta de 450nm, um comprimento de onda consideravelmente maior que os usuais para hemoproteínas. Essa foi a denominação dada ao citocromo P_{450} quando do seu descobrimento, e ainda continua a ser empregada devido às dificuldades de nomear essa família de enzimas, segundo suas funções. Além de catalisarem vários tipos de reações, eles são capazes de transformar um grande número de diferentes substratos (15,16). Podem catalisar a hidroxilação de compostos aromáticos e alifáticos, a N-oxidação, a sulfoxidação, a epoxidação, a N-, S- e O-dealquilação, a peroxidação, a deaminação, dessulfuração e dealogenação. Parecem também capazes de atuar como um citocromo clássico, transferindo elétrons para a redução de compostos com grupos azo, nitro, N-óxido e epóxido. Seus substratos além de quimicamente diversos, podem ser tanto xenobióticos como lipídeos de ocorrência fisiológica, incluindo ácidos graxos, prostaglandinas e esteróides (15,16).

Assim, essa família de hemoproteínas presentes na

maioria dos tecidos e organelas de animais, plantas e microorganismos, parece ter como principal função a monooxigenação de substratos lipofílicos segundo a estequiometria abaixo:

Em alguns casos, como nos microsossomos hepáticos, a NADPH - citocromo P₄₅₀ redutase catalisa a transferência de elétrons dos coenzimas piridínicos reduzidos ao citocromo. Em outros, como na mitocôndria adrenal e Pseudomonas putida, uma proteína de ferro e enxofre serve como intermediário entre uma redutase contendo FAD e o citocromo (15,16).

O citocromo P₄₅₀ é a principal proteína do fígado, constituindo-se em 2-3% da proteína total e 15% da proteína microsossomal. Está assim, presente principalmente no retículo endoplasmático mas é também encontrado na membrana nuclear, lisossomos, mitocôndria e aparelho de Golgi (17).

Os citocromo P₄₅₀ microsossomal hepáticos são hemoproteínas hidrofóbicas, integrais e com pesos moleculares que variam de 48.000 a 58.000 daltons. Cada enzima contém uma molécula de heme, 2-3 moléculas de glicosamina e 400-500 resíduos de aminoácidos (18). A elucidação de suas estruturas primária, secundária e terciária, tem sido um desafio constante devido aos problemas de isolamento e purificação e só muito recentemente, com as técnicas de DNA recombinante, tem sido possível determinar a estrutura primária de algumas dessas isoenzimas pelo sequenciamento dos DNA cópias (19-21).

Esses recentes avanços oferecem novas perspectivas de abordagem de um dos mais fascinantes problemas da área do citocromo P₄₅₀, a questão dos isoenzimas. Quanto na verda

de existem e quais são as diferenças entre eles? Além das dificuldades de isolamento e sequenciamento, o problema torna-se mais complicado pelo fato de que os níveis das diferentes formas proteicas variam em função da prévia exposição do animal a diversos agentes. Por exemplo, a exposição a 3-metilcolantreno, fenobarbital, pregnolenona - 16 - α - carbonitrila, misturas de hidrocarbonetos aromáticos policlorados ou benzo flavona, induz os níveis de certas formas do citocromo P₄₅₀, levando a alterações tanto morfológicas como das velocidades metabólicas. Já foi sugerida a possibilidade de existirem centenas de diferentes formas num determinado tecido, que apresentariam uma estrutura primária quase homóloga e especificidades superpostas (22).

Atualmente acredita-se na existência de um número finito de isoenzimas, entre cinco e sete no caso de fígado de rato não induzido (23,24).

Nesse caso, a existência de pelo menos quatro formas já foi demonstrada por estudos de seletividade quanto a substratos, e também, por purificação até homogeneidade aparente. Tais formas foram utilizadas em estudos de reconstituição quando, em presença da redutase e de fosfatidilcolina, mostraram-se cataliticamente ativas. Essas isoenzimas também apresentam diferenças quanto ao comportamento eletroforético, propriedades espectrais, atividades catalíticas, propriedades imunológicas e aminoácidos N- e C- terminal (23).

O tratamento de animais com diferentes agentes indutores estimula também diferentemente, a oxidação de drogas. Essas alterações na velocidade e especificidade do meta

bolismo de xenobióticos, reflete a complexidade das mudanças ocasionadas pelos agentes indutores. Acredita-se que tais mudanças ocorram principalmente por um aumento da síntese dos enzimas, sendo pequeno o papel atribuído a uma redução na velocidade de degradação das proteínas (22,25-28).

A indução por certos agentes como o barbiturato fenobarbital aumenta, não só o conteúdo de certas formas de citocromo P_{450} , mas também, o peso total do fígado, a quantidade de NADPH- citocromo P_{450} redutase e de glicuronil transferase, além de causar uma proliferação generalizada do retículo endoplasmático. Por outro lado, a indução por 3-metilcolantreno parece afetar somente a distribuição dos diferentes isoenzimas, sem aumentar o conteúdo total de citocromo P_{450} , nem promover mudanças marcantes no peso do fígado ou no nível da redutase. Além desses indutores clássicos, o citocromo P_{450} é passível de indução por vários outros compostos, o que levou à sugestão de que cada xenobiótico poderia induzir um enzima específico. Isso implicaria num número ilimitado de isoenzimas mas, os conhecimentos atuais favorecem um número entre 15 e 20, que poderia explicar o metabolismo de toda uma variedade de compostos (24). De qualquer forma, a questão da multiplicidade do citocromo P_{450} permanece aberta e um dos mais fascinantes problemas atuais da pesquisa biomédica.

Ciclo Catalítico do Citocromo P_{450} - Além da questão dos isoenzimas, um outro aspecto crucial para a compreensão do papel do citocromo P_{450} no metabolismo de compostos estruturalmente tão distintos, seria a definição dos aspectos químicos da catálise. Essa é complexa, envolvendo múltiplas interações,

entre o citocromo P₄₅₀, o substrato, o oxigênio e equivalentes redutores. Estudar os detalhes desse processo não tem sido uma tarefa fácil, devido não só à presença de diferentes isoenzimas mas também, ao ambiente natural do citocromo e enzimas coadjuvantes. Evidentemente, a membrana pode impor restrições no número de interações efetivas necessárias à catálise. Parece assim, altamente improvável que um único mecanismo seja operante para todas as isoenzimas, e em todas as interações possíveis com tão diferentes substratos. Apesar das dificuldades, alguns dos passos da catálise vem sendo elucidados e algumas generalizações podem ser tentadas (15,29).

As diferentes oxidações catalisadas pelo citocromo P₄₅₀ podem ser agrupadas em três tipos gerais: (i) inserção de um átomo de oxigênio na ligação entre um átomo de hidrogênio e um átomo, mais pesado, para formar o derivado hidroxilado; (ii) adição de um átomo de oxigênio a uma ligação π entre 2 átomos de carbono para formar um epóxido e (iii) adição de um átomo de oxigênio ao par de elétrons de um heteroátomo para formar um óxido dipolar (Esquema 3) (30).

(Esquema 3)

A característica central de todas essas reações é a transferência de um átomo de oxigênio cataliticamente ativado, formalmente ao nível de oxidação do oxeno, do enzima para o substrato. Os detalhes mecanísticos dessa transferência permanecem pouco conhecidos, enquanto que os passos precedentes estão razoavelmente elucidados (15,29).

O esquema mais aceito para o ciclo catalítico do citocromo P_{450} é apresentado no Esquema 4, e as várias etapas são discutidas abaixo.

(Esquema 4)

Ligação do Substrato - No estado de repouso o citocromo P_{450} aparece como $Fe(III)$, onde as quatro posições equatoriais de coordenação estão ocupadas pelos nitrogênicos pirrólicos, e as duas posições axiais estão disponíveis para ligação. Seus ocupantes tem sido matéria de muita controvérsia e, se hoje é bem

aceito que a quinta posição é ocupada pelo tiolato, provavelmente derivado de um resíduo de cisteína (31), ainda se discute se a sexta posição é ocupada pelo imidazol ou água (32-35).

A ligação de um substrato ao citocromo P_{450} pode ser acompanhada por espectrofotometria diferencial, uma vez que o espectro de absorção eletrônica reflete o estado de spin do grupo prostético.

A maioria das formas do citocromo, no estado de repouso, contém um sexto ligante suficientemente forte para favorecer a configuração de baixo spin (spin $1/2$), na qual o ferro está no plano da porfirina. Neste caso, o espectro de absorção de luz visível apresenta a banda Soret a 418 nm bem como bandas α e β bem definidas. Um caso particular é a forma citocromo P_{450} L M 4, o isoenzima predominante obtido por indução com 3-metilcolantreno, que não possui um sexto ligante ou possui um ligante fraco. Neste caso, o heme está no estado de alto spin (spin $5/2$), apresentando uma banda Soret a 394 nm; a adição de butanol a essa preparação leva ao aparecimento do espectro normal, de baixo spin (15).

Quando um composto apolar, hidrofóbico, liga-se ao sítio ativo, ele desloca o sexto ligante endógeno mas, ou não se coordena diretamente, ou não tem força suficiente para manter o estado de baixo spin. O equilíbrio vai sendo deslocado para o estado de alto spin, (spin $5/2$), que possui a Soret a 394 nm. Essa interação, chamada tipo I, pode ser acompanhada pelo espectro diferencial que mostra o pico a 394 nm e um vale a 418 nm (Fig. 1). Inversamente, um substrato que possua grupos funcionais fortemente ligantes, como uma amina, deslo

ca o equilíbrio para a forma hexacoordenada de baixo spin, resultando num espectro diferencial com um vale a 394 nm e um máximo na região de 420 nm; essa interação é chamada tipo II (Fig. 1) (15,35).

Figura 1 - Espectro absoluto (a), (b) e espectro diferencial (c) e (d) do citocromo P₄₅₀, mostrando uma típica interação tipo I (a) e (c) e uma típica interação tipo II (b) e (d)

Transferência do primeiro elétron e ligação do dioxigênio -

A oxidação do substrato pelo citocromo P_{450} requer dois equivalentes redutores. O primeiro simplesmente reduz o ferro (III) para ferro (II). Nesta forma, de maneira análoga à hemoglobina e mioglobina, a enzima liga-se rapidamente ao dioxigênio ou CO. A formação desse complexo com CO é a responsável pela denominação citocromo P_{450} , banda Soret na região de 450 nm, e torna o CO um inibidor clássico das oxidações catalisadas por essas isoenzimas. A ligação do oxigênio também pode ser acompanhada espectrofotometricamente em microsossomos de ratos pré-tratados com fenobarbital (36). Experimentos com preparações purificadas também confirmaram a presença do complexo; tais estudos foram realizados à baixas temperaturas porque o complexo se decompõe rapidamente em Fe(III) e íon superóxido ou reverte a Fe(II) mais dioxigênio (37,38).

A redução do citocromo P_{450} por NADPH, mediada pela redutase, apresenta uma cinética bifásica tanto em preparações microsossomais como nos sistemas reconstituídos (39,40). A velocidade de redução depende não só do isoenzima como também, do tipo de substrato. Tais diferenças são provavelmente devidas à modulação do equilíbrio entre os diferentes estados de spin do citocromo, pelos substratos e ambiente do sítio ativo (15,39,40).

Formação do oxigênio ativo - A fase final do ciclo catalítico, formação de água e do substrato oxidado a partir do complexo Fe(II) - dioxigênio, é o passo menos compreendido de todo o processo. A estequiometria da reação requer a adição de mais um elétron e dois prótons; contudo, a ordem da adição, e os

possíveis intermediários envolvidos são matéria de intenso debate.

Parece que a oxidação do substrato é precedida pela quebra redutiva do dioxigênio e formação de água, caso em que o oxigênio ativo seria um átomo de oxigênio ligado ao ferro. A evidência mais clara para a existência dessa espécie é o fato de que o iodosobenzeno, doador de um oxigênio, pode substituir tanto o O_2 como os equivalentes redutores nas reações mediadas pelo citocromo P_{450} (41) (Esquema 5).

(Esquema 5)

O intermediário oxidante, que seria o mesmo nos dois casos, é formalmente composto por Ferro III ligado ao en-

zima e oxigênio atômico, embora não se possa precisar a exata distribuição dos elétrons. Todas as estruturas apresentadas abaixo (Esquema 6) são viáveis, existindo uma certa preferência em se assumir o complexo perferril (2) por extrapolação de resultados obtidos com sistemas modelos (15,42).

(Esquema 6)

É importante ressaltar que além do iodosobenzeno, vários outros compostos, como hidroperoxido de cumeno, periodato de sódio, peróxido de hidrogênio e vários perácidos, podem substituir o oxigênio e o NADPH em reações catalisadas por citocromo P₄₅₀. Contudo, no caso de peróxidos, observam-se diferenças significativas em relação à especificidade ao substrato, velocidades de oxidação e mesmo distribuição de produtos. Também, nessas reações o enzima consegue realizar somente um pequeno número de transformações sendo rápida e irreversivelmente inativado, provavelmente pela oxidação do seu grupo prostético. Tais resultados sugerem que as reações dependentes de peróxidos são mecanisticamente diferentes daqueles dependentes de dioxigênio e NADPH (15).

Mesmo assumindo que nessas últimas o intermediário

rio oxidante é o complexo perferril (Esquema 6, 2), falta ainda estabelecer como se dá a transferência desse oxigênio ativado ao substrato. Ela ocorreria de maneira concomitante ou em passos e, se em passos, ocorreria através de intermediários contendo elétrons livres ou elétrons emparelhados? Embora não se tenha a resposta definitiva a essas questões, estudos recentes sugerem que os três tipos gerais de reações catalisadas pelo citocromo P_{450} (Esquema 3) ocorrem por passos de um elétron. Groves e colaboradores apresentaram evidências de que as reações de hidroxilação ocorrem de maneira não concomitante, com o provável envolvimento de radicais livres (43,44). Também, Ortiz de Montellano e colaboradores, pela análise da regioestereoespecificidade das reações de epoxidação, puderam sugerir o envolvimento de radicais nesses processos (45). Finalmente, nós próprios apresentamos a primeira evidência direta de que o citocromo P_{450} atua como oxidante de um elétron na transformação de compostos nitrogenados (30).

Esses estudos recentes, além de fornecerem contribuições gerais para o clássico problema do mecanismo das oxidações biológicas, apresentam óbvias implicações toxicológicas. O principal enzima envolvido no metabolismo de xenobióticos pode formar radicais livres durante o seu ciclo catalítico; essas espécies, escapando do sítio ativo, poderiam desencadear os processos tóxicos muitas vezes associados aos xenobióticos.

1.5. DETECÇÃO DE RADICAIS LIVRES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS:

Método do Captador de Spin (Spin Trapping)

O atual reconhecimento da formação e envolvimento de radicais livres em vários processos biológicos, não nos pode fazer esquecer que os progressos nessa área tem sido bastante lentos. A própria importância de radicais livres em reações orgânicas em fases condensadas só começa a ser aventada em 1937, e a química dos radicais só começa a ser efetivamente desenvolvida a partir da 2ª Guerra Mundial. Também, embora o equipamento de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) se torne disponível a partir do início da década de 50, a detecção de radicais livres, não só em sistemas biológicos mas em fases condensadas no geral, tem sido um difícil problema experimental (46-48).

A maior limitação para a detecção e identificação direta de radicais livres nessas condições é a baixa concentração de estado estacionário que se consegue obter dessas espécies em fases condensadas. Para determinações por RPE se requer uma concentração maior que 10^{-8} M, de 100 a 1000 vezes esse valor para uma resolução espectral razoável. Também, o tempo de medida varia de décimo de segundo a horas, enquanto que os tempos de vida de radicais em solução são, em geral, bem menores que 1 milissegundo; isso faz com que suas concentrações de estado estacionário se mantenham em geral, abaixo de 10^{-7} M. Para contornar os problemas de detecção, várias abordagens experimentais tem sido desenvolvidas, seja para aumentar a velocidade de produção de radicais seja para diminuir a sua velocidade de desaparecimento. Como exemplo, temos o tratamento da amostra em "situ" com radiação de alta energia ou luz de alta intensidade. De aplicação mais geral são as técnicas

cas de fluxo rápido, que tem sido amplamente empregadas para o estudo, por RPE, de várias reações químicas e algumas poucas reações enzimáticas (47-49). Esse método dinâmico de manutenção das concentrações de estado estacionário apresenta várias vantagens, principalmente a de ser uma técnica direta. Contudo, além de exigir uma enorme quantidade de material, servirá para detectar radicais de relativa estabilidade o que limita sua aplicabilidade; de fato, a sua utilização mais elegante em sistemas enzimáticos continua sendo o clássico estudo de Yamazaki e colaboradores, de reações catalisadas por peroxidases formando radicais do tipo quininoide (49-51).

Evidentemente existem casos em que os radicais livres são suficientemente estáveis para atingir concentrações de estado estacionário acima dos limites de detecção do espectrômetro de RPE, como é o caso inclusive, de vários produtos de xenobióticos. Mason e colaboradores têm se dedicado ao estudo do metabolismo de vários desses compostos e seus resultados e conclusões são sintetizados em duas revisões recentes (52,53). Nosso maior interesse são justamente os radicais mais instáveis, principalmente radicais centrados no carbono, cuja formação em sistemas biológicos, em fases condensadas e à temperatura ambiente, não pudera ser comprovada por nenhuma das técnicas citadas até aqui.

Técnica do Captador de Spin - Essa abordagem experimental foi introduzida independentemente por quatro grupos em 1968-1969 (54-58). A técnica é bastante simples, fazendo uso de um composto diamagnético (captador de spin) que reagindo com um radical instável, forma um radical relativamente estável, geralmente

mente um nitróxido, observável por RPE em fase líquida e à temperatura ambiente (Esquema 7).

(Esquema 7)

Tem-se assim uma forma indireta de aumentar a concentração de estado estacionário, por acúmulo de um radical a duto razoavelmente estável.

Embora simples e vantajosa quanto à quantidade de material necessário, e não requerimento de instrumentação adicional ao espectrômetro de RPE, a técnica apresenta vários problemas, principalmente quando aplicada a sistemas biológicos (59-62).

Primeiro, é uma técnica indireta e como tal introduz uma perturbação no sistema em estudo. Também, não se detecta o radical primário e a estrutura deste não é facilmente deduzida a partir do espectro de RPE do radical estável (a duto).

Os adutos dos captadores de spin pertencem, em geral, à função nitróxido, um radical cujo elétron desempare-

lhado ocupa um orbital π^* entre o nitrogênio e o oxigênio. Tal função é em geral representada como um híbrido das estruturas abaixo, sendo a delocalização eletrônica a responsável pela estabilidade desses radicais.

O espectro de RPE de nitróxidos, em solventes não viscosos, é caracterizado por um largo desdobramento hiperfino devido ao nitrogênio (a_N); esse é resultado da interação do elétron livre com o momento magnético nuclear do nitrogênio ($I = 1$; nº de linhas = $2I + 1 = 3$), podendo ocorrer outros desdobramentos hiperfinos, se existirem núcleos com momentos magnéticos nos substituintes ligados ao nitrogênio. Os captadores de spin, ao reagir com um radical, formam um nitróxido que possuem pelo menos um átomo de hidrogênio ($I = 1/2$, nº de linhas = $2I + 1 = 2$) no carbono α , e portanto, apresentam pelo menos 6 linhas (Fig. 2). Os valores das constantes de desdobramento hiperfino do radical aduto, a_N e a_H , dependerão, além do solvente, da natureza e tamanho dos substituintes no nitrogênio. Contudo, como a única modificação nos adutos formados entre um mesmo captador e diferentes radicais é só o grupo R (Fig. 2), as variações de a_N e a_H não são suficientes para uma identificação inequívoca do grupo R. Os valores coletados na Tabela 1 mostram que é apenas possível conjecturar sobre a natureza do radical, se de carbono, oxigênio ou nitrogênio, quando teríamos um número superior de linhas; atribuir a estrutura exata dependerá de outras abordagens experimentais, embora o procedi

mento mais utilizado seja comparar os parâmetros de RPE dos adutos obtidos em sistemas biológicos com aqueles de adutos obtidos em reações químicas que, se espera, produzam os mesmos radicais (59-63).

Figura 2 - Captadores de spin comumente empregados em sistemas biológicos: estruturas e espectros característicos dos adutos formados pela adição de um radical alquila, de fórmula geral $\text{R-CH}_2\cdot$.

Em contraste com os captadores de spin da classe das nitronas, como DMPO e PBN, os captadores da classe dos nitroso derivados, como T-NB, são adequados para a identificação do grupo R. Neste caso a adição do radical se dá diretamente no nitrogênio e assim, os desdobramentos devidos aos átomos do próprio grupo R são espectroscopicamente observáveis (Fig.2). Contudo, outros fatores dificultam a utilização desses compos

Tabela 1. Variações nos Parâmetros Espectrais, em Benzeno, para Diferentes Classes de Adutos de Nitronas Captadoras de Spin

Classe	Aduto	PBN		DMPO	
		a_N	a_H	a_N	a_H
ROO.	t-BuOO.	13,40	1,57		
	Cumil OO.	13,55	1,82		
	HOO.	13,28	2,25		
RO.	t-BuO.	14,21	1,83	13,17	7,93
	EtO.	14,01	2,01	13,22	6,96
	MeO.	13,76	2,00	13,58	7,61
	HO.	14,48	2,17	14,83	14,83
R.	Cumil.	14,25	2,19		
	Et.	14,32	3,22	14,20	20,49
	Me.	14,81	3,47	14,31	20,52
	Benzil.	13,78	2,01	14,16	20,66
	Fenil.	14,41	2,21	13,79	19,22

a

Valores coletados da referência 48

como captadores de spin. Primeiro, são instáveis térmica e fotoquimicamente produzindo radicais secundários que dificultam a interpretação do fenômeno em estudo. Também, são bastante insolúveis em água e tendem a formar dímeros que não funcionam como captadores de radicais (60).

Até aqui discutimos apenas um dos fatores que devem ser considerados na escolha do captador de spin adequado a um determinado estudo, a possibilidade de identificação do radical primário. Outros fatores, como as constantes de velocidade da reação de captação (k_t , Esquema 7) e a estabilidade do radical aduto, são igualmente importantes.

A reação de captação de spin tem sido extensivamente estudada por Janzen e colaboradores; as rápidas velocidades de adição de um radical a uma nitrona foram racionalizadas por analogia com a adição de um radical ao butadieno, porque, em ambos os casos, o elétron desemparelhado no produto de adição é estabilizado pela delocalização em orbitais π de 2-3 átomos (64). Vários valores de constantes de velocidades tem sido determinados e alguns deles são apresentados na Tabela 2. Fica evidente que a maioria das reações de captação podem competir com outras reações radicalares desde que se use altas concentrações de captadores. Uma exceção é o íon superóxido que não reage com nenhum dos captadores a velocidades apreciáveis; o problema particular da captação do íon superóxido e outros radicais de oxigênio tem sido extensivamente estudado por Rosen e colaboradores (61,65).

Quanto à estabilidade dos adutos dos captadores de spin, muitos estudos são ainda requeridos. A química de ni

Tabela 2. Constantes de Velocidade Aparente ($M^{-1} S^{-1}$) Para a
Reação de Captação de Spin ^a

RADICAL	DMPO	PBN	T-NB
O_2^-	10		b
$\cdot OH$	3.4×10^9	1×10^9	b
$RO\cdot$	5×10^8	5.5×10^6	1.5×10^6
$R\dot{C}H_2$	2.5×10^6	1.3×10^5	9.0×10^6
$R_1\dot{C}H$ R_2	4.2×10^5	6.5×10^4	6.1×10^6
$R_1\dot{C}R_3$ R_2		1×10^4	3.3×10^6

^a Valores coletados da referência 62

^b Aduto instável

tróxidos tem sido bastante estudada, principalmente devido às suas aplicações na técnica de marcação de spin. Contudo, os nitróxidos obtidos por captação de spin diferem dos utilizados como marcadores pela presença de um hidrogênio no carbono α . O efeito positivo dessa presença é fornecer um parâmetro adicional de RPE, o a_H além do a_N , para auxiliar na identificação do radical primário. O efeito negativo é que esses nitróxidos são mais instáveis devido à reação de desproporcionamento (60,65-69):

O mecanismo desse processo foi estudado por Ingold e colaboradores, que estabeleceram que no caso do dietil nitróxido, ocorre a formação inicial de um dímero que se decompõe nos produtos; a constante de velocidade é alta, de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a 25° C , em benzeno. Para nitróxidos mais substituídos o decaimento é mais lento, por exemplo, $k_d = 100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 40° C , em benzeno para o n-hexil tercio-butil nitróxido (65-68). Embora esses estudos sugiram que a velocidade de decaimento de de cresça com o aumento do grau de substituição e do tamanho dos grupos ligados ao nitrogênio, não existem estudos quantitativos sobre os adutos dos captadores de spin comumente utilizados em sistemas biológicos. O único estudo aparece numa revisão de Evans (69) cujos resultados preliminares sugerem que, de fato, a meia-vida é proporcional ao tamanho do radical de carbono adicionado e também, que os adutos de PBN são mais es táveis que os correspondentes adutos de DMPO; no caso de radi cais de oxigênio o inverso é válido, sendo os adutos de DMPO os mais estáveis (61,65). Evidentemente faltam estudos sistemáticos sobre a estabilidade desses adutos radicais, inclusive frente a sistemas biológicos. Na ausência de dados mais quantitativos, o procedimento mais usual tem sido extrapolar os resultados obtidos com os nitróxidos totalmente substituídos. Nesses casos, o mais importante processo de decaimento é a redução, por redutores endógenos usualmente presente em pre parações biológicas, muito mais comum que a possível oxidação (Esquema 8) (69-71).

(Esquema 8)

Discutimos até aqui os critérios envolvidos na seleção do captador de spin adequado a determinado estudo, a saber: (a) possibilidade de identificação do radical captado a partir do espectro de RPE do aduto de spin; (b) a velocidade das reações de captação e (c) a estabilidade do aduto de spin. Esses fatores levaram ao uso extensivo do DMPO, PBN e T-NB em sistemas biológicos (Fig. 2). Além desses captadores tem sido empregados, embora menos extensivamente o POBN, ni trosobenzeno, o 2,4,6-tri-t-butil-nitroso benzeno e a base con jugada do tautômero do nitrometano (Esquema 9) (62).

nitrosobenzeno

2,4,6-tri-t-butil
nitrosobenzeno

(Esquema 9)

Também salientamos as dificuldades de interpretação dos resultados obtidos, principalmente em sistemas complexos como os biológicos. Permanece a dificuldade de identificação inequívoca do radical captado e também, o fato de que o aduto mais estável não é, necessariamente, o radical primário formado num determinado processo. Tais problemas não impediram que a técnica de captação de spin permitisse a detecção de vários radicais reativos em sistemas biológicos, espécies essas que não são detectáveis pela espectroscopia de RPE de estado estacionário. Entre as espécies identificadas incluem-se: radicais

superóxido e hidroxila, por captação com DMPD (61,65); radical de carbono, derivado de lipídeos durante o metabolismo do ácido araquidônico pela prostaglandina sintetase, por captação com T-NB (72); o radical triclorometila, formado durante o metabolismo de tetracloreto de carbono marcado, por captação com PBN (73). Uma revisão recente sobre a técnica do captador de spin apresenta também, os resultados obtidos com a técnica em sistemas químicos e fotoquímicos, inclusive a captação de radicais centrados no nitrogênio, fósforo e enxofre (62).

Um dos problemas que permanecia pouco considerado era aquele comum a toda técnica indireta, ou seja, a perturbação que o captador de spin pode introduzir no sistema em estudo. A nossa devida atenção ao problema com relação ao sistema microsomal nos propiciou sermos os primeiros a isolar biologicamente e caracterizar espectroscopicamente os adutos de radicais de carbono formados durante o metabolismo de DDEP (3,5-bis-etoxycarbonil)-4-etil-2,6 dimetil-1,4-diidropiridina) e 2-feniletildrazina (fenelzina), resultados que apresentaremos neste trabalho.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Os captadores de spin PBN, DMPO e POBN foram obtidos da Aldrich Chem. Co.; DMPO foi purificado como descrito por Buettner e Oberley (74). Também foram obtidos da Aldrich Chem. Co., os radicais 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidinooxila e 2,2-difenil-1-picrilidrazila.

Os substratos, etilidrazina (75) e DDEP (76) foram sintetizados como descrito nas referências citadas. A benzotammina foi gentilmente cedida pelo Dr. G. Miwa. Os outros derivados de hidrazina foram obtidos da Aldrich Chem. Co. na forma de seus cloridratos com exceção da 2-feniletilhidrazina, obtida da ICN Pharmaceuticals, Inc. As soluções estoques dos derivados de hidrazina foram preparadas em HCL 0,01 N, mantidas a 0° C e usadas até 12 hs após suas preparações.

Catalase bovina, superóxido dismutase bovina (Tipo I), isocitrato desidrogenase, isocitrato, glicose-6-fosfato desidrogenase, glicose-6-fosfato, NADH e NADPH foram obtidos da Sigma Chemical Co. A catalase foi dissolvida em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 a uma concentração de 3mg/ml e foi extensivamente dialisada contra o mesmo tampão para remover antioxidantes contaminantes. A monoamino oxidase foi obtida como descrito por Salach (77).

Os demais reagentes foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação adicional a não ser quando descrito no item 2.2. A água utilizada foi deionizada e destilada.

da de vidro.

2.2. MÉTODOS

- a. Microsossomos Hepáticos - Foram obtidos como previamente descrito (78) de ratos machos, Sprague-Dawley, de 250-300 g de peso e após pré-tratamento com fenobarbital (80 mg/Kg / dia) por quatro dias.
- b. Dosagem da Proteína Microssomal - Foi determinada com o conjunto da Bio Rad.
- c. Estudos com Citocromo P₄₅₀ "in vitro" - A destruição do citocromo P₄₅₀ pelos substratos é expressa em porcentagem, como a quantidade de citocromo P₄₅₀ remanescente após a incubação com o substrato, em relação à quantidade inicialmente presente. As quantidades de citocromo P₄₅₀ presentes nas preparações foram determinadas num espectrofotometro Aminco DW-2A como descrito por Estabrook e colaboradores (78). O tempo de incubação foi contado a partir da adição de NADPH e sempre foi controlada a perda da enzima devida à peroxidação de lipídeos (ausência de substrato e presença de NADPH), cujos valores, de aproximadamente 2%, foram descontados dos valores apresentados nos resultados. Para os estudos com DDEP (item 3.1), a incubação foi por 30 min. a 37° C e a mistura continha 1mg/ml de proteína microssomal, 10 mM DDEP, 150 mM KCl, 1,5 mM EDTA, 1,0 mM NADPH em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Para os estudos com fenelzina (item 3.2), a incubação foi realizada durante 60 min. a 37° C, a concentração de proteína microssomal foi de 2 mg/ml, o EDTA foi substituído por DETAPAC e o NADPH por um siste-

ma gerador contendo, 0,78 mM NADP, 7,8 mM glicose-6-fosfato, 0,8 unidades /ml glicose-6-fosfato desidrogenase e 2,55 mM $MgCl_2$.

A ligação dos substratos e dos captadores de spin ao citocromo P_{450} foi determinada por espectroscopia diferencial (35). A diferença entre o máximo e o mínimo de absorção foi medida a várias concentrações dos substratos e os valores obtidos foram utilizados para determinar as constantes aparentes de ligação. No caso dos captadores de spin, as concentrações reais são conhecidas; no caso do DDEP, bastante insolúvel em água, foi preparada uma solução saturada na suspensão microssomal. Essa solução foi filtrada através de lã de vidro e a concentração de DDEP foi determinada, após extração com acetato de etila/eter etílico (1.5, v/v), por cromatografia gasosa como sendo 0,06mM. A solução saturada de DDEP em microssomos foi utilizada como solução estoque para adição de volumes conhecidos nas experiências de espectroscopia diferencial.

- d. Análise de Metabólitos - O metabolismo do DDEP foi acompanhado indiretamente, pela destruição do citocromo P_{450} por ele induzida (76). Embora o seu metabólito desalquilado, a 3,5-bis(etoxicarbonil)-2,6-dimetilpiridina, possa ser acompanhado por cromatografia gasosa após extração, a sua decomposição durante o procedimento analítico tornava difícil a sua quantificação.

A N-demetilação da benzftamina foi ensaiada nas condições usadas por Correia e Mannering (80), sendo o formaldeído quantificado pelo método de Nash (81).

Para a dosagem dos metabólitos da fenelzina, a mistura de reação e as condições de incubação foram as mesmas utilizadas para acompanhar a destruição do citocromo P₄₅₀. Nas misturas controle o sistema gerador NADPH foi omitido. A concentração de substrato foi 5mM e o volume final de 25 ml. As incubações foram realizadas sob agitação a 37° C e a reação terminada pela adição de ácido tricloroacético a uma concentração final de 5% (peso/volume). As misturas foram centrifugadas para remover os microsossomos precipitados e os sobrenadantes extraídos com 10 mL de hexano (grau UV da Burdick e Jackson, Inc.). Adicionou-se aos extratos orgânicos uma quantidade conhecida de propilbenzeno, como padrão interno, e eles foram analisados por cromatografia gasosa, numa coluna de 6 pés empacotada com 10% Carbowax 20 M em 120/140 mesh Chrom Q. A temperatura da coluna, inicialmente a 50° C, foi programada para atingir 200° C com uma velocidade de incremento de 15° C/min. Esses estudos foram realizados num cromatógrafo da Varian, modelo 2100 com detecção por ionização de chama, e a integração dos cromatogramas foi realizada com um integrador da Hewlett-Packard, modelo 3390 A. As estruturas dos metabólitos foram estabelecidas pela comparação de seus tempos de retenção cromatográficos e de seus espectros de massa com aqueles obtidos para amostras autênticas. Esses estudos foram realizados num espectrômetro de massa Kratos MS-25 acoplado a um cromatômetro de gás da Varian, modelo 3700; nestes casos a coluna utilizada foi capilar, de 24 m de sílica fundida com OV - 1 e a sua temperatura foi programada para

aumentar quatro minutos após a injeção, a uma velocidade de 15° C/min. até atingir 250° C.

- e. Purificação e Caracterização do Aduto de Heme - A fenelzina dissolvida em água foi administrada por injeção intraperitoneal numa dose de 60 mg/Kg a 18 ratos machos, Sprague-Dawley, de 250-300 g de peso, que tinham sido pré-tratados por 4 dias com fenobarbital (80 mg/Kg/dia). Três horas após a dose de fenelzina, os ratos foram decapitados e seus fígados removidos após perfusão com solução salina. Os fígados foram homogenizados e extraídos com 5% H₂SO₄ em metanol (100 mL/fígado) como descrito anteriormente (79,82). As frações de porfirinas, complexadas com zinco obtidas seguindo esse procedimento, foram submetidas duas vezes a cromatografia de camada delgada em placas de sílica gel (2000 µm de espessura) usando como solvente CHCl₃/acetona (3:1, v/v). A fração verde, de fluorescência vermelha, foi extraída das placas e purificada novamente, por cromatografia líquida de alta pressão, numa coluna Whatman 10-PAC de 4,6 X 250 mm. A eluição foi acompanhada a 590nm e o complexo de zinco da porfirina transformada por fenelzina, elui com um tempo de retenção de 8 min. O zinco foi removido por tratamento com 5% H₂SO₄ em metanol e a porfirina, livre do metal, foi novamente submetida à cromatografia líquida de alta pressão, nas mesmas condições acima descritas, exceto quanto ao acompanhamento da eluição que foi a 510 nm. A porfirina elui como um único pico com um tempo de retenção de 3 min. O espectro de massa (field desorption) foi obtido num instrumento AEI MS-902, como descrito para ou-

tros adutos de porfirinas (82). O aduto de fenelzina, aproximadamente 400 μ g, foi re-convertido no seu complexo de zinco (83) e dissolvido em clorofórmio deuterado a uma concentração final de 1 mM para os estudos de RMN. Esses espectros foram obtidos em um instrumento Nicolet NT - 360 FT nas facilidades de ressonância magnética nuclear da Universidade da Califórnia, Davis. Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos num espectrofotômetro Hewlett-Packard HP - 8450 A.

- f. Estudos de RPE - As incubações microssomais utilizadas foram as mesmas descritas para os estudos de inativação do citocromo P₄₅₀ "in vitro" mais os captadores de spin, cujas concentrações finais estão descritas nos resultados apresentados. Alíquotas das incubações eram transferidas para uma pipeta capilar de 50 μ L, fechada numa ponta, e seus espectros analisados em espectrômetros da Varian; foram utilizados os modelos E-3, E-4 ou E-109 na University of California, Berkely ou no V.A. Hospital, San Francisco, dependendo das disponibilidades. As possíveis diferenças estão normalizadas e a maioria dos resultados aqui apresentados, foram obtidos num instrumento E-3. Alguns espectros foram obtidos num tubo permeável a gás (diâmetro interno 0,81 mm, espessura da parede 0,05 mm da Zeus Industrial Products). Isso foi necessário para manter a mistura da reação aeróbica, pois que a presença de redutores endógenos e das próprias hidrazinas em excesso, leva à redução do nitróxido aduto e conseqüentemente, do sinal de RPE; em outras circunstâncias, o uso do tubo permeável a gás foi para manter

a mistura sob nitrogênio. No caso da utilização de solventes orgânicos é necessário remover o oxigênio que pelo seu paramagnetismo e maior solubilidade em solventes orgânicos, leva a uma distorção dos espectros.

Para estimar as concentrações dos adutos obtidos, utilizou-se como padrão o radical 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidinoxila. As determinações dos valores de g foram feitas utilizando-se como padrão interno a 2,2-difenil-1-picrilidrazila (84).

- g. Purificação e Caracterização do Aduto Etil-POBN - Para obter um padrão autêntico que propiciasse o desenvolvimento de um protocolo de purificação, os radicais etila foram gerados, na presença de POBN, pela oxidação de etilidrazina catalizada por $\text{Cu}^{2+}/\text{OH}^-$ (85). A 5 mL de uma solução 0,2 mM de CuCl_2 em tampão carbonato 0,05M, pH 10, foram adicionadas 100 mg de POBN e 30 mg de etilidrazina; a solução permaneceu sob agitação por 2 hs. à temperatura ambiente (20-25°C). A mistura resultante foi liofilizada e o resíduo extraído com 5 mL de acetona. O extrato foi concentrado num rotavapor e em seguida submetido a cromatografia de camada delgada (placas de Silica gel de 500 μm de espessura) usando como solvente 5% (v/v) metanol em clorofórmio. A banda contendo o radical aduto (R_F aproximadamente 0,4) foi removida da placa, extraída com o mesmo solvente e re-cromatografada nas mesmas condições. A localização do radical aduto nas placas foi feita por extrações de frações da placa e análise de RPE. A quantificação do radical antes da purificação indicou a formação de aproximadamente 0,5 mg que

se reduziu a aproximadamente 0,2 mg após as cromatografias. O espectro de massa do material isolado foi obtido num instrumento Kratos MS - 25 sob condições de impacto de elétrons, com 70 eV de voltagem de ionização.

Uma incubação microsomal de larga escala (100 mL) contendo 1mg/mL de proteína, 10 mM DDEP, 1 mM NADPH e 20 mM POBN, foi incubada 30 min. a 37° C. A mistura foi então centrifugada por 30 min., a 4° C, a 100.000 Xg. O sobrenadante foi liofilizado e o resíduo extraído com acetona. O extrato foi concentrado e submetido à cromatografia como descrito para a etilidrazina, só que a cromatografia foi repetida três vezes. A quantidade de radical obtida durante a incubação microsomal foi de aproximadamente 0,1 mg que se reduziu a aproximadamente 0,02 mg após a purificação. O espectro de massa do produto formado biologicamente foi obtido nas mesmas condições utilizadas para o espectro do aduto derivado da etilidrazina.

- h. Purificação e Caracterização do Aduto de POBN derivado da Fenelzina - Novamente, primeiro isolamos o aduto de POBN obtido durante a oxidação química da fenelzina para podermos dispor de um padrão. A 10 mL de uma solução 0,1 mM CuCl₂ em tampão carbonato 0,05 M, pH 10, foram adicionadas 39 mg de POBN e 52 mg de fenelzina; a solução permaneceu sob agitação à temperatura ambiente, 20-25° C, e a formação do radical aduto foi acompanhada por RPE. Após 90 min. a mistura foi neutralizada com HCl e liofilizada. O resíduo foi extraído com 10 mL de acetona, esta removida num rotavapor e o novo resíduo, dissolvido em CHCl₃, foi submetido a cro

matografia numa coluna de sílica gel 60, de 10 X 260 mm, e eluído com 5% de metanol em clorofórmio. As frações eluídas foram analisadas por RPE para detectar o aduto e por espectroscopia de UV para detectar o POBN. As frações que apresentavam sinal de RPE e pouca contaminação de POBN foram combinadas, concentradas e recromatografadas numa coluna Merck Lobar, pré-empacotada, de sílica gel de 10 X 240 mm. A coluna foi eluída com o mesmo solvente, 5% metanol em clorofórmio, em condições de baixa pressão. As frações eluídas, de 0,5 mL, eram acompanhadas continuamente a 280 nm (o máximo de absorção do radical aduto). As frações apropriadas foram combinadas e o solvente removido sob nitrogênio. O radical aduto obtido, aproximadamente 300 µg por peso numa balança Cahn, foi caracterizado por espectroscopia de absorção eletrônica e de massa.

O aduto obtido biologicamente foi isolado de uma incubação microsomal em larga escala (125 mL) contendo 1 mg/mL de proteína microsomal, 5mM fênelzina, 20mM POBN, 0,3 mM NADP⁺, 5 unidades/mL de isocitrato desidrogenase, 5 mM isocitrato, 5 mM MgSO₄, 150 mM KCl e 1,5 mM DETAPAC em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. A mistura foi incubada a 37°C por 60 min. e então centrifugada a 100.000Xg por 30 min. O sobrenadante foi liofilizado, o resíduo extraído com 20 ml de acetona e o aduto de spin foi então purificado como descrito acima para o aduto gerado quimicamente. Contudo, devido ao grande excesso de POBN, a cromatografia na coluna Merck Lobar foi realizada duas vezes para purificação do aduto formado biologicamente.

Os espectros de absorção eletrônica dos adutos fo
ram obtidos num espectrofotômetro Hewlett-Packard HP 8450 A
e os espectros de massa no instrumento Kratos MS-25 sob con
dições de impacto de elétrons (70 eV).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito dos Captadores de Spin sobre o Metabolismo Microsomal: Isolamento Biológico do Aduto Etil-POBN

Os nossos primeiros estudos de aplicação da técnica do captador de spin em sistemas microssomais, já nos colocara a questão da diferença de efetividade observada com dois dos captadores mais comumente empregados em sistemas biológicos. Assim, a oxidação microssomal da etilidrazina leva a obtenção de um aduto estável de PBN mas a nenhum aduto observável de DMPO (85). Todavia, ambos os compostos apresentam constantes de velocidade aparentes bastante similares para a reação de captação de radicais de carbono (Tabela 2). Também, nos estudos demonstravam que eles eram igualmente eficientes para captar radicais de carbono gerados em sistemas aquosos, como aqueles formados durante a oxidação de derivados de hidrazina catalisada por CuCl_2 em meio alcalino, ou por oxiemoglobina em tampão fosfato (85,86). Esses nossos resultados eram compatíveis com outros descritos na literatura que contudo, não fornecia explicações para esse comportamento diferenciado. Havia, inclusive, a colocação de uma possível idiosincrasia dos diferentes captadores de spin (59).

Apesar de todas as lacunas existentes na literatura sobre a técnica do captador de spin, vislumbrávamos a sua potencialidade e resolvemos continuar aplicando-a, tentando contribuir para o preenchimento daquelas lacunas.

Os nossos estudos preliminares, aplicando a técnica

nica na oxidação microsossomal do DDEP (ver Fig. 8, abaixo) indicaram a formação de radicais de carbono por captação com PBN (87). Contudo, a quantidade de aduto de spin obtida era muito pequena e nos colocava frente ao problema da identificação do radical captado. O DMPO, que poderia ser mais adequado para a identificação do radical primário (Tabela 1), novamente se mostrava inefetivo no sistema microsossomal. Na ausência de uma base racional para a escolha do captador de spin, utilizamos a abordagem das tentativas e ensaiamos o POBN em nosso sistema. Para nossa surpresa, o rendimento do radical aduto obtido durante a oxidação microsossomal do DDEP em presença de POBN, era cerca de cinco vezes maior que o obtido em presença de PBN (Fig. 3).

Esse resultado inesperado recolocava uma série de questões. Primeiro, não eram conhecidas as estabilidades relativas dos adutos de PBN e POBN. Também, não era possível determinar se os dois compostos estavam captando o (s) mesmo (s) radical (is). Supondo que estivessem e que as estabilidades dos adutos fossem comparáveis, como, novamente, explicar as diferenças de efetividade? Para responder essas questões era necessário fazer um estudo sistemático sobre os efeitos dos captadores de spin sobre o metabolismo microsossomal. Não se pode esquecer que ao adicionar o captador de spin se está introduzindo uma perturbação no sistema microsossomal, nem tampouco, que esse sistema enzimático é bastante inespecífico quanto ao substrato, sendo capaz de interagir com toda uma gama de diferentes compostos químicos.

Figura 3. - Comparação do espectro de RPE obtido após 30 min. de metabolismo microsomal de DDEF em presença de 100 mM POBN (espectro superior) ou 100 mM PBN (espectro inferior). A incubação foi realizada nas condições padrão como descrito em Materiais e Métodos. Ajustes do instrumento: potência, 10 mW ; amplitude de modulação 1,0G; constante de tempo 1,0 s; intervalo de varredura, 200G, tempo de varredura 30 min.

- a. Efeito dos Captadores de Spin Sobre o Metabolismo Microsomal. - Escolhemos como substrato o DDEP, de nosso interesse imediato, e a benzftamina um clássico substrato do citocromo P_{450} . O metabolismo do DDEP foi acompanhado indiretamente, pela destruição do citocromo P_{450} por ele induzida (79) e a N-demetilação da benzftamina foi acompanhada pela formação de formaldeído. Os resultados obtidos são apresentados na Fig.4, e mostram que os captadores inibem ambos os processos e o fazem numa extensão que se correlaciona com a habilidade desses compostos formarem adutos estáveis, observáveis por RPE, durante o metabolismo microssomal do DDEP.

O DMPO, que não forma adutos estáveis nessa condições, não inibe praticamente nem a destruição do citocromo P_{450} mediada por DDEP, nem a N-demetilação da benzftamina. Por sua vez, o PBN inibe fortemente ambos os processos, e o POBN, o captador mais eficiente no sistema do DDEP, não inibe a destruição do enzima e tem um efeito intermediário, entre o do DMPO e do PBN, sobre a N-demetilação da benzftamina (Fig. 4).

- b. Ligação dos Captadores de Spin ao Citocromo P_{450} - Uma possível explicação para os efeitos inibitórios observados é a de que o PBN e o POBN competem efetivamente com os substratos para ligação no sítio ativo, enquanto que o DMPO não o faz. Essa hipótese pode ser facilmente testada, acompanhando-se a ligação dos captadores de spin ao citocromo P_{450} microssomal, por espectroscopia diferencial (35). De fato, o DMPO produz um espectro tipo II quando se liga ao citocromo P_{450} oxidado, mas a interação é caracterizada por uma alta constante de dissociação aparente ($K_s=6100 \mu M$) (Fig.5).

Figura 4. - Inibição, por três captadores de spin, da destruição do citocromo P₄₅₀ mediada por DDEP e da N-demetilação da benzftamina. As ordenadas à esquerda referem-se à porcentagem de inibição da destruição do citocromo pelas concentrações estipuladas de DMPO (■), PBN (●) e POBN (▲). As ordenadas à direita correspondem à porcentagem de inibição da N-demetilação da benzftamina pelas concentrações estipuladas de DMPO (◻), PBN (○) e POBN (△). As condições de incubação são as descritas em Materiais e Métodos. A máxima destruição do citocromo P₄₅₀, em ausência dos captadores, corresponde a 39% do total da enzima presente nas preparações microsossomais

A ligação de PBN resulta no aparecimento de um espectro tipo I e uma constante de dissociação aparente de $150\mu\text{M}$, enquanto que a do POBN resulta num espectro tipo II, a partir da qual se determina uma constante de dissociação aparente de $700\mu\text{M}$ (Fig. 5). Assim, o PBN parece ligar-se ao citocromo P_{450} oxidado cinco vezes mais fortemente que o POBN e trinta e cinco vezes mais fortemente que o DMPO. Deve-se contudo lembrar que esse tipo de abordagem experimental não estabelece que os três captadores estejam ligados ao mesmo isoenzima. Também, para propósitos comparativos, apresentamos os valores das constantes de dissociação aparente para o DDEP, um substrato tipo I, de $2\mu\text{M}$ (Fig. 5) e para a benzftamina, também um substrato tipo I, de $10\mu\text{M}$ (88).

Os resultados sumarizados na Fig. 4 e Fig. 5, mostram que a inibição da demetilação da benzftamina correlaciona muito bem com as afinidades relativas dos captadores de spin pelo citocromo P_{450} . O DMPO se liga fracamente e inibe pouco a demetilação; o PBN se liga fortemente e inibe bastante, enquanto que o POBN ocupa uma posição intermediária tanto quanto à ligação como quanto à inibição. Os resultados também explicam a relativa ineficiência do PBN para captar os radicais derivados do DDEP. Se o isoenzima que catalisa o metabolismo do DDEP é inibido fortemente pelas altas concentrações de PBN utilizado nos experimentos de captação, só se pode esperar um baixo rendimento de adutos de spin. Para testar definitivamente essa hipótese, comparou-se o sinal de RPE obtido durante o metabolismo microsomal de DDEP na presença de cada um dos captadores, e de am-

Figura 5. - Ligação do DDEP e dos captadores de spin ao citocromo P_{450} de ratos pré-tratados com fenobarbital. As constantes aparentes de dissociação foram obtidas como descrito em Materiais e Métodos.

bos, ao mesmo tempo. A Tabela 3 mostra que o sinal de RPE obtido em presença de POBN sozinho é reduzido em 70% de seu valor quando PBN está presente. Assim, os captadores não funcionam independentemente e o PBN inibe, de fato, a formação de radicais durante o metabolismo microsomal do DDEP.

Tabela 3. - Rendimento de Adutos de Spin Durante o Metabolismo Microsomal do DDEP

Adições à Mistura Padrão de Reação ^a	Altura do Sinal de RPE (cm) ^b
Nenhuma	ND ^c
DMPO (50mM)	ND
PBN (50mM)	1,7
POBN (5 mM)	4,6
POBN (10mM)	6,4
POBN (20mM)	9,3
POBN (50mM)	8,1
PBN (50mM) + POBN (20mM)	3,1

^a Mistura de reação contém 1mg/ml de proteína microsomal, 1mM NADPH e 10mM DDEP em tampão fosfato 0.1M pH 7.4 contendo 150 mM KCl e 1.5 mM EDTA

^b Altura do pico de RPE de baixo campo após 30 min. de incubação a 37° C

^c ND, não detectável

c. Isolamento e Propriedades Espectroscópicas do Aduto Radical Etil-POBN - Esses nossos estudos sistemáticos, além de oferecerem uma explicação bem fundamentada para a maior efetividade do POBN em captar radicais de carbono durante o metabolismo microssomal do DDEP, nos levou a conjecturar sobre a possibilidade de isolar e caracterizar estruturalmente o aduto obtido. Como já colocado várias vezes, os parâmetros do espectro de RPE são insuficientes para uma identificação inequívoca dos adutos dos captadores de spin, e a situação é ainda pior para o caso dos adutos de POBN. Este captador só foi introduzido em 1979, tem sido pouco utilizado e estudado, não havendo ainda uma compilação dos parâmetros de RPE de seus adutos, como existe para o T-NB, PBN e DMPO (ver, por exemplo, a Tabela 1).

A concentração do aduto de POBN obtida durante o metabolismo microssomal do DDEP (aproximadamente $10\mu M$) é alta, quando comparada ao rendimento de outros radicais de carbono, mas ainda insuficiente para o desenvolvimento de um protocolo de purificação do aduto, principalmente quando se parte de um sistema tão complexo.

A ausência de tentativas anteriores de isolamento desses adutos, nos levou a desenvolver um protocolo de purificação partindo de um sistema mais simples e que gerasse um alto rendimento dos radicais adutos. Escolhemos a oxidação da etilidrazina catalisada por $CuCl_2$ em meio alcalino. Nós já havíamos demonstrado a obtenção de um alto rendimento de radicais adutos de DMPO e PBN (da ordem de mM) durante a oxidação de alquilidrazinas catalisada por Cu^{2+} /

OH^- (85,86). Escolhemos a etilidrazina, porque era o radical etila aquele que esperávamos obter durante o metabolismo microsomal do DDEP (Ver Fig. 8, abaixo).

Após algumas tentativas, conseguimos de fato purificar, por sucessivas cromatografias em sílica gel (ver Materiais e Métodos), o aduto de POBN obtido durante a oxidação química da etilidrazina. O espectro de massa do radical estável purificado (Fig. 6), apresenta o pico do íon molecular a m/e 223 e um pico mais intenso a m/e 222, que seria esperado pela perda de um hidrogênio do aduto etil-POBN ($\text{PM} = 223$); o pico a m/e 166 pode ser atribuído à perda do grupo *t*-butila e de fato, essa quebra é também observada no espectro de massa do POBN, que apresenta um forte pico a m/e 138, consistente com a perda daquele grupo a partir do íon molecular a m/e 194 (não apresentado).

Desenvolvido o protocolo, ele foi adaptado ao sistema microsomal. Considerando a relação existente entre as concentrações do radical aduto, aproximadamente μM , e a do POBN adicionado ao sistema, da ordem de 100 mM em estudos clássicos de captação de spin, primeiro procuramos diminuir a concentração de POBN numa extensão que não afetasse o rendimento de radicais adutos. A tabela 3, mostra que 20 mM de POBN pode ser considerada uma concentração ótima e essa foi aquela utilizada nos nossos experimentos de purificação. Mesmo assim, tivemos que introduzir mais separações cromatográficas para o sistema microsomal e o radical aduto purificado apresentou ainda uma certa contaminação de POBN, detectável no espectro de massa. Apesar dessa con

taminação, é indiscutível que, tanto no processo químico como no enzimático, ocorre a formação do aduto etil-POBN. Ambos adutos purificados apresentam o mesmo espectro de massa (Fig. 6) e o mesmo espectro de RPE com $a_N = 15,73$ e $a_H = 2,74$ em água e $a_N = 14,43$ e $a_H = 2,50$ em benzeno (Figura 7).

Figura 6. - Região superior do espectro de massa do aduto etil-POBN obtido a partir de: (a) etilidrazina/Cu²⁺/OH⁻ e (b) incubações microssomais de DDEP. O espectro (b) foi corrigido por subtração dos picos devido ao POBN contaminante.

Figura 7. - Comparação do espectro de RPE em benzeno dos adu-
tos de POBN obtidos a partir de (a.) etilidrazina/
 $\text{Cu}^{2+}/\text{OH}^-$ e (b) incubações microssomais de DDEP.
Ajustes do instrumento: potência, 10mW; amplitude
de modulação, 0,5G; constante de tempo, 0,3s; in-
tervalo de varredura, 100G; tempo de varredura 8
min.

- d. Conclusões - Esses estudos sitemáticos forneceram uma expli-
cação racional para as diferentes efetividades dos captado-
res de spin em sistemas microssomais. Explorando essas di-
ferenças conseguimos, pela primeira vez na literatura, iso-
lar e caracterizar espectroscopicamente, um aduto de radi-
cal de carbono formado durante o metabolismo microssomal.

Isso nos abriu a possibilidade de abordar mecanisticamente, detalhes do metabolismo de xenobióticos que não fora possível até então. Apresentaremos no item 3.2. um estudo completo, abordando não só a formação de radicais de carbono, como as suas interações com biomoléculas.

No caso do metabolismo microsomal do DDEP, a caracterização inequívoca da formação do aduto etil-POBN foi um passo fundamental para demonstrarmos que, pelo menos no caso do DDEP e compostos relacionados, a oxidação do nitrogênio pelo citocromo P_{450} ocorre por passos de um elétron. Na verdade, nossos estudos foram mais abrangentes e além da técnica de captação de spin, empregamos outras abordagens experimentais, inclusive síntese de derivados de DDEP, como N-etil-DDEP para definitivamente eliminar uma das possíveis vias de oxidação (viac, Fig. 8), e outros derivados para estudar a relação estrutura versus metabolismo versus capacidade de transalquilação do grupo prostético do citocromo P_{450} . Esses resultados são detalhadamente descritos na referência 30.

Figura 8. - Possíveis vias para a oxidação microsossomal do DDEP.
A única via compatível com nossos estudos completos (30) é a via a.

3.2. Formação de Radicais de Carbono durante o Metabolismo da Fenelzina: Implicações Toxicológicas e Terapêuticas

Os derivados de hidrazina apresentam várias aplicações industriais e tecnológicas destacando-se o seu uso como combustíveis de foguetes, antioxidantes, herbicidas e remédios (89). As drogas atualmente em uso que devem a sua atividade farmacológica à presença do grupo hidrazina nas suas estruturas incluem: (i) inibidores da monoamino oxidase, isocar

boxazida, nialamida e fenelzina; (ii) o agente antihipertensivo hidralazina; (iii) o agente antituberculose, isoniazida e (iv) a droga anticancer, procarbazina (90) (Esquema 10)

(Esquema 10)

Todavia, a aplicação de derivados de hidrazina como remédios fica comprometida pelo fato de que eles são metabolicamente ativados a espécies que promovem uma série de efeitos tóxicos. O metabolismo da isoniazida pode levar à necrose hepática em certas circunstâncias (91), o da hidralazina pode resultar em cancer (92) e lupus eritematoso (93) e o da fenelzina, em cancer (94,95). Até recentemente acreditava-se que espécies catiônicas derivadas das drogas fossem os agentes alquilantes, responsáveis pelos efeitos tóxicos observados (96).

Além da toxicidade, há muito era conhecida a propriedade de derivados de hidrazinas inibirem o metabolismo oxidativo de drogas co-administradas (97-99). Mais recentemente,

estudos com fenilidrazina (100) e fenelzina (101) demonstraram que a inibição do metabolismo oxidativo por esses agentes era devida, pelo menos em parte, à inativação irreversível do citocromo P₄₅₀ microsomal. Tal inativação requeria a transformação catalítica dos substratos pelas enzimas vulneráveis e estava associada à acumulação de pigmentos hepáticos não identificados. O desconhecimento da estrutura desses pigmentos, bem como do mecanismo de sua formação nos levou a estudar o metabolismo microsomal de aquilidrazinas, principalmente da fenelzina, em detalhes.

a. Metabólitos da Fenelzina - Esse composto é extensivamente metabolizado "in vivo", inclusive pelo homem, sendo muito pequena a fração excretada como formas que mantêm intacta a função hidrazina (102). Dentre as suas transformações já descritas, incluem-se: (i) ao ácido 2-fenilacético, "in vivo" e por homogenatos de fígado (103,104); (ii) à fenilidrazona do 2-fenilacetaldeído, pela monoamino oxidase mitocondrial (105) e (iii) ao N-acetil derivado, pelo citosol hepático de homens e ratos (106).

Nós estudamos o metabolismo microsomal hepático da fenelzina, utilizando ratos induzidos com fenobarbital. As misturas de incubação foram extraídas com hexano e submetidas a cromatografia gasosa. Pode-se constatar a formação de cinco metabólitos dependentes da presença de NADPH (Fig. 9). Destes, três foram inequivocamente identificados por cromatografia gasosa e comparação do espectro de massa de amostras autênticas, como: etibenzeno (pico A), 2-fenilacetaldeído (pico D) e 2-feniletanol (pico F) (Fig. 9); os

metabólitos correspondentes aos picos C e E não foram identificados.

A observação de que a fenelzina é oxidada por microsossomos ao 2-fenilacetaldeído é consistente com os resultados obtidos "in vivo", à medida que são bem conhecidas as oxidações de aldeídos a ácidos por enzimas do citosol. As pequenas concentrações de 2-feniletanol obtidas são, provavelmente, produto da redução do 2-fenilacetaldeído. De fato, as nossas preparações microsossomais são capazes de reduzir o aldeído ao álcool (controle não apresentado) e também, já foi descrito na literatura uma atividade aldeído reductase microsossomal (107). O outro metabólito microsossomal da fenelzina, que aparece em quantidades apreciáveis, é o etilbenzeno (pico A, Fig. 9). Esses nossos estudos mostram que o etilbenzeno é formado por via radicalar e que este processo é o responsável pela destruição do citocromo P_{450} (ver abaixo).

- b. Destruição do Citocromo P_{450} e sua Relação com a Formação de Metabólitos - A incubação de fenelzina com microsossomos leva à destruição do citocromo P_{450} (Fig. 10). Essa perda do enzima também ocorre, embora em menor extensão, na ausência de NADPH. Além da fenelzina, outras alquilidrazinas promovem a inativação do citocromo P_{450} e a Fig. 10 inclui também, os efeitos observados durante o metabolismo microsossomal da benzilidrazina.

Para estabelecer possíveis relações entre a destruição do enzima e a formação de metabólitos, essa foi acompanhada e quantificada em função do tempo. Os resulta-

Figura 9. - Análise cromatográfica dos metabólitos extraídos com hexano de incubações microssomais da fenelzina em presença (traço inferior) e em ausência (traço superior) de NADPH. As condições de incubação estão descritas em Materiais e Métodos. O pico B é devido ao propilbenzeno utilizado como padrão interno. O traço superior foi obtido em condições de maior sensibilidade do instrumento. Durante a obtenção do cromatograma, a temperatura da coluna foi variada de 50° C a 200° C a uma velocidade de aumento de 15° C/min.

dos apresentados na Fig. 11, mostram que após 60 min. de incubação são formados 270 nmoles ($11\ \mu\text{M}$) de etilbenzeno e 728 nmoles ($29\ \mu\text{M}$) de fenilacetaldeído; no mesmo experimento determinou-se a formação de 118 nmoles ($4,7\ \mu\text{M}$) de 2-feniletanol (não apresentado). Evidentemente esses números não podem ser tomados como reais quando se considera a alta volatilidade dos produtos bem como a possibilidade de sofrerem reações químicas e enzimáticas no sistema microsomal. Para a obtenção de números mais próximos dos valores reais, realizaram-se experiências controles. Nessas, quantidades conhecidas de etilbenzeno e de 2-fenilacetaldeído foram submetidos ao mesmo procedimento experimental utilizado para a fenelzina, da incubação microsomal à extração com hexano e análise cromatográfica. Constatou-se que a quantidade de metabólitos recuperada nos extratos ficava entre 15-25% da quantidade inicialmente adicionada. Assim, as quantidades de 2-fenilacetaldeído e etilbenzeno formadas durante o metabolismo microsomal da fenelzina, são pelo menos quatro vezes maiores que os números apresentados na Fig. 11.

Essa figura compara a formação dos metabólitos com a destruição do citocromo P_{450} . Pode-se notar que praticamente toda enzima suscetível à inativação por fenelzina, está destruído nos primeiros 15 min. de incubação. O fato de que a quantidade de etilbenzeno continua a aumentar após os 15 min. iniciais sugere que existem outros caminhos, independentes de NADPH, para a sua formação. A ausência de uma quebra na curva de formação do 2-fenilacetaldeído sugere

re que o citocromo P_{450} deve contribuir muito pouco para a sua produção. Por outro lado, a natureza bifásica da produção do etilbenzeno sugere que a fração do citocromo P_{450} que é passível de destruição, contribui consideravelmente para a formação desse metabólito.

A figura 11 permite estimar o número de moléculas de fenelzina que serão oxidadas até que um evento de destruição do citocromo P_{450} ocorra. Essa razão não corresponde exatamente à razão de partição que caracteriza a destruição de um enzima por um inibidor suicida (108), porque não é uma medida da partição intrínseca do substrato no sítio ativo do enzima. Apesar disso, aquela razão pode dar uma estimativa da eficiência fisiológica da fenelzina como agente destrutivo do citocromo P_{450} . Para diminuirmos a contribuição de reações não mediadas pelo citocromo, tomamos a soma dos produtos formados e o número de moléculas de enzima destruídos, após 15 min. de metabolismo microssomal. A razão entre esses números fica entre 5-6, com os valores da Fig. 11, ou 20-24 se se considera a correção devida à recuperação dos metabólitos durante o procedimento de análise. Assim, um pequeno número de moléculas de fenelzina é oxidada até que ocorra um evento de inativação do enzima, sugerindo que esse composto é um eficiente agente destruidor do citocromo P_{450} .

- c. Estrutura do Produto da Inativação do Citocromo P_{450} Mediada pela Fenelzina - Muakkassah e Yang (101) constataram que a destruição do citocromo P_{450} por fenelzina, "in vitro", era acompanhada de um descoramento das preparações micros

Figura 10. Destruição do citocromo P₄₅₀ por fenelzina e benzilidrazina em função do tempo de incubação: (i) perda do enzima causada por fenelzina 5 mM na presença (●) e na ausência (○) de NADPH; (ii) perda do enzima causada por benzilidrazina 5 mM na presença (■) e na ausência (□) de NADPH; e (iii) perda do enzima na ausência do substrato (△). A mistura de incubação e suas condições experimentais são aquelas descritas em Materiais e Métodos.

Figura 11. - Formação de produtos e destruição do citocromo P_{450} durante o metabolismo microssomal da fenelzina 5 mM: formação de 2-fenilacetaldeído (●), formação de etilbenzeno (○) e destruição do citocromo P_{450} (Δ). A mistura de incubação e suas condições experimentais são aquelas descritas em Materiais e Métodos.

somais. Nós confirmamos essa observação e conseguimos isolar um pigmento anormal a partir de fígados de ratos induzidos com fenobarbital e tratados com fenelzina (60 mg/kg). A porfirina isolada pelos procedimentos usuais (Ver Materiais e Métodos) apresenta um espectro de absorção eletrônica característico de um N-alkil derivado da protoporfirina IX (83,109). A base livre em CHCl_3 apresenta uma banda Soret a 416 nm e picos de intensidade decrescente a 512, 546, 592 e 652 nm; o seu complexo de zinco, no mesmo solvente, apresenta a Soret a 416 nm e picos adicionais a 548, 594 e 634 nm (Fig. 12).

Os únicos picos presentes no espectro de massa ("field desorption"), são o íon molecular monoprotonado a m/e 695 e seus satélites isotópicos a m/e 696 e m/e 697. O pico a m/e 695 é o esperado para uma estrutura resultante da adição de um grupo feniletila (PM,105) ao éster dimetílico da protoporfirina IX (PM,590). O espectro de absorção e o espectro de massa sugerem que a porfirina isolada dos fígados dos ratos tratados com fenelzina, é o éster dimetílico da N-(2-feniletil) protoporfirina IX (Fig. 13).

Essa estrutura é confirmada por estudos de RMN do complexo de zinco da porfirina. A Tabela 4 apresenta a posição dos picos do espectro de RMN do complexo, suas multiplicidades e os resíduos responsáveis por suas presenças. Deve-se ressaltar que o espectro de RMN mostra a presença de um segundo isômero (10-15% da amostra total) cujos dados não aparecem na Tabela 4. Os prótons da parte porfirínica foram designados por analogia com os sinais correspon

Figura 12. - Espectro de absorção eletrônica da porfirina isolada de ratos tratados com fenelzina (—) e de seu complexo com zinco (---) em CHCl_3 . Na região da banda Soret a escala das ordenadas é 1/10 da utilizada para o restante do espectro.

Figura 13. - Estrutura do éster dimetilico da porfirina hepática isolada a partir de ratos tratados com fenelzina.

dentes de outras porfirinas N-alquiladas (83,109,110); a identidade do grupo N-alquil foi confirmada por experimentos de desacoplamento. Assim, a irradiação dos prótons em orto do grupo fenila a 5,305 ppm leva à transformação do triplete, devido aos prótons em meta a 6,508 ppm, em um doublete. O acoplamento residual dos prótons em meta é com o próton na posição para a 6,612 ppm. A irradiação do triplete a - 0,196 ppm, designado como devido aos prótons do grupo metileno ligado ao grupo fenila, leva à transformação

do triplet a - 4,925 ppm em um singlete, mostrando que este sinal é devido aos prótons do grupo metileno ligado ao nitrogênio pirrólico.

A Fig. 13 mostra um dos possíveis isômeros do pigmento hepático. Dependendo do nitrogênio alquilado, quatro isômeros são possíveis mas nossos resultados indicam que o principal produto tem o anel C ou o anel D alquilado, já que: (i) não existe um ombro na banda Soret do complexo de zinco da porfirina (Fig. 12) (109,110); (ii) o espectro de RMN mostra um multiplete devido aos dois prótons vinílicos internos, um multiplete devido aos prótons vinílicos terminais e quatro diferentes multipletes devidos aos oito prótons metílicos das duas cadeias laterais de ácido propiônico (Tabela 4) (83,109).

- d. Formação de Radicais Livres Durante o Metabolismo da Fenelzina - O metabolismo microsomal da fenelzina em presença de POBN leva à formação de um aduto de spin estável (Fig.14). Como no metabolismo microsomal do DDEP (item 3.1), não se obtém nenhum sinal estável em presença de DMPO e aqui, tampouco com PBN, o que nos levou a utilizar o POBN como captador de spin.

O aduto de spin do POBN não é observado na ausência de NADPH, mas pode ser observado, em menor concentração, em presença de NADPH e microsomos pré-inativados por aquecimento (Fig. 14). Essa formação não enzimática de radicais deve ser resultado da autooxidação da fenelzina catalisada por heme ou outros complexos metálicos (111,112).

Tabela 4. Designações dos Sinais de RMN para o Complexo de Zinco da Porfirina Hepática Isolada de Ratos Tratados com Fenelzina.

PRÓTON (S)	NÚMERO DE PRÓTONS	POSIÇÃO ppm	MULTIPLICIDADE ^a
meso	1	10,225	s
meso	1	10,240	s
meso	1	10,204	s
meso	1	10,166	s
vinílicos internos	2	8,074-8,265	m
para fenílicos	1	6,627	t (J=7 Hz)
meta fenílicos	2	6,508	t (J=7 Hz)
vinílicos terminais	4	6,079-6,538	m
orto fenílicos	2	5,305	d (J=7 Hz)
metilenos do propionato	4	4,093-4,240	m
		4,303-4,367	m
metila e metoxila	18	3,367;3,550 3,593;3,633 3,585;3,641	s (seis)
metilenos do propionato	2	3,252	t (J=7 Hz)
metilenos do propionato	2	2,816	t (J=7 Hz)
metilenos benzílico	2	-0,196	t (J=8 Hz)
N-metilenos	2	-4,925	t (J=8 Hz)

^a Multiplicidade do sinal: s, singlete; d, doublete; m, multiplete; t, triplet; as constantes de acoplamento são apresentadas em parênteses.

A formação de radicais livres dependente de processos enzimáticos, pode ser devida a duas enzimas microsomais, o citocromo P_{450} e a FAD-amino oxidase (FP₃, Esquema 2). Ambas tem sido implicadas nas transformações metabólicas de alquilidrazinas, sendo sempre difícil estipular o papel de cada uma delas (113,114). Nossos resultados sugerem um maior envolvimento do citocromo P_{450} . De fato, a formação do aduto de POBN é inibida por CO, SKF 525-A, inibidores clássicos do citocromo P_{450} e por PBN, que demonstramos anteriormente também ser um inibidor do enzima (Fig.14, Tabela 5). Também, a cinética de destruição do citocromo P_{450} se correlaciona, em certa extensão, com a cinética de formação do radical aduto (Fig. 11, comparar com Fig. 15). Na Fig. 15 a concentração do radical aduto foi calculada a partir da altura do pico central de campo baixo, do espectro de RPE da amostra; o fator utilizado para converter altura do pico em concentração, foi calculado após isolamento e purificação do aduto de POBN (ver abaixo). Por outro lado, pudemos eliminar a participação de superóxido e H_2O_2 na formação do aduto radical estável, pelo efeito da superóxido dismutase e catalase adicionadas ao sistema (Tabela 5). Finalmente, uma forte evidência para a participação do citocromo P_{450} na formação de radicais livres a partir da fenelzina, é a inativação do enzima por alquilação do grupo heme com formação de 2-feniletila protoporfirina IX (Fig. 12, Fig. 13 e Tabela 4).

Figura 14. - Espectro de RPE de incubações microsossomais de fenelzina 5 mM, em presença de POBN 20 mM: (a) incubação com microsossomos pré-inativados por aquecimento; (b) incubação normal; (c) incubação normal pré-tratada com CO por 2 min.; (d) incubação normal contendo SKF 525-A 0,1 mM; e (e) incubação sem NADPH (o mesmo resultado é obtido para uma incubação sem fenelzina). Os espectros foram obtidos após 60 min. de incubação a 37° C. Ajustes do espectrômetro: potência 10 mW; amplitude de modulação, 1,0 G; constante de tempo, 1,0 s; tempo de varredura 0,5 h; intervalo de varredura, 200 G; ganho 6.2×10^5 .

Figura 15. - Efeito da concentração de fenelzina e do tempo de incubação na concentração do aduto radical de POBN: 10 mM (○); 5 mM (●); e 1 mM (Δ). A concentração de POBN é 20 mM e as demais concentrações e condições experimentais são descritas em Materiais e Métodos.

Tabela 5. - Concentração do Radical Aduto de POBN Obtido Durante a Incubação Microsossomal de Fenelzina em Várias Condições.

CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO ^a	CONCENTRAÇÃO DO RADICAL ADUTO, μ M	PORCENTAGEM DO CONTROLE
Normal	4,8	100
+ CO	3,2	67
+ SKF 525-A (0,1 mM)	3,6	76
+ Catalase (0,1 mg/mL)	4,8	100
+ SOD (0,1 mg/mL)	4,6	97
- NADPH + NADH (1,0 mM)	2,0	67
- POBN + PBN (50 mM)	N.D. ^b	-

^a Incubação de 60 min.

^b N.D., não detectável

e. Identificação do Radical Aduto de POBN obtido a partir da Fenelzina - Para que se possa relacionar os estudos metabólicos com a inativação do citocromo P₄₅₀, é fundamental estabelecer a estrutura do radical primário que está gerando o aduto de POBN estável. Como já discutido, os parâmetros de RPE não são suficientes para essa determinação. Aproveitando a experiência desenvolvida no estudo do metabolismo microsossomal do DDEP (item 3.1), tentamos isolar e purificar o aduto de POBN obtido na oxidação da fenelzina. Novamente, comparamos o aduto obtido quimicamente, por oxidação

com $\text{Cu}^{2+}/\text{OH}^-$ com o isolado após a transformação microsossomal. O espectro de RPE dos adutos purificados (ver Materiais e Métodos) são caracterizados por $a_N=15,73$, $a_H=2,75$ e $g=2,006$ em água (Fig. 16) e $a_N=14,41$ e $a_H=2,68$ em benzeno. O espectro de absorção eletrônica dos adutos em CHCl_3 , apresentam um máximo a 283 nm ($\epsilon = 19.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e em metanol a 271 nm ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Fig. 17). Portanto o cromóforo do aduto é similar ao N-Óxido da piridina, que apresenta um máximo a 276 nm ($\epsilon = 15.136 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em CHCl_3 (115), a 282 nm ($\epsilon = 10.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em hexano (116) e a 263 ($\epsilon = 13.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em metanol (115); o deslocamento de 6-8 nm observado para o aduto em cada solvente é consistente com a presença de um substituinte na posição 4 do anel piridínico. A fig. 17 mostra também, a grande diferença dos espectros de absorção do aduto e do POBN. Os adutos gerados química e biologicamente também apresentam o mesmo espectro de massa, com íons moleculares a m/e 298 (PM-1) e picos de fragmentação a m/e 283 (PM-15), 242 (PM-57) e 212 (PM-87) (Fig. 18). O íon molecular é aquele esperado para um aduto POBN-2-feniletila, com a perda de um hidrogênio durante o processo de ionização. Portanto, as propriedades espectroscópicas identificam inequivocamente a espécie captada como o radical feniletila, tanto no processo químico como durante o metabolismo microsossomal.

Mais ainda, nossos resultados mostram que é de fato possível isolar e identificar os adutos de radicais de carbono obtidos em sistemas microsossomais. Obtivemos sucesso no isolamento do aduto do radical etila (item 3.1) e agora

do aduto do radical feniletila, mostrando que a validade do método pode ser geral e uma abordagem muito útil para experimentos de captação de spin em sistemas microssomais. Qualquer estudo mecanístico sempre exigirá a identificação inequívoca do radical captado e isso não pode ser conseguido somente pela análise do espectro de RPE obtido. Para enfatizar esse ponto, apresentamos, para comparação, as propriedades espectroscópicas dos dois adutos de POBN que isolamos e purificamos na Tabela 6.

Tabela 6. Propriedades Espectroscópicas de Adutos de POBN

ADUTO	PARÂMETROS DE EPR				U V Máx.	MS ^a
	H ₂ O		Benzeno		CHCl ₃	(MI-1)
	a _N	a _H	a _N	a _H	(nm)	
POBN-Etila	15,73	2,73	14,36	2,54	283	222
POBN-2-fenil etila	15,73	2,75	14,41	2,68	283	298

^a Espectro de Massa

Figura 16. - Espectro de RPE do radical aduto 2-fenietila-POBN isolado e purificado a partir da : (a) oxidação da fenelzina catalisada por CuCl_2 a pH 10 e (b) oxidação microssomal da fenelzina. O solvente é tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4; ajustes do instrumento: potência, 10 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 0,3 seg.; tempo de varredura, 16 min.; intervalo de varredura, 100G; ganho $1,5 \times 10^4$ para (a) e 8×10^3 para (b).

Figura 17. - Espectro de absorção eletrônica no ultravioleta do aduto radical 2-feniletila-POBN em: (a) metanol; (b) CHCl_3 ; e (c) hexano. O espectro de POBN em CHCl_3 , (d) é apresentado para comparação.

Figura 18. - Espectro de massa, obtido por impacto de elétrons do aduto radical 2-feniletila-POBN purificado de uma incubação microssomal de fenelzina.

f. Implicações Toxicológicas e Terapêuticas - Os nossos resultados sobre o metabolismo microsossomal da fenelzina estão sumarizados no Esquema 10. Identificamos os principais metabólitos como 2-fenilacetaldeído e etilbenzeno, sendo que somente a formação deste parece depender do citocromo P_{450} . Correlacionando-se com a formação de etilbenzeno ocorre: (i) a formação do radical feniletila que identificamos inequivocamente por espectroscopia de massa do aduto obtido por captação com POBN e (ii) a inativação do próprio citocromo P_{450} cujo grupo prostético é alquilado com formação do N-(2-feniletil) derivado (Esquema 10).

(Esquema 10)

A estrutura do heme alquilado é, formalmente, resultado da adição do radical fenietila a um dos nitrogênios do grupo heme. Essa reação pode ser direta, ou pode ocorrer com a formação intermediária de um complexo σ^+ alquil-ferro (Esquema 11).

(Esquema 11)

Essa proposição de que a N-alkilação seja precedida de um ataque direto do radical de carbono ao ferro, vem de nossos estudos sistemáticos sobre a interação entre aril e alquil-hidrazinas e oxiemoglobina (86,117). Evidentemente, a facilidade de obtenção de grandes quantidades dessa proteína permitiu uma abordagem detalhada do mecanismo de inativação. Resumidamente, demonstramos que a hemoproteína é inativada por alteração do grupo prostético após transformar 6 moléculas de substrato, segundo a estequiometria abaixo:

Mais importante, nós conseguimos determinar a estrutura do

heme inativo. Ele é um complexo σ - aril-heme, formado via radical fenila, muito estável quando na matriz proteica mas que, quando extraído em presença de oxigênio reverte ao heme ou, se além de condições oxidantes estiver em presença de ácido, rearranja-se ao N-aril derivado (Esquema 12).

(Esquema 12)

Assim, além de elucidar a correta estrutura da hemoglobina inativada por fenilidrazina, um problema que vem sendo estudado há quase um século, pudemos demonstrar que as porfirinas N-ariladas previamente isoladas (118,119) eram produtos dos procedimentos empregados para a purificação. Esses estudos, foram detalhados para o caso de várias arilidrazinas, mas, mesmo no caso de etilidrazina, foi obtido o derivado N-alquilado (86).

Embora não possamos extrapolar totalmente esses estudos detalhados sobre aril radicais e a hemoglobina para a interação entre a fenelzina e o citocromo P₄₅₀, pode-se fazer analogias. Um cálculo estimativo indicou que a razão de produtos formados por citocromo P₄₅₀ inativado pela

fenelzina fica entre 20-24; embora muito maior que a razão obtida para a inativação da hemoglobina por fenilidrazina, 6, indica que a fenelzina é um eficiente agente destruidor do citocromo P_{450} , provavelmente via os radicais de carbono formados. Essa inativação do tipo suicida, tem óbvias relações com o efeito de hidrazinas sobre o metabolismo de drogas co-administradas (97-99). Também, pode ter implicações toxicológicas, quando o metabolismo de algum composto tóxico for diminuído pela menor quantidade de citocromo P_{450} disponível para transformá-lo.

De implicações toxicológicas mais gerais é o fato de que, além de reagir com o grupo prostético da enzima que os forma, os radicais de carbono podem escapar do sítio ativo e reagirem com moléculas circundantes (Esquema 10). Assim como puderam reagir com POBN, eles poderão reagir com biomoléculas importantes e portanto, serem os responsáveis diretos pelos efeitos tóxicos associados à fenelzina e outros derivados de hidrazina farmacologicamente ativos (91-96).

Por outro lado, o efeito antidepressivo da fenelzina está associado ao fato de que ela atua como um inibidor suicida da enzima monoamino oxidase. Essa flavo enzima está presente na fração mitocondrial de vários tecidos inclusive nos neurônios, onde exerce um papel fundamental na manutenção das concentrações aminas biogênicas (120,121).

Embora o mecanismo pelo qual a fenelzina inativa a monoamino oxidase não seja conhecido em detalhes, estudos com fenilidrazina sugerem que a alquilação do grupo prosté-

tico é a responsável pela perda da atividade enzimática. De fato, em certas circunstâncias o fenil aduto da flavina po de ser isolado e se mostrou arilado na posição 4a (122,123):

Nós também realizamos alguns experimentos preliminares de captação de spin no sistema monoamino oxidase / fenilidrazina (O. Augusto, P.R. Ortiz de Montellano, M. Hussain e T.P. Singer). A Fig. 19 mostra que dois radicais são captados nesse sistema com DMPO; um que decai rapidamente, provavelmente um radical de oxigênio (65) e um radical de carbono mais estável. Esse tem os mesmos parâmetros de RPE esperado para um aduto fenil-DMPO, $a_N=16,0$ e $a_H=14,7$ em água; como já discutido anteriormente, os parâmetros espectrais dos adutos de DMPO são mais sensíveis à estrutura do radical adicionado do que os adutos de PBN.

Considerando esses nossos resultados prelimina-

res, os estudos de Singer e colaboradores sobre a inativação da monoamino oxidase (120-123) e os nossos estudos sobre a inativação da hemoglobina (86,117), parece-nos bastante razoável sugerir que a inativação da monoamino oxidase por derivados de hidrazina também ocorra pela reação dos radicais de carbono com o grupo prostético da enzima. Neste contexto é interessante comparar o número de moléculas de substrato transformadas por número de moléculas de enzima inativadas nesses sistemas (Tabela 7).

Embora os valores apresentados na Tabela 7 sejam estimativos, eles mostram uma eficiência similar de cada agente destrutivo sobre as diferentes enzimas. Também, corroboram a nossa sugestão de que são os radicais de carbono os responsáveis diretos pelas inativações. De fato, sabe-se que no caso de alquilidrazinas os principais produtos da oxidação catalisada pela monoamino oxidase, são as hidrazonas correspondentes (105,124). Isso é esperado, à medida que no caso da fenelzina e outras alquilidrazinas o rearranjo diazeno a hidrazona é possível (124,125) o que diminuiria a via radicalar e conseqüentemente, a capacidade do substrato inativar a enzima (Esquema 13). Tal rearranjo não pode ocorrer no caso de arilidrazinas, o que, além das diferenças em reatividades dos radicais, poderia explicar as suas maiores eficiências como agentes destrutivos tanto de hemoproteínas como da flavoenzima.

Os resultados aqui discutidos, quando relacionados com nossos estudos concomitantes sobre as transformações biológicas de outros derivados de hidrazina (85, 86,

117), apresentam fortes evidências de que os radicais de carbono, formados nas suas transformações biológicas, são os responsáveis diretos por efeitos terapêuticos e tóxicos colaterais dessa classe de compostos.

(Esquema 13)

Figura 19. - Espectros de RPE obtidos após incubação de 4×10^{-5} M fenilidrazina com 20 μ M monoamino oxidase e 0,1 M DMPO em tampão fosfato 0,05 M contendo $1,0 \times 10^{-4}$ M EDTA, pH 7,2 à temperatura ambiente por: (a) 2 min. e (b) 12 min. Ajustes do instrumento: potência 10 mW; amplitude de modulação, 1,0G; constante de tempo 1,0 s; tempo de varredura 0,5 h; intervalo de varredura, 200G, ganho, 5×10^3 para (a) e $6,3 \times 10^3$ para (b).

Tabela 7. - Comparação entre o Número de Moles de Substrato Transformado por Número de Moles de Enzima Inativado em Vários Sistemas.

SISTEMA	MOLES DE SUBSTRATO/MOLES DE ENZIMA
HbO ₂ + Fenilidrazina	6
cit.P ₄₅₀ + Fenelzina	20-24
MAO ^a + Fenilidrazina	2 ^b
MAO + Fenelzina	20 ^b

^a MAO (monoamino oxidase)

^b Valores estimados a partir dos resultados descritos na referência 124

4. CONCLUSÕES GERAIS

Nossos estudos forneceram novas abordagens experimentais e amplas potencialidades para a compreensão das bases moleculares das interações entre xenobióticos e sistemas biológicos. Das várias questões possíveis nessa área de pesquisa, o nosso interesse se voltou para o estudo da formação de radicais livres durante o metabolismo de xenobióticos e de seus mecanismos interações com biomoléculas.

A possibilidade de formação de radicais livres em sistemas biológicos tem sido um assunto de pesquisa de evolução histórica bastante controvertida (46) mas recentemente, inclusive com a aplicação da técnica do captador de spin, ocorreu um avanço considerável na nossa compreensão do papel de radicais livres em processos fisiológicos tanto normais como deletérios (59,62,126).

No contexto geral dos processos de destoxicação e toxicação, a nossa contribuição para a aplicação judiciosa da técnica do captador de spin durante o metabolismo microssomal foi muito importante. Na verdade, estudos independentes e concomitantes ao nosso também mostraram que os captadores de spin podiam inibir o metabolismo microssomal (127); contudo, não foram exploradas todas as potencialidades das observações feitas.

O nosso mérito foi tentar e conseguir não só isolar, como caracterizar o aduto de spin obtido com o captador que se mostrou mais adequado aos estudos microssomais, o POBN. Mais ainda, ao aplicar a nossa abordagem experimental ao meta

bolismo de dois compostos estruturalmente distintos, o DDEP e a fenelzina, nós demonstramos que o método pode ser geral e deverá ter um grande impacto na utilização da técnica do captador de spin em sistemas microsomais, permitindo estudos mecanísticos detalhados.

Os nossos próprios estudos são um exemplo dessas possibilidades. A nossa abordagem experimental foi ampla e permitiu que pudessemos de fato avançar na interpretação mecanística de fenômenos há muito observados e estudados como a formação de corpúsculos de Heinz e hemólise induzidos por fenelzina (86,117), a inativação do citocromo P₄₅₀ por derivados de hidrazina (100,101) e a inativação suicida da monoamino oxidase por alquil e arilidrazina (120-124). Pudemos não só demonstrar o envolvimento de radicais de carbono nesses processos como também, determinar algumas das alterações que eles provocam nas biomoléculas envolvidas, tornando-as fisiologicamente inoperantes.

Consideramos também particularmente importante, a nossa demonstração de que os radicais de carbono podem escapar do sítio ativo e reagir com moléculas circundantes (Esquema 10). Esse tem sido um aspecto importante nas discussões sobre o envolvimento de radicais livres em processos biológicos, havendo uma tendência em se considerar que somente os radicais livres de estabilidade intermediária, nem excessivamente reativos nem excessivamente inertes, seriam capazes de agir em sítios diferentes dos sítios de formação (128). Essa visão geral, aliada às dificuldades de detecção e identificação dos radicais de carbono, levou a que pouca atenção fosse dada às

interações entre radicais de carbono e biomoléculas. Nossas observações mostram, contudo, que estudos dessas interações se rão fundamentais para a compreensão de vários processos dele térios.

5. SUMÁRIO

Uma nova abordagem experimental para a aplicação da técnica do captador de spin em sistemas biológicos é apresentada. Nós demonstramos que o POBN (α -(4-piridil-1-óxido) N-tercio-butil nitrona) é o captador de spin mais adequado para radicais de carbono formados no sistema microssomal. Outros captadores, 5,5,-dimetil-1-pirrolidina-N-óxido e α -fenil-N-tercio-butil nitrona, se mostraram inadequados, o último porque inibe fortemente o citocromo P₄₅₀. Essa constatação nos possibilitou isolar biologicamente e caracterizar, por espectroscopia de massa, o aduto formado durante o metabolismo microssomal de 3,5-bis-(etoxicarbonil)-4-etil-2,6-dimetil-1,4-diidropiridina, como sendo o aduto etil-POBN. Esse isolamento e caracterização de radicais formados metabolicamente, propiciaram uma firme base estrutural para a técnica do captador de spin, tornando-a um instrumento bastante útil para a abordagem mecanística de reações envolvendo radicais livres.

Como um exemplo dessas novas potencialidades, nós apresentamos nossos estudos sobre o metabolismo da fenelzina (2-feniletildrazina). Esse composto é um agente antidepressivo conhecido por vários nomes comerciais como Nardil, Fenelzina, Estinerva, Kalgan, etc. O metabolismo da fenelzina por microssomos hepáticos de ratos leva a formação dos seguintes compostos: 2-fenilacetaldeído, 2-feniletanol e etilbenzeno. Durante esse processo oxidativo, ocorre a formação de um radical de carbono que reage com o grupo prostético do citocromo P₄₅₀ inativando-o irreversivelmente. Esse radical foi captado,

isolado e caracterizado como sendo o radical 2-feniletila. A porfirina derivada do grupo heme, inativado pela fenelzina, foi isolada e caracterizada como sendo a N-(2-feniletil) protoporfirina IX.

Assim, o metabolismo da fenelzina, uma alquilidrazina, forma um radical de carbono que pode inativar o citocromo P_{450} , ser convertido num hidrocarboneto, reagir com captadores de spin e provavelmente também, pode reagir com biomoléculas circundantes. Esses resultados, analisados conjuntamente com outros estudos mecanísticos que realizamos sobre transformações biológicas de derivados de hidrazina, são utilizados para uma discussão geral do possível papel de radicais de carbono na expressão dos efeitos terapêuticos e tóxicos de drogas.

6. SUMMARY

A new experimental approach to the biological application of the spin-trapping technique is presented. Our studies showed that POBN (α -(4-pyridyl-1-oxide) N-tert-butyl-nitron) is the most suitable trap for carbon radicals formed in microsomal systems. Other spin traps, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide and α -phenyl-N-tert-butyl-nitron were found to be ineffective, the latter because it strongly inhibits cytochrome P₄₅₀. POBN suitability enabled us to isolate and characterize, by mass spectrometry, the adduct formed during the microsomal metabolism of 3,5-bis(ethoxycarbonyl)-4-ethyl-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine, as a POBN-ethyl adduct. The isolation and characterization of metabolically formed radicals provided a firm structural basis for the spin-trapping methodology, rendering it a useful tool for the mechanistic approach to reactions involving radical formation.

As an example of these potentialities, we present our studies on phenelzine (2-phenylethylhydrazine) metabolism. This compound is a tranquilizing drug known under a number of commercial names as Nardil, Fenelzina, Estinerval, Kalgan and others. The transformation of phenelzine by rat liver microsomes yields 2-phenylacetaldehyde, 2-phenylethanol and ethylbenzene. A carbon radical is formed during the oxidative metabolism of phenelzine that reacts with the prosthetic heme group of cytochrome P₄₅₀ and irreversibly inactivates the enzyme. The radical formed has been spin-trapped, isolated and shown by mass spectrometry to be the 2-phenylethyl radical.

The metal free porphyrin derived from the prosthetic heme group has been isolated and identified as N-(2-phenylethyl)protoporphyrin IX.

The metabolism of phenelzine, an alkylhydrazine, thus yields a carbon radical that inactivates cytochrome P₄₅₀, is converted to a hydrocarbon by hydrogen atom abstraction and reacts with spin traps or, presumably, with alternative cellular targets. These results, together with other mechanistic studies done by us on biological transformations of hydrazine derivatives, are taken into account in the discussion of the possible role of carbon radicals on drug action and toxicity.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hodgson, E. e Guthrie, F.E. (1980) em "Introduction to Biochemical Toxicology" (Hodgson, E. e Guthrie, F.E., eds), pp 1-9, Elsevier, New York.
2. Jakoby, W.B. (1980) em "Enzymatic Basis of Detoxication", (Jakoby, W.B., ed) Vol. I, pp 1-6, Academic Press, New York.
3. Hodgson, E. e Dauterman, W.C. (1980) em "Introduction to Biochemical Toxicology" (Hodgson, E. e Guthrie, F.G., eds), pp 67-82, Elsevier, New York.
4. Dauterman, W.C. (1980) em "Introduction to Biochemical Toxicology" (Hodgson, E. e Guthrie, F.G., eds) pp 83-91, Elsevier, New York.
5. Miller, J.A. (1970) Cancer Research 30, 559-576.
6. Hinson, J.A., Pohl, L.R. e Gillette, J.R. (1979) Life Sci. 24, 2133-2138.
7. Miner, D.J. e Kissinger, P.T. (1979) Biochem. Pharmacol. 28, 3285-3290.
8. De Pierre, J.W. e Ernster, L. (1980) em "Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis" (Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gelboin, H.V., Gillette, J.R. e O'Brien, P.J., eds) pp 431-443, Academic Press, New York.
9. Estabrook, R.W. (1978) Methods Enzymol. 52, 43-47

10. Strittmatter, P. e Enoch, H.G. (1978) *Methods Enzymol.* 52, 188-193.
11. Master, B.S. (1980) em "Enzymatic Basis of Detoxication" (W.B. Jakoby, ed) Vol I, pp 183-200, Academic Press, New York.
12. Sato, R. e Mihara, K. (1978) *Methods Enzymol.* 52, 102-108.
13. Ziegler, D.M. e Poulsen, L.L. (1978) *Methods Enzymol.* 52, 142-151.
14. Ziegler, D.M. (1980) em "Enzymatic Basis of Detoxication" (W.B. Jakoby, ed) Vol I, pp 201-227. Academic Press, New York.
15. White, R.E. e Coon, M.J. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 315-356.
16. Sato, R. e Omura, T. (Editores) (1978) "Cytochrome P₄₅₀", Academic Press, New York.
17. Estabrook, R.W., Waterman, M.R., Dubois, R.N., Simpson, E.R. e Werringloer, J. (1981) em "Molecular Basis of Drug Action" (Singer, T. e Ondarza, R., eds) pp 361-386.
18. Coon, M.J., Vermilion, J.C., Vatsis, K.P., French, J.S., Dean, W.L. e Haugen, D.A. (1971) em "Drug Metabolism Concepts" (Jerina, D.M., ed.) pp 46-71. ACS, Washington, DC.
19. Fujii-Kuriyama, Y., Mizukami, Y., Kawajiri, K., Sogawa, K. e Muramatsu, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 2793-2797.

20. Yuan, P-M., Ryan, D.E., Levin, W. e Shively, J.E. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80,1169-1173.
21. Heinemann, F.S. e Ozols, J. (1983). J.Biol. Chem. 258,
4195-4201.
22. Nebert, D.W. Eisen, H.J., Negishi M., Lang, M.A., Hjelme
land, L.M. e Okey, A.B. (1981). Ann. Rev. Pharmacol. To-
xicol. 21,431-462
23. Lu, A.Y.H. e West, S.B (1980) Pharmacol. Rev. 31,227-295.
24. Estabrook, R.W., Coon, M.J., Sato, R., Conney, A.H., Gus-
tadsson, J-A., Omura, T. e Nebert, D.W. (1982) em, "Micro-
somes, Drug Oxidations and Drug Toxicity" (Sato, R. e Ka-
to, R. eds) pp 3-11, Japan Scientific Press, Tokyo.
25. Conney, A.A., Lu, A.Y.H., Levin, W., Somogyi, A., West,
S., Jacobson, M., Ryan, D. e Kuntzman, R. (1973) Drug
Met. Disp. 1,199-210
26. Conney, A.H. (1967). Pharmacol Rev. 19,317-366.
27. Omura, T. (1979) em "The Induction of Drug Metabolism"
(Estabrook, R.W. e Lindenlaub, E.,eds) pp 161-175, F.K.
Schattauer Verlag, Stuttgart- New York.
28. Parke, D.V. (1979) em "The Induction of Drug Metabolism"
(Estabrook, R.W. e Lindenlanb, E. eds) pp 101-111, F. K.
Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.
29. Estabrook, R.W. (1982) em, "Microsomes, Drug Oxidations

- and Drug Toxicity" (Sato, R. e Kato, R. eds) pp 133-138,
Japan Scientific Press, Tokyo.
30. Augusto, O., Beilan, H.S. e Ortiz de Montellano, P.R.
(1982) J. Biol. Chem. 257, 11288-11295.
 31. Cramer, S.P., Dawson, J.H., Hodgson, K.O. e Hager, L.P.
(1978) J. Am. Chem. Soc. 100, 7282-7290.
 32. Sligar, S.G. e Gunsalus, I.C. (1979) Biochemistry 18,
2290-2295.
 33. Peisach, J., Mims, W.B., Davis, J.L. (1979) J. Biol. Chem.
12.379-12.389.
 34. White, R.E., Coon, M.J. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3073-
3083.
 35. Jefcoate, C.R. (1978) Methods Enzymol. 52, 258-279.
 36. Björken, I. (1977) Pharmac. Ther. A 1, 327-348.
 37. Guengerich, F.B., Ballou, D.P. e Coon, M.J. (1976) Bio-
chem. Biophys. Res. Commun. 70, 951-956
 38. Bonfils, C., Debey, P., Maurel, P. (1979) Biochem. Bio-
phys. Res. Commun. 88, 1301-1307
 39. Iyanagi, T., Anan, F.K., Imai, Y., Mason, H.S. (1978) Bio-
chemistry 17, 2224-2230.
 40. Oprian, D.D., Vatsis, K.P., Coon, M.J. (1979) J. Biol.
Chem. 254, 8895-8902

41. Rahimtula, A.D., O'Brien, P.J. (1977) Eur. J. Biochem. 77,201-208
42. Groves, J.T. e Krupes, Jr., W.J. (1979) J. Am. Chem.Soc. 101,7613-7615
43. Groves, J.T., McClusky, G.A., White, R.E. e Coon, M.J. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 81,154-160
44. Groves, J.T., Akinbote, O.F. e Avaria, G.E. (1980) em "Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis" (Coon, M.J., Conney, A.H., Estabrook, R.W., Gelboin, H. V., Gillette, J.R. e O'Brien, P.J., eds) pp 253-261, Academic Press, New York.
45. Ortiz de Montellano, P.R., Kunze, K.L., Beilan, H.S. e Wheeler, C. (1982) Biochemistry 21,1331-1339
46. Pryor, W.A. (1976) em "Free Radicals in Biology" (Pryor, W.A., ed) Vol. 1, pp 1-49, Academic Press, New York.
47. Borg, D.C. (1976) em "Free Radicals in Biology" (Pryor, W.A., ed) Vol.1, pp69-147, Academic Press, New York.
48. Schaich, K.M. e Borg, D.C. (1980) em "Autoxidation in Food and Biological Systems" (Simic, M.G. e Karel, M., eds) pp 45-70, Plenum Press, New York.
49. Yamazaki, I., Mason, H.S. e Piette, L.H. (1960) J. Biol. Chem. 235,2444-2449
50. Yamazaki, I. e Piette, L.H. (1961) Biochem. Biophys. Acta 50,62-69

51. Yamazaki, I. e Piette, L.H. (1963) Biochem. Biophys. Acta 77, 47-64
52. Mason, R.P. e Chignell, C.F. (1982) Pharmacol. Revs. 33, 189-211.
53. Mason, R.P. (1982) em "Free Radicals in Biology" (Pryor, W.A. ed) Vol. 5, pp 161-222, Academic Press, New York.
- 54- Chalfont, G.R., Perkins, M.J. e Horsfield, A. (1968) J. Am. Chem. Soc. 90, 7141-7142
55. Forshul, S., Lagercrantz, C. e Torsell, K. (1969) Acta Chem. Scand. 23, 522-530.
56. Leaver, I.H. e Ramsay, G.C. (1969) Tetrahedron 25, 5669-5675.
57. Terabe, S. e Konaka, R. (1969) J. Am. Chem. Soc. 91, 5655-5657.
58. Janzen, E.G. e Blackburn, B.J. (1968) J. Am. Chem. Soc. 90, 5909-5910
59. Janzen, E.G. (1980) em "Free Radicals in Biology" (Pryor, W.A. ed) Vol. 4, pp 115-151, Academic Press, New York.
60. Perkins, M.J. (1980) Adv. Phys. Org. Chem. 17, 1-64
61. Finkelstein, E., Rosen, M. e Rauckman, E.J. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 200, 1-16
62. Kalyanaraman, B. (1982) Revs. Biochem. Toxicol. 4, 73-135.

63. Janzen, E.G. e Ping-Liu, J. (1973) J.Mag. Res. 9,510-512.
64. Janzen, E.G., Evans, C.A., Davis, E.R. (1978) em "Organic Free Radicals" (Pryor, W.A. ed), ACS Symposium Series 69, 433-446.
65. Rosen, G.M., Finkelstein, E. e Rauckman, E.J. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 215,367-378.
66. Adamic, K., Bowman, D.F., Gillan, T. e Ingold, K.U. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93,902-908.
67. Bowman, D.F., Brokenshire, J.L., Gillan, T. e Ingold, K. U. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93,6551-6555.
68. Bowman, D.F., Gillan, T. e Ingold, K.U. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93,6555-6561.
69. Evans, A.C. (1979) Aldrichimica Acta 12,23-29.
70. Rosen, G.M. e Rauckman, E.J. (1977) Biochem. Pharmacol. 26,675-678.
71. Rosen, G.M., Rauckman, E.J. e Hanck, K.W. (1977) Toxicol. Letters 1,71-74.
72. Mason, R.P., Kalyanaraman, B., Tainer, B.E. e Eling, T. E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 5019-5022.
73. Poyer, J.L., McCay, P.B., Lai, E.K., Janzen, E.G. e Davis, E.R. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 94,1154-1160.
74. Buettner, G.R. e Oberley, L.W. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 83,69-74.

75. Gever, G. e Hayes, K. (1949) J. Org. Chem. 14,813-818
76. Ortiz de Montellano, P.R., Beilan, H.S. e Kunze, K.L.
(1981) J. Biol. Chem. 256,6708-6713
77. Salach, J.I (1979) Arch. Biochem. Biophys. 192,128-137.
78. Estabrook, R.W., Peterson, J., Baron, J. e Hildebrandt, A. (1972) Methods Pharmacol. 2,303-350.
79. Ortiz de Montellano, P.R., Beilan, H.S. e Kunze, K.L.
(1981) J. Biol. Chem. 256, 4395-4399.
80. Correia, M.A. e Mannering, G.J. (1973) Mol. Pharmacol. 9,
470-485.
81. Nash, T. (1953) Biochem. J. 55,416-421.
82. Ortiz de Montellano, P.R. e Kunze, K.L. (1980) J. Biol.
Chem. 255,5578-5585.
83. Ortiz de Montellano, P.R. e Kunze, K.L. (1981) Biochemistry. 20,7266-7271
84. Knowles, P.F., Marsh, D. e Rattle, H.W.E. (1976) em "Mag
netic Resonance of Biomolecules", John Wiley Sons, London,
New York.
85. Augusto, O., Ortiz de Montellano, P.R. e Quintanilha, A.
(1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 101,1324-1330
86. Augusto, O., Kunze, K.L. e Ortiz de Montellano, P.R.
(1982) J.Biol. Chem. 257,6231-6241

87. Ortiz de Montellano, P.R., Beilan, H.S., Kunze, K.L. e Augusto, O. (1982) em "Microsomes, Drug Oxidations and Drug Tpxicity" (Sato, R. e Kato, R., eds.), pp 381-388 , Japan Scientific Press, Tokyo.
88. Werringloer, J., Estabrook, R.W. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 167, 270-286.
89. Juchan, M.R. e Horita, A. (1972) Drug Metab. Revs. 1, 71-100.
90. Goodman, L.S. e Gilman, A. (eds) (1975) The Pharmacological Basis of Therapeutics, Fifth Edition, Mcmillan Publishing Co., New York.
91. Nelson, S.D., Mitchell, J.R., Timbrell, J.A., Snodgrass, W.R. e Corcoran, G.B. (1976) Science 193, 901-903.
92. Williams, G.M., Mazue, G., McQueen, C.A. e Shimada, T. (1980) Science 210, 329-330.
93. Dubroff, L.M. e Reid, R.J. (1980) Science 208, 404-406.
94. Toth, B. (1976) Cancer Res. 36, 917-921.
95. Daneshmend, T.K., Scott, G.L. e Bradfield, J.W.B. (1979) Brit. Med. J. 1, 1679-1682.
96. Mitchell, J.R., Nelson, S.D., Thorgeirsson, S.S., McMurtry, R.J., e Dybing, E. (1976) in "Progress in Liver Diseases", Vol. 5 (Popper, H. e Schaffner, F., eds) pp 259-279, Grune e Stratton, New York.

97. Kato, R., Tanaka, A. Shoji, H. (1969) Jap. J. Pharmacol. 19,315-322.
98. Muakassah, S.F., Bidlack, W.R. e Yang, W.C.T. (1981) Biochem. Pharmacol. 30,1651-1658.
99. Hara, S., Satoh, T. e Kitagawa, H. (1982) Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 36,260-272.
100. Jonen, H.G., Werringloer, J., Prough, R.A. e Estabrook, R.W. (1982) J. Biol. Chem. 257, 4404-4411.
101. Muakkassah, S.F. e Yang, W.C.T. (1981) J. Pharm. Exp. Therap. 219,147-155.
102. Caddy, B., Stead, A.H. e Johnstone, E.C. (1978) Br. J. Clin. Pharmacol. 6,185-188.
103. Clineschmidt, B.V. e Horita, A. (1969) Biochem. Pharmacol. 18,1021-1028.
104. Clineschmidt, B.V. e Horita, A. (1969) Biochem. Pharmacol. 18,1011-1020.
105. Tipton, K.F. e Spires, I.P.C. (1972) Biochem. Pharmacol. 21,268-270.
106. Tilstone, W.J., Margot, P. e Johnstone, E.C. (1979) Psychopharmacology. 60,261-263.
107. Costa, A.K. e Ivanetich, K.M. (1982) Biochem. Pharmacol. 31,2093-2102.
108. Walsh, C. (1982) Tetrahedron. 38,871-909.

109. Kunze, K.L. e Ortiz de Montellano, P.R. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103,4225-4230.
110. ~~Ortiz de Montellano~~, P.R., Beilan, H.S., Kunze, K.L. e Mico, B.A. (1981) J. Biol. Chem. 256,4395-4399.
111. Castro, C.E., Wade, R.S. e Belser, N.O. (1978) Biochemistry 17,225-231.
112. Aebi, H., Dewald, B. e Suter, H. (1965) Helv. Chim. Acta 48,656-674.
113. Prough, R.A., Wittkop, J.A. e Reed, D.J. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 131,369-373.
114. Prough, R.A., Freeman, P.C. e Hines, R.N. (1981) J. Biol. Chem. 256,4178-4184.
115. Kosower, E.M. (1958) J. Am. Chem. Soc. 80,3253-3260.
116. Ito, M e Hata, N. (1955) Bull. Chem. Soc. Japan 28,260-263.
117. Ortiz de Montellano, P.R., Kunze, K.L. e Augusto, O. (1982) J. Am. Chem. Soc. 104,3545-3546.
118. Ortiz de Montellano, P.R. e Kunze, K.L. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103,6534-6536.
119. Saito, S. e Itano, H.A. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78,5508-5512.
120. Singer, T.P. (1979) em "Monoamine Oxidase: Structure Function, and Altered Functions" (Singer, T.P., Von Korff, R.

- W. e Murphy, D.L., eds) pp.7-24, Academic Press, New York.
121. Singer, T.P. e Salach, J.I. (1981) em "Monoamine Oxidase Inhibitors - The State of the Art" (Youdim, M.B.H. e Paykel, E.S.) pp.17-29, John Wiley & Sons Ltd, New York.
122. Nagy, J. Kenney, W.C. e Singer, T.P. (1979) J. Biol.Chem. 254,2684-2688.
123. Kenney, W.C., Naggy, J., Salach, J.I. e Singer, T.P. (1979) em "Monoamine Oxidase: Structure, Function and Altered Functions" (Singer, T.P., Von korff, R.W. e Murphy, D.L., eds) pp.25-37, Academic Press, New York.
124. Patek, D.R. e Hellerman, L. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2373-2380.
125. Tsuji, T. e Kosower, E.M. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93, 1992-1999.
126. Trush, M.A., Mimnaugh, E.G. e Gram, T. (1982) Biochem. Pharmacol. 31,3335-3346.
127. Albano, E. Lott, K.A.K., Slater, T.F., Stier, A., Symons, M.C.R. e Tomasi, A. (1982) Biochem. J. 204,593-603.
128. Swartz, H.W. (1982) em "Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer" (McBrien, D.C.H. e Slater, T.F., eds) pp. 5-26, Academic Press, New York.