

**Efeitos de lantadenos sobre a bioenergética em mitocôndrias isoladas de
fígado de rato**

ANDRÉA FONTES GARCIA
Farmacêutica

ARAÇATUBA - SP
2009

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araçatuba

**Efeitos de lantadenos sobre a bioenergética em mitocôndrias isoladas de
fígado de rato**

Andréa Fontes Garcia

Orientador: Prof. Ass. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica)

**ARAÇATUBA - SP
2009**

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G216e Garcia, Andréa Fontes
Efeitos de lantadenos sobre a bioenergética em mitocôndrias isoladas de fígado de rato / Andréa Fontes Garcia. – Araçatuba: [s.n.], 2009
82 f. : il. ; tab + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2009
Orientador: Prof. Ass. Dr.Fábio Erminio Mingatto

1.Desacopladores 2.Lantadeno A 3.Lantadeno reduzido A
4.Plantas tóxicas 5.Transporte de elétrons

CDD 636.0896

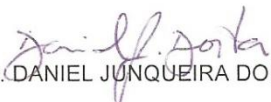
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeitos de lantadenos sobre a bioenergética em mitocôndrias
isoladas de fígado de rato.

AUTOR: ANDRÉA FONTES GARCIA

ORIENTADOR: Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

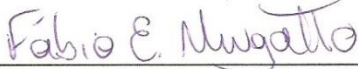
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dr. DANIEL JUNQUEIRA DORTA


Dr. SÉRGIO DINIZ GARCIA


Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

DATA DA REALIZAÇÃO: 15 de dezembro de 2009.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO
- Orientador -

DADOS CURRICULARES

Andréa Fontes Garcia – nascida no dia 02 de abril de 1973, no município de Dracena – SP formou-se em Farmácia com habilitação em Indústria (1995) e Nutrição (1999) na Universidade de Marília (UNIMAR). Atuou profissionalmente sempre nas áreas de suas graduações em Dracena e Lins. Sentindo a necessidade de aprimorar seus conhecimentos retornou a Dracena e fez especialização em Gestão Econômica e Financeira e MBA (2002) no Centro de Ensino Superior de Dracena (CESD) e depois em Nutrição Clínica (2004) no Grupo de Apoio à Nutrição Enteral e Parenteral (GANEP) em São Paulo. Atuou em outros seguimentos, mas sempre na linha de formação, em Campinas, Jaguariúna, São José do Rio Preto e Dracena. Finalmente ingressou no Programa de Mestrado em Ciência Animal em agosto de 2008, na área de Área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica sob orientação do Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto, professor da Unesp de Dracena, Laboratório de Bioquímica Toxicológica, onde realizou todos os experimentos relativos a este trabalho. Atualmente exerce a função de Nutricionista Clínica no Ambulatório de Especialidades Médicas (AME) de Dracena.

EPÍGRAFE

“Acontece a todo o momento:
as pessoas decidem mudar seu futuro”. (Richard Bach)

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade
com que acontecem.

Por isso, existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis... e pessoas incomparáveis...” (Fernando Pessoa)

“Quanto maior são as dificuldades a vencer, maior será a satisfação.” (Cícero)

DEDICATÓRIA

Minha vida

Salvador e Rosa Maria (meus pais), sempre aprendi com o modo que viveram e continuam vivendo os ensinamentos que repassaram e os ideais de respeito e honestidade que sempre cultivaram entrelaçados com o amor e o carinho presentes em nossa família. Em nenhum momento deixaram de estender seus braços para me confortar, incentivar e lutar para que eu realizasse os meus sonhos.

Meus Amores

Cada qual com um jeito de ser, uma característica, um enredo. Em especial dedico minha vida, pois me ensinaram o valor do que é uma verdadeira família, isto é fundamental para a construção do indivíduo. Onde a vitória de um é a comemoração de todos. E imensamente, agradeço ao meu irmão Salvador e Rosa Maria (cunhada) e meus sobrinhos Cassiano e Felipe, por me incentivarem a iniciar o mestrado e a minha irmã Rosana e Abrão (cunhado) e meus sobrinhos Rafael e Eduardo, pelo enorme incentivo financeiro.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Em vários instantes apreciáveis, a religião sempre se faz presente, principalmente acompanhada pela crença da existência de um ser perfeito, de personalidade inquestionável, adorável e protetor. Em nossas vidas é o pilar para nossas inseguranças, temores, alegrias, e compartilha conosco o encanto da nossa existência. Assim, dedico principalmente a Ele este estudo, e sempre agradeço imensamente por estar conosco. Simplicidade e paciência são o mínimo para sentir sua presença. E inúmeras vezes, por ter me escutado e auxiliado em momentos difíceis e concedido saúde, tranqüilidade, sabedoria e boas oportunidades, compartilhando comigo os sucessos e insucessos durante toda a minha Pós-graduação.

Ao Prof. Ass. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Ao professor, mas antes de tudo, amigo Fábio pelas horas infindáveis na busca incessante de lapidar e despertar qualidades nos que o rodeiam, com a paciência e compreensão de pai e com sabedoria de mestre, sempre no sentido de impulsionar o crescimento espiritual, pessoal, intelectual e profissional. Ajudou na minha construção acadêmica e interesse pela pesquisa científica, sempre indicando os caminhos seguros e mostrando a melhor forma de enfrentar os obstáculos. Permanece em mim como referência, um modelo de êxito, de sabedoria e de vida.

Aos graduandos do curso de Zootecnia e alunos de iniciação científica do Laboratório de Bioquímica: Larissa (Pintinha), Diego (Patricinho), Hylana (Xena) e Guilherme (Smeagle) pela ajuda nos experimentos, a qual foi imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho e, muito obrigada pela compreensão e diversão, e também por dividir as angústias, tristezas, alegrias e risadas, e principalmente ao Marcos (Puff), além de tudo isto, pela paciência, amizade e carinho.

Ao Professor Doutor Fernando Batista da Costa e ao mestrando Bruno Alves Rocha do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-Ribeirão Preto pela ajuda no isolamento e na caracterização dos lantadenos.

Aos Professores Doutores Anderson Magalhães do Curso de Zootecnia/ Campus Experimental de Dracena-UNESP e Cecílio Soares Viegas Filho do curso de Veterinária Apoio, Produção e Saúde Animal-FOA por fazerem parte da banca do Exame Geral de Qualificação, agradeço pelas correções e sugestões para aprimorar o meu trabalho.

Aos Professores do Curso de Medicina Veterinária e do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Campus de Araçatuba, pelos conhecimentos compartilhados e em especial ao Prof. Dr. Sérgio Diniz Garcia do Departamento de Clínica e Cirúrgica e Reprodução Animal, por me fornecer preciosas informações e materiais sobre plantas tóxicas, além de fazer parte da banca de dissertação.

Ao Professor Doutor Daniel Junqueira Dorta do Departamento de Química/ Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP-Ribeirão Preto agradeço por ter aceito o convite de fazer parte da banca de dissertação, pelas correções e sugestões para aprimorar o meu trabalho e o incentivo para seguir a carreira acadêmica.

Aos Professores e funcionários do Curso de Zootecnia do Campus Experimental da Unesp-Dracena por permitir o uso do Laboratório de Bioquímica (Caio), Informática (Piva e Leandro), da Biblioteca (Fábio Rosas, Fábio Gandolfi e Letícia), por toda ajuda na realização deste projeto e muito obrigada também à Lúcia, pelos cafezinhos roubados, e ao Sr. Clemente pelo jardim que nos descansava a vista.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação (Valéria e Diogo) e da Biblioteca (Ana Cláudia) da Faculdade de Odontologia do Campus da Unesp-Araçatuba por toda ajuda, com preensão e amizade para a finalização deste projeto.

Aos amigos de turma,

Natália (Nat), Amanda (Mandioca), Rita, Sheila (Miga), Fabrine (Doidinha), Anne Pamela (Tamela), Fabiane (Fabi), Tercília (Terci), Angela (Prof^a), Diego, Bruninha, Sérgio, Luis, Fernando (Brejinho), José Francisco (Zé cavalo), Tatiana (Tati), Talita, Camila (Mila), Ludmila (Lud), Diogo (Químico), Juliana (Nelorinha), Keila, Fausto, Laísa, Vinícius, Amanda (Agro.), Daniela (Vet.), Karlini, Simone, Helaine (Nani), Juliana (Jujuca) e Wanderson (Anderson).

“Daqueles que já partiram...

...permanecem nossas saudades e as alegrias dos momentos vividos juntos.

As experiências compartilhadas,

As graças recebidas, as memórias, os projetos que deram certo...

Sobra tanta coisa!

Lembrar da pessoa que partiu preenche a tristeza da ausência com o calor da recordação de tudo que ela construiu.”

Às minhas companheiras de moradia, Lucila e Karina, muito obrigada pelos dias maravilhosos.

A todos os meus familiares e amigos que me apoiaram e incentivaram.

Aos quilômetros andados neste um ano e 5 meses de mestrado e às paisagens que a cada dia eram diferentes, apesar de fazer sempre o mesmo trajeto e nunca ter ocorrido nenhum incidente.

À Natureza que me doou os ratos Wistar dos quais pude utilizar os fígados, pois sem estes seria impossível a realização desse projeto.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Intoxicação de animais por plantas.....	17
1.2 Hipótese.....	20
1.3 Objetivo.....	20
1.3.1 Objetivo geral.....	20
1.3.2 Objetivo específico.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 <i>Lantana camara</i>	21
2.2 Generalidades sobre o fígado e hepatotoxicidade.....	27
2.3 Mitocôndria.....	29
2.3.1 Estrutura.....	29
2.3.2 Energética celular.....	32
2.3.2.1 Complexo I.....	35
2.3.2.2 Complexo II.....	36
2.3.2.3 Complexo III.....	37
2.3.2.4 Complexo IV.....	39
2.3.2.5 Complexo V.....	40
2.3.2.6 Inibidores da Fosforilação Oxidativa.....	41
2.3.2.7 Desacopladores da Fosforilação Oxidativa.....	42
3 MATERIAL E MÉTODO.....	43
3.1 Preparações.....	43
3.1.1 Reagentes.....	43
3.1.2 Animais.....	43
3.1.3 Coleta das folhas e identificação da <i>Lantana camara</i>	44
3.1.4 Isolamento e caracterização dos lantadenos presentes nas folhas da <i>Lantana camara</i>	44
3.1.5 Isolamento das mitocôndrias de fígado de rato.....	45
3.1.6 Dosagem de proteína.....	46
3.2 Ensaio com as mitocôndrias isoladas.....	47
3.2.1 Respiração mitocondrial.....	47
3.2.2 Potencial de membrana mitocondrial.....	48

3.2.3 Síntese de ATP.....	49
3.2.4 Inchamento mitocondrial em meio hiposmótico de acetato de potássio.....	50
3.2.5 Atividade da ATPase	50
3.3 Análise estatística.....	51
4 RESULTADOS.....	52
4.1 Efeitos dos lantadenos na respiração mitocondrial.....	52
4.2 Efeitos dos lantadenos no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$).....	62
4.3 Efeitos dos lantadenos nos níveis mitocondriais de ATP.....	64
4.4. Efeitos do lantadeno reduzido A (RLA) no inchamento mitocondrial em meio hiposmótico de acetato de potássio.....	66
4.5. Efeitos dos lantadenos na atividade da ATPase mitocondrial.....	67
5 DISCUSSÃO.....	68
6 CONCLUSÃO.....	71
7 REFERÊNCIAS.....	72
8 ANEXOS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

		Página
$\Delta\Psi$	Potencial elétrico de membrana.....	33
Δp	Gradiente de prótons ou potencial químico.....	33
μL	Microlitro.....	42
μm	Micrometro.....	29
μM	Micromolar	43
ADP	Adenosina 5'difosfato.....	30
ATP	Adenosina 5'trifosfato.....	30
CCCP	Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona.....	39
Da	Dalton.....	29
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida.....	39
DNP	2,4-dinitrofenol.....	40
EGTA	Acido etilenoglicol bis(β aminoetil éter) N,N,N',N' tetraacético.....	45
EPM	Erro padrão da média.....	54
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada).....	33
FADH₂	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida).....	33
FCCP	Carbonilcianeto-p- trifluormetoxifenilhidrazona.....	40
g	Gramas.....	23
g	Força gravitacional.....	45
H⁺	Íon hidrogênio.....	30
HEPES	Ácido 2 [4(2 hidroxietil) piperazini(1)] etanossulfônico.....	45
mM	Milimolar.....	42

NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada).....	33
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida).....	33
nmol	Nanomol.....	47
pH	Potencial hidrogeniônico.....	45
Pi	Fosfato inorgânico.....	30
PM	Peso Molecular.....	34
Q ou UQ	Coenzima Q ou Ubiquinona.....	34
QH₂ ou UQH₂	Coenzima Q reduzida ou Ubiquinona reduzida ou Ubiquinol.....	34
QH⁻ ou UQH⁻	Semi Ubiquinona ou ânion semiquinona..	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Arbusto de <i>Lantana</i> spp.....	22
Figura 2- Aspecto geral de um exemplar de <i>Lantana camara</i> destacando-se um capítulo floral	23
Figura 3- Frutos verdes e maduros de <i>Lantana</i> spp.....	23
Figura 4- Estrutura química dos Lantadenos A (LA) e B (LB) e dos Lantadenos Reduzidos A (RLA) e B (RLB).....	24
Figura 5- Mitocôndria de hepatócito de rato.....	29
Figura 6- Esquema estrutural da mitocôndria.....	30
Figura 7- Modelo computacional de uma mitocôndria de fígado de rato em três dimensões.....	31
Figura 8- Modelo da hipótese quimiosmótica.....	33
Figura 9- NADH:ubiquinona oxidoreductase (complexo I).....	35
Figura 10- Succinato-Q redutase (complexo II).....	36
Figura 11- Ubiquinona–citocromo c oxidoreductase (complexo III).....	37
Figura 12- Ciclo Q (complexo III).....	38
Figura 13- Citocromo oxidase (complexo IV).....	39
Figura 14- F ₀ F ₁ ATP sintase (complexo V).....	40
Figura 15- Figura representativa de um experimento controle de respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato mais malato.....	53
Figura 16- Figura representativa de um experimento controle de respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato.....	54
Figura 17- Efeitos dos lantadenos no estado 4 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato.....	55
Figura 18- Efeitos dos lantadenos no estado 3 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato.....	57

Figura 19-	Efeitos dos lantadenos na razão de controle respiratório em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato.....	59
Figura 20-	Efeitos dos lantadenos na respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato e inibidas pela oligomicina.....	60
Figura 21-	Efeitos dos lantadenos na respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato e desacopladas pelo CCCP.....	61
Figura 22-	Efeitos dos lantadenos no potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato.....	63
Figura 23-	Efeitos dos lantadenos nos níveis de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato.....	65
Figura 24-	Efeitos do RLA no inchamento de mitocôndrias incubadas em meio hiposmótico de acetato de potássio.....	66

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela1- Variações na altura da planta <i>Lantana camara</i>	22
Tabela2- Efeitos dos lantadenos na atividade de ATPase nas mitocôndrias intactas (acopladas e desacopladas) e rompidas.....	67

EFEITOS DE LANTADENOS SOBRE A BIOENERGÉTICA EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATOS

RESUMO- *Lantana camara* (Verbenaceae) é uma importante planta daninha tropical que causa hepatotoxicidade tanto em ruminantes como em humanos. A maioria dos compostos isolados das folhas da lantana são triterpenóides pentacíclicos conhecidos como lantadenos, sendo o mais abundante o lantadeno A (LA). As mitocôndrias desempenham uma função crucial na manutenção dos processos celulares dependentes de ATP. Neste trabalho foi avaliada a ação do LA e do seu metabólito reduzido (RLA) na bioenergética estudando os seus efeitos na respiração, potencial de membrana e níveis de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato. Na faixa de concentração testada (5–25 μM), RLA estimulou a respiração de estado 4 e inibiu a de estado 3, estimulou a respiração de estado 3 inibida pela oligomicina, dissipou o potencial de membrana e diminuiu os níveis de ATP de uma forma dose-dependente. Entretanto, LA não estimulou a respiração de estado 4, nem afetou os outros parâmetros mitocondriais na mesma extensão que o RLA. Os lantadenos não inibiram a respiração desacoplada por CCCP, mas estimularam a atividade da ATPase em mitocôndrias intactas acopladas. A atividade da ATPase em mitocôndrias intactas desacopladas ou rompidas não foi afetada pelos compostos. Portanto, RLA age como um desacoplador da fosforilação oxidativa e o LA age em outros componentes da membrana mitocondrial que não a ATP sintase afetando a bioenergética mitocondrial. Esses efeitos podem contribuir para a hepatotoxicidade da lantana.

Palavras-chave: desacopladores, lantadeno A, lantadeno reduzido A, plantas tóxicas, transporte de elétrons

EFFECTS OF LANTADENES ON BIOENERGETICS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA

SUMMARY- *Lantana camara* (Verbenaceae) is an important tropical weed that causes hepatotoxicity even in ruminant or in human. The principal isolated compounds of lantana are the pentacyclic triterpenoids known as lantadenes, being the lantadene A (LA) the most abundant. Mitochondria are key to the maintenance of many cellular functions dependent of ATP. This work addressed the action of LA and its reduced derivative (RLA) on mitochondrial bioenergetics by assessing their effects on respiration, membrane potential and ATP levels in succinate-energized isolated rat liver mitochondria. At the concentration range tested (5–25 μ M), RLA stimulated state-4 respiration, inhibited state-3 respiration, circumvented oligomycin-inhibited state-3 respiration, dissipated membrane potential and depleted ATP in a dose-dependent manner. However, LA did not stimulate state-4 respiration, nor did it affect the other mitochondrial parameters to the extent of its reduced derivative. The lantadenes didn't inhibit the CCCP-uncoupled respiration but increased the ATPase activity of intact coupled mitochondria. The ATPase activity of intact uncoupled or disrupted mitochondria was not affected by the compounds. Therefore, RLA acts as a mitochondrial uncoupler of oxidative phosphorylation and LA acts in other mitochondrial membrane components rather than the ATP synthase affecting the mitochondrial bioenergetics. Such effects may account for the hepatotoxicity of lantana.

Keywords: electron transport, lantadene A, poisonous plants, reduced lantadene A, uncoupling agents



Fonte: http://www.terrasoft.com.br._msfp_smbus2_01.jpg

1 INTRODUÇÃO

1.1 Intoxicação de animais por plantas

Transformações intensas marcaram a bovinocultura brasileira na última década devido ao uso de técnicas modernas de produção, utilização dos cruzamentos e uma estabilização da economia interna.

Na economia mundial houve um crescimento dos países em desenvolvimento e conseqüentemente uma grande expansão da bovinocultura de corte com aspectos positivos do ponto de vista socioeconômico empregando mais de 6 milhões de pessoas e com exportação de US\$ 5 bilhões (AGROSOFT, 2007). Segundo dados do ANUALPEC, (2009) o rebanho bovino brasileiro possui 173.189.414 cabeças e o abate bovino brasileiro é de 39.985.976 cabeças/ano representando 23,1% do abate mundial, e enquanto as exportações da carne bovina são de 1.738 toneladas/ano.

As intoxicações por plantas em animais de produção no Brasil são conhecidas desde que os pioneiros portugueses introduziram as primeiras cabeças de gado em pastagens naturais da região (TOKARNIA et al., 2000). As perdas econômicas ocasionadas pelas intoxicações por plantas podem ser definidas como diretas ou indiretas. As perdas diretas são causadas pelas mortes de animais, diminuição dos índices reprodutivos (abortos, infertilidade, malformações), redução da produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações devidas a doenças transitórias, enfermidades subclínicas com diminuição da produção de leite, carne ou lã, e aumento à susceptibilidade a outras doenças devido à depressão imunológica. As perdas indiretas incluem os custos de controlar as plantas tóxicas nas pastagens, as medidas de manejo para evitar as intoxicações como a utilização de cercas e o pastoreio alternativo, a redução do valor da forragem devido ao atraso na sua utilização, a redução do valor da terra, a compra de gado para substituir os animais mortos, e os gastos associados ao diagnóstico das intoxicações e ao tratamento dos animais afetados (JAMES, 1994; RIET-CORREA et al., 1993; RIET-CORREA ; MEDEIROS, 2001).

A profilaxia e o controle das intoxicações por plantas no Brasil têm sido realizados com base no conhecimento dos fatores associados às plantas, aos animais, ao ambiente ou ao manejo que determinam a ocorrência, frequência e distribuição geográfica das intoxicações. Algumas das medidas preventivas incluem: 1) o manejo dos animais e das pastagens tais como evitar o pastoreio excessivo, utilizar animais de espécies ou idades resistentes a determinadas plantas, e evitar colocar animais recentemente transportados com fome ou sede em pastagens contaminadas por plantas tóxicas; 2) a utilização de cercas para isolar áreas contaminadas por plantas tóxicas; 3) a eliminação das espécies tóxicas, arrancando-as manualmente, utilizando herbicidas, roçando, capinando, lavrando, queimando ou pelo pastoreio com animais não-susceptíveis; 4) a utilização de sementes controladas para evitar a difusão de espécies tóxicas e 5) a confecção de feno e silagem evitando a sua contaminação por espécies tóxicas; (RIET-CORREA et al., 1993). Essas medidas de controle das intoxicações têm tido resultados limitados e, em consequência, as intoxicações mais importantes, causam, ainda, perdas econômicas significativas.

O número de bovinos mortos por plantas tóxicas no Brasil foi estimado por Riet-Correa e Medeiros (2001) como sendo de 800.000 a 1.120.000/ano. Entretanto, Barbosa et al. (2007) alegam que como este número foi obtido a partir da extrapolação da mortalidade por plantas ocorrida apenas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, provavelmente este esteja subestimado, uma vez que Tokarnia et al. (2000) descreveram que a taxa de mortalidade por plantas nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte é maior do que nas regiões Sul e Sudeste.

No Brasil, o número de plantas conhecidas como tóxicas para animais aumenta anualmente e atualmente somam pelo menos 122 espécies, pertencentes a 71 gêneros (RIET-CORREA et al., 2009). Dentre essas existem cerca de 35 espécies de plantas hepatotóxicas distribuídas em 16 gêneros e podem ser divididas em três grupos: plantas que causam necrose hepática aguda; plantas que causam fibrose hepática e plantas que causam fotossensibilização. Algumas delas têm princípio ativo conhecido, enquanto

outras não se conhecem ainda as substâncias responsáveis pelo quadro clínico patológico (SANTOS et al., 2008).

Para controlar eficientemente algumas dessas intoxicações será necessário desenvolver tecnologia mediante programas de pesquisa interdisciplinares que contemplem os diferentes aspectos das intoxicações por plantas: primeiramente é necessário a identificação dos princípios ativos, ainda desconhecidos, de muitas plantas tóxicas. Como foi mencionado por Molyneux et al. (1994), o isolamento e a caracterização dos princípios ativos tóxicos é o primeiro passo para prevenir as perdas causadas por plantas tóxicas; em seguida, a descoberta do mecanismo de ação dessas substâncias, poderá ajudar no desenvolvimento de técnicas mais eficientes de controle das intoxicações por plantas.

O mecanismo de ação dos lantadenos nos hepatócitos ainda não está totalmente esclarecido, porém alguns estudos têm demonstrado que as mitocôndrias podem ser as organelas alvo da ação de substâncias isoladas de plantas tóxicas (MINGATTO et al., 2007; SANTOS et al., 2009).

1.2 Hipótese

Os lantadenos afetam a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato podendo ser os responsáveis pela hepatotoxicidade provocada pela planta.

1.3 Objetivo

1.3.1 Objetivo Geral

Foram estudados os efeitos do lantadeno A (LA) e do seu metabólito lantadeno reduzido A (RLA) isolados das folhas da planta *Lantana camara* sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato, com relação a parâmetros associados à bioenergética, para tentar esclarecer seu mecanismo de toxicidade e auxiliar no tratamento de animais expostos a essa planta.

1.3.2 Objetivo Específico

Avaliar os efeitos dos lantadenos sobre os seguintes parâmetros associados à bioenergética mitocondrial:

1. Respiração
2. Potencial de membrana
3. Síntese de ATP



Fonte: <http://portaldbo.com.brimagensungsAlbumfoto1073.jpg>

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Lantana camara*

O gênero *Lantana* foi estudado por Linnaeus, em 1753, que descreveu 7 espécies, 6 originárias da América do Sul e 1 da Etiópia, é uma planta ornamental de jardim, cosmopolita. Há dificuldades para classificar taxonomicamente o gênero devido às espécies não serem estáveis difundindo hibridização e mudanças na forma da inflorescência e da coloração com idade e maturação da planta. Apesar de algumas taxas serem comprovadamente tóxicas, produzem vários metabólitos bons rendendo algumas atividades biológicas úteis (GHISALBERTI, 2000).

Lantana camara L. é uma das ervas daninhas mais nocivas no mundo que cresce naturalmente em áreas tropicais e subtropicais (SHARMA et al., 2007b). São conhecidas mais de 50 espécies do gênero *Lantana*, as quais pertencem à família Verbenaceas sendo a *L. camara* a espécie mais pesquisada, porém nem todas as plantas deste gênero são tóxicas. A *L. camara* (Figura 1) é uma planta hepatotóxica conhecida no Brasil por diversos nomes populares: cambará-de-espinho, cambará, cambará-de-duas-cores, cambará-juba, cambará-de-cheiro, cambará-de-chumbo, cambará-vermelho, cambará-verdadeiro, cambará-miúdo, cambará-de-folha-grande, lantana, lantana-espinhosa, camará, camará-miúdo, camará-branco, camará-verdadeiro, camará-de-espinho, camará-de-chumbo, chumbinho, erva-chumbinho, capitão-do-campo, bem-me-quer e mal-me-quer, margaridinha (LORENZI, 1982; TOKARNIA et al., 2000) e que apresenta as seguintes características: é uma planta perene e prefere solos argilosos e férteis, subarborescente, ereta, com reprodução por sementes; as folhas são opostas e têm de 3 a 7 cm de comprimento e a sua altura é bem variada como descrito por diferentes autores (Tabela 1); a planta apresenta inflorescências axilares e terminais em capítulos longo-pedunculados com muitas flores de coloração amarela e vermelha (Figura 2). O fruto (Figura 3) é uma baga globosa, negro-arroxeadado, de 3 a 4 mm de diâmetro (LORENZI, 1982) com uma semente no

centro envolta por uma massa ou polpa de consistência mole (CAMARGO, 1998); as folhas de lantana são ásperas e, por contato, podem causar irritação da pele, além de apresentarem um cheiro forte, semelhante a erva-cidreira, que pode provocar dor de cabeça e vertigem (MELLO et al., 2003).



Figura 1 - Arbusto de *Lantana* spp (Fonte: BASTIANETTO et al., 2005).

Tabela 1 - Variações na altura da planta *Lantana camara*

Altura (m)
1,5 ¹
1,5 a 3 ^{2,3,4}
1 a 3, chegando a 8 na Austrália ⁵
1 a 2 ⁶
0,40-1,20 ⁷

Fonte: Bastos et al. (1994)¹; Melo (1998)²; Melo (2006)³; Pereira (1992)⁴; Kissmann e Groth (1995)⁵; Osweiler (1998)⁶; Lorenzi (1982)⁷.



Figura 2 - Aspecto geral de um exemplar de *Lantana camara* destacando-se um capítulo floral com mais jovens no centro (coloração amarelada) e mais velhas na periferia (coloração púrpura) (Fonte: PEREIRA, 2005).



Figura 3 - Frutos verdes e maduros de *Lantana* spp (Fonte: ZENIMORI; PASIN, 2006).

A *Lantana* é uma importante planta daninha tropical, estando presente em áreas cultiváveis, pastagens e terrenos abandonados, tanto em regiões secas quanto úmidas e que, freqüentemente, cresce em vales e encostas. Estudos fitoquímicos têm demonstrado a presença de vários compostos como mono e sesquiterpenos, triterpenos, glicosídeos e flavonóides na planta (GHISALBERTI, 2000). É uma planta tóxica que age diretamente no fígado dos animais, causando uma fotossensibilização da pele que fica inchada e quebradiça. A ingestão de 2 g de folhas/kg corporal é suficiente para causar

intoxicação em bovinos (LORENZI, 1982). Tokarnia et al. (2000), em seu livro sobre plantas tóxicas de interesse pecuário, classificaram a *Lantana* ssp como sendo uma planta fotossensibilizante hepatógena ou secundária, tendo como princípio ativo os triterpenos pentacíclicos lantadeno A (LA) e lantadeno B (LB) e os lantadenos reduzidos A (RLA) e B (RLB) (Figura 4), sendo que o LB apresenta aproximadamente 1/3 da toxicidade do LA. Pass e colaboradores concluíram em 1979 que o lantadeno reduzido A (RLA) era o causador de colestase intra-hepática em ratas fêmeas Wistar e a intoxicação foi similar com a intoxicação de lantana em animais ruminantes.

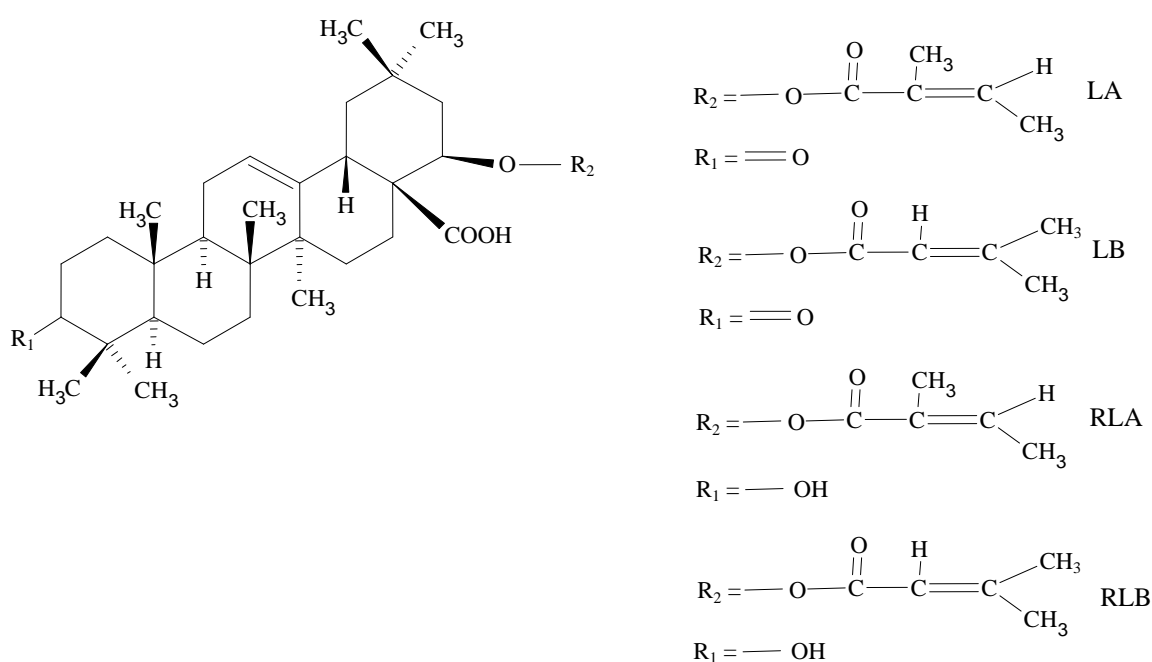


Figura 4 - Estrutura química dos Lantadenos A (LA) e B (LB), Lantadeno Reduzido A (RLA) e Lantadeno Reduzido B (RLB) (Fonte: SHARMA et al., 2000).

Em uma revisão publicada no ano de 1981, Sharma e colaboradores descreveram a intoxicação por lantana em várias espécies de animais, indicando que o fígado e os rins são os órgãos mais afetados. No Brasil, a intoxicação com lantana tem sido provocada acidental ou experimentalmente em bovinos (TOKARNIA et al., 1984), ovinos (BRITO; TOKARNIA 1995; BRITO et al., 2004), búfalos (BASTIANETTO et al., 2005; LAÚ, 1990) e coelhos (BRITO, 1995).

São tóxicas para os animais as folhas, tanto frescas como dessecadas. A planta não perde a toxicidade durante o processo de dessecação e a mantém durante, pelo menos, um ano (BRITO; TOKARNIA, 1995). As toxinas da lantana são absorvidas rapidamente pelo trato alimentar, mais especificamente no ceco e intestino grosso (SHARMA et al., 1999), após a ingestão da planta; chegam até o fígado pela circulação portal e dentro de poucos minutos provocam o quadro de colestase intra-hepática (PASS et al., 1979). Fotossensibilização ocorre devido ao impedimento da excreção de bilirrubina e filioeritrina. Os sintomas são alterações do sistema digestório - meteorismo moderado, movimentos ruminais diminuídos, perda de apetite, apatia, fezes amolecidas contendo sangue, fraqueza e lesões de fotossensibilização, principalmente nas regiões inguinal e cervical dorsal (LORENZI, 1982). Em experimentos desenvolvidos por Tokarnia et al. (1984) em bovinos, os sintomas observados variaram de algumas horas a alguns dias, dependendo da forma como ocorreu a ingestão, se em dose única ou em doses sucessivas.

Lantana ssp são plantas com sabor desagradável e os bovinos só as ingerem se outros alimentos são escassos ou em caso de animais transportados de pastos ou região (BRITO et al., 2004). Em geral, os animais morrem entre três dias e algumas semanas. Tokarnia et al. (1984) observaram que os sintomas de intoxicação são bastante uniformes tanto em ovinos quanto em bovinos, iniciando-se com anorexia e redução ou parada dos movimentos do rúmen. Quando colocados ao sol, os animais procuram a sombra e apresentam manifestações de fotossensibilização sob forma de eritema, edema e necrose das partes despigmentadas da pele. Seguem-se inquietação, icterícia, urina de coloração amarela escuro até marrom, fezes ressequidas e

em pequena quantidade. Os animais também podem apresentar fendas cutâneas com desprendimento de pedaços da pele (gangrena seca e mumificação), resultando em feridas abertas e mau cheiro. O fígado dos animais geralmente apresenta coloração alaranjada e, os rins, tons esverdeados. No fígado ocorre moderada proliferação das células epiteliais dos ductos biliares. As células hepáticas mostram-se intumescidas, com núcleos vesiculares e cromatina marginada, ocorrendo também necrose dos hepatócitos. Nos rins, as células epiteliais apresentam alterações degenerativas, com evolução para lise e presença de cilindros hialinos no córtex e na medula.

Apesar de seus efeitos tóxicos, o macerado das folhas da *L. camara* tem sido utilizado na medicina popular em todo o mundo uma vez que apresenta várias propriedades medicinais (ROSS, 1999): tônica, sudorífera, balsâmica, emoliente, expectorante e febrífuga, e também é utilizado para tratamento de ferimentos e contusões, enquanto que o chá é usado para lavar áreas afetadas no caso de dermatites, eczemas, furúnculos, úlceras, malária e reumatismo (BARRE et al., 1997; BEGUN et al., 1995). Segundo Lorenzi, (1982), é útil também contra doenças das vias respiratórias, rouquidão e bronquite, além de apresentar efeitos antipiréticos e antimicrobianos. Ghisalberti (2000) descreve atividades farmacológicas como anticoagulante, hipoglicêmica, cardiovascular, anti-hepatotóxica e hipotensiva, e ainda, os extratos das flores mostrou ser um eficiente repelente de mosquitos *Aedes*. Sharma et al. (2008) cita a atividade antibacteriana e, além dessa, outras como antiinflamatória, anti-tumoral e anti-HIV. Em um trabalho onde foram comparados os efeitos de diferentes extratos de plantas, Braga et al., 2006, observaram que o extrato mais efetivo contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi o de *Lantana camara* apresentando um IC₅₀ de $14 \pm 2 \mu\text{g/mL}$.

A planta é tóxica para animais e é ingerida indiscriminadamente por humanos, esses também poderão se intoxicar. Nesse sentido, alguns dados na literatura descrevem a intoxicação de humanos pela ingestão acidental da planta (SPOERKE; SMOLINSKE, 1990; WOLFSON; SOLOMONS, 1964).

Várias ervas e plantas com propriedades farmacológicas diversas mostram ser rica fonte de substâncias químicas com potencial quimio-

preventivo para o câncer (KAUR et al., 2008). Recentemente vários grupos de pesquisa estudaram sistematicamente os produtos naturais derivados da lantana para utilizar em pesquisas de novas drogas (deduziram a importância dos grupos químicos presos a cadeia C-22 e C-17 em relação à atividade anti-tumor destas combinações) e o lantadeno A, principalmente, e seus congêneres exibiram atividade anti-tumor *in vitro* e *in vivo* por induzir apoptose em diferentes tipos celulares e ter atividade quimiopreventiva (KAUR et al., 2008; SHARMA et al., 2007a, 2008).

Os efeitos hepatotóxicos de compostos isolados das folhas da *Lantana camara*, conhecidos como lantadenos, foram demonstrados em porquinho-da-índia (SHARMA et al., 1980; SHARMA et al., 1989; SHARMA et al., 1992), porém, o mecanismo de ação tóxica ainda não foi totalmente esclarecido. O conhecimento do mecanismo bioquímico da intoxicação por lantana a nível celular, subcelular e molecular seria, portanto, essencial para o desenvolvimento de antídotos e de uma terapia eficiente durante a intoxicação pela planta.

2.2 Generalidades sobre o fígado e hepatotoxicidade

Devido à sua interposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo, o fígado desempenha uma função central no metabolismo. Ele recebe grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta. Entre as principais funções hepáticas estão a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. O fígado é também o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998). Substâncias capazes de produzir danos aos hepatócitos são denominadas hepatotóxicas. Os hepatotóxicos intrínsecos afetam todos os indivíduos em uma forma dose-dependente e, portanto, previsivelmente, podendo interferir com o metabolismo celular

(hepatotóxicos ativos) ou tornarem-se tóxicos após biotransformação (hepatotóxicos latentes). A hepatotoxicidade idiossincrática, por outro lado, é dose-independente, podendo ser uma consequência do metabolismo anormal do xenobiótico em indivíduos susceptíveis (idiossincrasia metabólica) ou ser provocada por lesão hepática mediada pelo sistema imune (hepatite alérgica); nesses casos, mesmo pequenas concentrações de um fármaco podem provocar toxicidade. A atividade do fígado no metabolismo de substâncias exógenas é mediada principalmente pelo citocromo P450. Embora as reações de biotransformação estejam associadas ao processo de desintoxicação, em alguns casos o metabolismo do xenobiótico é prejudicial às células devido à produção de metabólitos altamente reativos, mais tóxicos do que o composto de origem, entre eles, eletrófilos, radicais e espécies reativas de oxigênio; estes, por sua vez, podem reagir diretamente com macromoléculas celulares ou iniciar reações em cadeia. Apesar deste processo de ativação ser o evento central em diversos fenômenos tóxicos, os hepatócitos possuem mecanismos de defesa efetivos para minimizá-los, de tal forma que é o balanço entre a bioativação, a desintoxicação e os mecanismos de defesa que determina se um composto irá ou não apresentar toxicidade (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2001).

Os diversos aspectos da lesão química ao fígado incluem a natureza dos agentes hepatotóxicos, a característica da lesão, o mecanismo para os efeitos hepatotóxicos, as circunstâncias de exposição e a importância médica e social. Algumas hepatotoxinas encontradas na natureza são produtos de plantas, metabolismo de fungos e bactérias ou são minerais (SCHOENTAL, 1963). Muitos agentes hepatotóxicos são produtos da indústria química ou farmacêutica (TOLMAN; SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros ainda são subprodutos ou resíduos de materiais industriais que, por poluir o ambiente, podem ter acesso a humanos e animais. A lesão hepatotóxica pode ter várias formas. Alguns agentes levam à necrose, esteatose, cirrose ou carcinoma (SCHOENTAL, 1963; TOLMAN; SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros levam apenas a interferências na secreção biliar e icterícia, com pequena ou nenhuma lesão evidente ao parênquima hepático (ROUILLER, 1964; ZIMMERMAN, 1998). Alguns produzem curiosas lesões degenerativas ou vasculares.

2.3 Mitocôndrias

2.3.1 Estrutura

As mitocôndrias não têm tamanho fixo, mas geralmente em hepatócitos e fibroblastos são descritas como estruturas cilíndricas e alongadas, com dimensões de 3 a 4 μm de comprimento e aproximadamente 1 μm de diâmetro (SCHEFFLER, 2008). No fígado de rato, por exemplo, a mitocôndria (Figura 5) apresenta aproximadamente 4,42 μm de comprimento por 0,45 μm de diâmetro, 1312 unidades por célula, e representa 17% do volume celular (VAN GURP et al., 2003). São organelas que na maior parte das células animais dominam o cenário intracelular em número total por célula, mais do que qualquer outra organela, além de conter seu próprio DNA e RNA estão diretamente ligadas à regulação de várias funções celulares dependentes de energia, como o metabolismo intermediário, regulação iônica, motilidade e proliferação celular (PEDERSEN, 1999). Assim, as mitocôndrias que tem modificações no DNA podem induzir doenças com herança materna que durante diferentes fases da vida se desenvolvem e prevalecem nos tecidos que mais precisam de energia: os músculos e o sistema nervoso (VERCESI, 2003).

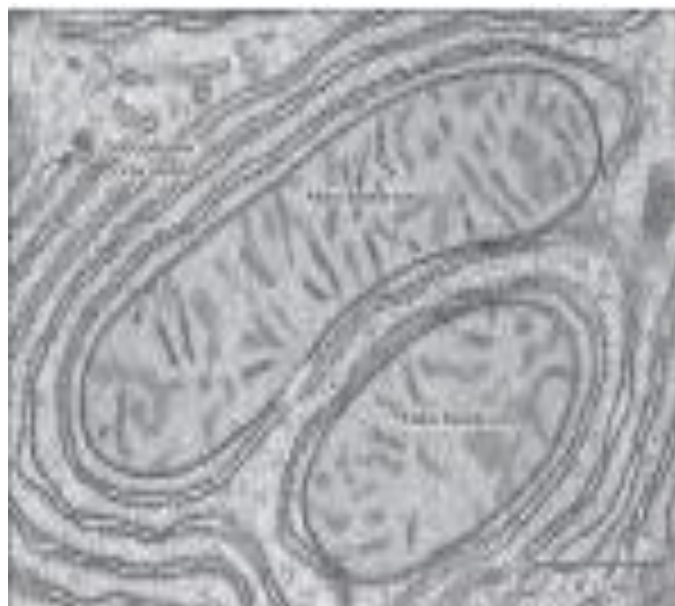


Figura 5 - Mitocôndria de hepatócito de rato (Fonte: <http://www.netterimages.com/image/12986.htm/> acesso em: 29/10/2009).

Frey e Manella, (2000) descrevem que Palade em 1952 e Sjöstrand em 1956 foram os pioneiros a descrever a organização interna da mitocôndria (Figura 6), composta por um sistema duplo de membranas, as quais definem três classes de compartimentos: as membranas externa e interna, o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial.

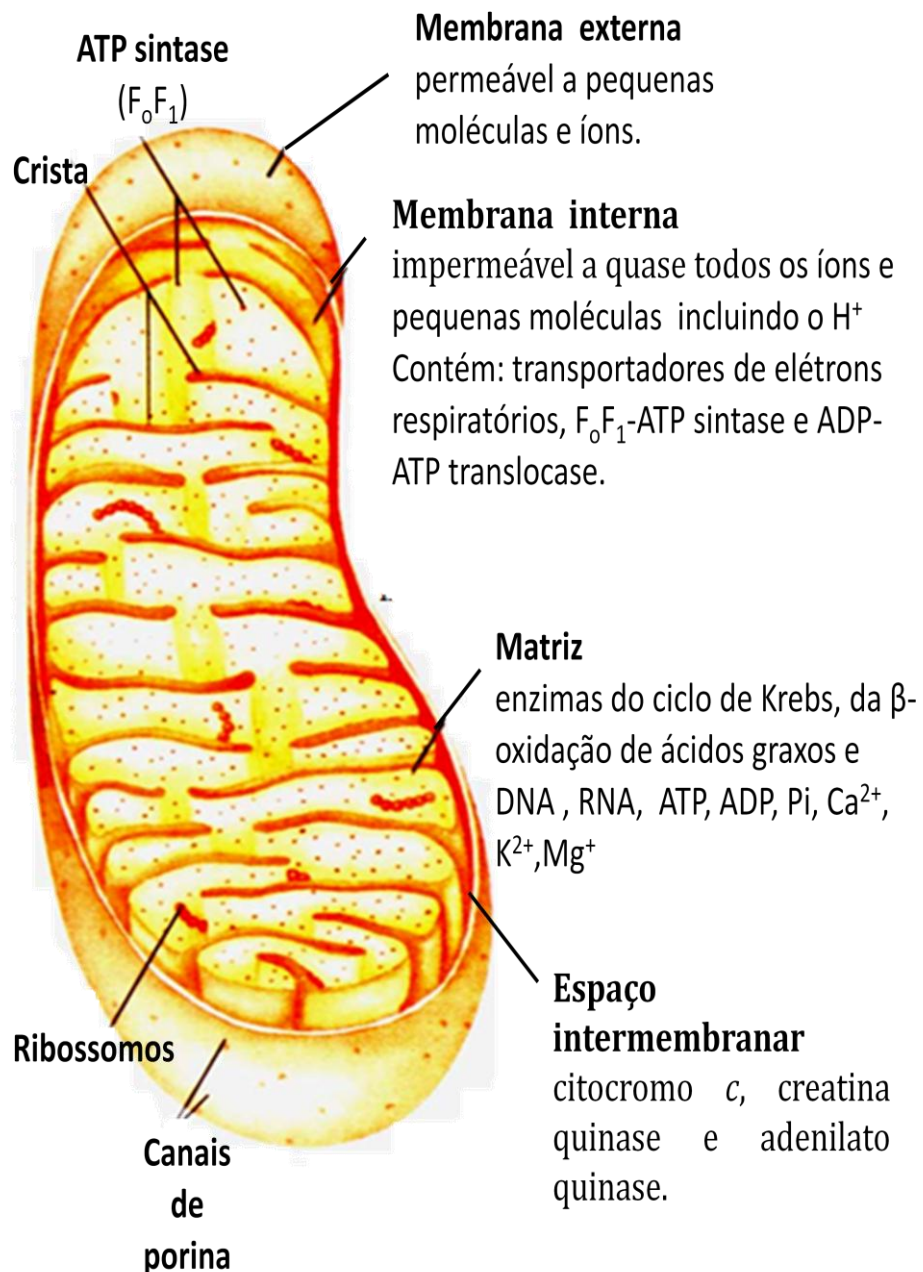


Figura 6 - Esquema estrutural da mitocôndria (Fonte: NELSON; COX, 2002).

Devido aos atuais avanços na microscopia eletrônica, visto na Figura 7, conseguiu-se desvendar mais detalhadamente a estrutura das mitocôndrias, e embora possam apresentar variabilidade morfológica, é possível definir uma morfologia básica.

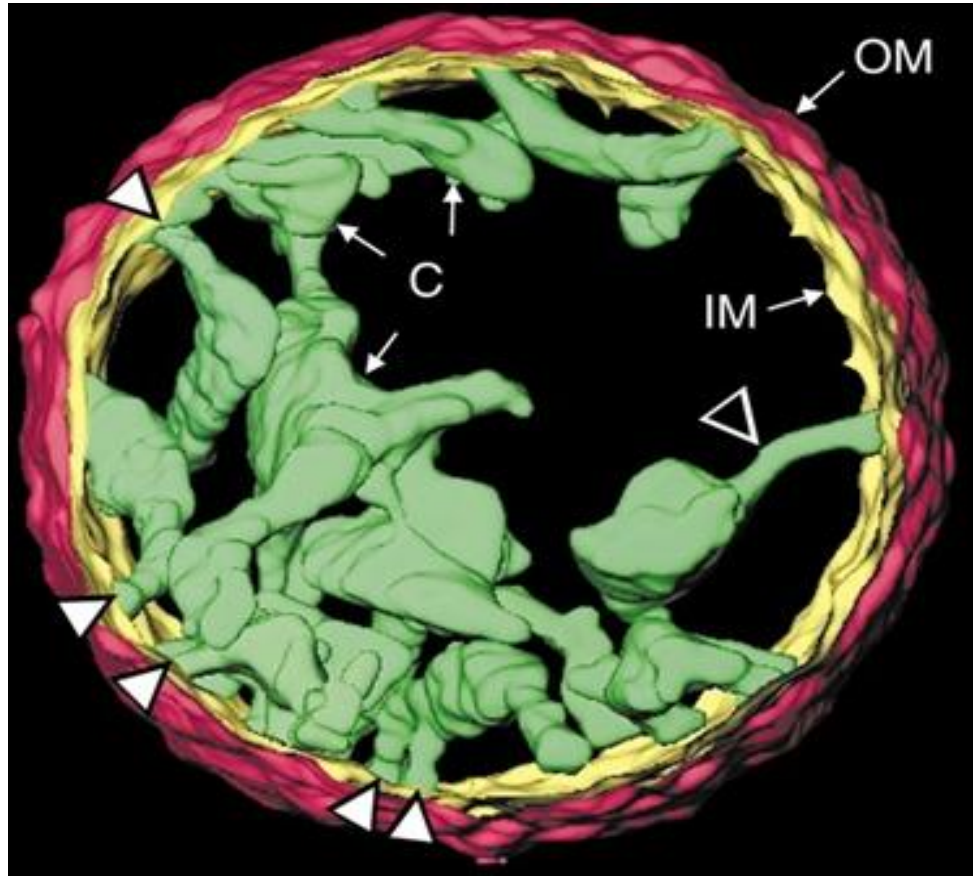


Figura 7 - Tomografia de mitocôndria isolada de fígado de rato com imagem 3D. C, cristas; IM, membrana interna; OM, membrana externa (Fonte: MANELLA, 2000).

A membrana mitocondrial externa é a interface entre a organela e o citosol e permeável à maior parte dos íons e moléculas pequenas ($PM < 1500$ Da), mas com menor superfície e contém a maior porcentagem de proteínas associadas (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina), ricas em colesterol, denominadas porinas, que formam poros na membrana e promovem a comunicação entre as mitocôndrias e a rede metabólica celular (DAUM, 1985; LESNEFSKY et al., 2001). Já a membrana mitocondrial interna é impermeável a quase todos os íons e moléculas polares, incluindo o hidrogênio e contém a porcentagem mais elevada de proteínas (fosfatidilcolina,

fosfatidiletanolamina e cardiolipina) (DAUM, 1985; NICHOLLS, 1982), que tem a função de mediar e regular o transporte de metabólitos selecionados garantindo a integridade morfológica e funcional das mitocôndrias, segundo Frey e Mannella (2000). Nessa membrana se encontra o sistema transportador de elétrons (cadeia respiratória), o sistema de fosforilação (ATP sintase) e os transportadores dos intermediários das vias metabólicas que incluem enzimas intra-mitocondriais. A matriz mitocondrial contém enzimas, principalmente as pertencentes ao ciclo de Krebs, da β -oxidação de ácidos graxos e o DNA mitocondrial. Apesar de pequeno, mas de suma importância fisiológica o espaço intermembranar possui proteínas com funções importantes dentro do metabolismo energético como o citocromo *c* (envolvido no transporte de elétrons e na apoptose), creatina-quinase e adenilato-quinase (FREY; MANNELLA, 2000). E é neste espaço que o gradiente eletroquímico (elemento fundamental) é utilizado em sistemas biológicos para produzir energia, ocorrendo tanto em mitocôndrias na fosforilação oxidativa quanto em cloroplastos na síntese fotossintética de ATP, em seres eucariontes e procariontes, respectivamente.

2.3.2 Energética celular

Em 1948, Eugene Kenedy e Albert Lehninger revolucionaram os estudos da bioenergética quando descobriram que as mitocôndrias eram os sítios da fosforilação oxidativa nos seres eucariontes (NELSON; COX, 2002). As células animais utilizam quase 90% da energia proveniente da cadeia respiratória mitocondrial e transforma energia redutora em um potencial de prótons transmembranar (MITCHELL, 1961). A respiração celular ocorre em três grandes estágios. No primeiro estágio, as moléculas dos combustíveis orgânicos - carboidratos, lipídios e proteínas - têm o seu metabolismo degradativo convergido em acetil-CoA. No segundo estágio, esses grupos acetil são consumidos durante o ciclo de Krebs, sendo oxidados totalmente a CO_2 acompanhado da redução de grande quantidade de coenzimas oxidadas NAD^+ e FAD , gerando os transportadores de elétrons reduzidos NADH e FADH_2 . No terceiro estágio da respiração, a mitocôndria remove os elétrons

oriundos dessas coenzimas reduzidas (NADH ou FADH_2) e os transfere para o oxigênio molecular reduzindo-o a H_2O (respiração mitocondrial), por meio de complexos respiratórios especializados I, II, III e IV, localizados nas cristas da membrana mitocondrial interna. Durante esse processo de transferência de elétrons, uma grande quantidade de energia é liberada e conservada na forma de ATP, por meio do processo chamado de fosforilação oxidativa que acontece no complexo V, ATP sintase (Figura 8).

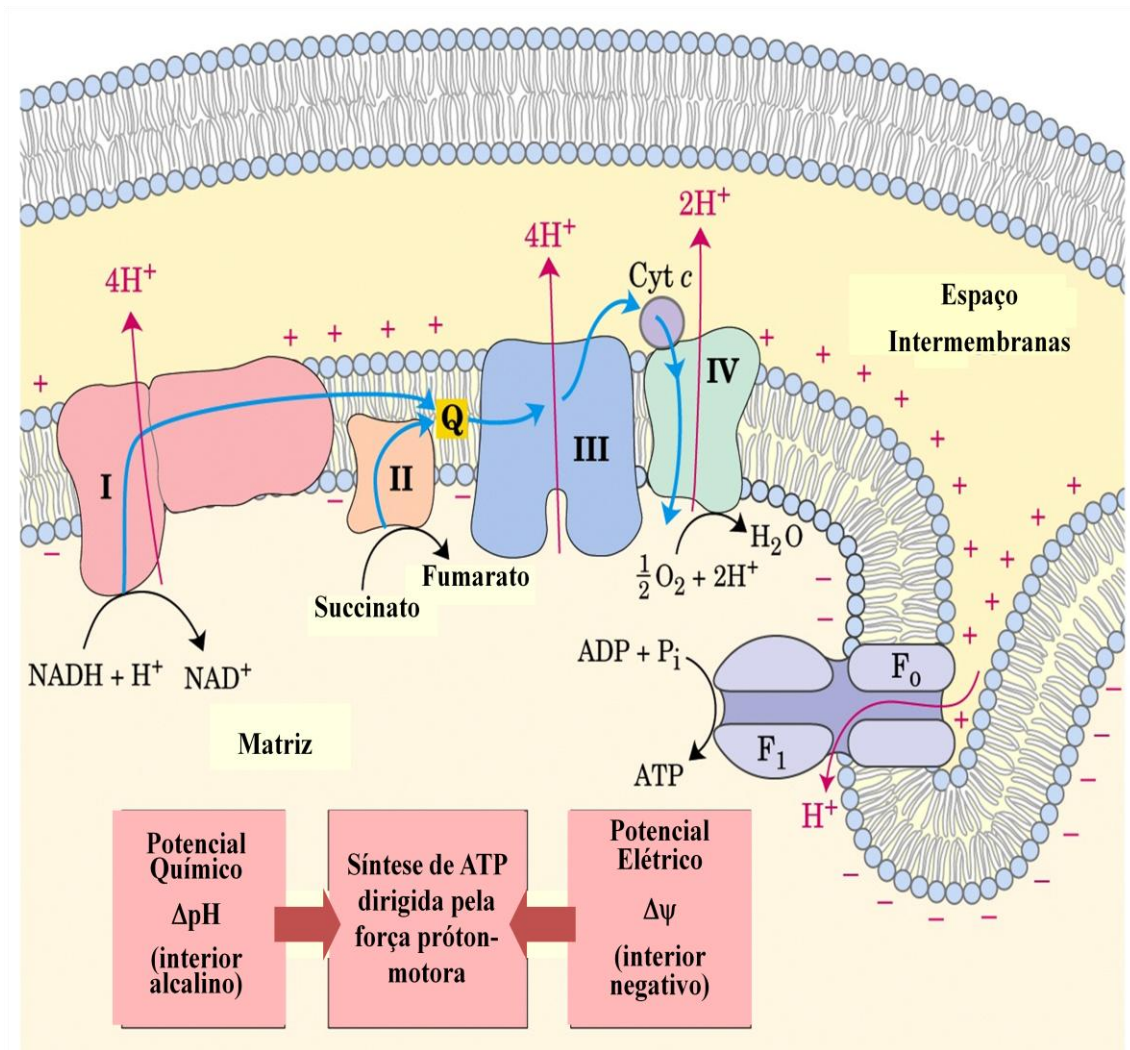


Figura 8 - Modelo da hipótese quimiosmótica (Fonte: NELSON; COX, 2002).

Tanto os elétrons transferidos pelo NADH para o átomo de ferro central da NADH desidrogenase (complexo I) quanto os elétrons originários do succinato que são transferidos para o FAD (complexo II) são repassados para

a forma oxidada da coenzima Q ou ubiquinona (Q ou UQ), levando à sua redução a ubiquinol (QH₂ ou UQH₂). Em seguida esta é desprotonada formando duas espécies na forma do ânion semiquinona (UQH⁻) um localizado na face citoplasmática da membrana mitocondrial interna, e outro na face matricial da membrana. As duas formas de UQH⁻ são combinadas quando oxidadas, regenerando UQ e doando seus elétrons ao citocromo *b-c*₁ e posteriormente ao citocromo *c* (complexo III). Este transporta elétrons para a citocromo *c* oxidase formada por várias subunidades protéicas associadas a dois grupos heme (citocromo *a* e *a*₃) e três centros íons cobre (2 Cu A e 1 Cu B), responsáveis pela transferência de elétrons para o oxigênio molecular, que resulta na formação de água (complexo IV). De acordo com as descobertas da hipótese quimiosmótica de Peter Mitchell (1961) em associação com a do acoplamento conformacional de Paul Boyer e colaboradores (1973), o fluxo de elétrons é acompanhado de bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (complexos I, III e IV), gerando um gradiente eletroquímico de H⁺. O bombeamento destas espécies químicas geradas na cadeia respiratória de volta à matriz mitocondrial pela F₀F₁-ATP sintase (complexo V), por meio do canal de prótons do componente F₀ que induz alteração conformacional dos sítios catalíticos a cada 120° no componente F₁ liberando o ATP formado a partir de ADP e Pi, sendo que cada rotação completa libera três unidades de ATP.

2.3.2.1 Complexo I

O complexo I ou NADH: ubiquinona oxidoredutase ou NADH desidrogenase (Figura 9) é o maior deles, possuindo 42 cadeias polipeptídicas diferentes. A primeira etapa da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias consiste em ionizar os átomos de H_2 que foram removidos dos substratos alimentares. Estes átomos de H_2 são removidos aos pares; um deles torna-se imediatamente um íon H^+ , enquanto o outro se combina com a nicotinamida adenina dinucleotídeo-forma oxidada (NAD^+) para formar o NADH. O efeito inicial é liberar o outro átomo de H do NADH para formar outro íon H^+ , esse processo reconstitui o NAD^+ que é reutilizado continuamente (GUYTON, 1997). Um grupo prostético de FMN (flavina mononucleotídeo) reduz a $FMNH_2$ e vários centros Fe-S são os componentes diretamente envolvidos na transferência de dois elétrons do NADH para a ubiquinona (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003). A ubiquinona é reduzida a um radical livre anionte denominado semiquinona pela captação de apenas um elétron (FREITAS, 2006). Este intermediário sofre redução por um segundo elétron, provindo da matriz, originando o ubiquinol ou ubiquinona reduzida (UQH_2). Na matriz o ubiquinol bombeia quatro H^+ para o lado citosólico da membrana interna, gerando parte do potencial eletroquímico responsável pela síntese de ATP.

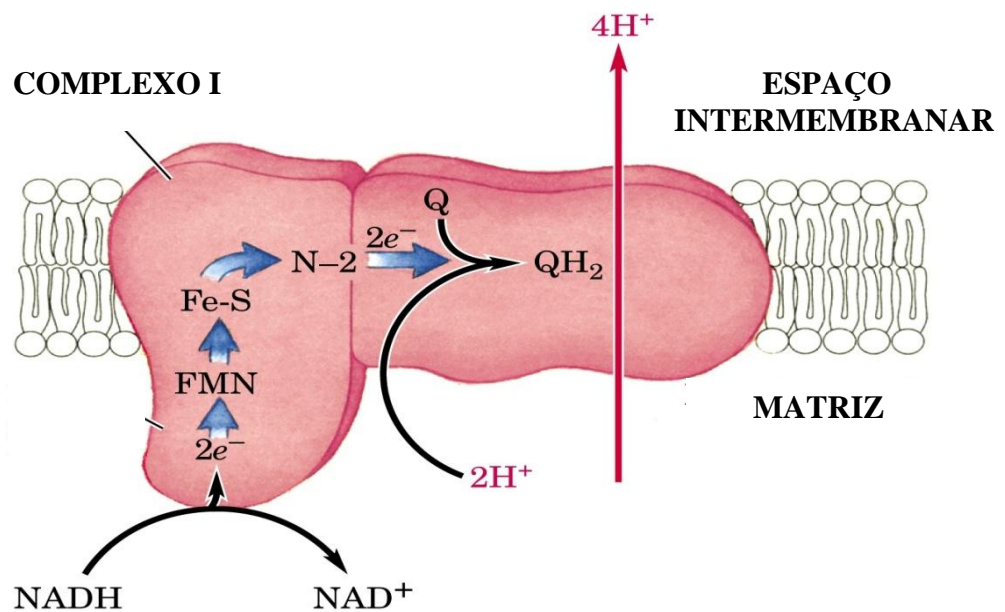


Figura 9 - NADH: ubiquinona oxidoredutase (complexo I) (Fonte: NELSON; COX, 2002).

2.3.2.2 Complexo II

O complexo II ou succinato-Q redutase (Figura 10) é composto por vários polipeptídios, sendo que os dois maiores representam a succinato desidrogenase, contendo uma molécula de FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e dois centros Fe-S (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003). A succinato desidrogenase é uma enzima do ciclo de Krebs e a única que não está livre na matriz mitocondrial, ela está ligada à membrana mitocondrial interna, recebe os equivalentes redutores do succinato, ou seja, transforma o succinato em fumarato, passando o H^+ e os elétrons para o FAD que é reduzido a $FADH_2$. O $FADH_2$ doa seus elétrons aos centros Fe-S que então os transfere à coenzima Q ou ubiquinona, mas antes os prótons são devolvidos à matriz mitocondrial, distinguindo-se do complexo I por não ser uma bomba de prótons (DORTA, 2007; FREITAS, 2006; MARZZOCO; TORRES, 1999).

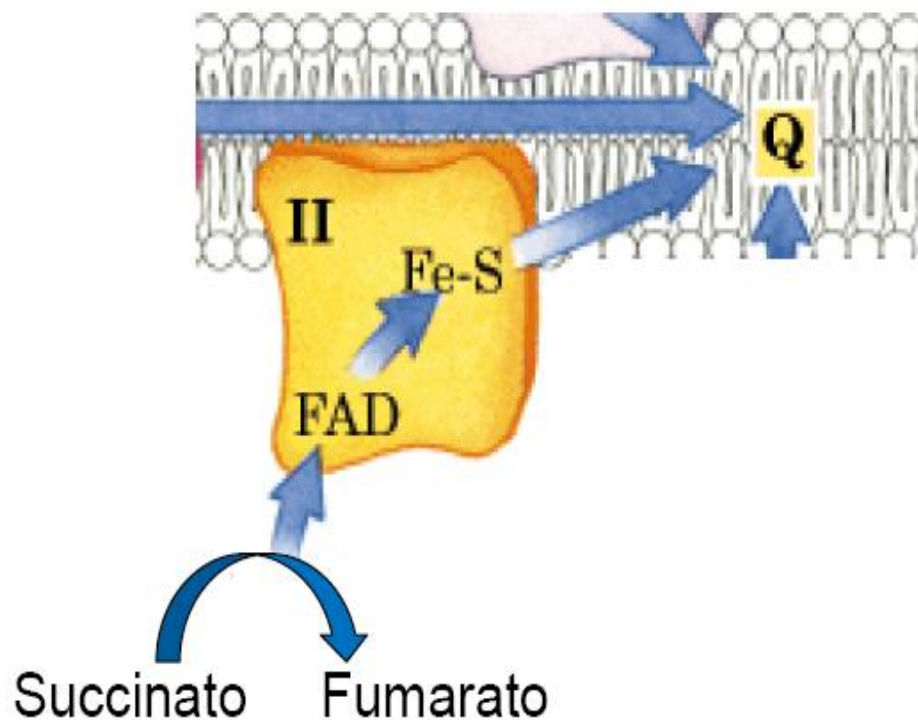


Figura 10 - Succinato-Q redutase (complexo II) (Fonte: NELSON; COX, 2002).

2.3.2.3 Complexo III

O complexo III ou complexo dos citocromos $b-c_1$ ou ubiquinona – citocromo c oxidorreductase (Figura 11) é constituído por pelo menos três cadeias polipeptídicas, contendo três tipos de centros redox: proteína ferro-enzofre, denominada proteína Rieske, citocromos c_1 e b (b_{566} e b_{562}). Os complexos I e II assim como a glicerol-3-fosfatodesidrogenase, desprotonam a coenzima Q reduzida (QH), transformando-a no ânion semiquinona (QH⁻). A redução ocorre com a adição de dois pools distintos, um localizado na face citoplasmática da membrana mitocondrial interna, e outro na face matricial da membrana, ambas formas da semiquinona são combinadas quando oxidadas, regenerando o ubiquinol (QH₂), forma reduzida da ubiquinona, responsável pela transferência de elétrons ao citocromo $b-c_1$ e posteriormente ao citocromo c , com transporte vetorial de prótons da matriz para o espaço intermembranar (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003; CALGARO-HELENA, 2006; MARZZOCO; TORRES, 1999).

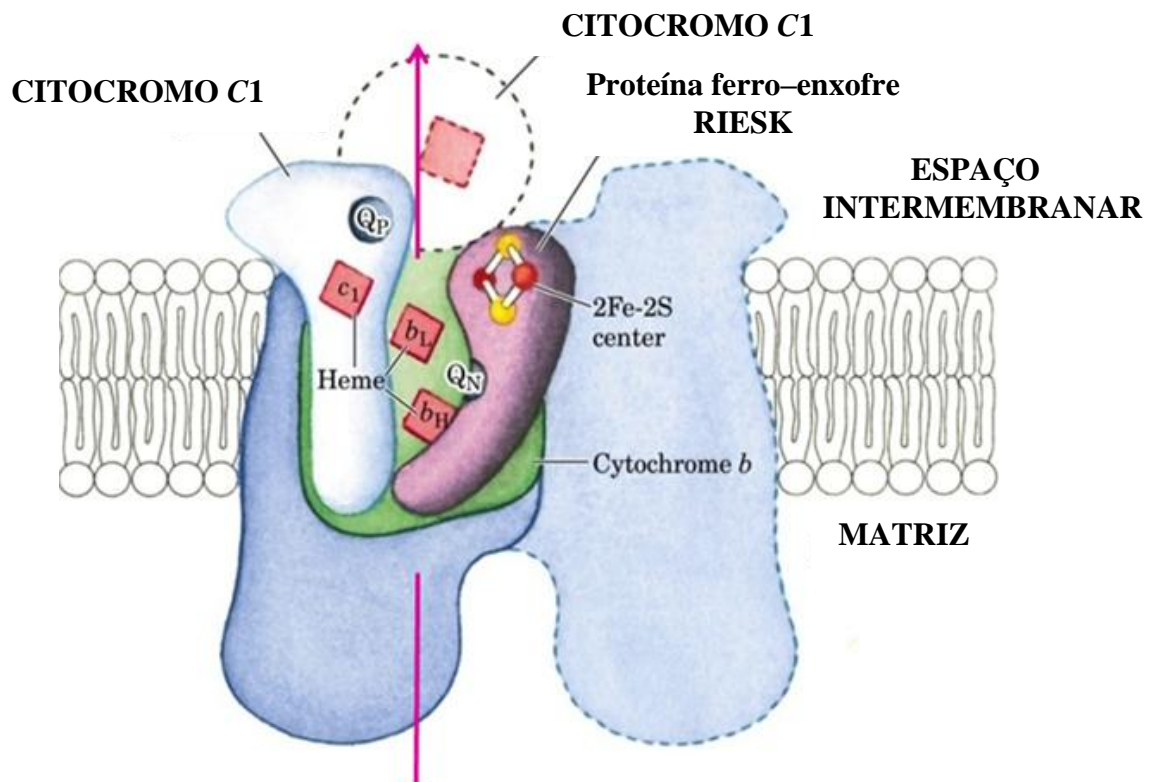


Figura 11- Ubiquinona – citocromo c oxidorreductase ou citocromo $b-c_1$ (complexo III) (Fonte: NELSON; COX, 2002).

O ciclo Q (Figura 12) apresenta dois sítios catalíticos distintos um localizado na face citoplasmática da membrana mitocondrial interna para oxidação de QH_2 do qual faz parte o citocromo b_{566} , e outro na face matricial da membrana para a redução de Q que faz parte o citocromo b_{562} é dividido em dois ciclos o primeiro o QH_2 , perde 1 elétron e 1 próton, formando QH^- , o elétron segue a rota $\text{QH}_2 \rightarrow \text{Fe-S} \rightarrow \text{cit.c1} \rightarrow \text{cit.c}$, enquanto o H^+ é liberado no espaço intramembranar e QH^- , converte-se na forma oxidada Q, por transferência de seu elétron aos $b_{566} \rightarrow b_{562} \rightarrow \text{Q} \rightarrow \text{QH}^-$, o consumo de um H^+ da matriz mitocondrial que irá reconstituir o QH^- em ubiquinol no próximo ciclo. O segundo inicia-se como o primeiro até o citocromo $b_{562} \rightarrow \text{QH}^-$, recebe mais um H^+ da matriz mitocondrial recuperando o QH_2 , que passa a refazer o ciclo, liberando mais 2H^+ para o espaço intramembranar. A Q formada neste segundo ciclo torna-se disponível para receber os elétrons que antecedem a cadeia respiratória (MARZZOCO; TORRES, 1999).

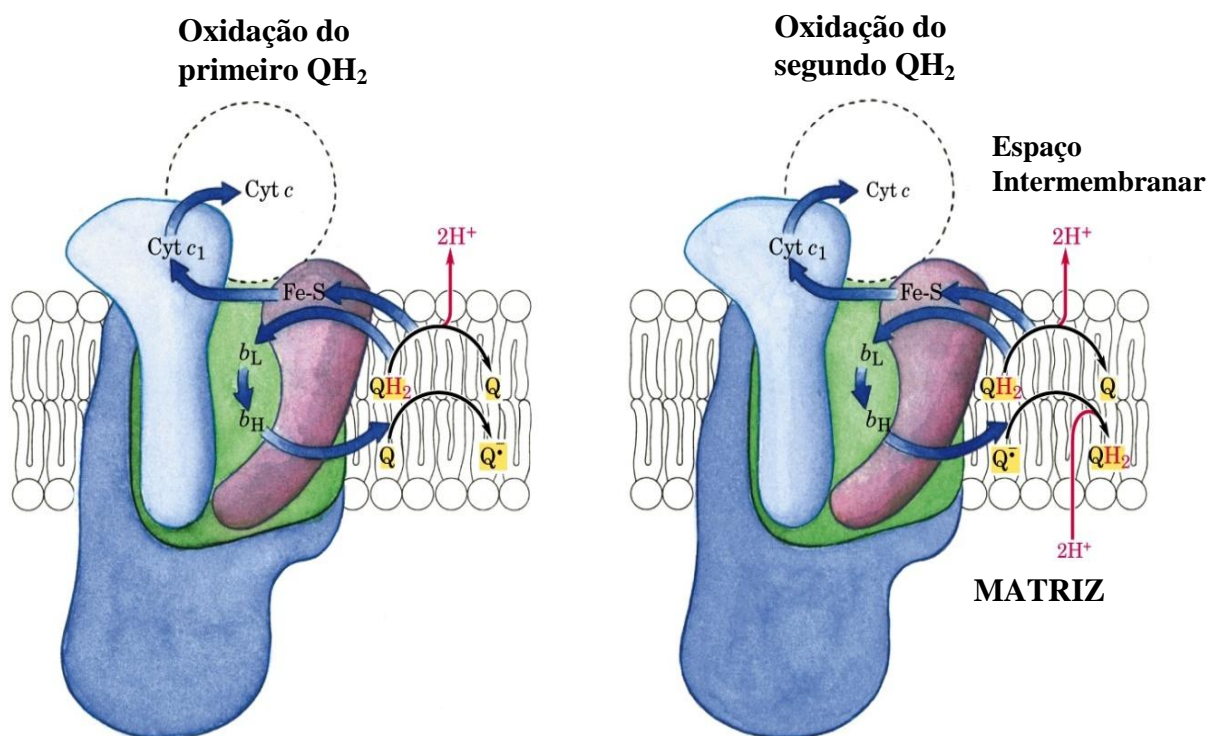


Figura 12- Ciclo Q (complexo III) (Fonte: NELSON; COX, 2002).

2.3.2.4 Complexo IV

Complexo IV ou citocromo oxidase (Figura 13), é nesta etapa final da cadeia de transporte de elétrons que o citocromo *c*, uma proteína solúvel associada à parte externa da membrana mitocondrial interna, transfere elétrons, através de dois grupos heme (citocromo *a* e *a*₃), pelo menos dois átomos de cobre denominados Cu_A e Cu_B, para o O₂ molecular formando 2H₂O e bombeia prótons da matriz para o lado citosólico pela reação de catálise da citocromo *c* oxidase. O caminho percorrido pelos elétrons neste complexo ainda é hipotético (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003; MARZZOCO; TORRES, 1999).

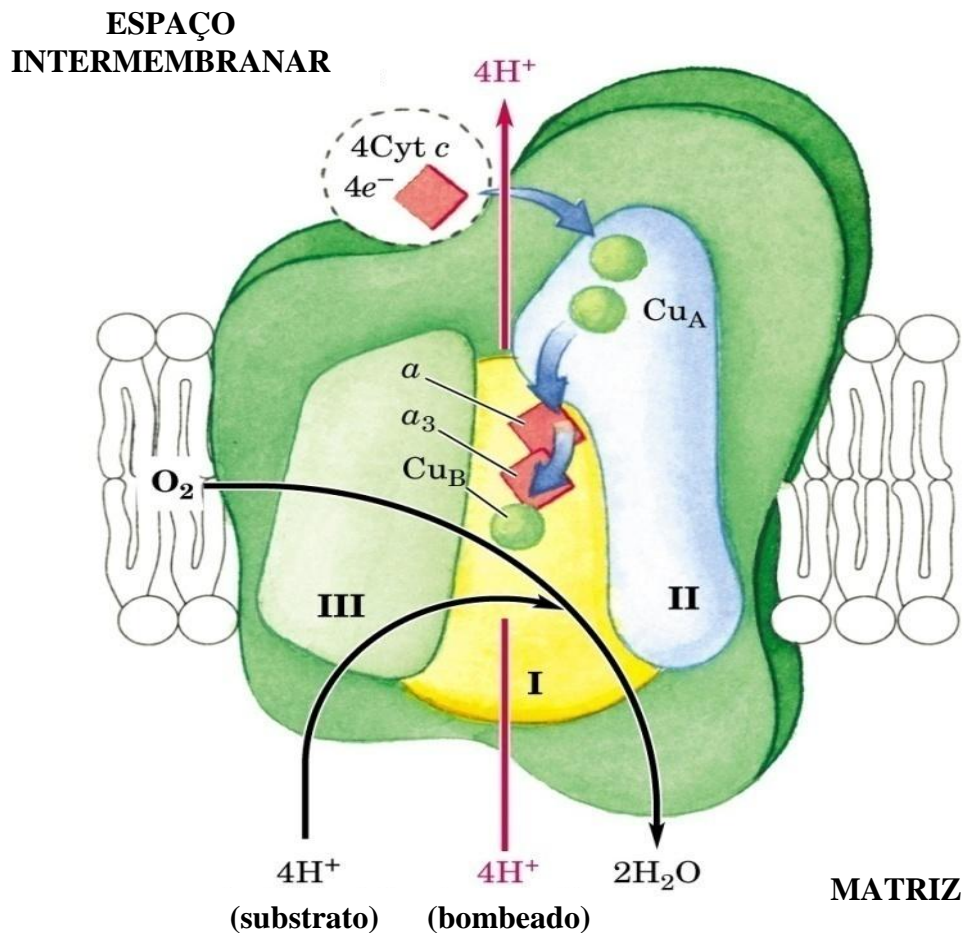


Figura 13 - Citocromo oxidase (complexo IV) (Fonte: NELSON; COX, 2002).

2.3.2.5 Complexo V

O Complexo V ou F_0F_1 ATP sintase (Figura 14) apresenta dois componentes distintos: F_1 , uma proteína periférica de membrana, e F_0 , uma proteína integral de membrana. A letra o subscrita em F_0 significa sensível à oligomicina (NELSON; COX, 2002). Cada componente é constituído por várias subunidades protéicas. F_1 tem 9 polipeptídios, 5 dos quais são diferentes, com a composição: $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$ e cada uma dessas três subunidades tem um sítio catalítico para a síntese de ATP. F_0 tem é composto por três tipos de subunidades protéicas a, b e c. A força próton-motriz dirige a síntese de ATP catalisada pela ATP sintase. A elevada concentração de íon H^+ , com carga positiva no lado citosólico da membrana mitocondrial interna, e a grande diferença de potencial elétrico através da membrana interna determinam o fluxo de íons H^+ para o interior da matriz mitocondrial através do componente F_0 . A energia derivada desse fluxo é utilizada para converter $ADP + P_i$ em ATP (GUYTON, 1997). As últimas evidências sugerem que o H^+ entra pela porção F_0 causando uma rotação, fazendo as subunidades girarem, a cada 120° a subunidade γ entra em contato com a subunidade β (aberta, ligada ao ADP ou ligada ao ATP). Cada rotação completa de γ , faz com que β passe pelas três conformações liberando três moléculas de ATP (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003).

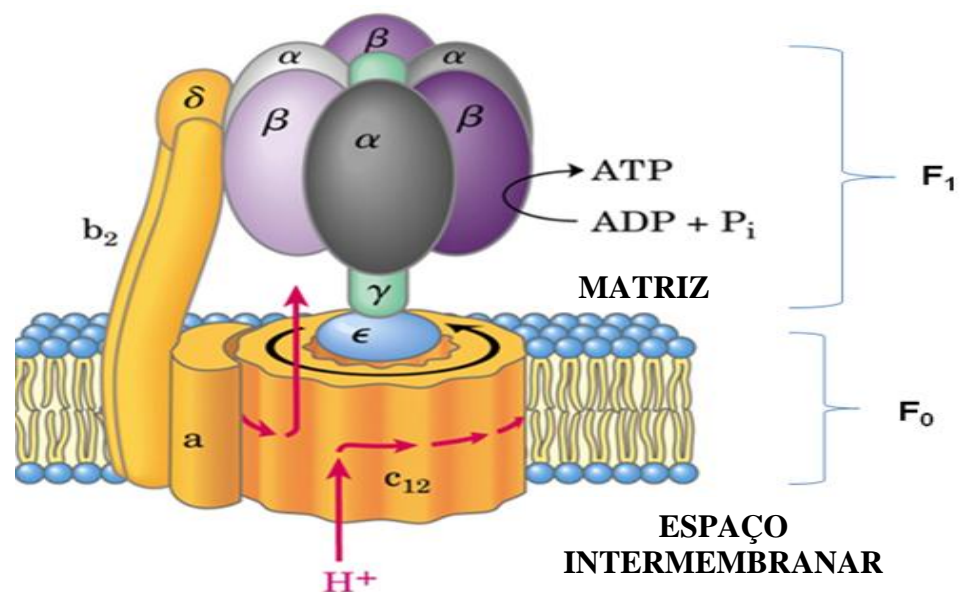


Figura 14 - ATP sintase (complexo V) (Fonte: NELSON; COX, 2002).

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias denomina-se respiração mitocondrial. Os estados clássicos da respiração mitocondrial são a respiração de estado 4 (basal) e a respiração de estado 3 (acoplada à síntese de ATP) (CHANCE; WILLIAMS, 1956). A relação entre a respiração de estado 3 e a de estado 4, Razão de Controle Respiratório (RCR), é um parâmetro da função mitocondrial que indica o grau de acoplamento entre a oxidação dos substratos respiratórios e a produção de ATP. A relação ADP/O, outro parâmetro, está associado à eficiência da mitocôndria em sintetizar ATP. Agentes desacopladores da fosforilação oxidativa estimulam a respiração de estado 4, enquanto que o efeito de agentes inibidores manifesta-se sobre a respiração de estado 3 (CAIN; SKILLETER, 1987).

2.3.2.6 Inibidores da Fosforilação Oxidativa

A fosforilação oxidativa é susceptível à inibição em todos os estágios do processo. Nos ensaios bioquímicos são muito utilizados os inibidores que agem especificamente em cada complexo da cadeia respiratória: no complexo I a rotenona e o amital bloqueiam o transporte de elétrons do NADH para a ubiquinona (ESPOSTI, 1998; LÜMMEN, 1998) e, portanto, impedem a utilização do NADH como substrato. Ao contrário, não é impedido o fluxo de elétrons resultante da oxidação do succinato, porque esses elétrons entram pelo complexo II, o qual, segundo Luciani (1971), é inibido especificamente pela 2-tenoitrofluoroacetona.

A antimicina A e o mixotiazol são os inibidores usados no complexo III. O primeiro inibe a transferência do elétron do grupo heme *b* para a molécula de quinona ou semiquinona, o segundo bloqueia a oxidação do ubiquinol (WALLACE; STARKOV, 2000). Os inibidores do complexo IV são o cianeto, a azida e o monóxido de carbono (CO). Os dois primeiros ligam-se, de maneira não competitiva ao oxigênio, à forma férrica do citocromo a_3 , o CO compete com o oxigênio ligando-se à forma ferrosa. O diciclo-hexilcarbodiimida (DCCD) e a oligomicina (antibiótico) são os inibidores da ATP sintase, bloqueando o fluxo de prótons (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003; SOPER; PEDERSEN, 1976). Se mitocôndrias respirando ativamente forem expostas a um inibidor da

ATP sintase, cessa de operar a cadeia transportadora de elétrons, mostrando que o transporte de elétrons e a síntese de ATP estão firmemente acoplados (BERG et al., 2004). Trabalho realizado anteriormente em nosso laboratório mostrou que substâncias isoladas de plantas podem atuar como inibidores da cadeia respiratória (MINGATTO et al., 2007).

2.3.2.7 Desacopladores da Fosforilação Oxidativa

O firme acoplamento do transporte de elétrons com a fosforilação nas mitocôndrias pode ser rompido (desacoplado). Assim, os desacopladores estimulam a respiração de estado 4 ou basal (estado 2) minimizando a produção de ATP mitocondrial, agem na força próton-motriz que é dissipada na presença destes compostos, mas o transporte de elétrons pela cadeia respiratória prossegue normalmente, desfazendo o acoplamento entre o transporte de elétrons e a síntese do ATP.

Estas substâncias carregam prótons pela membrana mitocondrial interna e essa atividade é conhecida como protonoforética. Há diversos compostos com atividade protonoforética como os ácidos lipofílicos fracos carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP), 2,4-dinitrofenol (DNP) e o carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), os quais atravessam a membrana interna na forma protonada, liberando o próton dentro da matriz mitocondrial (WALLACE; STARKOV, 2000). Trabalhos realizados anteriormente mostram que substâncias isoladas de plantas podem atuar como desacopladores (DORTA, et al., 2005; SANTOS, et al., 1998). Ionóforos (KADENBACH, 2003; WALLACE; STARKOV, 2000) e antiinflamatórios não-esteroidais como a nimesulida, o diclofenaco de sódio e o ácido mefenâmico são outros exemplos de desacopladores (CAPARROZ-ASSEF et al., 2001; MINGATTO et al., 1996, 2000).



Fonte: <http://www.researchtraining.org/images/Module605SD-Rat2.jpg>

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Preparações

3.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram do mais alto grau analítico comercialmente disponível. As soluções dos reagentes foram preparadas com água ultra-filtrada por meio do sistema purificador Millipore DirectQ-3[®] (Milli-Q[®]). As substâncias lipofílicas, como os lantadenos e o carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP) foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO).

3.1.2 Animais

Para esse estudo foram utilizados ratos Wistar machos de aproximadamente 200 g provenientes do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu. Os ratos ficaram alojados em caixas de plástico (41 cm x 34 cm x 16 cm) com cobertura de metal e serragem de madeira, no máximo de 4 animais/caixa e receberam água e alimento (ração comercial pelletizada especializada para ratos Purina[®]) *ad libitum*. Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em experimentação Animal (CEUA) do Campus Experimental da UNESP-Dracena, por estarem de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº 011/2008, ANEXO A).

3.1.3 Coleta das folhas e identificação da *Lantana camara*

As folhas da planta foram coletadas em uma propriedade rural no município de Monte Castelo, São Paulo, Brasil, localizado a uma latitude 21°17'58" sul e a uma longitude 51°34'07" oeste, estando a uma altitude de 375 metros. A planta foi identificada pelo Professor Doutor Milton Groppo Júnior e uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, sob o número SPFR 10364.

3.1.4 Isolamento e caracterização dos lantadenos presentes nas folhas da *Lantana camara*

As folhas de lantana foram secas em estufa com circulação de ar a 37°C até peso constante. Em seguida, foram moídas utilizando-se um moinho tipo Wiley, modelo MA 340, da marca Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil, e o pó obtido foi enviado ao Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, aos cuidados do Professor Doutor Fernando Batista da Costa que realizou o isolamento e a caracterização dos lantadenos presentes nas folhas da *Lantana camara*.

A 400 g do pó foram adicionados 2000 mL de metanol e o material foi macerado por 24 horas à temperatura ambiente com agitação intermitente. O extrato foi filtrado através de tecido tipo musselina e os pigmentos descoloridos com 70 g carvão ativado, o qual forneceu um extrato amarelo ouro. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo (15 g) foi suspenso em uma mistura metanol-H₂O (1:7, v/v) e extraído com clorofórmio (CHCl₃, 2 x 40 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o resíduo final (6 g) foi purificado em uma coluna cromatográfica de sílica gel (180 g, malha Merck 60-120, 7736) usando CHCl₃ e CHCl₃-metanol (99,5:0,5, v/v) como fase móvel. A fração rica em lantadenos foi então purificada e isolada por meio de cromatografia em camada delgada (sílica gel PF254, 1 mm de espessura, Merck 7730, CHCl₃-metanol (99,5:0,5, v/v) (SHARMA; DAWRA, 1991) fornecendo o lantadeno A e o lantadeno reduzido A. Os compostos foram então identificados por ressonância magnética nuclear (RMN ¹H) e por comparação com dados

existentes na literatura (SHARMA et al., 1987, 1990). A pureza dos compostos foi estimada por cromatografia em camada delgada usando diferentes sistemas de solventes, bem como análise de RMN ^1H .

3.1.5 Isolamento das mitocôndrias de fígado de rato

As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial (PEDERSEN, 1978). Ratos Wistar machos de 180-200 g foram anestesiados com éter e eutanasiados por decapitação em guilhotina; o fígado (10-15 g) foi imediatamente removido da cavidade abdominal por incisão bilateral, picotado em 50 mL de meio contendo 250 mM de sacarose, 1 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH, pH7, 2. Os fragmentos foram lavados no mesmo meio e homogeneizado três vezes por 15 segundos com intervalos de 1 minuto em homogeneizador tipo Potter-Elvehjen. A suspensão foi centrifugada a 770 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante resultante centrifugado a 9.800 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso com 10 mL de meio contendo 250 mM de sacarose, 0,3 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,2 e centrifugado a 4.500 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento mitocondrial final foi suspenso com 1 mL de meio contendo 250 mM de sacarose e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,2. Os ensaios com as mitocôndrias foram efetuados dentro de um período máximo de 3 horas.

Princípio do método:

A composição e a viscosidade dos meios são importantes fatores para o isolamento, sedimentação e integridade da mitocôndria. Assim, os meios devem conter sacarose para manutenção da osmolaridade, EGTA, um quelante de cátions bivalentes, principalmente cálcio que atua como desacoplador ou ainda como segundo mensageiro na ativação de fosfolipases que degradam os fosfolipídios da membrana, e HEPES-KOH, um sistema tampão pH 7,2 de acordo com Cain e Skilleter (1987).

No processo de homogeneização é por meio da força imposta pelo pistilo e a velocidade angular constante que a membrana citoplasmática é rompida liberando os componentes para o meio.

No processo de centrifugação fracionada, a primeira velocidade de centrifugação é baixa, sendo o primeiro sedimento do tecido homogeneizado desprezado, pois contém células intactas, núcleo, citoesqueleto, membrana plasmática e hemácias. O sobrenadante é submetido a uma velocidade de centrifugação maior, e o segundo sedimento contém lisossomos, mitocôndrias e peroxissomos. Este é ressuspenso e submetido à última centrifugação com velocidade média para separar as mitocôndrias das demais organelas devido às diferenças de densidade de flutuação de cada uma, resultante das proporções diferentes de lipídeos e proteínas em cada tipo de organela.

3.1.6 Dosagem de proteína

A proteína mitocondrial foi determinada de acordo com Cain e Skilleter (1987), utilizando-se a reação do biureto.

Foi extraída da suspensão mitocondrial uma alíquota de 10 µL e adicionada a 100 µL de uma solução de ácido deoxicólico 5% (m/v) e 1.390 µL de água Milli-Q® e posteriormente 1.500 µL do reagente de Biureto 0,15% (m/v). A absorvância foi estabelecida em 540 nm em relação a um branco reagente, e a concentração a partir de uma curva padrão ou de calibração utilizando-se a Albumina de Soro Bovino (BSA) nas mesmas condições das amostras.

Princípio do método:

O reagente de biureto tem por base hidróxido de sódio e sulfato de cobre, que se torna violeta na presença de proteínas. Os íons cúpricos em meio alcalino ligam-se ao nitrogênio de polipeptídios e proteínas formando um complexo de coordenação colorido com 4 ou até 6 ligações peptídicas vizinhas. A intensidade da cor produzida é proporcional ao número de ligações peptídicas que participam da reação. A vantagem da reação é que as ligações entre cobre e ligações peptídicas são independentes da composição de aminoácidos das proteínas.

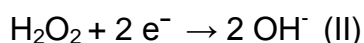
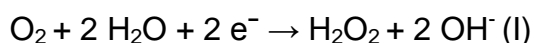
3.2 Ensaio com as mitocôndrias isoladas

3.2.1 Respiração mitocondrial

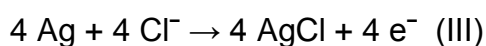
O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi medido usando um medidor de oxigênio dissolvido (Strathkelvin Precision Dissolved Oxygen Respirometer, Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Scotland, UK) equipado com um eletrodo tipo Clark. As mitocôndrias (1mg de proteína/mL) foram incubadas em uma câmara termostatizada fechada sob agitação em um meio composto por 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de K_2HPO_4 , 0,5 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,4 (volume final de 1 mL), a 30°C. Os substratos utilizados foram o glutamato (5 mM) e o malato (5 mM) ou succinato (5 mM) e rotenona (2,5 μ M) e as velocidades de consumo de oxigênio foram determinadas por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas como $nmol\ O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg\ de\ prote\acute{a}na^{-1}$. A respiração de estado 3 foi iniciada pela adição de 400 nmols de ADP e o efeito desacoplador foi observado com a adição dos lantadenos no estado 4.

Princípio do método:

O eletrodo tipo Clark é constituído por (a) dois ânodos de prata, em forma de anel, que circunda o (b) cátodo de platina, em forma de cilindro, acoplados por uma solução de KCl saturada e revestidos por uma membrana de teflon. À medida que é polarizado com 0,6 a 0,8 volts o fluxo de elétrons do eletrodo da prata para a platina, gera uma diferença de potencial entre os dois metais proporcional a quantidade de oxigênio dissolvido no meio de reação reduzindo-o a íons OH^- , de acordo com as reações no catodo da platina (I) e (II):



O circuito, que ocorre no ânodo de prata resulta com a reação (III):



A corrente elétrica gerada é proporcional à concentração de oxigênio que é detectado pela membrana de teflon, amplificado e registrado em um potenciômetro (CAIN; SKILLETER, 1987). Para a manutenção da osmolaridade o meio de respiração utilizado contém sacarose e KCl além de EGTA, HEPES-KOH, e K_2HPO_4 com fonte de fosfato para a síntese de ATP.

O estado 3 da respiração inicia-se com a adição do ADP ocorrendo um aumento na velocidade de consumo de oxigênio e o estado 4 da respiração, quando todo o ADP tiver sido consumido, a respiração retorna a lentidão. A razão do controle respiratório (RCR) é a relação entre os estados 3 e 4 da respiração mitocondrial, esta razão indica o grau de acoplamento entre a oxidação dos substratos respiratórios e a produção de ATP.

3.2.2 Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana das mitocôndrias (2 mg de proteína/mL) foi determinado espectrofluorimetricamente no meio contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 0,5 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,4, (volume final de 2 mL) com o indicador safranina-O (4 μ M). As mitocôndrias foram energizadas com glutamato (5 mM) e malato (5 mM) ou com succinato (5 mM) e rotenona (2,5 μ M), e a variação de fluorescência foi avaliada utilizando-se um espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão), nos comprimentos de onda de 505 e 535 nm para excitação e emissão, respectivamente. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação à fluorescência das células controle (sem adições).

Princípio do método:

A safranina O é um corante catiônico fluorescente que se distribui eletroforicamente na matriz em resposta à carga negativa da membrana interna da mitocôndria energizada. Assim, a redução da fluorescência ocorre devido ao influxo eletrogênico do corante na matriz das mitocôndrias energizadas alterando a sua forma e neutralizando seu núcleo. À medida que a safranina é liberada das mitocôndrias há um aumento da fluorescência.

3.2.3 Síntese de ATP

A síntese de ATP foi determinada pelo método de quimioluminescência utilizando o sistema luciferina-luciferase de vaga-lume por meio de um kit Bioluminescent Assay Kit Sigma (St. Louis, MO, USA) em um aparelho Luminômetro modelo Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). Previamente a suspensão de mitocôndrias foi tratada nas condições de respiração com succinato (5 mM) e rotenona (2,5 μ M) e centrifugada 9.000 g por 5 minutos, a 4°C. O sedimento obtido foi tratado com 1 mL de ácido percloracético 1 M gelado e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Foram aliqüotados 100 μ L de cada amostra e as mesmas foram neutralizadas com KOH 2 M. Em seguida foi adicionado Tris-HCl 100 mM, pH 7,8, sendo as amostras centrifugadas a 12.000 g, por 12 minutos a 4°C, e os sobrenadantes resultantes foram avaliados, em triplicata, no Luminômetro seguindo as recomendações do fabricante do kit.

Princípio do método:

O ATP presente na amostra é consumido durante a oxidação da luciferina em oxiluciferina “excitada” catalisada pela enzima luciferina-luciferase, no retorno da oxiluciferina no seu estado basal ocorre à emissão de luz, conforme a reação:



Mantendo as concentrações de luciferina, luciferase e oxigênio, constantes e sendo o ATP o reagente limitante, a quantidade de luz emitida é proporcional ao ATP disponível no meio.

3.2.4 Inchamento mitocondrial em meio hiposmótico de acetato de potássio

As mitocôndrias (0,45 mg de proteína) foram incubadas a 30°C em um meio contendo acetato de potássio 54 mM, HEPES-NaOH 5 mM, pH 7,1, EGTA 0,1 mM, EDTA 0,2 mM, azida sódica 0,1 mM, albumina de soro bovino 0,1% (p/v), atractilósídeo 15 µM, antimicina A 1 µM e propanolol 0,3 mM, seguido por valinomicina 1 µM e o lantadeno, em volume final de 1,5 mL. O inchamento foi monitorado pela diminuição da absorvância em 540 nm em um espectrofotômetro modelo DU-800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) (MINGATTO et al., 2000).

Princípio do método:

Para evidenciar a propriedade protonofórica dos desacopladores as mitocôndrias são incubadas em um meio hiposmótico de acetato de potássio. O ionóforo valinomicina é adicionada para permitir o movimento de íons K⁺ através da membrana mitocondrial. Nessa condição o acetato é capaz de atravessar a membrana mitocondrial na forma protonada produzindo um gradiente de prótons. O inchamento mitocondrial ocorre se um protonóforo está presente para promover a passagem de prótons da matriz para o meio extramitocondrial, permitindo o influxo posterior do acetato e do íon K⁺ (NICHOLLS, 1982).

3.2.5 Atividade da ATPase

A atividade da ATPase mitocondrial foi medida em mitocôndrias intactas (acopladas e desacopladas) e em mitocôndrias rompidas por congelamento e descongelamento. As mitocôndrias intactas (1 mg de proteína/mL) foram incubadas em um meio contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, adicionado de EGTA 0,2 mM e ATP 5 mM por 20 minutos a 37°C, na ausência (acoplada) e na presença (desacoplada) de CCCP 1 µM, em um volume final de 0,5 mL. Quando as mitocôndrias rompidas foram usadas como fonte da enzima, as mesmas foram congeladas em nitrogênio

líquido e em seguida descongelas em banho de água a 37°C (3 repetições) e o meio de incubação era composto de TRIS-HCl 20 mM (pH 7,4). A reação foi iniciada pela adição de ATP 5 mM e interrompida pela adição de ácido tricloroacético 5% gelado. A atividade da ATPase foi avaliada pela dosagem do fosfato inorgânico liberado conforme descrito por Fiske; Subbarow (1925) no comprimento de onda de 700 nm usando um espectrofotômetro modelo DU-800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Princípio do método:

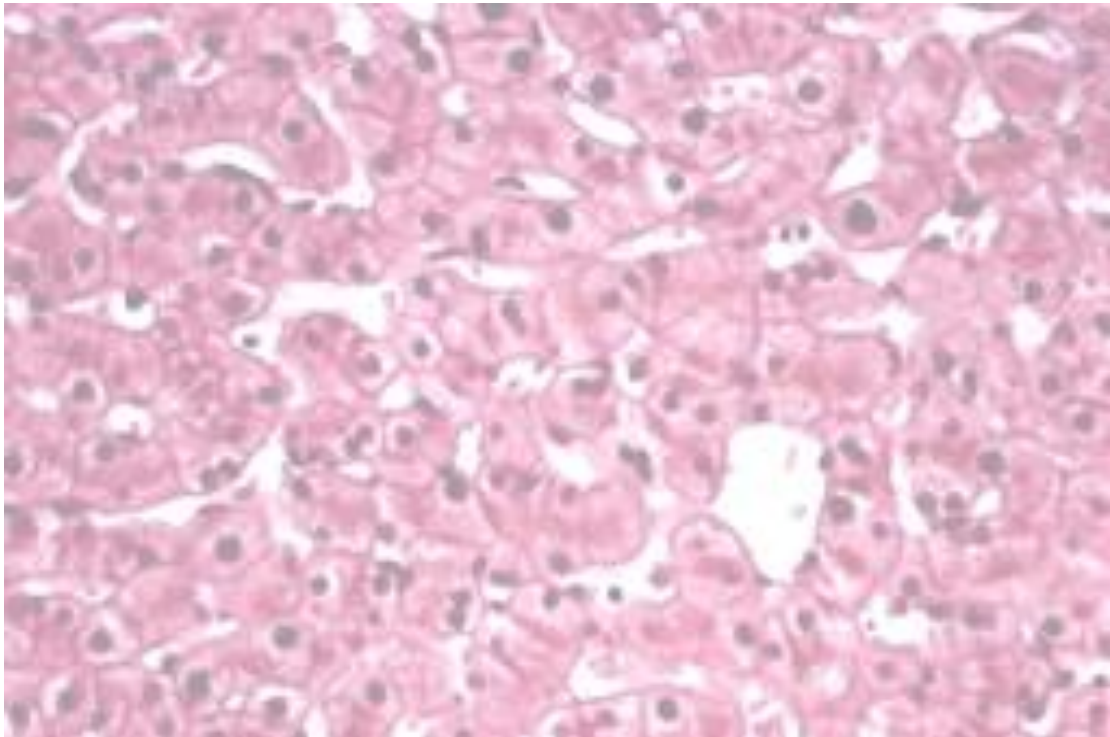
Em condições normais a ATP sintase ou ATPase mitocondrial usa a energia acumulada na forma do gradiente de prótons para sintetizar ATP, a partir de ADP e fosfato. Na ausência de substratos endógenos e de ADP, no entanto, e na presença de grandes quantidades de ATP, a ATPase passa a operar no sentido da hidrólise de ATP e da ejeção de prótons para manter o gradiente eletroquímico de prótons. Nessas condições, a ATPase comporta-se como uma fosfohidrolase e a sua atividade pode ser medida pela quantidade de fosfato liberado (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003).

3.3 Análise estatística

A significância estatística dos dados experimentais, quando pertinente, foi avaliada pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnet para comparação entre um único grupo tratado e o seu controle, e os resultados com valor de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).



Fonte: <http://www.hospitaldoacucar.com.br/site/images/stories/servicos/gg/unifigado03>



Fonte: <http://www.hepcentro.com.br/images/>

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos dos lantadenos na respiração mitocondrial

A interferência dos lantadenos no consumo de oxigênio das mitocôndrias foi monitorado na presença de concentrações diferentes dos compostos. Foram avaliadas a respiração de estado 3 (consumo de oxigênio na presença de substrato respiratório e ADP), a respiração de estado 4 (consumo de oxigênio depois que todo o ADP adicionado foi consumido) e a razão de controle respiratório (RCR, respiração de estado 3/respiração de estado 4). A Figura 15 mostra um experimento controle (sem adição dos lantadenos) realizado com glutamato mais malato, os quais são substratos do complexo I da cadeia respiratória e a Figura 16 mostra um experimento controle realizado com succinato, um substrato do sítio II da cadeia respiratória, acrescentado do inibidor do complexo I, rotenona. Nas concentrações testadas (5-25 μM), somente o RLA estimulou, de maneira dose-dependente, a respiração de estado 4 das mitocôndrias energizadas tanto com glutamato mais malato (dados não apresentados) como com succinato (Figura 17).

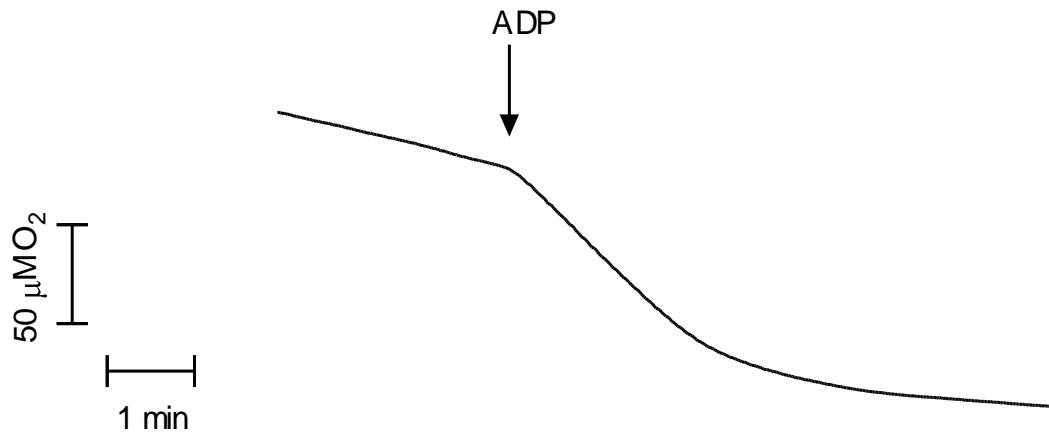


Figura 15 - Figura representativa de um experimento controle de respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato mais malato.

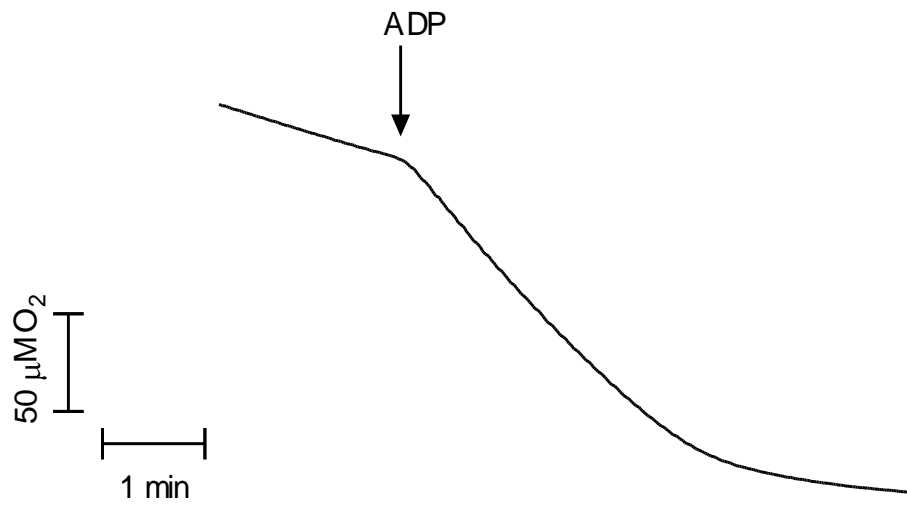


Figura 16 - Figura representativa de um experimento controle de respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato.

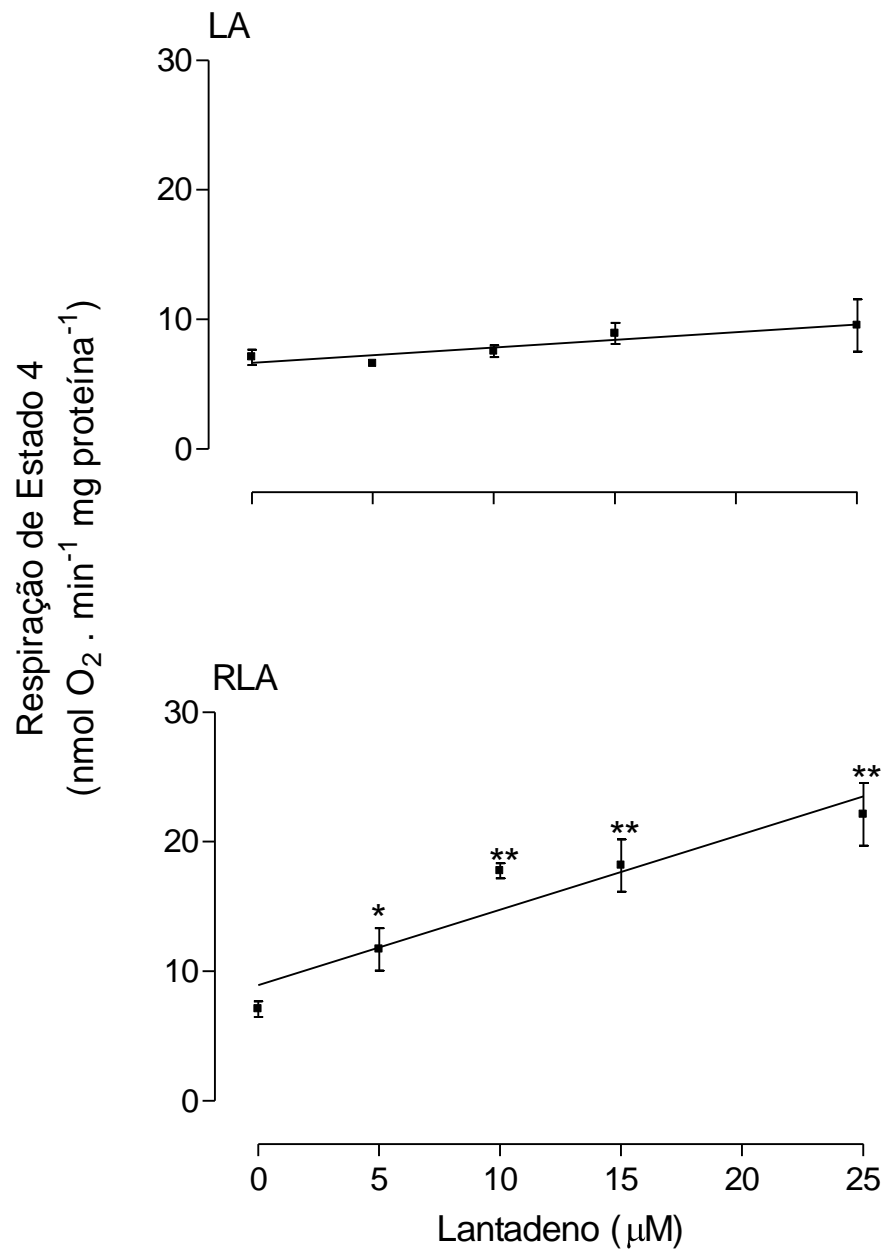


Figura 17 - Efeitos dos lantadenos no estado 4 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato. Valores representam a média \pm EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *,**Significativamente diferente do controle ($*P < 0,05$ e $**P < 0,01$, respectivamente).

RLA também inibiu de uma maneira dose-dependente a respiração de estado 3 de mitocôndrias energizadas com succinato, enquanto que LA apresentou efeito inibidor apenas na concentração de 25 μM (Figura 18) indicando que os compostos, embora com diferentes potências, inibem a cadeia respiratória ou a ATP sintase; um padrão similar foi observado para os substratos glutamato mais malato (dados não apresentados).

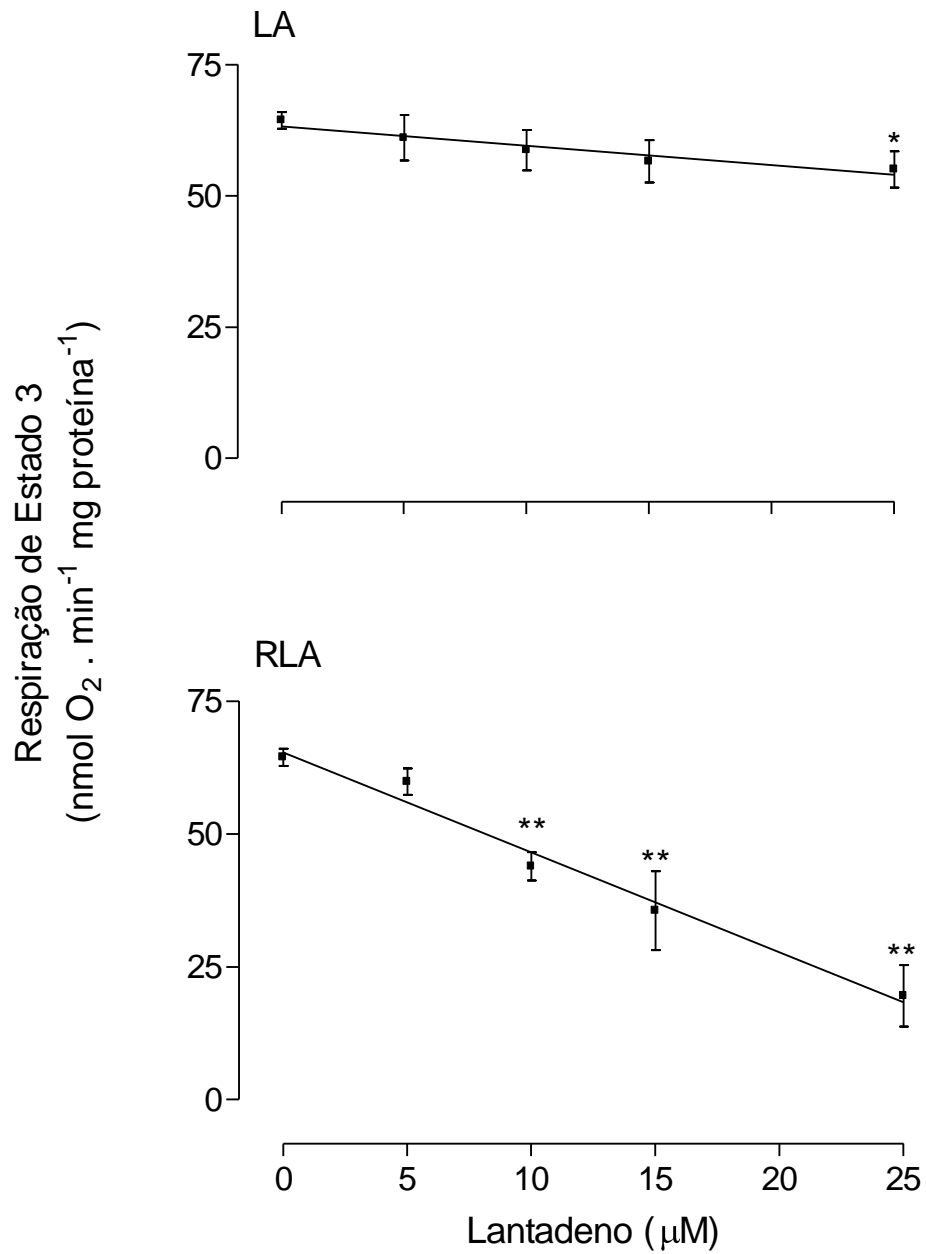


Figura 18 - Efeitos dos lantadenos no estado 3 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato. Valores representam a média \pm EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. ***Significativamente diferente do controle ($*P < 0,05$ e $**P < 0,01$, respectivamente).

Os efeitos na razão do controle respiratório (RCR) estão mostrados na Figura 19. Enquanto o LA só afetou significativamente esse parâmetro a 25 μM , RLA começou a afetá-lo já na concentração de 5 μM . RLA, mas não o LA, liberou a inibição da respiração mitocondrial de estado 3 imposta pela oligomicina (inibidor da F_0F_1 – ATP sintase) (Figura 20) indicando que o RLA atua como desacoplador. Além disso, nenhum dos dois compostos inibiu a respiração mitocondrial desacoplada pelo CCCP (desacoplador da fosforilação oxidativa) indicando que os compostos não atuam como inibidores da cadeia respiratória, podendo estar agindo como inibidores da ATP sintase (Figura 21).

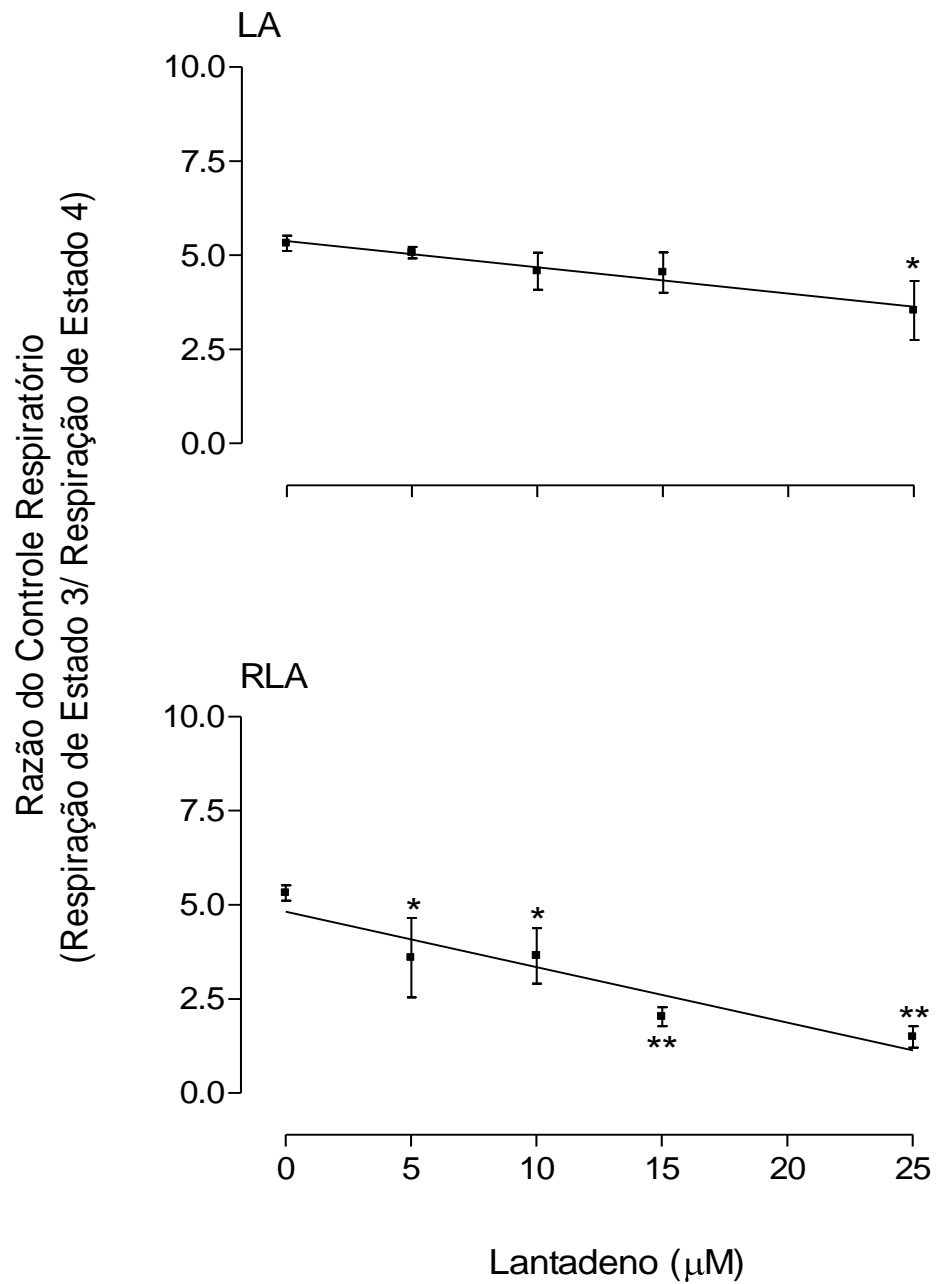


Figura 19 - Efeitos dos lantadenos na razão do controle respiratório em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato. Valores representam a média \pm EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. ***Significativamente diferente do controle (* P <0,05 e ** P <0,01, respectivamente).

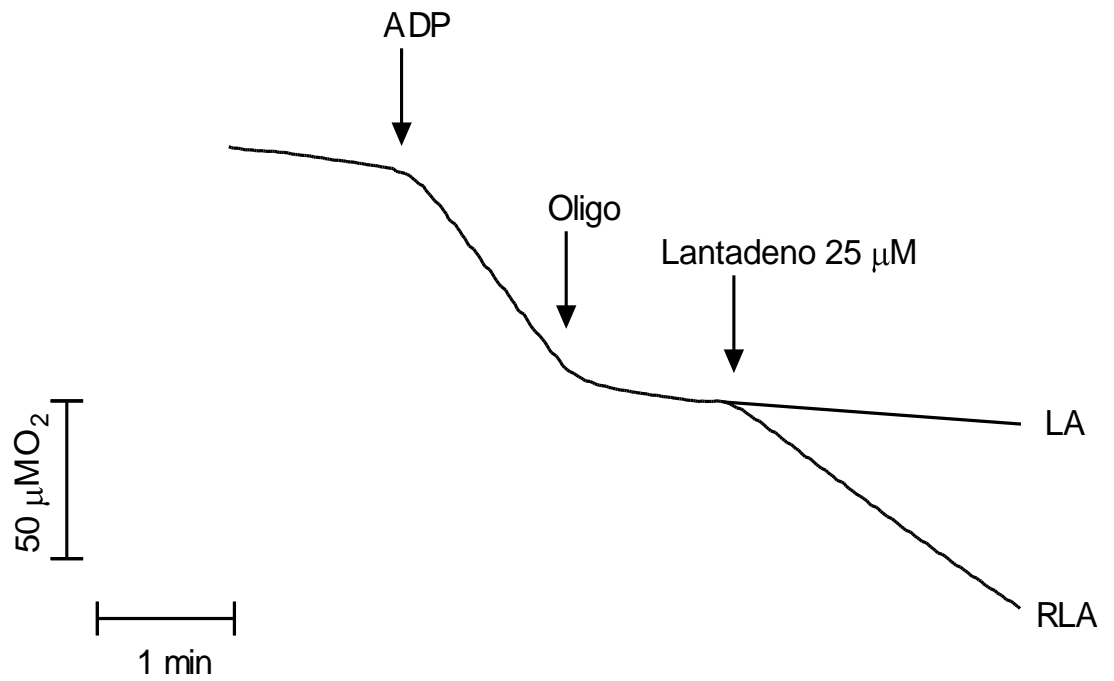


Figura 20 - Efeitos dos lantadenos na respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato e inibidas pela oligomicina (Oligo).

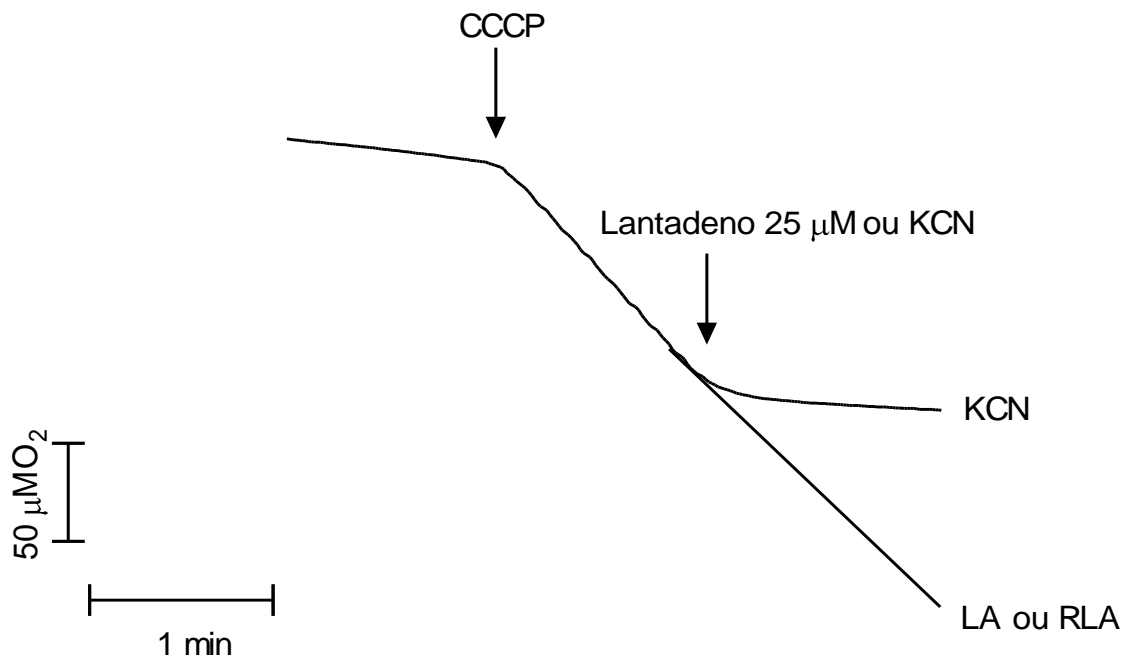


Figura 21 - Efeitos dos lantadenos na respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato e desacopladas pelo CCCP. KCN (cianeto de potássio, inibidor da cadeia respiratória).

4.2 Efeitos dos lantadenos no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

A Figura 22 mostra os efeitos dos lantadenos sobre o potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato. Em linha com os resultados obtidos na respiração mitocondrial, LA dissipou o $\Delta\psi$ significativamente somente na concentração de 25 μM , sendo que o RLA apresentou efeito significativo neste parâmetro ao longo de toda a faixa de concentração avaliada (5-25 μM), de uma maneira dose-dependente.

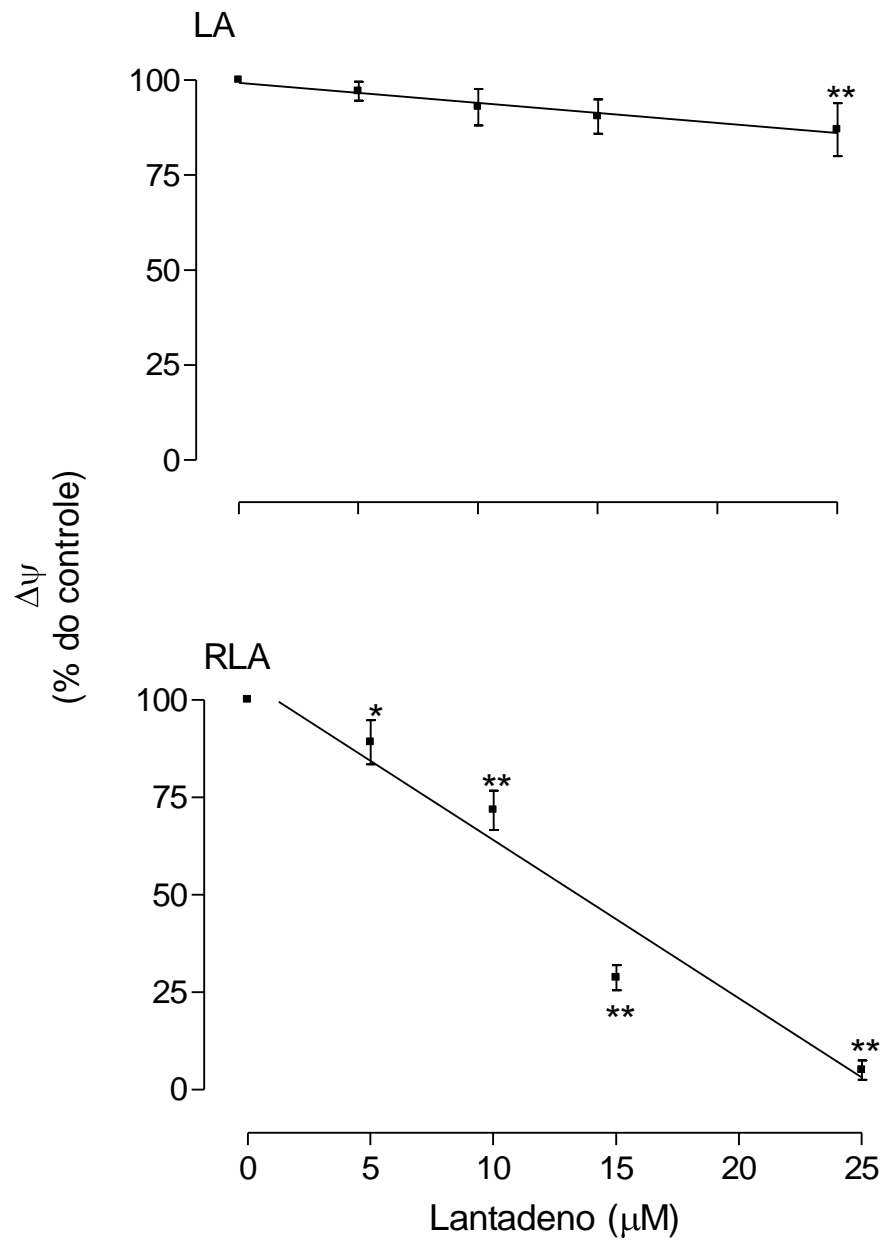


Figura 22 - Efeitos dos lantadenos no potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato. Valores representam a média \pm EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. ***Significativamente diferente do controle ($*P < 0,05$ e $**P < 0,01$, respectivamente).

4.3 Efeitos dos lantadenos nos níveis mitocondriais de ATP

Os efeitos dos lantadenos sobre a síntese de ATP pelas mitocôndrias foram avaliados em relação à oxidação de succinato nas mesmas condições do ensaio de respiração, 15 minutos depois que as mitocôndrias foram incubadas com as diferentes concentrações dos compostos (Figura 23). Em linha com os resultados obtidos para a respiração e potencial de membrana mitocondrial, LA causou uma inibição significativa na síntese mitocondrial de ATP na concentração de 25 μM , enquanto que o RLA apresentou efeito significativo neste parâmetro ao longo de toda a faixa de concentração avaliada, também de uma maneira dose-dependente.

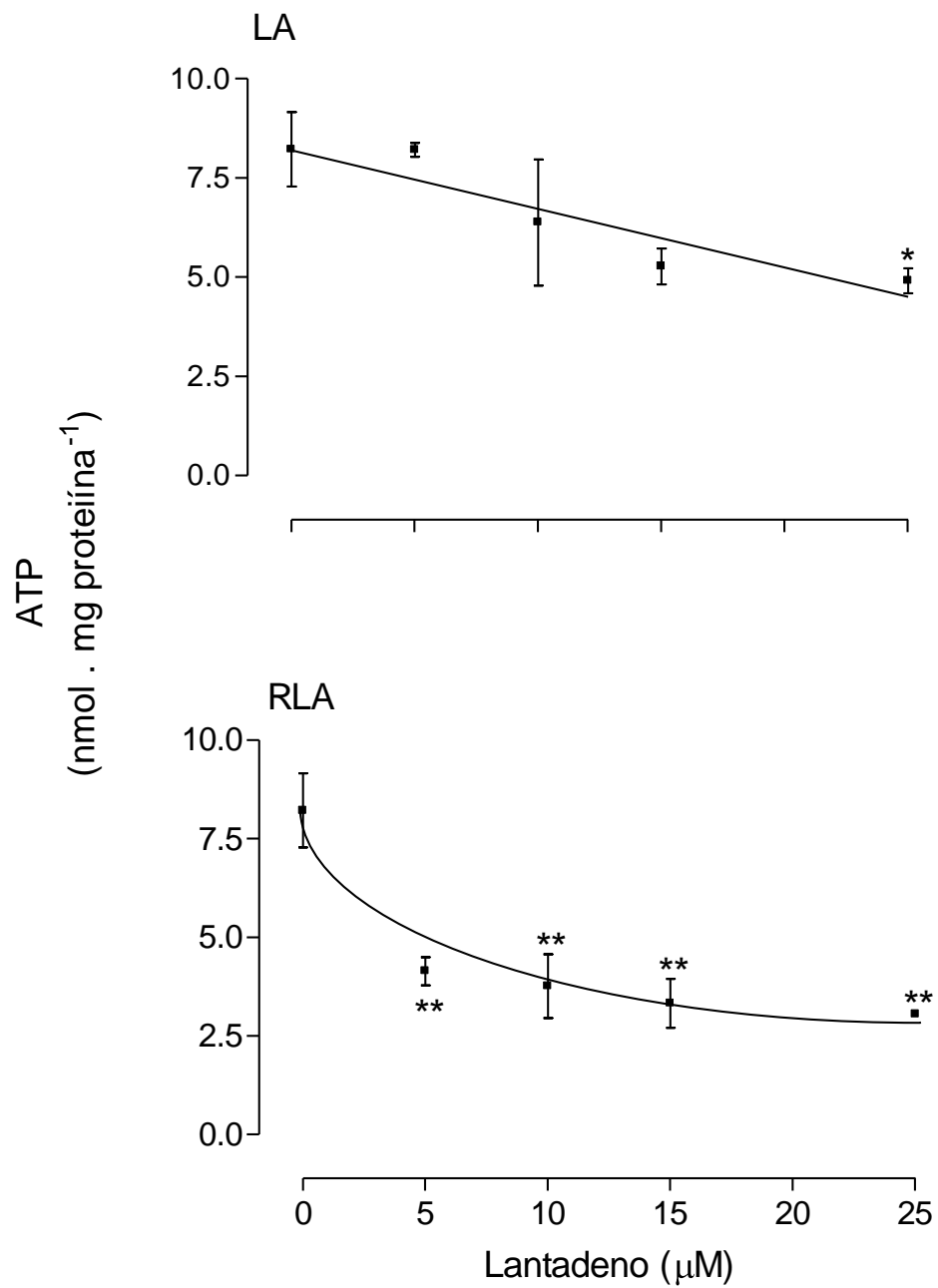


Figura 23 - Efeitos dos lantadenos nos níveis de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato. Valores representam a média \pm EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. ***Significativamente diferente do controle ($*P < 0,05$ e $**P < 0,01$, respectivamente).

4.4. Efeitos do lantadeno reduzido A (RLA) no inchamento mitocondrial em meio hiposmótico de acetato de potássio

Para avaliar as propriedades protonofóricas do RLA, nós investigamos os seus efeitos no inchamento de mitocôndrias incubadas em meio hiposmótico de acetato de potássio. A Figura 24 mostra que mesmo na concentração de 25 μM o RLA não induziu o inchamento das mitocôndrias, diferentemente do que acontece com um desacoplador protonofórico clássico como o CCCP.

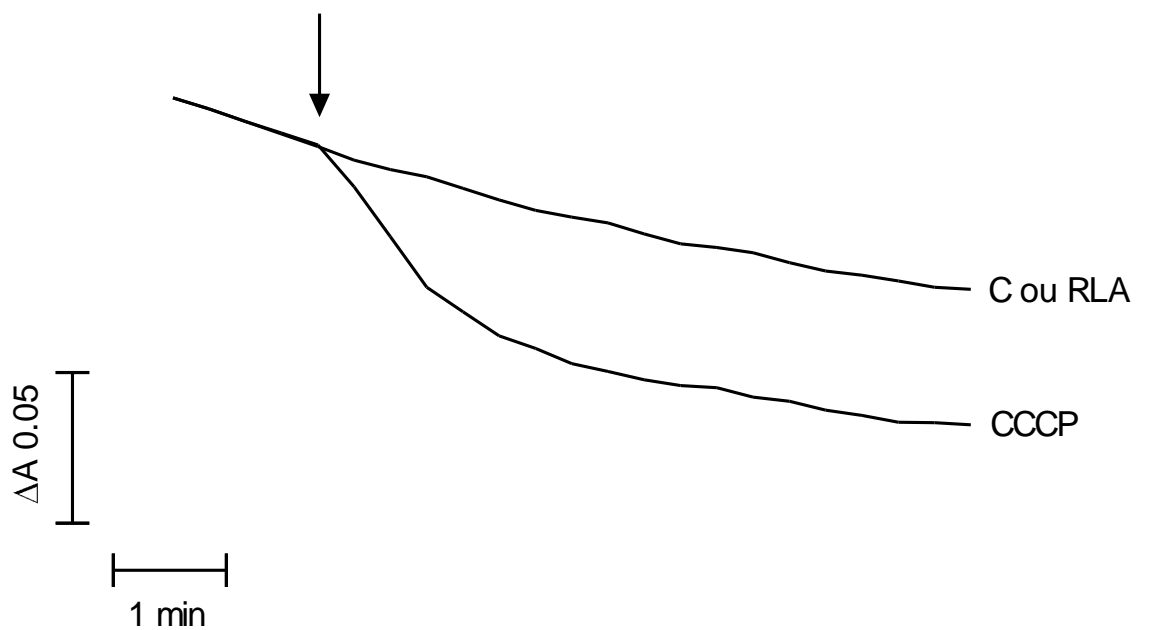


Figura 24 - Efeitos do RLA no inchamento de mitocôndrias incubadas em meio hiposmótico de acetato de potássio. A figura é representativa de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. A seta indica a adição dos compostos (C = controle, sem adição de RLA ou CCCP).

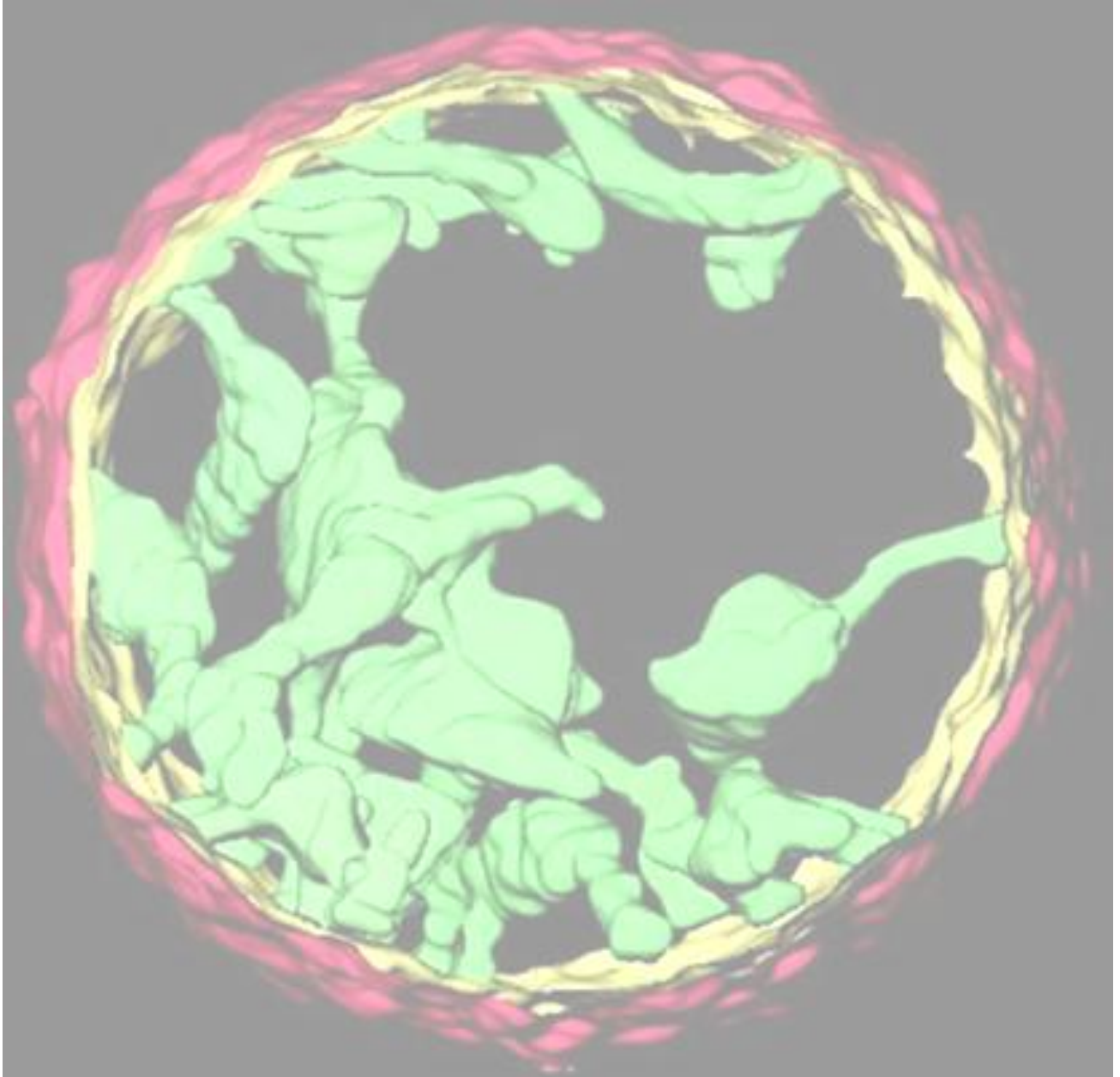
4.5. Efeitos dos lantadenos na atividade da ATPase mitocondrial

Os efeitos do LA e do RLA (25 μ M) na atividade da ATPase foi medido em mitocôndrias intactas na ausência (acopladas) ou na presença de CCCP (desacopladas) e em mitocôndrias rompidas por congelamento e descongelamento e os resultados estão apresentados na Tabela 2. A atividade da ATPase de mitocôndrias acopladas foi estimulada pela presença dos lantadenos, enquanto que a atividade da ATPase das mitocôndrias desacopladas ou rompidas não foi significativamente alterada por nenhum dos dois compostos.

Tabela 2 - Efeito dos lantadenos na atividade da ATPase em mitocôndrias intactas na ausência (acopladas) ou na presença de CCCP (desacopladas) e em mitocôndrias rompidas por congelamento e descongelamento

	Acopladas	Desacopladas	Rompidas
	μ mol/min.mg de proteína		
Controle	20,64 \pm 0,73	31,97 \pm 0,71	60,50 \pm 3,40
LA 25 μ M	29,86 \pm 0,67*	35,41 \pm 3,99	59,64 \pm 3,55
RLA 25 μ M	30,40 \pm 0,80*	35,84 \pm 1,17	61,58 \pm 1,78

LA: lantadeno A; RLA lantadeno reduzido A; *P < 0,05 relativo ao controle.



Fonte: MANELLA, 2000.

5 DISCUSSÃO

As mitocôndrias desempenham uma função crucial na manutenção dos processos celulares dependentes de ATP e são reconhecidas como alvo potencial de toxicidade induzida por xenobióticos (WALLACE; STARKOV, 2000). O papel das mitocôndrias na manutenção do metabolismo energético celular envolve a oxidação de substratos aquosos dissolvidos na matriz mitocondrial por desidrogenases específicas, as quais reduzem o NAD^+ ou FAD. O transporte de elétrons da oxidação do NADH e FADH_2 ao O_2 é estreitamente acoplado à síntese de ATP. Este ocorre por meio dos centros-redox ligados a proteínas, do complexo I (NADH desidrogenase) ou II (succinato-Q redutase) para o III (ubiquinona – citocromo c oxidorreductase) e então para o IV (citocromo oxidase). A energia livre liberada por esse transporte é conservada pelo bombeamento de prótons resultando em um gradiente eletroquímico de H^+ através da membrana mitocondrial interna. O potencial eletroquímico desse gradiente é então aproveitado para a síntese de ATP pelo complexo V (ATP sintase); esse processo é conhecido como fosforilação oxidativa. Uma grande variedade de compostos tem sido descritos como desacopladores da fosforilação oxidativa (WALLACE; STARKOV, 2000). Eles diminuem a eficiência da produção de ATP pelo aumento na permeabilidade da membrana interna ou pela diminuição do grau de acoplamento da força próton-motriz e complexos da fosforilação. O mau funcionamento da bioenergética mitocondrial instantaneamente transforma as mitocôndrias de “casa de força” celular para “forno” molecular, desperdiçando a energia metabólica dos substratos (WALLACE; STARKOV, 2000).

A disfunção mitocondrial é um mecanismo patogênico fundamental de várias toxicidades significantes em mamíferos, especialmente aquelas associadas ao fígado (AMACHER, 2005; SZEWCZYK; WOJTCZAK, 2002) e ainda, a diminuição dos níveis de ATP é crítica para o desenvolvimento de morte celular por necrose (NICOTERA et al., 1998; SZEWCZYK; WOJTCZAK, 2002; WALLACE; STARKOV, 2000). Assim sendo, com o objetivo de investigar o potencial envolvimento das mitocôndrias na hepatotoxicidade observada no

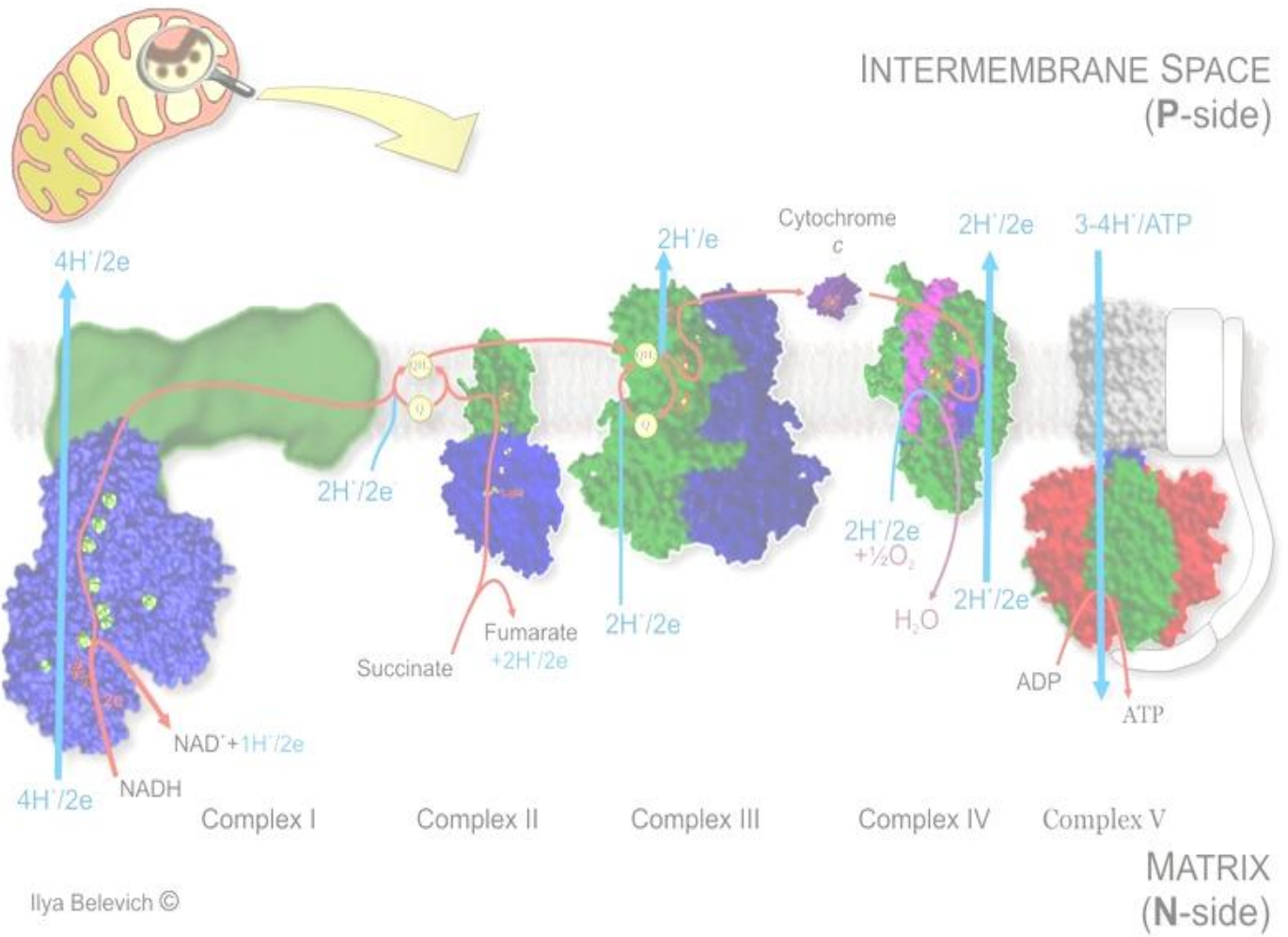
envenenamento por lantana, nós comparamos os efeitos do lantadeno A (LA) e o lantadeno reduzido A (RLA) na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. De acordo com nossos resultados o LA, o qual se acredita ser o responsável pelos efeitos tóxicos da lantana (SHARMA et al., 1991; SHARMA et al., 2007b), demonstrou um significativo efeito inibidor no estado 3 da respiração, mas somente na maior concentração testada (25 μM). Por outro lado, o RLA, o qual é um produto da biotransformação do LA (SHARMA et al., 2000), provocou um estímulo dose-dependente da respiração de estado 4 e inibiu a respiração de estado 3. Ainda, RLA dissipou o potencial da membrana mitocondrial e diminuiu os níveis de ATP em todas as concentrações testadas (5 ao 25 μM). O estímulo da respiração de estado 4 pelo RLA ocorreu mesmo na presença de oligomicina, um antibiótico inibidor da ATP sintase, indicando que o RLA age como um autêntico desacoplador, porém, o mesmo não foi capaz de induzir o inchamento das mitocôndrias em meio hiposmótico de acetato de potássio o que sugere que ele não é um desacoplador protonoforético, ou seja, seu mecanismo de desacoplamento não é o mesmo dos desacopladores clássicos como o 2,4 dinitrofenol e o CCCP. Fazendo-se uma comparação entre as estruturas químicas do LA e do RLA (Figura 4), podemos sugerir que a hidroxilação do carbono 3 é uma característica estrutural determinante para a atividade desacopladora apresentada pelo RLA.

A sobreposição dos efeitos do RLA sobre os parâmetros respiratórios, desacoplamento e inibição da fosforilação oxidativa, sugere que ele age como um desacoplador inibitório (MORELAND, 2001). Por outro lado, a inibição da respiração de estado 3 por ambos os compostos usando substratos associados tanto ao complexo I (glutamato mais malato) como ao complexo II (succinato) associada com a incapacidade dos mesmos de inibir a respiração desacoplada pelo CCCP sugere que esses compostos sejam inibidores da ATP sintase. Para testar essa hipótese nós realizamos experimentos para avaliar o efeito dos compostos na atividade da ATPase usando mitocôndrias intactas (acopladas e desacopladas) e mitocôndrias rompidas por congelamento de descongelamento na presença de excesso de ATP, uma condição na qual a enzima atua na direção inversa, hidrolisando ATP (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003). A estimulação da atividade da ATPase em mitocôndrias intactas

acopladas e a ausência de efeito na atividade da ATPase de mitocôndrias desacopladas ou rompidas indica que o RLA inibe o metabolismo energético provavelmente devido à sua propriedade desacopladora e sugere que o efeito do LA pode estar relacionado a um efeito em outros componentes da membrana mitocondrial que não a ATP sintase.

Em consonância com nossos resultados relativos aos efeitos do RLA, foi descrito na literatura que quando administrado a ratos Wistar, o composto causa intoxicação hepática caracterizada por icterícia, anorexia, constipação, poliúria, polidipsia e acúmulo de bilirrubina conjugada no soro. A lesão hepática é consistente o quadro causado pela colestase intra-hepática e é caracterizada pelo inchamento dos hepatócitos, necrose de células individuais e hiperplasia dos ductos biliares (PASS et al., 1979). Foi demonstrado também que o RLA provoca hepatotoxicidade por meio de um metabólito tóxico e lesão ao canalículo biliar, a qual é uma lesão inicial no desenvolvimento de colestase, ocorrendo provavelmente devido ao decréscimo na atividade da Mg^{2+} -ATPase que pode ser causada pela diminuição do ATP celular (PASS et al., 1981).

A conservação da energia acoplada à respiração na forma de ATP é a mais importante função mitocondrial (SKULACHEV, 1999) e a dissipação do potencial de membrana e diminuição do conteúdo de ATP podem resultar em efeitos tóxicos (WU et al., 1990). Além do mais, a síntese é dependente da integridade de membrana e sua diminuição pode estar envolvida com efeitos tóxicos, que induzem a um desbalanço funcional. No geral, nosso estudo mostra que os lantadenos aqui testados são potenciais perturbadores da bioenergética mitocondrial, por meio de diferentes mecanismos e potências, sendo o RLA mais potente que o LA. Ele mostra, em particular, que o lantadeno reduzido A inibe os níveis mitocondriais de ATP por meio do desacoplamento da fosforilação oxidativa, o qual, por sua vez, dissipa o potencial de membrana mitocondrial. Esses efeitos aqui descritos podem constituir um mecanismo molecular em potencial que pode contribuir para a toxicidade da lantana para as células hepáticas.



Ilya Belevich ©

Fonte: http://www.biocenter.helsinki.fi/biophysimagesR..._.jpg

6 CONCLUSÃO

No presente estudo nós comparamos os efeitos de dois lantadenos isolados das folhas da planta *Lantana camara* para avaliar o envolvimento potencial da mitocôndria na hepatotoxicidade da planta:

- LA afetou a função mitocondrial inibindo significativamente a respiração de estado 3, dissipou o potencial de membrana e diminuiu os níveis de ATP na concentração de 25 μM , atuando sobre algum componente da membrana mitocondrial ainda não determinado.
- RLA causou um estímulo dose-dependente da respiração de estado 4 e inibição da respiração de estado 3, dissipou o potencial de membrana e diminuiu os níveis mitocondriais de ATP em toda faixa de concentração testada (5 a 25 μM), atuando como desacoplador da fosforilação oxidativa por um mecanismo diferente daquele observado para os desacopladores clássicos como o CCCP.

Portanto, conclui-se que ambos os compostos têm potencial, embora com diferentes habilidades e potência, para interferir na bioenergética mitocondrial e assim contribuir para a já bem documentada hepatotoxicidade da lantana aos animais.



Fonte: <http://www.westpecuaria.comgadoS.jpg>
http://personales.ya.combotanicalLantana_camara.jpg
http3://bp.blogspot.com_6y2n8sMlvCASpw8u8lntIAAAAAAAAAAB1hzCiPiEt0Us3....jpg
<http://www.midiamax.comarquivos31089341756.jpg>
<http://www.portalms.com.bradmimagens%7BAFDF9967-7BA1-44B2-B742-05A82663....jpg>

7 REFERÊNCIAS

AGROSOFT. **Projeto estuda impactos ambientais, sociais e econômicos da bovinocultura de corte.** Publicação: 19/07/2007. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/25142.htm>>. Acesso em: 30 out. 2009.

ANUALPEC 2009: anuário da pecuária brasileira /Instituto FNP - São Paulo: FNP, 2009. 360 p. il.

AMACHER, D.E. Drug-associated mitochondrial toxicity and its detection. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n. 16, p. 1829-1839, 2005.

BARBOSA, R. R. et al. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo **Acta Vet. Bras.**, v. 1, n. 1, p.1-7, 2007.

BARRE, J.T. et al. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 321-324, 1997.

BASTIANETTO, E. et al. Intoxicação de bezerros búfalos por *Lantana* spp. em Minas Gerais: relato de casos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 29, n. 2, p. 57-59, 2005.

BASTOS, J.E.D.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, J.B.F. Apontamentos de toxicologia: identificação e diagnóstico. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, n. 9, p. 38-40, 1994.

BEGUN, S. et al. Triterpenoids from the aerial parts of *Lantana camara*. **J. Nat. Prod.**, v. 58 n. 10, p. 1570-1574, 1995.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. Fosforilação oxidativa. BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. In: **Bioquímica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 509-540.

BOYER, P.D.; CROSS, R.L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 70, n. 10, p. 2837-2839, 1973.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal (Org.) In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**, Barueri: Manole, 2003. Cap 9, p. 230-233.

BRAGA, F.G. et al., Avaliação leishmanicida de extratos utilizados na medicina popular brasileira in: XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica – UFJF Diretório Acadêmico de Ciências Biológicas - Walter Machado Couto, 2006, Rio de Janeiro. **Resumos...** Minas Gerais, MG: Universidade Federal Juiz de Fora, 2006. p. 209-212.

BRITO, M.F. Sensibilidade do coelho à intoxicação por *Lantana camara* var. *aculeata* (Verbenaceae) em estado seco e dessecado. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 15, n. 4, p.107-110, 1995.

BRITO, M.F.; TOKARNIA, C.H. Estudo comparativo da toxidez de *Lantana camara* var. *aculeata* em bovinos e ovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 15, n. 2/3, p. 79-84, 1995.

BRITO, M.F.; TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. A toxidez de diversas lantanas para bovinos e ovinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 3, p. 153-159, 2004.

CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B., (Ed). **Biochemical toxicology**. Oxford: IRL Press, 1987. p. 217-254.

CALGARO-HELENA, A.F. Estudo estrutura-atividade das ações pró-oxidante e antioxidante de isocumarinas sobre as mitocôndrias. 2008. 101f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CAMARGO, M.T.L.A. **Plantas medicinais e de rituais afro-brasileiros II: estudo etnofarmacobotânico.** São Paulo: Ícone, 1998. 232p.

CAPARROZ-ASSEF, S. M. E. A. The uncoupling effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide in liver mitochondria from adjuvant-induced arthritic rats. **Cell Biochem. Funct.**, v. 19, n. 2, p. 117-124. 2001.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol. Relat. Sunj. Biochem.**, v. 17, p. 65-134, 1956.

DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 822, n. 1, p. 1-42, 1985.

DORTA D.J. et al. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. **Chem. Biol. Interact.**, v.152, p. 67-78, 2005.

DORTA, D.J. Efeito citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides: estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose. 2007. 134f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

ESPOTI, M.D. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1364, n. 2, p. 222-235, 1998.

FREITAS, E.M.S. Ação tóxica da veratrina em mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático. 2006. 173f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

FREY, T.G.; MANELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, n. 7, p. 319-324, 2000.

GHISALBERTI, E.L. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). **Fitoterapia**, v. 71, p. 467-486, 2000.

GÓMEZ-LECHÓN, M.J. et al. The use of cultured hepatocytes to investigate the metabolism of drugs and mechanisms of drug hepatotoxicity. **Altern. Lab. Anim.**, v. 29, n. 3, p. 225-231, 2001.

GUILLOUZO, A. Liver cell models in vitro toxicology. **Environ. Health Perspect.**, v. 106, supl. 2, p. 511-532, 1998.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014p.

JAMES, L.F. Solving poisonous plant problems by a team approach, In: COLEGATE, S.M.; DORLING, P.R. (Ed.) **Plant associated toxins**. Wallingford: CAB International, 1994. p.1-6.

KADENBACH, B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1604, n. 2, p. 77-94, 2003.

KASS, G. E. Mitochondrial involvement in drug-induced hepatic injury. **Chem. Biol. Interact.**, v. 163, n. 1/2, p. 145-159. 2006.

KAUR, J. et al. Chemopreventive activity of lantadenes on two-stage carcinogenesis model in Swiss albino mice: AP-1 (c-jun), NF κ B (p65) and P53

expression by ELISA and immunohistochemical localization. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 314, n. 1/2, p.1-8, 2008.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Ed. BASF, 1995. p. 726.

LÁU, H.D. **Efeitos tóxicos de *Lantana camara* e de *Pithomyces chartarum* em búfalos**. Belém: EMBRAPA – CPATU, 1990, p.18.

LESNEFSKY, E.J. et al. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging and heart failure. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 33, n. 6, p. 1065-1089, 2001.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. Nova Odessa: Franciscana, 1982, 425 p.

LUCIANI, S. Effects of tannic acid and 2-thnoyltrifluoroacetone on succinate oxidation and penetration across the mitochondrial membrane. **FEBS Lett.**, v. 12, n. 4, p. 213-216, 1971.

LÜMMEN, P. Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1364, n. 2, p. 287-296, 1998.

MANELLA, C. A. Introduction: our changing views of mitochondria **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 32, n. 1, p.1-4, 2000.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Cadeia de transporte de elétrons e fosforilção oxidativa. In: **Bioquímica básica** 2.ed., São Paulo: Ed. Guanabara-Koogan, 1999. cap.11, p.136-158.

MELLO, F.B. et al. Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on rat fertility. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 45, n. 1, p. 20 – 23, 2003.

MELO, M.M. Plantas que causam lesão hepática **Cad. Téc. Vet. Zootec.** v. 49, p. 13-35, 2006.

MELO, M.M. Plantas tóxicas para bovinos. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, n. 24, p. 5-52, 1998.

MINGATTO, F.E. et al. In vitro interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 334, n. 2, p. 303-308, 1996.

MINGATTO, F.E. et al. Effects of nimesulide and its reduced metabolite on mitochondria. **Br. J. Pharmacol.**, v. 131, n. 6, p. 1154-1160, 2000.

MINGATTO, F.E. et al. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. **Toxicol.**, v. 50, n. 5, p. 724-730, 2007.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144-148, 1961.

MOLYNEUX, R.J. et al. Polyhydroxy alkaloids glycosidase inhibitors from poisonous plants of global distribution: analysis and identification, In: COLEGATE S.M.; DORLING P.R. (Ed.) **Plant associated toxins**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 107-112.

MORELAND, D.E. Effects of toxicants on electron transport and oxidative phosphorylation. In: HODGSON, E.; SMART, R.C. (Eds.) **Introduction to biochemical toxicology**. 3 ed. New York: John Wiley and Sons, 2001. p. 309-323,

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 2002. 975 p.

NICHOLLS, D.G. **Bioenergetics**. An introduction to the chemiosmotic theory. London: Academic Press, 1982. p. 25-96.

NICOTERA, P.; LEIST, M.; FERRANDO-MAY, E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **Toxicol. Lett.**, v. 102-103, p. 139-142, 1998.

OSWEILER, G.D. **Toxicologia veterinária**. Porto Alegre: Ates Médicas, 1998. p. 526.

PASS, M.A. et al. Toxicity of reduced lantadene A (22 β -angeloyloxyoleanolic acid) in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 51, n. 3, p. 515-521, 1979.

PASS, M.A.; PUGH, M.W.; FINDLAY, L. Studies on the mechanism of toxicity of reduced lantadene A in rats. **Biochem. Pharmacol.** v. 30, n. 12, p. 1433-1437, 1981.

PEDERSEN, P.L. et al. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Methods Cell. Biol.**, v. 20, p. 411-481, 1978.

PEDERSEN, P. L. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: A brief overview. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 31, p. 291-304, 1999.

PEREIRA, C.A. **Plantas tóxicas e intoxicações na veterinária**. Goiânia: UFG, 1992. p. 279.

PEREIRA, A.M. Toxicidade de *Lantana camara* (Verbenaceae) em operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). 2005. 58f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2005.

PESSAYRE, D. et al. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 15, n. 6, p. 367-373, 1999.

RIET-CORREA, F. et al. **Poisoning by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian livestock.** Campina Grande, PB: Editora da Universidade Federal de Campina Grande, 2009. 246p.

RIET-CORREA, F.; MENDEZ, M.C.; SCHILD, A. L. **Intoxicações por plantas e micotóxicos em animais domésticos.** Montevideo: Hemisfério Sur do Brasil, 1993. 340 p.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.

ROSS, I.A. **Medicinal plants of the world:** chemical constituents, traditional and modern medical uses. Totowa: Humana Press, 1999. 415p.

ROUILLER, C.H. Experimental toxic injury of the liver. In: ROUILLER, C.H. (Ed.) **The liver.** New York: Academic Press, 1964. v. 2. p. 335-476.

SANTOS, A.B. et al. Dehydromonocrotaline induces cyclosporine A-insensitive mitochondrial permeability transition/cytochrome c release. **Toxicon**, v. 54, p. 16-22, 2009.

SANTOS, A.C. et al. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria, **Free Radical Biol. Med.**, v.24, p.1455-146, 1998.

SANTOS, J.C.A. et al. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, n. 1, p. 1-14, 2008.

SCHEFFLER, I.E. **Mitochondria**. 2. ed. Hoboken: John Wiley and Sons Inc., 2008. 462 p.

SCHOENTAL, R. Liver disease and "natural" hepatotoxins. **Bull. World Health Organ.**, v. 29, p. 823-833, 1963.

SHARMA, M. et al. Synthesis, citotoxicity, and antitumor activity of lantadene-A congeners. **Chem. Biodivers.**, v. 4, n. 5, p. 932-939, 2007a.

SHARMA, M.; SHARMA, P.D.; BANSAL, M.P. Lantadenes and their esters as potential antitumor agents. **J. Nat. Prod.**, v. 71, n. 7, p. 1222-1227, 2008.

SHARMA, O.P. et al. A review of the hepatotoxic plant *Lantana camara*. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 37, n. 4, p. 313-352, 2007b.

SHARMA, O.P. et al. A review of the toxicity of *Lantana camara* (Linn) in animals. **Clin. Toxicol.**, v. 18, n. 9, p. 1077-1094, 1981.

SHARMA, O.P. et al. Biological action of lantadene C, a new hepatotoxicant from *Lantana camara* var. *aculeata*. **J. Biochem. Toxicol.**, v. 7, n. 2, p. 73-79, 1992.

SHARMA, O.P. et al. Lantadene A content and toxicity of the lantana plant (*Lantana camara*, Linn.) to guinea pigs. **Toxicon**, v. 18, n. 4, p. 485-488, 1980.

SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K.; PATTABHI, V. Molecular structure, polymorphism and toxicity of lantadene A, the pentacyclic triterpenoid from the hepatotoxic plant *Lantana camara*. **J. Biochem. Toxicol.**, v. 6, n. 1, p. 57-63, 1991.

SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K.; MAKKAR, H.P. Isolation and partial purification of lantana (*Lantana camara* L.) toxins. **Toxicol. Lett.**, v. 37, n. 2, p. 165-172, 1987.

SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K.; MAKKAR, H.P. Toxicity of isolated Lantana (*Lantana camara* L) constituents to male and female guinea pigs. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 31, n. 1, p. 10-3, 1989.

SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K.; RAMESH, D. A triterpenoid acid, lantadene D from *Lantana camara* var. *Aculeata*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3961-3962, 1990.

SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K. Thin-layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. **J. Chromatogr.**, v. 587, p. 351-354, 1991.

SHARMA, S. et al. Disposition of lantadene A, the pentacyclic triterpenoid hepatotoxin, orally administered to guinea pigs. **Toxicol. Lett.**, v. 105, n.1, p. 59-66, 1999.

SHARMA, S. et al. Biotransformation of lantadenes, the pentacyclic triterpenoid hepatotoxins of lantana plant, in guinea pig. **Toxicol.**, v. 38, n. 9, p. 1191-1202, 2000.

SKULACHEV, V.P. Mitochondrial physiology and pathology: concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. **Mol. Aspects Med.**, v. 20, n. 3, p. 139-184, 1999.

SPOERKE, D. G.; SMOLINSKE, S. C. **Toxicity of houseplants**. CRC Press, Inc., Boca Raton, 335 pp. 1990.

SOPER, J.W.; PEDERSEN, P.L. Adenosine triphosphatase of rat liver mitochondria: detergent solubilization of an oligomycin-and dicyclohexylcarbodiimide-sensitive form of the enzyme. **Biochemistry**, v. 15, n. 12, p. 2682-2690, 1976.

SZEWCZYK, A.; WOJTCZAK, L. Mitochondria as a pharmacological target. **Pharmacol. Rev.**, v. 54, n. 1, p. 101-127, 2002.

TOKARNIA, C.H. et al. Intoxicação por *Lantana* spp. (Verbenaceae) em bovinos nos Estados de Mato Grosso e Rio de Janeiro. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 4, n. 4, p. 129-141, 1984.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 310 p., 2000.

TOLMAN, K.G.; SIRRINE, R.W. Occupational hepatotoxicity. **Clin. Liver Dis.**, v. 2, n. 3, p. 563-589, 1998.

VAN GURP, M. et al. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 304, n. 3, p. 487-497, 2003.

VERCESI, A. E. Mitocôndria ATP, calor e morte celular. **CIÊNCIA HOJE**. v. 34, n. 199 novembro, p. 16-23, 2003.

WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p. 353-388, 2000.

WOLFSON, S. L.; SOLOMONS, T. W. Poisoning by fruit of *Lantana camara*. **Am. J. Dis. Child.**, v.107, p. 109-112, 1964.

WU, E.Y. et al. Relationships between the mitochondrial transmembrane potential, ATP concentration, and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 282, n. 2, p. 358-362, 1990.

ZENIMORI, S.; PASIN, L.A.A.P. Aspectos da biologia floral de *Lantana* (*Lantana camara* L.). **Rev. UNIVAP**, v.13, n. 24, p. 8, 2006. (Resumo).

ZIMMERMAN, H.J. Drug-induced liver disease. In: SCHIFF, ER; SORREL, MF; MADDREY, W.C. (Ed.) **Diseases of the liver**. 8ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1998, p. 973-1964.



Fonte: http://bp.blogspot.com_wya_Y27oLsASkFA-5QVbZIAAAAAAAAZnQkHQsOnnzvpwS1600-Rgarrafas-4-1

8 ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Experimental de Dracena



Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Certificado

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos de lantadenos em mitocôndrias isoladas de fígado de rato", protocolo nº 011/2008, sob a responsabilidade da acadêmica Andréa Fontes Garcia, sob supervisão da Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto (Orientador), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Zootecnia da UNESP de Dracena.

(We certify that the Project "Effects of lantadenes in rat liver isolated mitochondria", protocol number 011/2008, under the responsibility of the Master degree student Andréa Fontes Garcia, under supervision of Dr Fábio Erminio Mingatto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethics in Animal Research Committee of the Faculty of Zootecny of Unesp Dracena).

Dracena, 17 de dezembro de 2008.

Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)
Unesp Dracena

Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto
Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)
Unesp Dracena

Anexo B

Chapter 117

Effects of Lantadenes on Mitochondrial Bioenergetics

A.F. Garcia^{1,2}, H.C.D. Medeiros², G.A.M. Pasquali², M.A. Maioli², B.A. Rocha³, F.B. da Costa³, C. Curti⁴, M. Groppo⁵, and F.E. Mingatto²

¹ Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, Araçatuba, SP, Brazil; ² Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Experimental de Dracena, Dracena, SP, Brazil; ³ Departamento de Ciências Farmacêuticas; ⁴ Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ⁵ Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Introduction

Lantana (*Lantana camara* Linn.) is one of the most poisonous weeds in the world. The noxious properties of the plant are well documented: it causes cholestasis, hepatotoxicity, photosensitization, and even fatality in cattle, horses, sheep, dogs, and humans (Wolfson and Solomons, 1964; Tokarnia et al., 1984; Black and Carter, 1985; Fourie et al., 1987; Sharma et al., 1988; Pass, 1991; Brito et al., 2004). The most well-known lantana compounds are the lantadenes, which belong to the pentacyclic triterpenoid oleanane series. The most abundant triterpene acid is lantadene A (LA); it has been implicated as the main culprit responsible for the toxic effects of the plant (Sharma et al., 1991; Sharma et al., 2000; Sharma et al., 2007b) but the mechanism by which it induces toxicity has not yet been clearly established.

Mitochondria carry out a variety of biochemical processes, but their main function is to produce a majority (> 90%) of cellular ATP. Mitochondrial dysfunctions can be the main mechanism of induction of hepatic diseases by drugs and/or toxic compounds. These can be divided in two groups: 1) those that affect the function mitochondrial and 2) those that possess as primary objectives other cellular functions and they interact with the mitochondria secondarily. The recognition of the interaction of compounds with the mitochondria as a primary or secondary target can help in the understanding of the responsible mechanisms for the adverse effects and to the development of new drugs that eliminate or they minimize these reactions (Szewczyk and Wojtczak 2002).

Since no antidote against the toxic effects of lantana is so far available and treatment of the symptoms has presented limited success (Sharma *et al.* 2007b), the knowledge of the biochemical mechanism of lantana intoxication at the cellular and molecular levels can help in developing of antidotes and more rational therapy in lantana poisoning. Therefore, in the present work we addressed the action of LA isolated from *Lantana camara* and its reduced derivative lantadene A (RLA) (Figure 1) on mitochondrial bioenergetics assessing their effects on respiration, membrane potential and ATP levels in isolated rat liver mitochondria.

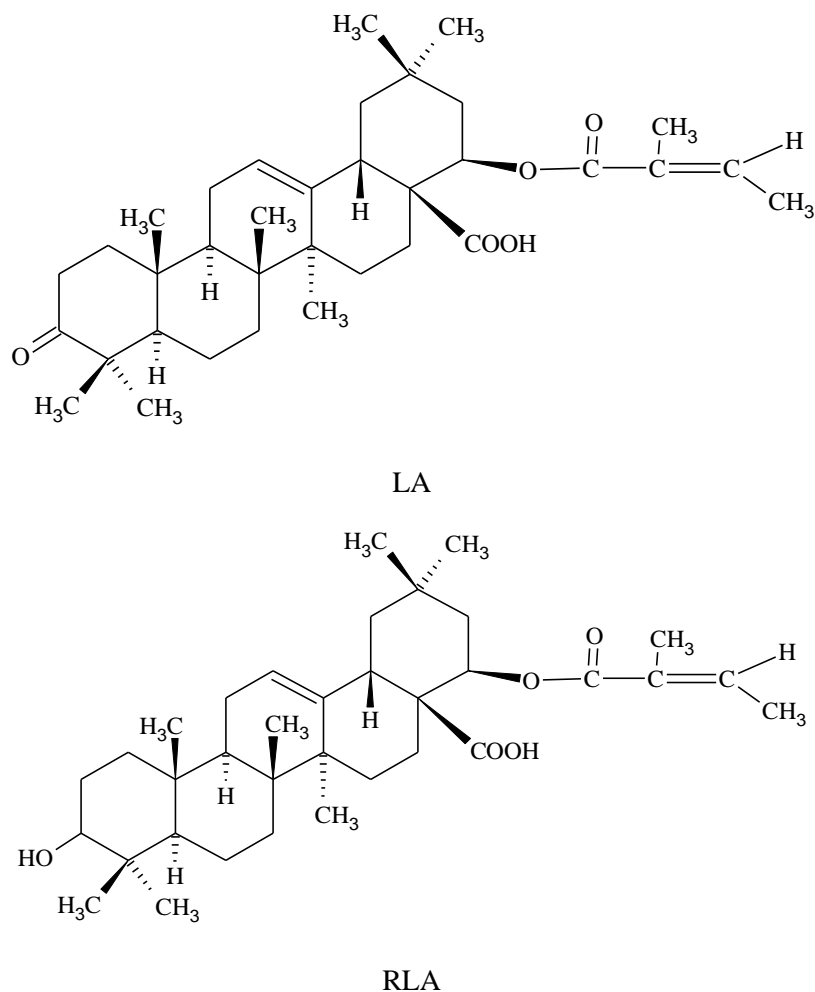


Figure 1: Chemical structures of lantadenes used in this study.

Effects of lantadenes on respiration, membrane potential and ATP levels of isolated mitochondria

The action of LA and its reduced derivative lantadene A (RLA) on mitochondrial bioenergetics was investigated addressing their effects on respiration, membrane potential ($\Delta\psi$) and ATP levels in succinate-energized isolated rat liver mitochondria. At the concentration range tested (5-25 μM) RLA stimulated state 4 and inhibited state 3 respiration, circumvented oligomycin-inhibited state 3 respiration, dissipated membrane potential and depleted ATP in a dose-dependent manner. LA did not stimulate state 4 respiration, but inhibited state 3 respiration, dissipated $\Delta\psi$ and caused significant decrease in the mitochondrial ATP levels, although these effects had been observed only at 25 μM .

Conclusions

The present study shows that lantadenes, in general, are potential perturbators of mitochondrial bioenergetics. It shows, in addition, that the reduced derivative lantadene A depresses ATP levels via both uncoupling and respiration inhibition, which, in turn, dissipates the mitochondrial membrane potential. This action of RLA may account for the well documented hepatotoxicity of lantana to humans and animals.

References

- Black H and Carter RG (1985). Lantana poisoning of cattle and sheep in New Zealand, *New Zealand Veterinary Journal* 33:136-137.
- Brito MF, Tokarnia CH, Döbereiner J (2004) A toxidez de diversas lantanas para bovinos e ovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 24(3):153-159.
- Fourie N, Van der Lugt JJ, Newsholme SJ, and Nel PW (1987). Acute *Lantana camara* toxicity in cattle. *Journal South Africa Veterinary Association* 58:173-178.
- Pass MA (1991). Poisoning of livestock by lantana plants. In *Handbook of Natural Toxins*. Vol. 6. Toxicology of Plant and Fungal Compounds. (Keeler R, Anthony T eds) p. 297-311. Marcel Dekker, New York
- Sharma OP and Dawra RK (1991). Thin-layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. *Journal of Chromatography* 587: 351-354.
- Sharma OP, Makkar HPS, and Dawra RK (1988). A review of the noxious plant *Lantana camara*. *Toxicon* 26: 975-987.
- Sharma OP, Sharma S, Patabhi V, Mahato SB, and Sharma PD (2007b). A review of the hepatotoxic plant *Lantana camara*. *Critical Review Toxicology* 37: 313-352.
- Sharma S, Sharma OP, and Singh B, Bhat TK (2000). Biotransformation of lantadenes, the pentacyclic triterpenoid hepatotoxins of lantana plant, in guinea pig. *Toxicon* 38:1191-1202.
- Szewczyk A and Wojtczak L (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacology Review* 54:101-127.
- Tokarnia CH, Döbereiner J, Lazzari AA, and Peixoto PV (1984). Intoxicação por *Lantana spp.* (Verbenaceae) em bovinos nos Estados de Mato Grosso e Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 4(4):129-141.
- Wolfson SL and Solomons TWG (1964). Poisoning by fruit of *Lantana camara*. An acute syndrome observed in children following ingestion of the green fruit. *American Journal Disease Children* 107:173-176.