

JOÃO CAETANO FORTES

AÇÃO DE DROGAS ANTI-ARRÍTMICAS (propranolol,
maleato de perexiline, iproveratril e lidoflazina) SOBRE
AS ALTERAÇÕES DO VOLUME MITOCONDRIAL E
ALGUNS EFEITOS ESPECTRAIS

Tese de Doutorado apresentada
ao Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

1981

Tese orientada por

Dr. ANNIBAL DE PAIVA CAMPELLO

AD DILECTAM MEMORIAM AMANTISSIMAE MATRIS
MEAE, CLEUSA MENDES FORTES, ORIGO AMORIS,
VIRTUTIS ET BENEVOLENTIAE, IN HOC THESE
DEDICANDO, CORS MEUS AD HUNC MODUM LOCUTUS
EST.

Dedico também:

Ao Dr. Annibal, meu orientador

Ao meu pai, meus irmãos e sobrinhos.

"O objetivo básico da minha vida é fazer algo de útil para as pessoas... É por isso que me interessei por coisas que não me dão pão nem poder. Espero, porém, que meus estudos talvez em breve, talvez num futuro distante, dêem à sociedade montanhas de trigo e um poder ilimitado".

K.E. TSIOLKOVSKY, 1912 - Fundador da Astronáutica.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. ANNIBAL DE PAIVA CAMPELLO pelo apoio, incentivo, orientação e amizade.
- Ao Prof. LUIZ CARLOS VIEIRA LOPES, pelo incentivo, amizade e inúmeras sugestões apresentadas.
- Ao Prof. VICENTE DUNKE, do Departamento de Física da U.F.Pr., pelas informações seguras e precisas sobre Oscilações Harmônicas.
- A Dra. MARIA LÚCIA WAMBIER KLÜPPEL, pelas críticas científicas que foram altamente valiosas para a melhoria desse trabalho.
- Ao Dr. METRY BACILA e ao Centro de Biologia Marinha, pelo apoio, compreensão e incentivo.
- A Bibliotecária Sra. MARIA HELENA B. IMAYUKI, pela valiosa colaboração feita na revisão bibliográfica.
- Aos Profs. do DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS DA U.F.R.R.J., por ter me incentivado e apoiado para que eu fizesse Pós - Graduação.
- Ao DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DA U.F.Pr. e ao COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO pelo apoio e a oportunidade que me deram durante todos anos de Doutorado.
- À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.
- A todas as ENTIDADES BRASILEIRAS que apoiam, financiam e estimulam a Ciência, a Cultura e a Pesquisa no Brasil.
- "In memoriam" a DONATO LUZ DE PINHO por ter me ajudado e incentivado nos estudos.

Í N D I C E

SUMÁRIO	01
INTRODUÇÃO	02
MATERIAIS E MÉTODOS	13
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

SUMÁRIO

O efeito do Propranolol (PR), Maleato de Perexiline (PM), Iproveratril (IPRO) e Lidoflazina (LIDO) foi observado sobre o estado oscilatório, swelling e contração mitocondrial de fígado de rato e sobre os espectros de absorção dos complexos enzimáticos I - II - III da cadeia respiratória de coração de boi.

Os anti-arrítmicos promovem uma acentuada inibição das oscilações e a permanência de excessivo estado de swelling mitocondrial suportado pela oxidação do substrato e NaAC como fon oscilante.

Estudos da influência das anti-arrítmicos sobre a fonte de energia para o "swelling" e a "contração" mitocondrial de fígado mostraram que o PR, PM, IPRO e LIDO alteram a velocidade e a amplitude do "swelling" e determinam a "contração" do swelling mitocondrial, suportado pela oxidação do glutamato quando as fontes energizadoras foram o glutamato, o succinato, o NaASC + TMPD e o ATP.

Nos experimentos realizados com complexos enzimáticos I-II-III da cadeia respiratória, procurou-se verificar a possível ação dos compostos anti-arrítmicos sobre as proteínas isoladas da cadeia respiratória; PR, PM, IPRO e LIDO, inibem a oxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$ e não a oxidação do succinato em proteínas supostamente desprovida de fosfolipídeos.

Os efeitos do DNP e dos anti-arrítmicos mostram mecanismos de ação e efeitos distintos, o que explicaria as causas e consequências diferentes para ambos devido a diferença de interação com a membrana mitocondrial.

INTRODUÇÃO

Entre os medicamentos incluídos ao arsenal terapêutico das drogas anti-arrítmicas, estão o propranolol (PR), o maleato de perexiline (PM) o iproveratril (IPRO) e a lidoflazina (LIDO), umas amplamente utilizadas por suas características de ação bloqueadora β -adrenérgica e outras pela ação vasodilatadora coronária.

Trabalhos realizados neste laboratório, com propranolol, maleato de perexiline, iproveratril e lidoflazina, possibilitaram o desenvolvimento de estudos na tentativa de esclarecer os aspectos bioquímicos do mecanismo de ação, à partir de mitocôndrias isoladas de coração.

Nestes trabalhos foram feitos estudos sobre a fosforilação oxidativa e a oxidação dos substratos energizadores da cadeia respiratória, bem como mostradas as possíveis alterações morfo-estruturais das mitocôndrias. Baseados nos resultados obtidos, os autores (53, 54, 68, 90, 91, 92, 99, 114) chegaram a conclusão que determinados efeitos tornavam-se marcantes em virtude da ação inibidora da fosforilação oxidativa e da oxidação dos substratos NADH — dependentes. SAKURADA et al. (92), demonstraram que as drogas estudadas (PR, PM, IPRO e LIDO) promoviam um aumento no metabolismo do succinato em virtude da queda dos níveis de oxaloacetato. Observações tais como "Swelling" e vacuolização induzidas pelo iproveratril e lidoflazina foram analisadas pela microscopia eletrônica (99) mesmo na presença da ação protetora da espermidina (68).

RODRIGUES et al. (89), estudaram os efeitos do verapamil em mitocôndrias do ápice do coração de coelhos após serem injetados endovenosamente com dose de 0,7mg/kg; os resultados obtidos demonstraram que o verapamil inibiu 15,13% a respiração mitocondrial na ausência de substrato e quando o α -cetoglutarato foi usado, estimulou em 30% a respiração em relação ao succinato e inibiu em 25% a fosforilação oxidativa.

Sucessivos trabalhos publicados nos últimos 15 anos mostraram que a mitocôndria manifestava periodicamente, vários tipos de mudanças "Swelling" e "Contração", onde o fenômeno oscilatório do transporte de íons através da membrana mitocondrial, era

associado com a função normal do transporte de elétron mitocondrial e sistemas de energia.

TEORELL (111, 112), foi o pioneiro no campo das oscilações ligadas a membrana, com modelos experimentais sobre as propriedades rítmicas do fluxo eletro-osmótico, através das membranas. Neste estudo, ele observou oscilações do potencial e volume do fluxo à corrente constante. Oscilações tem sido descritas nas clássicas vias de suprimento de energia: glicólise, fotossíntese (43, 118) e respiração mitocondrial (11, 24, 27, 43). Esta última, é um caso clássico de oscilação ligada à membrana de transporte vetorial de íons dependentes de energia, processo este acoplado ao fluxo de elétrons e atividade ATPásica. As oscilações foram descobertas quando se estudou a influência dos ionóforos sobre os processos mitocondriais. Contudo a presença de ionóforo não é obrigatória. Sempre que as taxas acopladas do transporte de íons, fluxo de elétrons e atividades ATPásica, alcançam níveis críticos, as oscilações dos nucleotídeos de piridina, flavoproteína, citocromos, consumo de oxigênio, de ATP e ADP, e do transporte de prótons e potássio (em direção oposta), do "swelling" e "contração", são vistas, assim como o fluxo de água.

A figura 1, possibilita sumarizar a evidência experimental, postulando a sequência de eventos que ocorrem, durante o processo oscilatório mitocondrial, tendo como fonte de energia a oxidação do substrato ou hidrólise do ATP, responsável pelo transporte de H^+ ligando a energia através da membrana interna mitocondrial, seguido pelo transporte de cation ou anion, responsável pela mudança do fluxo osmótico de água e resultando em alteração do volume mitocondrial.

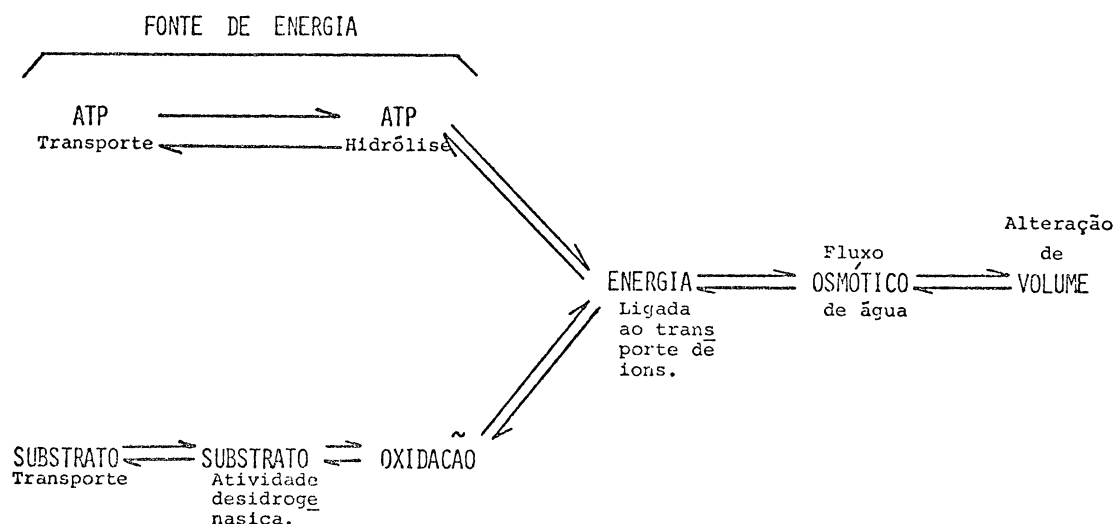


FIGURA 1 - ESQUEMA DE EVENTOS QUE OCORRE DURANTE O PROCESSO OSCILATORIO. GOOCH & PACKER (28).

Esses avanços coincidiram com a observação dos movimentos oscilatórios de íons na mitocôndria (56, 84), onde diferentes funções metabólicas, bem como, os componentes da cadeia respiratória, exibiram a manutenção do comportamento periódico (71). Neste caso, estudos posteriores sobre o fenômeno, levaram à descoberta de distintas propriedades de controle da membrana interna mitocondrial (121). Esses dois exemplos, demonstraram que a oscilação em sistemas bioquímicos complexos pode ser reduzida às propriedades funcionais das enzimas ou das membranas e pode, finalmente, ser recuperada em mudanças estruturais a níveis moleculares. Sem dúvida, oscilações em sistemas experimentais, refletem a complexidade do sistema em estrutura e tempo. Assim a detecção das oscilações, proporcionam excelente oportunidade para que seja estudado o comportamento dinâmico dos sistemas celulares e sub-celulares.

Em 1965, PRESSMAN (84) e LARDY & GRAVEN (56), descreveram as oscilações do volume mitocondrial induzidas, na presença de certos antibióticos ionóforos. MOORE & PRESSMAN (85) e HUFER & PRESSMAN (45), usaram o ionóforo valinomicina, para iniciar a oscilação e ativação do transporte de K^+ em mitocôndria de fígado de rato. GRAVEN et al. (31, 32, 33), também observaram oscilações do volume mitocondrial, usando homólogos de actina para estimular o transporte de cátions monovalentes em mitocôndrias. O fenômeno oscilatório em mitocôndria, foi também observado por FALCONE et al. (23), demonstrando ciclos de "swelling" e "contração", induzidos pela gramicidina. CARAFOLI et al. (9, 10), reportaram condições onde há ressaltos ligados a respiração, e movimento oscilatório

rio de Ca^{++} e H^+ entre as mitocôndrias e o meio. CHANCE & YOSHIOKA (14) mostraram que mitocôndria de coração de pombo, na presença de valinomicina, K^+ e em pH 6,5-6,0, oscilavam com amortecimento desprezível, quando comparado a outros sistemas oscilatórios mitocondriais. Provas de que os ionóforos, não são necessários para o processo oscilatório, foram fornecidas por AZZI & AZZONE (1) MUSTAFA et al. (71) e PACKER et al. (73) que mostraram oscilações amortecidas da respiração e do volume, sob condições de transporte de íons energizados, em mitocôndria de fígado de rato, tratada com EDTA. AZZONE & AZZI (3), também reportaram que o Mg^{++} diminuía a permeabilidade da membrana mitocondrial para os cátions monovalentes, enquanto que, agentes queladores de Mg^{++} , tais como EDTA e o citrato, aumentavam a permeabilidade dos cátions monovalentes.

Para o sistema oscilatório mitocondrial, a dependência de energia para certas mudanças de volume na mitocôndria, pode ser demonstrado fotometricamente, pelas alterações nas medidas em absorvância ou turbidimetria, usando como fonte de energia a oxidação de vários substratos ou a hidrólise de ATP. (Figura abaixo)

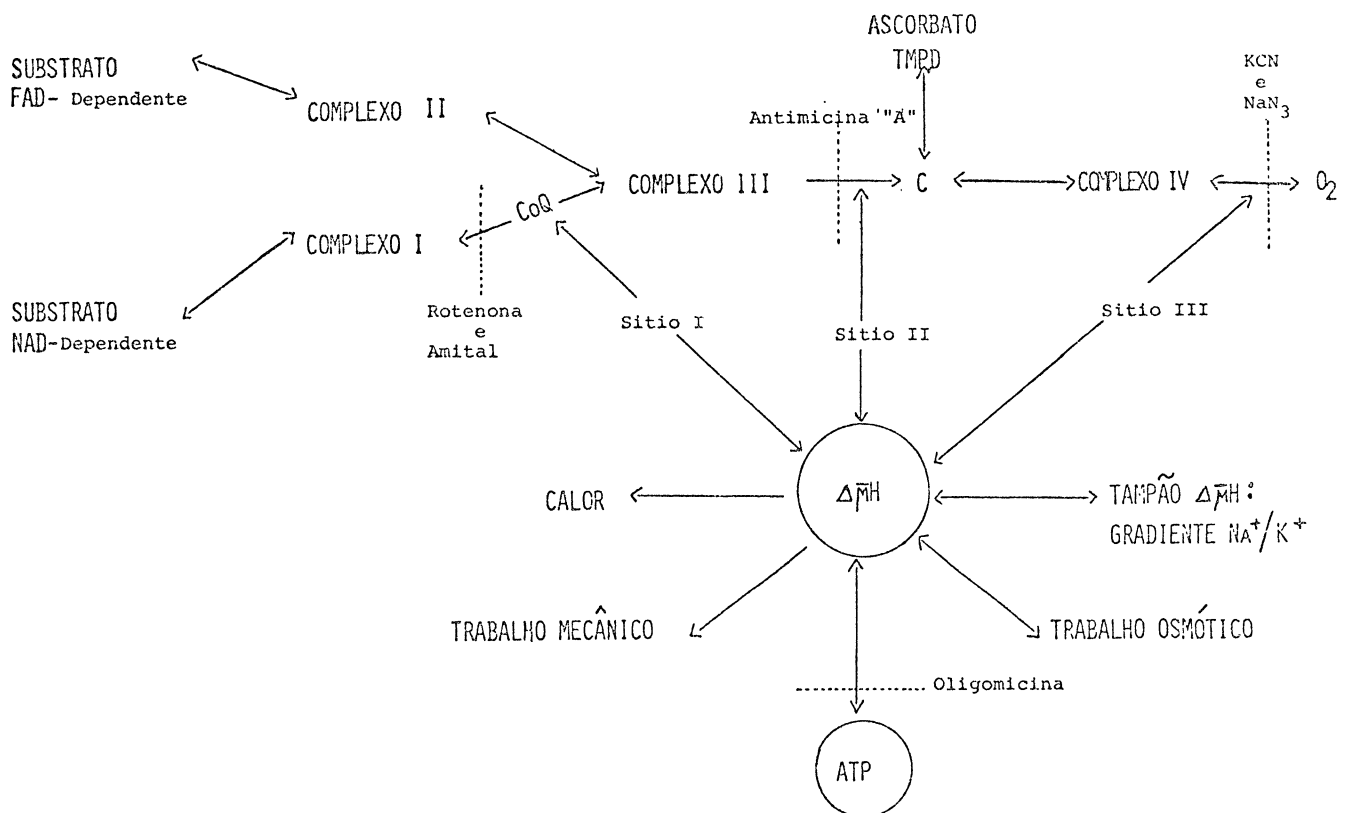


FIGURA 2 - CAMINHOS DO ELETRON E TRANSFERENCIA DE ENERGIJA NA MITOCONDRIA. ESQUEMA ADAPTADO SEGUNDO SKULACHEV, V.P. (101).

O "pool de alta energia" na mitocôndria pode aparecer em virtude de: 1) oxidação do substrato que transfere elétrons através dos sítios de acoplamento de energia (como o α -cetoglutarato, succinato, acorbato + TMPD); 2) hidrólise do ATP e, 3) reversão do transporte de íons. A formação do "pool de alta energia", pode suportar a ocorrência de vários processos, requerendo energia na mitocôndria, entre outros, o acúmulo de íons e "swelling" mitocondrial.

No processo de investigação da oxidação do substrato, sempre resulta no transporte de H^+ para o fenômeno oscilatório, tornando-se mensurável por meio de um eletrodo de pH de vidro, conforme foi observado por CHANCE & YOSHIOKA (14). De acordo com SLATER (103), MITCHELL (69) e SKULACHEV (102), o transporte de H^+ , conseqüente da oxidação do substrato, funciona como pré-requisito para o transporte de cátion e ânion. Recentemente, PAPA et al. (80), observaram que o transporte de H^+ dependente da respiração, envolve um mecanismo independente do transporte de cátions, e que o transporte de H^+ pode resultar no transporte de cátions através da formação de um gradiente de carga.

Por outro lado, a hidrólise do ATP é capaz de prover a energia necessária para o processo oscilatório, e as oscilações suportadas pelo ATP também envolvem o transporte de H^+ (45). Embora o mecanismo de hidrólise do ATP, seja completamente diferente da oxidação do substrato, as oscilações induzidas por ambas fontes de energia são similares em caráter. Estas observações são consistentes com a postulação proposta por MITCHELL & MOYLE (70), BAKEEVA et al. (4), LIBERMAN & SKULACHEV (60), de que o mecanismo de transdução de energia, de ambos sistemas, pode comandar o transporte de H^+ .

Foi demonstrado que o fenômeno oscilatório mitocondrial, depende de três componentes fundamentais: um substrato oxidável ou ATP; um ionóforo para íons monovalentes (exógeno ou endógeno), e um sal monovalente de um ânion de ácido fraco, tal como o acetato, fosfato ou propionato. Estes requerimentos sugerem que o fenômeno oscilatório é um processo energizado, que envolve o transporte ativo de um cátion monovalente, mediado por ionóforo tratado com EDTA, e que, o ânion de ácido fraco, é um determinante crítico do processo. Tem sido mostrado que a concentração de H^+ do meio mitocondrial, flutua durante o período de oscilação (14, 84, 113); que na oscilação dependente de valinomicina há

uma flutuação paralela e inversa de K^+ e H^+ (14) e que a configuração da mitocôndria flutua entre dois estados sincronicamente com a flutuação do H^+ e K^+ , conforme demonstrou HARRIS et al. (38). Embora não haja informação explícita a cerca do ânion, é implícito que a concentração de ânion de ácido fraco, também flutuará paralelamente com a flutuação da concentração de K^+ ou Na^+ . O ponto a ser enfatizado, é que o fenômeno oscilatório, seria a manifestação de delicada operação de mecanismo de controle, modulado pela concentração de algum componente do sistema. O mecanismo de controle é a membrana mitocondrial interna, que responde à concentração de ADP e ATP, no espaço da matriz mitocondrial. Quando a concentração de ADP é alta e a de ATP é baixa, a membrana interna assume a configuração "agregada" apropriada para fosforilação oxidativa. Quando a concentração de ADP é baixa e a de ATP é alta, a membrana interna assume a configuração "retorcida" apropriada para a hidrólise do ATP e transporte ativo. Esse estado de transição da membrana mitocondrial interna, da configuração "retorcida" para "agregada", é um esquema de regulação da extensão do transporte ativo. O transporte ativo não controlado, poderá resultar em uma ruptura da mitocôndria ou em última análise, em danos irreversíveis. Assim, o mecanismo de controle, deixa de ser transporte ativo, tão logo esse estágio seja alcançado. Os ânions de ácido fraco, constituem-se nas moléculas chave deste controle de transporte ativo, desde que são os instrumentos moleculares para a regulação do pH interno. Na fosforilação oxidativa, os ânions são ativamente "extruídos"; na hidrólise do ATP, os ânions são ativamente transportados. A extrusão de ânions, leva a acidificação do espaço da matricial, e o transporte de ânions para dentro, leva a alcalinização do espaço da matriz mitocondrial. Desse modo, os ânions de ácido fraco, controlam o pH da matriz.

Informações adicionais sobre o mecanismo de controle da oscilação mitocondrial, são dadas pela titulação com íons. Esses experimentos, revelam a possibilidade de haver controle "feedback positivo" dos íons hidrogênio e potássio sobre o sistema oscilante (43). A adição de qualquer desses íons ao meio de suspensão, resulta em mudança de fase de todos parâmetros oscilatórios para as posições indicadas, e ejeção de íon titulado do espaço da matriz mitocondrial para o espaço extramitocondrial. Assim, as oscilações mitocondriais, são controladas pelo acoplamento "feedback positivo" do fluxo de íon ao sistema respiratório e, pH e pK diferenciais, são identificados como sincronizadores para as oscilações sincronizadas da população mitocondrial.

Outra hipótese, é de que o sistema de "feedback" pode existir, devido às mudanças conformacionais moleculares, dentro da membrana. O transporte de cátions, ânions, água e em particular H^+ , através da membrana durante a oscilação, poderá levar à mudanças conformacionais moleculares; idem quando se usa, desvio rotatório ótico, dicroísmo circular, spin lábeis e fluorescência. ANS, indicando a correlação das mudanças de volume com as mudanças na estrutura secundária das proteínas, na membrana interna, durante a oscilação. Agentes químicos, bem como os deslocadores clássicos e os anestésicos locais, cujas propriedades lipofílicas, afetam as mudanças estruturais da membrana, durante o período de oscilação, podem levar a uma total inibição ou completo amortecimento das oscilações mitocondriais.

As oscilações mitocondriais têm sido demonstradas em mitocôndrias intactas, isoladas de fígado, coração e tecido de glândula mamária de camundongos normais e adenocarcinoma mamário. Mitocôndrias isoladas desses tecidos, podem ser induzidas a uma multiplicidade de complicados parâmetros oscilantes, para exibir oscilação amortecida do volume, movimentos de íons, variações periódicas do estado de oxiredução dos carreadores respiratórios (nucleotídeos de piridina, flavoproteínas e citocromos), oscilação da velocidade respiratória, oscilação da concentração total do fosfato de alta energia do nucleotídeo de adenina, oscilação das concentrações de ADP e ATP e oscilação da fluorescência do ANS (ácido 8 - anilino - naftaleno - 1 - sulfônico) (10, 14, 19, 29, 30, 32, 45, 56, 64, 71, 73, 75, 76, 84, 113). Desta maneira, o estado oscilatório mitocondrial experimenta uma transformação ultra-estrutural crítica e reversível, entre um "condensado" e uma configuração "ortodoxa", que pode ser imediatamente estudada pela técnica de "turbidimetria" (19). Somente dois, dos tres estados de transição configuracional, estabelecidos pela microscopia eletrônica, podem ser diretamente medidos por turbidimetria. A correlação entre a mudança configuracional deduzida da interpretação da micrografia eletrônica, e a mudança configuracional, implícita na medida por turbidimetria, tem sido testada concluindo-se que ambas as técnicas, medem mudanças configuracionais na crista da membrana interna mitocondrial.

Determinação do volume e outras medidas, têm sido grandemente ajudadas pela adição de glutaraldeído, a uma população de mitocôndrias, oscilando para uma rápida e guiada fixação do estado configuracional e conformacional da membrana interna mito

condrial (76, 77). Mudanças configuracionais, é o termo usado para descrever as reflexões correspondentes às mudanças conformacionais ao nível molecular da membrana interna. Em geral, as atividades funcionais da membrana interna, igualmente a respiração, fosforilação oxidativa, a capacidade de transporte energizado de íons (câtions mono e divalentes) e as mudanças configuracionais em mitocôndrias de fígado de ratos, alimentados com dieta deficiente em ácidos graxos essenciais (AGE), revelaram não apresentar uma mudança bem definida e mensurável (106). "Swelling" mitocondrial, foi também inalterado, mas no comportamento oscilatório das mitocôndrias de animais deficientes em AGE, verificou-se um aumento na duração do período, e um decréscimo da amplitude, após repetidos pulsos de O_2 , devido a tendência que a mitocôndria de ratos deficientes em AGE tem, para deterioração. As mudanças nos períodos das oscilações, são aparentemente, acompanhadas pelas mudanças da composição lipídica da membrana. (77, 106).

Até o presente tem sido demonstrado que a cadeia respiratória da mitocôndria, tem como principal função a regeneração de ATP, produzindo também energia para acumular íons na mitocôndria, em um processo paralelo a formação de ATP, representando três modalidades diferentes de transformação de energia respiratória: química, elétrica e osmótica.

Tem sido mencionado que mitocôndrias em célula viva, sofrem mudanças na forma e no volume, porém, há agora boa evidência que algumas dessas mudanças são determinadas pela atividade da cadeia respiratória. PACKER (78, 79) observou mudanças na turbidimetria de suspensão de células tumorais de Ehrlich que correspondiam ao "swelling" e a "contração" da mitocôndria dentro da célula. Considerando os aspectos bioquímicos e biofísicos dessa mudança de volume da mitocôndria, torna-se possível agora o estudo "in vitro".

A mudança no volume da mitocôndria isolada "in vitro", associada com a respiração, foi estudada por RAAFLAUB (86), Mac FARLANE & SPENCER (62), HARMAN (36,37), RAAFLAUB (86) estudou as mudanças de volume mitocondrial, medindo a turbidimetria da suspensão de mitocôndria demonstrando que a mitocôndria pode sofrer dois tipos de mudanças de volume: um passivo, dependente da pressão osmótica do meio de suspensão em que se encontra a mitocôndria, e outro ativo dependente da respiração ou de um composto rico em energia.

Mais tarde, TAPLEY (109) e TAPLEY et al. (110) mostraram que agentes capazes de desacoplar a fosforilação oxidativa também apresentam efeitos característicos sobre o "swelling" mitocondrial. LEHNINGER (57) em sua revisão, procurou relacionar o consumo ativo e extrusão de água com o processo transportador de elétrons e fosforilação oxidativa, levando em consideração, todas alterações envolvidas ao nível mitocondrial, durante a fase de "swelling" e "contração" tais como: 1 - aspectos termodinâmicos do "swelling" e "contração" mitocondrial, 2 - mudanças na morfologia mitocondrial e nas propriedades da membrana durante o "swelling" e "contração" e, 3 - alterações moleculares mitocondriais durante a fase de "swelling" e "contração".

AZZONE & AZZI (3) em acordo com CHAPPELL & CROFTS (15, 16) propuseram que a membrana mitocondrial deveria ter um limite de permeabilidade para cátions monovalentes e que a valinomicina ou EDTA aumentavam esta permeabilidade. Esta proposta é suportada pelos experimentos onde o consumo de K^+ foi medido na presença ou ausência de ânions, igual ao P_i ou acetato, os quais carregam água e induzem "swelling" mitocondrial. Quando a oxidação do β -hidroxibutirato é inibida pela rotenona, potássio é liberado pela mitocôndria. A adição de um novo substrato, como o succinato, resulta em restauração do consumo de K^+ . Outra vez, K^+ é liberado após a adição de antimicina. ATP restaura o consumo de K^+ e oligomicina abole o efeito do ATP inibindo dessa maneira o "swelling" mitocondrial.

Mustafa et al. (71), demonstraram em mitocôndria isolada de fígado de rato, o "swelling" e a "contração" sob condições de equilíbrio, em meio contendo EDTA e em pH 7,5, suportada pelo α -ceto-glutarato, succinato e acorbato + TMPD na cadeia respiratória, e sistemas transferidores de energia, como o ATP, tendo o acetato de sódio como desencadeante. Recentemente em condições bastante similares, BAKEEVA et al. (4), verificaram em mitocôndria isolada de fígado e coração, a penetração de cátions sintéticos (DDA^+) em presença de substrato ou ATP, respondendo da mesma maneira ao transporte ativo de outros cátions iguais ao Na^+ ou K^+ na presença de valinomicina, e induzindo desse modo o "swelling" da matriz mitocondrial. Em contra partida aos experimentos acima, GRINIUS et al. (34), trabalhando com partícula submitocondrial obtida por sonicação de mitocôndria de coração, contendo ou não F_1 , verificaram o consumo de ânions sintéticos (PCB^-) de maneira dependente de energia. O processo foi inibido

pela rotenona, antimicina e cianeto quando foi suportado pela respiração e pela oligomicina, quando o ATP foi usado como fonte de energia, sendo os desaclopadores inibidores de ambos os casos. Partícula desprovida do fator de acoplamento (F_1) mostrou um decréscimo na habilidade para acumular ânions (PCB^-) e produzir "swelling" dependente da respiração, entretanto, o processo foi estimulado em presença de oligomicina. O acúmulo de PCB^- dirigido pelo ATP não ocorrem em partícula desprovida de F_1 , mas foi obtido após pré-incubação com F_1 .

BRIERLEY, em 1976 (8), revisou os fatores envolvidos no movimento de cátions monovalentes através da membrana interna de mitocôndria isolada de coração. As evidências sugerem que o consumo dependente de energia do K^+ e Na^+ que resulta em "swelling" da matriz, é uma resposta eletroforética ao potencial negativo interno. A evidência também sugere que a troca de cátion monovalente ($Na^+ > K^+$) por prótons, presentes na membrana, pode participar na extrusão dependente de energia do íon acumulado. Os dois processos, podem representar um meio de controlar o volume da mitocôndria dentro do funcionamento celular. O número de indicações assinala a possibilidade de que o processo de controle do volume pode ser mediado pelos cátions divalentes Ca^{++} e Mg^{++} . Estudos com reagentes mercuriais também implicam certos grupos tióis na membrana, no postulado processo de controle do volume mitocondrial.

Os equivalentes redutores (átomos de hidrogênio ou elétrons) provenientes da desidrogenação dos substratos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, e outras vias metabólicas, são transferidas ao oxigênio por um sistema multienzimática denominado cadeia respiratória, localizado na membrana interna mitocondrial, que se caracteriza pela coesão física com que seus componentes se mantêm unidos entre si e integradas na membrana. Essas e outras observações sugerem que proteínas carreadoras respiratórias são arranjadas em organizadas assemblêias o que torna possível a rápida e específica interação proteína-proteína do transporte de elétrons, presumivelmente pela limitada distância intermolecular na qual as proteínas difundem-se lentamente movendo-se entre colisões. Este mesmo sistema enzimático é também chamado da cadeia transportadora de elétrons, uma denominação que dá ênfase às oxidações e reduções, como fenômenos caracterizados pela perda ou ganho de elétrons (12).

O presente trabalho tem por objetivo, a investigação de anomalias provocadas pela ação de substâncias anti-arrítmicas (Propranolol, maleato da perexiline, iproveratril e lidoflaziña) sobre as oscilações, em sistemas ligados a membrana, no controle do amortecimento oscilatório do volume e respiração mitocondrial ("swelling" e "contração" no estado do equilíbrio e estado oscilatório) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

Estudos espectrais também foram desenvolvidos sobre o sistema enzimático, transportador de elétrons, NADH-succinato-citocromo c redutase (complexo I-II-III) isolado de mitocôndrias de coração de boi.

Baseado em MUSTAFA et al. (71) & HATEFI et al. (40), que fornecem o necessário suporte teórico e calcado em conhecimentos obtidos dos trabalhos experimentais já descritos neste laboratório nos propusemos a desenvolver o presente trabalho, na tentativa de contribuir para a elucidação dos efeitos farmacológicos destas drogas, mormente aqueles inerentes aos processos estruturais da mitocôndria.

MATERIAIS E MÉTODOS

A - MATERIAIS

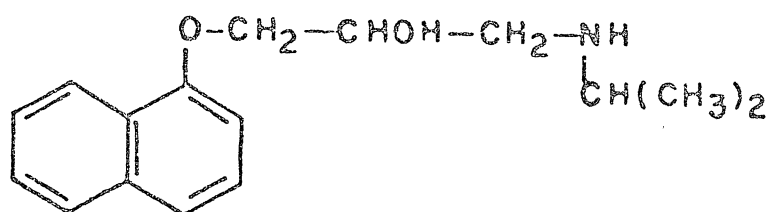
I - DROGAS ANTI-ARRÍTMICAS

PROPRANOLOL (INDERAL) (120)

1-(Isopropylamino)-3-(1-Naphtyluoxy)-2-propranolol; propranolol; propranol. ; ICI 45.520; sintetizado nos laborat6rios de pesquisas da Imperial Chemical Industries Limited (ICI), Inglaterra. Possui peso molecular de 259,34, ponto de fus6o 163 - 164 C (cristais de n-propranol), f6rmula molecular $C_{16}H_{21}NO_2$, solúvel em 6gua e 6lcool e praticamente insolúvel em outros solventes orgânicos. DL_{50} em camundongos: 30-40 mg/kg em machos e 40-50 mg/kg em f6meas.

Aç6o farmacol6gica: bloqueador β -adren6rgico.

0 propranolol foi dissolvido em N-N-dimetil-formamida , soluç6o 0,215 M.

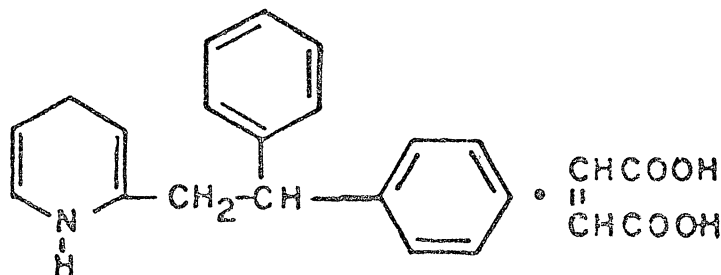


MALEATO DE PEREXILINE (PEREXILINE) (120).

2-(2,2-Dicyclohexylethyl) piperidine maleato; perexilene; sintetizado nos laborat6rios de pesquisas do Richardson-Merrel INC., USA. Possui peso molecular de 277,50; ponto de fus6o 188,5 - 191 C; f6rmula molecular $C_{23}H_{39}NO_4$; insolúvel em 6gua e praticamente solúvel em solventes orgânicos. DL_{50} em ratos e camundongos 4,37 g/kg oral.

Ação farmacológica: vasodilatador coronário e diurético.

O maleato de Perexiline foi dissolvido em N-N-Dimetil-Formamida, solução 0,021 M.

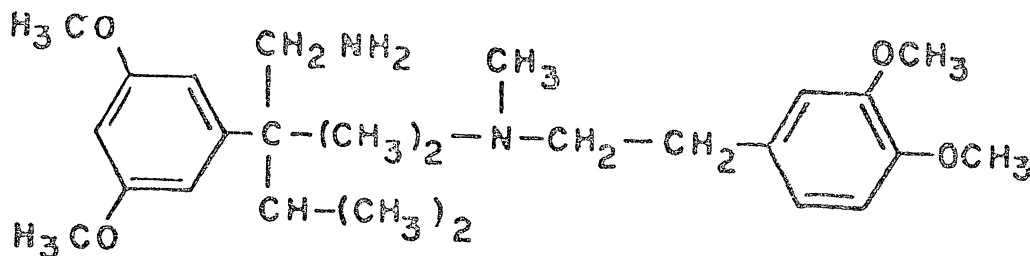


IPROVERATRIL (VERAPAMIL) (120)

5-[(3,4-dimethoxyphenethyl) methylamino]-2-3-4-dimethoxyphenyl)-2-isopropylvaleronitrile; D 365; Isoptin; sintetizado nos laboratórios de pesquisas do KNOLL A.G., Alemanha. Possui peso molecular de 454,59; ponto de ebulição 243 - 246 C; fórmula molecular $C_{27}H_{38}N_2O_4$; insolúvel em água, pouco solúvel em hexano, praticamente solúvel em outros solventes orgânicos. Decompõe-se a 138,5 - 140,5°C.

Ação farmacológica: vasodilatador coronário.

O iproveratril foi dissolvido em N-N-dimetil-formamida, solução 0,35 M.

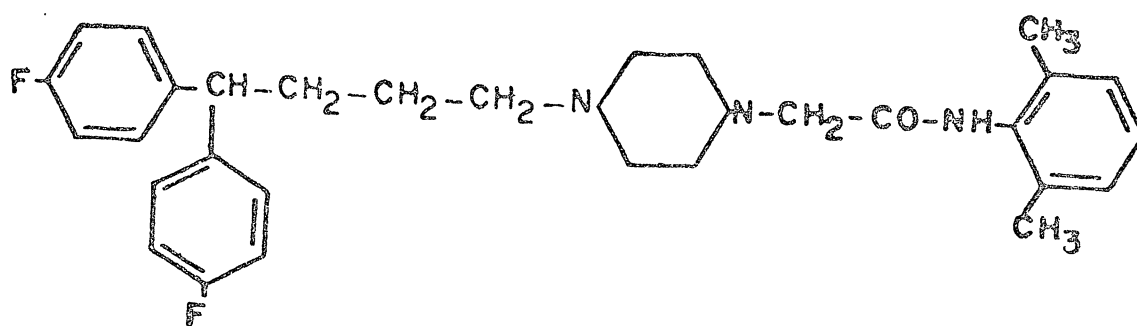


LIDOFLAZINA (ORDIFLAZINE) (120)

4-[4,4-bis(4-fluorephenyl) butyl -N-(2,6-dimethylphenyl)-1-piperazineacetamíde]; R 7904; klinium, corflazine. Sintetizado nos laboratórios de pesquisas da Janssen Farmaceutica, Bélgica. Possui peso molecular de 491,63; ponto de fusão 159-161°C; fórmula molecular $C_{30}H_{35}F_2N_3O$, quase insolúvel em água (0,01%), mais solúvel em clorofórmio (50%) e outros solventes orgânicos.

Ação farmacológica: Vasodilatador coronário.

A lidoflazina foi dissolvida N-N-dimetil-formamida, solução 0,12 M.



II - REAGENTES

Os reagentes químicos usados, foram obtidos comercialmente dos seguintes laboratórios:

TMPD (N-N-N-N-Tetrametil-p-phenyleno diamino), ATP (adenosina trifosfato), EDTA (etileno-diamino-tetracetato, sal sódico), Rotenona, Antimicina A, Oligomicina, Glutamato, DOCA (desoxicolato de sódio), NADH + H⁺ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida), pCMS (p-cloro mercúrio fenil sulfonado) da Sigma Chemical Company; Na₃N (azida de sódio), acetato de amônia, Na₂S₂O₄ (ditionito de sódio), ácido clorídrico, acetato de sódio e cloreto de potássio da E. Merck AG; ascorbato de sódio do Carlo Erba; succinato de sódio do General Chemical Company; TRIS (hidroximetil-amino-metano) do Fisher Scientific Company; sacarose da Reagen Industriais Química S.A.; cianeto de potássio da Riedel de Haen AG; DNP (2-4-dinitrophenol) de Dr. Theodor Schuchardt Munchen; DMF (N-N-dimetil formamida) da Merck AG; histidina - Eastman Organic Chemicals USA.

Todos os outros reagentes são de qualidade analítica.

Tanto o meio de extração como o de reação (Sacarose - TRIS-EDTA), foram preparados no dia de uso em água destilada, tendo sido corrigido o pH adequadamente com uma solução de HCl 1N. As demais soluções em uso, foram feitas e guardadas a baixa temperatura para melhor conservação.

III - SIGLAS

DNP	2-4-dinitrofenol
PR	Propranolol
PM	Maleato de perexiline
I PRO	Iproveratril
LIDO	Lidoflazina
TMPD	N-N-N-N-Tetrametil - p - phenyleno diamino
ATP	Adenosina trifosfato
GLUTA	Glutamato de sódio
NADH + H ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma <u>re</u> duzida
SUCC	Succinato de sódio
NaASC	Ascorbato de sódio
EDTA	Etileno diamino-tetra-acetato de sódio
TRIS	Hidroximetil amino metano
DOCA	Deoxicolato de sódio
NaAC	Acetato de sódio
DMF	N-N-dimetil formamida
ROT	Rotenona
ANTIM	Antimicina A
OLIGOM	Oligomicina
pCMS	p-cloro mercúrio fenil sulfonato
MIT	Mitocondria
Pi	Fosfato inorgânico

B - MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

I - ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

As mitocôndrias de fígado de rato foram isolados pelo método descrito para mitocôndria de cérebro, por VOSS et al. (115), usando-se como meio de extração, TRIS - sacarose - EDTA, confor me STANCLIFF et al. (106). Este meio continha: 0,33M sacarose, 1.0 mM TRIS e 1 mM EDTA com pH final de 7,5.

Ratos brancos, espécie Wistar, foram decapitados, usando uma guilhotina especial, seus fígados imediatamente removidos, lavados, picados e suspensos em meio de extração gelado (0-4°C), sendo a seguir, homogeneizados em homogeneizador de Van Potter - Elvehjem, centrifugados a 0°C por 10 minutos a 1085 x g, usando

centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B. Desprezado o sedimento, o sobrenadante foi centrifugado a 12.100 x g durante 10 minutos e o sedimento ressuspense em meio de extração e centrifugado a 7.710 x g durante 10 minutos. Esta última etapa foi repetida duas vezes, para obter mitocôndrias mais puras.

As mitocôndrias sedimentadas foram suspensas em meio de extração TRIS-sacarose-EDTA-pH 7,5 na concentração aproximada de 20 a 25 mg de proteína por mililitro.

II - ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CORAÇÃO BOVINO

Mitocôndrias de músculo de coração bovino, foram isoladas com base no método previamente descrito por CRANE et al. (17), usando-se meio de extração constituído por: sacarose 0,25M, TRIS base 13mM, K_2HPO_4 13mM e EDTA 0,1 mM (93).

Músculo cardíaco picado em pequenos cubos, foi moído e homogeneizado na proporção de 800g para 2200 ml do meio de extração, contendo sacarose-TRIS- K_2HPO_4 -EDTA, durante 30 segundos à velocidade máxima, em homogeneizador "Warring Blendor". O homogenizado foi centrifugado a 1.530 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de várias camadas de gaze e mantido no gelo. O precipitado foi suspenso e homogeneizado com 1000 ml de sacarose 0,25M e K_2HPO_4 15mM por 30 segundos. O homogenizado foi recentrifugado durante 10 minutos a 1.530 x g, o sobrenadante coletado nas mesmas condições e juntado ao anterior. O sobrenadante combinado foi centrifugado a 23.300 x g durante 15 minutos. Após a centrifugação de 6 litros do sobrenadante, obteve-se o sedimento mitocondrial que foi suspenso em sacarose 0,25M e estocado a $-25^{\circ}C$.

III - ISOLAMENTO DO "NADH-SUCCINATO-CITOCROMO C REDUTASE" - (COMPLEXO I-II-III DA CADEIA RESPIRATÓRIA)

O isolamento da partícula enzimática NADH-succ- cit c - redutase, foi realizada seguindo-se o método preconizado por HATEFI et al. (40), para isolamento de todos os complexos enzimáticos (complexos I, II, III, IV, V) da cadeia respiratória.

Mitocôndrias isoladas e congeladas pelo método descrito anteriormente, foram diluídas com solução de sacarose 0,25M para uma concentração proteica de 30mg/ml e centrifugadas a 81.000 x g por 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi des-

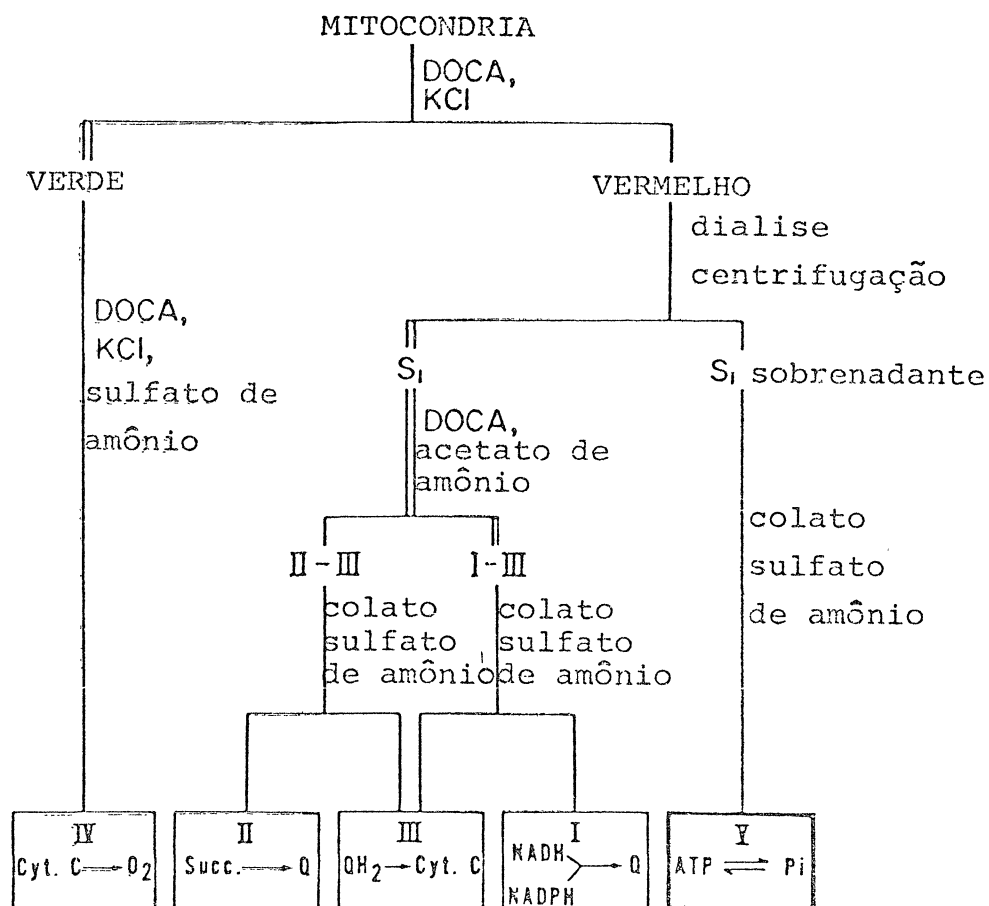


FIGURA 3 - Fracionamento das mitocôndrias de coração de bovino no complexo enzimático NADH Succinato - Citocromo c - redutase, com o uso de KCl , desoxicolato de Na^+ e acetato de amônio. HATEFI et al. (42).

cartado e o sedimento mitocondrial, foi suspenso em meio contendo: sacarose 0,67M, TRIS 0,05M e histidina 0,001M, com pH final de 8,0 para concentração proteica de 23 mg/ml.

A figura 3 mostra, após a lavagem mitocondrial, uma sequência de fracionamento para a obtenção da partícula NADH-succit c-redutase, com a produção de vários outros complexos enzimáticos da cadeia respiratória, conforme foi descrito por HATEFI e RIESKE (41). Após a obtenção, o sedimento final foi diluído em pequeno volume de TRIS-sacarose-histidina, pH 8,0, e estocado a -25°C . Alíquotas de 0,50ml foram descongeladas a medida que foram sendo usadas.

IV - DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por LOWRY et al. (62), usando soro albumina bovina cristalizada, como padrão. As leituras foram feitas a 700nm usando espectrofotômetro Aus-Jena.

C - MÉTODOS EXPERIMENTAIS

I - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DAS OSCILAÇÕES DO VOLUME MITOCONDRIAL SUPORTADAS PELA OXIDAÇÃO DO SUCCINATO EM PRESENÇA DE Na^+ AC.

Oscilação do volume e respiração mitocondrial. Sistema: mitocôndria de fígado de rato foi preparada em 0,33M de sacarose, 1 mM de TRIS e 1mM EDTA, pH 7,5 (106). O meio básico de reação, contém sacarose (100 mM), TRIS-HCl (10 mM), EDTA (0,3 mM) pH 8,5 e mitocôndria de fígado de rato (2,5 mg de proteína num volume final de 3 ml) a 27°C . Outras adições indicadas são: rotenona (1,6 μM), succinato de sódio (8,3 mM) e acetato de sódio (50 mM). As mudanças de volume, foram medidas em % de transmitância em espectrofotômetro Aminco-Chance Dual Wavelength a 575 nm e o consumo de oxigênio foi determinado em eletródio de oxigênio (116).

II - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DAS OSCILAÇÕES DO VOLUME MITOCONDRIAL, SUPORTADAS PELA HIDRÓLISE DO ATP EM PRESENÇA DE Na^+ AC.

Sistema: mitocôndria de fígado de rato foi preparada em

0,33M de sacarose, 1mM de TRIS e 1mM de EDTA, pH 7,5 (106). O meio básico de reação continha sacarose (100 mM), TRIS-HCl (10mM), EDTA (0,3 mM), pH 8,2 e mitocôndria de fígado de rato (2,5 mg de proteína num volume final de 3 ml) a 27°C. Outras adições indicadas são: rotenona (1,6 µM), acetato de sódio (83 mM), ATP de sódio (3 mM) e oligomicina (1,6 µg). As mudanças de volume foram medidas em % de transmitância em espectrofotômetro Aminco-Chance Dual Wavelength a 575 nm.

III - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO "SWELLING" E 'CONTRAÇÃO" MITOCONDRIAL, SUPORTADOS PELO FLUXO DE ELÉTRONS, SISTEMAS TRANSFERIDORES DE ENERGIA EM PRESENÇA DE Na⁺ AC SOB CONDIÇÕES DE EQUILÍBRIO

Sistema: mitocôndria de fígado de rato foi preparada em 0,33M de sacarose, 1 mM de TRIS e 1 mM de EDTA, pH 7,5 (106). O meio básico de reação continha sacarose (100 mM), TRIS-HCl (10 mM), EDTA (0,3mM), pH 7,5 e mitocôndria de fígado de rato (2,5 mg de proteína num volume final de 3 ml) a 27°C. Outras adições indicadas são: acetato de sódio (50 mM), glutamato de sódio (10 mM), rotenona (1,6 µM), succinato de sódio (8,3 mM), antimicina A (0,7 µM), ascorbato de sódio + TMPD (20 mM + 0,83 mM), KCN (1,6 mM), ATP de sódio (6,6 mM) e oligomicina (1,6 µg). As mudanças na densidade ótica foram medidas em espectrofotômetro Aminco - Chance Dual Wavelength 575 nm, e o consumo de oxigênio foi determinado em eletródio de oxigênio (116).

IV - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO I-II-III DA CADEIA RESPIRATÓRIA

Espectro de absorção destacando as bandas α e β dos citocromos b e c_1 da "NADH-succinato-citocromo c -redutase", da cadeia respiratória de mitocôndria de coração bovino, reduzida com NADH + H⁺, succinato de sódio e dititionito de sódio. Sistema: para uma das cubetas de 1 ml (referência e amostra) foi adicionado na amostra NaN₃ 0,1 M - pH 7,6 (2mM), tampão fosfato de potássio 1 M pH 8,0 (20 mM), enzima (1,2 mg de proteína/ml) NADH + H⁺ 4 mM (0,4 mM) ou succinato de sódio 0,5 M, pH 7,4 (10 mM) e água destilada para um volume final de 1 ml. A determinação espectral da NADH-succinato-citocromo c redutase, foi obtida, utilizando-se espectrofotômetro Aminco-Chance Dual Wavelength Split Beam, e quipado com banho termostático, para manutenção de temperatura en

tre 27-30°C, no compartimento das cubetas. Foram utilizadas cubetas de vidro de 1 cm de caminho ótico e uma velocidade de varredura de 2 nm/sg na faixa de 460 nm a 600 nm, com fotomultiplicadora automática e abertura de 0,15 cm.

V - VELOCIDADE DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

As determinações polarográficas das velocidade de consumo de oxigênio, foram feitas em eletródio de oxigênio do tipo descrito por VOSS et al. (116). As velocidades respiratórias foram calculadas e expresso em $\mu\text{M}\text{O}_2 \cdot \text{seg}^{-1}$ de acordo com o método descrito por ESTABROOK (22) e, utilizado para o cálculo da relação ADP/O nos ensaios da fosforilação oxidativa.

VI - MEDIDAS DE ALTERAÇÃO DO VOLUME POR TURBIDIMETRIA

As alterações obtidas na transmitância e absorbância a 575 nm, são causadas pelas mudanças de volume da matriz mitocondrial quando ocorre oxidação dos substratos, via cadeia respiratória ou hidrólise do ATP, via ATPase, concomitantemente com o transporte de íons através da membrana interna mitocondrial, levando a acúmulo e "swelling", fenômenos demonstrados por MUSTAFA et al. (71) e PACKER et al. (73).

O decréscimo da transmitância (aumento da absorbância) é refletido na diminuição do volume de contração. Por outro lado, o aumento da transmitância (decréscimo da absorbância) resulta no aumento de volume da matriz (swelling).

As mudanças nas medidas de volume de suspensões mitocondriais incubadas em estado de equilíbrio e estado oscilatório, foram obtidas através de leituras espectrofotométricas, usando-se cubetas de 1 cm de caminho ótico, em espectrofotômetro. Aminco Chance Dual Wavelength/Split Beam com 20% de transmitância de escala total, e comprimento de onda fixo em 575 nm conforme PACKER (74). Para cada incubação, foi usado o volume total de 3ml termostatizado a 25° - 27°C.

Reagentes específicos, procedimentos experimentais e condições de incubações, são descritos nas condições experimentais de cada sistema. Os anti-arrítmicos (PR, PM, IPR0 e LIDO), foram sempre utilizados dissolvidos em dimetil formamida. Controles por adição de solvente, indicam que a dimetil formamida não

interfere nos sistemas estudados.

VII - DADOS DE APRECIACÃO DO SISTEMA OSCILATÓRIO MITOCONDRIAL

Para avaliação e descrição dos fenômenos oscilatórios, os elementos usados, são fornecidos pelos parâmetros da oscilação, que comumente têm a aparência de uma OSCILAÇÃO HARMÔNICA AMORTECIDA, conforme mostra a figura 4.

Visto que, as oscilações são estudadas sobre uma ampla faixa de condições, torna-se importante estabelecer critérios quantitativos para a qualidade das oscilações, que serão de significância, não somente para oscilações altamente persistentes, mas também para aquelas oscilações, onde somente um ou dois ciclos são observados. A amplitude, fator de amortecimento, período médio, meio período, frequência, equilíbrio, relaxação e o número das oscilações, são variáveis possíveis.

O número de oscilações, não é um critério usual, porque as condições ótimas do comportamento oscilatório, levam para uma infinidade de ciclos. A mais simples característica a ser medida, é a amplitude, porém, a amplitude de ciclos sucessivos, pode diferir marcadamente e muitas oscilações começam com um grande excesso no primeiro ciclo.

O critério mais preciso é o fator de amortecimento que requer no mínimo dois ciclos, porém é aplicável a vários ciclos de oscilações. Este fator, é definido como a relação da amplitude de duas sucessivas deflexões do traço na mesma direção. Isto mostra que, o fator de amortecimento aufere o valor de 1,0, para uma oscilação de características ótimas; um valor bem maior que a unidade, para uma oscilação amortecida, que tende ser um valor constante, durante uma dada oscilação mitocondrial; fator menor ou igual a unidade para uma oscilação contínua. Por outro lado, se no movimento oscilatório mitocondrial, o amortecimento é pequeno, então a mitocôndria oscila em torno da posição de equilíbrio, com amplitude sempre decrescente exponencialmente até zero e atinge o repouso, quando o tempo for infinito, após diversas oscilações. A energia da oscilação é gradualmente dissipada pelo amortecimento e se anula também com o tempo. Quando forças de amortecimento estão presentes, o trabalho é realizado contra as mesmas e a energia original é dissipada.

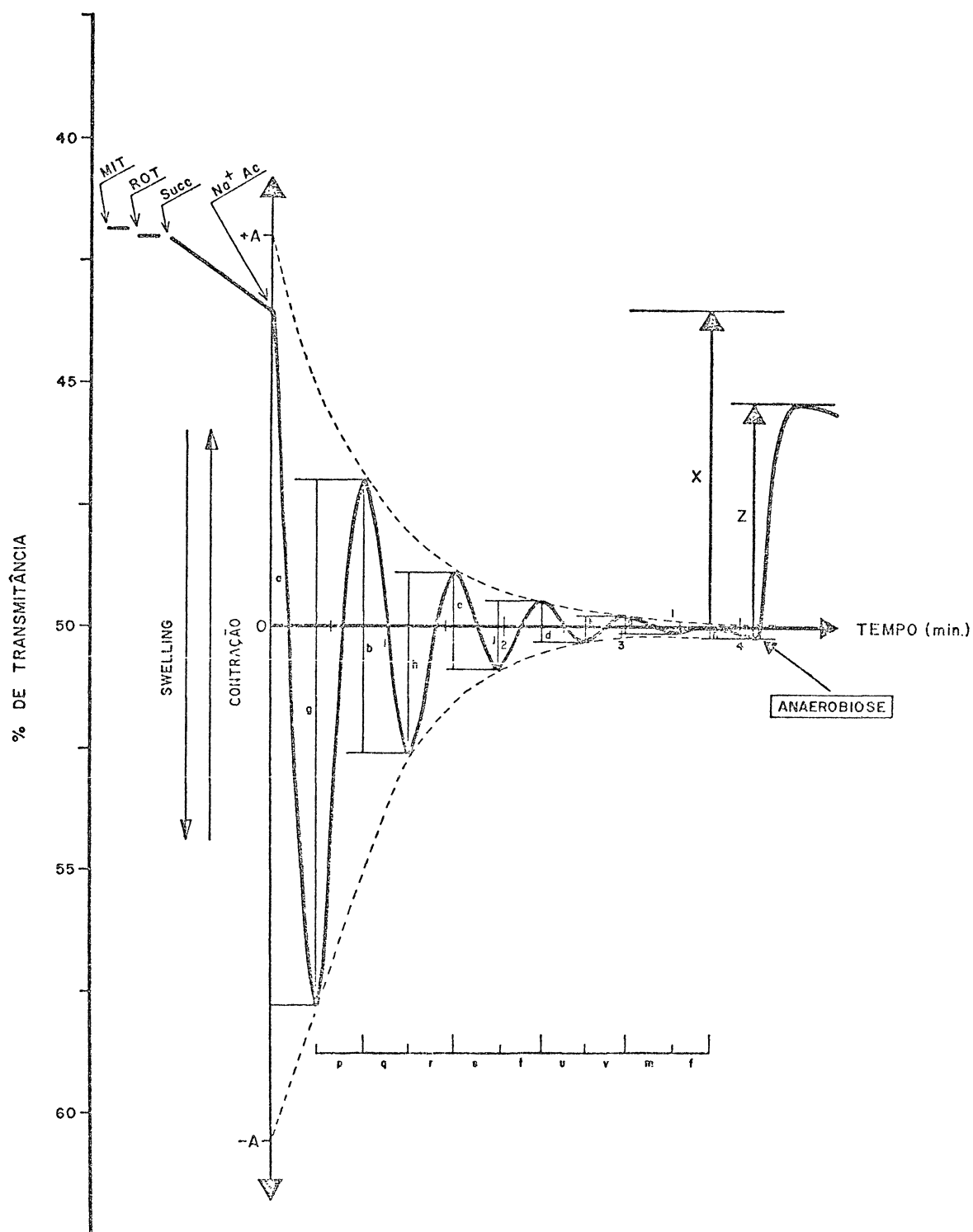


FIGURA 4 - Oscilação harmônica amortecida do volume mitocondrial, indicando os parâmetros e o critério de avaliação de seus elementos segundo GOOCH & PACKER (28). Condições experimentais descritas no ítem de Métodos experimentais.

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OSCILATÓRIOS (GOOCH & PACKER, 28)

Amplitude em % de transmitância	a	b	c	d	e	g	h	j	k	l
	14,3	5,6	2,0	0,8	0,3	10,8	3,7	1,4	0,5	0,2

Fator de amortecimento	a/b	b/c	c/d	d/e	g/h	h/j	j/k	k/l
	2,55	2,80	2,50	2,66	2,92	2,62	2,80	2,50

Meio período em segundos	o	p	q	r	s	t	u	v	m
	24	24	24	23	24	20	22	20	26

Período médio em segundos	em	$\frac{2 \times (\text{soma de } n \text{ medidas do meio período})}{n} = \frac{2 \times 207}{9} = 46$
---------------------------	----	--

Frequência Uma oscilação por minuto

Equilíbrio em % de transmitância	X
	6,5

Relaxação em % de transmitância	Z
	4,8

Número total de 1/2 ciclos	10
----------------------------	----

Baseado no grau de amortecimento, outras oscilações amortecidas, podem estar presentes; entre estas, a "superamortecida" e a "criticamente amortecida", na qual a oscilação atinge o equilíbrio em tempo mínimo. Frequentemente na oscilação mitocondrial completamente amortecida (fig. 4) a diferença no valor dos parâmetros do ponto onde oscilação foi iniciada, para o ponto onde se observa completo amortecimento, é designado o valor do equilíbrio. A relaxação é a mudança na determinação, que ocorre, quando o gradiente iônico é rapidamente dissipado. Isto acontece, quando a mitocôndria perde rapidamente seu suprimento de energia, quando são aplicados inibidores do transporte de elétrons ou se esgota o suprimento de oxigênio.

A partir da figura 4 foi feito um modelo de avaliação dos parâmetros oscilatórios mitocondriais, segundo o método estabelecido por GOOCH & PACKER (28), sendo este aplicado a todos os resultados de oscilações obtidos experimentalmente neste trabalho.

RESULTADOS

As figuras 5, 6, 7 e 8, mostram os efeitos dos anti-arrítmicos (PR, PM, IPR0 e LIDO) adicionados a um determinado ponto, no ciclo de "swelling" e "contração" e nas oscilações da respiração mitocondrial. Os anti-arrítmicos determinam uma "oscilação amortecida" do volume mitocondrial, onde a força de atrito é grande comparada com a força de restauração. Assim, após um deslocamento inicial, as oscilações voltam lentamente para sua posição de equilíbrio com amplitude decrescente atingindo o repouso após algumas oscilações. Passam em seguida para o estado "superamortecido" onde estas oscilações alcançam o equilíbrio mais rapidamente e chegam finalmente a uma fase "criticamente amortecida", a qual determina uma linha divisória entre os "movimentos oscilatórios amortecidos" e "superamortecido". Neste ponto amplitude é totalmente inibida e as oscilações atingem o equilíbrio num tempo mínimo à medida que a concentração de droga é aumentada sendo o estado de "Swollen" mitocondrial preservado na presença desses agentes. As fases espontâneas de contração, aparentemente são inibidas, à medida que a concentração de drogas é aumentada. Este estado de "swollen", é todavia dependente da respiração; a fase de contração é induzida na presença de inibidores da respiração, desacopladores, ou quando há total consumo de oxigênio do sistema (figuras 5,6,7 e 8).

As oscilações na presença de anti-arrítmicos, são acom-

panhadas inicialmente de aumento na velocidade de respiração (figuras 5, 6 e 8) sendo que a figura 7 não mostra alteração na velocidade.

À medida que as concentrações das drogas aumentam, o efeito sobre as oscilações do volume mitocondrial, torna-se gradualmente mais amortecido, havendo diminuição da amplitude, causando assim, um excessivo "swelling". Dessa forma, um estado de equilíbrio é atingido a um volume mitocondrial mais altamente expandido, conforme mostram as figuras 5, 6, 7 e 8. Nestas figuras pode-se observar que o principal efeito desses anti-arrítmicos, é a inibição da fase de contração espontânea em altas concentrações de drogas, tornando-se mais evidente a figura 7 (IPRO), onde a concentração D apresenta abolição quase total dessa fase, sem alterar contudo, o "swelling".

Similarmente, pode-se verificar ainda nas figuras 5, 6, 7 e 8, observando os experimentos B e C de cada figura, que drogas em baixa concentração, causam uma diminuição no tempo de duração do estado oscilatório mitocondrial, acompanhado de uma diminuição no equilíbrio e um aumento no amortecimento. Portanto, nos experimentos D e figura 7, nota-se ainda que nas concentrações mais altas da droga, pode-se ter a volta do estado normal, ou até mesmo um período maior no tempo de duração do estado oscilatório, com um rápido estado de equilíbrio e um total amortecimento. A análise mais detalhada de cada parâmetro será feita nas tabelas que se segue.

Observando as figuras 9, 10, 11, 12 pode-se verificar também o efeito dos anti-arrítmicos (PR, PM, IPRO e LIDO) sobre as oscilações do volume mitocondrial, utilizando a hidrólise do ATP como fonte de energia. Aqui também os anti-arrítmicos agem sobre o estado oscilatório mitocondrial, diminuindo a amplitude, aumentando o período e aumentando também o fator de amortecimento, transformando as oscilações "amortecida" para um estado "criticamente amortecido", e a permanência também de um estado de "swelling" garantido pela hidrólise do ATP. A fase de contração (figuras 9, 10, 11 e 12), não é mais induzida espontaneamente como nas figuras anteriores e sim pelo inibidor clássico do complexo ATPásico, a oligomicina.

A expansão do volume mitocondrial, causando um excessivo "swelling", à medida que as concentrações das drogas são aumentadas é evidente em todas as figuras, apresentando total abo

lição da fase de contração, induzida pela oligomicina, sem afetar a taxa e o estado de equilíbrio do "swelling".

O efeito das concentrações crescentes das drogas anti-arrítmicas (PR, PM, IPR0 e LIDO) sobre o volume oscilatório mitocondrial, suportado pela oxidação do succinato e hidrólise do ATP (figuras 13 e 14) e na respiração mitocondrial durante o estado oscilatório (figura 15), demonstra comparativamente entre si e entre sistemas, qual a droga mais ativa, ou qual sistema que é mais sensível à ação destes anti-arrítmicos, durante o fenômeno oscilatório. Estes dados poderão ser mais facilmente visualizados na tabela I, onde as concentrações molares de drogas anti-arrítmicas/mg de proteína, apresentam um efeito de inibição de 50% sobre o estado oscilatório do volume e da respiração mitocondrial. É importante verificar na tabela I, em ambos sistemas de oscilação, a mesma ordem de classificação, quanto à atividade dos anti-arrítmicos com concentração molares bastante próximas.

Observa-se nas figuras 13 e 14, que o PM é o mais ativo de todas as drogas anti-arrítmicas testadas, por ter apresentado efeito sobre o estado oscilatório em menor concentração (10^{-6}) e que o PR, é o menos ativo. Analisando comparativamente as figuras 13 e 14, pode-se verificar que a sequência de atividades desses anti-arrítmicos, segue a mesma classificação em ambos sistemas de oscilação (PM, LIDO, IPR0, PR). Pode-se observar ainda na figura 15, que a inibição produzida sobre a respiração com o succinato, só foi demonstrada com o PR em altas concentrações. Este efeito pode ser melhor visualizado na Tabela I, onde aparecem as concentrações de anti-arrítmicos necessárias para provocar 50% de inibição do estado oscilatório e da respiração mitocondrial.

Em geral, os efeitos desses anti-arrítmicos (PR, PM, IPR0 e LIDO) sobre os ciclos de "swelling" e de "contração" muito se assemelham.

TABELA I - CONCENTRAÇÃO DE DROGAS ANTI-ARRÍTMICAS (PR, PM, IPRO E LIDO), NECESSÁRIA PARA PROVOCAR 50% DE INIBIÇÃO DO ESTADO OSCILATÓRIO E RESPIRATÓRIO.

DROGAS ANTI-ARRÍTMICOS	ESTADO OSCILATÓRIO DO VOL. MITOCONDRIAL		RESPIRAÇÃO
	succ. + Na ⁺ Ac	ATP + Na ⁺ Ac.	succ. + Na ⁺ Ac.
PR	$2,0 \times 10^{-5} M$	$1,41 \times 10^{-5} M$	$5,62 \times 10^{-5} M^*$
PM	$1,00 \times 10^{-6} M$	$8,9 \times 10^{-7} M$	$1,00 \times 10^{-3} M^*$
IPRO	$1,58 \times 10^{-5} M$	$4,47 \times 10^{-6} M$	$5,00 \times 10^{-3} M^*$
LIDO	$3,16 \times 10^{-6} M$	$3,16 \times 10^{-6} M$	$5,60 \times 10^{-1} M^*$

*Valores obtidos por extrapolação dos pontos expressos da figura 15, considerando a concentração de droga que provoca 50% de inibição do consumo de O₂.

Uma série de experimentos (figuras 16, 17, 18, 19 e 20) foi realizada mostrando ação dos anti-arrítmicos (PR, PM, IPRO e LIDO) sobre o "swelling" e a "contração" mitocondrial, utilizando-se mitocôndrias suspensas em meio contendo Tris-Sacarose-EDTA e suportada pela transferência de elétrons e sistemas transferidores de energia, sob condições de equilíbrio conforme MUSTAFA et al. (71).

A figura 16 sistema (controle), mostra que a adição de acetato de sódio à suspensão mitocondrial proporciona o íon necessário para iniciar o processo de "swelling" frente ao substrato. Portanto a adição de glutamato como substrato, induz um grande "swelling" que alcança um estado de equilíbrio em poucos minutos (figura 16). O tratamento da oxidação aeróbica do glutamato pela rotenona, inibe a respiração e causa uma reversão do "swelling". Contudo, "swelling" pode ser reiniciado pelo succinato, como é mostrado pela estimulação da respiração e indução do "swelling". A indução da transferência de elétrons pelo succinato, se inibida pela antimicina A, resulta outra vez na reversão ou contração mitocondrial. Se a transferência de elétrons sobre o sítio inibido pela rotenona e antimicina A, é agora iniciado a frente desses pontos, pelo ascorbato + TMPD (NaASC + TMPD), o fluxo de elétrons é restabelecido e o "swelling" é reiniciado pela mitocôndria. A inibição do fluxo de elétrons, através da região terminal pelo cianeto, inibe outra vez a cadeia respiratória e o "swelling" mitocondrial é outra vez revertido. Por esta razão a respiração não é mais possível devido a presença de rotenona, antimicina A e cianeto. Contudo, ATP foi empregado como suplemento de energia na reiniciação do "swelling". Oligomicina inibe este efeito do ATP, resultando na reversão do "swelling" mitocondrial.

O mostrado na figura 16 (sistema) persiste em condições de estado de equilíbrio aerobicamente, só alterando o volume mitocondrial, quando determinadas condições resultarem na mudança deste estado de equilíbrio, como o caso dos inibidores clássicos aqui empregados e outros tipos de drogas, que possam vir apresentar efeito como desacopladores (7) e drogas que apresentam efeito sobre membrana (50).

As figuras 17, 18, 19 e 20 mostram dois experimentos in

dependentes empregando drogas anti-arrítmicas em dois diferentes pontos de cada sistema estudado, ora incubando a droga à suspensão mitocondrial antes da adição do NaAC (esquerda), ora em substituição à rotenona (direita). Os resultados obtidos nas figuras 17, 18, 19 e 20 demonstram que, as drogas nas concentrações aqui empregadas, promovem inibição total ou parcial do "swelling" mitocondrial, dirigido pelo glutamato em todos experimentos quando comparados com o "swelling" do controle.

Esta inibição total ou parcial da amplitude e velocidade do "swelling", causada pela droga adicionada, determina uma alteração significativa do volume mitocondrial acompanhado de alteração nos diferentes tipos de "swelling", suportados nestes experimentos, não só pelo glutamato mas também pelo succinato, NaAsc + TMPD ou por ATP, ficando bem evidenciado este efeito na figura 20 (esquerda) quando comparado com o controle.

Ao se avaliar a variação do volume mitocondrial observado nas figuras 17, 18, 19 e 20 (direita), para cada uma das drogas usadas, a sua adição em substituição à rotenona, observou-se que, os anti-arrítmicos provocam uma reversão do "swelling" mitocondrial, suportado pelo glutamato, ora atingindo o retorno total provocado pela rotenona, conforme mostra a figura 17, quando comparada com o controle (fig. 16), ora sem atingir este retorno como mostram as figuras 18, 19 e 20. Posterior adição de succinato, NaAsc + TMPD, ATP e seus respectivos inibidores à estes mesmos experimentos, mostram que o "swelling" mitocondrial é ainda possível, embora de uma forma menos acentuada quando comparado com o experimento controle (Fig. 16). Isto mostra que o efeito dessas drogas anti-arrítmicas, não é específico para o complexo I, como é a rotenona, entretanto supondo que seus efeitos se fariam sentir sobre a estrutura e permeabilidade da membrana mitocondrial, em virtude de um fenômeno de "swelling" e "Contração", acompanhado da alteração de volume mitocondrial, tem um componente elástico responsável pelo fenômeno que seria a membrana mitocondrial, embora, tendo como consequência direta sobre o maior complexo enzimático mitocondrial, como no Caso do Complexo I.

Um outro ponto a salientar, nas figuras 17, 18, 19 e 20, é que o efeito das drogas anti-arrítmicas em estudo sobre as diferentes velocidades respiratórias, suportadas pelo glutamato, foi parcialmente inibida, exceto para o propranolol (Fig. 17), quando drogas foram adicionadas aos experimentos antes da ener-

gização da cadeia respiratória pelo glutamato na presença do NaAc. Em oposição a este efeito, verifica-se nas figuras 17, 18, 19 e 20 o estímulo da velocidade respiratória, suportada pela oxidação do succinato e NaAsc + TMPD, quando comparado com o experimento controle (Fig. 16).

Dados também bastante similares e mais sugestivos podem ser demonstrados com os experimentos sobre a respiração (Fig. 17, 18, 19 e 20) quando os anti-arrítmicos foram adicionados em substituição à rotenona (direita), exibindo uma inibição parcial da respiração, dirigida pelo glutamato, embora bem menos acentuada ou em determinados casos, nula. A presença ou não de um estímulo da velocidade respiratória, causada posteriormente a adição do succinato e o NaASC + TMPD como fontes energizadoras da cadeia respiratória nas figuras à direita, pode também ser observado quando comparadas ao experimento controle (Fig. 16).

Os resultados aqui apresentados, sugerem que os efeitos dos anti-arrítmicos (PR, PM, IPR0 e LIDO) sobre o mecanismo de "swelling" e "contração" (Figuras 17, 18, 19 e 20) aparentemente não se assemelham àqueles obtidos nos mesmos sistemas experimentais, quando o 2-4 dinitrofenol (DNP) foi usado na variação do volume mitocondrial (Figura 22). Assim, quando o DNP foi adicionado ao experimento, antes da energização da cadeia respiratória pelo glutamato e na presença de NaAc, a amplitude e a velocidade de "swelling" foram totalmente inibidos quando o glutamato, succinato, NaASC + TMPD e ATP foram as fontes de energia para suportar o "swelling" mitocondrial. Do mesmo modo, que nos experimentos das figuras 17, 18, 19 e 20, a respiração foi inibida mais acentuadamente quando o transporte de elétrons é dirigido pelo glutamato (complexo I) e é estimulado ou não quando suportada pela oxidação do succinato e NaASC + TMPD, quando comparadas com o controle (Figura 21).

Todavia, quando DNP foi adicionado após a respiração do glutamato, em substituição a rotenona, o "swelling" foi imediatamente revertido, determinando uma alteração significativa do volume mitocondrial, refletida na amplitude e velocidade do "swelling", suportados pelo succinato, NaASC + TMPD e ATP como fontes de energia. A respiração respondeu com a inibição do fluxo de elétrons determinado pela oxidação do glutamato (complexo I) e o estímulo da oxidação do succinato e NaASC + TMPD foi pequeno ou nulo quando comparados com o experimento controle (figura 21)

e aquele onde o DNP foi adicionado, antes do glutamato e NaAC (figura 22). Essas observações com o DNP sobre o mecanismo de "swelling" e "contração" não contrariam às observações experimentais obtidas com PR, PM, IPRO e LIDO (figuras 17, 18, 19 e 20), embora em nível de ação bastante distintas quando comparadas com os resultados obtidos com DNP (figura 22). Entretanto, tendo-se em mente as propriedades lipofílicas das drogas anti-arrítmicas estudadas, poder-se-ia aventar a hipótese de que atuariam quebrando a força protomotiva mitocondrial, com efeito comparável aos desacopladores clássicos, mas a análise dos resultados demonstra a possibilidade do mecanismo de ação ser diferente para ambos (anti-arrítmicos e DNP).

Na figura 23, são mostradas as diferenças espectrais do complexo I, II e III sob a ação de PR, PM, IPRO e LIDO, reduzidos pelo $\text{NADH} + \text{H}^+$ (esquerda) ou reduzidos pelo succinato (direita). Mudanças espectrais características como mostradas na figura 23 (esquerda) foram observadas na redução do espectro de absorção do citocromo b (6, 7, 8 e 9), quando tratados com anti-arrítmicos, verificando dessa maneira uma quase completa redução da banda α -555 e β -526 do citocromo c₁, embora o citocromo b permanecesse quase totalmente com a sua banda α -563 e β -533 oxidada. E a inibição promovida pelos anti-arrítmicos, sobre a oxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$, muito se assemelha aos resultados mostrados nos espectros 4 e 5, quando inibidores clássicos do complexo I e III como a rotenona e p-CMS, foram usados e comparados com os espectros controle 1 e 2.

Dados laboratoriais visualizados neste trabalho demonstraram que, durante o estudo espectral do complexo I-II-III reduzidos pelo $\text{NADH} + \text{H}^+$, o aparecimento das bandas α e β do citocromo c₁ reduzido em presença dos inibidores clássicos ou de PR, PM, IPRO e LIDO, era consequência direta da redução do citocromo c₁ pelo $\text{NADH} + \text{H}^+$.

Resultados comparativos aos mostrados na figura (esquerda) podem ser vistos na figura 23 (direita), com a redução do complexo enzimático II-III pelo succinato, na tentativa de mostrar que as drogas anti-arrítmicas estudadas neste sistema (espectros 4, 6, 7 e 8), não determinam alterações espectrais no complexo protéico isolado, não inibindo, e garantindo desse modo a oxidação do succinato e a redução do citocromo b e c₁ quando comparados ao experimento controle.

As tabelas 2, 3, 4 e 5 mostram as avaliações quantitativas dos parâmetros oscilatórios mitocondriais em presença de três diferentes e crescentes concentrações de drogas anti-arrítmicas (PR, PM, IPR0 e LIDO). Sua análise demonstra, que alterações físico-químicas mitocondriais estão presentes ao nível de estrutura e função da membrana e através dos 8 parâmetros oscilatórios mitocondriais tabelas 2, 3, 4 e 5 (amplitude, fator de amortecimento, meio período, período médio, frequência, equilíbrio, relaxação e número total de meio ciclo), pode-se observar as seguintes alterações: a) aumento do fator de amortecimento com concomitante aumento do período médio e aumento do equilíbrio e da relaxação; b) diminuição do número de amplitude, do número de frequência por minuto (com alteração das frequências no início e no final do fenômeno oscilatório, e que também se reflete numa frequência média obtida a partir dos valores do período médio) e diminuição do número total de meio ciclo. Estas alterações tem como consequência a inibição total das oscilações levando a mitocôndria para um estado de Swelling excessivo como pode se observar através das figuras 5, 6, 7 e 8. Disto poder-se-ia inferir que ocorrem alterações estruturais ao nível da membrana mitocondrial interna em função do tempo de oscilação e das concentrações das drogas, tendo em vista a diminuição dos valores de frequência (inicial, média e final). O estado de Swelling mantido nesta situação é uma consequência de alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Portanto as tabelas 2, 3, 4 e 5 são demonstrativas das alterações físico-químicas da membrana mitocondrial interna condicionadas à interação das drogas na mesma.

Era de se esperar na análise das tabelas 2, 3, 4 e 5 que a relação, equilíbrio e relaxação deveriam aumentar, à medida que a concentração de drogas fosse aumentada, uma vez que seus efeitos sobre a membrana alteram sua organização estrutural e como consequência esta torna-se mais deformada e com menor elasticidade. Mas a inibição total da relaxação só foi verificada com concentrações muito maiores de drogas do que as expressas nas tabelas 2, 3, 4 e 5). Resultados de equilíbrio e relaxação (tabelas 2, 3, 4 e 5) são demonstrativos que até uma determinada concentração de droga há uma alteração de membrana (talvez por aumento de fluidicidade) sem muita alteração de sua elasticidade.

Resultados coincidentes em comportamento como: amplitude

de, fator de amortecimento, meio período, período médio, frequência e número total de meio ciclo, e em alguns pontos iguais aqueles obtidos nas tabelas 2,3,4 e 5, quando a oxidação do succinato foi a fonte energizadora do estado oscilatório mitocondrial, podem ser vistos comparativamente nas tabelas 6, 7, 8 e 9 em sistema oscilatório suportado pelo ATP, através de um mecanismo de hidrólise completamente diferente da oxidação do substrato, sendo que, as oscilações induzidas por ambas as fontes de energia são similares em caráter. Pode-se observar através das tabelas 6, 7, 8 e 9 que: a) diminui o número e amplitude das oscilações, diminui a frequência (inicial, média e final, sendo a última mais característica) e diminui o número total de meio ciclo; b) aumenta o fator de amortecimento (para um valor infinito), aumenta o meio período e período médio; a semelhança do que ocorre quando se usa o Succinato como fonte de energia para o processo. Também como no caso das tabelas 2,3,4 e 5 as oscilações são inibidas e um estado de Swelling é instalado rapidamente em função das concentrações usadas dos anti-arrítmicos (tabelas 6, 7, 8 e 9).

Contrariamente ao observado com o succinato nota-se nas tabelas 6, 7, 8 e 9 que há uma queda nos valores de amplitude e equilíbrio e relaxação. Há portanto na presença dos anti-arrítmicos, uma inibição das oscilações suportadas pela hidrólise do ATP instalando-se um estado de Swelling o qual tem a sua amplitude e velocidade inibidas concomitantemente ao aumento das drogas. Nota-se ainda nestas tabelas, valores nulos de relaxação induzida pela Oligomicina que poderiam estar relacionados com mudanças conformacionais e configuracionais da membrana, desorganizando-a de tal forma que não há mais energia disponível para o processo oscilatório e conseqüentemente não se pode mais observar a resposta da ATPase à Oligomicina, embora se note um pequeno Swelling mitocondrial, que ocorre logo após o desencadeamento do processo de oscilação, numa etapa onde a membrana possa ainda utilizar a força próton-motriz (figuras 9,10,11 e 12, traçado D).

Fenômenos oscilatórios similares em caráter obtidos por diferentes fontes de energização e submetidos a diferentes concentrações de drogas anti-arrítmicas, como mostram as figuras 5, 6,7 e 8 (oxidação do Succinato) e 9,10,11 e 12 (hidrólise do ATP), quando analisados quantitativamente (tabelas 2, 3, 4,5,6,7,

8 e 9), mostram inversões de valores em determinados parâmetros (equilíbrio e relaxação). O resultado da ação dessas drogas têm um efeito único sobre a membrana interna mitocondrial, embora haja alteração de todos os parâmetros físico-químicos, que expressam os acontecimentos de regulação mitocondrial ao nível molecular. Uma vez alterada esta regulação por uma ação direta sobre a membrana, toda a função mitocondrial se altera, de um modo diferente, para fenômenos que até então pareciam ser iguais em características, mas não em resposta ao nível molecular, quando analisados e mostrados nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

A adição de drogas anti-arrítmicas (PR, PM, IPRO e LIDO) em dois estágios distintos de oxidação de substratos, levou à obtenção dos resultados mostrados na tabela 10 (parte A e B) sobre o swelling e a contração de mitocôndria energizada por diferentes fontes de substratos em presença de um íon permeante como o Acetato de Sódio (NaAC). Dados percentuais correspondentes ao Swelling antes da oxidação do glutamato mostram quase 100% a inibição deste pelo propranolol (PR), não sendo tão acentuado assim no caso dos demais anti-arrítmicos estudados (PM, IPRO e LIDO), mas pode ser bastante significativo no caso da lidoflazina podendo este chegar a 52% quando comparado ao percentual de ação do controle visto na tabela 10 (A), durante o Swelling obtido pela oxidação do glutamato. A sequência de adição das demais fontes energizadoras (Succinato, NaASC + TMPD e ATP), mostra uma alteração generalizada do Swelling, podendo ter percentuais de inibição bem mais acentuados como no caso do ascorbato + TMPD onde este valor chega a 80% com a lidoflazina quando comparada ao controle, em relação ao Swelling das outras duas fontes de energização (Succinato + ATP), cujos valores de inibição as vezes são pouco significativos em relação ao controle, caindo dentro de uma faixa percentual de 10%, considerada como variação experimental entre as diferentes drogas anti-arrítmicas sobre o Swelling mitocondrial, mantido pelas diferentes fontes de oxidação e hidrólise de substratos (Glutamato, Succinato, NaASC + TMPD e ATP).

Outro ponto a salientar na tabela 10 (A) foi mostrado pela contração mitocondrial obtida após a oxidação do glutamato em substituição à rotenona. Valores percentuais de 66% a 100% de reversão do Swelling mitocondrial dirigido pelo glutamato obtive-se por ação direta desses anti-arrítmicos supostamente em virtude da lipofilicidade sobre a conformação estrutural da membra-

na interna ou sobre o complexo I ou sobre ambos, responsável pela integridade e manutenção do estado de Swelling em equilíbrio dinâmico e pelas trocas iônicas transmembrânicas sustentadoras desse estado integralmente modificado. Similarmente a estes valores, pode-se ver na tabela 10 (A) outros valores de contração do Swelling suportados pelo Succinato, NaASC + TMPD e ATP; nota-se que os percentuais de contração suportados pelo NaASC + TMPD são em média mais baixos que os demais valores de contração obtidos pelos diferentes anti-arrítmicos quando comparados ao controle. Pode-se notar na presença de propranolol e iproveratril valores estimulativos de até 22% do percentual de contração e reversão total, em Swelling mitocondrial suportado pela hidrólise do ATP.

Os percentuais de contração e de Swelling, mostrados na parte (B) da tabela 10 usando glutamato na presença de todos os anti-arrítmicos, são correspondentes aos valores obtidos na parte (A) da tabela 10 de Swelling e contração do glutamato em comparação entre si e aos controles das partes A e B da tabela 10. Observa-se uma inibição do Swelling e da contração antes da oxidação do glutamato, e um percentual de reversão total entre a contração e o Swelling após a oxidação do glutamato em substituição a rotenona. Os demais valores de contração e Swelling da parte (B) energizados pelo succinato, NaASC + TMPD e ATP apresentam alterações percentuais quando comparados ao controle. Como na parte (A), a contração e o Swelling suportados pela oxidação do NaASC + TMPD na parte (B), atingem níveis bastante baixos podendo chegar a valores zero como no caso do "Swelling" obtido em presença da Lidoflazina adicionada após a oxidação do glutamato em substituição a rotenona. Valores de contração da parte (B) quando comparados aos valores de Swelling da parte (A) é vice-versa apresentam com todas as fontes de energia, alterações percentuais que podem ir desde pequenas inibições, valores nulos de alterações até valores percentuais considerados como pequenos estímulos, dando uma demonstração de que nem tudo apresentado pode ser analisado pois as alterações do Swelling e contração causadas pela solubilidade das drogas na membrana mitocondrial energizada ou não está em função da carga da mesma.

Demonstrando já qualitativamente na figura 22, e agora quantitativamente na tabela 10 (parte A e B), os resultados percentuais do 2-4 dinitrófenol (DNP) sobre o Swelling e a contração mitocondrial, mostram (tabela 10) valores nulos de Swelling e contração comparados ao controle, para todas as fontes energiz-

zadoras do Swelling (Glutamato, Succinato, NaASC + TMPD e ATP) adicionado antes da oxidação do glutamato. As diferenças obtidas pelos valores percentuais de Swelling e contração dos anti-arrítmicos estudados (PR, PM, IPRO e LIDO), levam a sugerir um comportamento mitocondrial diferente daquele produzido pelos desacopladores clássicos como o DNP. Desses resultados comparativos demonstrados na tabela 10 entre anti-arrítmicos, DNP e controle, se pode ter uma idéia de que fenômeno como desacoplamento não é o mecanismo de ação produzido por essas drogas, em face de que, embora deteriorado, um mecanismo de Swelling e contração persiste, porque ainda existe a manutenção de um gradiente eletroquímico que não ocorre com o DNP. Assim os efeitos de membrana produzidos por essas drogas levam a uma alteração morfo-estrutural da membrana mitocondrial interna sem dissipar totalmente o gradiente de próton e o transporte de sódio responsável pelo estado de Swelling e contração mitocondrial.

Os efeitos percentuais sobre a respiração durante o Swelling mitocondrial são mostrados na tabela 11. Nota-se que a adição de anti-arrítmicos antes ou depois da oxidação do glutamato quando este foi a fonte energizadora do swelling, determina alterações nos valores percentuais da respiração mitocondrial quando comparada ao controle. Algumas vezes estes valores são pouco significativos como no caso do propranolol. Outras vezes tem maior significação como mostrado para o iproveratril, justificando desse jeito uma pequena inibição da respiração quase que inexpressiva quando se compara estes valores aos percentuais obtidos pelo DNP e este ao controle.

Os dois valores de percentuais de respiração obtidos com o glutamato após a oxidação do mesmo quando tais drogas foram adicionadas em substituição a rotenona, são resultantes da alteração desta velocidade respiratória, em relação ao controle (figura 16), e com a velocidade respiratória do glutamato, no ensaio experimental com as drogas (Figuras 17, 18, 19 e 20 direta), cujos valores respiratórios são bastante próximos entre si e entre os valores percentuais obtidos pela adição de drogas antes da oxidação do glutamato, quando este foi a fonte energizadora. Valores respiratórios acima de 100% podem também ser vistos na tabela 11, quando o succinato e NaASC+TMPD foram a fonte de energia; estes valores são mais expressivos com o NaASC+TMPD quando as drogas anti-arrítmicas foram adicionadas antes da oxidação do glutamato embora também ocorra após a oxidação do mesmo,

caracterizando desse jeito um possível estímulo respiratório bastante similar àquele obtido com o DNP na tabela 11..

Embora na tabela 11, os resultados percentuais da respiração sobre ação de anti-arrítmicos darem a impressão de igualdade de fenômeno obtido com os valores de DNP, pode-se chegar a conclusão de que estes fenômenos são distintos ao nível molecular. A inibição da respiração do glutamato pelo DNP antes e depois da oxidação do mesmo, se deve à quebra do potencial de ação da membrana mitocondrial cujo transporte de substrato (Glutamato) é dependente deste potencial, levando deste jeito a inibição da respiração por deficiência de substrato. O estímulo respiratório com o succinato e NaASC+ TMPD embora pequeno, explica-se através da tentativa mitocondrial de repor o gradiente de próton, continuamente quebrado pelo efeito desacoplante do DNP, estimulando desse jeito a velocidade respiratória mitocondrial.

Já os resultados obtidos com os anti-arrítmicos (tabela 11) levam a crer que tais efeitos de inibição sobre a respiração são a consequência da ação dessas drogas sobre a membrana mitocondrial, alterando sua estrutura conformacional e inibindo o complexo I ou agindo diretamente sobre o próprio complexo I ou ambos fenômenos, em face de que, cargas ao nível de membranas podem também ser alteradas modulando negativamente o mecanismo de respiração do complexo I. Assim as alterações de cargas da membrana mitocondrial e a mudança conformacional, pode também modular positivamente e o citocromo c, aumentando o seu "TURNOVER NUMBER" e sendo a causa, as vezes do estímulo respiratório do succinato e NaASC + TMPD, sendo este último favorecido em virtude de seu ponto de entrada de oxidação ser através do citocromo c (tabela 11).

TABELA 2 - Avaliação dos parâmetros oscilatórios mitocondriais suportados pelo Succinato em presença de NaAC como ion oscilante em função da concentração de Propranolol (PR).

PARÂMETRO OSCILATÓRIO CONCENTRAÇÃO DA DROGA (μ M/mg proteína)	AMPLITUDE (% T)	FATOR DE AMORTECIMENTO	MEIO PERÍODO (SEG.)	PERÍODO MÉDIO (SEG.)	FREQUÊNCIA (MIN.)			EQUILÍBRIO (% T)	RELAXAÇÃO (% T)	Nº TOTAL DE 1/2 CICLOS
					INICIAL	MÉDIO	FINAL			
A) CONTROLE	a - b - c - d 16,4-5,7-1,4-0,2 g - h - j 15,0-3,4-0,6	a/b - b/c - c/d 2,9 - 4,1 - 7,0 g/h - h/j 4,4 - 5,7	o - p - q 44 58 58 r - s - t 52 52 40	101	0,59	0,59	0,65	4,6	4,4	6
B) 8,6	a - b - c 17,5-6,3-1,4 g - h - j 16,2-3,5-0,6	a/b - b/c 2,7 - 4,5 g/h - h/j 4,6 - 5,8	o - p - q 40 56 60 r - s 52 48	102	0,625	0,59	0,60	5,0	4,7	5
C) 20,0	a - b 17,0 0,9 g - j 5,6 0,5	a/b - g/h 18,9 - 11,2	o - p - q 44 60 52	104	0,58	0,58	0,29	10,2	7,1	3
D) 57,0	a - g 16,9 - 5,0	∞	o 88	176	0,17	0,34	- ∞	11,9	10,6	1

Os valores acima apresentados foram obtidos a partir dos registros da FIGURA 5.

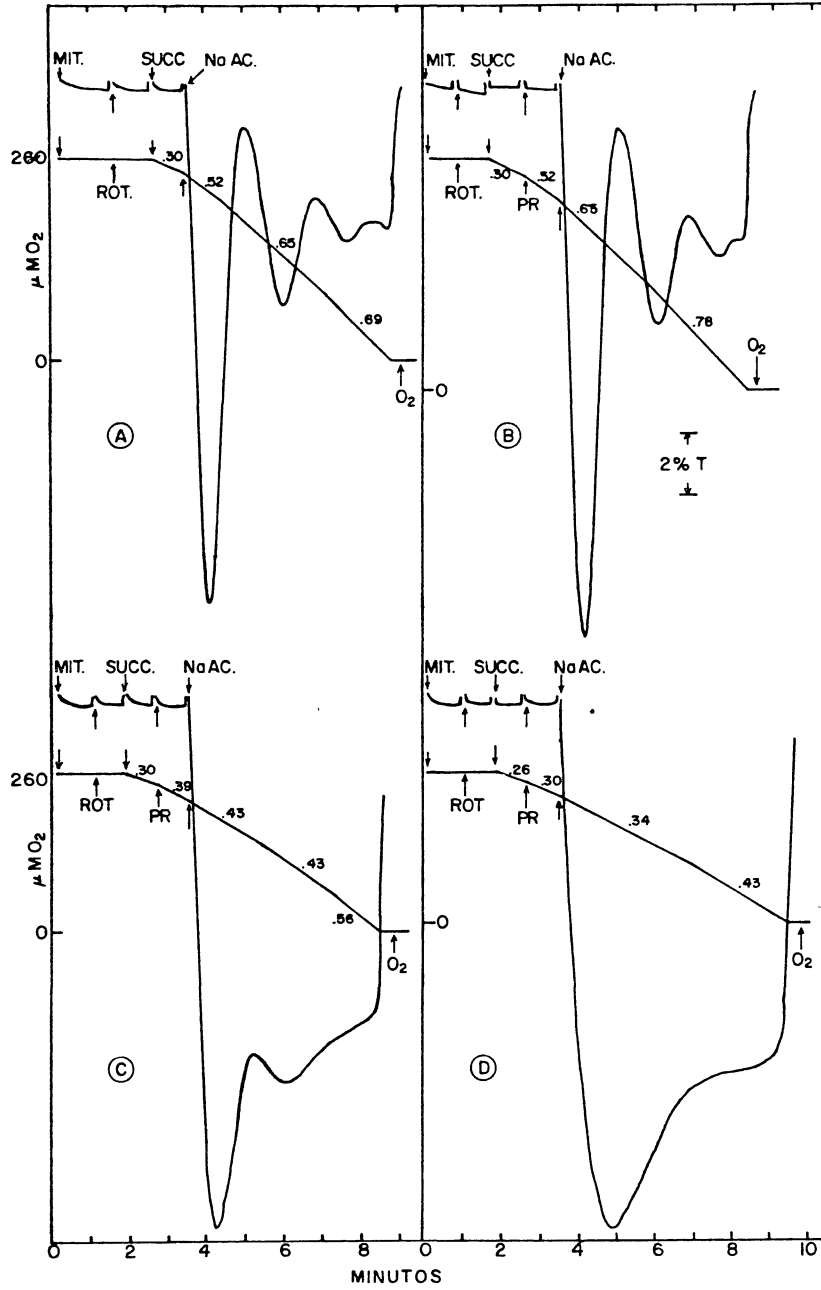


FIGURA 5 - Efeito do propranolol (PR) sobre oscilações do volume mitocondrial e oxidação do succinato. Propranolol foi adicionado após o succinato.

A - Controle

B - 8,6 μM de PR/mg de proteína

C - 20 μM de PR/mg de proteína

D - 57 μM de PR/mg de proteína

TABELA 3 - Avaliação dos parâmetros oscilatórios mitocondriais suportados pelo Succinato em presença de NaAC como íon oscilante em função da concentração de Maleato de Perexilina (PM).

PARÂMETRO OSCILATÓRIO	AMPLITUDE (% T)	FATOR DE AMORTECIMENTO	MEIO PERÍODO (SEG.)	PERÍODO MÉDIO (SEG.)	FREQUÊNCIA (MIN.)			EQUILÍBRIO (% T)	RELAXAÇÃO (% T)	Nº TOTAL DE 1/2 CICLOS
					INICIAL	MÉDIO	FINAL			
A) CONTROLE	a - b - c - d 17,6-4,6-1,2-0,4 e g h 0,2 - 10,7-2,7 j k l 0,8 - 0,2-0,1	a/b - b/c - c/d 3,8 - 3,8 - 3 d/e - g/h 2 - 4,0 h/j - j/k - k/l 3,4 - 4,0 - 2	o - p - q 34 - 38 - 30 r - s - t 34 - 26 - 28 u - v - m 26 - 30 - 30	61,3	0,83	0,98	1	9,2	4,9	10
B) 0,56	a - b - c 13,2- 4,4 - 0,6 g - h - j 10,5- 2,3 - 0,4	a/b - b/c 3 - 7,3 g/h - h/j 4,6 - 5,7	o - p - q 30 - 32 - 34 r - s 34 - 28	63,2	0,97	0,95	0,97	4,1	3,6	5
C) 1,40	a - b 17,8 - 1,5 g - h 7,5 0,7	a/b 11,9 g/h 10,7	o - p 32 - 50 q 32	76	0,73	0,79	0,47	7,8	6,7	3
D) 4,20	a - g 9,9 - 1,3	∞	o 76	152	0,20	0,39	- ∞	8,6	6,9	1

Os valores acima apresentados foram obtidos à partir dos registros da FIGURA 6.

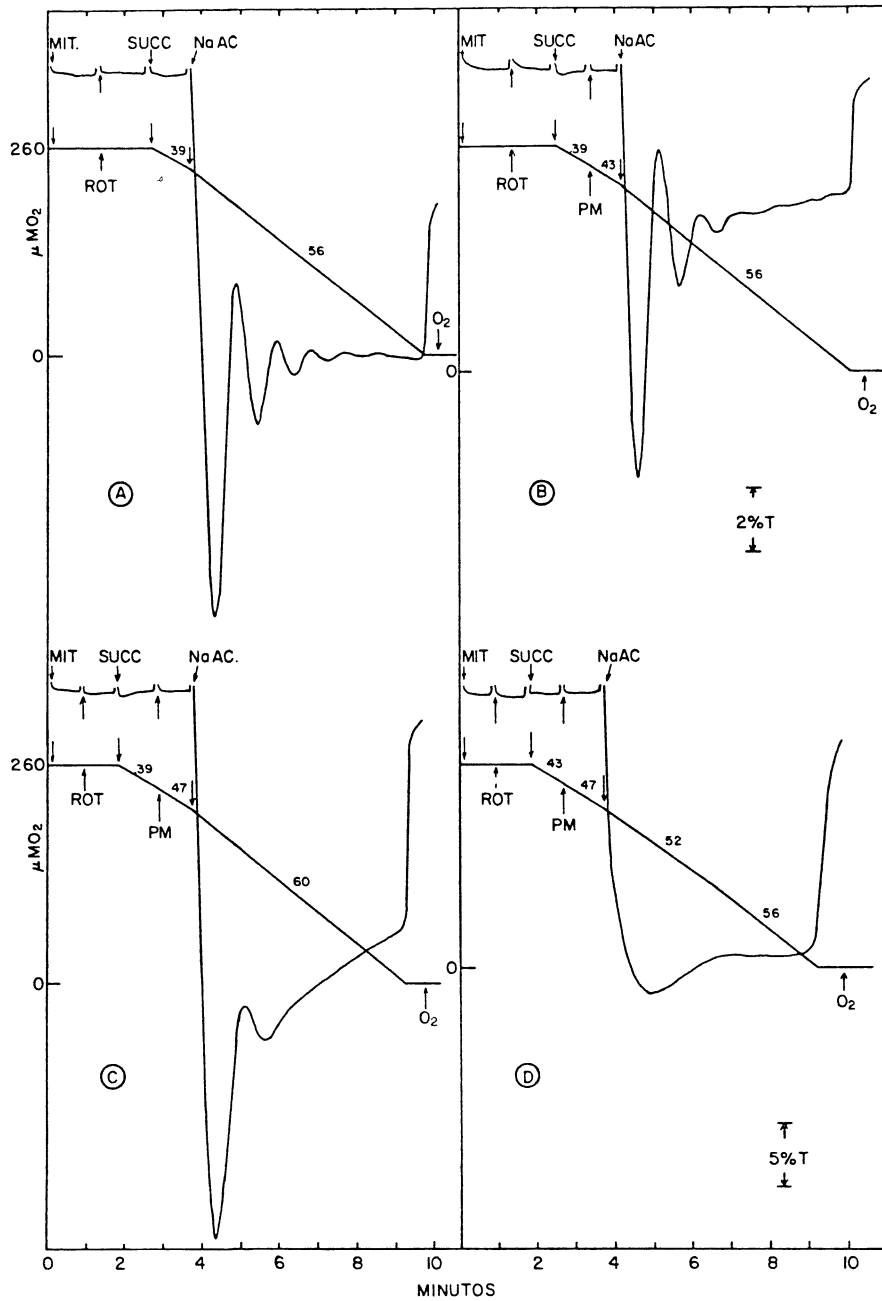


FIGURA 6 - Efeito do maleato de perexilina (PM) sobre oscilações do volume mitocondrial e oxidação do succinato. Maleato de perexilina foi adicionado após o succinato.

- A - Controle B - 0,56 μM de PM/mg de proteína
 C - 1,40 μM de PM/mg de proteína
 D - 4,20 μM de PM/mg de proteína

TABELA 4- Avaliação dos parâmetros oscilatórios mitocondriais suportados pelo Succinato em presença de NaAC como ion oscilante em função da concentração de Iproveratril (IPRO).

PARÂMETRO OSCILATÓRIO CONCENTRAÇÃO DA DROGA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)	AMPLITUDE (% T)	FATOR DE AMORTECIMENTO	MEIO PERÍODO (SEG.)	PERÍODO MÉDIO (SEG.)	FREQUÊNCIA (MIN.)			EQUILÍBRIO (% T)	RELAXAÇÃO (% T)	Nº TOTAL DE 1/2 CICLOS
					INICIAL	MÉDIO	FINAL			
A) CONTROLE	a - b - c - d 11,8-4,2-1,1-0,4 g,8-2,9-0,8-0,2 g h j k	a/b b/c c/d 2,8 3,8 2,7 g/h h/j j/k 3,4 3,6 4	o p q r 40 42 38 46 s t u 40 42 48	84,6	0,73	0,71	0,67	4	3,8	7
B) 7,0	a - b - c 11,8-3,0-0,3 6,0-1,3-0,2 g h j	a/b b/c 3,9 10 g/h h/j	o p q r 34 28 36 38 24 s	64	0,97	0,94	0,97	7,2	6,7	5
C) 11,60	a b 11,8 1,6 3,1 0,5 g h	a/b g/h 7,4 6,2	o p q 40 30 34	69,3	0,86	0,865	0,44	8,8	6,7	3
D) 46,60	a g 12,1 0,9	∞	o 88	176	0,17	0,34	$-\infty$	11,6	6,3	1

Os valores acima apresentados foram obtidos à partir dos registros da FIGURA 7.

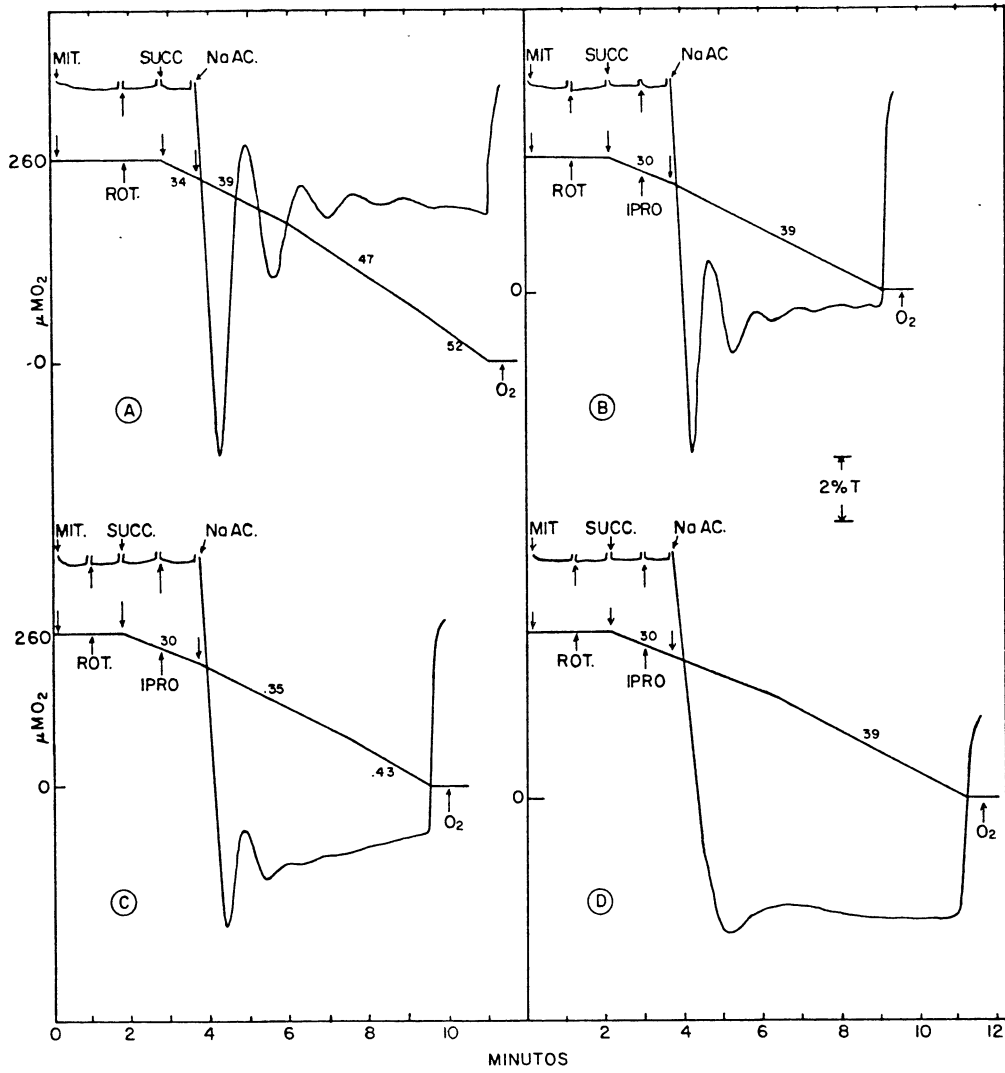


FIGURA 7 - Efeito do iproveratril (IPRO) sobre oscilações do volume mitocondrial e oxidação do succinato. Iproveratril foi adicionado após o succinato.

- A - Controle
 B - 7,00 μM de IPRO/mg de proteína
 C - 11,60 μM de IPRO/mg de proteína
 D - 46,60 μM de IPRO/mg de proteína

TABELA 5 - Avaliação dos parâmetros oscilatórios mitocondriais suportados pelo Succinato em presença de NaAC como ion oscilante em função da concentração de Lidoflazina (LIDO).

PARÂMETRO OSCILATÓRIO	AMPLITUDE (% T)	FATOR DE AMORTECIMENTO	MEIO PERÍODO (SEG.)	PERÍODO MÉDIO (SEG.)	FREQUÊNCIA (MIN.)			EQUILÍBRIO (% T)	RELAXAÇÃO (% T)	Nº TOTAL DE 1/2 CICLOS
					INICIAL	MÉDIO	FINAL			
A) CONTROLE	a b c d 13,9-5,8-1,2-0,6 12,3 3,1 0,6 g h j	a/b b/c c/d 2,4 4,8 2 4 5,2 g/h h/j	o p q r 44 42 56 56 60 44 s t	100,7	0,70	0,595	0,58	5,6	5,4	6
B) 0,80	a b c 12,6 4,9 0,4 9,7 1,9 0,3 g h j	a/b b/c 2,6 12,2 5,1 6,3 g/h h/j	o p q r 26 38 42 44 38 s	75,2	0,94	0,80	0,73	6,1	5,8	5
C) 3,20	a b 14,2 1,8 5,6 0,7 g h	a/b g/h 7,9 8	o p q 30 36 50	77,3	0,91	0,78	0,30	9,3	9	3
D) 16,00	a b h 13,6 2,2 0,9	a/b 6,2	o p 64 96	160	0,375	0,375	- ∞	12,4	12,1	2

Os valores acima apresentados foram obtidos a partir dos registros da FIGURA 8.

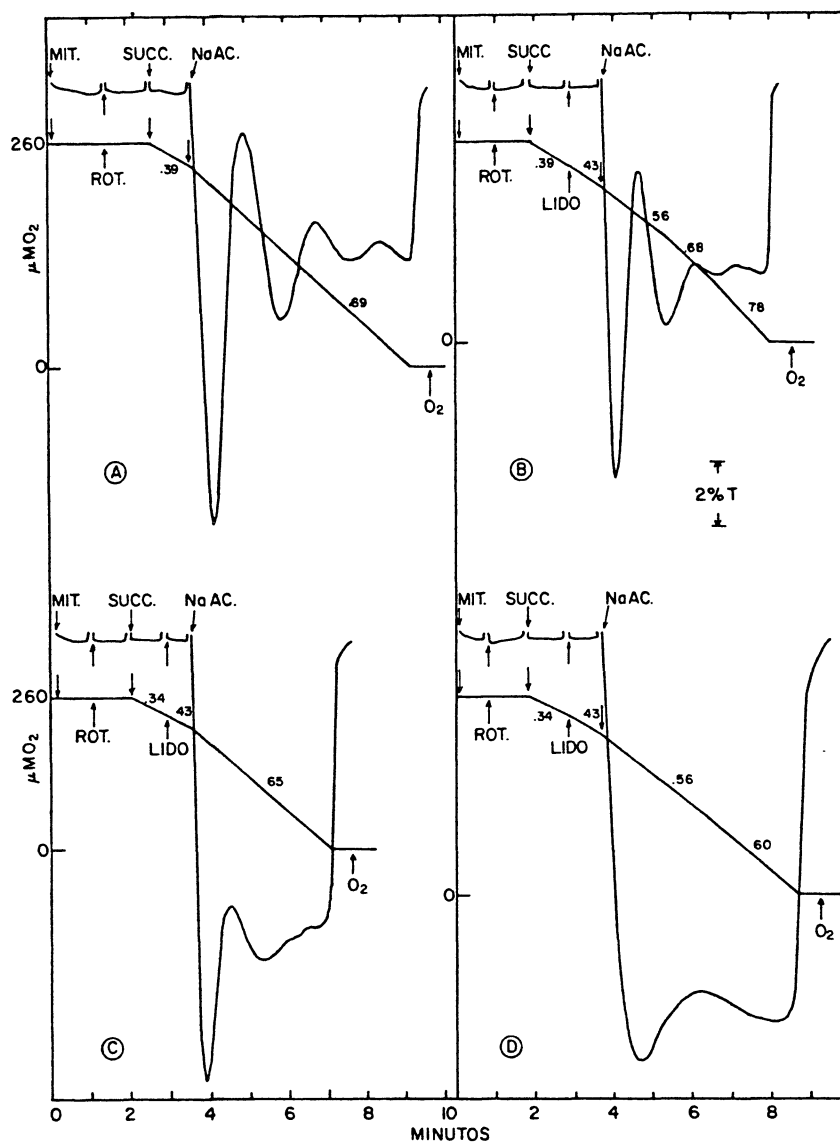


FIGURA 8 - Efeito da lidoflazina (LIDO) sobre oscilações do volume mitocondrial e oxidação do succinato. Lidoflazina foi adicionada após o succinato.

- A - Controle
 B - 0,80 μM de LIDO/mg de proteína
 C - 3,20 μM de LIDO/mg de proteína
 D - 16,00 μM de LIDO/mg de proteína

TABELA 6 - Avaliação dos parâmetros oscilatórios mitocondriais suportados pela hidrólise do ATP em presença de NaAC como ion oscilante em função da concentração de Propranolol (PR).

PARÂMETRO OSCILATÓRIO CONCENTRAÇÃO DA DROGA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)	AMPLITUDE (% T)	FATOR DE AMORTECIMENTO		MEIO PERÍODO (SEG.)	PERÍODO MÉDIO (SEG.)	FREQUÊNCIA (MIN.)			EQUILÍBRIO (% T)	RELAXAÇÃO (% T)	Nº TOTAL DE 1/2 CICLOS
						INICIAL	MÉDIO	FINAL			
A) CONTROLE	a b c 14,2 - 2,8 -0,2 g h i	a/b b/c 5,1 14	o p q 44 50 42 r s		86,4	0,64	0,69	0,75	8,2	3,7	5
B) 14,30	a b g 12,4 0,3 2,6	a/b 41,3	o p 48 50		98	0,61	0,61	- ∞	7,8	3,4	2
C) 28,60	a g 9,9 6,6	∞	o 56		112	0,27	0,535	- ∞	3,3	3	1
D) 44,00	a g 9,8 8,9	∞	o 66		132	0,23	0,45	- ∞	1	1	1

Os valores acima apresentados foram obtidos à partir dos registros da FIGURA 9.

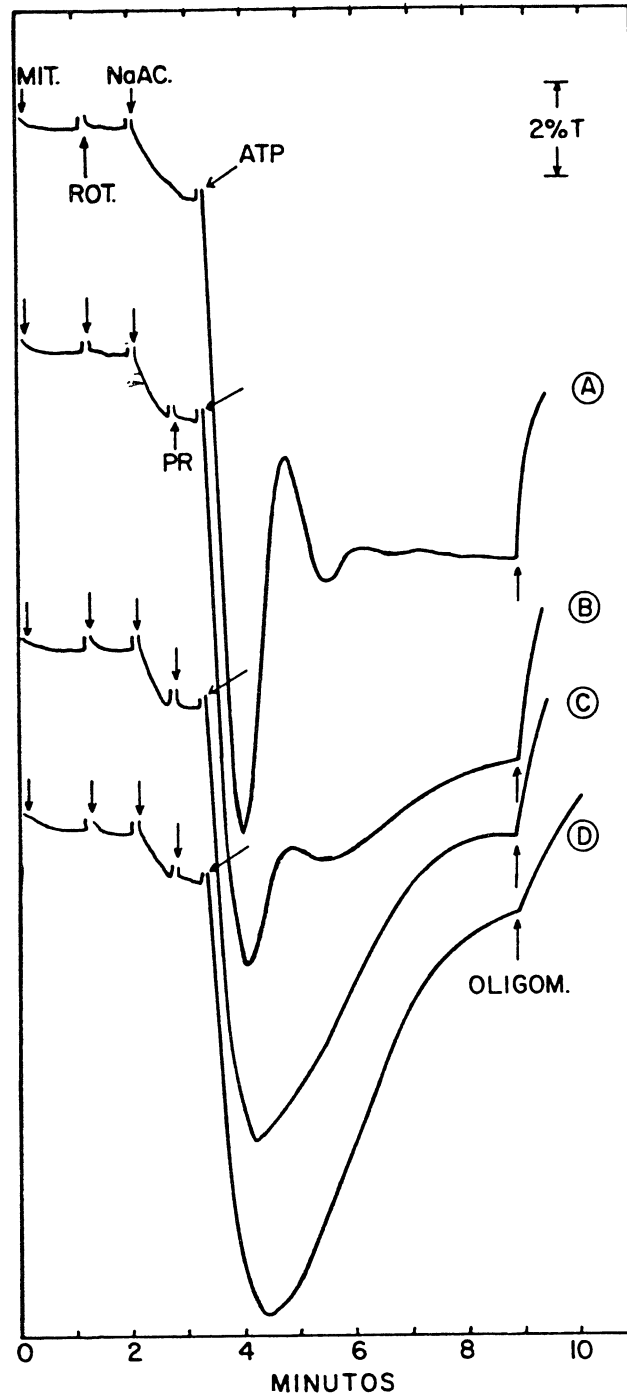


FIGURA 9 - Efeito do propranolol (PR) sobre oscilações do volume mitocondrial energizado pela hidrólise do ATP. Propranolol foi adicionado após o acetato de sódio (NaAc.).

A - Controle

B - 14,30 μM de PR/mg de proteína

C - 28,60 μM de PR/mg de proteína

D - 44,00 μM de PR/mg de proteína

TABELA 7 - Avaliação dos parâmetros oscilatórios mitocondriais suportados pela hidrólise do ATP em presença de NaAC como ion oscilante em função da concentração de Maleato de Perexiline (PM).

PARÂMETRO OSCILATÓRIO	AMPLITUDE (% T)			FATOR DE AMORTECIMENTO		MEIO PERÍODO (SEG.)	PERÍODO MÉDIO (SEG.)	FREQUÊNCIA (MIN.)			EQUILÍBRIO (% T)	RELAXAÇÃO (% T)	Nº TOTAL DE 1/2 CICLOS			
								INICIAL	MÉDIO	FINAL						
A) CONTROLE	a 14,3	b 2,8	c 0,2	a/b 5,1	b/c 14	o 42	p 56	q 42	r 40	84	0,61	0,71	0,86	8,2	3,8	5
	g 8,4	h 0,8	j 0,2	g/h 10,5	h/j 4	s 30										
B) 1,40	a 13,2	g 9,0		∞		o 82				164	0,18	0,365	- ∞	4,1	3,8	1
C) 2,80	a 11,6	g 6,2		∞		o 96				192	0,17	0,31	- ∞	5,4	5	1
D) 4,20	a 2,7	g 1,6		∞		o 108				216	0,14	0,28	- ∞	1,2	0	1

Os valores acima apresentados foram obtidos à partir dos registros da FIGURA 10.

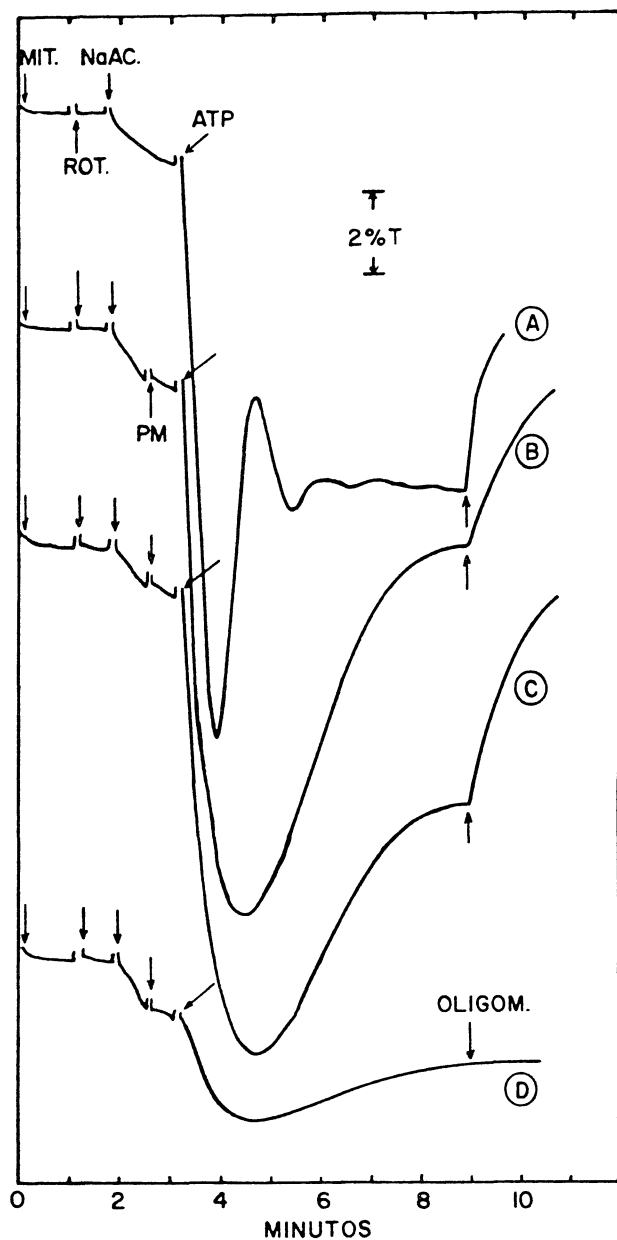


FIGURA 10 - Efeito do maleato de perexilina (PM) sobre oscilações do volume mitocondrial energizado pela hidrólise de ATP. Maleato de perexilina foi adicionado após o acetato de sódio (NaAc.).

- A - Controle
 B - 1,40 μM de PM/mg de proteína
 C - 2,80 μM de PM/mg de proteína
 D - 4,20 μM de PM/mg de proteína

TABELA 8 - Avaliação dos parâmetros oscilatórios mitocondriais suportados pela hidrólise ao ATP em presença do NaAC como ion oscilante em função da da concentração de Iproveratriil (IPRO).

PARÂMETRO OSCILATÓRIO CONCENTRAÇÃO DA DROGA (µM/mg proteína)	AMPLITUDE (% T)			FATOR DE AMORTECIMENTO		MEIO PERÍODO (SEG.)	PERÍODO MÉDIO (SEG.)	FREQUÊNCIA (MIN.)			EQUILÍBRIO (% T)	RELAXAÇÃO (% T)	Nº TOTAL DE 1/2 CICLOS			
	a	b	c	a/b	b/c	o	p	q	r	INICIAL				MÉDIO	FINAL	
A) CONTROLE	14,2	2,4	0,2	6	12	40	52	42	46	86,4	0,65	0,69	0,73	8,3	3,3	5
	8,4	0,8	0,2	10,5	4	36										
	g	h	j	g/h	h/j	s										
B) 9,30	a	g		∞		o				120	0,25	0,50	- ∞	1,5	1,5	1
	9,4	7,9				60										
C) 23,20	a	g		∞		o				176	0,17	0,34	- ∞	1,3	1,3	1
	8,6	7,6				88										
D) 46,40	a	g		∞		o				144	0,21	0,42	- ∞	0,6	0	1
	2	1,5				72										

Os valores acima apresentados foram obtidos a partir dos registros da FIGURA 11.

TABELA 9 - Avaliação dos parâmetros oscilatórios mitocondriais suportados pela hidrólise do ATP em presença do NaAC como ion oscilante em função da concentração de Lidoflazina (LIDO).

PARÂMETRO OSCILATÓRIO	AMPLITUDE (% T)			FATOR DE AMORTECIMENTO		MEIO PERÍODO (SEG.)	PERÍODO MÉDIO (SEG.)	FREQUÊNCIA (MIN.)			EQUILÍBRIO (% T)	RELAXAÇÃO (% T)	Nº TOTAL DE 1/2 CICLOS			
								INICIAL	MÉDIO	FINAL						
A) CONTROLE	a 14,3	b 2,8	c 0,3	a/b 5,1	b/c 9,3	o 42	p 50	q 44	r 42	83,2	0,65	0,72	0,83	8,2	3,6	5
	8,3	0,8	0,2	10,4	4	30										
	g 9	h h	j j	g/h	h/j	s										
B) 3,20	a 11,7	g 4		∞		o 60				120	0,25	0,50	- ∞	5,2	2,4	1
C) 8,00	a 10,4	g 9,8		∞		o 94				188	0,16	0,32	- ∞	0,6	0,4	1
D) 16,00	a 3,4	g 2,9		∞		o 70				140	0,21	0,43	- ∞	0,5	0	1

Cs valores acima apresentados foram obtidos à partir dos registros da FIGURA 12.

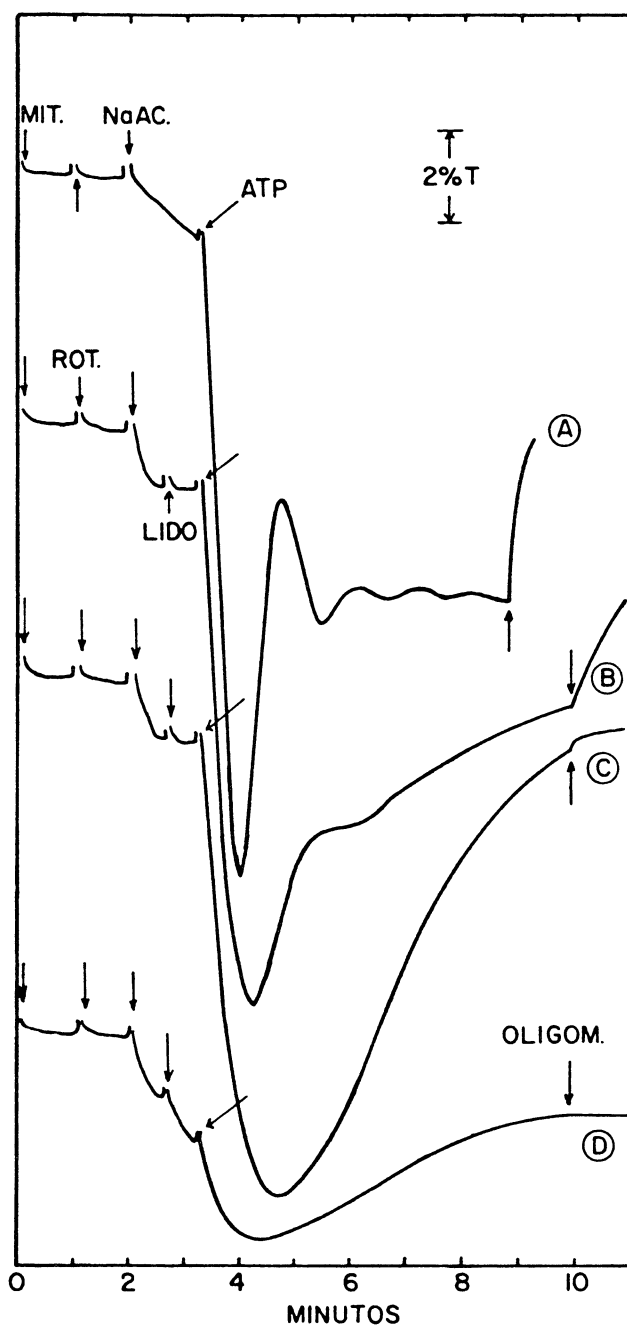


FIGURA 12 - Efeito da lidoflazina (LIDO) sobre oscilações do volume mitocondrial energizado pela hidrólise de ATP. Lidoflazina foi adicionada após o acetato de sódio (NaAc.).

- A - Controle B - 3,20 μM de LIDO/mg de proteína
 C - 8,00 μM de LIDO/mg de proteína
 D - 16,00 μM de LIDO/mg de proteína

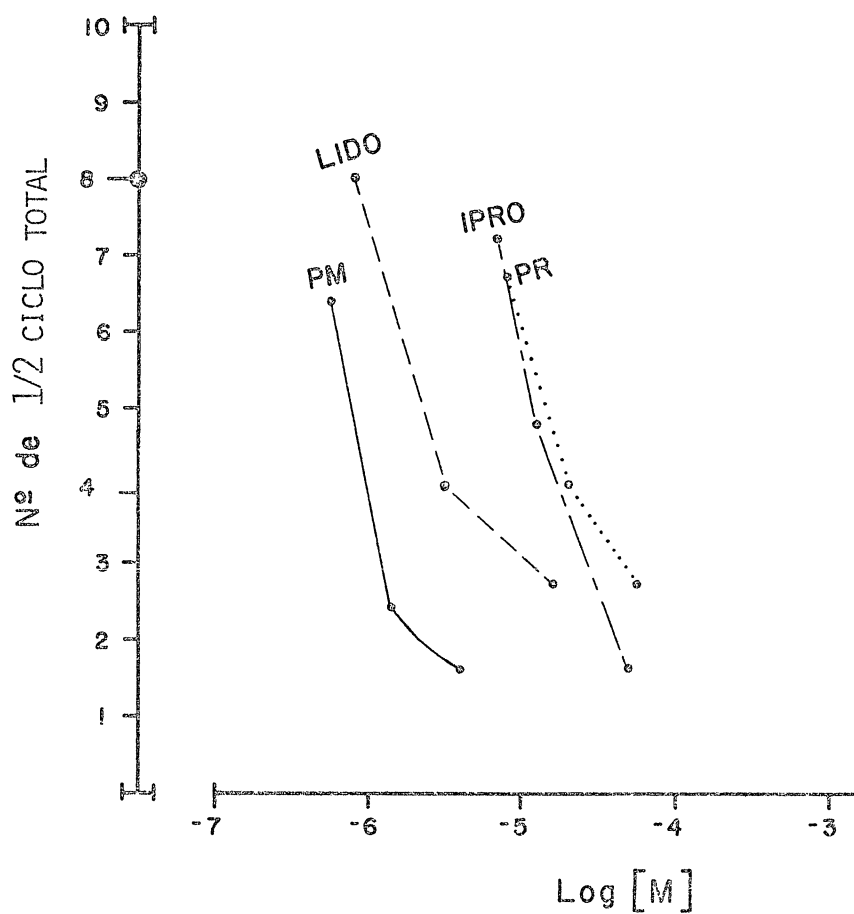


FIGURA 13 - Plote mostrando a inibição do número de 1/2 ciclos totais a diferentes concentrações dos anti-arrítmicos (PR, PM, IPRO E LIDO), sobre o estado oscilatório do volume mitocondrial, suportado pela oxidação do succinato e em presença de Na^+AC .
 * - média dos 1/2 ciclos totais dos experimentos normais.

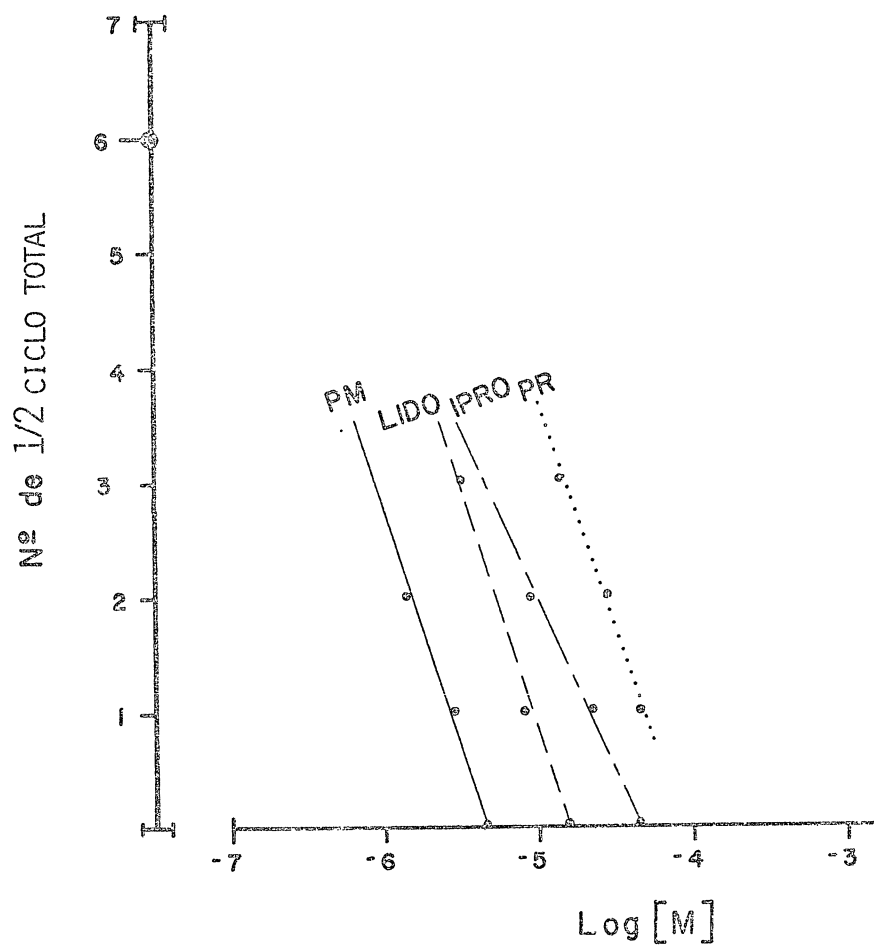


FIGURA 14 - Plote mostrando a inibição do número de 1/2 ciclos totais a diferentes concentrações dos anti-arrítmicos (PR, PM, IPRO e LIDO), sobre o estado oscilatório do volume mitocondrial, suportado pela hidrólise do ATP e em presença de Na^+ AC.

⊙ - média dos 1/2 ciclos totais dos experimentos normais.

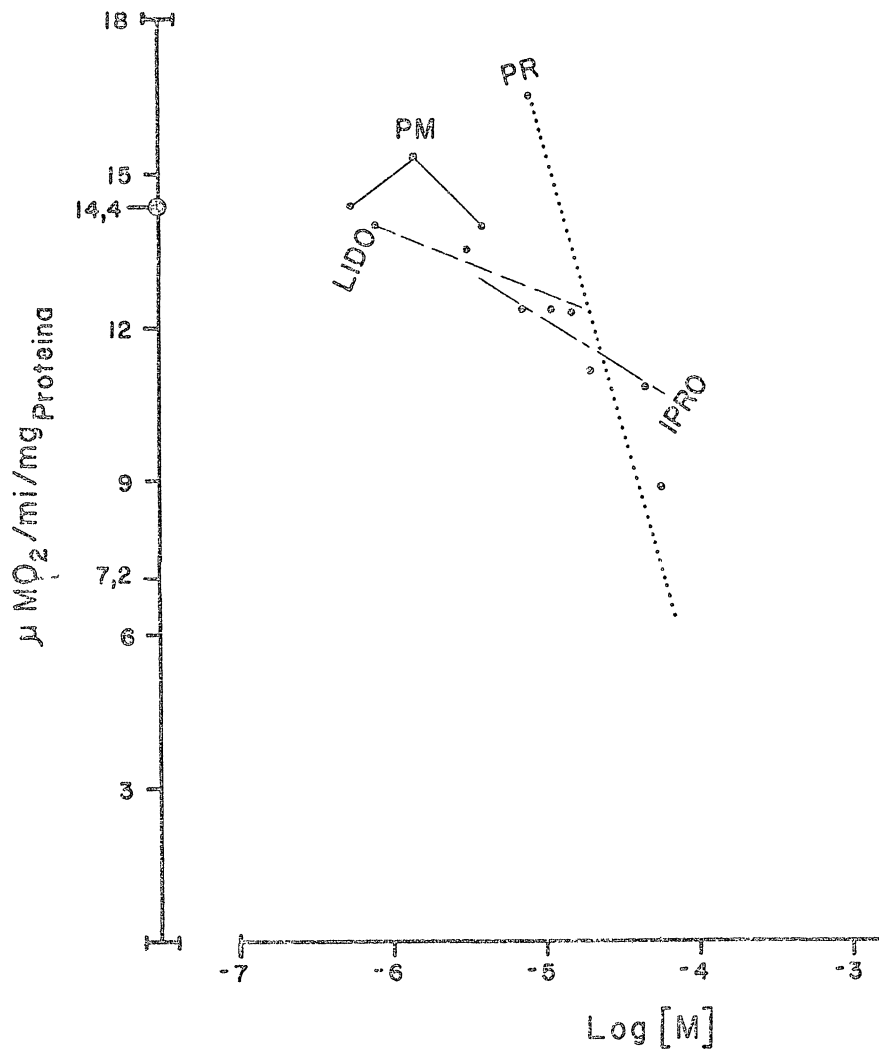


FIGURA 15 - Plote mostrando a inibição do consumo de oxigênio a diferentes concentrações dos anti-arrítmicos (PR, PM, IPRO e LIDO), sobre a respiração mitocondrial durante o estado oscilatório, suportado pela oxidação do succinato e em presença de Na^+ AC.

⊙ - média das respirações dos experimentos normais.

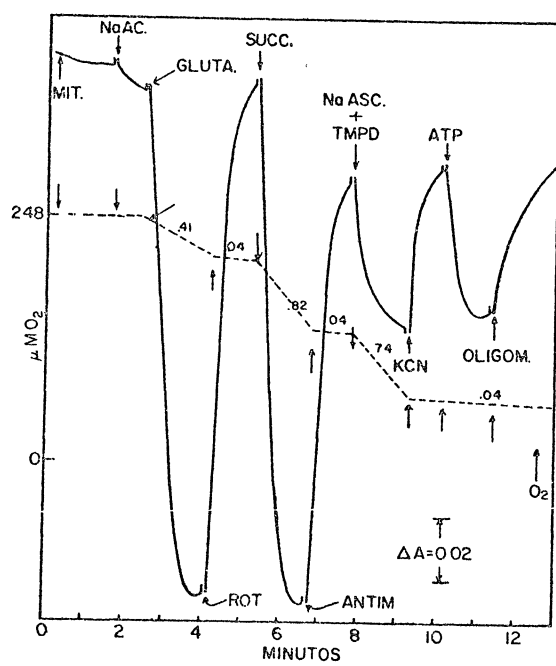


FIGURA 16 - Dependência de energia do "swelling" mitocondrial.
Sistema - Controle.

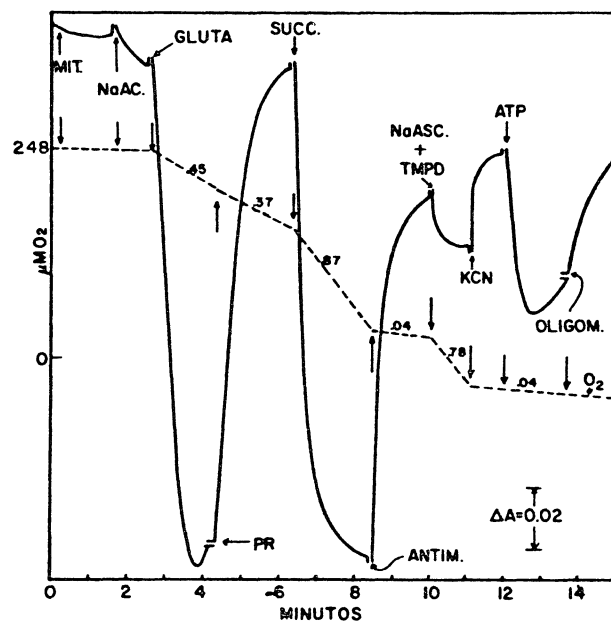
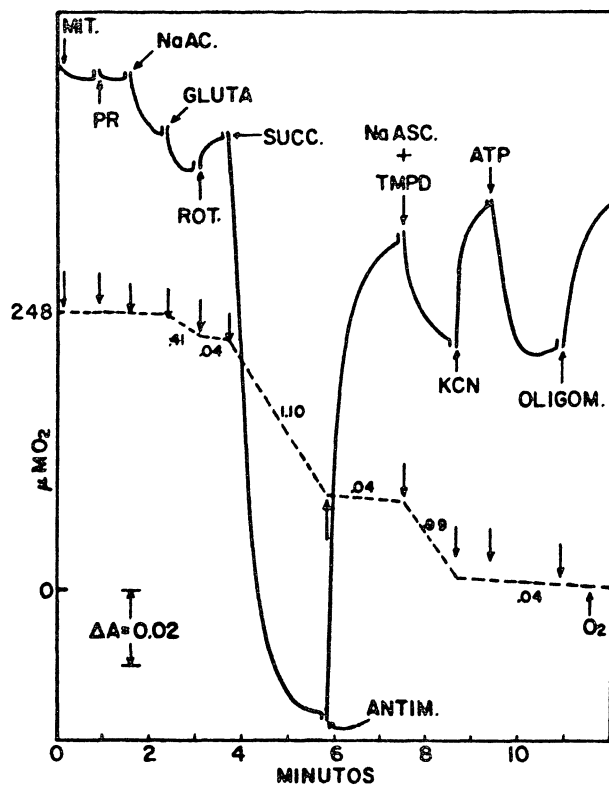


FIGURA 17 - Efeito do propranolol (PR) sôbre a dependência de energia do "swelling" mitocondrial. O PR foi usado na concentração de $43,00 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína.

Esquerda - propranolol foi adicionado ao sistema antes do acetato de sódio (NaAc.).

Direita - propranolol foi adicionado ao sistema após o glutamato.

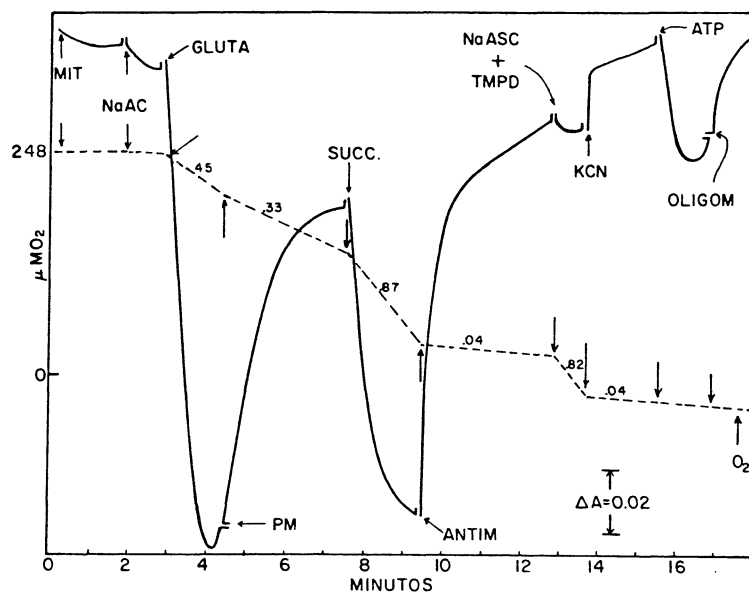
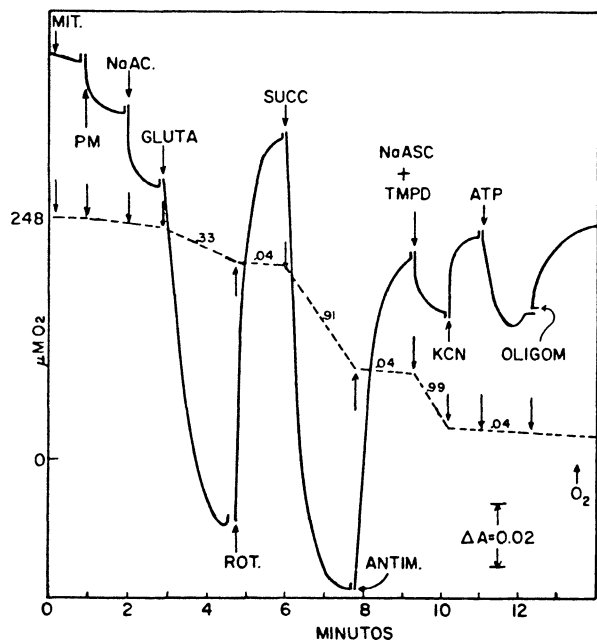


FIGURA 18 - Efeito do maleato de perexiline (PM) sôbre a dependên-
cia de energia do "swelling" mitocondrial. Maleato de
perexiline foi usado na concentraçãõ de 4,20 $\mu\text{M}/\text{mg}$
de protefna.

Esquerda - maleato de perexiline foi adicionado ao
sistema antes do acetato de sôdio (NaAc.)
Direita - maleato de PM foi adicionado ao sistema a-
pós o glutamato.

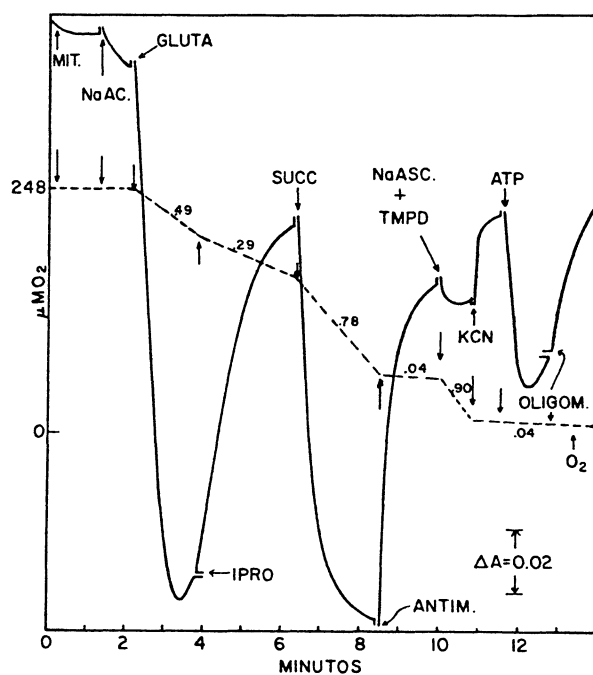
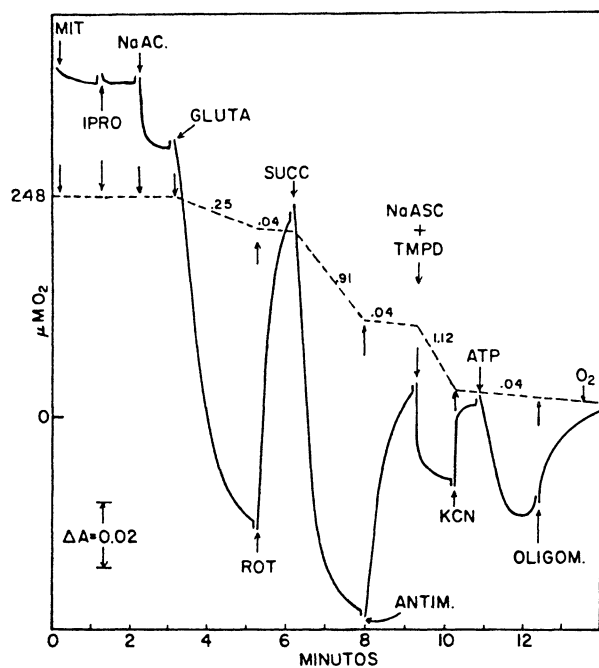


FIGURA 19 - Efeito do iproveratril (IPRO) sôbre a dependência de energia do "swelling" mitocondrial. Iproveratril foi usado na concentração de $47,0 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. Esquerda - iproveratril foi adicionado ao sistema antes do acetato de sódio (NaAc.). Direita - iproveratril foi adicionado ao sistema após o glutamato.

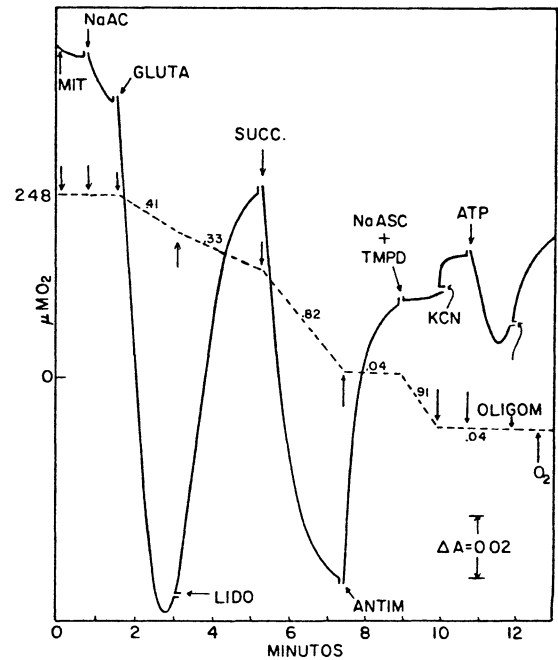
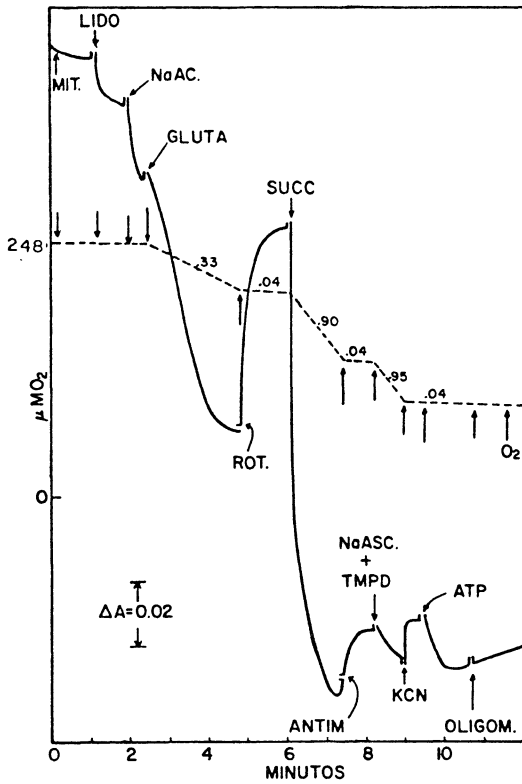


FIGURA 20 - Efeito da lidoflazina (LIDO) sôbre a dependência de energia do "swelling" mitocondrial. Lidoflazina foi usada na concentração de $16,00 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. Esquerda - lidoflazina foi adicionada ao sistema antes do acetato de sódio (NaAc.). Direita - lidoflazina foi adicionada ao sistema após o glutamato.

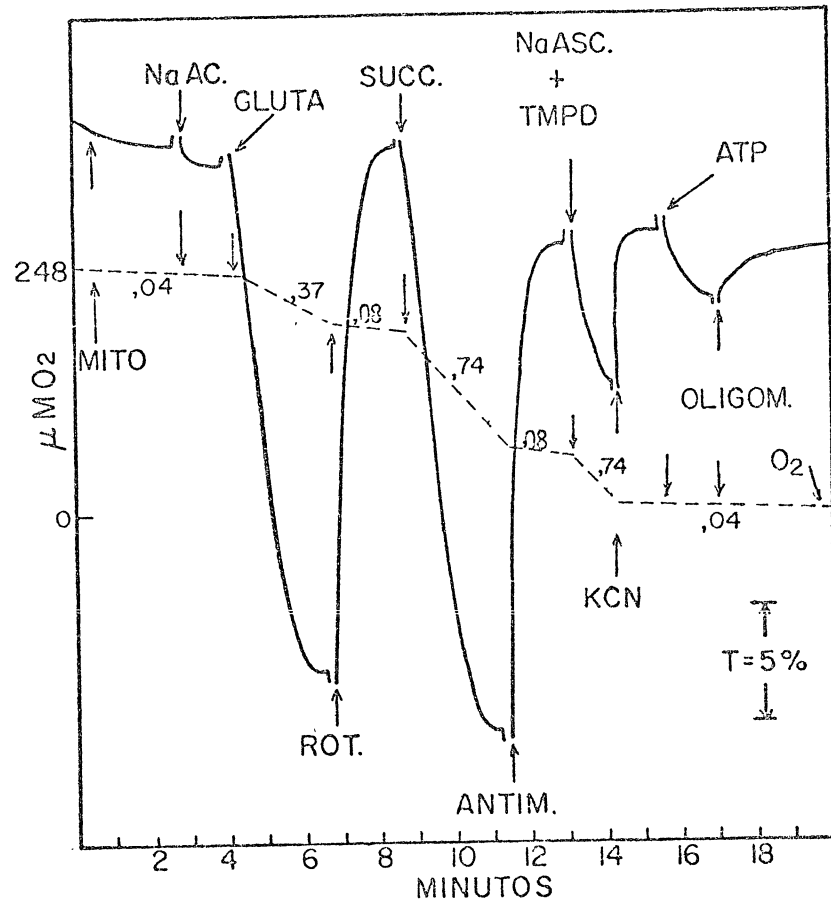


FIGURA 21 - Dependência de energia do "swelling" mitocondrial. Sistema - Controle.

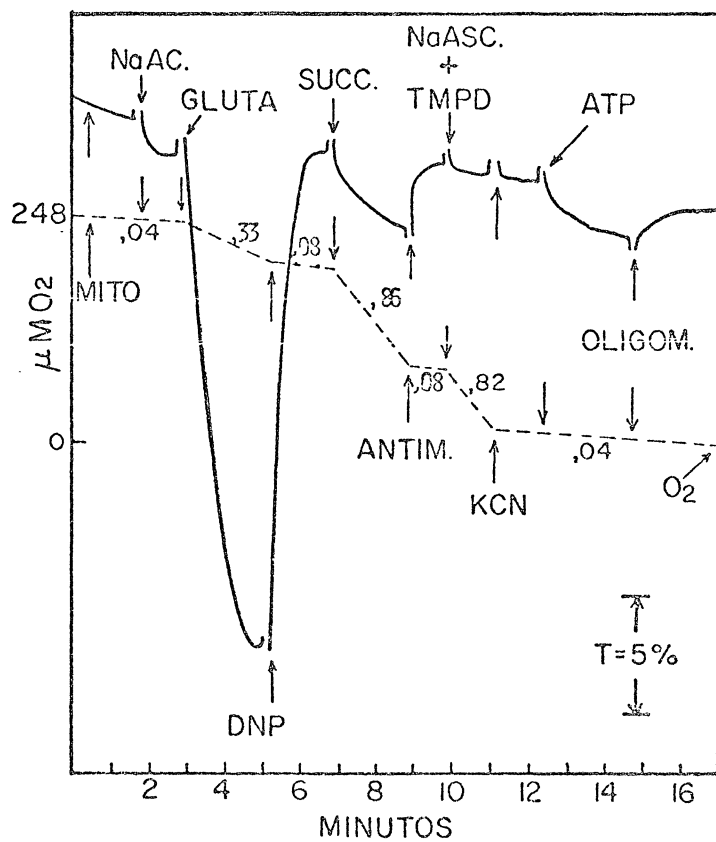
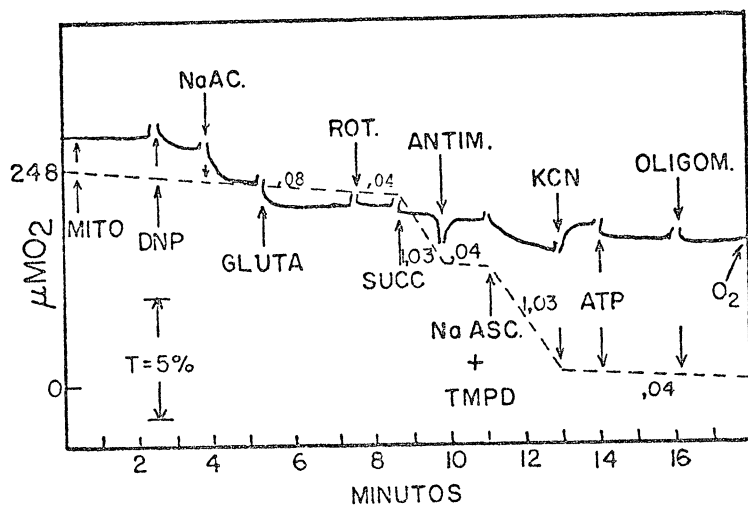


FIGURA 22 - Efeito do 2-4-dinitrofenol (DNP) sobre a dependência de energia do "swelling" mitocondrial. 2-4-dinitrofenol foi usado na concentração de $26 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína.

Esquerda - 2-4-dinitrofenol foi adicionado ao sistema antes do acetato de sódio (NaAC).

Direita - 2-4-dinitrofenol foi adicionado ao sistema após o glutamato.

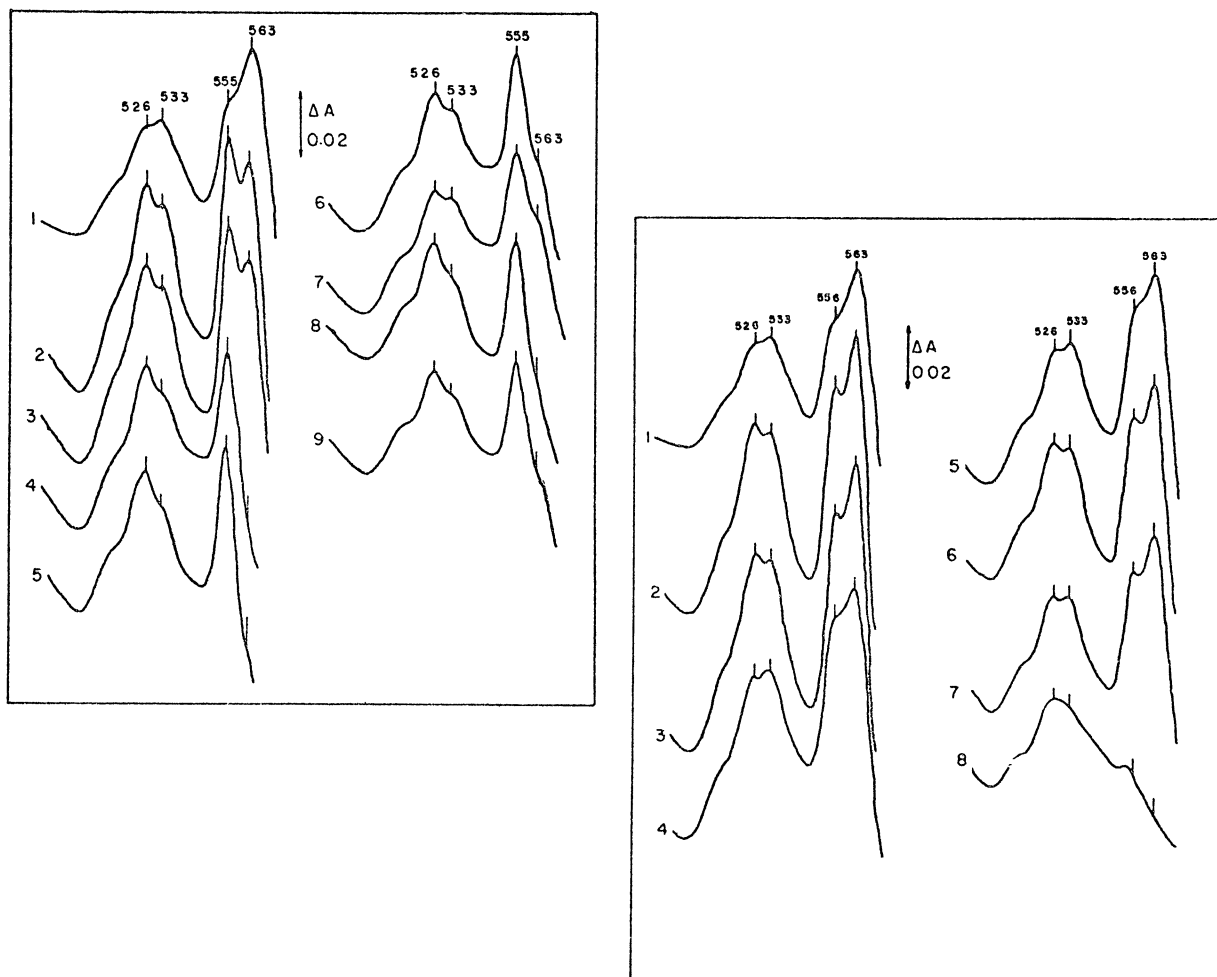


FIGURA 23 - Efeito do propranolol (PR), do maleato de perexiline (PM), do *i* proveratril (IPRO) e da lidoflazina (LIDO) sobre os espectros de absorção das bandas α e β do citocromo b_5 e c_1 dos complexos I - II e III.

Esquerda - Reduzido com $\text{NADH} + \text{H}^+$.

- 1 - Ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)
- 2 - $\text{NADH} + \text{H}^+$ (0,40 mM)
- 3 - N-N-dimetilformamida (50λ)
- 4 - pCMS (0,60 mM)
- 5 - Rotenona ($5 \mu\text{M}$)
- 6 - PR (10,70 mM)
- 7 - PM (1,05 mM)
- 8 - IPRO (1,75 mM)
- 9 - LIDO (1,20 mM)

Direita - Reduzido com succinato.

- 1 - Ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)
- 2 - Succinato de sódio (10,00 mM)
- 3 - N-N-dimetilformamida (50λ)
- 4 - PR (10,70 mM)
- 5 - PM (1,05 mM)
- 6 - IPRO (1,75 mM)
- 7 - LIDO (1,20 mM)
- 8 - pCMS (0,60 mM)

TABELA 10 - Efeito do percentual de ação dos anti-arrítmicos sobre a amplitude e a contração do swelling mitocondrial suportados pela oxidação do glutamato, succinato, NaASC + TMPD e hidrólise do ATP como fonte de energia em presença de acetato de sódio (NaAC).

Substratos	Controle		Propranolol (PR)		Maleato de perexiline (PM)		Iproveratril (IPRO)		Lidoflazina (LIDO)		2-4-Dinitrofenol (DNP)		
			Adição antes da oxidação do glutamato	Adição após a oxidação do glutamato em substituição da rotenona	Adição antes da oxidação do glutamato	Adição após a oxidação do glutamato em substituição da rotenona	Adição antes da oxidação do glutamato	Adição após a oxidação do glutamato em substituição da rotenona	Adição antes da oxidação do glutamato	Adição após a oxidação do glutamato em substituição da rotenona	Adição antes da oxidação do glutamato	Adição após a oxidação do glutamato em substituição da rotenona	
A	Swelling	Contração	Swelling	Contração	Swelling	Contração	Swelling	Contração	Swelling	Contração	Swelling	Contração	
	100	100	6,2	100	66,1	66,7	72,8	72,8	48,2	83,9	0	89,4	
	Succinato	100	100	93,3	86,8	86,1	78,7	74,6	77,9	89,1	65,4	0	13,3
	NaASC + TMPD	100	100	54,2	59,6	35,4	40,4	56,3	51,9	20,8	26,9	0	0,0
	ATP	100	100	81,6	104,1	57,2	83,7	71,4	122,4	32,7	71,4	0	63,6
B	Contração	Swelling	Contração	Swelling	Contração	Swelling	Contração	Swelling	Contração	Swelling	Contração	Swelling	
	100	100	5,5	101,2	75,3	93,8	58,0	96,3	39,5	102,5	0	90,6	
	Succinato	100	100	92,6	97	77,2	58,8	50,7	75,2	15,4	75,8	0	13,6
	NaASC + TMPD	100	100	67,3	35,4	46,1	8,3	46,1	12,5	25,0	0	0	0
	ATP	100	100	81,6	106,1	65,3	75,5	67,3	110,2	14,3	57,2	0	83,3

Os valores acima apresentados foram obtidos a partir dos registros das figuras 16,17,18,19,20,21 e 22.

TABELA 11 - Efeito do percentual de ação dos anti-arrítmicos sobre a respiração do swelling mitocondrial suportado pela oxidação do Glutamato, Succinato e NaASC + TMPD como fonte de energia em presença de Acetato de Sódio (NaAC).

Substratos	Controle	Propranolol (PR)		Maleato de perexiline (PM)		Iproveratril (IPRO)		Lidoflazina (LIDO)		2-4-Dinitrofenol (DNP)	
		Adição antes da oxidação do glutamato	Adição após a oxidação do glutamato em substituição da rotenona	Adição antes da oxidação do glutamato	Adição após a oxidação do glutamato em substituição da rotenona	Adição antes da oxidação do glutamato	Adição após a oxidação do glutamato em substituição da rotenona	Adição antes da oxidação do glutamato	Adição após a oxidação do glutamato em substituição da rotenona	Adição antes da oxidação do glutamato	Adição após a oxidação do glutamato em substituição da rotenona
Glutamato	100	100	90,3-82,2	80,5	80,5-73,3	61,0	70,7-59,2	80,5	80,5-80,5	21,6	21,6-24,3
Succinato	100	134,1	106,1	110,9	106,1	110,9	95,1	109,7	100	139,2	116,2
NaASC + TMPD	100	133,8	105,4	133,8	110,8	151,3	121,6	128,4	122,9	139,2	110,8

Os valores acima apresentados foram obtidos a partir dos registros das figuras 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22.

DISCUSSÃO

Agentes químicos, como os anti-arrítmicos aqui estudados, parecem influenciar diretamente a oscilação, swelling e a oxidação de substratos NADH-dependentes durante o estudo espectral dos complexos enzimáticos mitocondriais. Com características químicas comuns, contêm átomos de nitrogênio (Aminas terciárias), que facilmente podem se tornar carregados positivamente exibindo características lipofílicas e de partição em áreas hidrofóbicas de membranas biológicas, complexando-se com fosfolipídeos e proteínas (46, 94, 97).

A sistemática usada neste trabalho para o estudo dos compostos anti-arrítmicos (PR, PM, IPRO e LIDO) desenvolveu uma nova linha de raciocínio, através da qual se procurou esclarecer o seu mecanismo de ação a nível molecular. Inicialmente os anti-arrítmicos tinham seus efeitos comparados àqueles agentes desacoplantes clássicos (DNP e FCCP), em virtude de sua lipossolubilidade. Entretanto a inibição das oscilações e um excessivo swelling, obtido como consequência da análise paramétrica das alterações oscilatórias mitocondriais mostradas nas figuras e tabelas, diferem totalmente das causas (aumento do fator de amortecimento, da amplitude e diminuição do período médio) e consequências (inibição total da oscilação) obtidas, quando DNP e FCCP foram usados em baixas concentrações nos experimentos com sistema oscilatório mitocondrial de fígado e coração inibindo totalmente as oscilações sem a permanência de um estado de swelling (28). Este precedente causado pelos desacopladores concorda com a hipótese de uma redução no suprimento de energia, em virtude da quebra do potencial eletroquímico, que aumenta a permeabilidade passiva da membrana mitocondrial para proton (H^+) ao contrário do que se passa com os anti-arrítmicos que mantêm um estado de swelling, só possível, em virtude da permanência desse potencial, embora apresente inibição das oscilações.

Contrariamente aos desacopladores e mais próximos do mecanismo de ação dos cátions, di e trivalentes como Pb^{2+} e La^{3+} (28), os anti-arrítmicos estudados poderiam localizar-se sobre a membrana interna mitocondrial, levando à exposição de grupamentos aniônicos lipídicos, que carregar-se-iam positivamente ou com cátions di e monovalentes ou com H^+ através de seu nitrogênio ter-

ciário. Ambos os casos contribuem para um aumento líquido de cargas positivas na membrana mitocondrial, que poderiam aumentar a permeabilidade para ânions (65) e inibir a condutibilidade da membrana para cátions monovalentes, incluindo protons. Como consequência a oscilação mitocondrial seria inibida e a permanência de um excessivo swelling, poderia ser devido à inibição do transporte trans-membrânico citado acima. Os mecanismos oscilatórios descritos por GOOCH & PACKER (28) quando cátions di e trivalentes como Pb^{2+} e La^{3+} se ligam à membrana mitocondrial e são pouco transportados, podem levar a inibição total da oscilação em face das alterações paramétricas oscilatórias como: diminuição da amplitude, equilíbrio e um leve aumento no período com consequente aumento do fator de amortecimento; os resultados mostrados nas tabelas 6, 7, 8 e 9 visualizam uma possibilidade de que o mecanismo molecular destas drogas seja semelhante ao descrito por GOOCH & PACKER (28) permanecendo ainda um swelling mitocondrial que poderia também ser explicada pela hipótese de mecanismo acima proposta.

Os trabalhos de GOOCH & PACKER (28), WIKSTROM (119), SEPALA et al. (97) e CHANCE et al. (13) mostram excessivo "Swelling" e aumento do amortecimento (inibição das oscilações), semelhantes aqueles obtidos para os anti-arrítmicos aqui estudados e aos efeitos produzidos pela adição de Ca^{++} . Por outro lado, os anti-arrítmicos estudados tem uma ação inversa daquela observada em mitocôndrias isoladas com EDTA; quando à uma suspensão mitocondrial oscilante, é adicionada pequena quantidade de EDTA, obtem-se diminuição do período e do equilíbrio, e aumento do fator amortecimento, contrariando assim, os resultados obtidos com adição de Ca^{++} , Propranolol e mitocôndria isolada sem EDTA. Uma hipótese de trabalho seria a possibilidade destas drogas anti-arrítmicas terem efeito semelhante ao mostrado por MELA (66, 67), isto é aumento do consumo de cátions divalentes (Ca^{++}) solúveis no meio ou ligados a membrana. As alterações provocadas com altas concentrações dos anti-arrítmicos sobre a membrana mitocondrial, inibindo a fase de contração e as oscilações, poderiam levar à perda da capacidade estrutural da membrana, alteração de sua constante elástica, conferindo propriedades plásticas à membrana, devido à sua expansão como resultado direto da fluidicidade dos lipídios, o que caracterizaria um swelling mitocondrial sem a ruptura da membrana. SEEMAN (95) mostrou que eritrócitos eram protegidos de hemólise quando colocadas em meio hipotônico e sob ação de várias drogas

(neurotrópicas, anti-inflamatórias, anestésicas, detergentes, ácido graxo, tranquilizantes, etc.); a hemácia se transformava em uma vesícula inchada devido a perda de elasticidade de sua membrana que não mais se contraía.

A inibição da fase de contração, observada pela adição de oligomicina (Figuras 9, 10, 11 e 12), parece estar ligada a propriedade hidrofóbica dos anti-arrítmicos testados, que isofruíram experimentalmente da membrana mitocondrial, induzindo a desorganização de interação lipídica e proteica. Assim, pode-se supor que os anti-arrítmicos, em altas concentrações, inibem o complexo ATPásico mitocondrial, por afetarem aquela interação na membrana. Os anti-arrítmicos alteram o complexo ATPásico, tornando-o insensível à inibição da oligomicina na transferência de energia, mudando a posição relativa e a distância ótima ou mudando conformacionalmente as unidades do complexo ATPásico em consequência das alterações lipídicas na membrana, semelhantemente ao mostrado por LENAZ et al. (58) para os anestésicos gerais.

A relação entre a potência do anti-arrítmico e estrutura molecular, está correlacionada com a habilidade para interagir com os fosfolípidos e proteínas da membrana mitocondrial e a sua capacidade de inibir a oscilação do volume e da respiração, suportada pela oxidação do succinato e hidrólise do ATP. Os resultados obtidos, estão demonstrados nas figuras 13, 14 e 15, com um plote logarítmico da oscilação e da respiração. A análise detalhada sobre a estrutura molecular desses anti-arrítmicos, mostra que são constituídos de: a) um anel aromático (porção lipofílica), b) uma cadeia intermediária e, c) um grupo amino (porção hidrofílica). Desta forma, pode-se ter grande variedade de drogas com modificação estrutural desse modelo geral, apresentando maior ou menor hidrofobicidade e concomitantemente, diferentes afinidades e atividades, sobre a estrutura e função da membrana mitocondrial, conforme mostra a ordem de potência de ação dos anti-arrítmicos (Tabela 1). A correlação entre estrutura química e atividade farmacológica dos anestésicos locais sobre a membrana celular, foi discutida por RITCHIE et al. (88). LENAZ et al. (59) mostraram que grande variedade de agentes externos, podem perturbar e modificar a fluidez dos lípidos da membrana, e consequentemente sua função; baseados na estrutura química e em sua capacidade para afetar o estado físico dos lípidos da membrana, os autores, classificaram aqueles agentes em três grupos: polares, anfipáticos e apolares.

Drogas anti-arrítmicas, usadas como bloqueadores β -adrenérgicos, aparentam ter ação como anestésico local; propriedade esta caracterizada pela sua natureza de uma base lipofílica, devido ao grupo amino secundário na forma catiônica e pK variando entre 8,0 a 9,5 (178). SEEMAN (95) mostrou que compostos lipossolúveis, com ação anestésica local, incluindo entre eles, os anti-arrítmicos, devem esse efeito ao bloqueio da propagação dos impulsos nervosos, pela abolição da corrente transitória de despolarização no nervo ou células musculares. Sob certas condições, os anestésicos locais, relacionados estruturalmente com os anti-arrítmicos, diminuem a permeabilidade para os cátions monovalentes na dupla camada fosfolipídica e lipossomas, além de competir com o sítio de ligação de íons Ca^{++} (128), podem estabilizar a membrana mitocondrial provavelmente ligando-se aos fosfolipídeos (50, 81, 96). Em mitocôndria, os principais fosfolipídeos envolvidos na ligação dessas drogas, podem ser a cardiolipina e a fosfatiletanolamina. A fenotiazina interage fortemente com a cardiolipina (20), que tem duas cargas negativas por molécula e é um dos mais abundantes componentes fosfolipídicos da membrana mitocondrial interna. Esses agentes, que ligam a membrana mitocondrial, podem mudar suas propriedades estruturais pela combinação com grupos fosfolipídicos carregados negativamente.

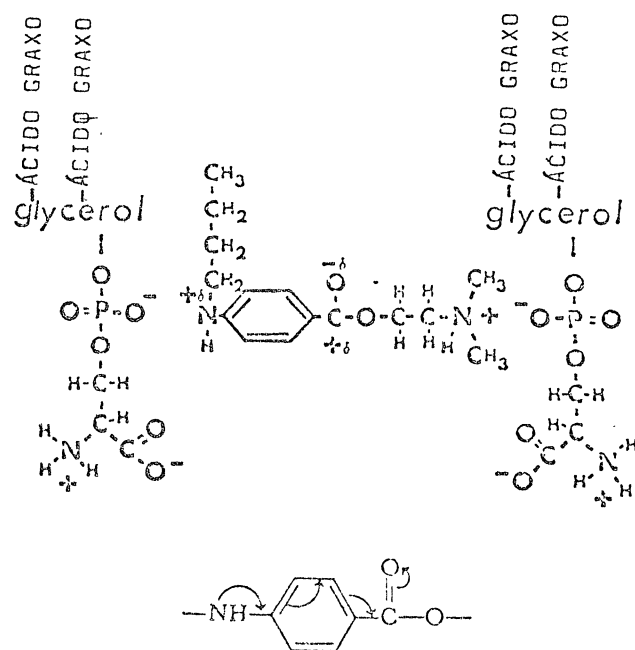


FIGURA 24 - Modelo do mecanismo de formação do complexo entre fosfolipídeos ácidos e anestésico local (25). O nitrogênio aromático polar ($+\delta$) e os grupos de nitrogênio alcali terciários carregados positivamente da tetracaina, estão orientados em direção aos grupos fosfato ionizados, carregados negativamente de duas moléculas de fosfatidil-serina. Polarização do anestésico local, resulta no deslocamento eletrônico do sistema de conjugação da dupla ligação.

AZZI (2), demonstra evidências de um rearranjo na distribuição de carga na membrana mitocondrial, na transição do estado não energizado para o energizado (Figura 25). Desta forma, o aumento da ligação de drogas como o propranolol e a clorpromazina, demonstrado por SEPPÄLÄ (98) em membrana mitocondrial energizada, fortalece o conceito de uma mudança na distribuição de grupos carregados na membrana mitocondrial, induzida pela energia. Em contrapartida, JÄRVISALO (48), propõe um aumento da aparente capacidade tampão da membrana mitocondrial, induzida pelo propranolol, devido ao aumento do número de grupos tituláveis, resultantes de um decréscimo da agregação dos fosfolipídeos das membranas.

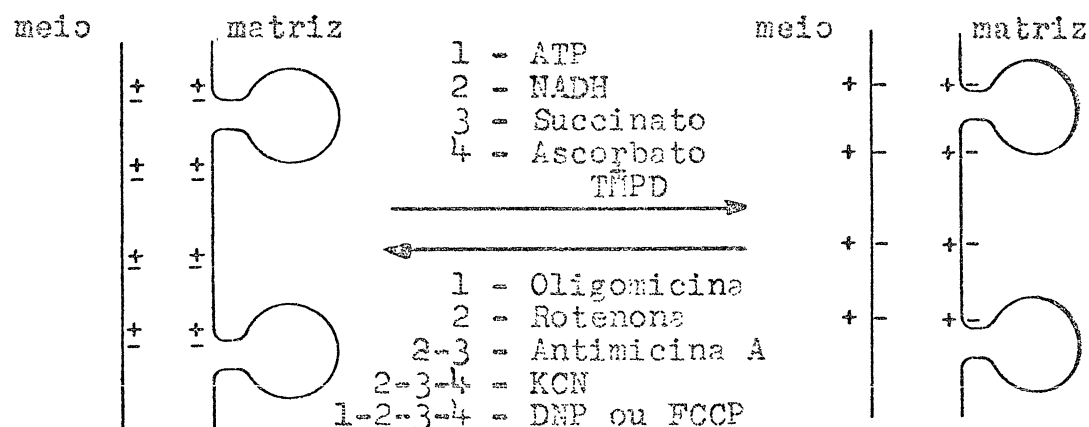


FIGURA 25 - Representação esquemática das trocas associadas com a conservação de energia na membrana mitocondrial.

O diagrama da esquerda representa a membrana mitocondrial no estado não energizado, As setas indicam a direção das transições. Números iguais indicam o inibidor da transição induzida por um certo substrato. AZZI (2).

Aparentemente, o efeito dos anti-arrítmicos testados, podem ter um mecanismo de ação semelhante ao proposto por JÄRVISALO (48), uma vez que as alterações de carga na membrana "não energizada" para "energizada" (21), facilitam a ligação do nitrogênio quaternário dos anti-arrítmicos com os grupos fosfolipídicos (carregados negativamente) da membrana.

Como o propranolol, os demais anti-arrítmicos estudados, podem afetar a fluorescência do ANS, do mesmo modo que estes afetam as mudanças de volume, mostrando que a configuração da membrana mitocondrial é estabilizada no "estado de alta energia" (97).

O total amortecimento na oscilação da fluorescência do ANS, causada por estes anti-arrítmicos, reporta um número de mudanças nas propriedades da membrana mitocondrial, provavelmente re-

sultantes da interação desses anti-arrítmicos com os fosfolipídeos, que poderá alterar a distribuição de carga da membrana, e causar perturbação da interfase membrana/água no seu interior hidrofóbico, e alterar a estrutura da membrana mitocondrial. A inibição da contração mitocondrial causada por estes anti-arrítmicos, mostra a estabilização da membrana em um estado de equilíbrio "energizado", possivelmente pela alteração das propriedades estruturais por combinação fosfolipídeos da membrana mitocondrial. O amortecimento das oscilações (inibição) pode ser resultante do decréscimo das forças elásticas da membrana expandida com uma inibição do efluxo de íon e água e a permanência de um estado de swelling em consequência da ação dos anti-arrítmicos (PR, PM, IPR0 e LIDO).

A inibição do efluxo de cátions e ânions, pode ser uma causa secundária, devido a diminuição na permeabilidade para íons de hidrogênio, e por isso retardando o equilíbrio dos gradientes iônicos, através da membrana interna, do mesmo modo que o mostrado para a nigericina, na oscilação do volume mitocondrial em presença do propranolol (47). Os diferentes níveis de inibição, da fase de relaxação, na presença desses anti-arrítmicos, a medida que a sua concentração aumenta, mostra uma interação com a membrana mitocondrial, em outro nível, que pode ser chamado de estrutural.

A solubilidade lipídica do PR, PM, IPR0 e LIDO, como principal fator de influência sobre a função bioquímica mitocondrial, na oscilação amortecida do volume mitocondrial, mostra correlação similar com outras substâncias lipossolúveis estudadas. HENKER (44), investigando quantitativamente os efeitos da solubilidade lipídica na ação dos desacopladores fenólicos, demonstrou que a atividade de um desacoplador fenólico, é determinada pela sua concentração dentro da fase lipídica da mitocôndria, e não pela sua concentração no meio que a rodeia.

Os resultados mostrados nas figuras 17, 18, 19 e 20, sugerem que a eventual adição de uma determinada concentração de anti-arrítmico, antes da energização da mitocôndria (esquerda) ou em substituição a rotenona (direita), pode determinar uma alteração do volume mitocondrial, resultante do consumo de prótons e extrusão de cátion (Na^+) que arrasta consigo, água do interior da mitocôndria com concomitante "contração" mitocondrial.

As alterações promovidas pelos anti-arrítmicos (PR, PM,

IPRO e LIDO) sobre a amplitude e velocidade de swelling e da contração mitocondrial, quando adicionados antes ou depois da energização da mitocôndria pelo glutamato (Tabela 10 e figuras 17, 18, 19 e 20) mostram a existência de mecanismos diferentes na permeabilidade de íons, confirmando os dados apresentados por JARVISALÓ & SARIS (47,49) para o propranolol.

As mudanças determinadas pelos anti-arrítmicos sobre a contração e sobre o swelling podem ser interpretadas como uma consequência da ação sobre a respiração ou devido a ligação da porção hidrofóbica da molécula com a área hidrofóbica da membrana, enquanto que a parte carregada positivamente estaria ligada aos grupos negativos dos fosfolipídeos, desestruturando a membrana, e alterando a sua permeabilidade iônica (26, 50, 51, 104, 105, 117). Isto causaria: a) inibição do swelling com glutamato quando os anti-arrítmicos foram adicionados antes da energização da membrana; b) a contração do swelling após a adição do glutamato em substituição a rotenona.

A respiração, obtida pela oxidação dos substratos NADH-dependentes pode ser inibida por diversos mecanismos, além da inibição clássica por rotenona e amital, que é, devido à sua ligação com uma proteína do complexo I. Pode-se citar outros mecanismos de inibição determinados por drogas com características lipofílicas (39, 72), ou fenômenos físicos (63), que podem atuar de uma forma direta ou indireta neste mecanismo de inibição do complexo I da cadeia respiratória.

Provavelmente, mecanismos de funções diversas podem ser mostrados por determinadas substâncias, as quais podem atuar sobre os componentes proteicos da cadeia respiratória ou sobre enzimas que estão envolvidas com os mecanismos de oxidação aeróbica (52, 107, 108) ou inibir carreadores responsáveis pelo transporte de substrato transmembrânicos mitocondriais (6, 82, 83).

Os mecanismos de inibição do complexo I, ou seja, o impedimento da oxidação dos substratos NADH dirigidos demonstrada acima (Fig. 17, 18, 19, 20 - esquerda e direita; Tabela 11) refletem antes uma ação primária das drogas sobre a membrana mitocondrial (55) do que uma inibição do transporte de substrato em virtude de quebra do potencial eletroquímico (69).

A figura 24 mostra a inibição da oxidação do glutamato

por altas concentrações de DNP, comprovando resultados já mostrados anteriormente (52, 107). Tal efeito é devido à inibição do transporte de substratos pelas membranas mitocondrial em consequência do colapso de $\Delta\bar{\mu}H^+$ provocado pelo desaclopador. Pode-se observar através das figuras 17, 18, 19, 20, 21 e Tabela 11 que tanto os anti-arrítmicos aqui usados como o DNP estimulam a velocidade respiratória quando succinato e NaASC + TMPD são os substratos. A habilidade desses anti-arrítmicos, para estimular a respiração de ambos substratos (succinato e NaASC + TMPD), foi comparada com outras drogas ou desacoplantes que apresentaram estímulo da respiração e propriedade para consumir íons e água em mitocôndria energizada ou não energizada, sob condições específicas, onde o gradiente de prótons transmembrânico, foi o limitante da velocidade (5, 18, 87). Porém, SAKURADA et al. (91) encararam dados semelhantes de estímulo da respiração com succinato, como sendo uma ativação da succinato desidrogenase, por diminuição dos níveis de oxaloacetato, devido a inibição do complexo I pelos anti-arrítmicos. A succinato desidrogenase, poderia também ser ativada ou seja, aumentando o seu "turnover number" por certos agentes como concentrações de ânions, coenzima Q reduzida ($CoQH_2$) e nucleotídeos de inosina, aparentemente envolvidos na remoção do oxaloacetato (100).

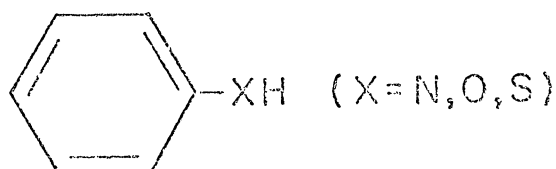
Este aumento do consumo de oxigênio, determinado pelo aumento da velocidade de transporte de elétrons, através da cadeia respiratória, pelo succinato e NaASC + TMPD, pode portanto ser demonstrado de dois modos diferentes: (a) aumento do "turnover number" dos citocromos; (b) desacoplando o mecanismo de transporte de elétrons da fosforilação oxidativa. De início, pode-se sugerir que o efeito das drogas anti-arrítmicas, se enquadra dentro do ítem a.

A ação das drogas anti-arrítmicas, sobre a ativação da respiração dirigida pelo succinato e NaASC + TMPD, diferem de acordo com a sua adição ao sistema, podendo estimular mais a respiração (succinato + NaASC + TMPD), quando adicionadas antes da energização da mitocôndria pelo substrato na presença do NaAC (esquerda) ou menos quando em substituição à rotenona em mitocôndria já energizada (direita), comparadas ao experimento controle (Figura 17, 18, 19, 20 - Tabela 11). Essas observações foram consideradas válidas também para DNP, cujo efeito na respiração é bem mais acentuado.

Os efeitos de inibição da oxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$ apresentados pelos anti-arrítmicos (figura 23, esquerda 6, 7, 8 e 9), sobre o complexo enzimático I - II e III isolado, pode ser demonstrado em virtude da distribuição de carga na superfície da proteína, atribuindo o fato que a concentração de espécies carregada no microambiente da enzima é diferente do microambiente no meio externo da solução. Drogas como os anti-arrítmicos carregados positivamente em virtude de uma base quaternária com um alto valor de pK de dissociação, podem alterar este microambiente na superfície do complexo enzimático e determinar uma inibição, em consequência da variação de carga, na superfície da proteína (21).

Outro ponto a salientar, é que o anti-arrítmico, pode combinar com regiões hidrofóbicas do complexo enzimático I-III, induzindo uma mudança conformacional na molécula, determinando uma baixa de atividade ou tornando-a totalmente inativa.

De acordo com HANSTEIN (35), todo procedimento que debilita a integridade da membrana mitocondrial interna, diminuindo o controle respiratório, aumentando a atividade ATPásica e frequentemente abaixando a eficiência da fosforilação pode ser considerado como agente desacoplante estrutural. Substâncias com características configuracionais fenólicas ou anilínicas, substituídas eletronegativamente no anel benzênico e sobre o nitrogênio na posição X (figura abaixo), apresentariam características de desacopladores (desacopladores aromáticos aniônicos). Entretanto, al-



guns compostos com estas características, como os anti-arrítmicos (PR, PM, IPRÓ e LIDO), fogem da classificação preconizada por HANSTEIN (35) pois sua basicidade e lipofilicidade são muito mais hábeis para apresentar efeito sobre a estrutura da membrana (2) do que um fenômeno de desacoplamento que jamais apresentaria um efeito de inibição e a permanência de um estado de swelling nas oscilações mitocondriais, inibição parcial e reversão total ou parcial do swelling, ausência ou pequena inibição da respiração dos substratos NAD^+ - dependentes e, às vezes, um pequeno estímulo dos substratos como succinato e $\text{NaASC} + \text{TMPD}$, e sim fenômenos bem caracterizados de inibição e estímulo como foi observado e analisa-

do neste trabalho, com o 2,4-dinitrofenol (DNP), para fins comparativos.

Compostos que apresentam grupos hidrofílicos e lipofílicos, como os anti-arrítmicos (PR, PM, IPR0 e LIDO) e desde que haja equilíbrio entre ambos grupos, tem a propriedade neste trabalho de modificar as características de interface lipídeo - lipídeo, lipídeo-proteína e proteína-proteína, concentrando-se e orientando-se numa disposição definida na membrana mitocondrial, caracterizando desse modo seu mecanismo de ação ao nível molecular.

CONCLUSÃO

Os anti-arrítmicos aqui estudados (PR, PM, IPR0 e LIDO), provavelmente teriam um efeito primário sobre a membrana mitocondrial interna, determinando uma alteração de carga líquida da mesma a qual modularia positiva ou negativamente os componentes enzimáticos da cadeia respiratória e a condutibilidade iônica transmembrânica como uma consequência do desarranjo estrutural da dupla camada fosfolipídica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZZI, A. & AZZONE, G.F. Swelling and shrinkage phenomena in mitochondria. IV - Reversible swelling changes linked to transport of monovalent cations stimulated by valinomycin. Biochim. Biophys. Acta, 113: 445-456, 1966.
2. AZZI, A. Redistribution of the electrical charge of the mitochondrial membrane during energy conservation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 37: 254-260, 1969.
3. AZZONE, G.F. & AZZI, A. Mechanisms for reversible and irreversible volume changes induced by inorganic phosphate in liver mitochondria. In: TAGER, J.M.; PAPA, S.; QUAGLIARIELLO, E.; SLATER, E.C. Regulation of metabolic processes in mitochondria. Amsterdam, Elsevier, 1966. p. 332-350.
4. BAKEEVA, L.E.; GRINIUS, L.L.; JASAITIS, A.A.; KULIENE, V.V.; LEVITSKY, D.O.; LIBERMAN, E.A.; SEVERINA, I.I. & SKULACHEV, V.P. Conservation of Biomembrane - Produced energy into electric form intact mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 216: 13-21, 1970.
5. BAKKER, E.P.; VAN DEN HEUVEL, E.J.; WIECHMANN, A.H.C.A. & VAN DAN, K. A comparison between the effectiveness of uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria and in different artificial membrane systems. Biochim. Biophys. Acta, 292: 78-87, 1973.
6. BARRIT, G.J. Effects of dibucaine on pyruvate and ketone-body transport in isolated rat heart mitochondria. Biochem. Pharmacol., 29: 2877-2879, 1980.
7. BLONDIN, G.A. & GREEN, D. Mechanism of mitochondrial swelling. III. Two forms of energized swelling. Arch. Biochem. Biophys. 132: 509-523, 1969.
8. BRIERLEY, G.P. The uptake and extrusion of monovalent cations by isolated heart mitochondria. Mol. Cell. Biochem., 10, nº 1: 41-62, 1976.
9. CARAFOLI, E.; GAMBLE, R.L. & REHNINGER, A.L. K^+ - dependent rebounds and oscillations in respiration - linked movements of Ca^{++} and H^+ in rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Res. Commun. 21: 488-493, 1965.

10. CARAFOLI, E.; GAMBLE, R.L. & LEHNINGER, A.L. Rebound and oscillations in respiration - linked movements of Ca^{++} and H^+ in rat mitochondria. J. Biol. Chem., 241: 2644-2652, 1966.
11. CHANCE, B.; PYE, E.K.; GHOSH, H.K. & HESS, B. ed. Biological and Biochemical oscillator. New York, Academic. 1973.
12. CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol. 17: 65-134, 1956.
13. CHANCE, B., HESS, B., PYE, K. & SARIS, N.E.L. Report of a symposium Held in Hango, Finland August 16-17, 1969 - Febs Letters, 7: 311, 1970.
14. CHANCE, B. & YOSHIOKA Sustained oscillations of ionic constituents of mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 117: 451-465, 1966.
15. CHAPPELL, B.J. & CROFTS, A.R. Gramieidin and ion transport in isolated liver mitochondria. Biochem. J., 95: 393-402, 1965.
16. CHAPPELL, J.B. & CROFTS, A.R. Ion transport and reversible volume changes of isolated mitochondria in regulation of metabolic process in mitochondria. Regulation of metabolic process in mitochondria. In: TAGER, J.M., PAPA, S. QUAGLIA RIELLO, E.; SLATER, C.S. Amsterdam, Elsevier, 1966. p.293-316.
17. CRANE, F.L.; GLENN, J.L. & GREEN, D.E. Studies on the electron transfer system: The electron transfer particle. Biochim. Biophys. Acta, 22: 475-487, 1956.
18. CUNARRO, J. & WEINER, M.W. Mechanism of action of agents which uncouple oxidative phosphorylation direct correlation between proton - Carrying and respiratory - Releasing properties using rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 387: 234-240, 1975.
19. DEAMER, D.W.; UTSUMI, K. & PACKER, L. Oscillation states of mitochondria. III. Ultrastructure of trapped conformational states. Arch. Biochem. Biophys., 121: 641-651, 1967.
20. DEMEL, R.A. & VAN DEENEW, L.L.M. Penetration of lipid monolayers by psycho active drugs. Chem. Phys. Lipids, 1: 68-82, 1966.

21. ENGASSER, J.M. & HORVARTH, C. Electrostatic effects on the kinetics of bound enzymes. Biochem. J., 145: 431-435, 1975.
22. ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the Polarographic measurement of ADP: O Ratios. In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. ed. Oxidation and Phosphorylation. New York, Academic, 1967. p. 41-47. (Methods in Enzymology, 10).
23. FALCONE, A.B. & HADLER, H.I. Action of gramicidin on mitochondria. I. Ion - dependent mitochondrial volume changes energized by γ -Adenosine, 5-Triphosphat. Arch. Biochem. Biophys 124: 91-109, 1968.
24. FARADAY SYMPOSIA OF THE CHEMICAL SOCIETY - Physical Chemistry of Oscillatory Phenomena. The Faraday Division Chemical Society London, n^o 9, 1974.
25. FEINSTEIN, M.B. Reaction of local anesthetics with phospholipids. A possible chemical basis for anesthesia. J. Gen. Physiol., 48: 357-374, 1964.
26. FREEMAN, A.R. & SPIRITES, M.A. Effects of chlorpromazine on biological membranes. II. Chlorpromazine induced change in human erythrocytes. Biochem. Pharmacol., 12: 47-53, 1963.
27. GOLDBETER, A. & KAPLAN, S.R. Oscillatory enzymes. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 5: 449-476, 1976.
28. GOOCH, V.D. & PACKER, L. Oscillatory systems in mitochondria Biochim. Biophys. Acta, 346: 245-260, 1974.
29. GOOCH, V.D. & PACKER, L. Adenine nucleotide control of heart mitochondrial oscillations. Biochim. Biophys. Acta, 245: 17-20, 1971.
30. GOOCH, V.D. & PACKER, L. Oscillatory states of mitochondria Studies on the oscillatory mechanism of liver and heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 163: 759-768, 1974.
31. GRAVEN, S.N.; LARDY, H.A.; JOHNSON, D. & RUTTER, A. Antibiotic as tools for metabolic studies. V. Effect of nonactin, monactin, dinactin and trinactin on oxidative phosphorylation and adenosine triphosphatase induction. Biochemistry, 5: 1729-1734, 1966.
32. GRAVEN, S.N.; LARDY, H.A. & RUTTER, A. Antibiotics as tools

- for metabolic studies. VI. Damped oscillatory swelling of mitochondria induced by nonactin, monactin, dinactin and trinactin. Biochemistry, 5: 1735-1742, 1966.
33. GRAVEN, S.N.; LARDY, H.A.; ESTRADA, O.S. Antibiotics as tools for metabolic studies. III. Effect of nonactin homologs on alkali metal, cation transport and rate of respiration in mitochondria. Biochemistry, 6: 365-371, 1967.
34. GRINIUS, L.L.; JASAITIS, A.A.; KADZIAUSKAS, YU. P.; LIBERMAN, E.A.; SKULACHEV, V.P., TOPALI, V.P.; TSOFINA, L.M. & VLADIMIROVA, M.A. Conversion of biomembrane produced energy into electric from I. Submitochondrial particles. Biochim. Biophys. Acta, 216: 1-12, 1970.
35. HANSTEIN, W.G. Uncoupling of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta, 456, 129-148, 1976.
36. HARMAN, J.W. & FEIGELSON, M. Studies on mitochondria. III. The relationship of structure and function of mitochondria from heart muscle. Exp. Cell Res., 3: 47-58, 1952.
37. HARMAN, J.W. & FEIGELSON, M. Studies on mitochondria. V. The relationship of structure and oxidative phosphorylation in mitochondria of heart muscle. Exp. Cell. Res., 3: 509-525, 1952.
38. HARRIS, R.A.; ASBELL, M.A.; ASAI, J.; JOLLY, W.W. & GREEN, D.E. The conformational basis of energy transduction in membrane systems. V. Measurement of configurational changes by light scattering. Arch. Biochem. Biophys., 132: 545-560, 1969.
39. HARRIS, R.A.; MONROE, J.; FARMER, B.; KIM, K.C. & JENKINS, P. Action of halothane upon mitochondrial respiration. Arch. Biochem. Biophys., 142: 435-444, 1971.
40. HATEFI, Y.; HAAVIK, A.G. & JURTSCHUK, P. Studies on the electron transport system: DPNH-cytochrome c-reductase. I. Biochim. Biophys. Acta, 52: 106-118, 1961.
41. HATEFI, Y. & RIESKE, J.S. The preparation and properties of DPNH-Cytochrome c reductase (Complex I-III of the respiratory chain). In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. ed. Oxidation and Phosphorylation. New York, Academic, 1967. p.

- 225-231. (Methods in Enzymology, 10).
42. HATEFI, Y.; HANSTEIN, W.G.; GALANTE, Y.; & STIGGALL, D.L. Mitochondrial ATP-Pi exchange complex and the side of uncoupling of oxidative phosphorylation. Fed. Proc., 34: 1699-1705, 1975.
 43. HESS, B. & BOITEUX, A. Oscillatory phenomena in biochemistry. Ann. Rev. Biochem., 40: 237-258, 1971.
 44. HENKER, H.C. Lipid solubility as a factor influencing the activity of uncoupling phenols. Biochim. Biophys. Acta, 63: 46-54, 1962.
 45. HÖFER, M. & PRESSMAN, B.C. Stimulation of oxidative phosphorylation in mitochondrial by potassium in the presence of valinomycin. Biochemistry, 5: 3919-3925, 1966.
 46. JACONUS, W.E. & BRIERLEY, G.P. Ion transport by heart mitochondria. XVI. Cation binding by submitochondrial particles. J. Biol. Chem., 244: 4995-5004, 1969.
 47. JÄRVISALO, J.O. & SARIS, N.E.L. Action of propranolol on mitochondrial functions. Effects on energized ion fluxes in the presence of valinomycin. Biochem. Pharmacol. 24: 1701-1705. 1975.
 48. JÄRVISALO, J.O. Change of mitochondrial buffering capacity induced by propranolol. Bioenergetics, 7: 39-48, 1975.
 49. JÄRVISALO, J.O. & SARIS, N.E.L. Action of propranolol on mitochondrial functions. Effects on non-energized ion fluxes. Biochem. Pharmacol. 24: 1309-1312, 1975.
 50. JOHNSON, C.L.; GOLDSTEIN, M.A. & SCHWARTZ, A. On the molecular action of local anesthetics. 1. The mitochondrial as a model membrane system for studying local anesthetic action. Mol. Pharmacol. 9: 360-371, 1973.
 51. JOHNSON, C.L. & SCHWARTZ, A. A some effects of local anesthetics on isolated mitochondria. J. Pharmacol. Exp. Ther. 167: 365-373, 1969.
 52. KIM, L.E. & CROS, J. Effects of Phenoperidine on Rat Liver Mitochondrial respiration. Biochem. Pharmacol., 28: 361 - 366, 1979.

53. KLUPPEL, M.L.W.; SILVEIRA, O.; LOPES, L.C.V. & CAMPELLO, A.P. Biochemical Aspects of the Mechanism of action of anti-arrhythmic Drugs on heart Mitochondria II - Enzymatic activities. Arq. Biol. Tecnol. 21: 13-18, 1978.
54. KLUPPEL, M.L.W.; LOPES, L.C.V.; SILVEIRA, O. & CAMPELLO, A.P. Possible mechanism of action of perhexiline maleate on heart mitochondria. Biochem. Pharmacol., 25: 2383-2386, 1976.
55. KOMAI, H. & BERKOFF, H.A. Effects of quimidine and propranolol on energy transduction in beef heart mitochondria. Biochem. Pharmacol., 28: 1501-1504, 1979.
56. LARDY, H.A. & GRAVEN, S.N. The relation between alkali cations and hydrolysis of ATP by liver mitochondria. Fed.Proc., 24: 424, 1965.
57. LEHNINGER, A.L. Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation. Physiol. Rev. 42: 467, 1962.
58. LENAZ, G.; GURATALA, G.; MAZZANTI, L.; PARENTI-CASTELLI, G. & BERTOLI, E. Effects of general anesthetics on lipid protein interactions and ATPase activity in mitochondria. Biochem. Pharmacol., 27: 2833-2844, 1978.
59. LENAZ, G.; GURATALA, G. & MASOTTI, L. Perturbation of membrane fluidity. J. Bioenerg., 7: 223-299, 1975.
60. LIBERMAN, E.A. & SKULACHEV, V.P. Conversion of biomembrane produced energy into electric form. IV. General Discussion. Biochim. Biophys. Acta, 216: 30-42, 1970.
61. LOWRY, O.M.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
62. MACFARLANE, M.G. & SPENCER, A.G. Changes in the water, sodium and potassium content of rat-liver mitochondria during metabolism. Biochem. J., 54: 568-569, 1953.
63. MATLIB, M.B. & SRERE, P.A. Oxidative properties of swollen rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 174: 705-712, 1976.

64. MEHARD, C.W.; PACKER, L. & ABRAHAM, S. Activity and ultrastructure of mitochondria from mouse mammary gland and mammary adenocarcinoma. Cancer. Res., 31: 2148-2160, 1971.
65. MEISNER, H.; PALMIERI, F. & QUAGLIARIELLO, E. Effect of cations and protons on the kinetics of substrate uptake in rat liver mitochondria. Biochemistry, 11: 949-955, 1972.
66. MELA, L. Interactions of La^{+++} and local anesthetic drugs with mitochondrial Ca^{++} and Mn^{++} uptake. Arch. Biochem. Biophys., 123: 286-293, 1968.
67. MELA, L. Inhibition and activation of calcium transport in mitochondria effect of lanthanides and local anesthetic drugs. Biochemistry, 8: 2481-2486, 1969.
68. MIYASAKI, N.; BRANDÃO, D. & CAMPELLO, A.P. The effect of lidoflazine (R 7904) on rat heart mitochondria. International Research Communications System. (73-9) 1-3-2; 1973.
69. MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, 191: 144-148, 1961.
70. MITCHELL, P. & MOYLE, J. Proton translocation coupled to ATP hydrolysis in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 4: 530-539, 1968.
71. MUSTAFA, M.G.; UTSUMI, K. & PACKER, L. Damped Oscillatory Control of Mitochondrial Respiration and Volume. Biochem. Biophys. Res. Commun., 24 (3): 381-385, 1966.
72. OLIVEIRA, T.C.L.; FORTES, J.C.; LOPES, L.C.V & CAMPELLO, A. P. Studies of Practolol on Mitochondrial Metabolism. Res. Commun. Chem. Pathol. and Pharmacol., 29: 141-148, 1980.
73. PACKER, L.; UTSUMI, K. & MUSTAFA, M.G. Oscillatory states of Mitochondrial. I. Electron and Energy transfer Pathways. Arch. Biochem. Biophys., 117: 381-393, 1966.
74. PACKER, L. Energy-linked low amplitude mitochondrial swelling. In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. ed. Oxidation and Phosphorylation. New York, Academic, 1967. p. 685-689. (Methods in Enzymology, 10).

75. PACKER, L.; DONOVAN, M.P. & WRIGGLESWORTH, J.M. Oscillations of 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid fluorescence in Mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 35: 832-837, 1969.
76. PACKER, L.; WRIGGLESWORTH, J.M.; FORTES, P.A.G. & PRESSMAN, B.C. Expansion of the inner membrane compartment and its relation to mitochondrial volume and ion transport. J. Cel. Biol. 39: 382-391, 1968.
77. PACKER, L. Relation of structure to energy coupling in rat liver mitochondria. Fed. Proc., 29: 1533-1540, 1970.
78. PACKER, L. Metabolic and Structural State of Mitochondria . I. Regulation by adenosine Diphosphate. J. Biol. Chem., 235: 242-249, 1960.
79. PACKER, L. Metabolic and structural State of Mitochondria . II. Regulation by Phosphate. J. Biol. Chem., 236: 214-219; 1961.
80. PAPA, S.; GUERRIERI, F.; SIMONE, S.; LORUSSO, H. & LAROSA, D. Mechanism of Respiration - Driven Proton Translocation in the inner Mitochondrial Membrane - Kinetic of proton translocation and role of cations. Biochim. Biophys. Acta, 292: 20-38, 1973.
81. PAPAHADJOPoulos, D. Studies on the mechanism of action of local anesthetics with phospholipid model membranes. Biochim. Biophys. Acta. 265: 169-186, 1972.
82. PASSARELLA, S. & QUAGLIARIELLO, E. Effect of Ethacrynic acid on the permeability of the mitochondrial membrane in rat liver mitochondria. Biochem. Pharmacol., 28: 2267-2272, 1979.
83. PASSARELLA, S.; RICCIO, P.; MARRA, E. & QUAGLIARIELLO, E. Effects of Amytal on the permeability of the mitochondrial membrane in rat liver mitochondria. Biochem. Pharmacol., 29: 2325-2331, 1980.
84. PRESSMAN, B.C. Induced Ion Transport in Mitochondria. Fed. Proc. 24: 425, 1965.
85. PRESSMAN, B.C. Induced active transport of ions in mitochon

- dria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 53: 1076-1083, 1965.
86. RAAFLAUB, J. Die schwellung isolierter leber zell mitochondrien and ihre physikazisch - Chemische Beeinflussbarkeit. Uber Wirkungsmechanismus von Adenosintriphosphat (ATP) als Co-factor isolierter mitochondrien. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 11: 142-157, 1953.
87. REED, P.W. & LARDY, H.A. Uncoupling and specific inhibition of phosphoryl transfer Reactions in Mitochondria by Antibiotic A 20668. J. Biol. Chem., 250: 3704-3708, 1975.
88. RITCHIE, J.M. & GREENGARD, P. On the mode of action of local anesthetics. Annu. Rev. Pharmacol., 6: 405-430, 1966.
89. RODRIGUES, L.E.; PINTO, R.S.S. & COSTA, M.F.D. Estudo polarográfico do efeito do verapamil sobre a atividade respiratória e a fosforilação oxidativa das mitocôndrias. Arq. Bras. Cardiol., 31: 15-18, 1978.
90. SAKURADA, A.; VOSS, D.O.; BRANDÃO, D. & CAMPELLO, A.P. Effects of propranolol on heart muscle mitochondria. Biochem. Pharmacol., 21: 532-540, 1972.
91. SAKURADA, A.; SILVEIRA, O.; WAMBIER, M.L.; BRANDÃO, D. & CAMPELLO, A.P. Regulation of succinic dehydrogenase activity of heart mitochondria by anti-arrhythmic drugs. Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol., 11: 89-97, 1975.
92. SAKURADA, A.; CAMPELLO, A.P. & BRANDÃO, D. Regulation of succinic dehydrogenase activity of heart mitochondria by propranolol. IRCS (Research on: Biochemistry: Cardiovascular system). Pharmacology, 2: 1469, 1974.
93. SANADI, D.R.; PHARO, R.L. & SORDHAL, L.A. NADH-CoQ-reductase-assay and purification. In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M. E. ed. Oxidation and Phosphorylation. New York, Academic, 1967. p. 297-302. (Methods in Enzymology, 10).
94. SARIS, N.E.L.; WIKSTRÖM, M.F. & SEPÄLÄ, A.H. The effects of oligoamines on cation binding in mitochondria. In: ERNSTER, L. & DRAHOTA, Z. Mitochondria; structure and function. London, Academic, 1969. p. 363-368.
95. SEEMAN, P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. Pharmacol. Rev., 24: 583-655, 1972.

96. SEEMAN, P. Membrane stabilization by drugs: tranquilizers, steroids, and anesthetics. Intern. Rev. Neurobiol. 9: 145-221, 1966.
97. SEPPÄLÄ, A.J.; WIRSTRÖM, M.K.F. & SARIS, N.E.L. Damping of mitochondrial volume oscillations by propranolol and related compounds. In: CHANCE, B.; PYE, E.K.; GHOSH, A.K. & HESS, B. Biological and biochemical oscillators. New York, Academic, 1973. p. 115-124.
98. SEPPÄLÄ, A.H. Binding of propranolol and chlorpromazine by mitochondrial membranes. Acta. Chem. Scand., 26: 2713-2733, 1972.
99. SILVEIRA, O. & CAMPELLO, A.P. Effects of iproveratril on isolated heart mitochondria. Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol., 10: 149-154, 1975.
100. SINGER, T.P. Determination of the activity of succinate NADH choline and α -Glycerophosphate Dehydrogenase. Methods of Biochemical Analysis, 22: 123-175, 1975.
101. SKULACHEV, V.P. Membrane electricity as a convertible energy currency for the cell. Can. J. Biochem., 58: 161-175, 1980.
102. SKULACHEV, V.P. Energy transformations in the respiratory chain. Curr. Top. Bioenerg. 4: 127-190, 1971.
103. SLATER, E.C. An evaluation of the Mitchell hypothesis of chemiosmotic coupling in oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. Eur. J. Biochem., 1: 317-326, 1967.
104. SPIRITES, M.A. & GUTH, P.S. Effects of chlorpromazine on Biological membranes - I. Chlorpromazine - induced in liver mitochondria. Biochem. Pharmacol., 12: 37-46, 1973.
105. SPIRITES, A.M.; MORGAN, E.S. & COHEN, M.S. Effects of chlorpromazine on Biological Membranes III. Swelling and Shrinkage of rat liver mitochondria suspended in the presence of cyanide or cyanide plus chlorpromazine. Biochem. Pharmacol., 14: 295-303, 1965.
106. STANCLIFF, R.C.; WILLIAMS, M.A.; UTSUMI, K. & PACKER, L. Essential fatty acid deficiency and mitochondrial function.

Arch. Biochem. Biophys., 131: 629-642, 1969.

107. STOCKDALE, M. & SELWYN, M.J. Influence of ring substituents on the action of phenols on some Dehydrogenases Phosphokinases and the soluble ATPase from mitochondria. Eur. J. Biochem., 21: 416-423, 1971.
108. STOCKDALE, M. & SELWYN, J.M. Effects of ring substituents on the activity of phenols as inhibitors and uncouplers of mitochondrial respiration. Eur. J. Biochem., 21: 565-574, 1971.
109. TAPLEY, D.F. The effect of thyroxine and other substances on the swelling of isolated rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 222: 325-339, 1956.
110. TAPLEY, D.F.; COOPER, C. & LEHNINGER, A.L. The action of thyroxine on mitochondria and oxidative phosphorylation. Biochem. Biophys. Acta, 18: 597-598, 1955.
111. TEORELL, T. A contribution to the knowledge of rhythmical transport processes of water and salts. Exp. Cell. Res. Suppl., 3: 339-345, 1955.
112. TEORELL, T. Electrokinetic membrane processes in relation to properties of excitable tissues. II. Some theoretical considerations. J. Gen. Physiol., 42: 847-863, 1959.
113. UTSUMI, K. & PACKER, L. Oscillatory states of mitochondria. II. Factors controlling period and amplitude. Arch. Biochem. Biophys., 120: 404-412, 1967.
114. VIEIRA LOPES, L.C.; SILVEIRA, O.; KLUPPEL, M.L.W. & CAMPELLO, A.P. Biochemical aspects of the mechanism of action of anti-arrhythmic drugs on heart mitochondrial. I. Oxygen uptake and oxidative phosphorylation. Arq. Biol. Tecnol., 20: 7-14, 1977.
115. VOSS, D.O.; CAMPELLO, A.P. & BACILA, M. The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 4: 48-51, 1961.
116. VOSS, D.O.; COWLES, J.C. & BACILA, M. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. Anal. Biochem. 6: 211-222, 1963.

117. WIETHOLD, G.; HELLENBRECHT, D.; LEMMER, B. & PALM, D. Membrane effects of β -adrenergic blocking agents: investigations with the fluorescence probe 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) and antihemolytic activities. Biochem. Pharmacol., 22: 1437-1449, 1973.
118. WILSON, A.T. & CALVIN, M. The Photosynthetic cycle CO_2 dependent transients. J. Am. Chem. Soc., 77: 5948-5957, 1955.
119. WIKSTRÖM¹¹, M.K.F.. Phase relationships of mitochondrial oscillations energized by adenosine triphosphate: the effect of propranolol. Biochem. J., 116: 14 P. - 15 P, 1970-
120. WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S., STROUMTSOS, L.Y. & NOETHERFER-TIG, M. The Merck Index; an encyclopedia of chemicals and drugs. 9.ed. Rahway, N.Y., Merck, 1976, p. 1-1313.
121. WRIGGLESWORTH, J.M. & PACKER, L. Optical rotary dispersion and circular dichroism studies on mitochondria: Correlation of ultrastructure and metabolic state with molecular conformational changes. Arch. Biochem. Biophys., 128: 790-801, 1968.