

MARCIO CHIMELLI

Estudo Bioquímico dos Efeitos do Mexitil em Mitocôndria

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná visando a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1985

Tese orientada pelo professor

Dr. ANNIBAL DE PAIVA CAMPELLO

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor ANNIBAL DE PAIVA CAMPELLO, pela orientação, denodo, estímulo e amizade irrestrita.
- À Professora MARIA LÚCIA WAMBIER KLÜPPEL, pelo auxílio, amizade e clara orientação científica.
- Ao Professor LUIZ CARLOS VIEIRA LOPES, pelas valiosas críticas e sugestões.
- À Coordenação do Curso de Pós-graduação e Professores do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela seriedade e dedicação.
- Aos colegas do Curso de Pós-graduação, pelo companheirismo e amizade.
- Aos funcionários do departamento de Bioquímica da UFPr.
- Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	- Adenosina 5' difosfato
ATP	- Adenosina 5' trifosfato
CoQ	- Coenzima Q ou ubiquinona (forma oxidada)
CoQH ₂	- Coenzima Q ou ubiquinona (forma reduzida)
ΔA	- Diferença de absorção
D.O.	- Densidade óptica
EDTA	- Ácido etileno diamino tetracético
FAD	- Flavina adenina dinucleotídeo
FCCP	- Carbonilcianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona
HEPES	- N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfonado
NAD ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma oxidada
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma reduzida
PEP	- fosfoenolpiruvato
RC	- Coeficiente de controle respiratório
TCA	- Ácido tricloroacético
TMPD	- N,N,N',N', tetrametil-p-fenilenodiamino
Tris	- Tri (hidroximetil)-aminometano

RESUMO

O Mexitil (Mexiletine hidrocloreídrico) ou 1-metil-2-(2,6-xililoxi)-etil-amina hidrocloreídrico, é uma amina aromática usada em medicina por suas propriedades antiarrítmicas, além de ser um poderoso anestésico local.

No presente estudo, verificou-se o efeito do Mexitil sobre alguns aspectos do metabolismo de mitocôndrias isoladas de coração de rato. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Inibição, nos estudos polarográficos, do estado III da respiração mitocondrial para substratos NAD^+ dependentes - glutamato (70%) e α -cetoglutarato (55%) -, sem alterar significativamente a relação ADP:O e a velocidade respiratória do estado IV. Para o único substrato FAD dependente ensaiado - o succinato -, as alterações verificadas nestes parâmetros foram insignificantes.

Nos ensaios das atividades enzimáticas, o Mexitil inibiu fortemente as atividades da NADH-oxidase (90%) e da NADH citocromo c-redutase (85%), teve pouca atuação sobre o segmento da succinato-oxidase (10% de inibição) e nenhuma sobre a citocromo c-oxidase. Sobre a NADH-desidrogenase, a droga provocou um estímulo de aproximadamente 80%.

A atividade ATPásica de mitocôndrias intactas sofreu uma pequena inibição (10%) por ação do Mexitil, enquanto que para mitocôndrias rompidas, a queda da atividade ATPásica foi mais acentuada (70%).

Verificou-se ainda um colapso do potencial de membrana (15%) em mitocôndrias energizadas com glutamato, α -cetooglutarato, succinato, TMPD + ascorbato e ATP, além de um estímulo do efluxo de prótons. O Mexitil também aumentou o grau de "swelling" mitocondrial passivo para sais de Na^+ e K^+ .

Os dados obtidos são compatíveis com as seguintes conclusões:

- O antiarrítmico inibe a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial.

- A droga altera a permeabilidade da membrana mitocondrial interna a cátions como o sódio e o potássio.

- Estes dois efeitos são, provavelmente, consequências de uma ação primária do Mexitil sobre a membrana mitocondrial interna, a qual seria esperada, tendo em vista as características anfipáticas da droga.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	01
1.1	Mexitil	02
1.1.1	Uso clínico	03
1.1.2	Eletrofisiologia	03
1.1.3	Farmacocinética	04
1.1.4	Dosagem e administração	05
1.1.5	Efeitos colaterais	05
	Resumo do perfil farmacológico do Mexitil ..	07
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	08
2.1.1	Isolamento de mitocôndrias de coração de <u>ra</u> to, para a determinação do consumo de O ₂ , da atividade ATPásica em mitocôndrias intactas e do efluxo de prótons	08
2.1.2	Isolamento de mitocôndrias de coração de <u>ra</u> to, para a determinação do potencial de mem brana	09
2.1.3	Isolamento de mitocôndrias de coração de <u>ra</u> to, para a determinação do "swelling" ativo e passivo	09
2.1.4	Obtenção de mitocôndrias de coração de <u>ra</u> to rompidas, para a determinação das atividades enzimáticas da NADH-oxidase, NADH citocromo c-redutase, NADH-desidrogenase, succinato -o xidase e citocromo c-oxidase	09
2.2	MÉTODOS ANALÍTICOS	10
2.2.1	Determinação do consumo de O ₂ pelo método po larográfico. Cálculo do RC e ADP:O	10
2.2.2	Determinação da atividade ATPásica em mito côndrias intactas	11
2.2.3	Determinação da atividade ATPásica em mito côndrias rompidas	12
	Determinação das atividades enzimáticas liga	

	das à cadeia respiratória em mitocôndrias rompidas por congelamento	13
2.2.4	NADH-oxidase	13
2.2.5	NADH citocromo c-redutase	14
2.2.6	citocromo c-oxidase	14
2.2.7	NADH-desidrogenase	16
2.2.8	succinato-oxidase	16
2.2.9	Determinação do efluxo de prótons	17
2.2.10	Determinação do potencial de membrana	17
2.2.11	Curva padrão para o cálculo do potencial de membrana mitocondrial	19
2.2.12	Determinação do grau de "swelling" mitocon- drial	20
2.2.13	Determinação da concentração de proteína ...	20
2.2.14	Preparo da solução de Mexitil	21
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1	Efeito do Mexitil sobre o consumo de O ₂ pela mitocôndria de coração de rato	22
3.2	Efeito do Mexitil sobre a atividade das enzi- mas ligadas à cadeia respiratória	28
3.3	Efeito do Mexitil sobre a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas e em mitocôndrias rompidas	33
3.4	Efeito do Mexitil sobre o potencial de mem- brana mitocondrial	36
3.5	Efeito do Mexitil sobre o efluxo de prótons.	43
3.6	Efeito do Mexitil sobre o "swelling" mitocon- drial	47
4.	DISCUSSÃO FINAL	59
5.	CONCLUSÕES	67
6.	BIBLIOGRAFIA	68

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos inúmeros avanços realizados e de uma crescente sofisticação dos modos de terapia incorporados ao combate das arritmias, esta disfunção ainda persiste como causa maior das cardiopatias e das mortes correlacionadas a elas. A terapêutica para este tipo de afecção encontra o maior aliado em agentes farmacológicos, embora a cirurgia e o uso de técnicas mais arrojadas, estejam em franco desenvolvimento. Um exemplo disto, são os mapeamentos epi e endocárdicos usados como guias de aneurismectomias e ventriculotomias, marcapassos programáveis, desfibriladores implantáveis e marcapassos que detectam e interrompem taquicardias com uma série de estímulos programados.

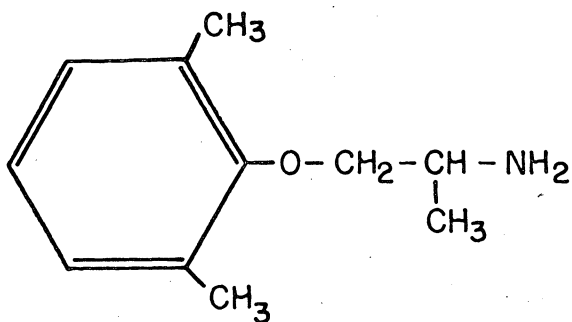
Tais medidas, entretanto, sofrem certas restrições quanto à conveniência ou quanto à disponibilidade, ou mesmo quanto à efetividade quando se trata de arritmias sérias, fazendo recair sobre as drogas a fatia maior da terapia deste tipo de enfermidade. Não é de se surpreender, portanto, que nos últimos anos os avanços logrados neste terreno sejam formidáveis, fazendo surgir uma série de novas drogas, sempre à procura daquelas realmente eficazes, com efeitos colaterais toleráveis e doses terapêuticas convenientes ao tratamento.

Este arsenal está longe de ser completo, entretanto. É de se prever que, na busca de um antiarrítmico que possa ser usado efetivamente na totalidade dos pacientes, os próximos anos vejam surgir mais e mais drogas do gênero.

1.1 MEXITIL

O Mexitil (Mexiletine hidrocloreídrico) ou 1-metil-2-(2,6-xililoxi)-etil-amina hidrocloreídrico, droga sintetizada e comercializada pelo Laborat6rio Boehringer-Ingelheim sob o c6digo K6 1173, 6 uma amina arom6tica com peso molecular de 215,73. Dentro da classifica66o atribu6da por VAUGHAM e WILLIAMS (1974) 6s drogas antiarr6tmicas - baseada nos modos de a66o destas, sobre as propriedades eletrofisiol6gicas do cora66o -, ela est6 inclu6da na classe I (subclasse B), com uma estrutura muito similar 6 da lignocaina e 6 da tocinida.

F6rmula estrutural



P.M.: 215,73

6 um potente anest6sico local (SINGH e VAUGHAM - WILLIAMS, 1972) e 6 largamente usado como antiarr6tmico na Irlanda e na Inglaterra . Foi objeto de v6rias revis6es nos 6ltimos anos (CHEW et al., 1979 ; LEAHEY e BIGGER, 1980 ; WOOSLEY et al., 1984 e RODEN, 1985) e de um simp6sio (Acta Cardiologica, supl. 25, 1980).

1.1.1 Uso Clínico

O Mexitil é usado com relativo sucesso no tratamento de arritmias ventriculares crônicas, arritmias ventriculares associadas com enfarte do miocárdio e taquicardia ventricular recorrente. A sua administração oral mostrou-se significativamente efetiva no combate de anormalidades específicas, incluindo batimentos ectôpicos (uni ou multifocais), taquicardia ventricular, "flutter" e fibrilação. Em alguns casos, arritmias ventriculares crônicas também podem ser controladas (OHASHI, 1984 ; MEHTA e CONTI, 1982).

O Mexitil vem sendo usado com sucesso nas horas que sucedem ao enfarte agudo do miocárdio (HALINEN, 1984) juntamente com ou logo após a aplicação de outros antiarrítmicos (DUFF et al., 1983), ou quando os últimos falham (WASPE et al., 1983; SINGH, 1984 ; SOEOL, 1984). Provoca pouca ou nenhuma interferência na contratilidade do miocárdio ou na condução do estímulo, razão pela qual é empregado com excelentes resultados em pacientes com problema de condutividade no miocárdio.

A administração intravenosa do Mexitil provou ser efetiva em pacientes sofrendo de patologia coronariana, mesmo em casos resistentes à lignocaína (HENRARD e CARLIER, 1980 ; SANTINELLI, 1983).

1.1.2 Eletrofisiologia

Ao nível celular, o Mexitil provoca um decréscimo da velocidade de ascensão da fase 0 do potencial de ação -

agindo diretamente sobre o componente rápido (influxo de íons sódio para o interior da fibra cardíaca) - bem como diminuindo a sua amplitude e duração. Ele também reduz a média de disparos do marcapasso ventricular, deslocando a voltagem limiar de uma maneira similar à quinidina (WELD et al., 1979).

Em cães, este antiarrítmico não apresenta efeitos nos intervalos PR, QRS e QT em doses inferiores a 9mg/kg (CARLIER, 1980). Embora em pacientes com sistema de condução cardíaco normal ele tenha poucos efeitos eletrofisiológicos (CHEW et al., 1979), pequenas alterações eletrofisiológicas podem ser notadas em pacientes apresentando patologia do nodo sino-atrial, tais como, bradicardia e prolongamento da recuperação sinusal.

Alterações em outros parâmetros eletrofisiológicos são variáveis. Os efeitos do Mexitil são essencialmente semelhantes aos reportados para a lignocaína (RODEN, 1985).

1.1.3 Farmacocinética

O Mexitil pode ser administrado oral ou intravenosamente. No caso da administração oral, a sua absorção é boa, com aproveitamento sistêmico de aproximadamente noventa por cento (PRESCOT et al., 1977). É eliminado primariamente pelas vias metabólicas, sendo menos de 10% eliminado sem alteração pela urina (PRESCOT et al., 1977), enquanto cerca de 75% liga-se a proteínas plasmáticas (TALBOT et al., 1977).

Sua concentração plasmática terapêutica acredita-se que oscila entre 0,75 e 2,00µg/ml (CAMPBELL et al., 1978), ao passo que a sua meia-vida plasmática, seguindo-se administração endovenosa foi reportada como sendo de 16,7 ±5,1 horas e de 12,1±4,0 horas no caso da administração oral (PRESCOT et al., 1977).

A sua eliminação é mais rápida quando a urina é tornada mais ácida, e mais lenta quando ela é alcalinizada

1.1.4 Dosagem e Administração

Numa terapia endovenosa a curto prazo, a dose inicial de 150 a 250mg pode ser administrada em espaço de 2 a 5 minutos, seguida de perfusão de 250mg durante 30 minutos. A partir daí, uma dose de 250mg em 2h30min e 500mg dentro de 8 horas podem ser usadas. Para a manutenção intravenosa da droga, costuma lançar-se mão de uma dosagem de 500 a 1000mg em 24 horas (CHEW et al., 1979).

A dosagem oral é de 450 a 1200mg por dia, dividida em três porções iguais (HENRARD e CARLIER, 1980). Se desejado, uma dose de reforço de 400 a 600mg pode ser administrada 4 a 6 horas antes da de manutenção.

1.1.5 Efeitos Colaterais

Os efeitos colaterais mais frequentes no uso do Mexitil envolvem o sistema nervoso central e são relacionados com a dosagem. Eles incluem: tremores, nistagmo, visão

embaçada, vertigens, sonolência, confusão mental, insônia, náuseas e convulsões (CHEW et al., 1979 ; SCHWARTZ et al., 1981). Em 15% dos casos, ocorrem também efeitos gastrointestinais adversos (HENRARD e CARLIER, 1980). Efeitos colaterais de natureza cardiovascular incluem hipotensão e bradicardia (especialmente em pacientes com disfunção do nódulo SA), bloqueio cardíaco e piora da função ventricular esquerda (SCHWARTZ et al., 1981), além de fibrilação ventricular (HENRARD e CARLIER, 1980).

Segue, na tabela I, um resumo do perfil farmacológico do Mexitil.

Embora muitos estudos sobre os aspectos clínicos do Mexitil tenham sido levados a cabo, persiste a inexistência de dados, até o início deste estudo, relacionados com sua ação sobre a atividade de mitocôndrias isoladas. Tal lacuna possibilitou a idéia da realização deste estudo, que pretende uma visão panorâmica do efeito desta droga sobre o metabolismo oxidativo mitocondrial e sobre alguns parâmetros físico-químicos. Visando estes objetivos, determinou-se o efeito da droga sobre a respiração e fosforilação mitocondriais, sobre a atividade dos complexos enzimáticos, sobre o potencial de membrana mitocondrial, sobre o efluxo de prótons e sobre o "swelling" mitocondrial passivo e ativo.

TABELA I

Resumo do perfil farmacológico do Mexitil

Eletrofisiologia	Decrêscimo da taxa de elevação da fase 0 do potencial de ação por ação direta sobre os canais de sódio.
Dosagem	i.v.: 150 a 250mg dentro de 5 minutos, total de 750mg em 3 horas. Dose de manutenção de 0,5 a 1,0mg/min (CHEW et al., 1979). oral: 200 a 300mg cada 8 horas, com dose de reforço de 400 a 600mg (CHEW et al., 1979).
Efeito sobre o ECG	Nenhum (KEEFE et al., 1981) Ampliação da fase QRS (OPIE, 1980)
Meia-vida	i.v.: 16±5 horas oral: 12±4 horas (KEEFE et al., 1981)
Dose terapêutica plasmática	0,75µg/ml a 2,0µg/ml (KEEFE et al., 1981 ; OPIE, 1980)
Dose tóxica plasmática	1,5 a 3,0µg/ml (OPIE, 1980)
Efeitos Colaterais	Neurológicos (relacionados à dose) Hipotensão Bradycardia Arritmias

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Isolamento de mitocôndrias de coração de rato para a determinação do consumo de O_2 , da atividade ATPásica em mitocôndrias intactas e do efluxo de prótons.

Mitocôndrias de coração de rato foram isoladas segundo método descrito por VOSS et al. (1961), usando-se o sistema de extração como segue: D-manitol 0,2M, sacarose 0,075M, Tris-HCl (pH 7,4) 5mM e EDTA 1mM.

Ratos brancos Wistar foram decapitados, seus corações removidos e depois lavados no sistema de reação gelado. A seguir foram picados com tesoura e homogeneizados em homogeneizador Van Potter-Elvehjem, usando-se três tipos de pistilo em ordem crescente de diâmetro. O homogenado obtido foi submetido a centrifugação a $800 \times g$ por 10 minutos, a $4^\circ C$, em centrífuga refrigerada Beckman J-21B.

O precipitado foi descartado e o sobrenadante centrifugado a $7800 \times g$ por 10 minutos. O precipitado assim obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspensado em meio de extração, sendo novamente centrifugado a $5.000 \times g$ por mais 10 minutos. Após esta terceira centrifugação, as mitocôndrias foram ressuspensas na menor quantidade possível do sistema de reação e homogeneizadas de modo a se obter uma concentração de proteínas de aproximadamente 50mg/ml.

2.1.2 Isolamento de mitocôndrias de coração de rato para a determinação do potencial de membrana.

Mitocôndrias de coração de rato foram obtidas segundo o método de VOSS et al. (1961), descrito anteriormente, com a diferença de que as duas últimas lavagens foram feitas com o seguinte sistema: sacarose 0,24M , Tris-HCl (pH 6,9) 0,01M. O sedimento final obtido foi também suspenso neste sistema.

2.1.3 Isolamento de mitocôndrias de coração de rato para a determinação do "swelling" ativo e passivo.

Mitocôndrias de coração de rato foram obtidas segundo método descrito por MUSTAFA et al. (1966), com pequenas modificações. O procedimento é igual ao de VOSS et al. (1961), à diferença que, o sistema de extração usado em todas as etapas era constituído por: sacarose 0,33M, EDTA 1mM e Hepes-HCl (pH 7,5) 2mM.

2.1.4 Obtenção de mitocôndrias de coração de rato rompidas, para a determinação das atividades enzimáticas da NADH-oxidase, NADH citocromo c-redutase, NADH-desidrogenase, succinato-oxidase e citocromo c-oxidase.

Mitocôndrias intactas, obtidas segundo o método de VOSS et al. (1961) - já descrito -, foram congeladas a -15°C por pelo menos 12 horas, descongeladas à temperatura

ambiente e conservadas a 0°C para ensaio. As frações de membrana resultantes apresentaram todos os componentes da cadeia respiratória com atividade satisfatória. Nenhuma alíquota da extração inicial foi ensaiada após um prazo de 4 (quatro) dias de congelamento.

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.2.1 Determinação do consumo de oxigênio pelo método polarográfico. Cálculo do RC e ADP:O.

O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas, foi determinado em eletródio de oxigênio modelo Rank - Brothers (Cambridge - England), acoplado a registrador Recti-Riter (Texas Instruments Incorporated), segundo método de VOSS et al. (1963). O sistema de reação, também segundo VOSS et al. (1963), constava de: tampão fosfato (pH 7,4) 5mM, EDTA 0,2mM, KCl 10mM e D-manitol 250mM, Tris-HCl (pH 7,4) 10mM. Este sistema era ainda suplementado ora com glutamato de sódio 15mM, ora com succinato de sódio 7mM, ou então com α -cetogluturato de sódio 15mM, além da suplementação adequada de ADP 0,8mM.

Mitocôndrias suspensas neste sistema, numa concentração final de 0,42mg de proteína/ml e suplementadas com o substrato de oxidação adequado, foram mantidas à temperatura constante de 28°C por banho-maria termostatizado, e as respectivas velocidades respiratórias registradas.

As velocidades respiratórias foram expressas em

nmoles de O consumidos por segundo por miligrama de proteín na mitocondrial, considerando-se que a solubilidade do oxigênio na água, a 28°C e 1atm, é de 248µM de O₂ (ESTABROOCK, 1967).

O coeficiente de controle respiratório (RC), foi calculado fazendo-se a razão entre a velocidade de consumo de O em presença do ADP (estado III) e a velocidade respiratória após todo o ADP ter sido consumido (estado IV).

A relação ADP:O foi obtida segundo CHANCE e WILLIAMS (1955), fazendo-se a razão entre nmoles de ADP consumidos durante o estado III e nmoles de O consumidos no mesmo estado.

2.2.2 Determinação da atividade ATPásica em mitocôndrias intactas.

A atividade ATPásica (ATP fosfohidrolase E C 3.6.1.3) em mitocôndrias intactas, foi determinada segundo metodo descrito por PULLMAN et al. (1960), cujo sistema de reação é constituído de: sacarose 50mM, Tris HCl (pH 7,4) 12mM, KCl 50mM e proteína mitocondrial 2mg, num volume final de 1ml.

A reação foi iniciada pela adição de ATP numa molaridade final de 3mM e interrompida com TCA 0,12%, após 10 minutos de agitação constante a 30°C em banho-maria termostatizado.

A seguir, o material foi centrifugado a 7.800xg por 1 minuto, para precipitar os restos mitocondriais, e alií

quotas do sobrenadante foram retiradas para dosagem do fosfato liberado, segundo método descrito por SUMNER (1944).

Os resultados foram expressos em nmoles de ATP hidrolisados por minuto por miligrama de proteína mitocondrial e, para cada concentração da droga, os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao normal (na ausência da droga).

2.2.3 Determinação da atividade ATPásica em mitocôndrias rompidas.

A atividade ATPásica em mitocôndrias rompidas por congelamento, foi determinada medindo-se a liberação do fosfato inorgânico a partir da hidrólise do ATP, na presença de um regenerador de ATP, segundo método descrito por PULMAN et al. (1960).

O sistema de reação, num volume final de 1ml, era constituído por: Tris-HCl (pH 8,4) 50mM, MgSO₄ 3mM, PEP 2,5mM, piruvato quinase 3 unidades (uma unidade de piruvato quinase converte 1µmol de PEP a piruvato em um minuto, a 37°C e a pH 7,6) e 100µg de proteína mitocondrial, na presença e na ausência da droga.

A reação foi iniciada com a adição do ATP numa molaridade final de 4mM e bloqueada, depois de 10 minutos, com TCA 0,1%. Toda a reação foi levada a cabo a uma temperatura constante de 30°C em banho-maria termostaticado e com agitação constante.

Em seguida o material foi centrifugado a 7.800xg

por um minuto para sedimentar os restos mitocondriais e, em alíquotas do sobrenadante, o fosfato liberado foi dosado pelo método de SUMNER (1944).

Os resultados foram expressos em μ moles de ATP hidrolisados por minuto por miligrama de proteína.

Determinação das atividades enzimáticas ligadas à cadeia respiratória em mitocôndrias rompidas por congelamento.

2.2.4 NADH-oxidase (NADH:oxigênio óxido-redutase) E C 1.6.99.3.

A atividade da NADH-oxidase foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por SINGER (1974) em espectrofotômetro Beckman, modelo DB, acoplado a registrador - Linear Potentiometric Recorder - e a expensor de escala Beckman.

O sistema de reação, num volume final de 3ml era constituído de: tampão fosfato (pH 7,4) 80mM, EDTA 50 μ M, NADH (adicionado pouco antes da reação) 0,17mM e proteína mitocondrial (mitocôndrias rompidas por congelamento) 240 μ g. Todo o sistema foi mantido à temperatura constante de 28°C em banho-maria termostatizado e sob agitação.

A reação foi iniciada com a adição de proteína mitocondrial e a oxidação do NADH foi acompanhada em 340nm.

Os resultados obtidos, tanto na ausência quanto na presença de concentrações crescentes da droga, foram ex

pressos em nmoles de NADH oxidados por minuto por miligrama de proteína mitocondrial, levando-se em conta que o coeficiente de extinção molar do NADH a 340nm é de $6.220M^{-1}cm^{-1}$.

2.2.5 NADH citocromo c-redutase (NADH:citocromo c ôxi do-redutase) E C 1.6.99.3 .

A atividade da NADH citocromo c-redutase foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por SOMLO et al. (1965), em espectrofotômetro Beckman, modelo DB, a coplado a um registrador - Linear Potentiometric Recorder - e a um expensor de escala Beckman.

O sistema de reação, num volume final de 3ml era constituído por: tampão fosfato (pH 7,4) 50mM, EDTA 2mM, NADH 50µM, citocromo c (oxidado) 40µM, KCN 1mM e proteína mitocondrial (mitocôndrias rompidas por congelamento) 30µg.

Todo o sistema foi mantido a 28°C em banho-maria termostatizado. A reação foi iniciada com a adição da proteína mitocondrial e a redução do citocromo c acompanhada em 550 nm.

Os resultados obtidos, tanto na ausência quanto na presença da droga, foram expressos em nmoles de citocromo c reduzidos por minuto por miligrama de proteína mitocondrial, levando-se em conta que o coeficiente de extinção molar do citocromo c red-ox a 550nm é de $19.000M^{-1}cm^{-1}$.

2.2.6 Citocromo c-oxidase (Ferrocitocromo c:oxigênio ôxi xido-redutase) E C 1.9.3.1 .

Esta atividade foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por MASON et al. (1973), empregando-se o mesmo recurso instrumental usado para as determinações espectrofotométricas anteriores, utilizando-se mitocôndrias rompidas por congelamento.

O sistema de reação, num volume final de 3ml, continha: tampão fosfato (pH 7,4) 50mM, EDTA 2mM, ferrocitocromo c 30 μ M e proteína mitocondrial 30 μ g.

Todo o sistema foi mantido à temperatura de 28°C por banho-maria termostaticado, sendo a reação iniciada pela adição da proteína mitocondrial e acompanhada pelo decréscimo da absorção em 550nm durante 2 minutos.

Para os cálculos dos resultados obtidos, tanto na ausência quanto na presença da droga, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do citocromo c red-ox ($19.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Obtenção do citocromo c reduzido.

Citocromo c (tipo IV - Sigma Chemical Co.) de coração de boi, foi reduzido por pequena quantidade de ditionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), e a solução aquosa foi filtrada através de coluna de gel de Sephadex G-25, de acordo com YONETANI e RAY (1965), a fim de separar o ferrocitocromo c do excesso de ditionite e de seus produtos de reação.

A concentração de citocromo c reduzido foi calculada usando-se $E_{550\text{nm}} = 28.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a hemoproteína reduzida. O ferrocitocromo preparado desta maneira, contém me

nos de 5% da proteína oxidada.

**2.2.7 NADH-desidrogenase (NADH:ferricianeto óxido-redu-
tase) E C 1.6.99.3 .**

Tal atividade foi determinada segundo método es
pectrofotométrico de SINGER (1974), acompanhada em 420nm a
28°C em banho-maria termostatizado, utilizando-se ferricia-
neto como acceptor de elétrons e em presença de rotenona pa
ra bloquear a atividade da NADH-oxidase.

O sistema de reação continha: tampão fosfato (pH
7,4) 50mM, EDTA 2mM, NADH 166µM, ferricianeto 0,66mM e rote-
nona 1,67µM. A reação foi iniciada com a adição de proteína
mitocondrial 30µg (mitocôndrias rompidas por congelamento).

Os resultados obtidos, tanto na ausência quanto
na presença da droga, foram expressos em nmoles de NADH oxi-
dados por minuto por miligrama de proteína, levando-se em
conta que o coeficiente de extinção molar do ferricianeto é
de $1.040M^{-1}cm^{-1}$.

**2.2.8 Succinato-oxidase (Succinato:oxigênio óxido-redu-
tase) E C 1.3.99.1 .**

A reação enzimática foi determinada polarografica-
mente segundo o método de SINGER (1974), utilizando-se como
fonte enzimática as mitocôndrias de coração de rato rompi-
das por congelamento.

O sistema de reação continha: tampão fosfato (pH
7,4) 80mM, EDTA 50mM, succinato de sódio 10mM e proteína mi

tocondrial 560µg, em volume final de 1,3ml. O consumo de O₂ foi acompanhado a 28°C em eletródio de oxigênio, sendo a reação iniciada pela adição de proteína.

A enzima succinato-oxidase foi previamente ativa da conforme descrito por SINGER (1974), incubando-se as mitocôndrias rompidas por congelamento, a 28°C durante 10 minutos na presença de 40mM de succinato de sódio.

Para os cálculos da atividade enzimática foi utilizada a constante de dissolução do O₂ (a 28°C, 1atm), igual a 248µM (ESTABROOK, 1967).

2.2.9 Determinação do efluxo de prótons.

O efluxo de prótons do meio intra para o meio extramitocondrial, como consequência da hidrólise de ATP, foi determinado com o auxílio de um microeletrodo Metrhom, acoplado a um registrador Recti-Riter (Texas Instruments Incorporated) com expansor de escala, de tal modo que a escala inteira correspondia a 0,2 unidades de pH.

O sistema de reação, num volume final de 2,4ml era constituído por: KCl 150mM, Tris-HCl (pH 7,4) 1mM, proteína mitocondrial 1mg, rotenona 4,2µM e ATP (pH 7,4) 4mM.

O efluxo de prótons foi iniciado pela adição do ATP, e registrado por dois minutos. Os resultados foram calculados e expressos em $\Delta\text{pH} \cdot \text{min}^{-1}$, tanto na ausência quanto na presença da droga.

2.2.10 Determinação do potencial de membrana.

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) foi determinado com base na variação da densidade óptica provocada pela captação de safranina por mitocôndrias energizadas ou por α -cetogluturato, ou por succinato, ou por glutamato, ou por ATP, ou ainda por ascorbato + TMPD, segundo método descrito por ÅKERMAN e WIKSTRÖM (1976).

O sistema de reação, num volume final de 3ml, continha: sacarose 0,2M, HEPES (pH 7,2) 20mM, EDTA 0,38M, KCl 20mM, suplementado com safranina 9,6 μ M, rotenona 4,2 μ M, NaCN 1mM, oligomicina 2 μ g e proteína mitocondrial 2,4mg, sendo a reação iniciada com a adição do substrato.

Em todos os experimentos foram mantidas constantes as concentrações de safranina (9,6 μ M) e de proteína mitocondrial (0,8mg/ml) visto que a faixa de linearidade da curva é função das concentrações do corante e da proteína, i.e., para valores mais elevados de concentração do corante, maiores são os desvios nos valores máximos de potencial (AZZONE et al., 1976).

As alterações da densidade óptica foram registradas em 511-533nm, à temperatura constante de 28°C, em Aminco Chance Dual Wavelengths / Split Beam Recorder Spectrophotometer e o cálculo da variação do potencial de membrana foi realizado usando-se uma curva de calibração. Através desta curva, converteram-se os valores das amplitudes correspondentes à ΔDO de cada ensaio, para valores de potencial de membrana, expressos em mV. Tais ensaios foram realizados tanto na ausência quanto na presença de concentrações cres

centes da droga .

2.2.11 Curva padrão para o cálculo do potencial de membrana.

A curva padrão para a determinação do potencial de membrana foi confeccionada segundo método espectrofotométrico, preconizado por ÅKERMAN e WIKSTRÖM (1976), usando-se Aminco Chance Dual Wavelengths / Split Beam Recording Spectrophotometer.

O sistema de reação continha: sacarose 200mM, HEPES (pH 7,2) 20mM, EDTA 380mM e proteína mitocondrial 2,4 mg, suplementado com rotenona 4,2µM, oligomicina 2µg, safranina 9,6µM, valinomicina 42ng/ml, FCCP 1mM e KCl 0,083mM a 1,67mM, num volume final de 3ml.

Para o cálculo do potencial de membrana, utilizou-se a equação de Nernst $\Delta\Psi = 60 \cdot \log \frac{[K^{+in}]}{[K^{+out}]}$, sendo $[K^{+in}]$ a concentração de K^{+} intramitocondrial (120mM) e $[K^{+out}]$ a concentração de K^{+} adicionada ao sistema. O ΔDO lançado no gráfico foi a diferença entre o pico de absorção em 511- 533nm a 28°C, obtida após a adição da valinomicina e aquela obtida após a adição do FCCP. A curva foi obtida lançando-se o potencial calculado para diferentes $[K^{+out}]$, através da equação de Nernst, no eixo das abscissas, contra os vários ΔDO registrados espectrofotometricamente, no eixo das ordenadas. Posteriormente a curva foi ajustada pelo método dos mínimos quadrados para minimizar os desvios e eliminar aflições com muita dispersão.

2.2.12 Determinação do grau de "swelling" mitocondrial .

A determinação do grau de "swelling" mitocondrial foi realizada segundo o método espectrofotométrico de SEPPÄLA et al. (1973), sendo ΔDO mensurado em Aminco Chance Du al Wavelengths / Split Beam Spectrophotometer.

Para a determinação do "swelling" provocado pela entrada de sódio na matriz mitocondrial, foi utilizado o seguinte sistema de reação: sacarose 100mM, Tris (pH 7,5) 30 mM, EDTA 0,5mM, acetato de sódio 50mM e proteína mitocondrial 1,5mg, suplementado adequadamente, ora com glutamato de sódio 15mM, ora com succinato de sódio 15mM, ora com ATP 5mM, ou ainda com ascorbato + TMPD 15mM, além de cianeto de sódio 100 μ M, rotenona 4,2 μ M e FCCP 0,48 μ M.

Já para a determinação do grau de "swelling" causado por entrada de potássio, tanto o sistema quanto a suplementação foram os mesmos, exceto que utilizou - se o KH_2PO_4 (20mM) ao invés do acetato de sódio e a presença adicional da valinomicina 1,7 μ g/ml.

Nos dois casos a temperatura foi mantida constante em 28°C, diferindo apenas o comprimento de onda usado para os dois ensaios: 575nm para o "swelling" provocado pelo sódio e 520nm para o provocado pelo potássio. As variações do grau de "swelling" foram acompanhadas pelas variações da densidade óptica em função do tempo.

2.2.13 Determinação da concentração de proteína.

Todas as determinações de concentração de proteí

na foram realizadas pelo método descrito por LOWRY et al (1951) utilizando-se como padrão solução aquosa de soroalbumina bovina cristalina (Sigma). As leituras foram feitas 10 minutos após a adição do reativo de fenol, em 540nm, com auxílio de espectrofotômetro Beckman modelo DB.

2.2.14 Preparo da solução de Mexitil.

A solução aquosa de Mexitil usada em todos os experimentos foi preparada cerca de uma hora antes de cada ensaio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

3.1 Efeito do Mexitil sobre o consumo de O_2 pela mitocôndria de coração de rato.

No início do estudo do(s) efeito(s) do Mexitil sobre o metabolismo mitocondrial lançou-se mão de dois substratos NAD^+ dependentes (glutamato e α -cetoglutarato) e de um FAD dependente (succinato), por serem eles, pelas suas oxidações, os aportadores do processo básico de liberação de energia na mitocôndria, seja para a síntese de ATP, seja para o transporte ativo de íons, ou ainda para transidrogenações (GREVILLE, 1969).

Como pode ser visto nas figuras 1,2 e 3, é perceptível a diferença de comportamento do metabolismo dos substratos NAD^+ dependentes frente ao Mexitil se compararmos com a oxidação do substrato FAD dependente nas mesmas condições. Enquanto nas três situações não temos alterações notáveis no estado IV de CHANCE e WILLIAMS (1955), nem na relação ADP:O, fica evidente a profunda alteração causada pela droga sobre o estado III (e conseqüentemente sobre o RC), para os substratos NAD^+ dependentes. Se neste estado III não temos alteração marcante no consumo de O_2 com o succinato, já no caso dos dois substratos NAD^+ dependentes a diminuição da velocidade respiratória é notável em presença do Mexitil.

Várias hipóteses caberiam para explicar a queda da velocidade respiratória para os substratos NAD^+ depen

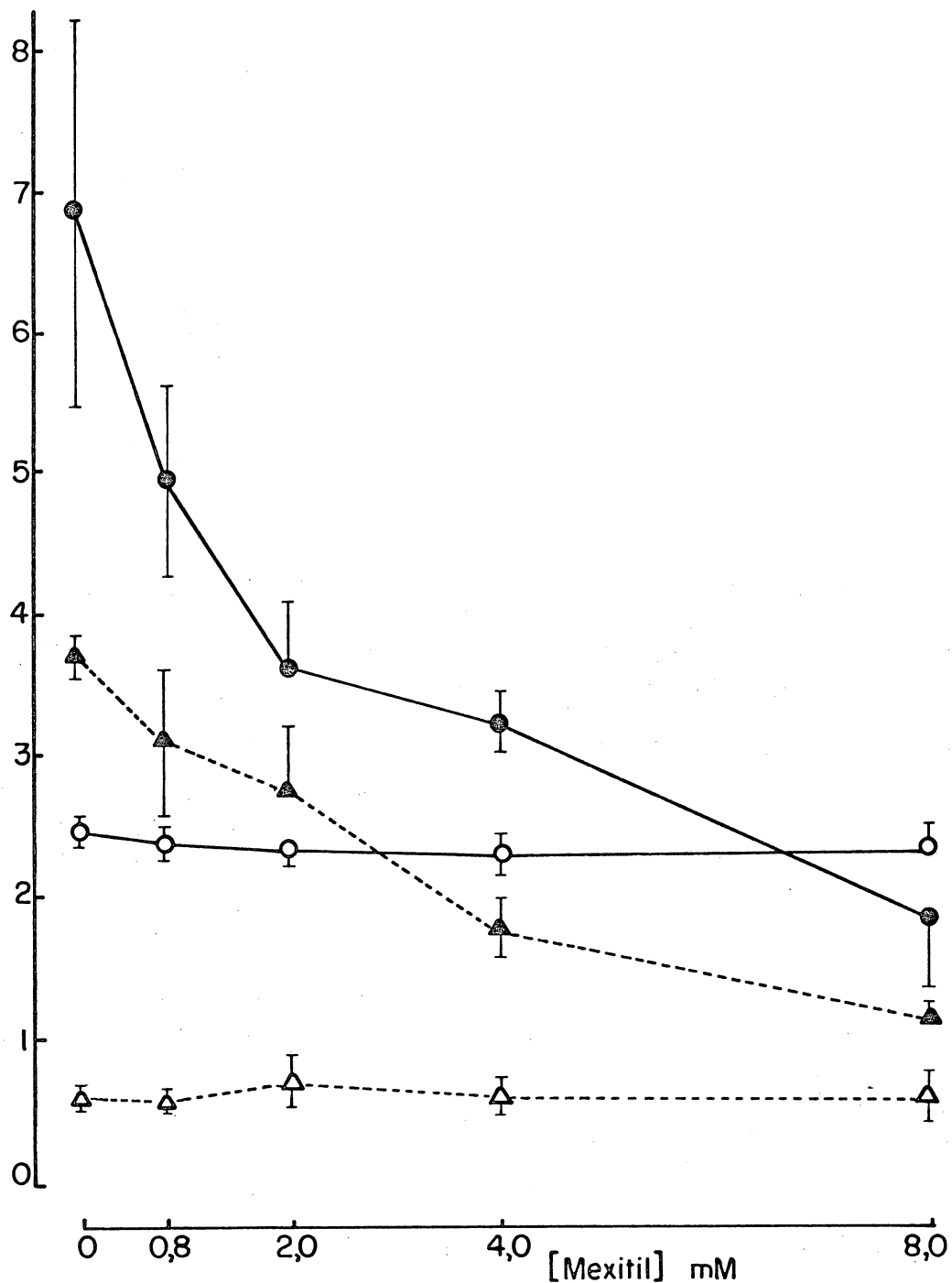


Fig 1 - Efeito do Mexitil sobre a velocidade respiratória e fosforilação oxidativa em mitocôndrias energizadas com glutamato.

Sistema: tampão fosfato (pH 7,4) 5mM , Tris 10mM , EDTA 0,2mM , KCl 10mM , manitol 250mM , glutamato de sódio 15mM, e proteína mitocondrial 1mg , suplementado adequadamente com ADP 5µmoles, para um volume final de 2,4ml. Os resultados representam a média de quatro experimentos. As velocidades respiratórias do estado III (▲--▲) e do estado IV (△--△) estão expressas em nmoles de O consumidos por minuto por miligrama de proteína mitocondrial. (●—●) controle respiratório e (○—○) relação ADP:O.

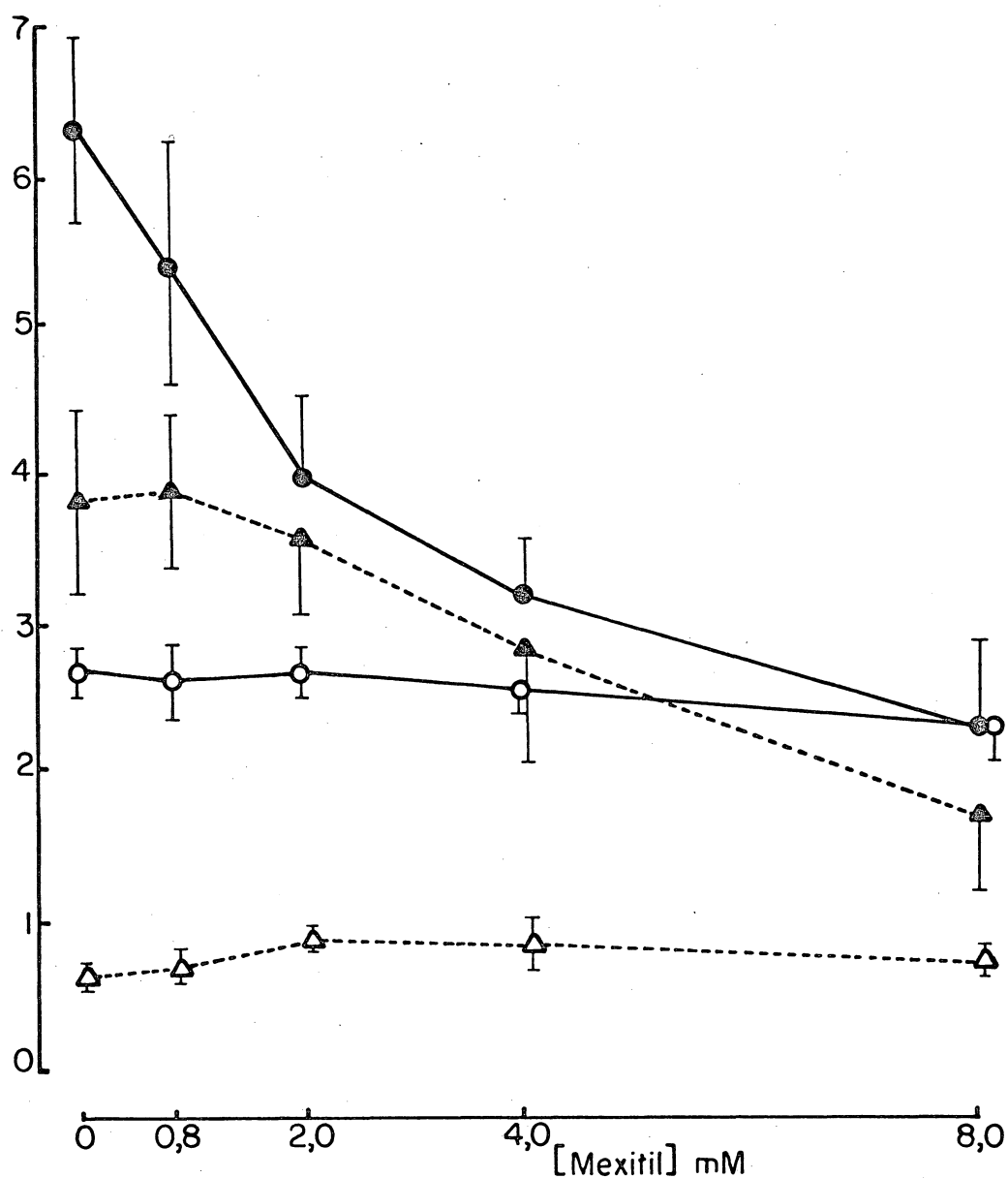


Fig 2 - Efeito do Mexitil sobre a velocidade respiratória e fosforilação oxidativa em mitocôndrias energizadas com α -cetogluturato.

Sistema: tampão fosfato (pH 7,4) 5mM, Tris 10mM, EDTA 0,2 mM, KCl 10mM, manitol 250mM, α -cetogluturato de sódio 15mM e proteína mitocondrial 1mg, suplementado adequadamente com ADP 5 μ moles, para um volume final de 2,4ml. Os resultados representam a média de cinco experimentos. As velocidades respiratórias do estado III (\blacktriangle -- \blacktriangle) e do estado IV (\triangle -- \triangle) estão expressas em nmoles de O₂ consumidos por segundo por miligrama de proteína mitocondrial. (\bullet — \bullet) controle respiratório (RC) e (\circ — \circ) relação ADP:O₂.

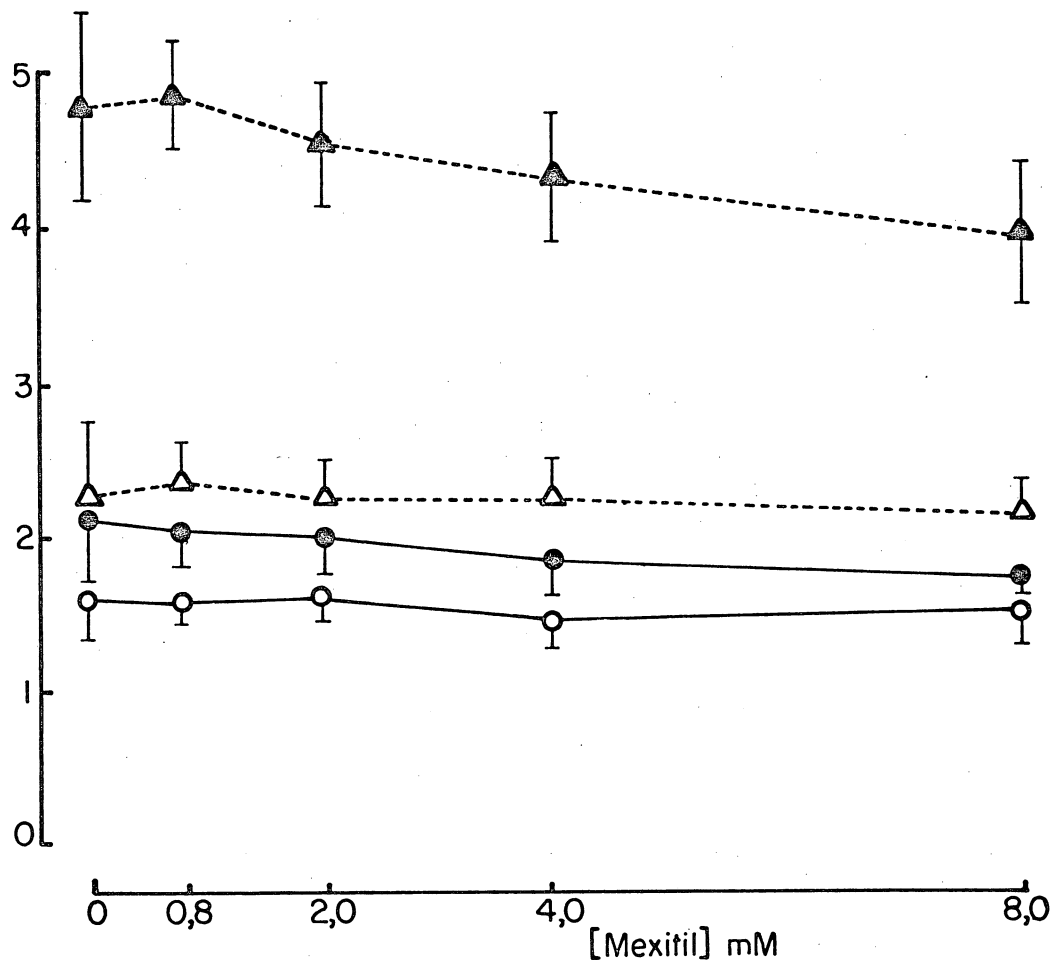


Fig 3 - Efeito do Mexitil sobre a velocidade respiratória e fosforilação oxidativa em mitocôndrias energizadas com succinato.

Sistema: tampão fosfato (pH 7,4) 5mM, Tris 10mM, EDTA 0,2 mM, KCl 10mM , manitol 250mM , succinato de sódio 7mM e proteína mitocondrial 0,5mg , suplementado adequadamente com ADP 5µmoles , para um volume final de 2,4ml. Os resultados representam a média de quatro experimentos independentes. As velocidades respiratórias do estado III (▲--▲) e do estado IV (△--△) estão expressas em nmoles de O₂ consumidos por segundo por miligrama de proteína mitocondrial . (●—●) controle respiratório e (○—○) relação ADP:O .

dentes, a saber: 1- Inibição da oxidação ao nível da cadeia respiratória (mais especificamente sobre o complexo I, a NADH CoQ-redutase), 2- Inibição da ATPase mitocondrial, 3- Ação sobre o carreador ATP/ADP ou até sobre o próprio carreador fosfato e 4- Inibição dos carreadores glutamato/aspartato e α -cetogluturato/malato.

Enquanto a primeira hipótese resiste a posteriores análises, a segunda e a terceira são descartadas imediatamente se levarmos em conta os parâmetros obtidos com o succinato como substrato de oxidação. Se houvesse inibição da ATPase ou do carreador ATP/ADP, ou ainda do carreador fosfato, teríamos um comportamento frente ao Mexitil, semelhante para os três substratos, uma vez que α -cetoglutarato, succinato e glutamato compartilham estes sistemas.

A quarta hipótese, por sua vez, pode ser refutada com um dos dados obtidos durante os estudos polarográficos. Se houvesse ação do antiarrítmico sobre os carreadores, haveria uma grande diferença de velocidade respiratória entre ensaios efetuados com a adição da droga antes ou depois da adição dos substratos. Nos registros das velocidades respiratórias, a respiração mitocondrial, seja no estado III seja no IV, é a mesma, independente da ordem de adição entre o antiarrítmico e o substrato ensaiado.

Resta a primeira hipótese, que é plausível até este estágio, se for levado em conta que o complexo I da cadeia respiratória, a NADH CoQ-redutase, é responsável pela oxidação do glutamato e do α -cetogluturato, e que ele é in

dependente do complexo II (succinato CoQ-redutase). Neste caso, o Mexitil poderia estar atuando negativamente sobre o primeiro sem causar alterações drásticas no segundo.

Pequenas inibições sobre outros sistemas, contudo, não podem ser descartadas. Apesar de não explicarem a sensível queda do estado III para os substratos NAD^+ dependentes, restam ainda alguns efeitos menores, explicáveis através de uma inibição de várias atividades enzimáticas.

É o caso da leve diminuição da velocidade respiratória do estado III, para o succinato, em presença do Mexitil. Apesar desta queda não ser tão drástica quanto aquela ocorrida para os substratos NAD^+ dependentes, ela existe e é aparente (figura 3). É de se esperar, portanto, uma ligeira inibição também na atividade da succinato-oxidase.

Já as variações da relação ADP:O são inconclusivas, podendo resultar tanto de variações experimentais, quanto de uma queda motivada pela inibição da atividade ATPásica, ou então por uma leve dissipação de energia. Esta mesma dissipação, poderia ser a causa de um sutil aumento da velocidade respiratória do estado IV, embora estas variações possam ser devidas apenas a circunstâncias experimentais. Não se pode descartar, portanto, uma pequena dissipação da força próton-motriz ($\Delta\mu\text{H}^+$) e/ou uma leve inibição da atividade ATPásica. Em outras palavras, não é de se esperar uma só causa para os efeitos da droga; o mais provável é que estes efeitos apresentados sejam resultados de uma somatória de causas, embora o efeito sobre o complexo

I pareça ser o que contribui com maior parcela no cômputo geral.

3.2 Efeito do Mexitil sobre a atividade das enzimas ligadas à cadeia respiratória.

Depois dos resultados polarográficos obtidos, a escolha mais natural para o experimento seguinte recaiu sobre o estudo parcelado da cadeia, para confirmação ou não das suspeitas iniciais. E boa parte das hipóteses anteriores se viram confirmadas.

Como pode ser visto na figura 4, a inibição pelo Mexitil, tanto da NADH-oxidase quanto da NADH citocromo c-reductase, é bastante drástica. Para concentrações do Mexitil, iguais às usadas para os estudos polarográficos, houve inibições na ordem de 50% já nas concentrações mais baixas da droga, e que chegam a ser da ordem de 90% naquelas mais altas. (Qualquer comparação quantitativa, entretanto, deve ser evitada, pois tanto os meios de reação usados, quanto as condições de atuação das enzimas são diferentes. Nos estudos polarográficos, os complexos enzimáticos atuavam em mitocôndrias intactas, ao passo que nos estudos de parcelamento de cadeia, eles o fazem em frações de membrana. A própria atuação da droga pode sofrer mudanças em condições tão diferentes).

O contrário ocorre com a atividade da NADH-desidrogenase. Por razões que fogem à profundidade do presente trabalho, esta parcela da cadeia respiratória é ativada em

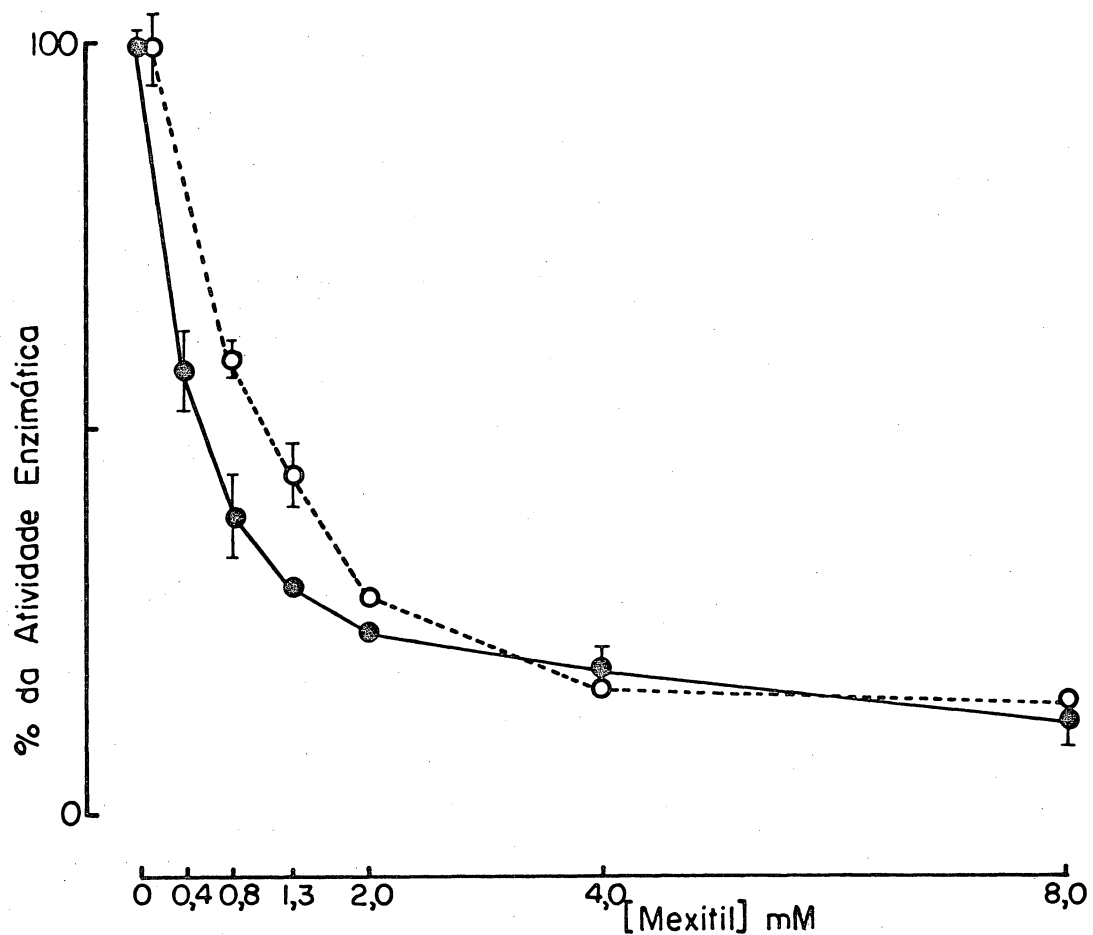


Fig. 4 - (●—●) Efeito do Mexitil sobre a atividade da NADH-oxidase.

Sistema: tampão fosfato (pH 7,4) 80mM, EDTA 50mM, NADH 0,17 mM e proteína mitocondrial 240µg. A reação foi iniciada com a adição da proteína, e a oxidação do NADH seguida espectrofotometricamente em 340nm, a 28°C. Cada resultado representa a média de três experimentos independentes, e 100% da atividade enzimática correspondem a 70nmoles de NADH oxidados por minuto por miligrama de proteína mitocondrial.

(○--○) Efeito do Mexitil sobre a atividade da NADH citocromo c-redutase.

Sistema: tampão fosfato (pH 7,4) 50mM, EDTA 2mM, NADH 50µM, citocromo c 40µM, KCN 1mM e proteína mitocondrial 30µg. A reação foi iniciada com a adição da proteína e acompanhada espectrofotometricamente em 550nm, a 28°C. Os resultados representam a média de três experimentos independentes, e 100% da atividade enzimática corresponde a 189nmoles de citocromo c reduzidos por minuto por miligrama de proteína.

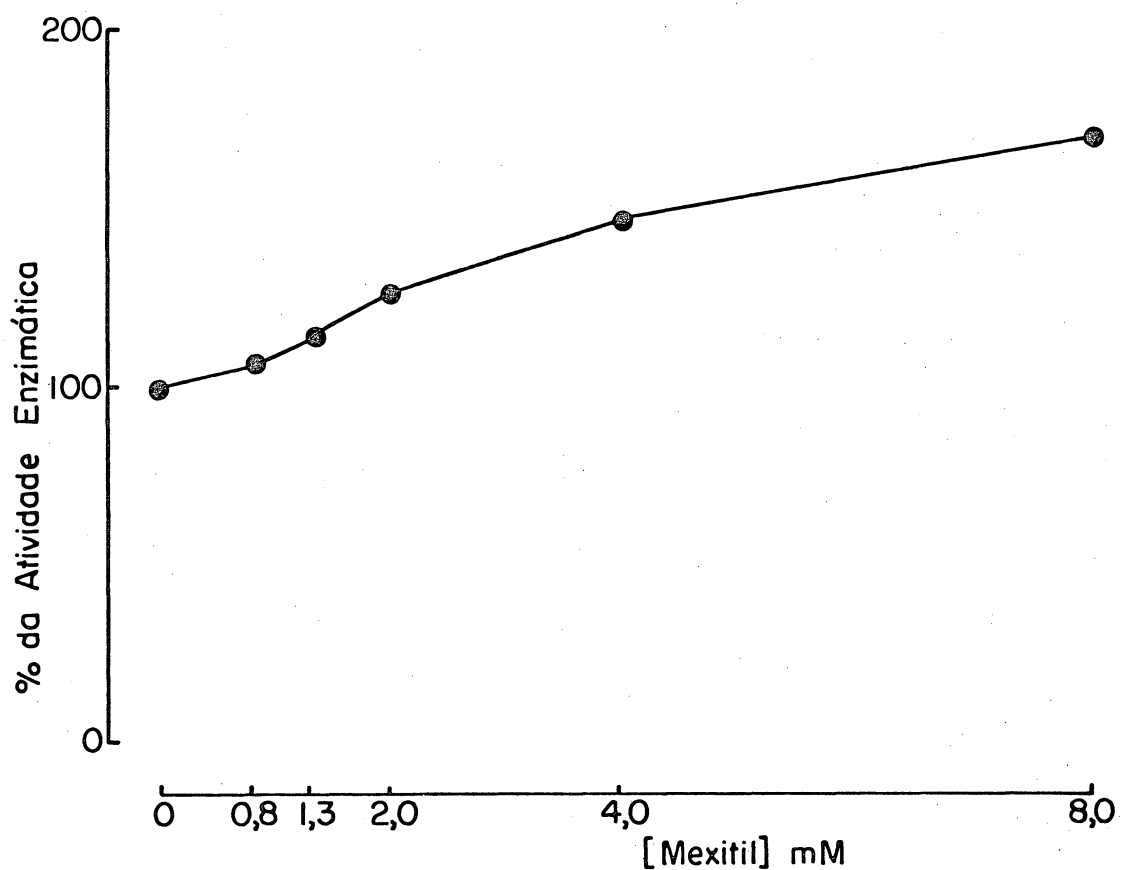


Fig. 5 - (●—●) Efeito do Mexitil sobre a atividade da NADH-desidrogenase.

Sistema: tampão fosfato (pH 7,4) 50mM, EDTA 2mM, NADH 166 μ M, ferricianeto 0,66mM, rotenona 1,67 μ M e proteína mitocondrial 30 μ g. A redução do ferricianeto foi iniciada com a adição da proteína e acompanhada espectrofotometricamente em 420nm, a 28°C, por 2 minutos. Os resultados representam a média de três experimentos independentes e 100% da atividade enzimática correspondem a 4,52nmoles de NADH oxidados por minuto por miligrama de proteína mitocondrial.

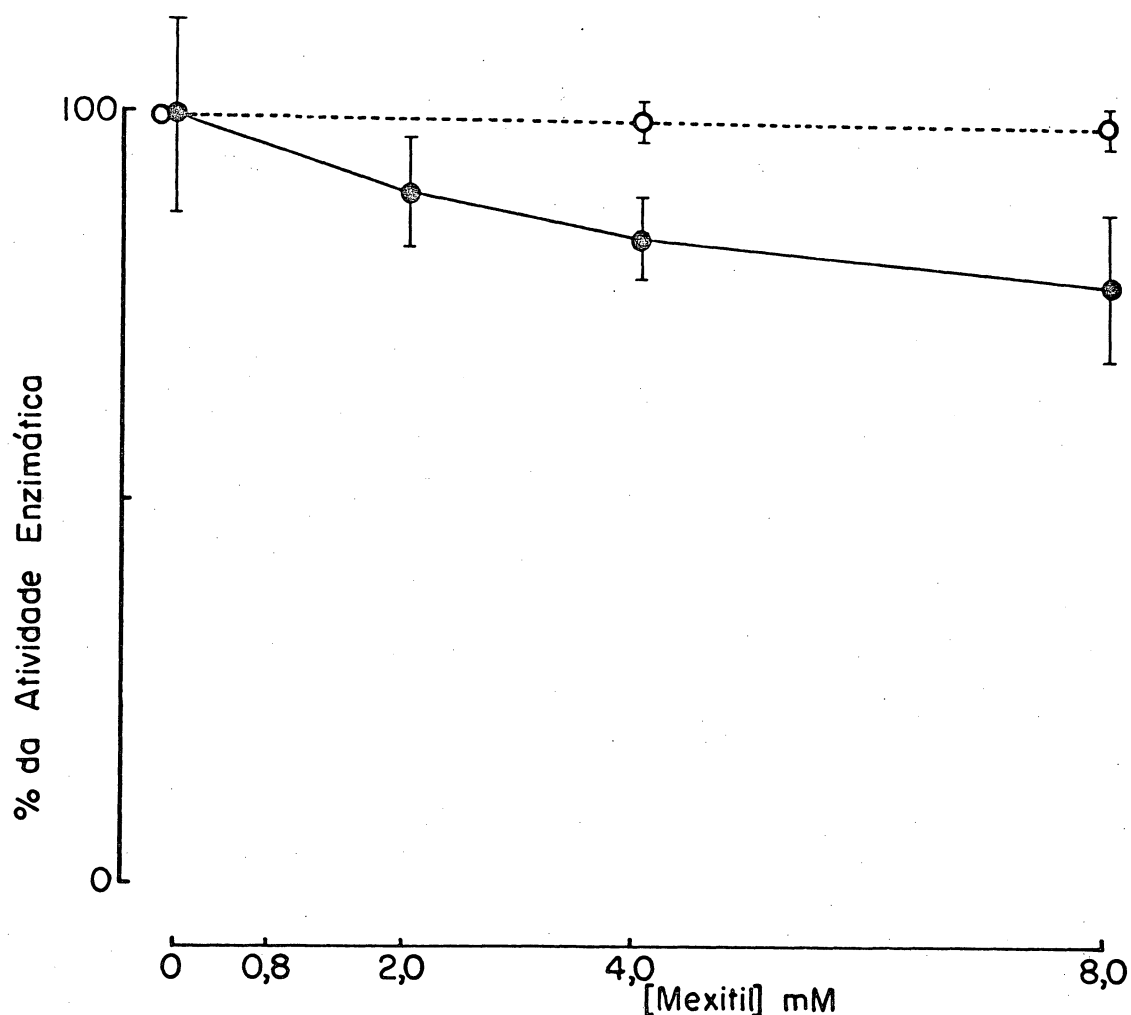


Fig. 6 - (o--o) Efeito do Mexitil sobre a atividade da citocromo c-oxidase.

Sistema: tampão fosfato (pH 7,4) 50mM, EDTA 2mM, ferricitocromo c 30 μ M e proteína mitocondrial 30 μ g, para um volume final de 3ml. A oxidação do citocromo c foi iniciada com a adição da proteína e acompanhada espectrofotometricamente em 550nm, a 28°C, por 2 minutos. Os resultados representam a média de três experimentos independentes, e 100% da atividade enzimática corresponde a 180nmoles de citocromo c oxidados por minuto por miligrama de proteína mitocondrial.

(●—●) Efeito do Mexitil sobre a atividade da succinato-oxidase.

Sistema: tampão fosfato (pH 7,4) 80mM, EDTA 50mM, succinato de sódio 10mM e proteína mitocondrial 560 μ g, para um volume final de 1,3ml. A reação foi iniciada com a adição da proteína e o consumo de O₂ acompanhado polarograficamente a 28°C. Os resultados representam a média de três experimentos independentes, e 100% da atividade enzimática corresponde a 29nmoles de O₂ consumidos por minuto por miligrama de proteína mitocondrial.

presença do antiarrítmico, como pode ser observado na figura 5. De conclusivo deste experimento, fica a evidência de que a NADH-desidrogenase não é a responsável pela inibição do segmento NADH-citocromo c redutase.

A análise do efeito do Mexetil sobre segmentos parcelados da cadeia respiratória, confirma as suposições iniciais de que o sítio mais atingido é aquele ligado ao complexo I. Isto é facilmente visível na figura 6, onde são mostradas as atividades da succinato-oxidase e da citocromo c-oxidase, sendo esta última a parte final da cadeia respiratória e a que parece sofrer pouquíssimo ou nenhum efeito com concentrações crescentes do antiarrítmico.

Os resultados tornam-se ainda mais claros quando se observa a atividade da succinato-oxidase, que sofre leve inibição nas concentrações usadas nos estudos polarográficos, o que poderia explicar a pequena redução do consumo de O_2 , quando da oxidação do succinato. Como as duas porções da cadeia respiratória (NADH-oxidase e succinato-oxidase) possuem em comum tanto o complexo III ($CoQH_2$ citocromo c-redutase) quanto o complexo IV (citocromo c-oxidase) -que sofrem pequenas inibições -, é fácil perceber que a redução da atividade da NADH-oxidase deve estar localizada num ponto que não seja comum aos dois substratos (mais precisamente ao nível do complexo I). Dito de outro modo: se os elétrons fluem livremente pelo complexo IV e com pequena dificuldade pelos complexos II e III, a grande inibição da atividade da NADH citocromo c-redutase e da NADH-oxidase de

ve residir ao nível do complexo I ou, mais especificamente, após a NADH-desidrogenase e antes da CoQ, tendo em vista os resultados obtidos com a ativação da NADH-desidrogenase.

Tais dados confirmam com certa segurança aqueles obtidos nos estudos polarográficos (corroborando a primeira hipótese lançada), além de apresentarem semelhança com resultados obtidos em estudos com outros anestésicos locais (CHAZOTTE e VANDERKOOI, 1981) e com outros antiarrítmicos (KLÜPPEL et al., 1978 ; BORBA , 1983).

Isto se deve ao fato de que, sendo o Mexitil um composto lipossolúvel, é possível que a maior parte dos seus efeitos se deva à sua interação com a membrana plasmática. Sabe-se também que, de todas as parcelas da cadeia, a CoQH_2 citocromo c-redutase é a menos dependente de lipídeos (SINGER, 1974). É portanto previsível que a interação de uma droga lipossolúvel com a membrana cause maiores modificações no comportamento enzimático das porções anteriores da cadeia respiratória (notadamente do complexo I), que sejam mais dependentes de interações com a membrana.

3.3 Efeito do Mexitil sobre a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas e em mitocôndrias rompidas.

Evidentemente existe grande probabilidade de que os efeitos do Mexitil não se restrinjam a um único sítio ou a uma só atividade enzimática. Por ser uma droga lipossolúvel, com prováveis efeitos sobre toda a membrana mitocondri

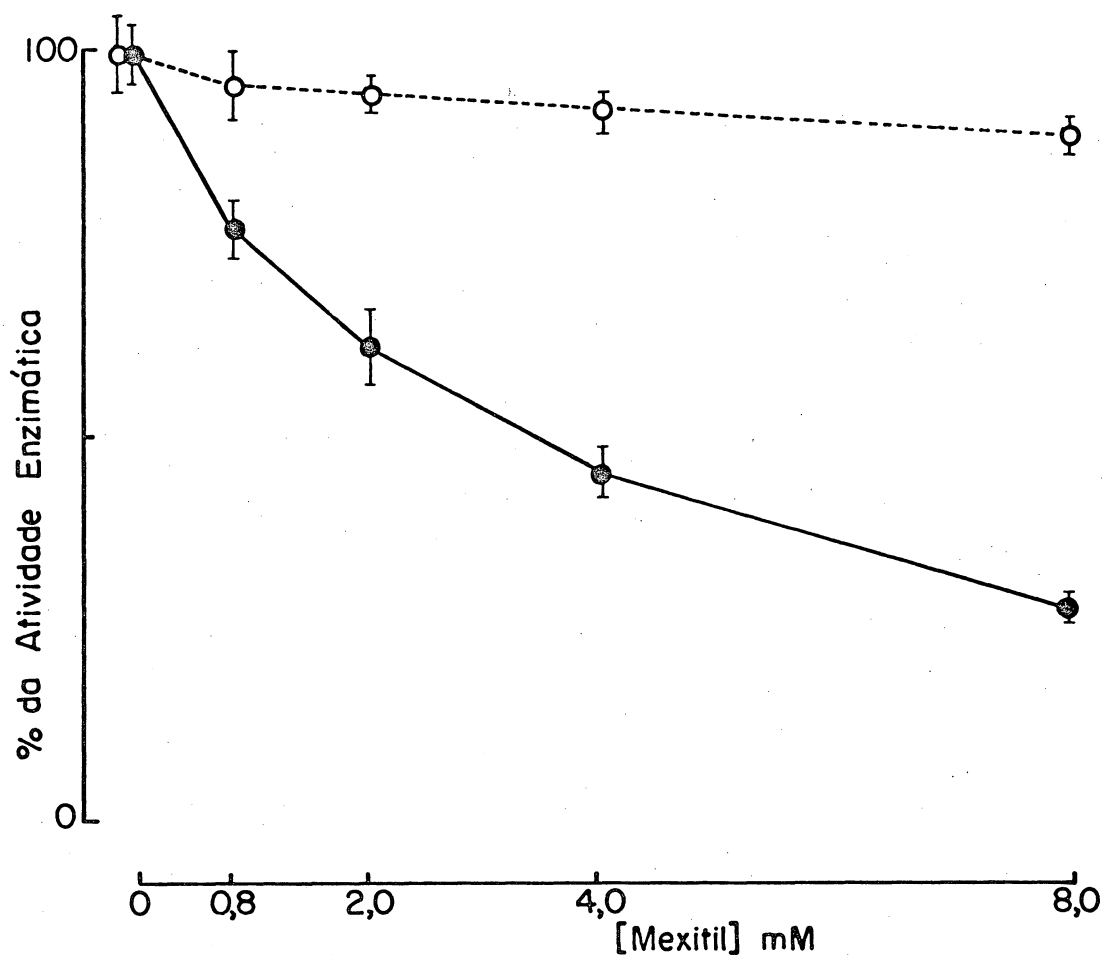


Fig.7 - (o--o) Efeito do Mexitil sobre a atividade ATP ásica de mitocôndrias intactas.

Sistema: sacarose 50mM, Tris-HCl (pH 7,4) 12mM, KCl 50mM , proteína mitocondrial 2mg e ATP 3mM, para um volume final de 1ml. A reação foi iniciada com a adição do ATP e interrompida com TCA 6% depois de 10 minutos de agitação constante a 30°C. A quantidade de ATP hidrolisado foi determinada pela liberação de fosfato inorgânico no sistema. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes, e 100% da atividade enzimática corresponde a 63nmoles de ATP hidrolisados por minuto por miligrama de proteína.

(o—o) Efeito do Mexitil sobre a atividade ATP ásica de mitocôndrias rompidas.

Sistema: Tris-HCl (pH 8,4) 50mM, MgSO₄ 3mM, PEP 2,5mM, piruvato quinase 3 unidades, ATP 4mM e proteína mitocondrial 100µg. A reação foi iniciada com a adição do ATP e bloqueada com TCA 5% depois de 10 minutos de agitação constante a 30°C. A quantidade de ATP hidrolisada foi determinada pela dosagem do fosfato inorgânico liberado no sistema. Os resultados representam a média de quatro experimentos independentes, e 100% da atividade enzimática corresponde a 2,6µmoles de ATP hidrolisados por minuto por miligrama de proteína.

al, é lógico se pensar que todas as atividades enzimáticas ligadas a ela sofrerão maiores ou menores efeitos, devido a uma ou mais causas.

Estas observações se aplicam à ATPase mitocondrial. Sendo ela um complexo de membrana, é natural que a sua atividade sofra modificações devidas à perturbação do seu apoio físico.

Como pode ser visto na figura 7, isto parece ser verdadeiro, já que para mitocôndrias rompidas, a inibição da atividade ATPásica é marcante, enquanto leve decréscimo de atividade (aproximadamente 10%) ocorre em mitocôndrias intactas, o que explicaria uma pequena diminuição da relação ADP:O nos estudos polarográficos.

Já as disparidades obtidas entre as atividades ATPásicas de mitocôndrias intactas e rompidas se devem primariamente às concentrações finais de proteínas usadas nos dois ensaios (0,1mg para o ensaio com mitocôndrias rompidas e 2,0mg para aquele com intactas), e já que as concentrações da droga são as mesmas para ambos os ensaios, têm-se que a relação droga/proteína é bem maior naquele realizado com mitocôndrias rompidas, ocasionando maior inibição da ATPase. Além disto, estas disparidades são provavelmente devidas a uma maior interação do Mexitil com a membrana mitocondrial no caso da atividade ATPásica em mitocôndrias rompidas, uma vez que as duas camadas da bicapa lipídica estão em contacto direto com a droga.

3.4 Efeito do Mexitil sobre o potencial de membrana mitocondrial.

Entre os ensaios realizados com mitocôndrias, o potencial de membrana ($\Delta\Psi$) é um dos que têm trazido maiores problemas para a sua mensuração exata. Várias tentativas têm sido feitas neste sentido, por diversos autores, para elucidação dos valores exatos deste parâmetro, cuja importância reside no fato de ser ele um dos componentes da força próton-motriz ($\Delta\mu\text{H}^+$) em mitocôndrias (ROTTENBERG, 1979 ; BOYER et al., 1977).

Entrementes, foi demonstrado por ÅKERMAN e WIKSTRÖM (1976), que existe uma relação linear entre a resposta espectroscópica da safranina e o valor de $\Delta\Psi$ em preparações mitocondriais oxidando substratos da cadeia respiratória ou hidrolisando ATP. Nestas condições, a safranina, um composto com carga líquida positiva na faixa do pH de ensaio, desloca-se do meio extra para o intramitocondrial (este último carregado negativamente em relação ao primeiro), por simples repulsão eletrostática do meio extramitocondrial, além da atração, de mesma natureza, do intramitocondrial.

Com isto, parte da safranina se agrega em solução, formando dímeros e até mesmo polímeros, sendo que a outra parte se liga a grupos aniônicos da membrana (COLLONA et al., 1973), podendo sofrer agregação em paliçada e, se os sítios de ligação da safranina estiverem bem próximos, havendo passagem à forma polimérica.

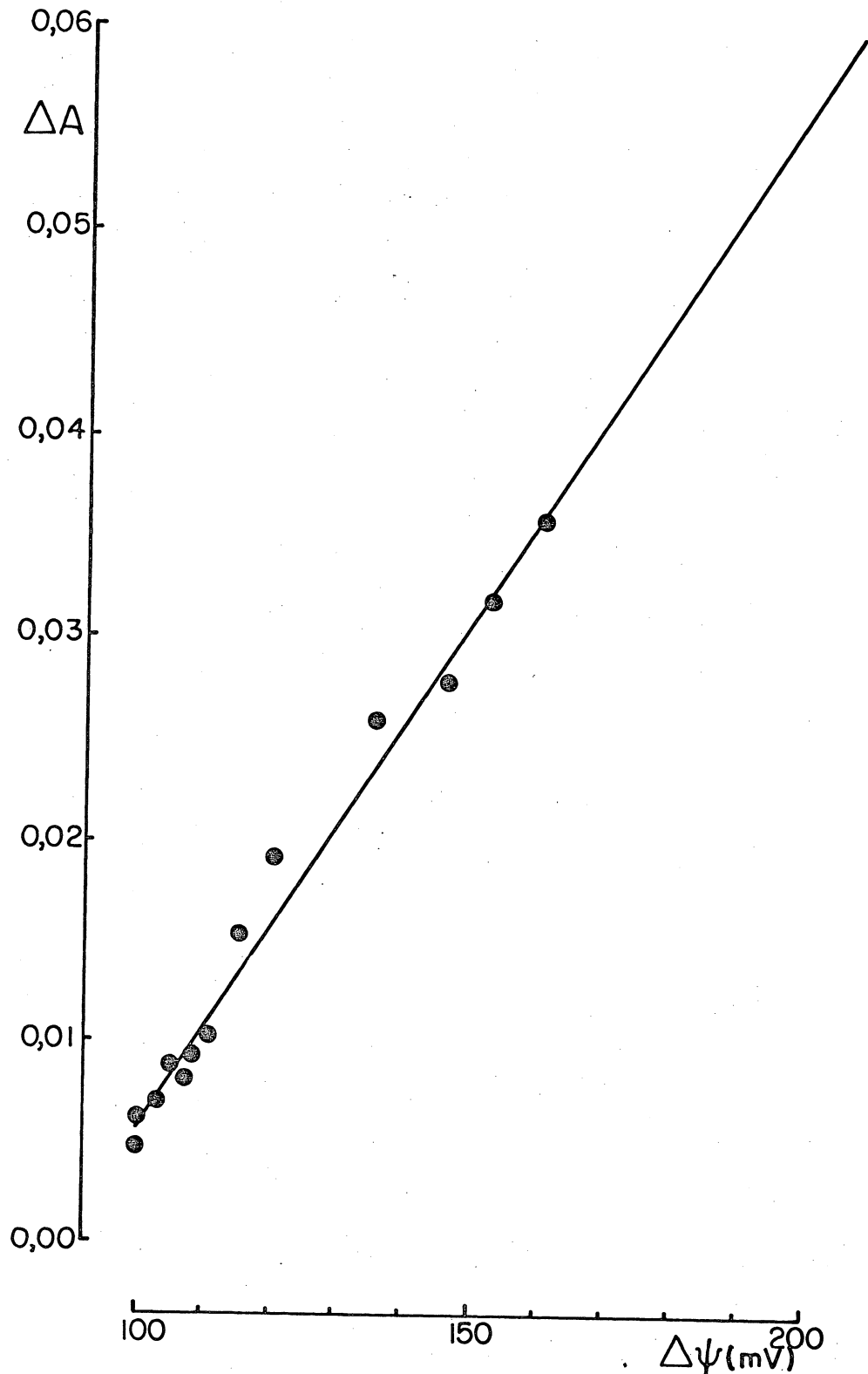


Fig. 8- Variação espectral da safranina induzida pelo potencial de difusão do potássio.

Sistema: sacarose 200mM, HEPES 20mM (pH 7,2), EDTA 0,38 mM, rotenona 4,2 μ M, oligomicina 2 μ g, safranina 9,6 μ M, valinomicina 42ng/ml, FCCP 1mM, KCl 0,083 a 1,67mM e proteína mitocondrial 0,8mg/ml, num volume final de 3ml. O potencial foi calculado de acordo com a equação de Nernst :

$\Delta\psi = 60 \cdot \log K^{+in} / K^{+out}$, sendo $K^{+in} = 120mM$ e K^{+out} conforme o potássio adicionado. A extensão da resposta foi a diferença de absorção em 511-533nm a 28°C, obtida após a adição de valinomicina e aquela obtida após adição do FCCP. Outros detalhes são descritos em Materiais e Métodos.

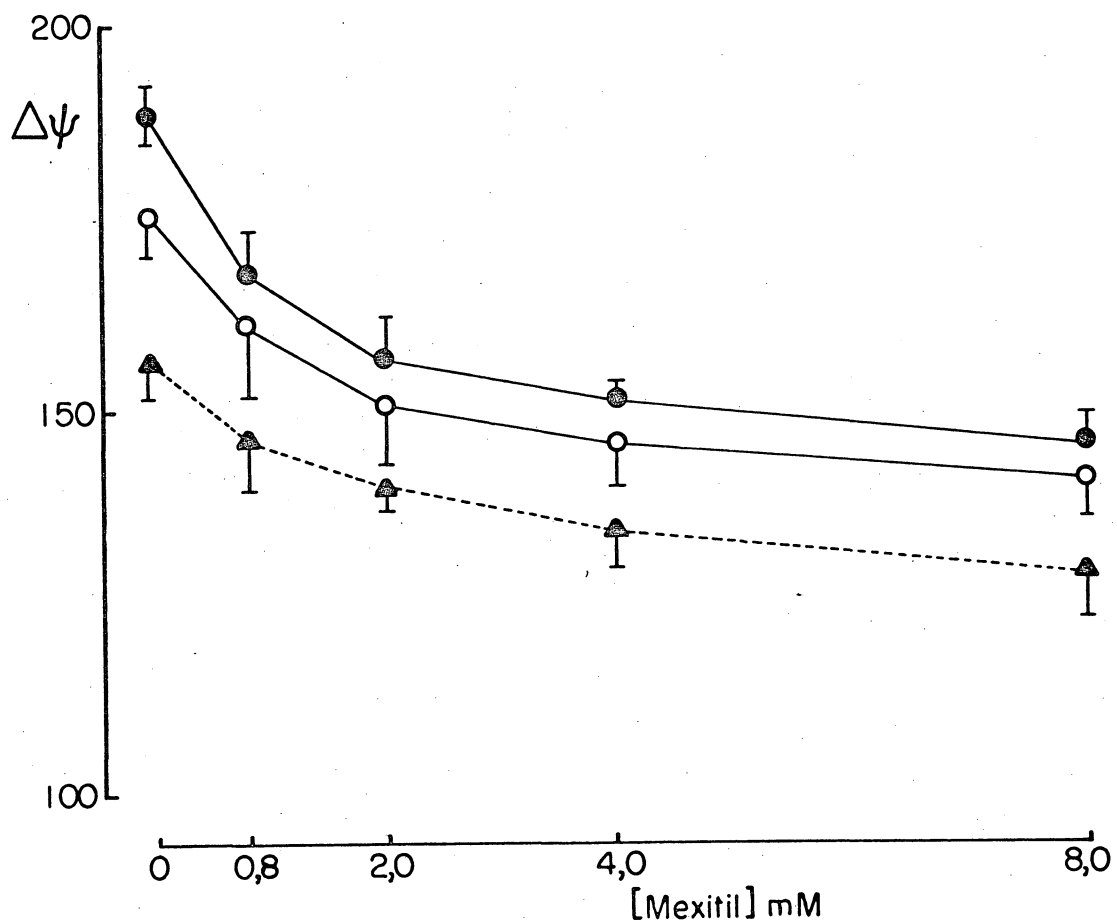


Fig. 9 - Efeito do Mexitil sobre o potencial de membrana. Sistema: sacarose 200mM, HEPES 20mM (pH 7,2), EDTA 0,38mM, KCl 20mM, safranina 10 M, 0,8mg/ml de proteína mitocondrial, suplementado com rotenona 4,2 μ M, oligomicina 2 μ g, KCN 1mM, num volume final de 3ml. Reação iniciada com glutamato de sódio 15mM ●—● (100% correspondendo a 188mV); ATP 0,38mM ○—○ (100% correspondendo a 176mV) e TMPD 0,6mM e ascorbato de sódio 15mM ▲--▲ (100% correspondendo a 157mV). Alterações na densidade óptica foram registradas em 511-533nm a 28°C. Os cálculos foram feitos com base na curva de calibração mostrada na figura 8.

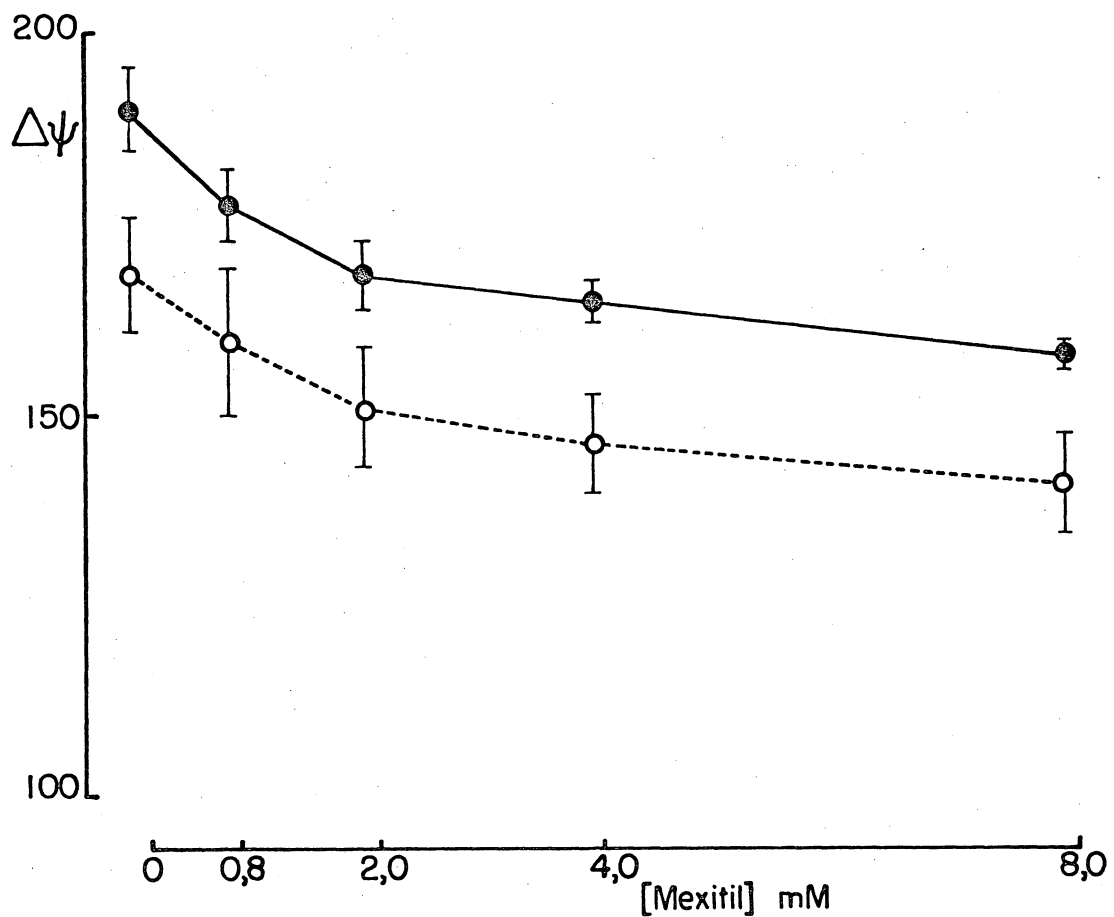


Fig. 10 - Efeito do Mexitil sobre o potencial de membrana. Sistema: sacarose 200mM, HEPES 20mM (pH 7,2), EDTA 0,38mM; KCl 20mM, safranina 10 μ M, 0,8mg/ml de proteína mitocondrial, suplementado com rotenona 4,2 μ M, oligomicina 2 μ g e KCN 1mM, num volume final de 3ml. A reação foi iniciada com succinato de sódio 5mM \bullet — \bullet (100% correspondendo a 190mV); α -cetoglutarato 15mM o--o (100% correspondendo a 168mV). Alterações da densidade óptica foram registradas em 511-533nm a 28°C. Os cálculos foram feitos com base na curva de calibração mostrada na figura 8.

Esta passagem é acompanhada de alterações espec
trofotométricas, tanto maiores quanto maior for o influxo
de safranina, causado pela diferença de cargas do meio ex
tra para o intramitocondrial (diferença de potencial elê
trico), possibilitando estabelecer uma relação direta entre
o valor do $\Delta\Psi$ e o ΔDO resultante do acúmulo e da polimeri-
zação da safranina na mitocôndria (ZANOTTI e AZZONE,1980).

Após determinada a curva de calibração que seria
usada para mensuração dos potenciais de membrana (mantendo
se a melhor relação possível safranina/proteína e a concen-
tração final de safranina mais adequada, para maior lineari-
dade), a ação do Mexitil sobre o potencial de membrana de
mitocôndrias energizadas teve início com o uso de cinco
substratos. Além do glutamato, do α -cetoglutarato e do suc-
cinato, usados nos estudos polarográficos, escolheu-se o
ATP e o ascorbato+TMPD porque tanto a hidrólise do ATP
quanto a oxidação do ascorbato + TMPD sofrem alteração mí
nima com a droga. Deste modo, uma eventual queda de poten
cial com estes dois substratos, seria devida unicamente a
alterações de permeabilidade de membrana e não à ação da
droga sobre a cadeia respiratória.

Como pode ser observado nas figuras 9 e 10, a que
da do potencial de membrana, em termos proporcionais, não
difere muito para os cinco substratos usados, embora a velo
cidade de formação deste potencial caia bastante para al
guns deles (não mostrado). Se bem que haja pequenas va
riações do potencial de membrana na ausência do Mexitil (em

função do substrato empregado e das preparações mitocondriais), a queda dos mesmos, frente a concentrações crescentes da droga, mostram perfis praticamente idênticos para todos os substratos. (Os desvios padrões relativamente altos, notadamente no caso do α -cetoglutarato, se devem mais a preparações mitocondriais diferentes - já que os ensaios foram realizados em dias diferentes -, que a variações dentro de uma mesma bateria de experimentos).

Tal semelhança de resultados permite afastar, já de início, a hipótese de que esta diminuição do potencial de membrana para os vários substratos, seja decorrente da inibição da cadeia respiratória, uma vez que o ascorbato+ TM PD é um substrato redutor do último sítio conservativo da cadeia respiratória, o qual não sofre nenhuma ação aparente do antiarrítmico. (Mesmo a oxidação do succinato e a hidrólise do ATP mostraram sofrer bem pouca influência).

Existe portanto, uma dissipação do potencial de membrana motivada pela droga, e que pode ser provocada pelo influxo de prótons e/ou cátions, como o potássio (no presente ensaio) ou mesmo o sódio. Para verificar esta proposição, determinou-se o efluxo de prótons da matriz mitocondrial, em presença do Mexitil.

Antes porém, uma breve análise dos estudos polarográficos poderá servir de auxílio para a elucidação desta questão.

Segundo a teoria quimiosmótica de MITCHEL (1961), em mitocôndrias acopladas e respirando, o consumo de O_2 é

lento na ausência de ADP, uma vez que a força próton-motriz ($\Delta\mu_{H^+}$) não está sendo utilizada, inibindo assim a cadeia respiratória (estado IV). Quando se adiciona ADP ao sistema de reação, a velocidade de consumo de O_2 aumenta (estado III) por causa do afastamento da inibição da cadeia (motivado pela utilização da força próton-motriz), até que todo o ADP seja esgotado, quando então a velocidade respiratória retorna ao ritmo característico do estado IV. Como foi dito em Materiais e Métodos, a relação entre o número de moles de ADP consumidos (ou adicionados), durante o estado III (em nmoles), e o número de moles (em nmoles de O) de oxigênio reduzidos no mesmo estado, nos fornece a relação ADP:O.

Supondo-se no entanto, que durante o estado III haja influxo de prótons para o interior da matriz mitocondrial, causado pela presença de uma droga que não desacople totalmente a respiração da fosforilação, é de se esperar um abaixamento da relação ADP:O, uma vez que muitos prótons ejetados da matriz mitocondrial não são utilizados para a síntese de ATP e consequente fosforilação do ADP. Em outras palavras, mais oxigênio vai ser consumido para compensar os prótons "inúteis" (não conservativos), ejetados da matriz mas não usados para fosforilar o ADP. Este desacoplamento parcial produziria um outro efeito, que é o aumento da velocidade respiratória no estado IV. Havendo influxo de prótons não conservativos tanto no estado III quanto no estado IV, a velocidade de consumo de O_2 neste último aumen

ta, fazendo com que a sua velocidade respiratória se aproxime da do estado III.

Este não é o caso. Embora possa ocorrer ligeira queda da relação ADP:O (figuras 1,2 e 3), se realmente houver uma desenergização da mitocôndria por influxo de prótons não conservativos, o aumento da velocidade respiratória do estado IV seria muito mais notória, principalmente em concentrações maiores do antiarrítmico.

Resta portanto, explicar os três fatos - estabilidade da velocidade respiratória do estado IV, queda muito pequena da relação ADP:O e diminuição do potencial de membrana.

3.5 Efeito do Mexetil sobre o efluxo de prótons.

Depois dos resultados obtidos com o estudo do potencial elétrico de membrana (descartada a hipótese de que a diminuição deste parâmetro seja devido a influência do Mexetil sobre a cadeia respiratória), resta apenas definir entre duas possibilidades; ou o antiarrítmico causa influxo de prótons para a matriz mitocondrial (prótons não utilizados para a síntese do ATP - não conservativos), ou a diminuição do potencial é causada pela entrada de cátions, como o sódio e/ou o potássio, que normalmente contribuem para a manutenção do potencial de membrana.

Supondo a primeira hipótese, do influxo de prótons não conservativos, seria de se esperar, como resultado, uma diminuição do efluxo total de prótons. Ou mais precisa

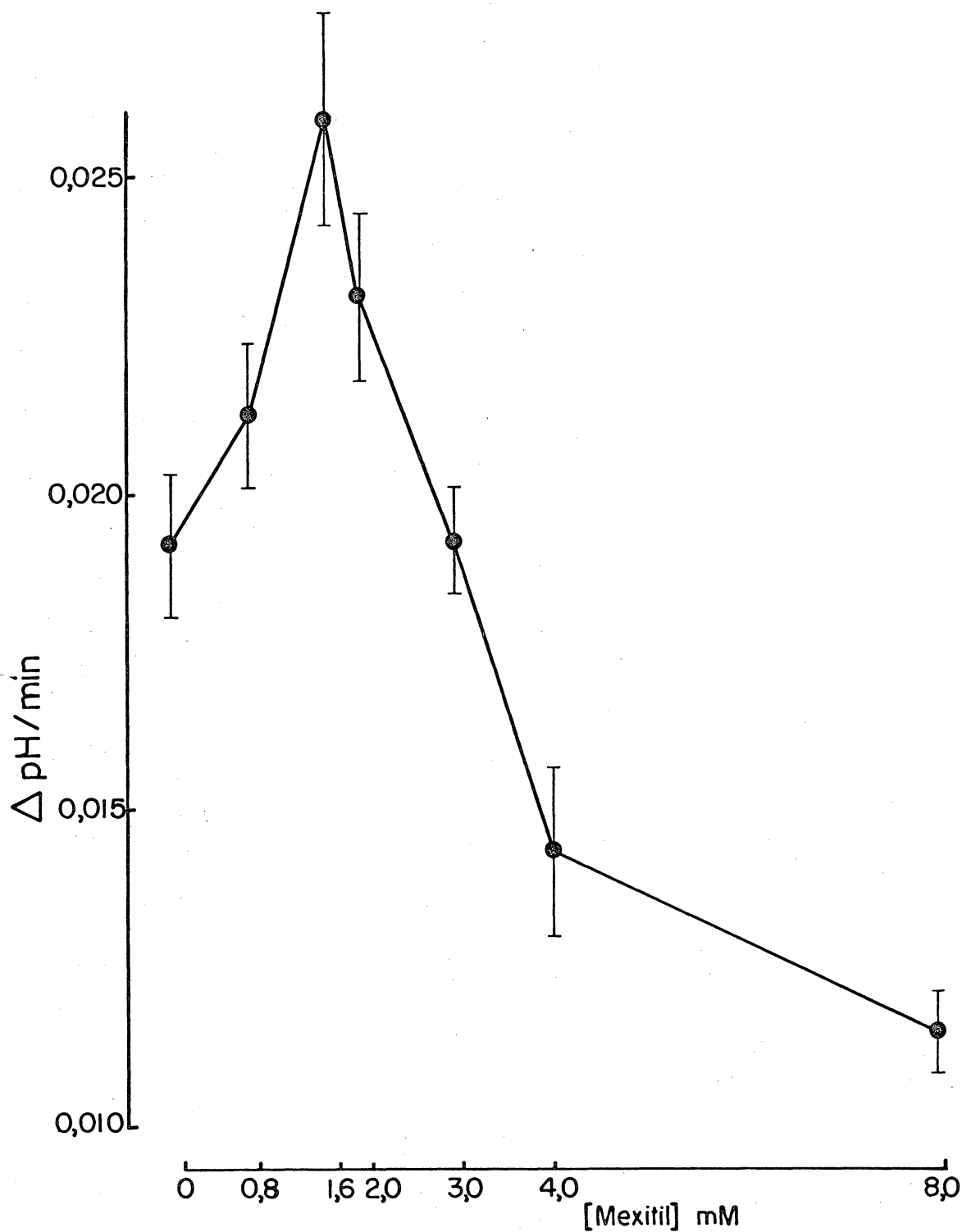


Fig. 11 - Efeito do Mexitil sobre o efluxo de prótons induzido pelo ATP em mitocôndrias.

Sistema: KCl 150mM, Tris-HCl (pH 7,4) 1mM, rotenona 2,5 μg , proteína mitocondrial 1mg e ATP (pH 7,4) 4mM. O efluxo foi iniciado com a adição do ATP e os resultados (média de três experimentos) estão expressos em ΔpH por minuto.

mente, uma diminuição da variação do pH do sistema extramitocondrial, num dado intervalo de tempo, motivado pelo fato de que uma certa parcela de prótons ejetados pela cadeia respiratória seria novamente captada pela matriz mitocondrial, não contribuindo para a diminuição do pH do meio extramitocondrial. Numa situação destas, a curva traçada de concentração da droga contra variação do pH do meio por minuto, teria um perfil semelhante aos resultados mostrados para a queda de potencial de membrana (figuras 9 e 10).

Entretanto, quando se analisa a figura 11, referente à variação do pH por minuto, em função da concentração do antiarrítmico, vê-se que a máxima variação do pH ocorre para uma concentração de aproximadamente 1,6mM de Mexilitil e não no controle (ausência da droga), e que para maiores concentrações da droga, esta variação é aos poucos achatada.

Várias razões caberiam para explicar este tipo de perfil. Uma delas seria uma possível ativação da ATPase mitocondrial frente à concentração de 1,6mM da droga. Esta hipótese parece pouco viável, todavia, pois já se sabe que ela causa uma inibição crescente da ATPase mitocondrial (figura 7).

Outra hipótese, mais razoável, é de que ao invés de um influxo de prótons, ocorra um influxo de íons potássio (veja-se a constituição do sistema utilizado no experimento). Isto por um motivo: havendo um influxo de cátions para a matriz mitocondrial, deve haver também uma queda da

força próton-motriz ($\Delta\tilde{\mu}H^+$), devido à redução do potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$), e um conseqüente aumento - com pensatório - do ΔpH . (Recorde-se aqui que a força próton-motriz ($\Delta\tilde{\mu}H^+$) é dada, a grosso modo, pela expressão simples $\Delta\tilde{\mu}H^+ = \Delta\Psi + \Delta pH$).

Pela análise desta expressão, observa-se que um decréscimo de $\Delta\Psi$ implica num aumento de ΔpH a fim de manter a força próton-motriz constante. E é isto que o mecanismo mitocondrial fez, ativando a hidrólise de ATP, aumentando a acidez do sistema de reação.

Outro aspecto, porém, deve ser discutido. A par tir da concentração da droga em que ocorre a máxima varia ção do pH do sistema, esta variação por unidade de tempo vai caindo gradativamente até valores de cerca de 60% do controle, na máxima concentração do antiarrítmico. Tal fato pode ser explicado de duas maneiras distintas:

1- A partir de uma certa concentração da droga, o desarranjo da membrana mitocondrial é tal que ela, além do potássio, permitiria a entrada de prótons. Deste modo é cla ro que, mesmo funcionando no máximo da sua capacidade, a ATP ase mitocondrial jamais conseguiria repor a força próton-moforço so admitir que a variação do pH do sistema em função do tem po, sofreria uma drástica redução.

2- A partir da concentração de Mexitil de 1,6mM no sistema de reação, a inibição da ATPase é tal (recorde-se da sua ação sobre este complexo), que menores quantida-

des de ATP seriam hidrolizadas em certa unidade de tempo. Em consequência disto, também menores quantidades de prótons seriam bombeadas pelo complexo, causando menor variação do pH por minuto.

Como se vê, fica extremamente difícil descartar totalmente a hipótese do refluxo de prótons para o interior da matriz, causado pela droga. Um argumento que se poderia usar é de que, não havendo entrada de prótons não conservativos, como sugerem as evidências dos estudos polarográficos, mesmo para concentrações maiores da droga, também não haveria tal fenômeno no estudo sobre o efluxo de prótons.

Este argumento pode conter um certo erro, uma vez que as condições usadas em polarografia não são iguais às usadas no efluxo de prótons. Um exemplo disto é o tamponamento - muito mais fraco no sistema usado para o estudo do efluxo de prótons.

Novamente aqui, portanto, cabe a linha de raciocínio usada anteriormente para as outras análises. Como não é de se esperar " um efeito - uma causa " para uma droga que atua sobre algo tão extenso como a membrana mitocondrial, é possível que o efeito notado na figura 11 seja o resultado das duas causas aventadas acima.

3.6 Efeito do Mexitil sobre o "swelling" mitocondrial .

Como foi visto ao longo deste trabalho, todas as evidências apontam para um influxo de potássio ou de sódio

para a matriz mitocondrial, embora não esteja excluída a hipótese de um refluxo paralelo de prótons, ambos causados pela presença do Mexitil no sistema de reação.

Já o estudo das alterações do "swelling" mitocondrial alterado por esta droga não busca dirimir esta dúvida, e sim comprovar o provável aumento da permeabilidade da membrana a estes cátions quando em presença do antiarrítmico. Uma dúvida que se desfaz logo na primeira análise dos resultados obtidos.

Como se pode notar pelas figuras 12 a 19, o "swelling" passivo (ausência do substrato de oxidação ou de hidrólise) está grandemente aumentado em concentrações crescentes da droga, tanto para aquele induzido por sal de sódio quanto para com o sal de potássio. Isto se deve ao fato de que, com a entrada de um ou de outro destes cátions no meio intramitocondrial, este sofreu aumento da sua osmolaridade, atraindo mais água para o seu interior. Como consequência houve o aparecimento de um "swelling" mitocondrial passivo, inexistente na ausência da droga.

O influxo destes cátions, causado pela presença da droga, fica ainda mais evidente se for considerado que quantidades crescentes desta, causam uma entrada também crescente de sódio ou de potássio (e em consequência um aumento do "swelling" passivo), a tal ponto que o próprio "swelling" ativo, induzido pela adição dos substratos, é gradativamente reduzido.

Nota-se também que para concentrações maiores da droga, a reversão do "swelling" esperada depois da adição

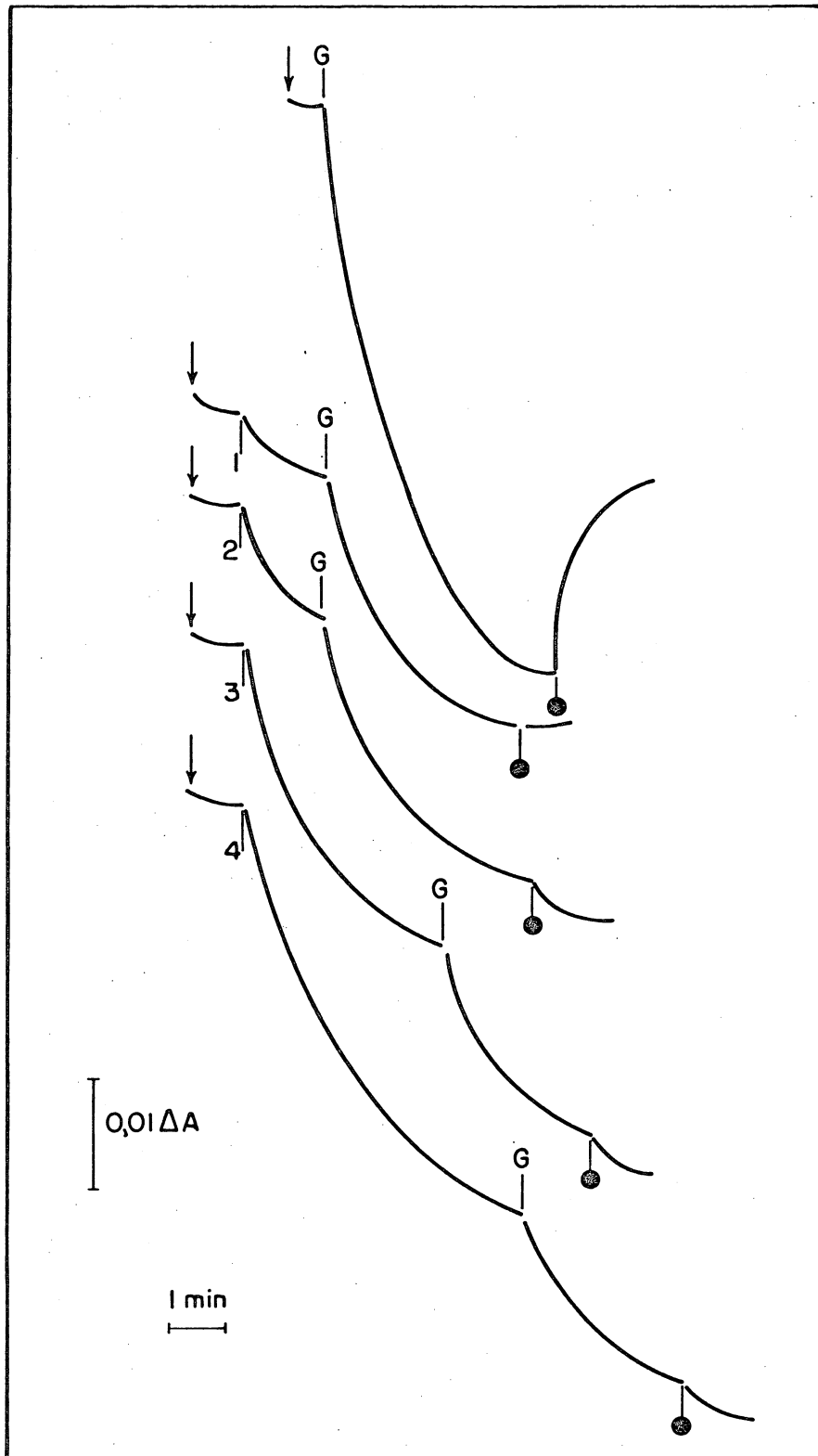


Fig. 12 - Efeito do Mexitil sobre o "swelling" mitocondrial dirigido por glutamato, na presença de sal de sódio.

Sistema: sacarose 100mM, Tris (pH 7,5) 30mM, EDTA 0,5mM, acetato de sódio 50mM, proteína mitocondrial 1,5mg, suplementado adequadamente com glutamato 15mM e cianeto de sódio 100 μ M, num volume final de 3ml. O experimento teve início com a adição da proteína (\downarrow), seguido pela adição da droga nas concentrações finais no sistema de 1- 0,8mM , 2- 2,0mM, 3- 4,0mM e 4 - 8,0mM, depois glutamato (G) e finalmente de cianeto (\bullet), para a reversão do "swelling", que foi acompanhada em 575nm a 28°C.

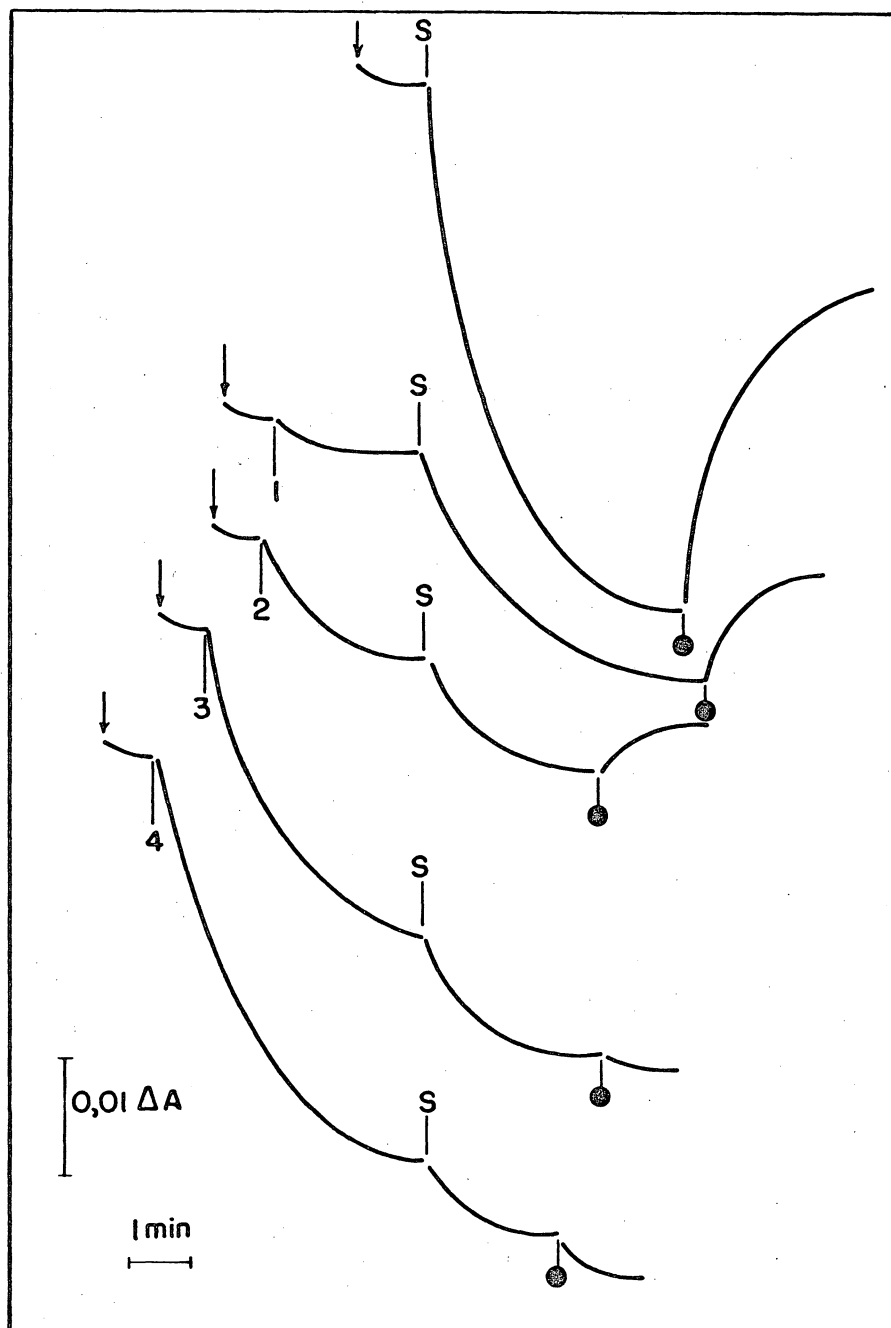


Fig. 13 - Efeito do Mexilit sobre o "swelling" mitocondrial dirigido por succinato na presença de sal de sódio.

Sistema: o mesmo da figura 12, suplementado com succinato de sódio 15mM, rotenona 4,2 μ M e cianeto de sódio 100 μ M, num volume final de 3ml. (\downarrow) proteína e rotenona, seguidas pela adição da droga para as concentrações finais de 1- 0,8mM, 2- 2,0mM, 3- 4,0mM e 4- 8,0mM. (S) succinato e (●) cianeto. O "swelling" foi acompanhado em 575nm a 28°C.

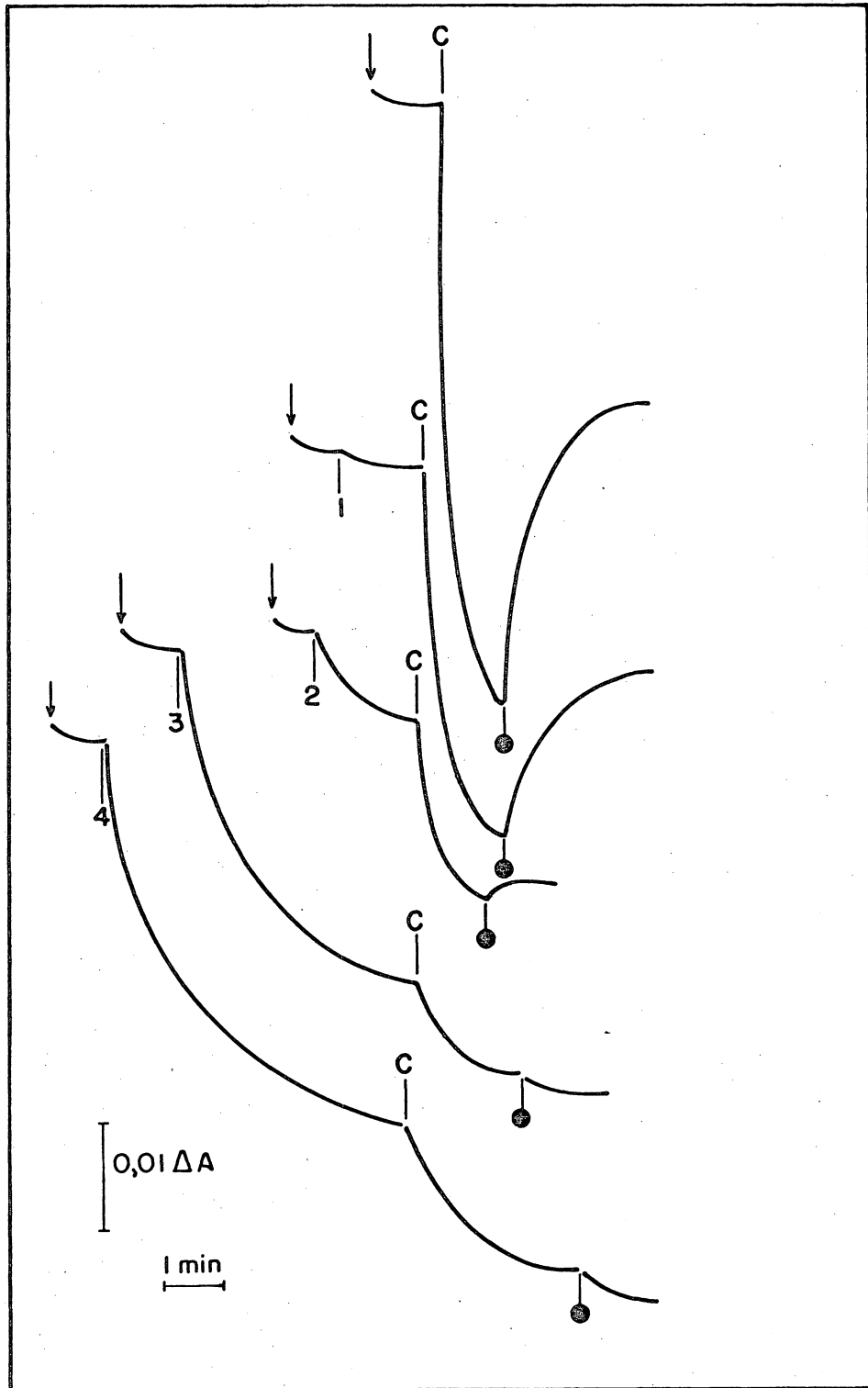


Fig. 14 - Efeito do Mexilit sobre o "swelling" mitocondrial dirigido por ascorbato + TMPD na presença de sal de sódio.

Sistema: o mesmo da figura 12, suplementado adequadamente com TMPD 0,6mM e ascorbato de sódio 15mM, rotenona 4,2 μ M e cianeto de sódio 100 μ M, num volume final de 3ml. O experimento teve início com a adição da proteína e da rotenona (\downarrow), seguido pela adição da droga nas concentrações finais de 1- 0,8mM, 2- 2,0mM, 3- 4,0mM e 4- 8,0mM, depois do TMPD e ascorbato (C), e finalmente do cianeto (\bullet) para a reversão do "swelling", acompanhado em 575nm, a 28°C.

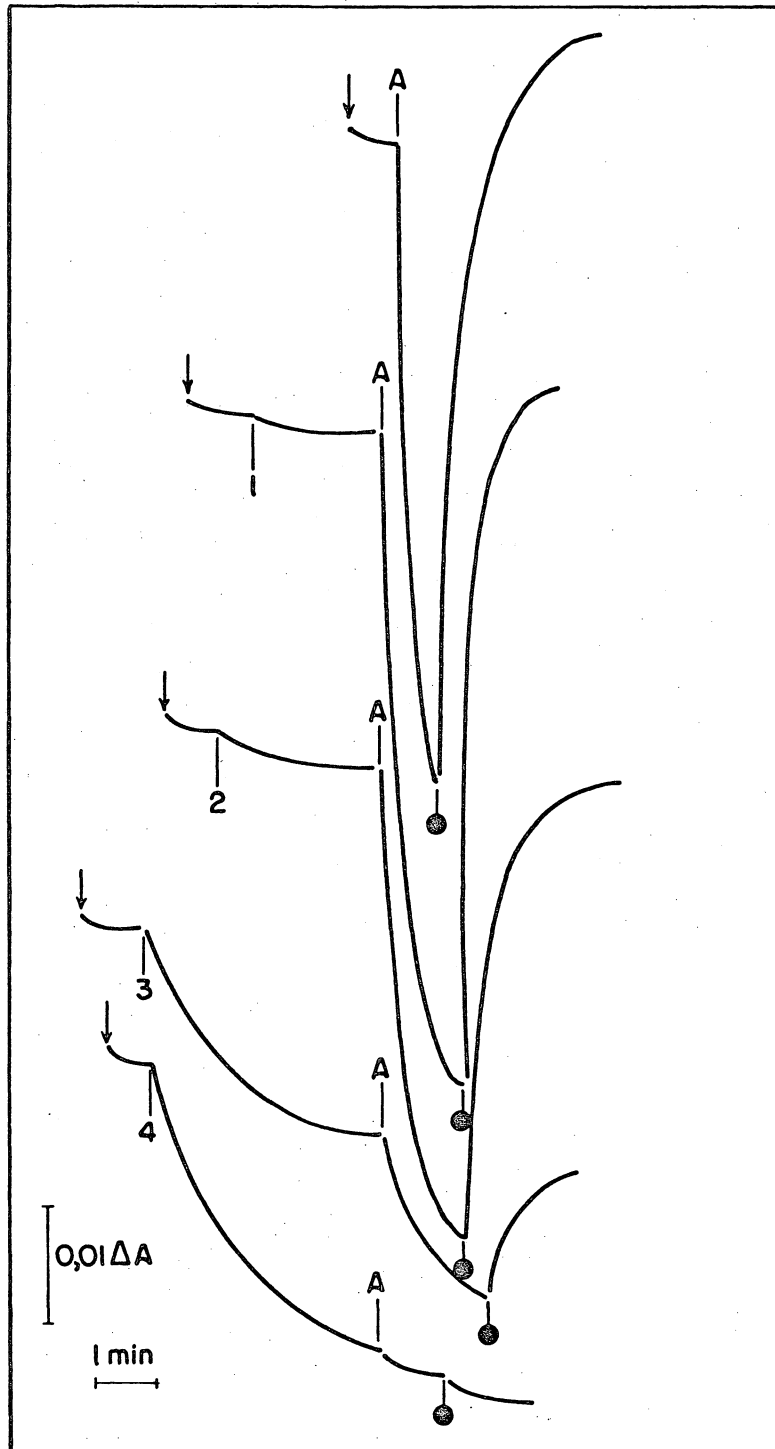


Fig.15 - Efeito do Mexilitil sobre o "swelling" mitocondrial dirigido pelo ATP, em presença de sal de sódio. Sistema: o mesmo da figura 12, suplementado adequadamente com ATP 5mM, cianeto de sódio 100 μ M e FCCP 0,48 μ M, para um volume final de 3ml. O experimento teve início com a adição da proteína e do cianeto (\downarrow), seguido pela da droga nas concentrações finais de 1- 0,8mM, 2- 2,0mM, 3- 4,0mM e 4- 8,0mM, do ATP (A) e finalmente do FCCP (\bullet) para a reversão do "swelling", acompanhado em 575nm a 28°C.

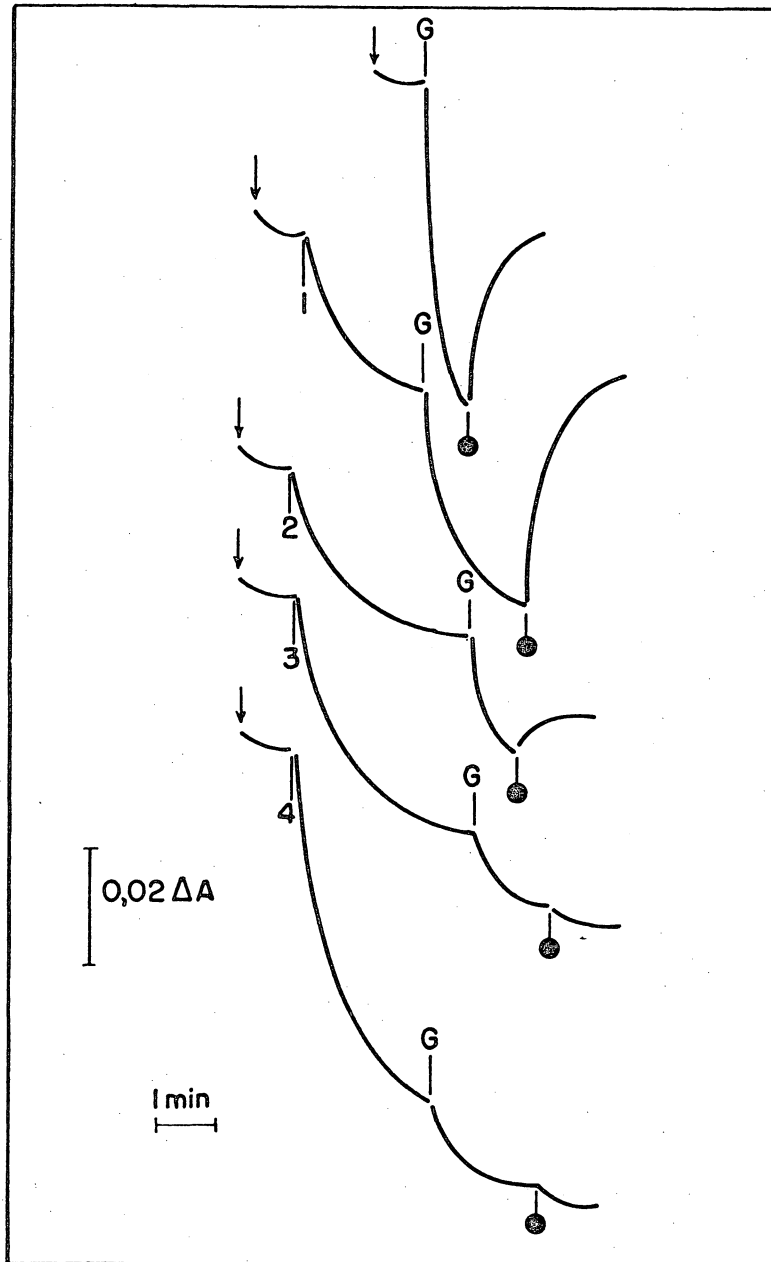


Fig. 16 - Efeito do Mexitil sobre o "swelling" mitocondrial dirigido por glutamato, na presença de sal de sódio.

Sistema: sacarose 100mM, KH_2PO_4 20mM, Tris (pH 7,4) 30mM, EDTA 0,5mM e proteína mitocondrial 1,5mg, suplementado adquadamente com glutamato de sódio 15mM, rotenona 4,2 μM , valinomicina 1,7 $\mu\text{g/ml}$ num volume final de 3ml. O experimento foi iniciado com a adição da proteína (\downarrow), seguida pela da droga em concentrações finais de 1- 0,8mM, 2- 2,0mM, 3- 4,0mM e 4- 8,0mM. Em seguida foram adicionados o glutamato e a valinomicina (G) e finalmente a rotenona (\bullet) para a reversão do "swelling" acompanhado em 520nm a 28°C.

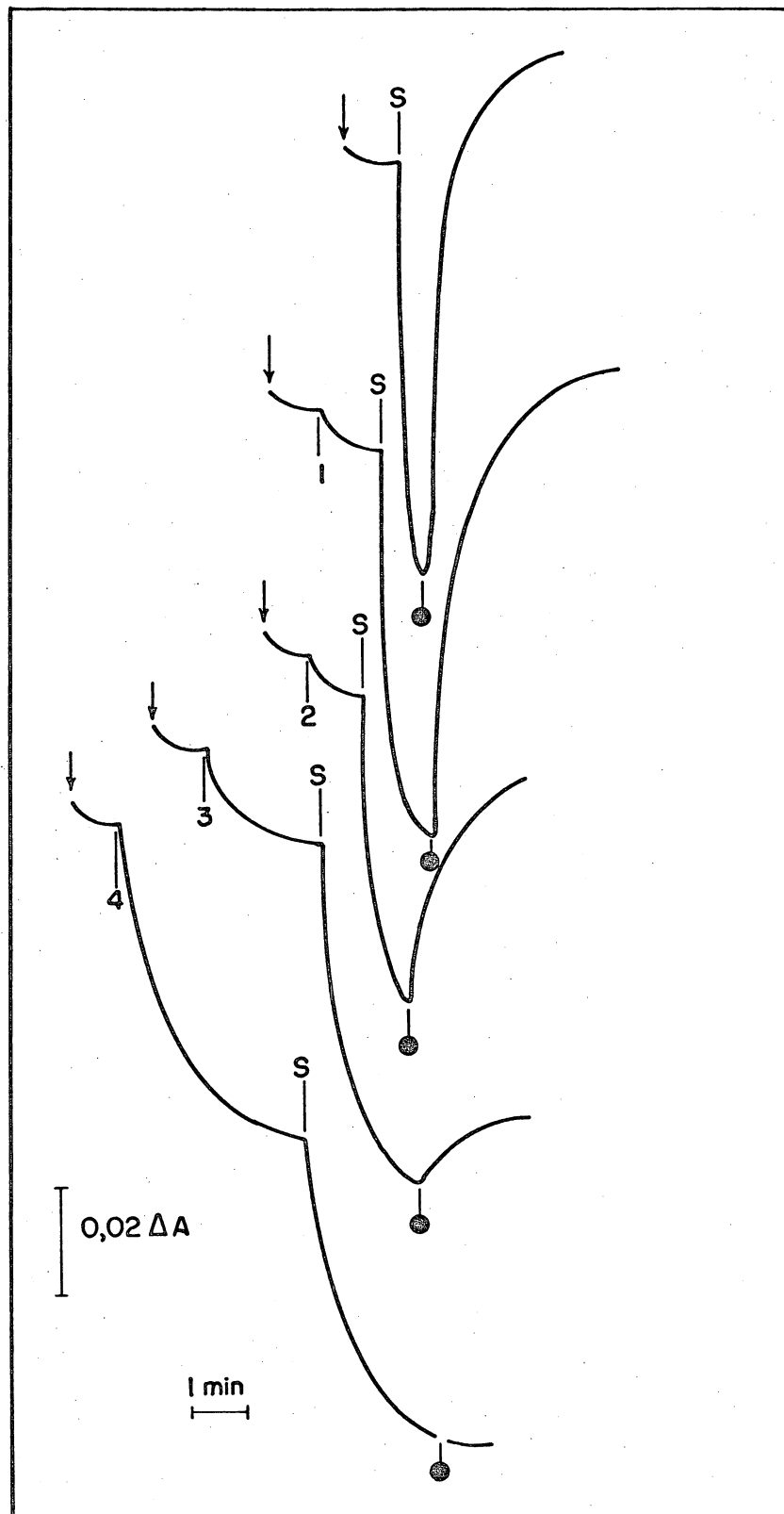


Fig. 17 - Efeito do Mexitil sobre o "swelling" mitocondrial dirigido por succinato, na presença de sal de potássio.

Sistema: o mesmo da figura 16, suplementado adequadamente com rotenona $4,2\mu\text{M}$, valinomicina $1,7\mu\text{g/ml}$, succinato de sódio 15mM e cianeto de sódio $100\mu\text{M}$. As adições se fizeram na ordem; (\downarrow) proteína e rotenona, droga nas concentrações finais de 1- $0,8\text{mM}$, 2- $2,0\text{mM}$, 3- $4,0\text{mM}$ e 4- $8,0\text{mM}$, (S) succinato e valinomicina e (●) cianeto para a reversão do "swelling", acompanhado em 520nm , a 28°C .

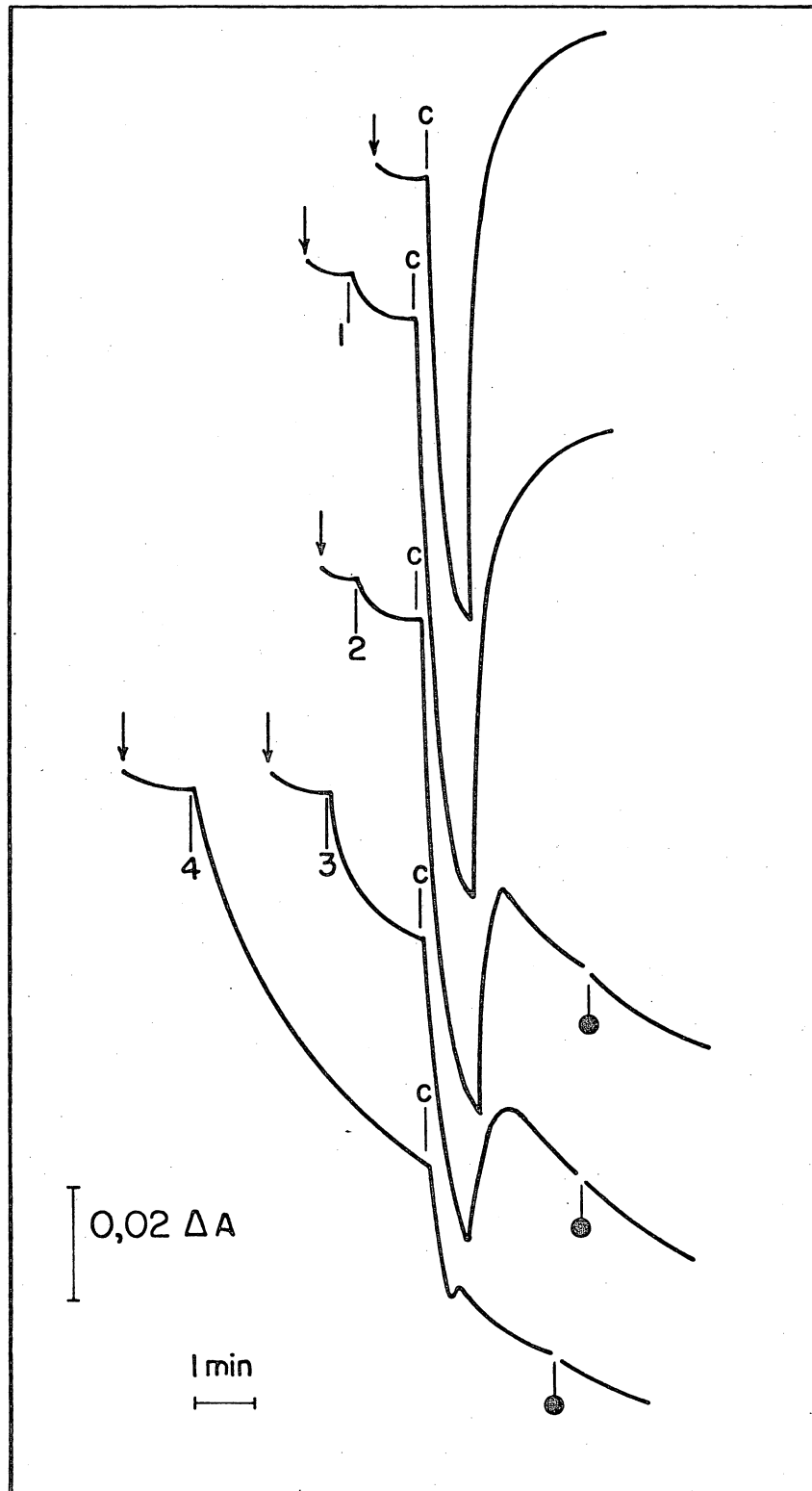


Fig. 18 - Efeito do Mexilit sobre o "swelling" mitocondrial dirigido por ascorbato + TMPD na presença de sal de potássio.

Sistema: o mesmo da figura 16, suplementado adequadamente com rotenona $4,2\mu\text{M}$, valinomicina $1,7\mu\text{g/ml}$, ascorbato de sódio 15mM + TMPD $0,6\text{mM}$ e cianeto de sódio $100\mu\text{M}$. As adições se fizeram como segue: (\downarrow) proteína e rotenona, droga nas concentrações finais de 1- $0,8\text{mM}$, 2- $2,0\text{mM}$, 3- $4,0\text{mM}$ e 4- $8,0\text{mM}$, (C) ascorbato e valinimicina e (●) cianeto para a reversão do "swelling", acompanhado em 520nm , a 28°C .

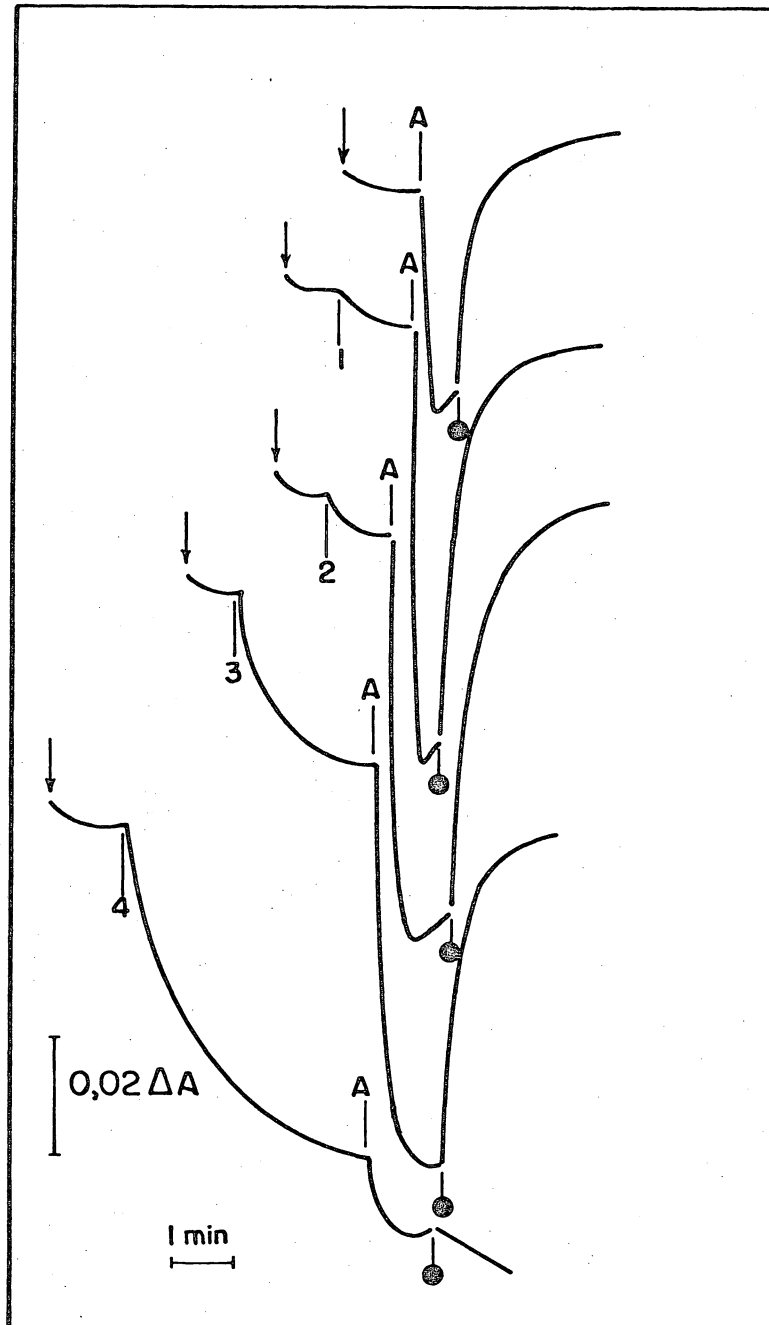


Fig. 19 - Efeito do Mexilit sobre o "swelling" mitocondrial dirigido por ATP na presença de sal de potássio. Sistema: o mesmo da figura 16, suplementado adequadamente com cianeto de sódio $100\mu\text{M}$, ATP 5mM , valinomicina $1,7\mu\text{g/ml}$ e FCCP $0,48\mu\text{M}$. As adições se fizeram como segue: (\downarrow) proteína e cianeto, droga nas concentrações finais de 1- $0,8\text{mM}$, 2- $2,0\text{mM}$, 3- $4,0\text{mM}$ e 4- $8,0\text{mM}$, (A) ATP e valinomicina, e FCCP (\bullet) para a reversão do "swelling" acompanhado em 520nm a 28°C .

do cianeto ou do FCCP, simplesmente não aconteceu. Uma hipótese plausível para este fenômeno poderia ser o desaparecimento total - ou quase total - do potencial elétrico de membrana, causado pela entrada excessiva dos cátions.

Esta hipótese se torna clara quando se raciocina em termos de uma diminuição do ΔpH entre matriz mitocondrial e sistema de reação, provocada pela adição de um bloqueador da cadeia respiratória como o cianeto ou de um desacoplador como o FCCP. Nestas condições, a tendência natural dos prótons é refluir para a matriz, havendo uma expulsão de cátions, reduzindo a osmolaridade do meio intramitocondrial e revertendo o "swelling". Este refluxo de prótons, entretanto, vai depender de um potencial elétrico de membrana para se processar. Inexistindo este último, inexistirá a reversão do "swelling".

É o que parece acontecer no caso de altas concentrações da droga. Ao que tudo indica, a entrada de cátions para o interior da matriz é tão grande que chega a anular completamente o potencial de membrana, a ponto de impossibilitar a entrada de prótons (ou de deixá-la apenas por conta de um fenômeno de difusão).

Este último raciocínio parece ir totalmente contra os resultados dos estudos polarográficos, em que mitocôndrias sujeitas às mesmas concentrações da droga (que aqui provocam desaparecimento do potencial de membrana), continuam fosforilando, com uma relação ADP:O e com a velocidade respiratória do estado IV relativamente inalteradas. A-

contece porém, que as condições do sistema de reação usadas naqueles estudos - isotônicos em relação à matriz mitocondrial -, são totalmente diferentes das condições do presente sistema de ensaio (hipotônico em relação à matriz mitocondrial). Tentativas de induzir o mesmo "swelling" usando-se mitocôndrias suspensas em meio de VOSS (1961), produziram resultado nulo.

4. DISCUSSÃO FINAL.

Embora o intuito inicial do presente trabalho não tenha sido o de esgotar, numa pesquisa exaustiva, todas as alterações sobre a fisiologia mitocondrial, causadas pelo antiarrítmico em estudo, os dados colhidos até a presente data já possibilitam uma visão panorâmica das interações principais da droga. Interações que podem ser resumidas em dois efeitos principais, e que cabem como explicação para os resultados colhidos durante a fase experimental.

São eles: 1- Inibição do complexo I da cadeia respiratória e 2- Aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial a cátions como o sódio e o potássio.

1- Inibição da complexo I da cadeia respiratória.

Tendo em vista os resultados dos estudos polarográficos, tinha-se uma pálida idéia deste ítem, uma vez que o efeito mais marcante da ação do antiarrítmico era a diminuição da velocidade respiratória no estado III, durante a oxidação dos substratos NAD^+ dependentes (glutamato e α -cetoglutarato). E, embora outro efeito notável tenha sido a redução do controle respiratório (RC), este último pode ser visto apenas como consequência do primeiro, uma vez que não houve alterações significativas no estado IV da respiração mitocondrial. Paralelamente pequena redução da relação ADP:O foi observada na oxidação destes substratos.

Já na oxidação do substrato FAD dependente (succinato), houve uma repetição de todos os efeitos, porém com uma grande diferença; longe de ser tão drástica quanto no

Complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons.

- I - NADH CoQ - redutase
- II - succinato CoQ - redutase
- III - CoQH₂ citocromo c - redutase
- IV - citocromo c - oxidase

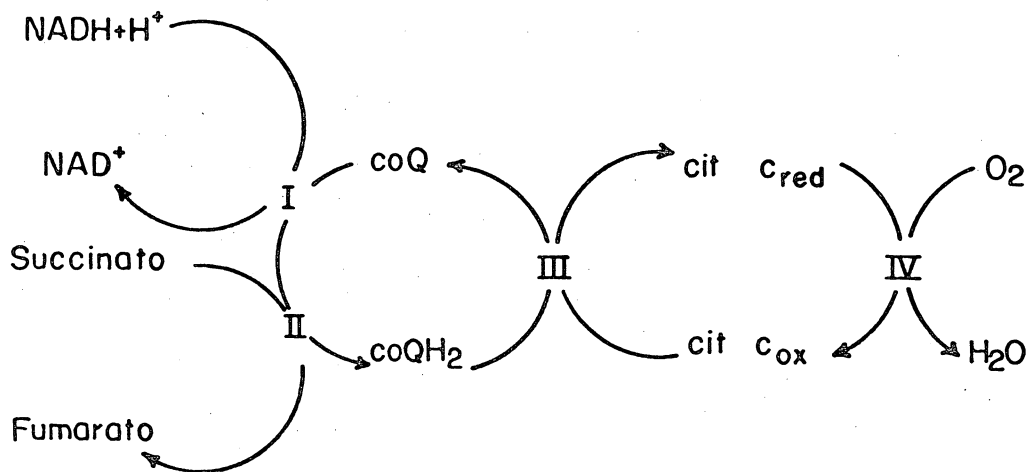
NADH - oxidase (I,III e IV) - grande inibição.

NADH citocromo c - redutase (I e III) - grande inibição.

succinato - oxidase (II,III e IV) - pequena inibição.

citocromo c - oxidase (IV) - nenhuma inibição.

NADH - desidrogenase (parte do complexo I) - estímulo.



Esquema 1 - Efeito do Mexitil sobre os vários sistemas enzimáticos em mitocôndrias.

Note-se que onde o complexo I está envolvido no transporte de elétrons, a inibição provocada pelo Mexitil é maior.

caso dos substratos NAD^+ dependentes, a diminuição da velocidade respiratória durante o estado III, para o succinato, foi bem mais discreta, definindo assim a primeira pista para a elucidação de um dos efeitos da droga.

Imediatamente, devido a estas diferenças de comportamento fisiológico frente a substratos NAD^+ e FAD dependentes sob a ação do Mexitil, foram deixadas de lado várias hipóteses que serviriam para explicar a queda de consumo de O_2 no estado III durante a oxidação do glutamato e do α -cetoglutarato. Isto porque, tanto os substratos NAD^+ quanto os FAD dependentes, compartilham muitos sistemas enzimáticos para as suas oxidações e posterior aproveitamento energético. Como consequência, qualquer alteração em um destes sistemas, não caberia para explicar as diferenças de velocidade de oxidação encontradas no estado III para um e para outro. É o caso da ATPase mitocondrial, dos carreadores de fosfato e de ADP e até dos complexos III e IV da cadeia respiratória, já que qualquer inibição profunda nestes sistemas, iria alterar os parâmetros respiratórios para qualquer dos substratos ensaiados.

Por um motivo diferente foi descartada a hipótese de uma possível ação do Mexitil sobre os carreadores glutamato-aspartato e α -cetoglutarato-malato, uma vez que não foi notada nenhuma diferença na atuação da droga quando ela foi adicionada antes ou depois dos substratos ensaiados. Em outras palavras; se existisse inibição sobre os carreadores, era de se esperar que a inibição do estado III fosse bem maior

nos experimentos em que o antiarrítmico foi adicionado antes da adição do substrato ao sistema.

Restava portanto uma única explicação plausível para os fenômenos observados nos estudos polarográficos, e que foi corroborada nos ensaios das atividades enzimáticas de frações da cadeia respiratória; a inibição desta última, ao nível do complexo I.

Com efeito, enquanto os segmentos da cadeia respiratória comuns para a oxidação dos substratos ensaiados não sofrem ação muito grande do antiarrítmico (CoQH₂ citocromo c - redutase e citocromo c - oxidase), resta admitir que a inibição da NADH - oxidase e da NADH citocromo c - redutase, se localiza ao nível do complexo I. Ou ainda mais precisamente, ao se levar em conta o estímulo sofrido pela NADH - desidrogenase, no segmento compreendido entre esta e a coenzima Q.

É claro que, em torno da inibição mais drástica deste segmento da cadeia transportadora de elétrons, existem outras menores, como é o caso da succinato-oxidase. Isto era de se esperar já que o Mexitil, como todos os anestésicos locais, age diretamente sobre as membranas biológicas.

Todos os medicamentos interagem com estas membranas mas, enquanto a maioria deles apenas as atravessam, outros fixam-se nas proteínas ou nos complexos lipídio - proteicos, localizados nas membranas dos sistemas celulares. No primeiro caso, a membrana não é modificada pela interação com a droga. Entretanto com outros, especialmente os anestésicos locais - inibidores da excitabilidade das membranas neuronais -

ais -, ocorrem modificações mais ou menos profundas da estrutura da bicapa lipídica, que se traduzem por modificações de suas propriedades fisiológicas, como é o caso das atividades ligadas à membrana mitocondrial.

Como o Mexitil é também um anestésico local (SINGH e VAUGHAN-WILLIAMS , 1972), estas considerações são igualmente verdadeiras. Devido à sua natureza anfipática, da qual decorre a sua lipossolubilidade, não se poderia esperar que os seus efeitos fossem restritos a um determinado sistema enzimático, uma vez que em mitocôndrias, a maioria destes é dependente , do ponto de vista funcional, das interações lipídeo-proteína (GREEN e FLEISHER, 1963 ; CARROL e RA-CKER, 1977). Em resumo; como o sítio de atuação direta da droga em estudo parece ser a membrana mitocondrial, é de se esperar que os seus efeitos se façam sentir sobre uma ampla gama de sistemas enzimáticos.

É por este motivo que, no decorrer deste trabalho, uma multiplicidade de efeitos foi observada sobre vários parâmetros fisiológicos em mitocôndrias, provocados pelo antiarrítmico, muitos deles não resultantes de ação direta sobre os sistemas enzimáticos mas sim decorrentes das alterações induzidas sobre a fração lipídica da membrana. Não é de se estranhar, portanto, que sistemas mais dependentes de interações lipídicas tenham sofrido maior ação do Mexitil , (como é o caso da NADH CoQ - redutase) , ao passo que outros, menos dependentes destas interações lipídeo - proteí-
nas (CoQH₂ citocromo c - redutase e citocromo c-oxidase) ,

pouco ou nada tenham sofrido (SINGER, 1974).

2- Aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial a cátions, provocada pelo Mexitil.

É claro que, desde que o sítio de atuação do antiarrítmico é a membrana biológica como um todo, alterações das suas propriedades físico-químicas também seriam esperadas, e não somente inibições a nível enzimático ou de sistemas.

A primeira evidência de que isto é correto, surgiu dos estudos da atuação das droga sobre o potencial de membrana. Desde que a queda deste potencial, para todos os substratos ensaiados, mostrou o mesmo perfil, estava descartada a hipótese de que ela era devida a interações do antiarrítmico com a cadeia respiratória. Como possíveis explicações do fato ficaram; ou o influxo de prótons para a matriz mitocondrial, ou a entrada de cátions (como o potássio e o sódio). Qualquer dos fenômenos implica em queda de potencial de membrana.

Ao se admitir o influxo de prótons, entretanto, fica difícil explicar a moderada estabilidade do estado IV da respiração mitocondrial nos estudos polarográficos. Se tal ocorresse, era de se esperar um razoável estímulo da velocidade de consumo de oxigênio nesta fase, já que este influxo simularia um estado de fosforilação, fazendo com que a velocidade respiratória do estado IV se assemelhasse com a do estado III. Além disto, supondo um refluxo de prótons, a re

lação ADP:O cairia sensivelmente, o que não aconteceu.

O estudo da influência do Mexitil sobre o efluxo de prótons confirmou estas suspeitas, pois para uma determinada concentração da droga, verificou-se aumento do efluxo total de prótons por unidade de tempo; um resultado que não seria de se esperar caso houvesse influxo de prótons para a matriz mitocondrial. Tal resultado é plausível apenas se for levada em conta a hipótese de haver influxo de cátions, já que os resultados obtidos da ação da droga sobre a ATPase, descartam a possibilidade de estar ocorrendo estímulo deste complexo a uma determinada concentração do antiarrítmico (o que iria ocasionar o pico de $\Delta pH/min$ observado na figura 11). Havendo este influxo de cátions (sódio ou potássio), ocorre uma redução do potencial de membrana ($\Delta \Psi$), que por sua vez vai ocasionar uma diminuição da força próton-motriz ($\Delta \mu H^+$). Para compensar tal redução, mais prótons são ejetados para o exterior por unidade de tempo, contrabalançando o potencial elétrico perdido, o que se traduz por estímulo do efluxo de prótons observado.

Assim, embora a hipótese do influxo de prótons não possa ser totalmente descartada (admitindo-se que ela ocorra de forma bem diminuta), fica patente que a entrada de cátions para a matriz mitocondrial é um fato, em presença do Mexitil. Fenômeno que se torna facilmente visível nos estudos das alterações do "swelling" mitocondrial induzidas pelo antiarrítmico. Neles, em presença do Mexitil, comprovou-se haver aumento do "swelling" mitocondrial passivo, quando

na ausência da droga ele nem existe. Aumento que é tanto maior quanto maior é a concentração do antiarrítmico.

Esta alteração do "swelling" por sua vez, só poderia ser explicada pela alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, que permite o influxo de cátions. (Influxo que aumentará a osmolaridade da matriz mitocondrial, ocasionando a entrada de água que, por sua vez, causará aumento de volume da matriz mitocondrial). Isto é verdade tanto para o sódio (figuras 12 a 15) quanto para o potássio (figuras 16 a 19), confirmando as suspeitas iniciais aventadas com os estudos do potencial de membrana e efluxo de prótons.

Fica patente, com estes resultados, não somente a atuação do Mexetil sobre os complexos enzimáticos, como também sobre a físico-química da membrana mitocondrial, uma vez que, sendo uma droga lipossolúvel, ela parece modificar significativamente a membrana biológica como um todo. Modificações que, sem dúvida, não se restringem somente à membrana mitocondrial, tomada aqui como simples modelo. A verdade é que seus efeitos devem ser gerais sobre todas as membranas celulares.

5. CONCLUSÕES

Da análise dos efeitos do Mexitil sobre o metabolismo mitocondrial, tira-se as seguintes conclusões:

- grande inibição do estado III da respiração mitocondrial, para substratos NAD^+ dependentes e leve inibição do mesmo estado quando da oxidação do substrato FAD dependente. Para os dois substratos, a relação ADP:O e o estado IV praticamente não sofreram alterações.

- grande inibição dos complexos NADH-oxidase e NADH citocromo c-redutase, leve decréscimo da atividade da succinato-oxidase, nenhuma alteração sobre a citocromo c-oxidase e estímulo da NADH-desidrogenase.

- ligeiro decréscimo do potencial de membrana para todos os substratos ensaiados (ATP, ascorbato+TMPD, glutamato, α -cetogluturato e succinato).

- estímulo do ΔpH por minuto, em determinada concentração da droga.

- aumento do grau de "swelling" mitocondrial passivo, tanto para o sódio quanto para o potássio.

Todos os resultados apresentados são consistentes com 1- inibição do complexo I da cadeia respiratória e 2 - aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial a cátions como o sódio e o potássio. Ambos os efeitos são provavelmente devidos a interações ocorridas entre a droga e a membrana mitocondrial interna, devido à natureza anfipática do antiarrítmico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅKERMAN, K.E.O. e WIKSTRÖM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Lett., **68**: 191-197, 1976.
- AZZONE, A.; BRAGADIN, M.; POZZAN, T. e DELL'ANTONE, P. Proton electrochemical potential in steady state rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, **459**: 96-109, 1976.
- BORBA, H.R. Efeito dos antiarrítmicos (lidoflazina, maleato de perexilina e propranolol) sobre o metabolismo mitocondrial. Curitiba, 1983. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
- BOYER, P.D.; CHANCE, B.; ERNSTER, L.; MITCHELL, P.; RACKER, E. e SLATER, E.C. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Ann. Rev. Biochem., **46**: 905-1026, 1977.
- CAMPBELL, R.W.F.; ASCHUFF, S.C.; POTTAGE, A.; MURRAY, A.; PRESCOTT, L.F. e JULIAN, D.G. Mexilitine in the prophylaxis of ventricular arrhythmias during acute myocardial infarction. J. Cardiovasc. Pharmacol., **1**: 43-52, 1979.

- CARLIER, J. Hemodynamic electrocardiographic and toxic effects of the intravenous administration of increasing doses of mexilitine in the dog. Comparison with similar effects produced by other antiarrhythmics . Acta Cardiol. (suppl. XXV) 81-100, 1980.

- CARROL, R e RACKER, E. Preparation and characterization of cytochrome c oxidase vesicles with high respiration control. J.Biol.Chem. , 252 (20) : 6981-6990 , 1977.

- CHANCE, B e WILLIAMS, G.R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylations: Kinetics of oxygen utilization. J.Biol.Chem. , 217 : 383-393 , 1955.

- CHAZOTTE, B. e VANDERKOOI; G. Multiple sites of inhibition of mitochondrial electron transport by local anesthetics. Biochim. Biophys. Acta , 635 : 153-161 , 1981.

- CHEW, C.Y.C. ; COLLETT, J. e SINGH, B.N. Mexilitine: A review of its pharmacologic properties and therapeutic efficacy in arrhythmias. Drugs , 17 : 161-181 , 1979 .

- COLLONA, R. ; MASSARI, S. e AZZONE, G.F. The problem of cation binding in the energized membrane of intact mitochondria. Eur.J.Biochem. , 34 : 577-585 , 1973.

- DUFF, H.J.; RODEN, D.; PRIMM, R.K.; OATES, J.A.; WOOSLEY, R.L., Mexiletine in the treatment of resistant ventricular arrhythmias: enhancement of efficacy and reduction of dose-related effects by combination with quinidine Circulation , 67 (5) : 1124-1128, 1983.

- ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP:O ratios, In: ESTABROOK, R.W. e PULLMAN, M.E. Oxidation and phosphorylation. New York, Academic Press, 1967. p. 41 -47, (Methods in Enzymology, 10).
- GREEN, D.E. e FLEISCHER, S. The role of lipids in mitochondrial electron transfer and oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta , 70 : 554-582 , 1963.
- GREVILLE, G.D. A scrutiny of Mitchell's chemiosmotic hypothesis of respiratory chain and photosynthetic phosphorylation. Curr. Topics in Bioenerg. , 3 : 1 - 78, 1969.
- HALINEN, M.O.; PENTIKÄINEN, P.J. ; HELIN, M.J.; REHNBERG, S. Antiarrhythmic efficacy of combined intravenous and oral mexiletine in acute myocardial infarction: A double blind placebo-controlled study. Eur. Heart J. 5 (8): 675-683 , 1984.
- HENRARD, L. e CARLIER, J. Mexiletine in the treatment of ventricular arrhythmias. Acta Cardiol. , (Suppl. XXV): 127-135, 1980.
- KEEFE, D.L.D. ; KATES, R.E. e HARRISON, D.C. New antiarrhythmics drugs : Their place in Therapy. Drugs, 22: 363-400 , 1981.
- KLÜPPEL, M.L.W.; SILVEIRA, O. ; LOPES, L.C.V. e CAMPESLO, A.P. Biochemical aspects of the mechanism of action of antiarrhythmics drugs on heart mitochondria . II - Enzymatic activities. Arq. Biol. Tecnol. , 21 : 13-18 , 1978 .

- LEAHY, E.B. e BIGGER, J.T. Mexiletine: A new antiarrhythmic drug. Ann. Intern. Med. , 92 : 427-429, 1980.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, H.J. ; FARR, A.C. e RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent . J. Biol. Chem. , 193 : 265-275, 1951.
- MASON, T.L. ; POYTON, R.O. ; WHARTON, D.C. e SHATZ, G. Cytochrome c oxidase from bakers yeast isolation and properties. J. Biol. Chem. , 248 : 1346-1354 , 1973.
- MEHTA, J. e CONTI, C.R. Mexiletine, a new antiarrhythmic agent for treatment of premature ventricular complexes. Am. J. Cardiol. , 49 : 455-560, 1982.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature (Lond.) , 191 : 144-148 , 1961.
- MUSTAFA, M.G. ; UTSUMI, K. e PACKER, L. Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. Biochem. Biophys. Res. Commun. , 24 : 381-385 , 1966.
- OHASHI, K. ; EBIHARA, A. ; HASHIMOTO, T. ; HOSODA, S. ; KONDO, K. e OKA, T. Pharmacokinetics and the antiarrhythmic affect of mexiletine in patients with chronic ventricular arrhythmias . Arzneimittelforsch. , 34 (4): 503-507, 1984.
- OPIE, L.H. Drugs and the heart IV. Antiarrhythmics agents. Lancet , 1 : 861-868 , 1980.
- PRESCOTT, L.F.; CLEMENTS, J.A. e POTTAGE, A. Absorption, distribution and elimination of Mexiletine. Postgrad. Med. J. , 53 (suppl. 1): 50-55, 1977.

- PULLMAN, M.E. ; PENEFSKY, H.S.; DATTA, A. e RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol stimulated triphosphate. J. Biol. Chem. , 235 (11) : 3322-3329, 1960.

- RODEN, D.M. Tocainide and mexiletine. Orally effective lidocaine analogues Arch. Intern. Med. , 145 (3):417-418, 1985

- ROTTENBERG, H. The measurement of membrane potential and ΔpH in cells, organelles and vesicles. In: FLEISCHER, S. e PACKER, L. Biomembranes; Bioenergetics-oxidative phosphorylation. New York, Academic Press, 1979 , p. 547-569 (Methods in Enzymology, 55).

- SANTINELLI, V.; CHIARIELLO, M.; STANISLAO, M. e CONDORELLI, M. Intravenous mexiletine in management of lidocaine-resistant ventricular tachycardia. Am. Heart J. , 105 (4) : 680-685 , 1983.

- SCHWARTZ, J.B.; KEEFE, D.L. e HARRISON, D.C. Adverse effects of antiarrhythmic drugs. Drugs , 21 : 23-45, 1981.

- SEPPÄLÄ, A.J.; WIKSTRÖM, M.K.F. e SARIS, N.E.L. Damping of mitochondrial volume oscillations by propranolol and related compounds. In: CHANCE, B.; PYE, E.K.; GHOSH, A.K. e HESS, B. Biological and Biochemical Oscillators. New York; Academic Press, 1973. p. 115-124.

- SINGER, T.P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenase. Methods Biochem. Anal. , 22 : 125-175, 1974.

- SINGH, B.N. e VAUGHAM WILLIAMS, E.M. Investigations of the mode of action of a new antiarrhythmic drug Kö 1173. Br.J.Pharmacol. , 44 : 1-9, 1972.
- SINGH, J.B. Efficacy of mexiletine in chronic ventricular arrhythmias compared with quinidine: a single-blind, randomized trial. Am.J.Cardiol. , 53 (1) : 84-87 , 1984.
- SOBOL, B.J. Mexiletine for drug resistant ventricular tachycardia (letter) Am.J.Cardiol. , 53 (4) : 642, 1984.
- SOMLO, M. Induction des lactico-cytochrome c reductases (D- et L-) de la levure aerobie par les lactates (D- et L-). Biochim.Biophys.Acta , 97 : 183-201, 1965.
- SUMNER, J.B. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. Science , 100 : 413-414, 1944.
- TALBOT, R.G.; CLARK , R.A.; NIMMO, J.; NEILSON, J.M.M. ; JULIAN, D.G. e PRESCOTT, L.F. Treatment of ventricular arrhythmias with mexilitine. Lancet , 2 : 399-401, 1973.
- VAUGHAM WILLIAMS, E.M. Electrophysiological basis for a rational approach to antidysrhythmic drug therapy . Adv. Drug Res. , 9 : 69-101 , 1974.
- VOSS, D.O.; CAMPELLO, A.P. e BACILA, M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain

- mitochondria. Biochem.Biophys.Res.Comm. , 4 : 48-51, 1961.
- VOSS, D.O.; COWLES, J.C. e BACILA, M. A new eletrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. Anal.Biocehm. , 6 : 211-222 , 1963.
 - WASPE, L.E.; WAXMANN, H.L.; BUXTON, A.E. e JOSEPHSON, M.E. Mexiletine for control of drug-resistant ventricular tachycardia: clinical and electrophysiologic results in 44 patients. Am.J.Cardiol. , 51 : 1175-1181, 1983.
 - WELD, F.M.; BIGGER, J.T.; SWISTEL, D.; BORDIUK, J. e LAU, Y.H. Electrophysiological affects of mexiletine (Ko 1173) on bovine cardiac Purkinje fibers. J.Pharmacol. Exp. Ther. , 210 : 222-228 , 1979.
 - WOOSLEY, R.L.; WANG, T.; STONE, W.; SIDDOWAY, L.; THOMPSON . K.; DUFF, H.J.; CERKUS, I. e RODEN, D. Pharmacology, e lectrophysiology, and pharmacokinetics of mexiletine. Am.Heart J. , 107: (5) : 1058-1084 , 1984.
 - YONETANI, T. e RAY, G.S. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome oxidase . J.Biol.Chem. , 240 : 3392-3398 , 1965.
 - ZANOTTI, A. e AZZONE, G.F. Safranine as membrane potential probe in rat liver mitochondria. Arch. Biochem . Biophys. , 201 : 255-265 , 1980.