

MARCO ANTONIO GIMENES BASSO

Maleato de Enalapril: efeito comparativo em
mitocôndrias hepáticas e renais

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

CURITIBA
1989

Tese orientada pela professora
Dra. MARIA LÚCIA MAMBIER KLÜPPEL

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria Lúcia Wambier Klüppel, pela orientação objetiva e segura, e pela amizade.

Ao Professor Dr. Annibal de Paiva Campello, e à Professora Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, pelo apoio, críticas e sugestões a este trabalho.

Ao Professor Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, por haver permitido o uso de seu laboratório para parte dos experimentos realizados.

aos Professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelo estímulo e amizade.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e ao Departamento de Biologia Geral, pelo apoio.

À CAPES/PICD, pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP.....	adenosina 5' difosfato
ADP/O.....	quociente entre nanomoles de ADP e nanomoles de oxigênio consumidos durante o Estado III
BSA.....	soroalbumina bovina
citocr.	citocromo
CS.....	concentração sérica
CU.....	coeficiente de variação de Pearson
desidrog.	desidrogenase
DPIP.....	diclorofenol - indofenol
ECA.....	enzima conversora de angiotensina
EDTA.....	ácido etileno diamino tetracético
EGTA.....	ácido etilenoglicol bis (éter 2-aminoetil) - N,N,N',N' tetracético
GDH.....	glutamato desidrogenase
GOT.....	glutamato-oxaloacetato aminotransferase
Hep.	hepáticas
HEPES.....	N-[2-hidroxietil] piperazina - N' [ácido 2-etano sulfônico]
[MAL. DE ENALAPRIL]	concentração de Maleato de Enalapril
MDH.....	malato desidrogenase
ME.....	Maleato de Enalapril
MFR.....	mitocôndrias de fígado de rato rompidas
mM	milimolar

MRR.....	mitocôndrias de rim de rato rompidas
µM	micromolar
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)
NADH.....	nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)
PMS.....	metassulfato de fenazina
RC.....	coeficiente de controle respiratório
red.	redutase
Ren.	renais
TCA.....	ácido tricloroacético
Tris.....	tri (hidroximetil) - aminoetano

Resumo

Avaliou-se a ação do Maleato de Enalapril (o sal maleato do monoetil-éster da N-[1(S)-carboxi-3-fenilpropil] - L-alanil-L-prolina) sobre a capacidade de utilização de substratos e fosforilação oxidativa de mitocôndrias isoladas de fígado e de rim de ratos.

O Maleato de Enalapril causa inibição significativa da atividade da glutamato-oxaloacetato aminotransferase purificada, e atua sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória de mitocôndrias de rim de rato, inibindo a transferência de elétrons dos Complexos I e II para o Complexo III.

A estrutura responsável pelas inibições da cadeia respiratória é a do Enalapril, pois seu derivado desesterificado (Enalaprilato) não apresenta ação inibitória; porém ambas as estruturas provocam restrição à utilização de glutamato pelas mitocôndrias.

Os experimentos de biotransformação indicam que a esterólise de Enalapril a Enalaprilato ocorre em mitocôndrias hepáticas.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	01
I.1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	02
I.2. Estrutura e Propriedades dos bloqueadores da ECA	05
I.3. Farmacocinética e Farmacodinâmica do Maleato de Enalapril.....	08
I.4. Uso clínico do Maleato de Enalapril.....	10
I.5. Objetivos.....	12
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
II.1. Reagentes.....	14
II.2. Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato....	14
II.3. Isolamento de mitocôndrias de rim de rato.....	15
II.4. Obtenção de mitocôndrias rompidas de fígado e de rim de ratos para a determinação de atividades enzimáticas.....	15
II.5. Determinação do consumo de oxigênio por polaro- grafia. Cálculo do RC e ADP/O.....	16
II.6. Determinação das atividades enzimáticas ligadas à cadeia respiratória.....	17
II.6.1 NADH-oxidase.....	17
II.6.2 NADH-citocromo c redutase.....	18
II.6.3 Citocromo c-oxidase.....	18
II.6.4 Obtenção do ferrocitocromo c reduzido.....	19
II.6.5 NADH desidrogenase.....	19

II.6.6	Succinato desidrogenase.....	20
II.6.7	Succinato-citocromo c redutase.....	20
II.7.	Ação do Maleato de Enalapril solubilizado na fração microsossomal do homogenato de fígado de rato.....	21
II.8.	Determinação da atividade das enzimas ligadas à lançadeira malato-aspartato.....	21
II.8.1	Malato desidrogenase.....	22
II.8.2	Glutamato-oxaloacetato aminotransferase.....	22
II.8.3	Glutamato desidrogenase.....	23
II.9.	Avaliação de contaminação microsossomal na fração mitocondrial de fígado de rato	23
II.10.	Determinação da concentração de proteínas.....	24
II.11.	Preparo do Maleato de Enalapril.....	24
II.12.	Análise estatística dos dados obtidos.....	25
III.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
III.1.	Justificativa das doses de Maleato de Enalapril utilizadas no presente trabalho.....	27
III.2.	Efeito do Maleato de Enalapril sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias de fígado e de rim de ratos.....	29
III.3.	Efeito do Maleato de Enalapril sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória de mitocô- ndrias rompidas de fígado e de rim de ratos.....	40
III.4.	Efeito do Maleato de Enalapril sobre as enzimas relacionadas à lançadeira malato-aspartato.....	48

III.5. Efeito do Maleato de Enalapril solubilizado na fração microsomal de homogenato de fígado de rato sobre a NADH-oxidase e NADH-citocromo c re- ductase de mitocôndrias rompidas de rim de rato..	50
III.6. Avaliação de contaminação microsomal da fração mitocondrial de fígado de rato	53
IV. DISCUSSÃO FINAL.....	55
V. CONCLUSÕES.....	60
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

I - Introdução

A hipertensão arterial é uma das principais preocupações da medicina moderna representando, quando avaliada isoladamente, o fator de risco mais importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (WILHELMSSEN et al., 1979).

Estima-se atualmente que 15% da população dos países desenvolvidos seja hipertensa, e que fração apreciável desta porcentagem não esteja em tratamento contínuo.

Estudos multicêntricos demonstram que a terapia medicamentosa é efetiva na prevenção das complicações e no prolongamento da expectativa de vida, sendo portanto a hipertensão uma das poucas patologias crônicas compatíveis com controle terapêutico efetivo (HOROVITZ et al., 1979; VETERANS ADMINISTRATION COOPERATIVE STUDY GROUP ON ANTIHYPERTENSIVE AGENTS, 1967, 1970; WILHELMSSEN et al., 1979).

Uma ampla gama de agentes antihipertensivos tem sido utilizada, indo desde os agentes diuréticos até os bloqueadores beta-adrenérgicos (WESTFALL, 1986), sendo que na última década a indústria farmacêutica mundial tem procurado desenvolver drogas com reduzidos efeitos colaterais, e que possam ser administradas em dose única diária, por serem estes dois fatores os responsáveis pela grande maioria dos abandonos de tratamento.

Dentre as drogas desenvolvidas na última década os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) apresentam-se

como os mais promissores lançamentos (GAURAS & GAURAS, 1988), e um representante de desenvolvimento recente é o Enalapril, derivado da carboxi-acetilprolina, que vem sendo amplamente utilizado no controle da hipertensão e como coadjuvante no tratamento da insuficiência cardíaca (DAVIES et al., 1984; CODY, 1985).

I-1. SISTEMA RENINA - ANGIOTENSINA - ALDOSTERONA

RENINA - ANGIOTENSINA - ALDOSTERONA é um sistema hormonal de defesa fisiológica dos mamíferos, destinado a manter os níveis de volemia dentro dos limites compatíveis com as necessidades metabólicas e hemodinâmicas (GROSS, 1968), atuando tanto na regulação da resistência vascular periférica, como no volume e composição dos fluidos corpóreos.

Quando o volume plasmático, a concentração de sódio que atinge a mácula densa renal, ou a pressão de perfusão na arteriola aferente renal diminuem por qualquer motivo, as células justaglomerulares do córtex renal aumentam a secreção de uma protease ácida de peso molecular de 42.000 dáltons - renina - para a corrente sanguínea, desencadeando a sequência de eventos resumidos na Figura 1, e descritos abaixo.

O substrato da renina plasmática, uma α -globulina de peso molecular de 58.000 dáltons, o angiotensinogênio, é sintetizado pelo fígado e secretado para a corrente circulatória onde, após ação enzimática, libera o tetradecapeptídeo amino-terminal.

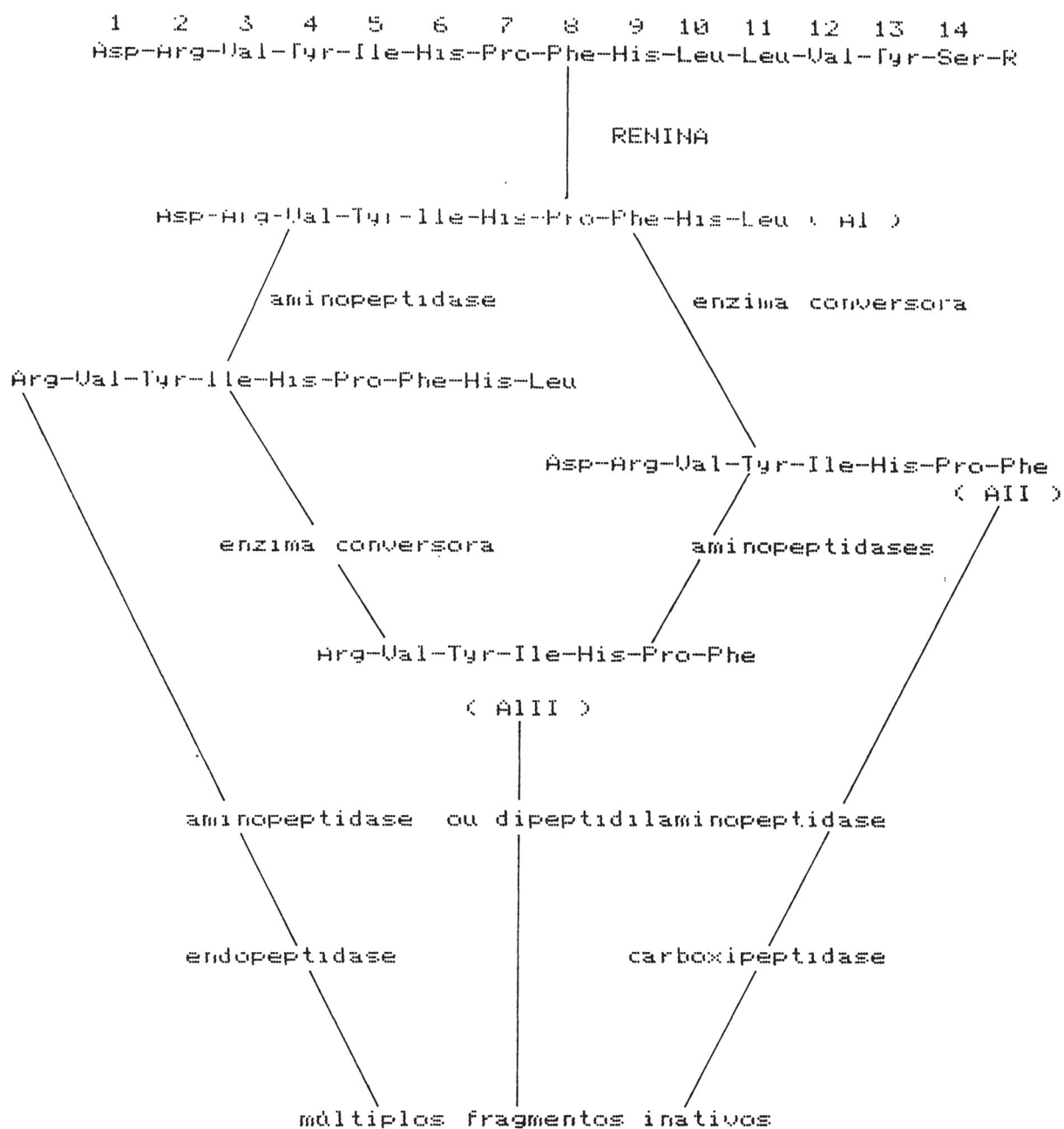


Figura 1- SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

R - α -globulina
 AI - angiotensina I
 AII - angiotensina II
 AIII - angiotensina III

Este tetradecapeptídeo é transformado em um decapeptídeo, a angiotensina I, pela ação da renina sobre a ligação peptídica entre os resíduos de leucina nas posições 10 e 11 (PEACH, 1977).

A conversão de angiotensina I em angiotensina II (um octapeptídeo) é realizada pela "enzima conversora" (uma exopeptidase - peptidil: dipeptídeo hidrolase E C 3.4.15.1), que existe em uma ampla variedade de tecidos de muitas espécies animais, bem como no plasma, sendo os vasos pulmonares os responsáveis pela maior parte da conversão (AIKEN & JANE, 1970).

A ação de aminopeptidases sobre a angiotensina II leva a formação de um heptapeptídeo, a angiotensina III, que é inativada pelas "angiotensinases" (aminopeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases).

Uma via alternativa de produção da angiotensina III seria pela ação de aminopeptidases sobre a angiotensina I, e posterior atuação da enzima conversora.

A angiotensina I estimularia o sistema nervoso central, a liberação de catecolaminas adrenais, a modulação da atividade simpática periférica e a regulação do fluxo sanguíneo intrarenal (PEACH, 1977).

Por sua vez, a angiotensina II atuaria sobre o sistema cardiovascular com aumento da força contrátil do músculo cardíaco, aumento da resistência vascular periférica, diminuição do débito cardíaco (devido à bradicardia reflexa causada pelo aumento de resistência periférica), aumento da biossíntese e liberação de catecolaminas, bem como estimularia a conversão de colesterol em pregnenolona nas suprarenais, que é o primeiro passo da produção de aldosterona (REGOLI et al., 1974).

A angiotensina III teria importância no estímulo das respostas de biossíntese do sistema renina-angiotensina-aldosterona, estimulando a produção de aldosterona, noradrenalina e prostaglandinas.

A atuação do sistema como um todo levaria à retenção de água e sódio, ao aumento da pressão sanguínea, e ao estímulo do sistema de ataque-defesa; sendo o responsável pelas hipertensões renino-dependentes, quando existam fatores para a manutenção de altas taxas de renina plasmática (por exemplo por estenose da artéria renal ou inibição do retrocontrole exercido pela taxa de angiotensina II sobre a produção de renina).

I-2. ESTRUTURA E PROPRIEDADES DOS BLOQUEADORES DA ECA

Após um início histórico, no qual foram investigadas as propriedades bloqueadoras da ECA por derivados do veneno de *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 1965 ; FERREIRA et al., 1970), a pesquisa sobre os inativadores da atividade da enzima conversora da angiotensina seguiu um caminho pouco usual.

A partir da semelhança estrutural entre o sítio ativo da carboxipeptidase A de pâncreas bovino e da ECA, foram construídas quimicamente moléculas de pseudosubstratos da enzima conversora (Figura 2) derivadas do nonapeptídeo SQ 20.881 (Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro), um potente e específico inibidor da enzima conversora de angiotensina (UNDETTI et al., 1971; UNDETTI et al. 1977).

O nonapeptídeo desenvolvido não apresentava efeito quando

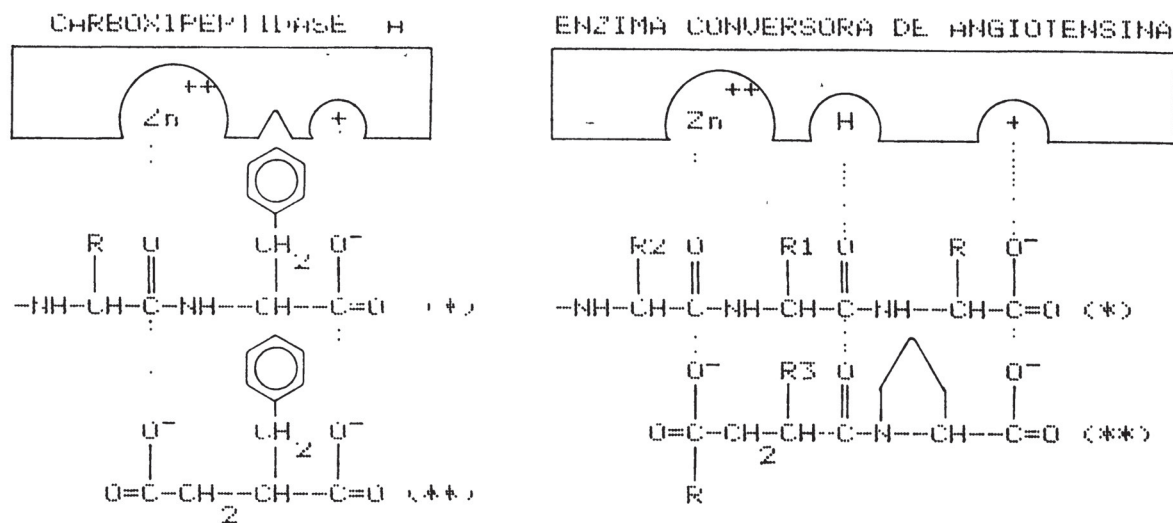


Figura 2- Representação esquemática da ligação de substratos (*) e inibidores (**) às estruturas da carboxipeptidase A e enzima conversora de angiotensina.

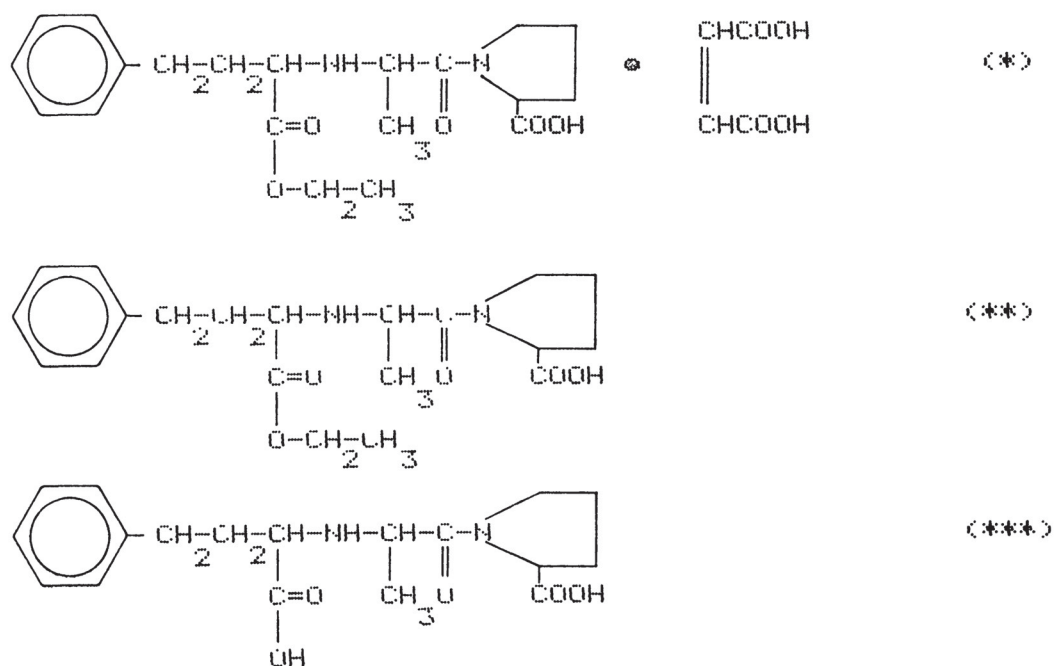


Figura 3- Estrutura química do Maleato de Enalapril (*), Enalapril (**) e ácido Enalaprilico (***).

administrado por via oral, o que motivou a procura de novas estruturas que possuísem a mesma propriedade bloqueadora, com maior absorção intestinal; e as modificações estruturais que foram realizadas na molécula básica levaram ao desenvolvimento do primeiro bloqueador da enzima conversora de angiotensina para uso humano, uma mercaptoalcanoil-prolina (SQ 14.255 - Captopril) que apresentava boa absorção oral (CUSHMAN et al., 1977).

Os inibidores da ECA existentes no mercado farmacêutico possuem a mesma estrutura básica, com variações nas cadeias laterais da molécula, sendo, fundamentalmente, carboxialcanoil aminoácidos ou mercaptoalcanoil aminoácidos.

A droga em estudo, Maleato de Enalapril, é o sal maleato do derivado acetilado de N-[1(S)-carboxi-3-fenilpropil]-L-alanil-L-prolina, e atinge sua atividade inibidora da ECA por desesterificação do grupamento acetil, sendo portanto um carboxialcanoil aminoácido, do ponto de vista funcional (Figura 3).

Segundo CUSHMAN et al., 1977, embora os derivados carboxialcanoil e mercaptoalcanoil de L-prolina tenham sido desenvolvidos inicialmente por analogia com um inibidor da carboxipeptidase A, eles são bastante específicos para inibição da enzima conversora de angiotensina, já que, apresentam constantes de inibição de 1 μ M a 1 nM para a ECA, enquanto concentrações de 1mM inibem até 50% da atividade da carboxipeptidase A, tripsina e quimiotripsina de pâncreas bovino, ou carboxipeptidase B de pâncreas de porco.

1-3. FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DO MALEATO DE ENALAPRIL (ME)

O sal Maleato de Enalapril foi estruturado quimicamente para facilitar a absorção intestinal, porém não apresenta atividade farmacológica em relação ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, sendo absorvido como Enalapril (um monoetil-éster do ácido enalaprilico), que também não é atuante como bloqueador da enzima conversora.

Para ser ativo deve ser desesterificado a ácido enalaprilico - Enalaprilato ou N-L1(S)-carboxi-3-fenilpropil]-L-alanil-L-prolina -, ou seja: um derivado monocarboxílico de aminoácido e transformado em dicarboxílico (TOULO et al., 1982), sendo que estudos de absorção e metabolismo em preparações perfundidas de intestino-fígado de rato, mostraram ser o fígado o local desta conversão hidrolítica (PANG et al., 1985).

Não existem evidências, até o momento, do local no hepatócito onde ocorra a conversão de Enalapril em Enalaprilato.

Por ser a inibição da ECA mais importante nos tecidos, e a medida da renina plasmática, aldosterona e angiotensinas I e II apresentar uma série de dificuldades técnicas, torna-se difícil a interpretação dos resultados obtidos.

Também a medida plasmática dos componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona não apresenta boa correlação com as reais atuações dos inibidores da ECA (TODD & HEEL, 1986).

Apesar destas dificuldades, a ação do Enalapril "in vitro" (CHEH et al., 1984), e "in vivo" (UNGER et al., 1985), mostrou que seu perfil de ação farmacológico é 10 vezes superior

ao de seu antecessor, o Captopril, em relação à inibição da enzima conversora de angiotensina.

Do ponto de vista de uso humano, os efeitos do emprego do Enalapril, tanto em voluntários normais como em hipertensos e pacientes em insuficiência cardíaca congestiva, foram de queda da concentração plasmática de angiotensina II, aumento na concentração de angiotensina I e atividade da renina plasmática, e redução na taxa de aldosterona circulante e urinária (ABRAMS et al., 1984); resultados compatíveis com os obtidos em animais (RADZIWILL et al., 1986).

O uso de Enalapril parece também ser responsável pela inibição parcial da quininase II, uma das enzimas responsáveis pela degradação da bradicinina, porém seus efeitos nesta área não estão suficientemente elucidados (YASUJIMA et al., 1984; TODD & HEEL, 1986).

Segundo JOHNSTON et al (1983), a queda da pressão arterial é relacionada linearmente à redução de atividade da enzima conversora de angiotensina, que por sua vez, apresenta correlação negativa linear com a dose de Enalapril administrada.

Desta forma teríamos uma redução de 15% na atividade com 10 miligramas de Enalapril administrado por via oral (concentração sérica [CS] de ácido enalaprilico média de 35 microgramas por litro), 30% com 20 miligramas (CS média de 70 microgramas por litro), e 60% com 40 miligramas (CS média de 120 microgramas por litro).

Considerando que a biotransformação de Enalapril em ácido Enalaprilico apresenta uma taxa máxima de 60%, e que o peso

molecular do Enalapril é de 374 dáltons, estas concentrações séricas seriam correspondentes a picos de concentração aproximados de respectivamente 0,15, 0,30 e 0,60 μM de Enalapril.

Estudos do metabolismo e disposição fisiológica do Enalapril e do Enalaprilato em animais de laboratório e no homem mostram que o metabólito diácido e polar (Enalaprilato) apresenta difusão muito baixa através da membrana plasmática de hepatócitos, tendo eliminação renal, assim como a parte não metabolizada do Enalapril absorvido (TOCCO et al., 1982; ULM, 1983; LANNON & PANG, 1987).

A avaliação da cinética de eliminação renal em pacientes com função renal alterada (LOWENTHAL et al., 1985), mostrou que existe um acúmulo progressivo de Enalaprilato relacionado à queda de atividade renal.

Em condições de uso em pacientes com alterações hepáticas fisiológicas ou patológicas, como em cirrose ou congestão hepática por insuficiência cardíaca congestiva, JOHNSTON et al. (1984) verificaram uma diminuição de 60% na concentração de enalaprilato prevista nas primeiras 4 horas após a ingestão da droga, o que significaria um incremento correspondente da concentração prevista de Enalapril no mesmo período.

1.4. USO CLÍNICO DO MALEATO DE ENALAPRIL (ME)

O Maleato de Enalapril é comercializado no Brasil com o nome de RENITEC (Merck Sharp & Dohme), em comprimidos contendo 5 e 20 miligramas de princípio ativo, sendo utilizado em doses que variam de 2,5 a 80 miligramas diários.

Como os demais bloqueadores da ECA, apesar de ter sido inicialmente proposto para o controle da hipertensão arterial, atualmente faz parte do conjunto de medicamentos utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (DAVIES et al., 1984; REAMS et al., 1986; FRANCIS & RUCINSKA, 1989).

O efeito anti-hipertensivo do Enalapril foi verificado quase exclusivamente em trabalhos comparativos com o efeito de placebo ou outros hipotensores, sendo que em sua totalidade tais estudos verificaram sua eficácia no controle da hipertensão com dosagens de 10 a 40 miligramas ao dia, em dose única ou dupla diária (DAVIES et al., 1984; MONCLOA et al., 1985; TODD & HEEL, 1986).

Estudos a longo prazo (THIND et al., 1985) mostraram que a droga foi atuante na redução dos níveis de pressão arterial após um ano de uso, sem demonstrar perda de atividade.

Na insuficiência cardíaca congestiva, em cuja fisiopatologia a vasoconstrição periférica e o aumento de catecolaminas circulantes teriam papel importante (LIPKIN & POOLE-WILSON, 1985), o uso de inibidores da ECA seria indicado para reduzir a resistência periférica e o retorno venoso ao coração, diminuindo a sobrecarga existente (TODD & HEEL, 1986).

Enalapril tem sido usado em insuficiência cardíaca na dose de 2,5 a 20 miligramas ao dia, acompanhado ou não de diuréticos, cardiotônicos e vasodilatadores (McGRATH et al., 1985; FRANCIS & RUCINSKA, 1989; BEAUNE, 1989; KJEKSHUS & SWEDBERG, 1989), com bons resultados na avaliação de parâmetros subjetivos e objetivos.

Os efeitos colaterais referidos nos diversos trabalhos citados são na sua maioria discretos quando comparados com os da terapêutica habitual da hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva, e os mais frequentes na literatura disponível são: tonturas, fadiga, diarreia, náuseas, reações alérgicas, tosse, hipotensão, glicosúria e hiperpotassemia, havendo porém citações isoladas de efeitos colaterais graves como insuficiência renal (CODY, 1985), infarto do miocárdio e episódios de isquemia transitória (ULASSES et al., 1985).

I.5. OBJETIVOS

Apesar do Maleato de Enalapril apresentar uma extensa avaliação clínica (até 1985 foram apresentados trabalhos envolvendo 6000 pacientes entre hipertensos e cardiopatas na literatura mundial segundo GOMEZ et al., 1985), sua atuação a nível bioquímico restringiu-se à pesquisa plasmática e urinária de eletrólitos e produtos do metabolismo (uréia, creatinina e eliminação renal de proteína) em voluntários normais ou pacientes que utilizaram a droga.

Portanto, visando ampliar os conhecimentos da ação a nível molecular do Enalapril, o presente trabalho tem como objetivos:

a) verificar a atuação do medicamento no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial de forma a auxiliar o entendimento de seus efeitos colaterais a curto e longo prazo nos órgãos expostos às maiores concentrações da droga (fígado e rins), bem como

verificar em que níveis teóricos tais efeitos tem maior probabilidade de ocorrer;

b) contribuir para a localização do local de biotransformação do Enalapril em Enalaprilato a nível hepático.

II - Materiais e Métodos

II.1. REAGENTES

Succinato e glutamato como sais sódicos, NAD^+ , NADH, ADP, EDTA, EGTA, BSA, HEPES, glutamato desidrogenase de fígado de boi tipo I (37 U/mg de proteína), glutamato oxaloacetato transaminase (295 U/mg de proteína), rotenona, ferricitocromo c de coração de boi, PMS, foram adquiridos da Sigma Chemical Co.

Manitol, ácido perclórico, tris-base, hidróxido de potássio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, sulfato de magnésio, NaCN, ditionito, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, sulfato de amônia, ácido sulfúrico, molibidato de amônia, sulfato de ferro, foram obtidos da Merck do Brasil.

Maleato de Enalapril, utilizado sob a forma de comprimidos de 20 mg de Renitec (Merck Sharp & Dohme).

Os demais reagentes utilizados foram do melhor grau de pureza disponível.

II.2. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas segundo método descrito por UOSS et al. (1961), com algumas modificações.

Assim, ratos brancos Wistar foram mortos por decapitação

tendo seus ríngados removidos e lavados em meio de isolamento composto de: Manitol 260 mM, EGTA 1mM, TRIS-HCl 10 mM (pH 7.2), e BSA 0.1%, sendo posteriormente picados com tesoura e homogeneizados em homogeneizador Van Potter-Elvehjem, usando-se sucessivamente pistilo frouxo e normal.

O homogenato obtido foi centrifugado a $320 \times g$ por 5 minutos em centrífuga refrigerada Beckman J-21B, a 3 graus centígrados. Descartou-se o precipitado, e o sobrenadante foi centrifugado a $12600 \times g$ por 10 minutos, sendo obtido um precipitado de mitocôndrias que foi por duas vezes ressuspensão em cerca de 15 ml de meio de isolamento, e centrifugado a $8100 \times g$ por 10 minutos; o precipitado obtido foi ressuspensão em 2 ml do mesmo meio.

Com esta diluição obteve-se uma concentração de proteína em média de 60 miligramas por mililitro.

II.3. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE RIM DE RATO

Mitocôndrias de rim de rato foram obtidas da córtex renal isolada, seguindo o método de VOSS et al. (1961) modificado, como descrito acima.

Com a diluição em 2 ml de meio de isolamento conseguiu-se uma concentração de proteína de 30 miligramas por mililitro em média.

II.4. OBTENÇÃO DE MITOCÔNDRIAS RUMPIDAS DE FÍGADO E DE RIM DE RATOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Mitocôndrias de fígado e rim de ratos obtidas conforme já descrito, foram congeladas em nitrogênio líquido a -180 graus centígrados.

Para os experimentos foram descongeladas a temperatura ambiente e recongeladas por 12 horas a -15 graus centígrados, novamente levadas a temperatura ambiente, e mantidas a 0 graus centígrados.

II.5. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO POR POLAROGRAFIA.

CÁLCULO DO RC E ADP/O.

Segundo VOSS et al. (1963), com algumas modificações, determinou-se o consumo de oxigênio de mitocôndrias intactas em polarógrafo GILSON dotado de registrador.

O sistema de reação era composto de: Manitol 250 mM, KCl 10 mM, tris-HCl 10 mM, EGTA 0.1 mM, BSA 0.05% e tampão fosfato 5 mM (pH 7.2), sendo complementado, de acordo com o experimento, com glutamato de sódio 4,2 mM ou succinato de sódio 4,2 mM, e ADP 0.2 μ M.

A concentração de proteína mitocondrial foi de 1 miligrama por mililitro, quando o substrato utilizado era succinato, e de 1.5 miligramas por mililitro no caso de glutamato, e a temperatura foi mantida em 28 graus centígrados por banho-maria termostaticado.

As velocidades respiratórias do estado III e estado IV (respectivamente o consumo de O_2 por minuto por miligrama de proteína em presença de ADP, e após o consumo do ADP), e sua razão, o coeficiente de controle respiratório (RC), foram calcula-

dos em cada um dos experimentos, bem como o quociente entre os nanomoles de ADP e de oxigênio consumidos durante o estado III (ADP/O) (CHANCE & WILLIAMS, 1955; ESTABROOK, 1967).

II.6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS LIGADAS À CADEIA RESPIRATÓRIA.

As atividades das enzimas respiratórias foram determinadas, exceto onde explicitamente referido, em espectrofotômetro GILFORD modelo 252, acoplado a registrador GILFORD 6051, sendo que a curva de absorção do Maleato de Enalapril não mostrou picos de absorbância nas faixas utilizadas nos diversos experimentos.

Foram utilizadas mitocôndrias de fígado (MFR) e de rim de rato (MRR), rompidas por congelamento.

Em todos os experimentos descritos abaixo, adicionou-se Maleato de Enalapril ao meio de reação, na quantidade necessária para se obter uma concentração final de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, ou 1 mM.

II.6.1 NADH -OXIDASE (NADH : oxigênio oxidoreductase) E C 1.6.99.3

Seguindo o método descrito por SINGER (1974), determinou-se espectrofotometricamente a atividade da NADH-OXIDASE, a 28 graus centígrados, em meio contendo: tampão fosfato 50 mM pH 7,4, EDTA 50 μ M e 215 μ g de MFR ou 230 μ g de MRR, em volume final de 1 ml; e a reação foi iniciada pela adição de NADH 100 μ M, sendo registrado em 340 nm o decréscimo de absorbância devido à oxida-

ção do NADH.

Para calcular a velocidade da reação utilizou-se o coeficiente de extinção de $6.220 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ para o NADH, e os resultados foram expressos em nanomoles de NADH oxidado por minuto e por miligrama de proteína.

II.6.2 NADH -CITOCROMO C REDUTASE (NADH : citocromo c -oxidoreductase) E C 1.6.99.3

Acompanhou-se a redução do citocromo c espectrofotometricamente a 550 nm segundo SINGER (1974), a 28 graus centígrados.

O meio de reação era constituído de tampão fosfato 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, NADH 50 uM, ferricitocromo c 35 uM, NaCN 1 mM, sendo a reação iniciada com a adição de 72 ug de MFR ou 46 ug de NRR em volume final de 1 ml.

Utilizando-se o coeficiente de extinção molar para o ferricitocromo c de $19.000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, foi calculada a atividade enzimática em nanomoles de citocromo c reduzido por minuto, por miligrama de proteína.

II.6.3 CITOCROMO C -OXIDASE (Ferricitocromo c : oxigênio oxidoreductase) E C 1.9.3.1

A oxidação de ferrocitocromo c, como indicativo de atividade da citocromo c oxidase, a 28 graus centígrados, foi medida espectrofotometricamente em 550 nm (MASUH et al., 1973).

O meio de reação era composto de tampão fosfato 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, ferrocitocromo c 25 uM e 46 ug de MFR ou 23 ug de

MRR, em volume final de 1 ml.

Utilizando o coeficiente de extinção molar de $19.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para o ferrocitocromo c, a atividade específica foi expressa em nanomoles de ferrocitocromo c oxidado por minuto e por miligrama de proteína.

II.6.4 Obtenção do ferrocitocromo c reduzido

Ferricitocromo c de coração de boi reduzido com ditionito, foi eluído com água deionizada em coluna de SEPHADEX G25, a fim de separar o ferrocitocromo c do excesso de ditionito, segundo YONETANY & RAY (1965).

A concentração final de ferrocitocromo c foi obtida por espectrofotometria a 550 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de $27.700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para o citocromo c reduzido.

II.6.5 NADH DESIDROGENASE (NADH : ferricianeto oxidoreductase)

E C 1.6.99.3

Utilizando ferricianeto como oxidante, e rotenona para bloqueio da cadeia respiratória, a atividade da NADH desidrogenase foi avaliada segundo SINGER (1974).

O meio de reação era constituído de tampão fosfato 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, ferricianeto 0,6 mM, rotenona 1 μM e 20 μg de MFR ou 20 μg de MRR, em volume final de 1 ml; sendo mantida a temperatura de 28 graus centígrados durante os experimentos.

A reação foi acompanhada por espectrofotometria a 420 nm

após a adição de NADH 150 μ M, sendo os resultados expressos em nanomoles de ferricianeto reduzido por minuto e por miligrama de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar para o ferricianeto de $1.040 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

II.6.6 SUCCINATO DESIDROGENASE (Succinato : fenazina metassulfato oxidoreductase) E C 1.3.99.1

A redução de DPIP foi utilizada para avaliar a atividade da succinato desidrogenase segundo SINGER (1974).

Tampão fosfato 50 mM pH 7,4, succinato de sódio 20 mM, NaCN 1 mM, EDTA 2 mM, e 10 μ g de MFR ou 31 μ g de MRR constituíam o meio de reação, em volume final de 1 ml; após 10 minutos de incubação a 28 graus centígrados, a reação foi iniciada pela adição de DPIP 60 μ M e PMS 1 mM, acompanhando-se a redução de DPIP por espectrofotometria em 600 nm.

Os resultados foram expressos em nanomoles de DPIP reduzido por minuto e por miligrama de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de $14.400 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ para o DPIP reduzido.

II.6.7 SUCCINATO-CITOCROMO C REDUTASE (Succinato : ferrocitocromo c oxidoreductase) E C 1.3.99.1

A atividade enzimática da succinato-citocromo c redutase foi determinada, segundo SOMLO (1965), pela redução de ferricitocromo c, estando a cadeia respiratória bloqueada por NaCN.

O sistema de reação era composto de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, EDTA 2 mM, succinato de sódio 5 mM, e MFR 68 ug ou MRR 9 ug; após incubação por 10 minutos a 28 graus centígrados, a reação foi iniciada pela adição de ferricitocromo c 40 uM, sendo seguida espectrofotometricamente em 550 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles de ferricitocromo c reduzido por minuto e por miligrama de proteína, utilizando o coeficiente de extinção de $19.000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

II.7. AÇÃO DO MALEATO DE ENALAPRIL SOLUBILIZADO NA FRAÇÃO MICROSSOMAL DO HOMOGENATO DE FÍGADO DE RATU

A atividade da NADH-OXIDASE (E C 1.6.99.3) e da NADH-CITOCROMO C REDUTASE (E C 1.6.99.3) de mitocôndrias de rim de rato rompidas por congelamento foi avaliada seguindo precisamente o mesmo procedimento experimental descrito nos itens II.6.1 e II.6.2, sendo a única alteração o uso de Maleato de Enalapril solubilizado na fração microssomal do homogenato de fígado de rato, em substituição à solução em água destilada e deionizada.

II.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS LIGADAS À LANÇADEIRA MALATO-ASPARTATO

A atividade das enzimas ligadas a lançadeira malato-aspartato foi determinada em espectrofotômetro Aminco Chance Dual Wavelength / Split Beam, equipado com registrador.

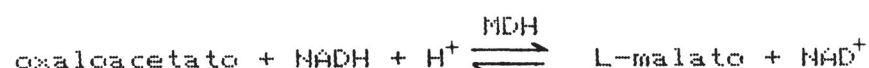
Em todos os experimentos foi adicionado Maleato de

Enalapril dissolvido em água destilada e deionizada, na quantidade necessária para se obter uma concentração final de 0,01 , 0,05 , 0,1 , 0,5 ou 1 mM.

Nos experimentos descritos nos itens 11.8.1, 11.8.2 e 11.8.3 foi utilizada a metodologia descrita por WILLIAMSON & CURKE' (1969, 1979), porém foi adicionada quantidade conhecida de substrato ao meio de reação, quando então avaliou-se a atividade da enzima purificada na ausência ou presença de Maleato de Enalapril.

11.8.1 MALATO DESIDROGENASE (L-malato : NAD⁺ oxidoreductase)
E C 1.1.1.37

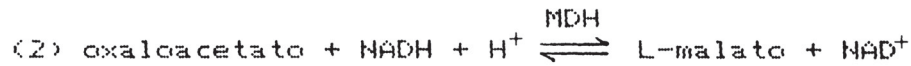
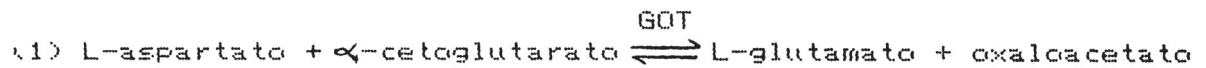
A atividade da malato desidrogenase de coração de boi purificada foi medida seguindo a oxidação de NADH por espectrofotometria em 340 nm, a 28 graus centígrados, segundo a reação:



O meio de reação era composto de tampão trietanolamina 50 mM pH 7,4, sulfato de magnésio 10 mM, EDTA 5 mM, NADH 50 uM e oxaloacetato 2 mM, em um volume final de 3 ml, e a reação foi iniciada pela adição de malato desidrogenase (0,235 unidades).

11.8.2 GLUTAMATO-OXALOACETATO AMINOTRANSFERASE (aspartato aminotransferase) E C 2.6.1.1

acompanhando a oxidação do NADH segundo as reações:

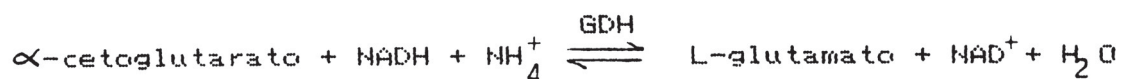


avaliou-se, por espectrofotometria em 340 nm, a atividade da glutamato-oxaloacetato aminotransferase purificada.

Tampão trietanolamina 50 mM pH 7,4, sulfato de magnésio 10 mM, EDTA 5 mM, NADH 50 uM, α -cetogluturato 10 mM, aspartato 30 mM, MDH 0,235 unidades, compunham o meio de reação em volume final de 3 ml, mantido a 28 graus centígrados, sendo a reação iniciada pela adição de 0,4 unidade de GOT.

II.8.3 GLUTAMATO DESIDROGENASE (L-glutamato : NAD(P) oxidoreductase) E C 1.4.1.3

A atividade da glutamato desidrogenase purificada de fígado de boi foi quantificada acompanhando-se a oxidação de NADH por espectrofotometria em 340 nm, a 28 graus centígrados, segundo a reação:



O meio de reação era composto de tampão fosfato 50 mM pH 7,0, sulfato de amônia 10 mM, EDTA 5 mM, NADH 65 uM em volume final de 3 ml, sendo a reação iniciada pela adição de GDH 0,1 unidade.

II.9 AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO MICROSSOMAL NA FRAÇÃO MITOCONDRIAL DE FÍGADO DE RATO

A pureza da preparação de mitocôndrias de fígado de rato foi pesquisada através da atividade da enzima marcadora microsomal - glucose-6-fosfatase E C 3.1.3.9 - , segundo a metodologia descrita por HERS et al. (1951).

O sistema de reação era composto de tampão histidina-HCl 20 mM pH 6.5, glucose-6-fosfato 40 mM, EDTA 1 mM e volume adequado de mitocôndrias isoladas de fígado de rato ou sobrenadante da centrifugação de 12.600 x g, em volume final de 1 ml.

Após incubação a 37 graus centígrados por 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de TCA a 7%.

O sistema foi centrifugado a 14.000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante utilizado para a dosagem de fosfato inorgânico liberado durante a incubação, conforme descrito por SUMNER (1944).

II.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As determinações de proteína foram realizadas pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando espectrofotômetro Micronal, modelo B380, e soro albumina bovina como padrão.

II.11. PREPARO DO MALEATO DE ENALAPRIL

Comprimidos de 20 mg de Renitec (Merck Sharp & Dohme), com a seguinte composição:

maleato de enalapril.....20 mg

carbonato de sódio.....	10 mg
lactose.....	146,7 mg
amido de milho.....	22 mg
óxido amarelo de ferro.....	0,13 mg
estearato de magnésio.....	1,1 mg

foram dissolvidos em água destilada e deionizada, sendo a suspensão posteriormente centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante filtrado.

As soluções assim obtidas apresentavam pH = 7,0, e foram mantidas a -15 graus centígrados.

Novas soluções eram preparadas a cada 3 semanas, porém soluções com até 5 semanas foram testadas, mostrando a mesma atividade que as recentes.

Nos experimentos de biotransformação de Enalapril em Enalaprilato, os comprimidos de Renitec foram dissolvidos na fração microsossomal de homogenato de fígado de rato, ou seja, no sobrenadante obtido na centrifugação de 12.600 x g durante o isolamento de mitocôndrias.

É importante salientar que as concentrações de Maleato de Enalapril utilizadas nos vários experimentos (0,01 , 0,05 , 0,1 , 0,5 e 1 mM), representam concentrações de Enalapril de 0,008 , 0,04, 0,08 , 0,4 e 0,8 mM, já que o sal maleato apresenta peso molecular de 116 dáltons acima do Enalapril isolado.

II.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS

A análise estatística dos dados obtidos foi feita por regressão linear utilizando-se o método dos mínimos quadrados das médias obtidas nos vários experimentos, e os coeficientes de regressão, correlação e determinação avaliados quanto a

significância pelo teste t de Student.

Nos diversos experimentos o termo "significante" foi utilizado apenas quando os três coeficientes foram considerados significativos pelo teste.

As médias, antes da regressão linear, foram submetidas a avaliação de ajuste de curvas para verificar a melhor representação, e calculadas por regressão não linear, porém em todos os casos apresentados no presente trabalho, o coeficiente de correlação foi maior quando se utilizava a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Também, levando-se em conta a possibilidade de que mitocôndrias renais estejam submetidas a concentrações menores de Enalapril em condições fisiológicas (página 29), foram repetidos os testes citados com dados interpolados, os quais apresentaram comportamento estatístico similar aos obtidos experimentalmente.

A variabilidade dos resultados apresentados foi quantificada pelo coeficiente de variação de Pearson, obtido pela fórmula:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

- CV - coeficiente de variação de Pearson
- σ - desvio padrão
- \bar{x} - média aritmética

III. Resultados e discussão

III.1. JUSTIFICATIVA DAS DOSES DE MALEATO DE ENALAPRIL (ME) UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO

O modelo farmacodinâmico do Maleato de Enalapril é baseado em diversas premissas.

A primeira é a de que sais de ácidos fracos são mais solúveis em água, o que justifica a forma farmacêutica de apresentação: sal maleato de Enalapril.

Segundo PANG et al. (1985), o Enalapril liberado no intestino delgado seria rapidamente absorvido (discute-se ainda uma pequena biotransformação de Enalapril em ácido Enalaprilico por bactérias entéricas), sendo a taxa de absorção humana de 60% da dose administrada, e a biotransformação seria feita a nível hepático até 60% da dose absorvida.

A excreção do Enalapril não transformado (cerca de 40% da dose absorvida), seria realizada pelos rins, embora uma parcela não superior a 8% poderia ser eliminada pela bile; porém a determinação seria difícil devido à recirculação entero-hepática (ABRAMS & DAVIES, 1984).

Resumindo, em termos gerais, se um ser humano normal com peso médio de 70 kg, e rigado de 1,5 kg com espaço hídrico de 1 litro, ingerisse uma dose única de 10 miligramas, apresentaria uma absorção de 6 miligramas em um período máximo de uma hora,

levando a uma concentração hepática da droga de até 0,016 mM (ou 0,008 mM se considerarmos uma rápida transformação de 50% da dose em ácido Enalaprilico).

Partindo-se do princípio que as concentrações séricas de ácido Enalaprilico seguem uma forma linear acompanhando a dose administrada (JOHNSTON et al., 1983), as prováveis concentrações hepáticas para 20, 40 e 80 miligramas de Enalapril administrado seriam de 0,016, 0,032 e 0,064 mM (ainda considerando que a conversão de 50% seria extremamente rápida).

Tais considerações parecem ter sido seguidas por PANG et al. (1985), já que a concentração máxima empregada na perfusão hepática foi de 0,0133 mM de Enalapril, compatível com o uso de 20 mg diários em dose única.

As concentrações de 0,5 e 1 mM de Maleato de Enalapril (correspondendo a 0,4 e 0,8 mM de Enalapril) foram utilizadas com o fim de simular condições de administração em pacientes com problemas na conversão, como hepatopatas; bem como para servir como teste do efeito sobre as diversas enzimas, já que CUSHMAN et al. (1977) haviam verificado uma queda de 50% da atividade da carboxipeptidase H, tripsina e quimiotripsina de pâncreas bovino, e carboxipeptidase B de pâncreas de porco, com concentrações de 1 mM de inibidores da ECA.

Do ponto de vista renal a análise de concentrações fica mais complexa porque apesar de apenas 40% da dose absorvida ser eliminada pelo rim como Enalapril, o volume hidrico de ambos os rins é de apenas 450 ml, existindo evidências de secreção tubular da droga (LODD & HEEL, 1986), e o filtrado glomerular é concentrado cerca de 80 vezes em relação ao plasma.

Desta forma, o mais provável é que a concentração de Enalapril em células renais seja de 30 a 40% mais baixa que em células hepáticas, o que deve ser levado em consideração na análise dos resultados.

III.2. EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO E DE RIM DE RATOS

A avaliação do efeito do Maleato de Enalapril sobre mitocôndrias isoladas de fígado e de rim de ratos foi iniciada com o registro polarográfico do consumo de oxigênio, com a utilização de glutamato de sódio como substrato.

As Figuras 4 a 7, e Tabela I, mostram os resultados obtidos utilizando-se o método descrito por ESTABROOK (1967) para o cálculo da velocidade respiratória do Estado III, Estado IV, RC e ADP/O.

Observa-se nas figuras 4 a 7 uma redução da velocidade do Estado III, RC e ADP/O, e elevação da velocidade do Estado IV, proporcional em ambos os tipos de mitocôndrias exceto em relação à velocidade do Estado IV de mitocôndrias hepáticas, que não se mostrou significativa.

Mitocôndrias hepáticas e renais apresentaram portanto, com este substrato, alterações semelhantes de seus parâmetros polarográficos, exceto em relação à velocidade do Estado IV.

Avaliando apenas os dados de velocidade do Estado III, RC e ADP/O, até esta fase do estudo, a droga parecia atuar sobre o transporte e/ou metabolismo do substrato empregado, podendo

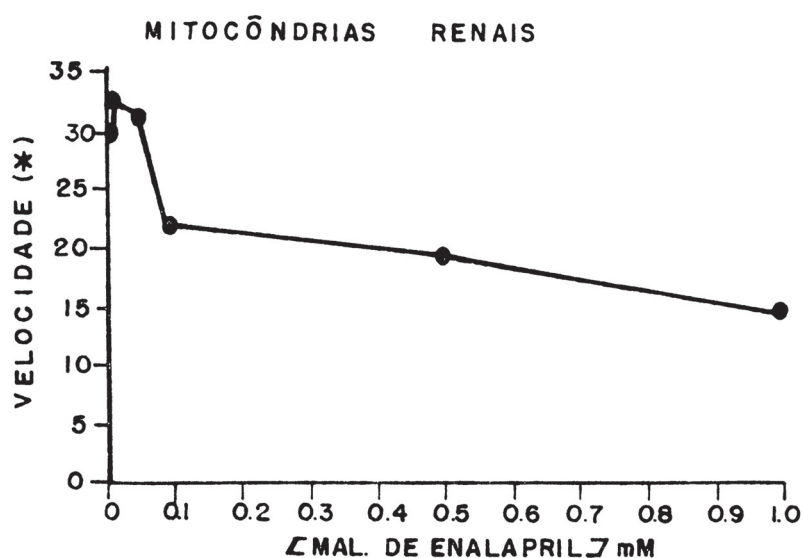
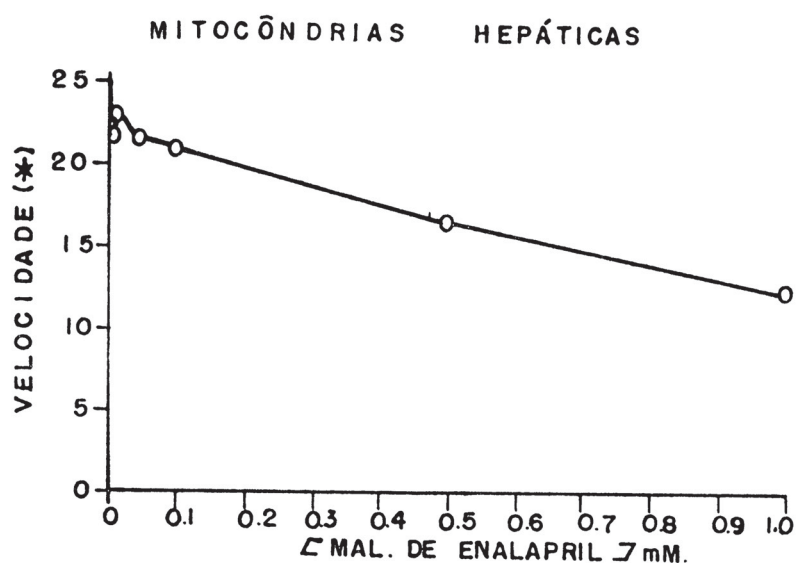


FIGURA 4- Efeito do Maleato de Enalapril sobre a velocidade respiratória do Estado III de mitocôndrias hepáticas e renais utilizando glutamato de sódio como substrato.

Sistema : Manitol 250 mM, KCl 10 mM, tris-HCl 10 mM (pH 7.2), EGTA 0.1 mM, BSA 0.05%, tampão fosfato 5 mM (pH 7.2), ADP 0.2 μ M, glutamato de sódio 4.2 mM e proteína mitocondrial 1.8 mg para um volume final de 1.2 ml. Os resultados representam as médias de oito experimentos independentes, e o coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 8 %

(*) Os valores de velocidade estão expressos em nanomoles de oxigênio consumido por minuto e por miligrama de proteína.

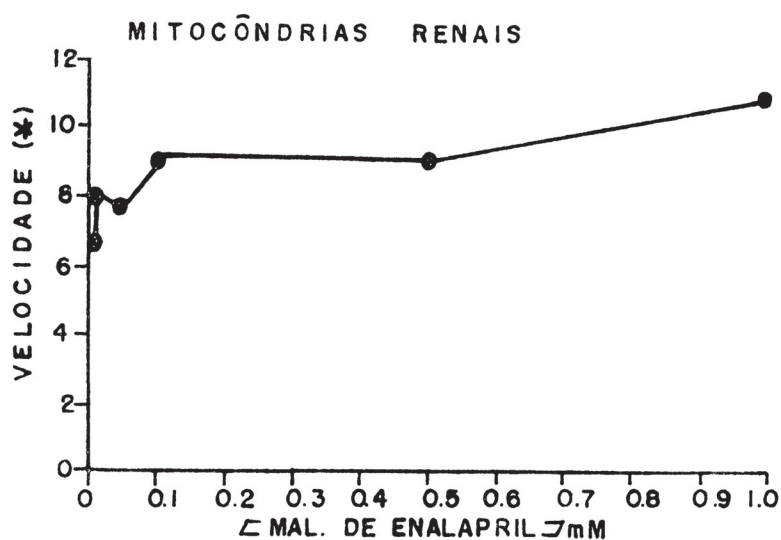
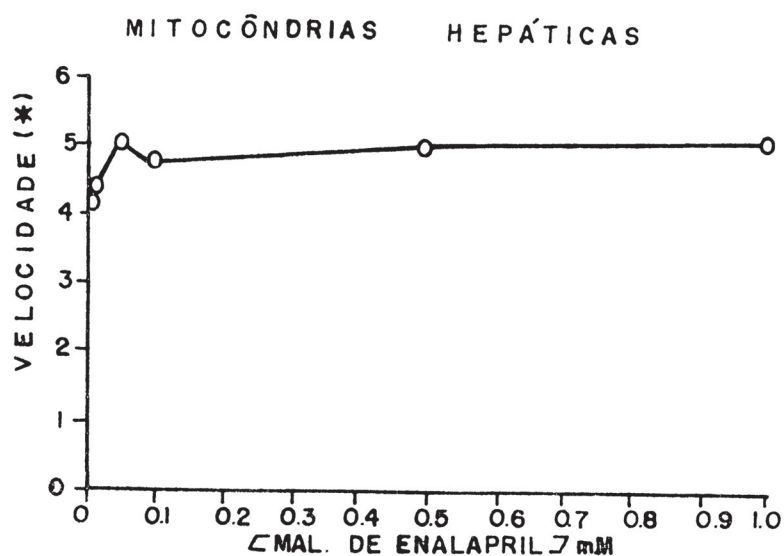


FIGURA 5- Efeito do Maleato de Enalapril sobre a velocidade respiratória do Estado IV de mitocôndrias hepáticas e renais utilizando glutamato de sódio como substrato.

Sistema : Manitol 250 mM, KCl 10 mM, tris-HCl 10 mM (pH 7,2), EGTA 0,1 mM, BSA 0,05%, tampão fosfato 5mM (pH 7,2), ADP 0,2 µM, glutamato de sódio 4,2 mM e proteína mitocondrial 1,8 mg para um volume final de 1,2 ml. Os resultados representam as médias de oito experimentos independentes, e o coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 9 %.

(*) Os valores de velocidade estão expressos em nanomoles de oxigênio consumido por minuto e por miligrama de proteína.

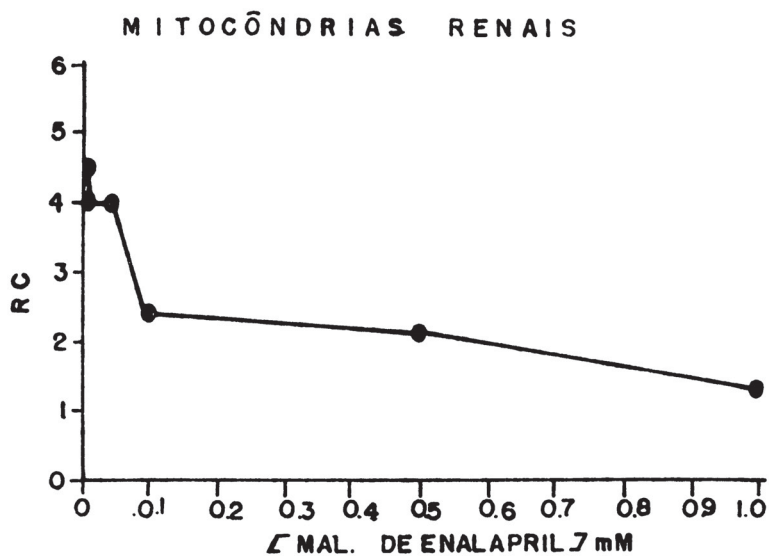
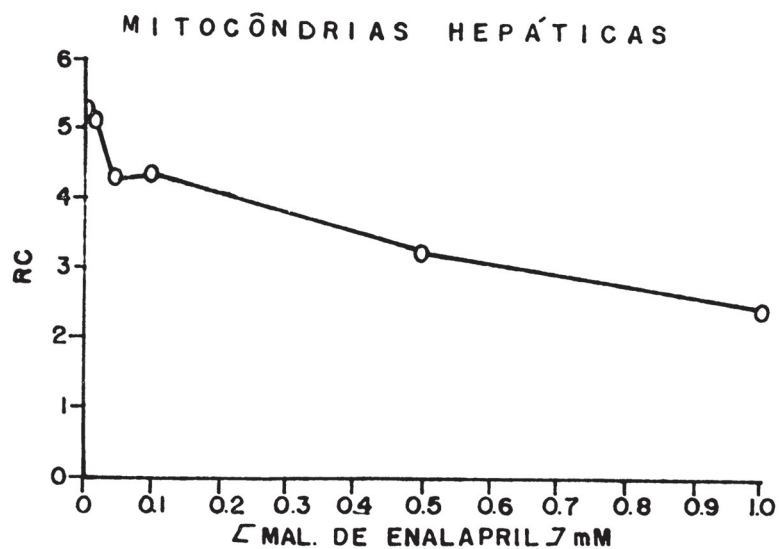


FIGURA 6- Efeito do Maleato de Enalapril sobre o R/C de mitocôndrias hepáticas e renais utilizando glutamato de sódio como substrato.

Sistema : Manitol 250 mM, KCl 10 mM, tris-HCl 10 mM (pH 7,2), EGTA 0,1 mM, BSA 0,05%, tampão fosfato 5 mM (pH 7,2), ADP 0,2 μ M, glutamato de sódio 4,2 mM e proteína mitocondrial 1,8 mg para um volume final de 1,2 ml.

Os resultados representam as médias de oito experimentos independentes, e o coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 7 %

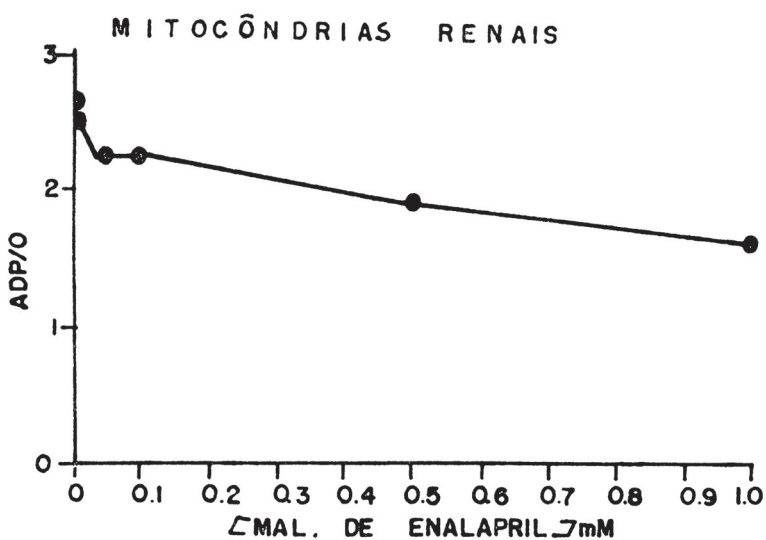
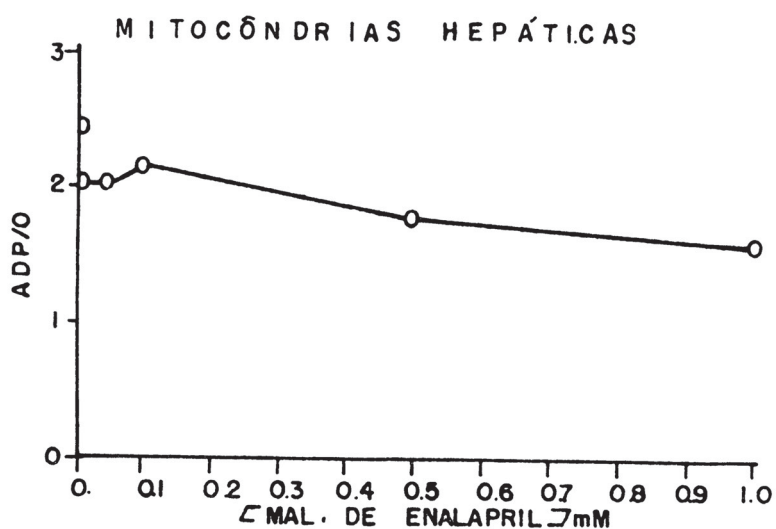


FIGURA 7- Efeito do Maleato de Enalapril sobre o ADP/O de mitocôndrias hepáticas e renais utilizando glutamato de sódio como substrato.

Sistema : Manitol 250 mM, KCl 10 mM, tris-HCl 10 mM (pH 7,2), EGTA 0,1 mM, BSA 0,05%, tampão fosfato 5 mM (pH 7,2), ADP 0,2 μM, glutamato de sódio 4,2 mM e proteína mitocondrial 1,8 mg para um volume final de 1,2 ml. Os resultados representam as médias de oito experimentos independentes, e o coeficiente de variação de Pearson das médias foi $\times 8$ %.

também estar interferindo em algum ponto da cadeia respiratória, de uma forma equivalente em ambas as mitocôndrias.

Do ponto de vista das alterações verificadas na velocidade do Estado III, o efeito desacoplador da droga seria compatível com suas características de lipossolubilidade, sendo mais intensas e significativas em mitocôndrias renais devido às características constitucionais de sua membrana.

TABELA I

Variações percentuais máximas dos parâmetros polarográficos de mitocôndrias hepáticas (Hep) e renais (Ren) utilizando glutamato de sódio como substrato

	Variacão máxima	Significância para p = 0,05
ESTADO III	Hep - 57 %	sim
	Ren - 51 %	sim
ESTADO IV	Hep + 26 %	não
	Ren + 66 %	sim
R C	Hep - 52 %	sim
	Ren - 69 %	sim
ADP:O	Hep - 35 %	sim
	Ren - 39 %	sim

O próximo passo foi a avaliação do efeito da droga mantendo as mesmas condições experimentais, porém utilizando succinato de sódio como substrato.

Na Tabela II e Figuras 8 a 11 estão representados os principais resultados desta fase.

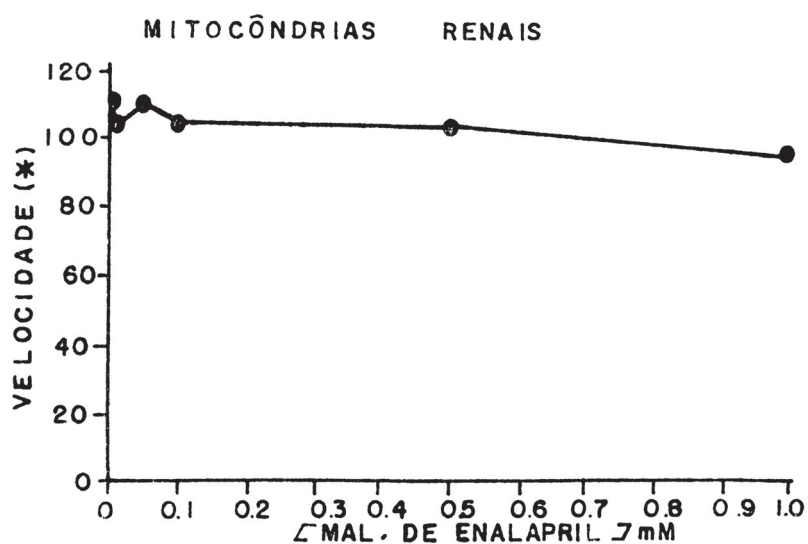
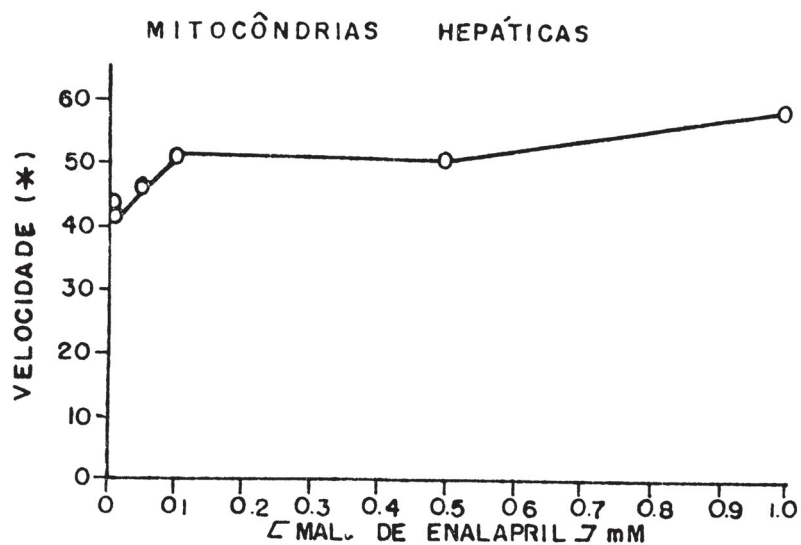


FIGURA 8- Efeito do Maleato de Enalapril sobre a velocidade respiratória do Estado III de mitocôndrias hepáticas e renais utilizando succinato de sódio como substrato.

Sistema : Manitol 250 mM, KCl 10 mM, tris-HCl 10 mM (pH 7,2), EGTA 0,1 mM, BSA 0,05%, tampão fosfato 5 mM (pH 7,2), HDP 0,2 µM, succinato de sódio 4,2 mM e proteína mitocondrial 1,2 mg para um volume final de 1,2 ml.

Os resultados representam as médias de seis experimentos independentes e o coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 8 %.

(*) Os valores de velocidade estão expressos em nanomoles de oxigênio consumido por minuto e por miligrama de proteína.

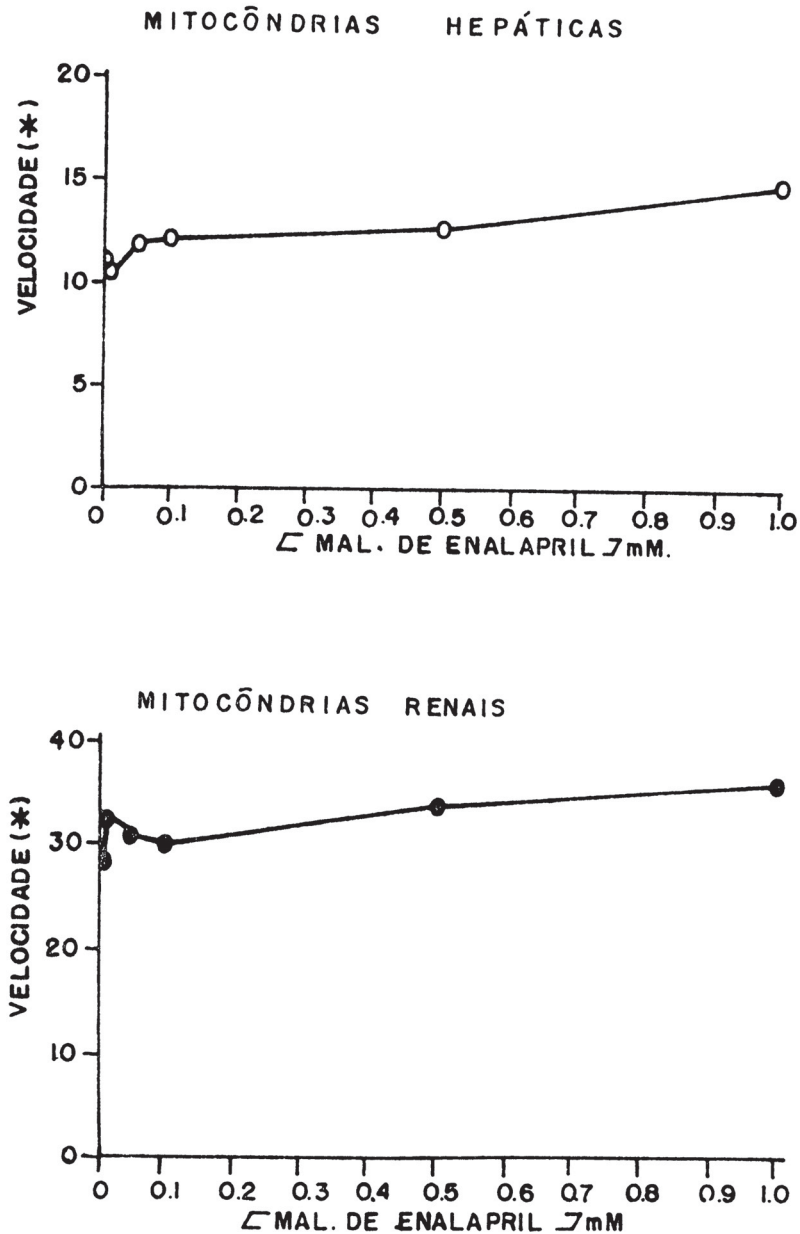


FIGURA 9 - Efeito do Maleato de Enalapril sobre a velocidade respiratória do Estado IV de mitocôndrias hepáticas e renais utilizando succinato de sódio como substrato.

Sistema : Manitol 250 mM, KCl 10 mM, tris-HCl 10 mM (pH 7,2), EGTA 0,1 mM, BSA 0,05%, tampão fosfato 5 mM (pH 7,2), ADP 0,2 μ M, succinato de sódio 4,2 mM e proteína mitocondrial 1,2 mg para um volume final de 1,2 ml.

Os resultados representam as médias de seis experimentos independentes, e o coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 10 %.

(*) Os valores de velocidade estão expressos em nanomoles de oxigênio consumido por minuto e por miligrama de proteína.

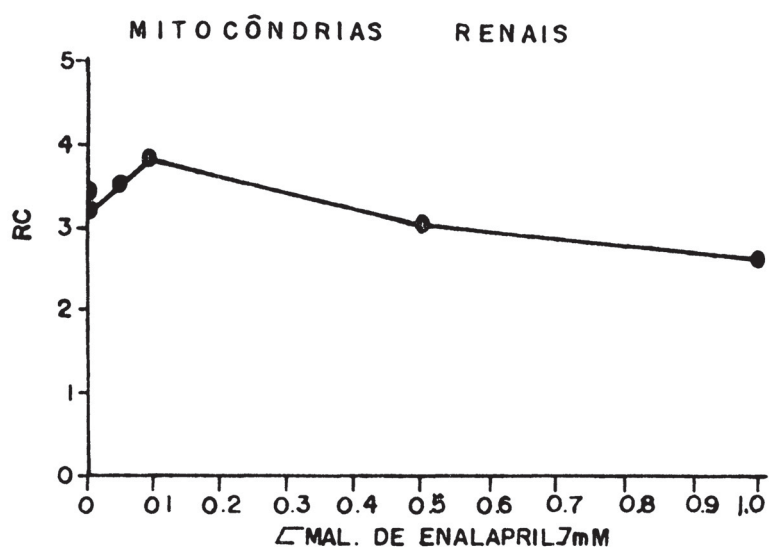
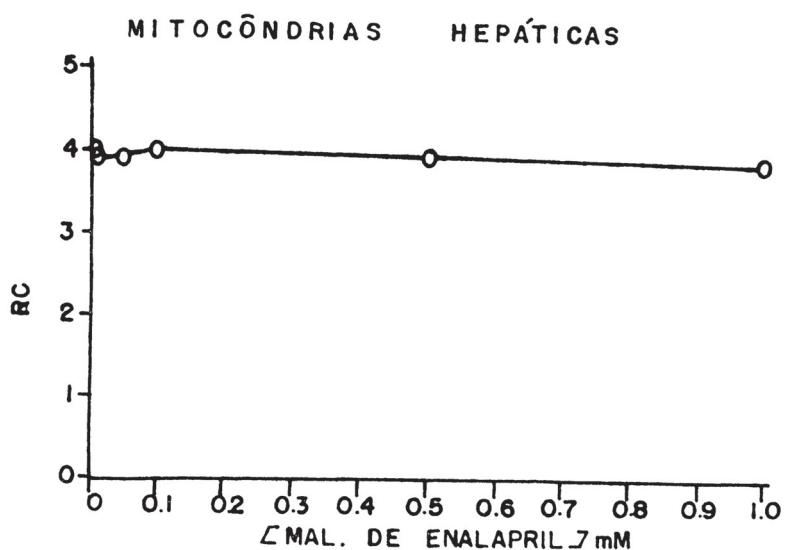


FIGURA 10 - Efeito do Maleato de Enalapril sobre o R/C de mitocôndrias hepáticas e renais utilizando succinato de sódio como substrato.

Sistema : Manitol 250 mM, KCl 10 mM, tris-HCl 10 mM (pH 7,2), EGTA 0,1 mM, BSA 0,05%, tampão fosfato 5 mM (pH 7,2), ADP 0,2 µM, succinato de sódio 4,2 mM e proteína mitocondrial 1,2 mg para um volume final de 1,2 ml.

Os resultados representam as médias de seis experimentos independentes, e o coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 9,5 %

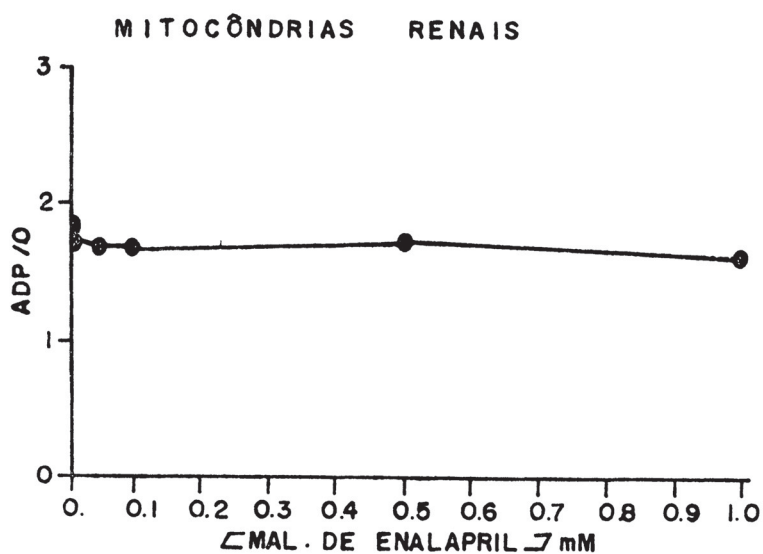
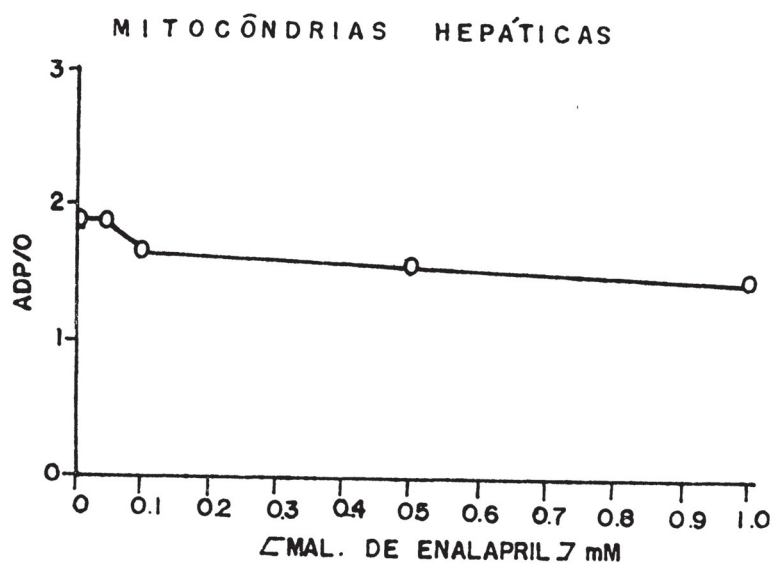


FIGURA 11- Efeito do Maleato de Enalapril sobre o ADP/O de mitocôndrias hepáticas e renais utilizando succinato de sódio como substrato.

Sistema : Manitol 250 mM, KCl 10 mM, tris-HCl 10 mM (pH 7.2), EGTA 0.1 mM, BSA 0.05%, tampão fosfato 5 mM (pH 7.2), ADP 0.2 μM, succinato de sódio 4.2 mM e proteína mitocondrial 1.2 mg para um volume final de 1.2 ml.

Os resultados representam as médias de seis experimentos independentes, e o coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 9.5 %

As principais diferenças entre os resultados obtidos com ambos os substratos toram na velocidade do Estado III que, em mitocôndrias hepáticas metabolizando succinato, sofreu uma inversão de comportamento, passando a apresentar uma aceleração significativa, e na relação ADF/O em mitocôndrias renais com succinato como substrato, cuja queda não foi significativa.

Também o RC de mitocôndrias hepáticas não apresentou variação significativa, quando succinato de sódio era o substrato.

TABELA II

Variações percentuais máximas dos parâmetros polarográficos de mitocôndrias hepáticas (Hep) e renais (Ren) utilizando succinato de sódio como substrato

	! Variação ! máxima	! Significância ! para p = 0,05
ESTADO III	! Hep + 36 %	! sim
	! Ren - 14 %	! sim
ESTADO IV	! Hep + 38 %	! sim
	! Ren + 28 %	! sim
R C	! Hep - 2 %	! não
	! Ren - 23 %	! sim
ADF/O	! Hep - 21 %	! sim
	! Ren - 10 %	! não

Com os novos dados a avaliação dos efeitos da droga passou a necessitar de um novo enfoque.

A elevação da velocidade do Estado III em mitocôndrias hepáticas, acompanhada da queda da relação ADP/O, sugere que uma parte do potencial eletroquímico estaria sendo dissipado de alguma forma, porém tal não acontecia com mitocôndrias renais, que mantinham um padrão semelhante ao obtido quando o substrato era glutamato de sódio.

Em resumo, quando foi utilizado glutamato de sódio como substrato, mitocôndrias hepáticas e renais comportaram-se de maneira semelhante, porém com succinato de sódio como substrato apresentaram divergências importantes, sugerindo até que estivessem frente a drogas diferentes.

Diante destes resultados, foi necessária a avaliação do efeito da droga sobre as enzimas da cadeia respiratória de mitocôndrias isoladas de fígado e rim de ratos.

III.3. EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA DE MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS DE FÍGADO E DE RIM DE RATOS

Os complexos enzimáticos da cadeia respiratória de mitocôndrias de fígado e de rim de ratos (esquema abaixo), foram avaliados segundo SOMLU (1964), MASON (1973) e SINGER (1974), apresentando as alterações de atividade mostradas nas Figuras 12 a 17, e resumidas na Tabela III.

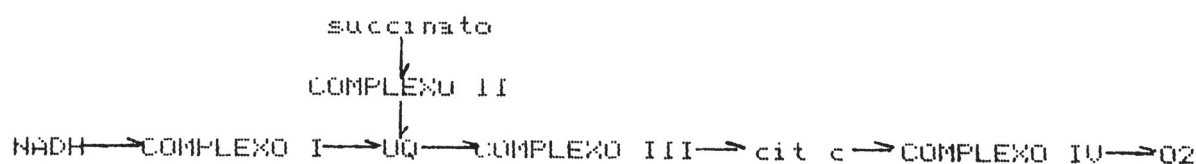
As principais variações de atividade observadas foram em mitocôndrias renais rompidas, e evidenciavam uma intensa inibição de atividade enzimática na região compreendida entre os Complexos I e II, e o Complexo III.

Mitocôndrias hepáticas rompidas, apesar de possuírem

complexos enzimáticos idênticos, surpreendentemente não apresentavam alterações significativas de suas atividades.

ESQUEMA I

Complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial



COMPLEXO I - NADH - Ubiquinona (UQ) oxidoreductase
 COMPLEXO II - Succinato - UQ oxidoreductase
 COMPLEXO III - UQ - citocromo c oxidoreductase
 COMPLEXO IV - citocromo c oxidase

TABELA III

Variações percentuais máximas das atividades enzimáticas da cadeia respiratória de mitocôndrias rompidas de fígado (MFR) e de rim (MRR) de ratos

	! Variação !	! Significância !
	! máxima !	! para p = 0,05 !
NADH-OXIDASE	! MFR -10 % !	! não !
	! MRR -54 % !	! sim !
NADH-cit. c redutase	! MFR 0 % !	! --- !
	! MRR -77 % !	! sim !
NADH desidrogenase	! MFR -8 % !	! não !
	! MRR -4 % !	! não !
cit. c-OXIDASE	! MFR -6 % !	! não !
	! MRR -7 % !	! não !
Succinato-cit. c redut.	! MFR +1 % !	! não !
	! MRR -56 % !	! sim !
Succinato desidrog.	! MFR -8 % !	! não !
	! MRR 0 % !	! --- !

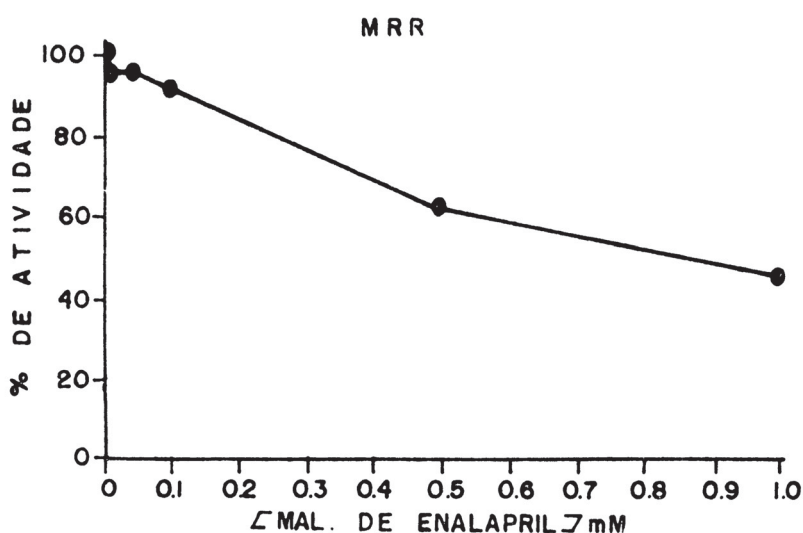
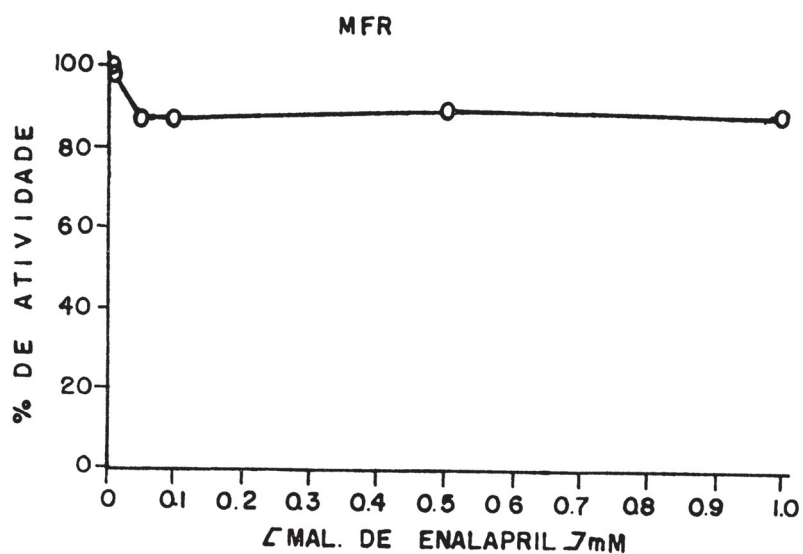


FIGURA 12- Efeito do Maleato de Enalapril sobre a atividade da NADH OXIDASE de mitocôndrias hepáticas (MFR) e renais (MRR) rompidas por congelamento.

Sistema : tampão fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 50 µM, 215 µg de MFR ou 230 µg de MRR, e NADH 100 µM em um volume final de 1 ml.

Os resultados são as médias de dois experimentos independentes, e estão expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle, que foi de 45 nanomoles de NADH oxidado por minuto e por miligrama de proteína para MFR e de 79.7 nanomoles de NADH oxidado por minuto e por miligrama de proteína para MRR.

O coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 5 % para MFR e < 6.5 % para MRR.

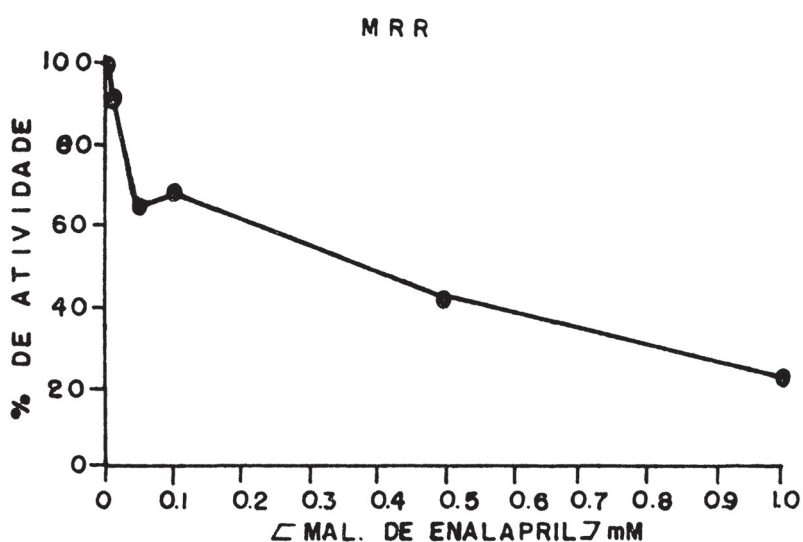
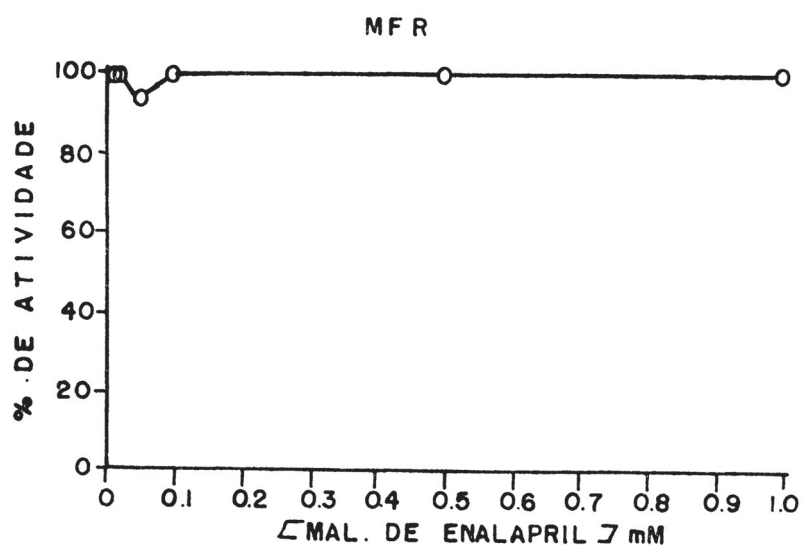


FIGURA 13- Efeito do Maleato de Enalapril sobre a atividade da NADH-CITOCROMO C REDUTASE de mitocôndrias hepáticas (MFR) e renais (MRR) rompidas por congelamento.

Sistema : tampão fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, ferricitocromo c 35 µM, 72 µg de MFR ou 46 µg de MRR, NaCl 1 mM e NADH 50 µM em um volume final de 1 ml.

Os resultados são as médias de dois experimentos independentes, e estão expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle, que foi de 21,8 nanomoles de ferricitocromo reduzido por minuto e por miligrama de proteína para MFR, e 27,2 nanomoles de ferricitocromo reduzido por minuto e por miligrama de proteína para MRR.

O coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 4% para MFR e < 6% para MRR.

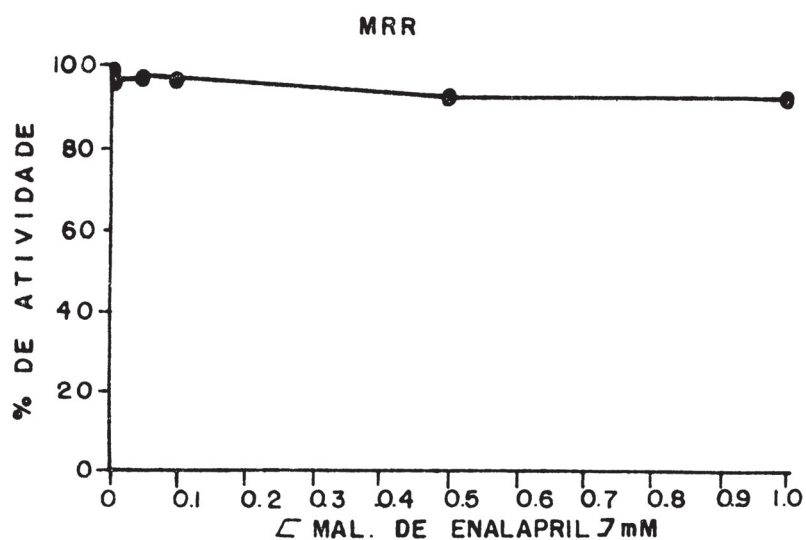
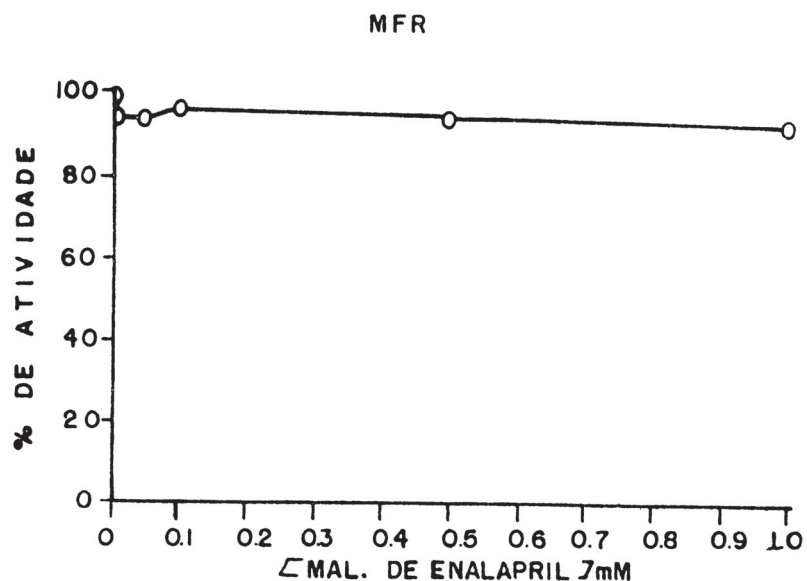


FIGURA 14- Efeito do Maleato de Enalapril sobre a atividade da CITOOCROMO C-OXIDASE de mitocôndrias hepáticas (MFR) e renais (MRR) rompidas por congelamento.

Sistema : tampão fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, ferrocitocromo c 25 µM e 46 µg de MFR ou 23 µg de MRR, em um volume final de 1 ml.

Os resultados são as médias de dois experimentos independentes, e estão expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle, que foi de 66 nanomoles de ferrocitocromo oxidado por minuto e por miligrama de proteína para MFR, e de 70 nanomoles de ferrocitocromo oxidado por minuto e por miligrama de proteína para MRR.

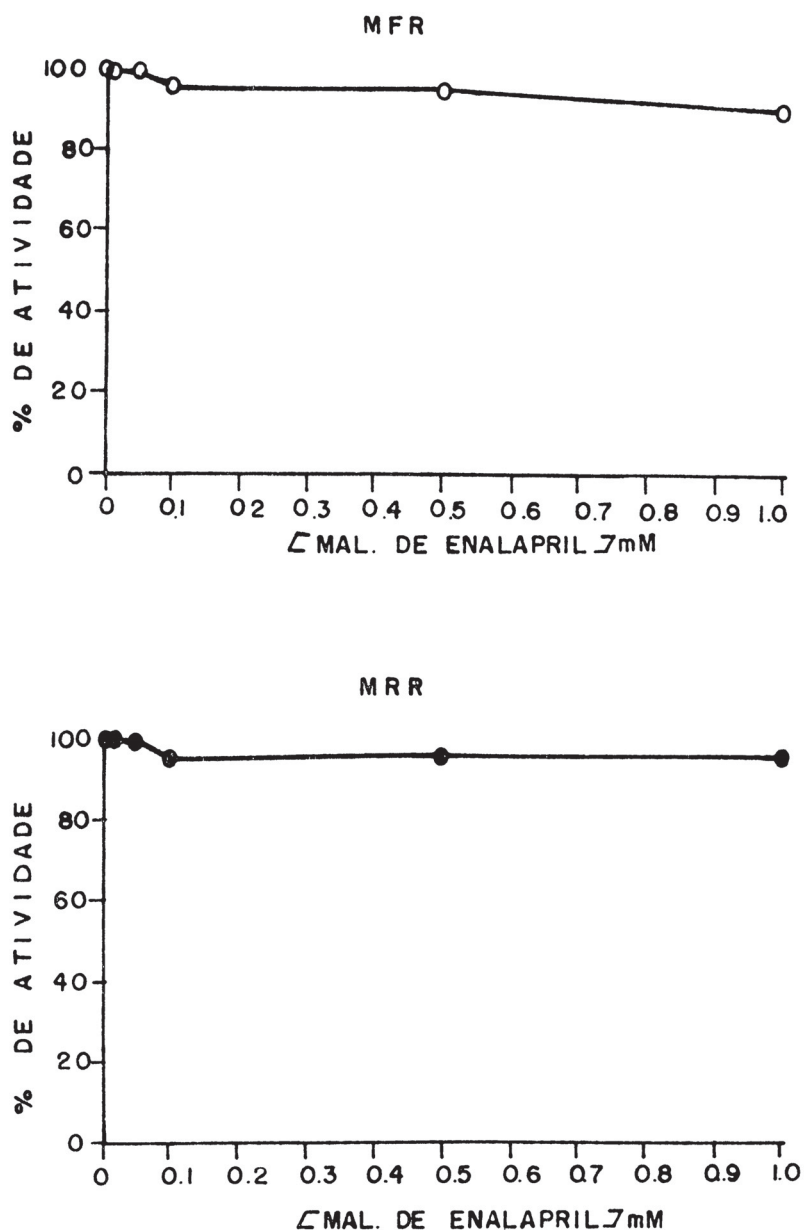


FIGURA 15- Efeito do Maleato de Enalapril sobre a atividade da NADH DESIDROGENASE mitocondrias hepáticas (MFR) e renais (MRR) rompidas por congelamento.

Sistema : tampão fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, ferricianeto 0.6 mM, rotenona 1 μ M, NADH 150 μ M, e 20 μ g de MFR ou 20 μ g de MRR, em um volume final de 1 ml.

Os resultados são as médias de dois experimentos independentes, e estão expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle, que foi de 25 nanomoles de ferricianeto reduzido por minuto e por miligrama de proteína para MFR, e 12.5 nanomoles de ferricianeto reduzido por minuto e por miligrama de proteína para MRR.

O coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 5% para MFR e < 3% para MRR.

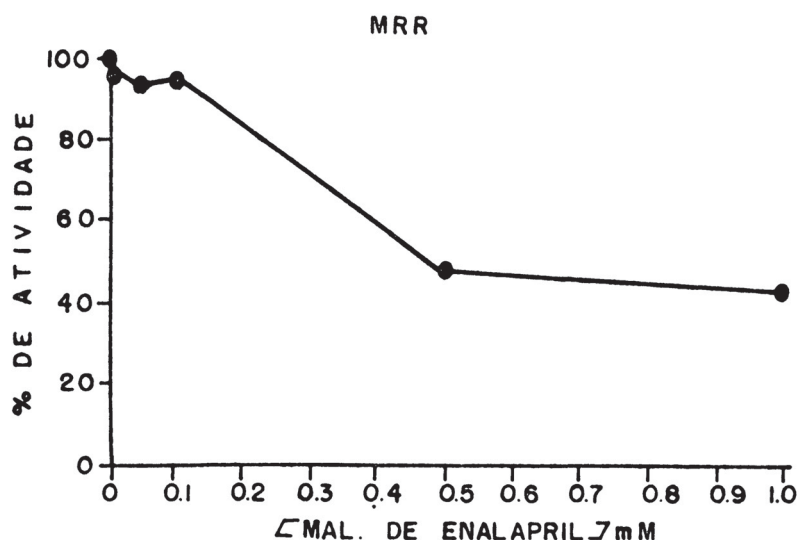
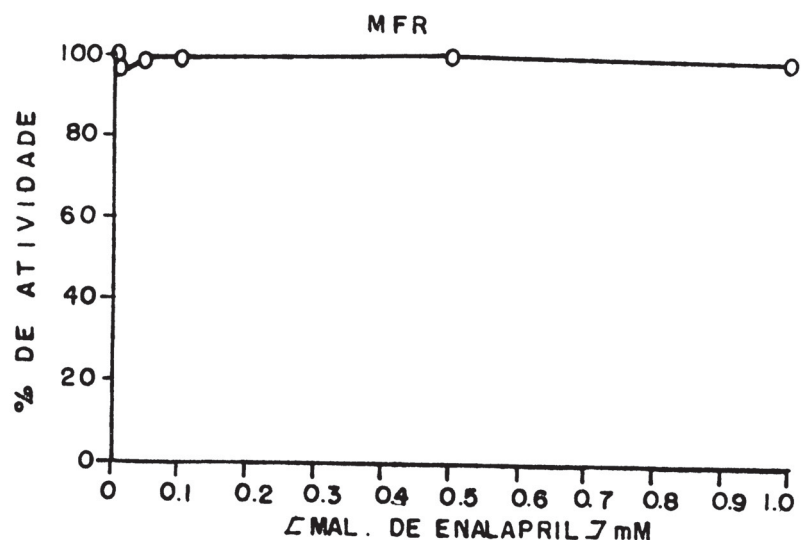


FIGURA 16- Efeito do Maleato de Enalapril sobre a atividade da SUCCINATO - CITOCROMO C REDUTASE de mitocôndrias hepáticas (MFR) e renais (MRR) rompidas por congelamento.

Sistema : tampão fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, succinato de sódio 5 mM, ferricitocromo c 40 µM, e 68 µg de MFR ou 9 µg de MRR, em um volume final de 1 ml.

Os resultados são as médias de dois experimentos independentes, e estão expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle, que foi de 59.5 nanomoles de ferricitocromo reduzido por minuto e por miligrama de proteína para MFR, e 550 nanomoles de ferricitocromo reduzido por minuto e por miligrama de proteína para MRR.

O coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 6% para MFR e < 6% para MRR.

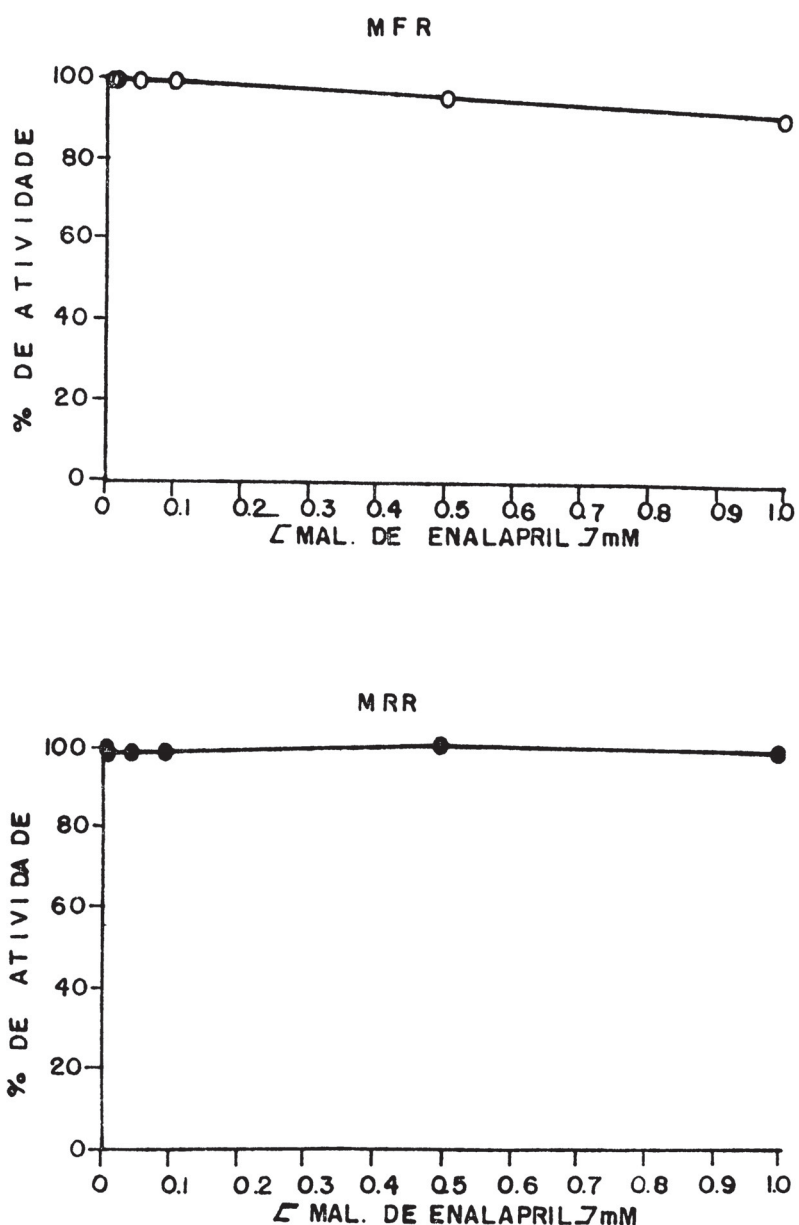


FIGURA 17- Efeito do Maleato de Enalapril sobre a atividade da SUCCINATO DESIDROGENASE de mitocôndrias hepáticas (MFR) e renais (MRR) rompidas por congelamento.

Sistema : tampão fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, succinato de sódio 20 mM, NaCN 3 mM, rotenona 1 mM, DPIP 60 μ M, PMS 0,975 mM, e 31 μ g de MFR ou 10 μ g de MRR, em um volume final de 1 ml.

Os resultados são as médias de dois experimentos independentes, e estão expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle, que foi de 101 nanomoles de DPIP reduzido por minuto e por miligrama de proteína para MFR, e de 254 nanomoles de DPIP reduzido por minuto e por miligrama de proteína para MRR.

O coeficiente de variação de Pearson das médias foi < 4% para MFR e < 8% para MRR.

Os resultados desta fase experimental levavam a uma única conclusão: mitocôndrias de fígado e de rim estavam expostas a drogas diferentes.

Como a única transformação do Enalapril exposto a homogenato de fígado é em direção a ácido Enalaprilico (TOCCO et al., 1982; PANG et. al., 1985), a hipótese viável era de que estava havendo a desesterificação de Enalapril na preparação de mitocôndrias de fígado de rato.

Esta transformação explicaria os resultados conflitantes obtidos em polarografia quando o substrato era succinato e as inibições enzimáticas, porém não justificaria a concordância de resultados polarográficos com glutamato como substrato.

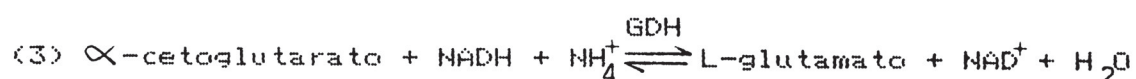
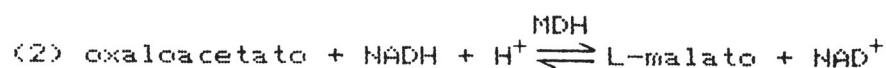
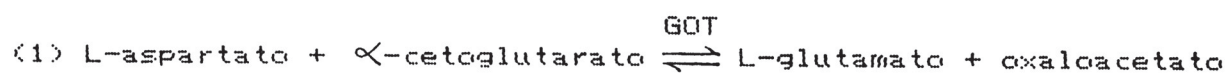
Para existir tal concordância, o fator limitante deveria estar antes da cadeia respiratória ou seja, no transporte ou nas enzimas necessárias para o funcionamento da lançadeira malato-aspartato (LANQUE et al., 1973; LANQUE & SCHOOLWERTH, 1979).

HESEM, para uma avaliação destas possibilidades foi verificado o efeito do Maleato de Enalapril sobre as enzimas : malato desidrogenase, glutamato - oxaloacetato transaminase e glutamato desidrogenase.

III.4. EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL SOBRE AS ENZIMAS RELACIONADAS À LANÇADEIRA MALATO-ASPARTATO

O ensaio das enzimas relacionadas à lançadeira malato-aspartato baseou-se nas reações abaixo, sendo verificada inicialmente a atividade da malato desidrogenase (MDH), e posteriormente da glutamato-oxaloacetato aminotransferase (GOT).

A glutamato desidrogenase (GDH) foi avaliada segundo a reação (3).



Os resultados obtidos foram conclusivos para uma inibição da GOT de 23% ($p = 0,05$), apresentando um perfil de inibição exposto na Tabela IV.

TABELA IV

Variação percentual da atividade da GOT purificada submetida a diversas concentrações de Maleato de Enalapril [M.E.]

[M.E.] mM	% DE ATIVIDADE
0 (*)	100 (**)
0,01	91
0,05	89
0,1	89
0,5	79
1,0	77

(*) controle sem Maleato de Enalapril

(**) equivalente a 7,73 nanomoles de NADH oxidado por minuto e por unidade de GOT

Por sua vez, a atividade da malato desidrogenase e da glutamato desidrogenase foram inibidas em um máximo de,

respectivamente, 8% e 11% (ambas não significativas para $p=0,05$)

Assim, levando-se em conta as condições experimentais em que foram realizadas, as alterações polarográficas encontradas com glutamato de sódio como substrato seriam provavelmente devidas a uma inibição da glutamato-oxaloacetato aminotransferase (GOT), que ocasionaria a restrição de uso deste substrato por ambas as mitocôndrias em estudo.

A inibição da GOT verificada neste experimento não estaria relacionada a biotransformação de Enalapril em Enalaprilato, já que as alterações polarográficas foram proporcionais em mitocôndrias de fígado e rim de ratos.

Portanto, a alteração de atividade deveria ser provocada por uma região da molécula não envolvida na esterólise.

Uma possibilidade seria a de que a região prolina-terminal das moléculas de Enalapril e Enalaprilato estivesse envolvida, uma vez que trabalhos anteriores constataram uma inibição da oxidação e transporte de glutamato em mitocôndrias de fígado de rato por estruturas semelhantes, como a N-etilmaleimida (MEIJER et al., 1972).

Dos efeitos do Maleato de Enalapril verificados até este momento do estudo, ainda necessitavam uma explicação a possibilidade de que o ácido Enalaprilico não inibisse as enzimas da cadeia respiratória, e a localização provável de biotransformação da droga.

III.5. EFEITO DO MALEATO DE ENALAPRIL SOLUBILIZADO NA FRAÇÃO MICROSSOMAL DE HOMOGENATO DE FÍGADO DE RATO SOBRE A NADH-

OXIDASE E NADH-CITOCROMO C REDUTASE DE MITOCÔNDRIAS
ROMPIDAS DE RIM DE RATO

Para verificar a hipótese de que o ácido Enalaprilico não apresentasse efeito significativo sobre as enzimas da cadeia respiratória, decidiu-se solubilizar Maleato de Enalapril no sobrenadante da centrifugação de 12.600 x g da preparação normal de mitocôndrias de fígado de rato deste trabalho.

De acordo com o método empregado no isolamento, este sobrenadante continha mitocôndrias leves, o conteúdo solúvel citosólico, microssomos, e uma contaminação variável de sangue.

Baseado em TOCCO et al. (1982), de que a esterólise ocorreria em homogenatos de fígado, e no plasma de ratos, o sobrenadante referido teria, em tese, as condições necessárias para a transformação.

Escolheram-se os ensaios de NADH-oxidase e NADH-citocromo c redutase em mitocôndrias rompidas de rim de rato, por serem os que apresentaram maior inibição percentual, nos experimentos com Maleato de Enalapril solubilizado em água.

A Figura 18 mostra os resultados, que foram de uma inibição máxima de 9% para a NADH-oxidase, e de 10% para a NADH-citocromo c redutase (ambos não significativos para $p = 0,05$).

Assim, verifica-se que a atuação do Maleato de Enalapril era o principal responsável pelas inibições constatadas na cadeia respiratória de mitocôndrias renais rompidas, inibições estas que desapareciam quando a droga sofria esterólise.

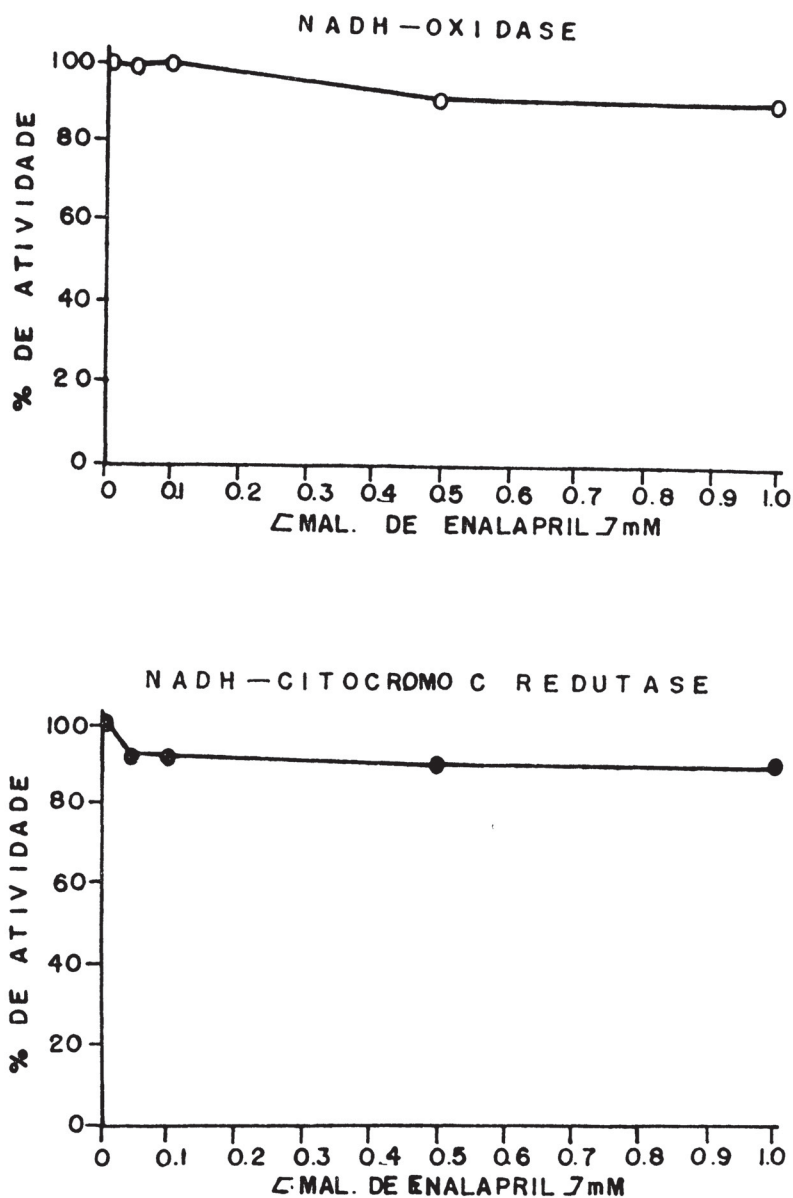


FIGURA 18- Efeito do Maleato de Enalapril solubilizado na fração microsomal de homogenato de fígado de rato sobre a atividade da NADH OXIDASE e NADH-CITOCROMO C REDUTASE de mitocôndrias de rim de rato rompidas por congelamento.

Sistema : para efeito de comparação de resultados foram mantidos os sistemas descritos nas Figuras 12 e 13, e a droga foi solubilizada conforme descrito no item 11.11.

Os resultados são as médias de dois experimentos independentes e estão expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle, que foi de 84 nanomoles de NADH oxidado por minuto e por miligrama de proteína nos experimentos da NADH OXIDASE, e 25 nanomoles de ferricitocromo reduzido por minuto e por miligrama de proteína nos experimentos da NADH CITOCROMO C REDUTASE.

Os coeficientes de variação de Pearson foram < 10% em ambos os casos.

III.6. AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO MICROSSOMAL DA FRAÇÃO MITOCONDRIAL DE FÍGADO DE RATO

Como mitocôndrias renais rompidas passaram a ter um comportamento semelhante as de fígado quando submetidas à ação da droga após esterólise, chegou-se a conclusão de que o mesmo processo estaria ocorrendo nas preparações de mitocôndria de fígado de rato íntegras ou rompidas.

Mas o processo estaria ocorrendo devido à ação da própria mitocôndria hepática, ou seria um artefato devido a contaminação durante o isolamento ?

No tipo de preparação utilizado neste trabalho o contaminante mais provável seria microssomal, o que levou à necessidade de avaliar a atividade da glucose-6-fosfatase (enzima predominantemente microssomal) como indicador da possível contaminação.

Utilizando a dosagem de fósforo inorgânico liberado enzimaticamente da glucose-6-fosfato, verificou-se que do total de atividade enzimática apenas 10% estava localizado na mitocôndria hepática isolada, sendo que o sobrenadante da centrifugação de $12.600 \times g$ apresentava os 90% de atividade restantes.

A contaminação verificada, apesar de não poder ser desprezada, não está acima da encontrada como limite superior em isolamento de mitocôndrias de fígado de rato na literatura (HEDERGAARD & CANNON, 1979; FLEISCHER & KERUINA, 1974), e provavelmente não poderia responder pela rápida esterólise verificada durante os experimentos com mitocôndrias hepáticas.

principalmente nas avaliações enzimáticas onde foram utilizadas quantidades muito pequenas de proteína mitocondrial.

Assim, os resultados apresentados sugerem que o Enalapril é desesterificado a ácido Enalaprilico em mitocôndrias hepáticas o que justificaria a dissipação parcial do potencial eletroquímico verificada durante a avaliação polarográfica com succinato como substrato.

Esta queda de potencial poderia acontecer pela necessidade de transporte de um derivado dicarboxílico através da membrana mitocondrial externa, que seria possível por um sistema eletroforético.

Outra possibilidade seria de que a biotransformação ocorresse na região intermembrânica mitocondrial, sendo o resultado final o mesmo : uma redução parcial do potencial de membrana mitocondrial.

IV. Discussão final

Conclusões obtidas a partir de um estudo subcelular apresentam restrições ao serem transferidas para a célula como um todo, particularmente quando tentamos interpretar resultados obtidos de uma espécie animal para outra.

Porém, as concordâncias do presente estudo com os efeitos fisiológicos e farmacológicos do uso de Maleato de Enalapril em modelos animais e humanos (PANG et al., 1985; TODD & HEEL, 1986) são pronunciadas, o que levou a uma análise das correlações existentes entre os dados bioquímicos obtidos, e os parâmetros fisio-farmacológicos já conhecidos.

Seguindo a linha de raciocínio esboçada no item III.1., verificamos que não é possível avaliar uma droga nos seus locais de metabolismo e excreção com os dados obtidos de concentração plasmática, principalmente se existem evidências de acúmulo nestas regiões.

Apesar do Enalapril apresentar uma rápida absorção e desesterificação hepática, só haverá um pico de ácido Enalaprilico plasmático após 4 horas de administração oral, sendo o perfil deste pico menos acentuado e mais prolongado que o de Enalapril (que ocorre 1 hora após a ingestão) (ABRAMS et al., 1984).

Com os dados do presente estudo tal comportamento seria

viável, pois o aparecimento de uma estrutura polar e dicarboxilica como o ácido Enalaprilico criaria um problema de cargas intracelulares que só poderia ser resolvido a médio prazo, sendo a saída da droga para a corrente circulatória um processo eletroforético, e não de transporte passivo de uma molécula lipofílica a favor de gradiente de concentração, como no caso da molécula base de Enalapril.

Como podemos verificar na análise da ação da droga sobre os parâmetros polarográficos de mitocôndrias de rim de ratos, a ação inibidora da velocidade do Estado III, RC e ADP/O ocorria mais intensamente a partir de uma concentração de Enalapril de 0,08 mM, que provavelmente seria atingida quando um ser humano normal de 70 kg de peso utilizasse uma dose diária próxima a 80 miligramas de Enalapril, ou com doses menores caso existissem fatores de decréscimo da biotransformação a ácido Enalaprilico.

Este perfil polarográfico, segundo os resultados obtidos na análise das enzimas da cadeia respiratória em mitocôndrias renais rompidas, seria justificado pela inibição significativa da transferência de elétrons entre os Complexos enzimáticos I e II e o Complexo III, fato não observado em mitocôndrias de fígado de rato rompidas.

A grande sensibilidade de mitocôndrias renais à droga seria devida a incapacidade de esterólise do Enalapril, e tal fato ficou evidente com os ensaios da NADH-oxidase e NADH-citocromo c redutase de mitocôndrias renais rompidas, utilizando Maleato de Enalapril solubilizado no sobrenadante da centrifugação de $12.600 \times g$, do isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.

Estes ensaios mostraram o desaparecimento das grandes inibições evidenciadas nos experimentos correspondentes utilizando a droga solubilizada em água.

Por outro lado, os mesmos ensaios referidos acima, combinados com a avaliação da contaminação microsossomal que foi considerada dentro da faixa permissível, sugerem fortemente que a biotransformação de Enalapril em ácido Enalaprilico ocorra em mitocôndrias hepáticas, já que os ensaios de NADH-oxidase e NADH-citocromo c redutase nestas mitocôndrias, utilizando Enalapril solubilizado em água, não mostraram inibição significativa pela droga.

A própria esterólise do Enalapril poderia justificar um decréscimo de potencial eletroquímico da mitocôndria hepática (evidenciada pela estímulo de velocidade do Estado III e redução do ADP:O quando o substrato utilizado era succinato de sódio), com conseqüente redução da carga energética celular, o que tornaria o processo de transferência do ácido Enalaprilico para a corrente circulatória mais demorada.

O decréscimo do potencial eletroquímico seria devido à criação de um derivado dicarboxílico, e conseqüente dissipação parcial do referido potencial, por um transporte eletroforético ou redução direta de cargas na região intermembrânica.

Apenas esta constatação, caso possa ser comprovada em seres humanos, levaria a uma necessária redução das doses empregadas em pacientes hepatopatas ou em insuficiência cardíaca, condições que por si só já reduzem a potencialidade de biotransformação hepática da droga, bem como a uma avaliação mais detalhada das condições hepáticas dos pacientes expostos à droga.

Do ponto de vista renal as deduções acima seriam ainda mais importantes, devido à excreção do Enalapril não transformado ocorrer por esta via, existindo uma combinação de filtração glomerular, secreção tubular da droga, e a concentração do filtrado durante o trânsito tubular renal.

Estas considerações sobre o efeito que insuficiências hepáticas funcionais ou não (como nos quadros de cirrose e insuficiência cardíaca) causariam na biotransformação do Enalapril ganham, após as evidências da sensibilidade de mitocôndrias renais a droga, maior dimensão, pois segundo JOHNSTON et al. (1984) teríamos uma elevação da quantidade de Enalapril que não seria transformado a nível hepático.

Tal fato, elevando a quantidade de Enalapril filtrado ou secretado a nível tubular, iria contribuir para a acentuação dos efeitos sobre o metabolismo renal.

Como a formação da urina, com os consequentes fenômenos de reabsorção e secreção tubular, utiliza 2/3 a 3/4 da energia metabólica renal, inibições tão importantes da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa devem levar obrigatoriamente a uma redução do transporte ativo de sódio e potássio, ao qual estão acoplados os processos de reabsorção de glucose e aminoácidos.

Também a neoglucoqênese renal sofreria uma redução pela queda da disponibilidade energética (GORDON & HARTOG, 1973).

A inibição da glutamato-oxaloacetato aminotransferase por sua vez poderia contribuir para a queda da neoglucoqênese, já que segundo GORDON & HARTOG (1973) succinato e α -cetoglutarato

seriam os precursores mais eficientes para a formação de glucose.

Desta forma poderíamos justificar alguns dos efeitos secundários do uso do Enalapril, como a ocorrência ocasional de glicosúria e tonturas não relacionadas à queda da pressão arterial e a manutenção da excreção de sódio urinário acima do normal, mesmo quando as taxas de aldosterona circulantes voltavam aos níveis anteriores ao tratamento, durante o uso crônico da droga (LODD & HEEL, 1986).

U. Conclusões

O estudo comparativo em mitocôndrias isoladas de fígado e de rim de ratos mostrou que o Enalapril causa, no processo de rostonilação oxidativa, efeitos que seriam relacionados ao substrato utilizado e outros que estariam ligados ao tipo de mitocôndria estudada.

O principal efeito relacionado ao substrato foi uma redução da capacidade de metabolização de glutamato, por inibição de 23% da atividade da glutamato-oxaloacetato aminotransferase, proporcional em ambos os tipos de mitocôndria testados, e que portanto não seria ocasionada pela conversão da droga.

Os efeitos relacionados ao tipo de mitocôndria avaliada seriam ligados à conversão de Enalapril em Enalaprilato, o que ficou evidente pela análise dos resultados obtidos na avaliação da cadeia respiratória de mitocôndrias rompidas.

Os resultados dos ensaios da NADH-oxidase e NADH - citocromo c redutase de mitocôndrias renais rompidas, utilizando Maleato de Enalapril solubilizado em homogenato de fígado de rato, reforçam a hipótese de que a esterólise aconteça, em ratos, em mitocôndrias hepáticas.

Nestes experimentos, o desaparecimento das inibições verificadas com Maleato de Enalapril suspenso em água (abaixo citadas), comprova que a conversão de Enalapril a Enalaprilato é a responsável pelo comportamento diverso da cadeia respiratória

de mitocôndrias hepáticas e renais.

Esta conversão, alterando a estrutura por esterólise do grupamento acetil e criando uma nova carboxila na molécula, impediria que mitocôndrias hepáticas íntegras ou rompidas apresentassem as inibições de atividade da cadeia respiratória observadas em mitocôndrias renais (54% da NADH-oxidase, 77% da NADH - citocromo c redutase e 56% da Succinato - citocromo c redutase), obtidas com a utilização de Maleato de Enalapril solubilizado em água.

A alteração de estrutura por sua vez, seria responsável pelas evidências de diminuição do potencial energético de mitocôndrias hepáticas íntegras, verificadas por polarografia com succinato de sódio como substrato, e que provavelmente também ocorram com glutamato de sódio, sendo porém obscurecidas pela ação da droga sobre a glutamato-aspartato aminotransferase.

VI - Referencias Bibliográficas

- ABRAMS, W.B.; DAVIES, R.O. & GOMEZ, H.J. Clinical pharmacology of enalapril. *J. Hypertension*, 2 (Suppl. 2): 31-36, 1984.
- AIKEN, J.W. & UANE, J.R. The renin-angiotensin system: inhibition of converting enzyme in isolated tissues. *Nature (London)*, 228: 30-34, 1978.
- BEAUNE, J. Comparison of enalapril versus digoxin for congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.*, 53: 22D-25D, 1989.
- CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 212 (1): 383-393, 1955.
- CHEN, D.S.; BRUNNER, H.R.; WAEBER, B. In-vitro response of plasma angiotensin converting enzyme to precursors and active forms of converting enzyme inhibitors. *Curr. Iber. Res.* 35: 253-262, 1984.
- CODY, R.J. Clinical and hemodynamic experience with enalapril in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.*, 55: 36A-40A, 1985.
- LUSHMAN, D.W.; CHEUNG, H.S.; SABO, E.F.; & ONDETTI, M.A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme: Carboxyalcanoyl and mercaptoalcanoyl amino acids. *Biochemistry*, 16: 5484-5491, 1977.
- DAVIES, R.O.; IRVIN, J.D.; KRAMSCH, D.K.; WALKER, J.F.; MONCLUA, F.

- Enalapril worldwide experience. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 27: 23-25, 1984.
- ESTHBROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. In: *METHODS ENZYMOLOGY*, New York, 10: 41-47, 1967.
- FERREIRA, S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 24: 163-169, 1965.
- FLEISCHER, S. & KERUINA, M. Subcellular fractionation of rat liver. In: *METHODS ENZYMOLOGY*, New York, 31: 6-41, 1974.
- FERREIRA, S.H.; BARTELT, D.C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9: 2583-2593, 1970.
- FRANCIS, G.S. & RUCINSKI, E.J. Long-term effects of a once-a-day versus twice-a-day regimen of Enalapril for congestive heart failure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 63: 17D-21D, 1989.
- GAURAS, H. & GAURAS, I. Angiotensin converting enzyme inhibitors: properties and side effects. *Hypertens. Suppl.* 11 (2): 37-41, 1988.
- GOMEZ, H.J.; CIRILLO, U.J.; IRVIN, J.D. Enalapril: a review of human pharmacology. *Drugs* 30 (Suppl. 12): 13-24, 1985.
- GORDON, E.E.G. & HARTOG, M. Gluconeogenesis in renal cortical tubules. *Diabetes* 22: 50-57, 1973.
- GROSS, F. The regulation of aldosterone secretion by the renin-

- angiotensin system under various conditions. *Acta Endocrinol. Scand.* 124: 41-46, 1968.
- HERS, H.G.; BERTHET, J.; BERTET, L.; DUVE, C. Le système hexose-phosphatasique III. Localisation intra-cellulaire des ferments par centrifugation fractionnée. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33: 21-41, 1951.
- HOROVITZ, Z.P.; ANTONACCIO, M.J.; RUBIN, B.; PANASEVITCH, R.E. Influence of various antihypertensive agents on lifespan of renal hypertensive rats. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 7 (Supp. 2): 243S-248S, 1979.
- JOHNSTON, C.I.; JACKSON, B.; McGRATH, B.; MATHEWS, G. ARNOLDA, L. Relationship of antihypertensive effect of enalapril to serum MK-422 levels and angiotensin converting enzyme inhibition. *J. Hypertens.* 1 (Supp. 12): 71-75, 1983.
- JOHNSTON, C.L.; JACKSON, B.J.; LARMOUR, I.; CUBELLA, R. CASLEY, D. Plasma enalapril levels and hormonal effects after short and long-term administration in essential hypertension. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 18 (Suppl. 22): 233S-239S, 1984.
- KJEKSHUS, J. & SWEDBERG, K. Enalapril for congestive heart failure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 63: 26D-36D, 1989.
- LANNOY, I.A.M. & PANG, K.S. Effect of diffusional barriers on drug and metabolic kinetics. *Drug Metab. Dispos.* 15: 51-58, 1987.
- LANQUE, K.F. & SCHOOLWERTH, A.C. Metabolite transport in mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 871-922, 1979.

- LIPKIN, D.P. & POOLE-WILSON, P.H. Treatment of chronic heart failure: a review of recent drug trials. *Br. Med. J.* 291: 993-996, 1985.
- LOWENTHAL, D.I.; IRVIN, J.D.; MERRIL, D.; SARIS, S.; ULHM, E.; GOLDSTEIN, S.; HICHENS, M. KLEIN, L. The effect of renal function on Enalapril kinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 38: 661-666, 1985.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, H.J.; FARR, A.C. RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- MASON, T.L.; POYTON, R.O.; WHARTON, D.C.; SCHATZ, G. Cytochrome c oxidase from bakers yeast. isolation and properties. *J. Biol. Chem.* 225: 1346-1354, 1973.
- MASSEY, T.H. & FESSLER, D.C. Substrate binding properties of converting enzyme using a series of p-nitrophenyl-alanyl derivatives of angiotensin I. *Biochemistry* 15: 4906-4912, 1976.
- MCGRATH, B.P.; ARNULDA, L.; MATTHEWS, P.G.; JACKSON, B.; JENNINGS, G.; FLAT, H.; JOHNSTON, C.I. Controlled trial of enalapril in congestive heart failure. *Br. Heart J.* 54: 405-414, 1985.
- MEIJER, A. I.; BROUWER, D.J.; REIJNGOUD, D.J.; HOEK, J.B.; TAGER, J.M. Transport of glutamate in rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* 283: 421-429, 1972.
- MONCLOH, F.; GRUMOUSKY, J.A.; WALKER, J.F.; DAUVES, R.O. Enalapril in hypertension and congestive heart failure. Overall review

- of efficacy and safety. *Drugs*, 30 (Suppl. 1): 82-89, 1985.
- NEDERGAARD, J. & CANNON, B. Overview - preparation and properties of mitochondria from different sources. In: *METHODS ENZYMOLOGY*. New York, 15: 3-29, 1979.
- ONDETTI, E.C.; WILLIAMS, H.L.; SABO, E.F.; PLUSCEC, J.; MEAVER, E.R.; KOCY, O. Angiotensin converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. *Biochemistry*, 10: 4033-4039, 1971.
- ONDETTI, E.C.; RUBIN, B.; CUSHMAN, D.W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science (New York)*, 196: 441-444, 1977.
- PANG, K.S.; CHERRY, W.F.; ULM, E.H. Disposition of enalapril in the perfused rat intestine-liver preparation: absorption, metabolism and first pass effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232: 788-795, 1985.
- PEACH, M.J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiol. Rev.*, 57: 313-370, 1977.
- RADZIWILL, R.D.; STUZHANN, M.; HILGENFELDT, U.; HACKENTHAL, E. Converting enzyme inhibitor-induced changes of plasma angiotensinogen concentration in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 122: 59-64, 1986.
- REHNS, G.P.; BAUER, J.H.; GADDY, P. Use of the converting enzyme inhibitor Enalapril in renovascular hypertension. Effect on

- blood pressure, renal function and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* (Dallas), 8: 290-297, 1986.
- REGOLI, D.; PARK, W.K.; RIOUX, F. Pharmacology of angiotensin. *Pharmacol. Rev.* 26: 69-123, 1974.
- REITMAN, S. & FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and pyruvic transaminases. *Amer. J. Clin. Pathol.* 28: 56-63, 1957.
- SINGER, T.P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenase. In: *METHODS OF BIOCHEMICAL ANALYSIS*. New York, 22: 123-175, 1974.
- SOMLO, M. Induction des lactico-cytochrome c reductase (D- et L-) de la levure aerobie par les lactates (D- et L-). *Biochim. Biophys. Acta*, 27: 183-201, 1965.
- STRECKER, H.J. L-glutamic dehydrogenase from liver. In: *METHODS ENZYMOLOGY*. New York, 2: 220-221, 1955.
- SUMNER, J.B. A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* (New York), 100: 413-414, 1944.
- THIND, G.S.; JOHNSON, A.; BHATNAGAR, D.; HENKEL, T.W. A parallel study of enalapril and captopril and 1 year of experience with enalapril treatment in moderate-to-severe essential hypertension. *Am. Heart J.* 109: 852-858, 1985.
- TOCCO, D.J.; DELUNA, F.A.; DUNCAN, A.E.W.; VASSIL, T.C.; ULM, E.H. The physiological disposition and metabolism of enalapril maleate in laboratory animals. *Drug Metab. Dispos.* 10: 15-19,

1982.

TODD,P.A. & HEEL,R.C. Enalapril - a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs*, 31: 198-248, 1986.

UNGER,T; GANTEN,D; LANG,R.E.; SCHOLKENS,B.A. Persistent tissue converting enzyme inhibition following chronic treatment with Hoe 498 and MK 421. in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc. Pharmacol*, 2: 36-41. 1985.

ULM,E.H. Enalapril maleate (MK-421). a potent nonsulphydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor; absorption, disposition, and metabolism in man. *Drug Metab. Rev.*, 14: 99-110, 1983.

VETERANS ADMINISTRATION COOPERATIVE STUDY GROUP ON ANTIHYPERTENSIVE AGENTS. Effects of treatment on morbidity in hypertension: results in patients with diastolic blood pressures averaging 115 through 129 mmHg. *JAMA*, 202: 1028-1034, 1967.

---,---. : Results in patients with diastolic blood pressures averaging 90 through 114 mmHg. *JAMA*, 213: 1143-1152, 1970.

VLASSES,P.H.; LARIJANI,G.E.; CONNER,D.P. Enalapril, a nonsulphydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Clin. Pharmacol.* 4: 27-40. 1985.

VOSS,D.O.; LANPELLO,A.P.; BACILA,M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem.*

- Biochem. Res. Commun., 4: 48-51, 1961.
- VOSS, D.O.; COOLES, C.J.; BACILA, M. A new oxygen electrode model for the polarography of cellular and mitochondrial respiration. Anal. Biochem., 6: 211-222, 1963.
- WESTFALL, D.P. Tratamento farmacológico da hipertensão. In: CRAIG, C.R. & STITZEL, R.E. eds. Farmacologia Moderna. São Paulo, Rocca, 1986. p.320-350.
- WILHELMSEN, L.; BERGLUND, G.; SANHERSTED, R.; HANSSON, L.; ANDERSSON, O.; SIEVERTSSON, R.; WIKSTRAND, J. Effect of treatment of hypertension in the primary preventive trial. Br. J. Clin. Pharmacol., 7 (Suppl. 2): 261S-265S, 1979.
- WILLIAMSON, J.R. & CORKEY, B.E. Assay of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. In: METHODS ENZYMOLOGY. New York, 13: 434-513, 1969.
- WILLIAMSON, J.R. & CORKEY, B.E. Assay of citric acid cycle intermediates and related compounds. In: METHODS ENZYMOLOGY. New York, 55: 200-222, 1979.
- YASUJIMA, M.; ABE, K.; TANNO, M.; KASHI, Y.; TAJIMA, J.; SEINO, M.; UHIBA, S.; SATO, K.; GOTO, T. Antihypertensive effect of MK 421 in rats: role of the renal kallikrein-kinin system. Hypertension (Dallas), 6: 229-235, 1984.
- YONETANI, T. & RAY, G.S. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome oxidase. J. Biol. Chem., 240 (1965): 3392-3398, 1965.