

ORIETA SILVEIRA

EFEITO DO VERAPAMIL SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, visando a obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

**CURITIBA
1984**

Tese orientada pelo professor
Dr. *ANNIBAL DE PAIVA CAMPELLO*

*À memória de meu pai
e a minha mãe pelo
estímulo ao desenvolv
vimento intelectual.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. *ANNIBAL DE PAIVA CAMPELLO* pelo apoio e orientação que tornaram possível a realização desta tese.

À Professora Dra. *MARIA LUCIA WAMBIER KLÜPPEL*, em especial, pela ajuda, pelas sugestões e pela revisão desta tese.

Aos Professores Dr. *AGUINALDO NASCIMENTO* e Dra. *GLACI ZANCAN* pelas sugestões e revisão deste trabalho.

Aos Professores *VANIA BEATRIZ VIEIRA DE SOUZA* e *ROBIN MARIO HOFMEISTER* do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, pela elaboração das micrografias eletrônicas.

Ao Professor *HELICIO RESENDE BORBA* pela elaboração da curva padrão para determinação do potencial de membrana e pela extração, purificação e determinação da atividade da F_1 -ATPase.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, Professores e Amigos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelo incentivo.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPr., CNPq e FINEP pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	1
1.2. Alguns aspectos farmacológicos	1
1.3. Análise de experimentos que abordam aspectos bio- químicos em mitocôndrias isoladas	3
1.4. Objetivos deste trabalho	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. Materiais	6
2.1.1. Isolamento de mitocôndrias de coração para determinação do consumo de oxigênio por po- larografia e manometria	6
2.1.2. Obtenção de mitocôndrias rompidas para de- terminação de atividades enzimáticas	6
2.1.3. Isolamento de partículas com atividade de NADH-oxidase	6
2.1.4. Isolamento de partículas transportadoras de elétrons de mitocôndrias de coração (EP ₁) ..	7
2.1.5. Isolamento da NADH-citocromo c redutase ...	7
2.1.6. Isolamento da desidrogenase succínica	7
2.1.7. Isolamento do complexo succinato-CoQ reduta se.....	7
2.1.8. Isolamento da malato desidrogenase mitocon- drial	7
2.1.9. Preparação de partículas submitocondriais..	8
2.1.10. Isolamento do segmento NADH-CoQ redutase da cadeia respiratória	8
2.1.11. Isolamento e purificação de F ₁ -ATPase de mi- tocôndrias de coração de bovino	8
2.1.12. Obtenção do citocromo c reduzido	8
2.1.13. Preparo do chelex 100	8
2.1.14. Reagentes	9
2.2. Métodos Analíticos	
2.2.1. Determinação do consumo de oxigênio e fosfo rilação oxidativa por polarografia	9
2.2.2. Determinação do consumo de oxigênio por ma- nometria	9

2.2.3.	Determinações da concentração proteica	10
2.2.4.	Determinação da atividade de NADH-oxidase...	10
2.2.5.	Determinação da atividade de NADH-desidrogenase	11
2.2.6.	Determinação da atividade de NADH-citocromo c redutase	11
2.2.7.	Determinação da atividade de NADH-CoQ redutase	12
2.2.8.	Determinação da atividade de succinato desidrogenase	12
2.2.9.	Determinação da atividade de succinato citocromo c redutase	13
2.2.10.	Determinação da atividade de succinato -CoQ redutase	13
2.2.11.	Determinação da atividade de citocromo c oxidase	14
2.2.12.	Determinação da atividade da desidrogenase málica mitocondrial	14
2.2.13.	Determinação dos níveis de oxaloacetato ...	15
2.2.14.	Determinação da atividade de aspartato aminotransferase	15
2.2.15.	Determinação da atividade da ATPase	16
2.2.16.	Determinação do potencial de membrana	18
2.2.17.	Determinação do "swelling" mitocondrial induzido por valinomicina-K ⁺	18
2.2.18.	Determinação espectrofotométrica do transporte de Ca ⁺⁺ mitocondrial	20
2.2.19.	Microscopia eletrônica	21
2.2.20.	Efeito do solvente	21

3. RESULTADOS

3.1.	Efeito do verapamil sobre a respiração de mitocôndrias intactas isoladas de coração	22
3.2.	Efeito do verapamil sobre o consumo de oxigênio, fosforilação oxidativa e controle respiratório em mitocôndrias isoladas de coração.....	28
3.3.	Efeito sobre as atividades enzimáticas NAD ⁺ dependentes	30
3.3.1.	Efeito sobre a atividade da NADH-oxidase...	31

3.3.2.	Efeito do verapamil sobre a atividade da NADH-citocromo c redutase	31
3.3.3.	Efeito do verapamil sobre a atividade da NADH-ferricianeto redutase	31
3.3.4.	Efeito do verapamil sobre a atividade da NADH-CoQ redutase	34
3.4.	Efeito sobre a atividade enzimática da succinato desidrogenase purificada	34
3.4.1.	Efeito do verapamil sobre a atividade da succinato desidrogenase purificada.....	37
3.4.2.	Efeito do verapamil sobre as atividades enzimáticas succinato desidrogenase e succinato citocromo c redutase	37
3.4.3.	Efeito do verapamil sobre a atividade da succinato coenzima Q redutase	37
3.5.	Efeito do verapamil sobre a atividade da citocromo c oxidase	37
3.6.	Efeito do verapamil sobre a atividade ATPásica....	40
3.7.	Efeito do verapamil sobre o potencial de membrana mitocondrial	43
3.8.	Efeito do verapamil sobre a fluidez da membrana mitocondrial interna	46
3.9.	Efeito do verapamil sobre o transporte de cálcio mitocondrial	48
3.10.	Efeito do verapamil sobre a estrutura mitocondrial..	52
4.	DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÕES	58
5.	BIBLIOGRAFIA	64

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estrutura química do verapamil	1
2	Variação espectral da safranina induzida pelo potencial de difusão do potássio	19
3	Efeito do verapamil sobre a oxidação do L-glutamato em mitocôndrias de coração	23
4	Efeito do verapamil sobre a oxidação do malato-piruvato em mitocôndrias de coração	24
5	Efeito de verapamil sobre a oxidação do α -cetoglutarato em mitocôndrias de coração	25
6	Efeito do verapamil sobre a oxidação do succinato em mitocôndrias de coração	26
7	Efeito do verapamil sobre a oxidação do α -cetoglutarato em mitocôndrias de coração	27
8	Efeito do azul de metileno no restabelecimento da atividade das partículas EP ₁ (NADH-oxidase) inibidas por verapamil	33
9	Efeito do verapamil sobre a atividade ATPásica mitocondrial	42
10	Efeito do verapamil sobre o potencial de membrana mitocondrial	45
11	Efeito do verapamil sobre o "swelling" mitocondrial induzido por valinomicina-K ⁺	47
12	Efeito do verapamil sobre o transporte mitocondrial de cálcio	51
13	Micrografias de mitocôndrias de coração de rato usadas como controle	55
14	Efeito do verapamil sobre a morfologia de mitocôndrias desenergizadas	56
15	Efeito do verapamil sobre a morfologia de mitocôndrias energizadas com α -cetoglutarato,	57

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
I	Efeito do verapamil sobre a velocidade respiratória e fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de coração	29
II	Efeito do verapamil sobre a atividade NADH-oxidase em partículas submitocondriais	32
III	Efeito do verapamil sobre a atividade NADH-oxidase em mitocôndrias rompidas por congelamento	32
IV	Efeito do verapamil sobre a atividade NADH -citocromo c redutase	35
V	Efeito do verapamil sobre a atividade NADH ferri-cianeto redutase	35
VI	Efeito do verapamil sobre a atividade NADH-CoQ re- dutase	36
VII	Efeito do verapamil sobre a atividade da succina- to desidrogenase	37
VIII	Efeito do verapamil sobre os níveis de oxaloaceta- to	39
IX	Efeito do verapamil sobre a atividade da malato desidrogenase e aspartato amino transferase	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	-	adenosina 5'-difosfato
AM	-	azul de metileno
BSA	-	sêro albumina bovina
α KG	-	α -cetogluturato
ATP	-	adenosina 5' trifosfato
ATPase	-	adenosina 5' trifosfatase
CP	-	creatina fosfato
CoQ	-	coenzima Q
DCIP	-	2,6-dicloro-fenol-indofenol
DMF	-	N,N-dimetilformamida
DNP	-	2,4-dinitrofenol
EDTA	-	ácido etileno diamino tetra acético
FCCP	-	carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona
HEPES	-	N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-ácido etanosulfônico
LDH	-	lactato desidrogenase
MDH	-	malato desidrogenase
NAD ⁺	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida
NADH cit c	-	NADH citocromo c
OAA	-	oxaloacetato
PEP	-	fosfoenol piruvato
Pi	-	fosfato inorgânico
PK	-	piruvato quinase
PMS	-	fenazina metassulfato
RR	-	vermelho de rutênio
TCA	-	ácido tricloacético
Tris	-	Tris (hidroximetil) aminometano
VERA	-	verapamil
V. Resp.	-	velocidade respiratória

RESUMO

Estudos sobre o efeito do verapamil em mitocôndrias isoladas de coração, foram realizados, com o objetivo de determinar a sua interferência no metabolismo mitocondrial. Esses estudos revelaram a existência de vários efeitos tanto a nível de membrana mitocondrial, como a nível enzimático.

Nas condições utilizadas, verificou-se que verapamil promoveu os seguintes efeitos: a) inibição na respiração de substratos NAD^+ -dependentes e estímulo na respiração do succinato; b) inibição da velocidade respiratória no estado III e estímulo daquela no estado IV; c) alteração das relações RC e ADP/O; d) inibição das atividades de NADH-oxidase, de NADH-citocromo c redutase e de NADH-CoQ redutase, sem afetar as demais atividades enzimáticas ligadas à cadeia de transporte de elétrons; e) estímulo da atividade ATPásica de mitocôndrias intactas e inibição da atividade ATPásica de mitocôndrias rompidas; f) diminuição dos níveis de oxaloacetato na respiração estimulada pelo succinato; g) colapso do potencial de membrana; h) inibição da velocidade de "swelling" induzido por valinomicina- K^+ ; i) inibição do influxo e do efluxo de Ca^{2+} ; j) alteração da morfologia mitocondrial.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Verapamil (Figura 1) é um derivado da papaverina e foi sintetizado nos laboratórios da Knoll A.G. (Alemanha). Foi introduzido no arsenal terapêutico por Haas e Hartfelder (36), em 1962, como vasodilatador coronariano e atualmente está sendo usado como antiarrítmico (12).

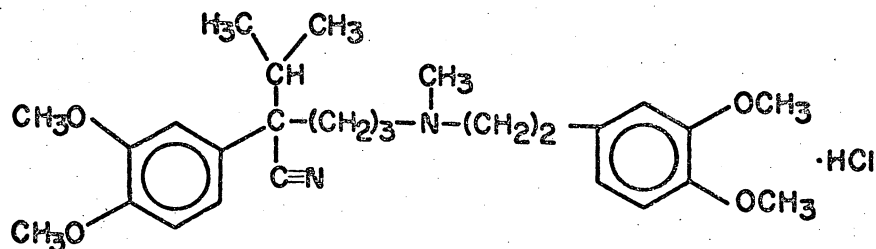


FIGURA 1 - Estrutura química do verapamil.

Cloridrato de: 5-[N-(3,4-dimetoxifenetil, metilamino)-2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropilvaleronitrilo.

Sinônimos: Isoptin, Iproveratril

Nome comercial: Dilacorón

1.2. Alguns aspectos farmacológicos

O desenvolvimento de um agente antiarrítmico eficiente e seguro, continua a ser uma meta significativa e desejável na investigação terapêutica (110).

Os agentes antiarrítmicos tem sido divididos em 4 classes de acordo com seus efeitos sobre o potencial de ação do músculo cardíaco (82). Verapamil está incluído na IV classe, cujo efeito antiarrítmico está relacionado à sua ação como antagonista de cálcio. A sua ação farmacológica como droga antagonista do cálcio ou droga bloqueadora de íons cálcio em célula muscular cardíaca tem sido amplamente divulgada (26,62,75,76,78).

A redução da demanda de O₂ pelo miocárdio na presença de verapamil está relacionada, nestes casos, com uma diminuição correspondente na velocidade de contração, força de contração, volume por batimento ou frequência cardíaca. Algumas vezes, o coração é aliviado adicionalmente pelos efeitos vasodilatadores de verapamil na circulação periférica.

Tem sido demonstrado em ensaios com VERA, que este não

diminua em nenhum caso o consumo de O_2 do músculo papilar isolado em repouso de coelhos, cobaias e macacos, demonstrando que o metabolismo oxidativo do miocárdio em repouso não é influenciado (26). O aspecto decisivo é o controle de atividade do metabolismo oxidativo, por intermédio de uma diminuição da atividade mecânica. Portanto, verapamil no músculo papilar isolado, pode produzir qualquer grau desejado da dinâmica cardíaca, dependendo da dosagem utilizada. Também em coração *in situ* de animais de sangue quente varia a escala de efeitos inibidores, desde uma ligeira diminuição de contratilidade e do consumo de O_2 , até insuficiências miocárdicas severas com inibição marcada de atividade do metabolismo oxidativo, efeitos estes dependentes da dose aplicada ao animal (22 a 29).

De acordo com Nayler e Krikler (78) o efeito do verapamil é devido a sua habilidade de interferir no influxo de íons Ca^{++} através da membrana da célula cardíaca. A droga se liga as lipoproteínas da superfície interna do plasmalema, inibindo este étereo especificamente a ATPase ativada por Ca^{++} (67, 74), reduzindo a resistência vascular coronariana (76) e aumentando a eficiência cardíaca (76, 79).

A conversão eletromecânica consiste na ativação da ATPase miofibrilar por íons Ca^{++} ; no momento da excitação eles passam do espaço extracelular ou de depósitos vizinhos à membrana, em maior quantidade ao interior da fibra, produzindo por este mecanismo, nas miofibrilas a decomposição de ATP com consequente estímulo da contração. A intensidade do consumo de ATP e o desenvolvimento mecânico da tensão no sistema contrátil é, portanto, dependente quantitativamente do cálcio (24).

O efeito inibitório do VERA no transporte do Ca^{++} é restrito ao sarcolema, (74, 79), não interferindo na contração em músculo esquelético (77).

Numerosos trabalhos tem sido realizados com verapamil comprovando seu efeito protetor sobre o miocárdio, principalmente na conservação da energia do ATP e da fosfocreatina, em célula cardíaca.

A queda de fosfatos altamente energéticos induzida por cálcio é o ponto crucial na etiologia da necrose das células cardíacas, podendo ser produzida por uma série de agentes cardiotoxícos, altas doses de catecolaminas, de vitamina D, de gli

cosídeos cardíacos, ou em condições de extremo "stress" físico e emocional ou ainda devido a hiperatividade mecânica (25, 26).

Este tipo de necrose de células de miocárdio produzidas por catecolaminas beta-adrenérgicas como isoproterenol, foram descritas pela primeira vez por Rona e colaboradores (96). Somente há alguns anos foi demonstrado que esses efeitos cardiotóxicos são mediados por íons Ca^{++} (24, 25, 29, 41, 42, 43, 96). Este tipo de experimento tem servido de modelo para o estudo de fatores não coronariogênicos envolvidos na necrotização cardíaca.

Uma das condições sobre a qual os estudos com verapamil tem sido realizados em animais de laboratório consiste em induzir hipoxia ou isquemia do miocárdio com isoproterenol ou outros agentes cardiotóxicos. O verapamil tem sido aplicado simultaneamente com o isoproterenol e a incorporação de $^{45}Ca^{++}$ tem-se mostrado inibida (28). As mesmas doses que tem impedido a incorporação cardíaca de cálcio radioativo, também tem sido eficientes na prevenção da decomposição de ATP e CP, ao mesmo tempo que tem impedido a lesão tissular induzida por isoproterenol (22, 25, 26, 28, 29, 42, 43, 73).

1.3. Análise de experimentos que abordam aspectos bioquímicos em mitocôndrias isoladas

Hass e Hartfelder (36), verificaram a ação do verapamil sobre a respiração em fatias e em mitocôndrias isoladas de fígado de rato obtendo alto grau de inibição na presença de succinato. Concentrações de 10^{-4} e $10^{-3}M$ inibiram o consumo de oxigênio em fatias, enquanto que em mitocôndrias somente com concentrações de $10^{-3}M$ houve inibição ($\pm 90\%$). A concentração de $10^{-3}M$ também inibiu significativamente a atividade da amino oxidase em homogenado de cérebro. Não houve modificação da respiração em relação ao normal, quando os fígados foram retirados, após a administração oral de verapamil (20 mg/kg).

Rodrigues et al (95) obtiveram inibição de 15% da respiração mitocondrial na ausência de substrato e de 25% da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de coração de coelhos, após a administração intravenosa de verapamil (0,7 mg/kg). A inibição 15%, observada na ausência de substrato adicionado, foi idêntica àquela obtida quando o αKG foi usado como substrato. O

succinato ativou em 30% a respiração aeróbica mitocondrial no grupo injetado com verapamil.

Clements e colaboradores (8) obtiveram RC e ADP/O semelhantes aos controles quando utilizaram mitocôndrias isoladas de coração de cães pré-tratados com verapamil ou quando os corações foram submetidos a perfusão em solução salina ou em meio contendo verapamil 0,2 mg ou 0,8 mg/kg, após terem sido submetidos a oclusão coronariana temporária. Contudo a velocidade no estado III da respiração mostrou inibição no grupo controle (não isquêmico), tratado com verapamil. O grau de inibição foi maior no grupo controle tratado com 0,8 mg de VERA/kg (17% de inibição na presença de glutamato e 13,2% na presença de succinato).

Nayler e colaboradores (72, 73), obtiveram relações ADP/O; RC; produção de ATP e CP e concentração de Ca^{2+} em níveis normais em mitocôndrias de coração de animais pré tratados com verapamil (2 mg/kg injetada durante 4 a 5 dias), submetidos a isquemia e reperfusão. Resultados semelhantes foram obtidos por Ferrari et al (21).

Vaghy et al. (120) demonstraram em mitocôndrias isoladas de coração de coelho, que verapamil, em concentrações de 200 a 800 μ M, inibe a velocidade de respiração do estado III, estimula aquela do estado IV e altera a relação ADP/O quando se usa meio de reação contendo sacarose 250 mM e tampão fosfato 5 mM. Quando o meio era constituído de KCl 150 mM e tampão fosfato 2 mM foram obtidos valores normais de ADP/O e RC, na presença de 200 a 400 μ M de verapamil. Aumentando a concentração de fosfato inorgânico para 5 mM em meio de KCl, ocorreu "swelling" mitocondrial, e a adição de baixas concentrações de verapamil (25 a 200 μ M) protegeu a mitocôndria, impedindo o "swelling" provocado pelo Pi.

Kohda e Gemba (53) verificaram que verapamil altera a permeabilidade da membrana mitocondrial para Pi e acetato.

Trabalhos realizados em nossos laboratórios com verapamil (30, 31, 52, 99, 107, 124), utilizando mitocôndrias isoladas de coração de rato, sistemas enzimáticos e enzimas mitocondriais purificadas, demonstraram que esta droga, bem como outros antiarítmicos, afetam o metabolismo mitocondrial em vários aspectos.

1.4. Objetivos deste Trabalho

A maioria dos trabalhos descritos na literatura, demonstram a ação protetora do verapamil na conservação de energia, e uma maior disponibilidade de oxigênio para o miocárdio, através da diminuição do trabalho mecânico cardíaco. Sendo a mitocôndria a organela responsável pela síntese de energia, qualquer alteração bioquímica ou fisiológica na respiração, na fosforilação oxidativa e na concentração iônica leva a alterações metabólicas.

Apesar dos estudos clínicos indicarem um marcado efeito terapêutico deste medicamento em doenças artério coronarianas, o seu mecanismo de ação não está ainda elucidado.

Lüllmann et al. (65) em 1979 comprovaram o acúmulo do verapamil no citosol. Este resultado indica que a mitocôndria pode sofrer diretamente a ação do antiarrítmico.

O objetivo deste trabalho foi investigar mais profundamente os efeitos deste antiarrítmico sobre alguns aspectos do metabolismo mitocondrial, a fim de auxiliar na elucidação do mecanismo de ação deste medicamento, cuja ação farmacológica está interligada ao sistema de conservação de energia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. Isolamento de mitocôndrias de coração para determinação do consumo de oxigênio por polarografia e manometria.

Mitocôndrias de coração de rato foram isoladas empregando-se o método descrito por Voss et al. (125), usando meio de extração contendo: D-manitol 0,2M, sacarose 0,075M, EDTA 0,2mM, e tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4.

Ratos brancos Wistar foram decapitados com auxílio de guilhotina e seus corações imediatamente removidos, lavados, dissecados e picados em meio de extração, à temperatura de 0-4°C. A seguir, foram homogeneizados em homogeneizador de Van Potter Elvehjem. O homogeneizado obtido foi centrifugado em centrífuga refrigerada à 0°C (SORVALL SUPERSPEED MOD. RC-2B), ou centrífuga (BECKMANN MODELO J. 21B), a 800 x g, durante 10 minutos, a fim de eliminar células intactas, membranas e núcleos. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi centrifugado a 7.800 x g durante 10 minutos. O sedimento foi suspenso em meio de extração e centrifugado a 5.000 x g, por 10 minutos. As mitocôndrias sedimentadas foram ressuspensas em meio de extração suficiente para dar aproximadamente 10 mg de proteína por ml, conservadas a 0°C e usadas imediatamente.

2.1.2. Obtenção de mitocôndrias rompidas para determinação de atividades enzimáticas.

Mitocôndrias de coração de rato foram isoladas pelo método de Voss et al. (125), divididas em pequenas alíquotas e congeladas à -30°C, durante um período nunca superior a 5 dias. No momento do uso, as frações foram descongeladas à temperatura ambiente e conservadas à 0°C.

2.1.3. Isolamento de partículas com atividade de NADH - oxidase (E.C. 1.6.99.3.).

As partículas com atividade de NADH-oxidase foram isoladas pelo método descrito por Kielley e Kielley (50). Mitocôndrias de 40g de fígado de rato, isoladas pelo método de Voss et

al (125), foram suspensas em 55 ml de tampão fosfato 0,003M, pH 7,5 e desintegradas durante 2 minutos, a 0°C em homogeneizador Sorvall Omni-mixer com micro adaptador, (24.000 rpm). As partículas maiores foram removidas por centrifugação em ultracentrífuga Spinco modelo L a 20.000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 105.000 x g durante 30 minutos e o precipitado foi suspenso em 2 ml de tampão fosfato 0,003M, pH 7,5.

A atividade de NADH-oxidase foi determinada polarograficamente em eletródio de oxigênio.

2.1.4. Isolamento de partículas transportadoras de elétrons de mitocôndrias de coração (EP₁).

As partículas EP₁ foram isoladas pelo método descrito por Kopaczik (54), a partir de mitocôndrias de coração de boi, isoladas pelo método de Crane et al. (11).

2.1.5. Isolamento de NADH-citocromo C redutase (EC 1.6.2.1) Complexo I-III da cadeia respiratória.

O complexo enzimático NADH-citocromo C redutase foi isolado pelo método descrito por Hatefi e Rieski (38), a partir de mitocôndrias isoladas pelo método de Crane et al. (11).

2.1.6. Isolamento da desidrogenase succínica (EC 1.3.99.1)

A desidrogenase succínica foi isolada e purificada pelo método descrito por Singer (108), a partir de mitocôndrias de coração de boi, isoladas pelo método de Crane et al. (11).

2.1.7. Isolamento do complexo succinato-CoQ redutase (complexo II) da cadeia respiratória.

O complexo succinato-CoQ-redutase foi isolado pelo método descrito por Ziegler e Rieske (132), a partir de mitocôndrias de coração de boi, isoladas pelo método de Crane et al. (11).

2.1.8. Isolamento da malato desidrogenase mitocondrial (EC 1.1.1.37).

A malato desidrogenase mitocondrial purificada foi obtida pelo método descrito por Englard e Siegel (18), a partir de

mitocôndrias de coração de bovino isoladas pelo método de Crane et al. (11).

2.1.9. Preparação de partículas submitocondriais.

Partículas submitocondriais foram obtidas seguindo o procedimento descrito por Penin et al. (84), a partir de mitocôndrias de coração de boi, isoladas pelo método de Low e Valin (63).

2.1.10. Isolamento do segmento NADH-coenzima Q redutase (complexo I) da cadeia respiratória.

A NADH-CoQ redutase foi isolada e purificada pelo método de Sanadi et al. (101), a partir de mitocôndrias de coração bovino isoladas pelo método descrito por Crane et al. (11).

2.1.11. Isolamento e purificação de F_1 -ATPase de mitocôndrias de coração de bovino.

F_1 -ATPase foi isolada e purificada de partículas submitocondriais EDTA, obtidas de mitocôndrias de coração de boi, seguindo o método de Lee e Ernster (56).

2.1.12. Obtenção do citocromo c reduzido.

O citocromo c de coração de cavalo foi reduzido por uma pequena porção de ditionite e o ferricitocromo c foi separado do excesso de ditionite e de seus produtos de reação por passagem através de gel de Sephadex G 25, de acordo com Yonetani e Ray (129). O citocromo c "reduzido" preparado desta maneira con tinha menos de 5% de proteína oxidada.

2.1.13. Preparo do Chelex.

Preparação do Chelex 100 (K^+) (comunicação pessoal do Dr. Gomez-Puyou).

5 a 10 g de Chelex 100, foram suspensos em 100 ml de HCl 1 N. 12 horas após, o material foi filtrado à vácuo e lavado com 200 ml de água destilada, coletado com espátula e transferido para um copo de becker. O pH foi ajustado para 7,4 com Tris-

base, fazendo-se nova filtração a vácuo até à secura. O material obtido foi coletado e armazenado em frasco de plástico, para posterior utilização.

2.1.14. Reagentes

Verapamil foi fornecido pelos laboratórios da Knoll G.A. NADH, NAD⁺, ADP, ATP, piruvato quinase, ferricitocromo C, 2-4 DNP, coenzima Q₆, DMF, BSA, HEPES, safranina, lactato desidrogenase, colato, desoxicolato, RR, todos de origem industrial Sigma Chemical CO. Azida sódica, KCN, NaCN, PMS, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ditionite, Tris, cloreto de cálcio, cloreto de potássio foram adquiridos da Merck. Chelex (Bio RAD) e AH Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals). Todas as demais substâncias utilizadas foram do mais alto grau de pureza disponível.

2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.2.1. Determinação do consumo de oxigênio e fosforilação oxidativa por polarografia.

As determinações polarográficas do consumo de oxigênio e fosforilação oxidativa foram realizadas em eletródio de oxigênio descrito por Voss et al. (126), à temperatura de 27°C. A velocidade respiratória foi calculada em $\mu\text{M O}_2$ por segundo. A solubilidade do oxigênio foi tomada como sendo igual a 240 μM , segundo Estabrook (19).

A relação P/O foi determinada como ADP/O, de acordo com o método descrito por Chance e Williams (7), para o ensaio de fosforilação oxidativa, considerando a concentração de átomos de oxigênio consumidos durante o estado ativo (estado III) da respiração e a concentração molar de ADP adicionado ao sistema.

O coeficiente de controle respiratório (RC) foi determinado pela relação entre a velocidade da respiração na presença de ADP (estado III) e a velocidade após o consumo de ADP (estado IV).

As experiências foram desenvolvidas em um volume de 2,4 ml, utilizando-se o meio de reação de Voss et al. (125) que continha: tampão fosfato 5,0 mM; Tris 0,01 M, KCl 0,01 M; EDTA 0,2 mM; manitol 0,25 M, pH final ajustado com HCl.

2.2.2. Determinação do consumo de oxigênio por manometria.

As determinações manométricas do consumo de oxigênio

foram feitas pela técnica convencional de Warburg (118). O sistema de reação continha: Tris 0,01 M; KCl 0,01 M; EDTA 0,2 mM; tampão fosfato 3,5 mM, 100 μ moles de substrato, 5 mg de proteína mitocondrial, pH final 7,4 num volume total de 2,7 ml e 0,15 ml de KOH no compartimento central. O sistema foi incubado a 37°C com \pm 100 agitações por minuto.

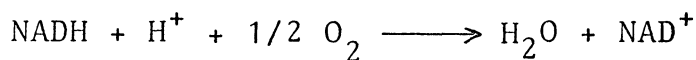
Os resultados foram expressos em microlitros de oxigênio consumido nos intervalos de tempo.

2.2.3. Determinações da concentração de proteína

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Lowry et al. (64), ou pelo método do biureto, descrito por Gornall et al. (34). Em ambos os casos foi usada soro albumina bovina como padrão.

2.2.4. Determinação da atividade de NADH-oxidase (NADH: oxigênio oxidoreductase. E.C. 1.6.99.3).

Para a determinação da atividade da NADH oxidase empregou-se três tipos diferentes de preparações enzimáticas e acompanhou-se o consumo de oxigênio ou a reoxidação do NADH, de acordo com a seguinte equação:



a) A atividade enzimática da NADH-oxidase de partículas submitocondriais isoladas pelo método de Kielley e Kielley (50) foi medida em eletrodo de oxigênio, usando o seguinte meio: tampão fosfato 0,05 M pH 7,5; NADH 0,330 mM; NADH oxidase (2,4 mg de proteína), num volume final de 2,4 ml. A reação foi iniciada pela adição do NADH.

Os resultados foram calculados em μMO_2 consumido por segundo.

b) A atividade enzimática da NADH-oxidase em partículas EP₁ da membrana mitocondrial interna (54), foi determinada polarograficamente em eletrodo de oxigênio usando meio de reação de Voss et al. (125) e enzima (2,0 mg de proteína). A reação foi iniciada pela adição de NADH + H⁺ 0,330 mM. Volume final 2,4 ml. Azul de metileno 0,04 mM.

A velocidade da reação foi expressa em $\mu\text{M O}_2$ consumido por segundo.

c) Em mitocôndrias rompidas por congelamento esta atividade foi determinada espectrofotometricamente, seguindo o método de Singer (108). As leituras foram executadas em espectrofotômetro Beckman, Modelo DB, acoplado a um registrador. O meio de reação continha: tampão fosfato 80 mM, pH 7,4; EDTA 50 μ M NADH 0,133 mM. A reação foi iniciada pela adição da enzima (0,34 mg de proteína). Temperatura 28°C. A velocidade de reação foi calculada

da, utilizando-se para o NADH um coeficiente de extinção molar de $6.220 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (93).

2.2.5. Determinação da atividade de NADH-desidrogenase (NADH: ferricianeto oxidorreductase.E.C. 1.6.99.3).

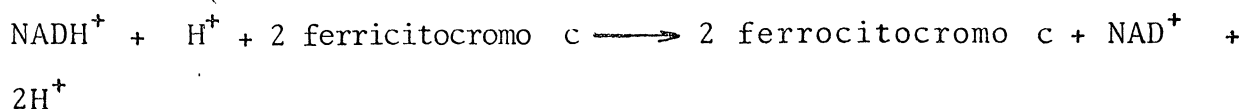
Esta atividade enzimática foi determinada usando mitocondrias rompidas por congelamento, de acordo com o método de Singer (108), utilizando várias concentrações de ferricianeto como aceitador final de elétrons e em presença de KCN para bloquear a atividade da NADH oxidase. A reação foi desenvolvida em um sistema com a seguinte composição: tampão fosfato 50 mM pH 7,4, KCN 1,0 mM; NADH 0,150 mM e ferricianeto entre 0,20 e 0,80 mM. A reação foi iniciada pela adição da enzima (47 μg de proteína) e seguida espectrofotometricamente a 420 nm em espectrofotometro Beckman, Modelo DB, num volume final de 3 ml, empregando-se cubetas com 1 cm de caminho ótico. Temperatura de 27°C. Para o cálculo da atividade enzimática o coeficiente de extinção molar utilizado para o ferricianeto foi de $1.040 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, segundo Creutz e Sutin (13).

Em partículas isoladas pelo método de Kielley e Kielley (50) esta atividade enzimática foi determinada da mesma maneira, usando o seguinte sistema: tampão fosfato 7,8 mM pH 7,4; KCN 2 mM; NADH 0,130 mM; ferricianeto 1,0 mM, enzima (0,32 mg de proteína), num volume final de 3,0 ml.



2.2.6. Determinação da atividade de NADH-citocromo c redutase (NADH: cit c oxidorreductase E.C. 1.6.99.3).

A atividade de NADH citocromo c redutase foi medida espectrofotometricamente em 550 nm, acompanhando-se a redução do ferricitocromo c, através do método de Somlo (112), empregando mitocôndrias rompidas por congelamento.



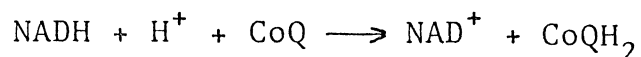
O meio de reação continha: tampão fosfato 50,0 mM pH 7,4; EDTA 2,0 mM; NADH 50,0 μM ; ferricitocromo c 66,0 μM e

KCN 1,0 mM. A reação foi iniciada pela adição da enzima (15-50 µg de proteína). Volume final 3,0 ml. Para expressar a velocidade da reação, usou-se para o citocromo c o coeficiente de extinção molar a 550 nm de $19000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, Keyhani e Keyhani (49).

Com o complexo enzimático (I-III da cadeia respiratória) isolado pelo método de Hatefi e Rieski (38) a atividade da NADH citocromo c redutase foi medida pelo mesmo método, usando o seguinte meio de reação: tampão fosfato 20 mM pH 8,0; azida de sódio 2,0 mM; citocromo c 50 µM; EDTA 10 mM; NADH 0,25 mM. Volume final 1,0 ml. A reação foi iniciada pela adição da enzima (0,24 mg de proteína).

2.2.7. Determinação da atividade de NADH-coenzima Q redutase.

A atividade da NADH-CoQ redutase (complexo I da cadeia respiratória) que cataliza a reação:



foi medida em espectrofotometro Varian 635 D em 340 nm. O meio de reação continha: Tris-sulfato 0,5 M pH 8,0; CoQ₆ 6,0 mM, KCN 30 mM; NADH 4,0 mM. O sistema foi incubado em banho de água a 30°C, 2,5 minutos, para estabilizar a turvação causada pela adição do CoQ₆ em meio aquoso. A reação foi iniciada pela adição da enzima (480 µg de proteína). Volume final 3 ml. Os cálculos foram feitos utilizando-se para o NADH um coeficiente de extinção molar a 340 nm de $6.220 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, Raw et al. (93).

2.2.8. Determinação da atividade de succinato desidrogenase (Succinato fenazina metassulfato oxidorreductase (E.C. 1.3.99.11)).

a) A atividade enzimática da desidrogenase succínica purificada foi determinada manometricamente pelo método descrito por Kearney e Singer (47). O sistema de reação continha: tampão fosfato 0,05 M pH 7,6; KCN 10 mM; fenazina metassulfato 0,03 mM; succinato de sódio 10 mM pH 7,6; enzima (10 unidades), num volume final de 3,0 ml. Temperatura 37°C. Agitação ± 100 por minuto. A reação foi iniciada pela adição do substrato após 7 minutos de incubação a 37°C, para homogeneizar a temperatura.

1 unidade de enzima = a quantidade que consome 1 µl

de oxigênio por minuto.

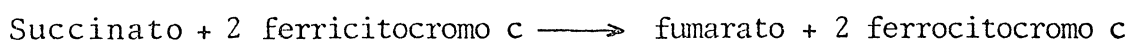
A atividade específica é expressa como unidade por mg de proteína.

b) A atividade enzimática da desidrogenase succínica de mitocôndrias rompidas por congelamento foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Singer (108), utilizando o seguinte sistema: tampão fosfato 50,0 mM pH 7,4; azida de sódio 3,0 mM; succinato de sódio 20,0 mM; DCIP 60 μ M; PMS 0,180 mM. A proteína (20 a 60 μ g) foi pré-incubada a 28°C durante 10 minutos, com o meio de reação contendo succinato, a fim de obter a atividade máxima da desidrogenase succínica. A reação foi iniciada pela adição do DCIP e PMS. Os cálculos foram feitos utilizando-se para o DCIP: $\Delta\xi_{600} = 14.400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Jones (44). A atividade específica foi de 289 η moles de DCIP reduzido. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Concentrações de verapamil testadas 141 a 1410 η moles/mg de proteína.

2.2.9. Determinação da atividade de succinato citocromo c redutase (Succinato: citocromo c oxidoreductase E.C. 1.3.99.1).

A atividade da succinato-citocromo c redutase foi determinada usando como fonte de enzima mitocôndrias rompidas por congelamento (51 μ g de proteína). A redução do citocromo c foi seguida espectrofotometricamente a 550 nm, de acordo com o método de Somlo (112). O meio de reação continha tampão fosfato 50,0 mM pH 7,4; EDTA 2,0 mM; succinato de sódio 5 mM; ferricitocromo c 66,0 μ M; KCN 1 mM.

A enzima foi pré-incubada à temperatura de 28°C, durante 10 minutos, em meio de reação contendo succinato. A reação foi iniciada pela adição do citocromo c. A velocidade de reação foi expressa em η moles de citocromo c reduzido por $\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, usando-se para o cit c: $\Delta\xi_{550} = 19.000, \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, Keyhani e Keyhani (49). 100% de atividade corresponde a 31,8 η moles de citocromo c reduzido. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (média de dois experimentos). Concentrações de verapamil testadas entre 100 e 800 η moles / mg de proteína.



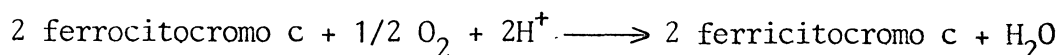
2.2.10. Determinação da atividade da succinato-Coenzima Q redutase (complexo II da cadeia respiratória).

A atividade da enzima isolada pelo método de Zie-

gler e Rieske (132) foi registrada polarograficamente, usando meio de incubação contendo: D-manitol 0,23 M; Tris 9,5 mM; EDTA 0,190 mM; fosfato inorgânico 4,7 mM, pH final 7,4, fenazina metassulfato 12 mM; succinato de sódio 2×10^{-3} M; enzima (1,84 mg de proteína). Volume final 2,4 ml. Temperatura 28°C. A atividade foi expressa em $\mu\text{MO}_2/\text{seg}$. 100% de atividade corresponde a 0,4 $\mu\text{MO}_2/\text{seg}$. Concentrações de verapamil testadas entre 120 e 780 $\eta\text{moles/mg}$ de proteína.

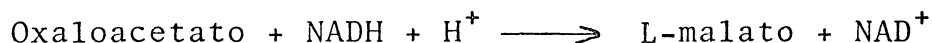
2.2.11. Determinação da atividade de citocromo c oxidase (ferrocitocromo c: oxigênio oxidoreductase E.C. 1.9.3.1).

A atividade de citocromo c oxidase foi medida espectrofotometricamente em 550 nm, seguindo a técnica descrita por Mason et al. (68), utilizando como fonte de enzima, mitocôndrias rompidas por congelamento. O meio de reação continha: tampão fosfato 50 mM pH 7,4; EDTA 2,0 mM; ferrocitocromo 30 μM . A reação foi iniciada pela adição da enzima (30 a 80 μg de proteína). A atividade específica foi calculada utilizando-se para o citocromo c: $\Delta\xi_{550} = 19.000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, Keyhani e Keyhani (49). 100% de atividade corresponde a 289 ηmoles de citocromo c oxidado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (média de duas experiências independentes). Concentrações de verapamil testadas entre 135 e 6.000 $\eta\text{moles/mg}$ de proteína:



2.2.12. Determinação da atividade da desidrogenase málica mitocondrial (E.C. 1.1.1.37).

Esta atividade enzimática foi seguida espectrofotometricamente acompanhando-se a oxidação do NADH em 340 nm.



O meio de reação continha: Tris-acetato 0,05 M pH 8,0, oxaloacetato 0,1 mM; NADH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 1000 unidades da enzima malato desidrogenase, extraída pelo método de England e Siegel (18). Volume final: 3 ml.

1 unidade corresponde à quantidade de enzima que oxida 0,482 ηmoles de NADH/min.

2.2.13. Determinação dos níveis de oxaloacetato.

Os níveis de oxaloacetato e aspartato formados durante o metabolismo mitocondrial através da oxidação de succinato mais glutamato ou de malato mais glutamato, na ausência ou na presença de verapamil (330 μ moles/mg de proteína), foram primeiro demonstrados qualitativamente através de cromatografia por Sakurada et al. (99).

As determinações quantitativas dos níveis de oxaloacetato foram feitas ou através do piruvato formado, Sakurada et al. (99), ou através do uso da malato desidrogenase, purificada pelo método de England e Siegel (18).

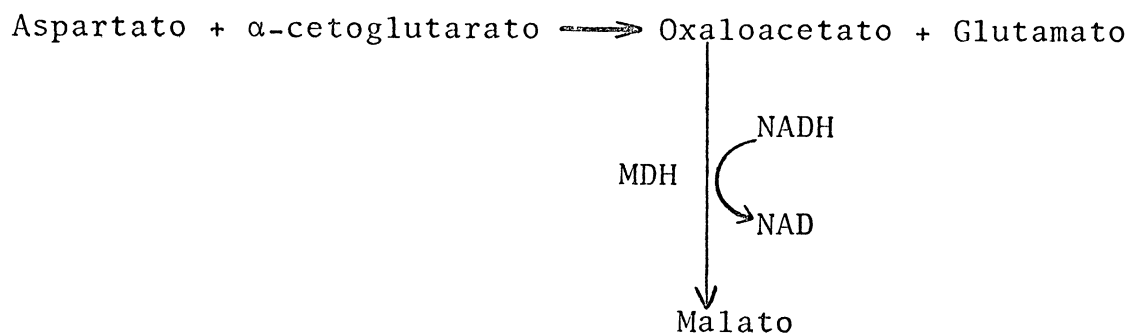
Mitocôndrias de coração de rato (5 mg de proteína) isoladas pelo método de Voss et al. (125) foram incubadas, com agitação, a 37°C durante uma hora, em meio de reação de Voss et al., sendo o succinato de sódio o substrato usado. A reação foi interrompida pela adição de 2 volumes de ácido tricloroacético à 10% e a proteína precipitada foi separada por centrifugação a 8 000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi neutralizado para pH 7,4 - 8,0 e uma alíquota foi usada para determinar os níveis de oxaloacetato. A reação foi seguida em 340 nm, usando o seguinte sistema: sobrenadante neutralizado da suspensão mitocondrial; tampão tris-acetato 0,05 M pH 8,0; NADH 0,1 mM; malato desidrogenase 200 unidades (1 unidade corresponde a quantidade de enzima que oxida 0,482 μ moles de NADH/min Volume final 3 ml).

2.2.14. Determinação da atividade de aspartato amino transferase.

A determinação da aspartato amino transferase foi realizada seguindo a técnica descrita por Schwartz (104), usando soro humano e malato desidrogenase isolada pelo método de England e Siegel (18).

O meio de reação continha: tampão fosfato 0,67 mM pH 7,4; NADH 0,1 mM; L-aspartato 33 mM; malato desidrogenase 1000 unidades (1 unidade é a quantidade de enzima que oxida 0,482 μ moles de NADH/min), soro 0,2 ml. O sistema de reação (volume de 3 ml) foi incubado a 37°C, durante 10 minutos, a fim de consumir o

substrato endógeno, e a reação foi iniciada pela adição do α -cetoglutarato 6,7 mM. A oxidação do NADH foi acompanhada a 340 nm até o final de reação, isto é, até absorção constante.



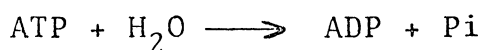
2.2.15. Determinação da atividade de ATPase. (ATP: fosfohidrolase E.C. 3.6.1.3).

A atividade de ATPase foi determinada através do método de Pullman et al. (89) empregando 3 tipos de preparações enzimáticas

- a) mitocôndrias intactas
- b) mitocôndrias rompidas por congelamento
- c) F_1 isolado

a) Determinação da atividade ATPásica de mitocôndrias intactas.

O sistema de reação era constituído de: sacarose 50 mM; Tris 0,0125 M; cloreto de potássio 50 mM; ATP 3,0 mM; pH final 7,4 e 1,0 mg de proteína mitocondrial, num volume total de 1,0 ml. Os tubos foram incubados a 30°C, com constante agitação durante 5 minutos, para homogeneização da temperatura. A reação foi iniciada pela adição da proteína e interrompida exatamente 10 minutos após, pela adição de TCA a 2%. O material foi centrifugado 1 minuto a 8.000 x g e a atividade ATPásica foi medida, usando-se uma alíquota do sobrenadante para determinar a quantidade de Pi liberado, através do método descrito por Sumner (113).



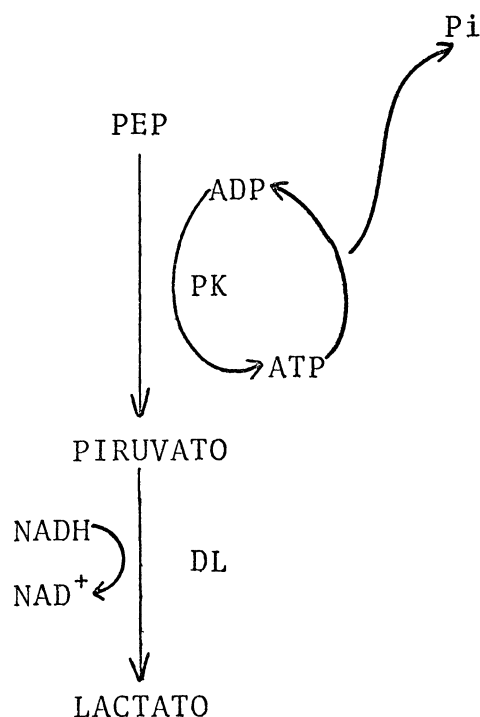
b) Determinação da atividade ATPásica de mitocôndrias rompidas.

O sistema de reação para mitocôndrias rompidas por congelamento continha: Tris-HCl 50,0 mM pH 8,0, MgSO_4 3,0 mM; PEP 2,5 mM; piruvato quinase (ATP piruvato 2-0-fosfotransferase E. C. 2.7.1.40) 35U/ml e 0,1 mg de proteína mitocondrial. Os tubos

foram incubados a 30°C com agitação durante 5 minutos. A reação foi iniciada pela adição de ATP 4,0 mM pH 7,0. Após 10 minutos exatos de incubação, adicionou-se TCA a 5% para bloquear a reação enzimática. O material foi centrifugado durante 1 minuto a 8.000 x g e uma alíquota foi utilizada para determinar a quantidade de Pi liberado, através do método descrito por Sumner (113).

c) Determinação da atividade ATPásica de F_1 isolado.

O sistema de reação continha: sacarose 50 mM; Tris-acetato 50 mM pH 7,4; acetato de magnésio 3,0 mM; acetato de potássio 30 mM; PEP 1,0 mM; NADH 0,2 mM; piruvato quinase 3 unidades; (1 unidade de PK converte 1 μ mol de PEP a piruvato por minuto, pH 7,6, 37°C); lactato desidrogenase 3 unidades (1 unidade de DL reduz 1 μ mol de piruvato a lactato por minuto, pH 7,5, 37°C); ATP 3,0 mM num volume final de 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição da enzima, (0,002 mg de proteína) e a atividade enzimática foi acompanhada pela oxidação do NADH em 340 nm; utilizando espectrofotômetro Beckman, modelo D.B., acoplado a um registrador Beckman. Para os cálculos usou-se, para o NADH, o coeficiente de extinção molar = $6.220 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Os resultados da atividade ATPásica são expressos em μ moles de ATP hidrolizado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, já que 1 mol de ATP hidrolizado, corresponde a 1 mol de NADH oxidado, de acordo com a reação abaixo:



2.2.16. Determinação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) em mitocôndrias de coração.

Mitocôndrias de coração de rato foram isolados em meio contendo sacarose 0,25 M e EDTA 1 mM pH 6,9; lavadas duas vezes e ressuspensas em meio sem EDTA, conforme o método descrito por Wikström e Saari (128), com pequenas modificações. O meio de reação num volume total de 3 ml continha: sacarose 0,20 M; HEPES 20,0 mM pH 7,2; EDTA 0,38 mM; KCl 20 mM, mitocôndrias 2,4 mg de proteína (0,8 mg/ml). Em todos os experimentos as mitocôndrias foram usadas logo após o isolamento e durante o mesmo dia. O potencial de membrana foi determinado pela captação de safranina $10\ \mu\text{M}$, através da membrana mitocondrial energizada ou com succinato de sódio 5 mM, ou com ATP 1,67 mM. O sistema foi adequadamente suplementado com rotenona 4,2 μM , NaCN 1 mM e oligomicina 2 $\mu\text{g/ml}$.

Foi mantida a relação safranina proteína de 4,2 para todos os experimentos. As alterações espectrais, provocadas pela captação da safranina pela membrana energizada, foram registradas em espectrofotômetro de duplo feixe de onda, Aminco Chance, acoplado a um registrador Aminco (American Instrument Co.), em 511-533 nm à 28°C, usando o método descrito por Åkerman e Wikström (2).

Para determinar o potencial de membrana em cada caso experimental usou-se uma curva padrão gentilmente cedida pelo Professor Hércio R. Borba, (figura 2), onde se mediu o potencial de membrana provocado pela difusão do K^+ na presença de valinomicina, de acordo com a metodologia de Åkerman e Wikström (2). O potencial foi calculado de acordo com a equação de Nernst, considerando $(\text{K}^+)_{\text{in}}$ 120 mM conforme Rossi e Azzone (97).

2.2.17. Determinação do grau de "swelling" induzido por valinomicina- K^+ em mitocôndrias de coração.

Mitocôndrias de coração de rato foram isoladas seguindo o método descrito por Voss et al. (125), sendo a última lavagem e a suspensão das mitocôndrias em meio isento de EDTA.

O aumento do volume mitocondrial (swelling) causado pelo transporte de potássio mediado pela valinomicina, foi acompanhado a 546 nm em espectrofotômetro Beckman, Modelo DB acoplado

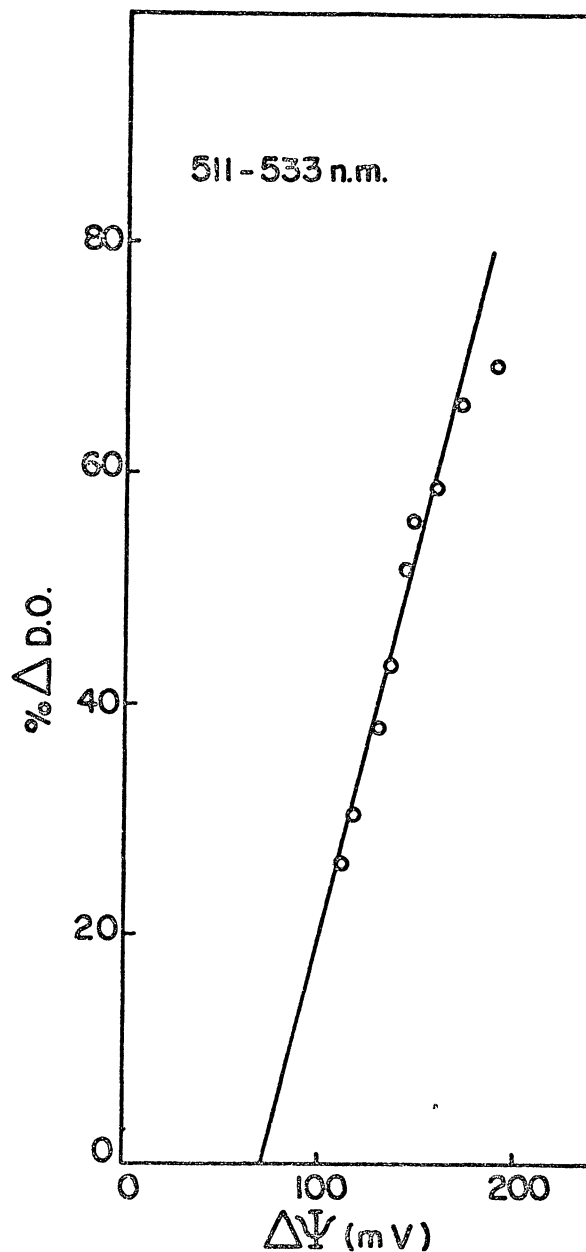


FIGURA 2 - Variação espectral da safranina induzida pelo potencial de difusão do potássio.

Sistema: sacarose 200 mM, HEPES 20 mM pH 7,2, EDTA 0,38 mM, rotenona 4,2 μ M, oligomicina 2 μ g, safranina 10 μ M, valinomicina 42 ng/ml, FCCP 1 mM, KCl 0,083 a 1,67 mM e 0,8 mg/ml de proteína mitocondrial, num volume final de 3 ml. O potencial foi calculado de acordo com a equação de Nernst: $\Delta\Psi = 60 \log \frac{(K^+ \text{ in})}{(K^+ \text{ out})}$ sendo $K^+_{\text{in}} = 120$ mM e K^+_{out} o potássio adicionado. A extensão da resposta foi a diferença de absorção, em 511-533 nm a 28°C, obtida após a adição de valinomicina e aquela obtida após a adição de FCCP. 100% de Δ DO corresponde a 0,040.

a um registrador (Linear and Log Potenciometric Recorder), seguindo a técnica descrita por Liguetti e Fonyó (60).

O meio de reação num volume de 3 ml continha: tampão fosfato de sódio 4,0 mM, pH 7,0; sacarose 243 mM; KCl 10 mM; Tris-fosfato 1,0 mM pH 7,0, valinomicina 1,6 ng/ml; rotenona 1 μ M. A reação foi iniciada pela adição do substrato: succinato de sódio 1,6 mM em presença de 0,6 mg de proteína mitocondrial; ou ATP 0,55 mM em presença de 0,37 mg de proteína mitocondrial e suplementada com FCCP 0,3 μ M. Temperatura 28°C.

Os resultados foram expressos em Δ DO/min.

2.2.18. Determinação espectrofotométrica do transporte de Ca^{++} mitocondrial, na presença de Arsenazo.

Mitocôndrias de coração de rato foram isoladas pelo método descrito por Voss et al. (125), substituindo o EDTA por EGTA 1 mM. As mitocôndrias foram lavadas duas vezes e ressuspensas em meio sem EGTA.

Os experimentos de influxo e efluxo de Ca^{++} foram feitos num volume total de 3 ml. O meio de reação continha: sacarose 66 mM; KCl 52 mM; Tris-fosfato 0,175 mM pH 7,4; Tris-Cl 13,13 mM pH 7,4; Arsenazo 31,5 μ M. Este meio foi preparado e mantido por uma noite em geladeira na presença de Chelex 100 (K^+). O uso da solução livre de Chelex (vermelha) para o ensaio do transporte de Ca^{++} foi obtido através de filtração à vácuo, com papel de filtro isento de Ca^{++} .

A reação foi iniciada pela adição de 2,4 mg de proteína mitocondrial (0,8 mg/ml) na presença de rotenona 4,2 μ M. O sistema foi suplementado com: CaCl_2 21 nmoles/mg; succinato de potássio 5 mM; FCCP 0,3 μ M e NaCl 10 mM.

As alterações de absorbância foram acompanhadas em espectrofotômetro de duplo feixo de onda Aminco-Chance, acoplado a um registrador (Aminco Chance Dual - Wavelength/Split Beam Recorder Spectrophotometer), em 675-685 nm, à 28°C, conforme descrito por Scarpa (102).

Em todos os experimentos as mitocôndrias foram usadas após o isolamento e durante o mesmo dia.

2.2.19. Microscopia eletrônica.

Mitocôndrias de coração de rato, isoladas pelo método de Voss et al. (125) foram fixadas em glutaraldeído a 2% e tampão cacodilato 0,15 M, durante 90 minutos a 4°C, lavadas em tampão cacodilato 0,15 M e cloreto de sódio 0,2% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato 0,30 M a mesma temperatura. A coloração foi feita com solução aquosa de acetato de uranila a 2% durante 20 horas, seguida de desidratação em série crescente de concentrações alcoólicas (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) com duração de 10 minutos cada passagem.

A embebição e inclusão foram feitas com resina Polyte, Coiro et al.(9) e os cortes ultrafinos foram feitos em Ultra-Micrótomo Sorvall MT 2-B, corados em citrato de chumbo, Reynolds (94) durante 10 minutos e examinados em microscópio eletrônico Philips EM-300.

O efeito do verapamil sobre a morfologia das mitocôndrias foi realizado na presença de: a - substrato endógeno; b - substrato exógeno α -cetogluturato. Em cada situação foram usadas duas concentrações diferentes do verapamil e em dois tempos diferentes: imediatamente após sua adição (T0) e após 10 minutos de contacto com a membrana (T10). Um controle foi feito nas mesmas condições, na ausência da droga.

2.2.20. Efeito do Solvente

Verapamil é pouco solúvel em H_2O , tendo sido dissolvido em N.N: dimetilformamida. Tornou-se portanto necessário analisar a ação do solvente em todos os sistemas experimentais. Dentro dos volumes empregados no presente trabalho, o solvente mostrou-se inócua, não havendo qualquer interferência nos resultados experimentais obtidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do verapamil sobre a respiração de mitocôndrias intactas, isoladas de coração.

O efeito do verapamil sobre a respiração em mitocôndrias intactas foi medido manometricamente, usando várias concentrações da droga, verificando a sua ação em relação ao tempo de incubação e em relação ao substrato NAD^+ ou FAD^+ dependente.

Nas figuras 3, 4 e 5 são mostrados os resultados da respiração mitocondrial usando respectivamente L-glutamato, malato-piruvato e αKG como substratos. Como pode ser observado as velocidades de oxidação desses substratos foram severamente inibidas em relação ao tempo de incubação e dependendo da concentração da droga.

A figura 6 mostra os resultados obtidos com o succinato. Nesta figura pode-se observar que a oxidação do succinato foi estimulada (371% com 660 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína em 60 minutos). Experiências preliminares foram feitas usando mitocôndrias de fígado de rato, tendo-se obtido resultados semelhantes aos mostrados com coração. Em todos estes experimentos as mitocôndrias foram pré-incubadas com a droga.

A figura 7 mostra um outro tipo de experimento, no qual o verapamil foi adicionado juntamente com o substrato αKG . Resultados similares foram obtidos com glutamato e menor ativação na oxidação do succinato (resultados não mostrados). Os resultados mostrados nas figuras 5 e 7 diferem entre si, embora as concentrações da droga e substrato sejam iguais. Na presença de VERA incubado com a proteína (figura 5), 132 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína inibiram em 38,5% a respiração dependente do αKG em 60 minutos e, 330 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína produziram 90% de inibição. Quando o VERA foi adicionado simultaneamente com o αKG (figura 7) a respiração foi levemente estimulada na presença de 66 e 132 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína; com 330 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína a inibição foi de apenas 11% e isto só a partir de 40 minutos. Foram necessários 660 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína para produzir inibição de 45%.

O pronunciado efeito sobre a respiração do L-glutamato, malato-piruvato e αKG sugere que o verapamil exerce efeito ini-

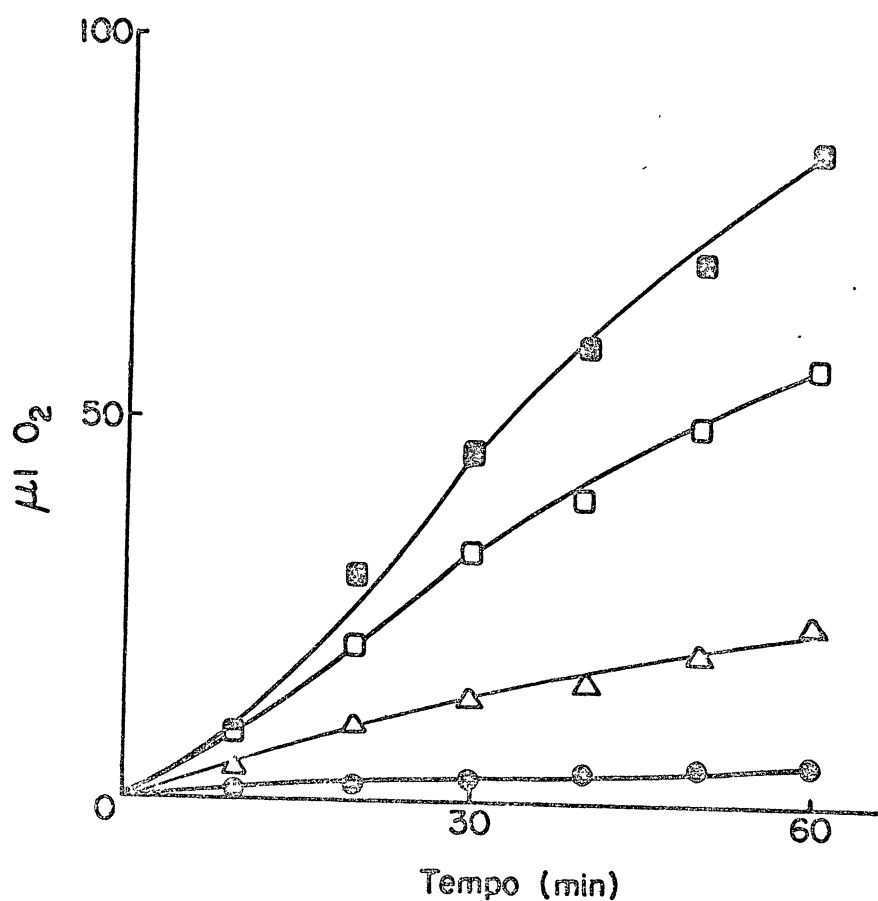


FIGURA 3 - Efeito do verapamil sobre a oxidação do L-glutamato em mitocôndrias de coração.

Sistema: As mitocôndrias (5 mg de proteína), foram incubadas em meio contendo: D-manitol 0,25 M; Tris 0,01 mM; KCl 0,01 mM; EDTA 0,2 mM; fosfato inorgânico 3,5 mM, pH final 7,4; substrato 100 μ moles; 0,15 ml de KOH a 20% (poço central). Volume final 2,85 ml. Temperatura 37°C. Agitações \pm 100 por minuto. Fase gasosa: ar atmosférico. O consumo de oxigênio foi seguido manometricamente. Os resultados correspondem a média de quatro experiências independentes.

(□) Controle; (□) verapamil 66 μ moles/mg de proteína; (Δ) verapamil 132 μ moles/mg de proteína; (●) verapamil 330 μ moles / mg de proteína.

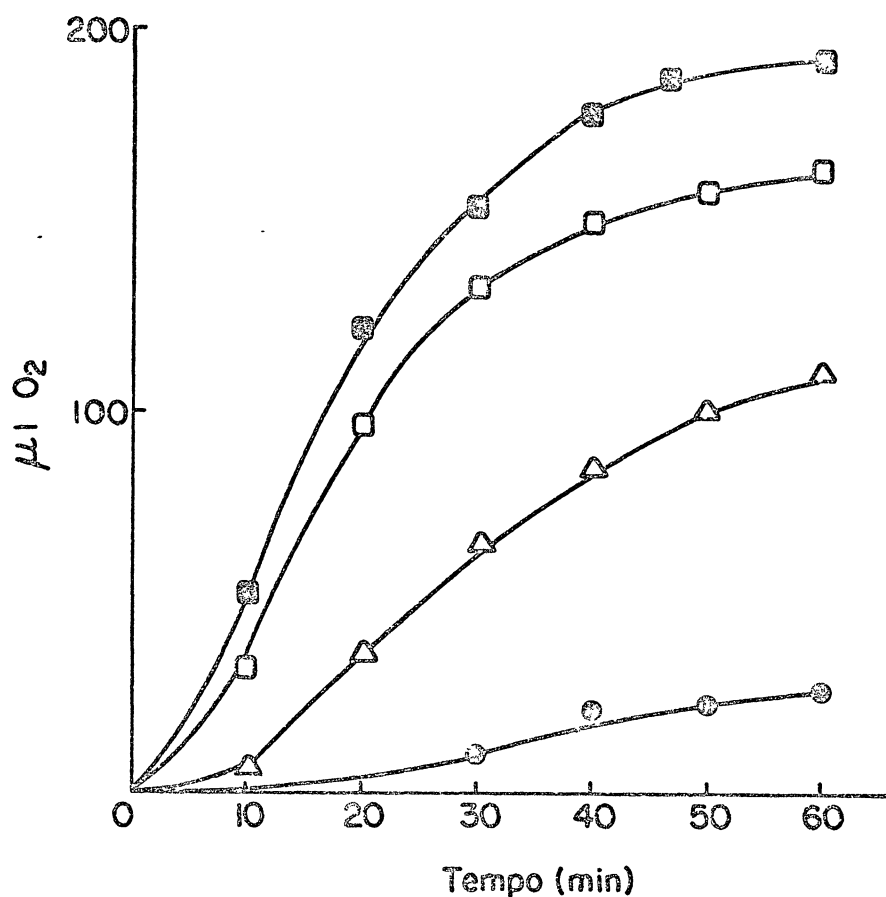


FIGURA 4 - Efeito do verapamil sobre a oxidação do malato-piruvato em mitocôndrias de coração.

Sistema: Idêntico ao da figura 2. Esses resultados representam a média de quatro experiências independentes.

(■) Controle; (□) verapamil 66 ηmoles/mg de proteína; (Δ) verapamil 132 ηmoles/mg de proteína; (●) verapamil 330 ηmoles / mg de proteína.

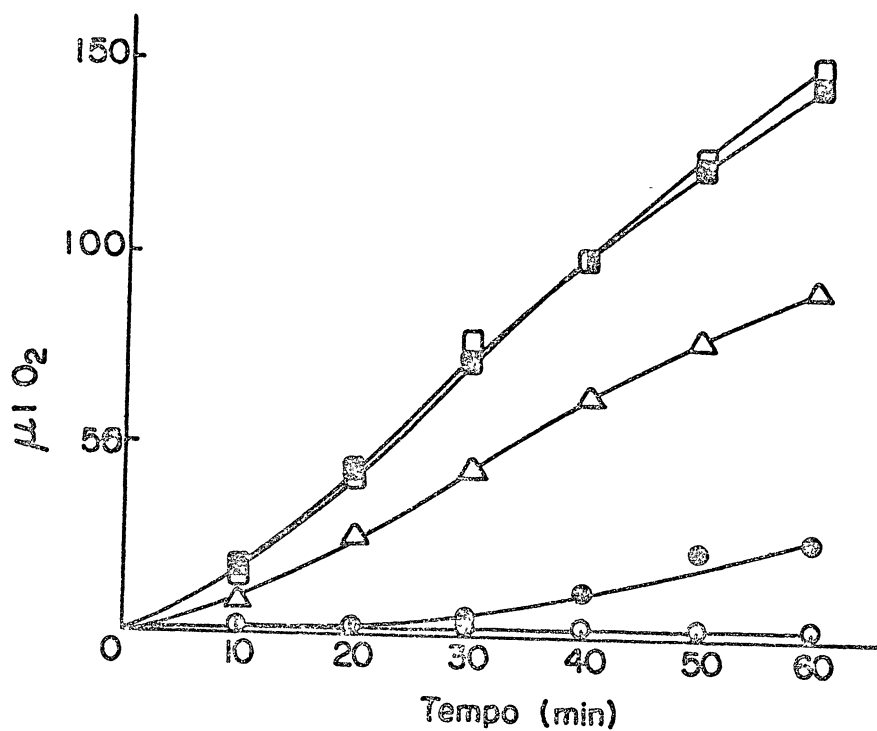


FIGURA 5 - Efeito do verapamil sobre a oxidação do α -cetoglutarato em mitocôndrias de coração.

Sistema: Idêntico ao da figura 2. Esses resultados correspondem a média de quatro experiências independentes.

(■) Controle; (□) verapamil 66 nmoles/mg de proteína; (△) verapamil 132 nmoles/mg de proteína; (●) verapamil 330 nmoles / mg de proteína; (○) verapamil 660 nmoles/mg de proteína.

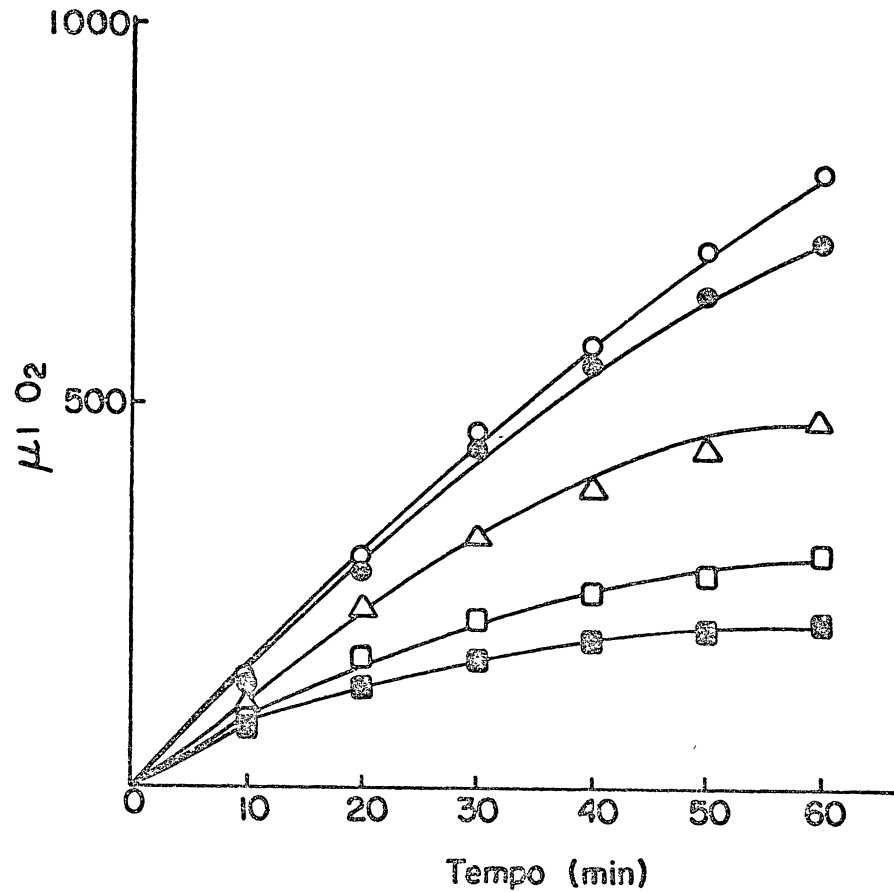


FIGURA 6 - Efeito do verapamil sobre a oxidação do succinato em mitocôndrias de coração.

Sistema: Idêntico ao da figura 2. Esses resultados correspondem a média de quatro experiências independentes.
 (■) Controle; (□) verapamil 66 ηmoles/mg de proteína; (△) verapamil 132 ηmoles/mg de proteína; (●) verapamil 330 ηmoles/mg de proteína; (○) verapamil 660 ηmoles/mg de proteína.

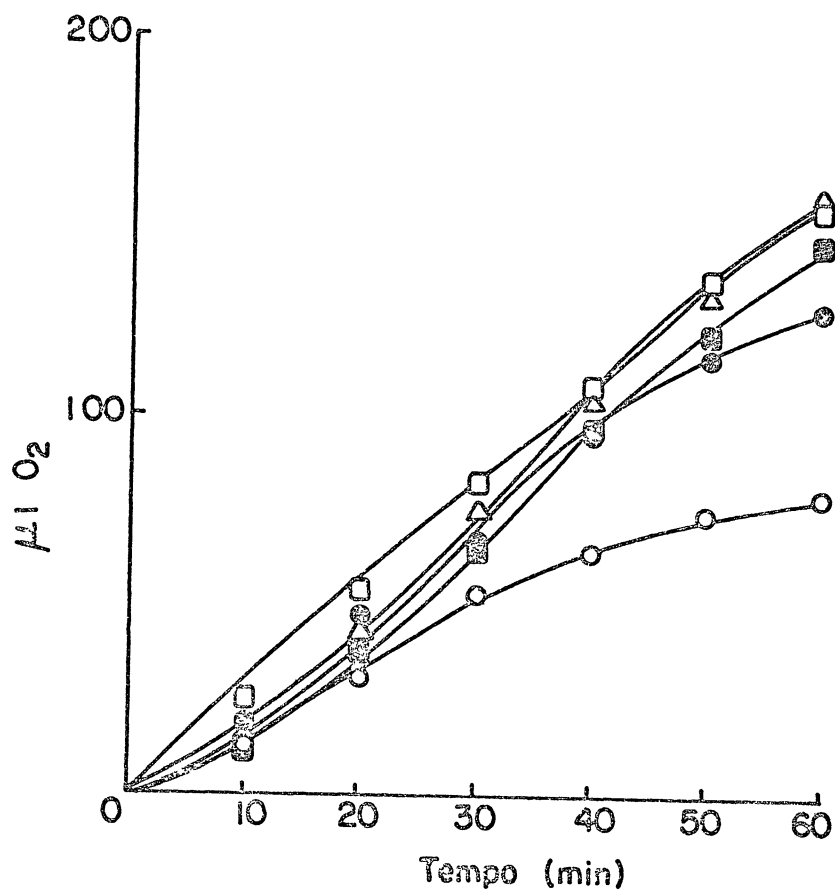


FIGURA 7 - Efeito do verapamil sobre a oxidação do α -cetoglutarato em mitocôndrias de coração.

Sistema: Idêntico ao da figura 4, porém verapamil foi adicionado junto com o substrato.

(▣) Controle; (Δ) verapamil 66 $\eta\text{moles/mg}$ de proteína; (◼) verapamil 132 $\eta\text{moles/mg}$ de proteína; (⊙) verapamil 330 $\eta\text{moles/mg}$ de proteína; (○) verapamil 660 $\eta\text{moles/mg}$ de proteína.

bitório, sobre algum componente responsável pela transferência de elétrons, entre estes substratos NAD-dependentes e o coenzima Q; já que a respiração do succinato não foi inibida. Por outro lado, estes resultados demonstram que o grau de inibição depende das condições impostas à mitocôndria. Verapamil em baixas concentrações (66 e 132 nmoles/mg de proteína) não interfere ou produz um leve estímulo na respiração dos substratos NAD⁺ dependentes nos primeiros 20 minutos, quando a droga é adicionada sobre a mitocôndria energizada (figura 7), porém a adição de VERA na proporção de 660 nmoles/mg de proteína inibe a respiração NAD⁺ dependente, mesmo com mitocôndrias energizadas.

3.2. Efeito do verapamil sobre o consumo de oxigênio, fosforilação oxidativa e controle respiratório em mitocôndrias isoladas de coração de rato.

A tabela I mostra os resultados de experiências, nas quais a respiração e fosforilação oxidativa em mitocôndrias intactas foram medidas polarograficamente, na presença de diferentes concentrações de verapamil. Observa-se que a velocidade de oxidação dos substratos tanto NAD⁺ dependentes (α -cetogluturato e L-glutamato), como FAD⁺ dependente, (succinato), não foi afetada ou sofreu um leve estímulo na presença do antiarrítmico.

A velocidade de respiração no estado III (ativação da respiração induzida pelo ADP) foi gradativamente inibida com o aumento da concentração do medicamento, enquanto que, a velocidade de respiração no estado IV (retorno da respiração após o consumo de ADP) foi estimulada com a concentração mais alta da droga. Como pode ser observado, os resultados são semelhantes para o α KG, o L-glutamato e o succinato.

O alto grau de inibição da velocidade no estado III da respiração pode ser provocado ou por inibição do complexo ATPásico ou por inibição do translocador ADP-ATP ou ainda por uma inibição direta do transporte de elétrons, o que automaticamente está eliminado, nas condições da tabela I, já que a velocidade respiratória foi estimulada.

Por outro lado os decréscimos da relação ADP/O, a inibição da velocidade no estado III da respiração, com estímulo da velocidade no estado IV, na presença de concentrações crescentes

TABELA I - Efeito do Verapamil sobre a velocidade respiratória e fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de coração de rato.

Verapamil nmoles/mg proteína	α-cetoglutarato					L-Glutamato					Succinato				
	V.Resp.	Estados III IV		RC	ADP/O	V.Resp.	Estados III IV		RC	ADP/O	V.Resp.	Estados III IV		RC	ADP/O
0	0,13	0,71	0,16	4,4	3,0	0,14	0,87	0,06	14,5	3,4	0,42	1,57	0,49	5,4	1,9
146	0,14	0,65	0,17	3,8	3,0	0,11	0,78	0,10	7,8	3,4	0,42	1,57	0,56	2,8	1,7
365	0,18	0,30	0,15	2,0	3,0	0,18	0,71	0,12	5,9	3,2	0,52	1,30	0,52	2,5	1,7
730	0,14	0,24	0,24	1,0	---	0,32	0,37	0,22	1,7	2,5	0,60	0,87	0,71	1,2	1,16

Sistema: Meio de reação descrito por Voss et al. (125); suspensão mitocondrial (4,5 mg de proteína); substrato 100 μmoles; ADP 0,235 μmoles. Volume final 2,4 ml. Temperatura 28°C. A velocidade respiratória esta expressa em μMO₂/seg.

da droga, são indicativos de uma ação desacopladora. Contudo é temerário afirmar, baseados nestes resultados, que o verapamil exerça um efeito semelhante a um desacoplador. Dados adicionais fazem-se necessários para esclarecer este aspecto.

Efeito do verapamil sobre atividades enzimáticas ligadas à cadeia de transporte de elétrons.

Os resultados obtidos em medidas de respiração e fosforilação oxidativa sugerem mais de um tipo de efeito sobre as atividades enzimáticas, ao longo da cadeia de transporte de elétrons. A fim de verificar o local de ação do medicamento, procedeu-se ao isolamento, purificação e testes de várias enzimas e complexos enzimáticos mitocondriais. As atividades enzimáticas foram testadas também em partículas submitocondriais e em mitocôndrias rompidas por congelamento.

Estabeleceu-se como padrão, em todos os testes, a comparação das velocidades de reação na ausência de verapamil (controle) e na presença de várias concentrações do mesmo.

3.3. Efeito sobre atividades enzimáticas NAD^+ dependentes.

Com o objetivo de esclarecer a inibição mostrada nas figuras 3, 4, 5 e 7 sobre a respiração de L-glutamato; malato-piruvato e α -cetoglutarato foi testado o efeito do verapamil sobre as atividades enzimáticas NAD^+ dependentes.

3.3.1. Efeito sobre a atividade de NADH-oxidase.

Foi testado o efeito do medicamento sobre a atividade de NADH-oxidase, em três tipos diferentes de preparações.

3.3.1.1. A tabela II mostra os resultados na atividade NADH-oxidase em partículas submitocondriais isoladas pelo método de Kielley e Kielley (50). Os resultados mostram alto grau de inibição com as concentrações de VERA usadas.

3.3.1.2. A figura 8 mostra os resultados obtidos na atividade NADH-oxidase em partículas EP_1 da membrana interna e o efeito do azul de metileno em restabelecer a atividade enzimática inibida com verapamil. Pode-se verificar pelos resultados a-

presentados que a inibição causada pelo verapamil foi quase completamente revertida pelo azul de metileno. Só altas concentrações da droga acima de 1 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, mantiveram inibição acima de 13%, após a adição do AM.

3.3.1.3. A tabela III mostra os resultados obtidos com mitocôndrias rompidas por congelamento. A inibição é de 45% com concentração de verapamil de 1445 nmoles/mg. Se compararmos os resultados da tabela II, figura 8 e tabela III, torna-se evidente que o grau de inibição é bem menor quando usamos mitocôndrias rompidas por congelamento; contudo, talvez seja o resultado mais exato, uma vez que a mitocôndria mantém muito mais as suas características originais, em relação às partículas que sofreram tratamentos mais drásticos.

Por outro lado, os dados constantes na tabela II e na figura 8 foram medidos polarograficamente e a reação foi sempre iniciada pela adição do NADH, o que permitiu maior tempo de contato entre a enzima e a droga. Os resultados constantes da tabela III foram medidos espectrofotometricamente e a reação foi iniciada pela adição da enzima. Como os cálculos são baseados na velocidade inicial da reação, os resultados significam ação imediata da droga sobre a atividade enzimática.

3.3.2. Efeito do verapamil sobre a atividade da NADH-citocromo c redutase.

O efeito sobre a atividade de NADH citocromo c redutase foi medido em dois tipos de preparações enzimáticas: Complexo I-III da cadeia respiratória, isolada pelo método de Hatefi e Rieske (38) e em partículas submitocondriais obtidas por sonicação, seguindo o método descrito por Penin et al. (84).

A tabela IV mostra os resultados obtidos com os dois tipos de preparações, indicando uma inibição de 45% e 30%, respectivamente, na presença de 680 e 666 nmoles de verapamil por mg de proteína.

3.3.3. Efeito do verapamil sobre a atividade de NADH - ferricianeto redutase.

A tabela V mostra os resultados obtidos na atividade da

TABELA II - Efeito do verapamil sobre a atividade NADH- oxidase em partículas submitocondriais.

Verapamil η moles/mg de proteína	O ₂ consumido μ MO ₂ .Seg ⁻¹	% inibição
Controle	1,36	---
130	0,78	43
390	0,39	72
520	0,17	88
650	0,09	94

Sistema: tampão fosfato 0,05 M pH 7,5; NADH 0,150 mM; NADH-oxidase (partículas de Kielley e Kielley, 2,4 mg de proteína); VERA nas concentrações indicadas. Volume final 2,4 ml. A atividade enzimática foi determinada polarograficamente em eletródio de oxigênio. A reação foi iniciada pela adição do NADH.

TABELA III - Efeito do verapamil sobre a atividade NADH-oxidase em mitocôndrias rompidas por congelamento.

Verapamil η moles/mg de proteína	η moles NADH-oxidado. min ⁻¹ .mg ⁻¹	% Atividade relativa
Controle	100,0	100
289	77	77
579	77	77
1125	77	77
1445	55	55
2890	44	44

Sistema: Tampão fosfato 80 mM pH 7,4; EDTA 0,050 mM; NADH 0,150 mM. VERA nas concentrações indicadas. A reação foi iniciada pela adição da enzima (0,345 mg de proteína). Leitura em 340 η m. Esses resultados representam a média de dois experimentos independentes.

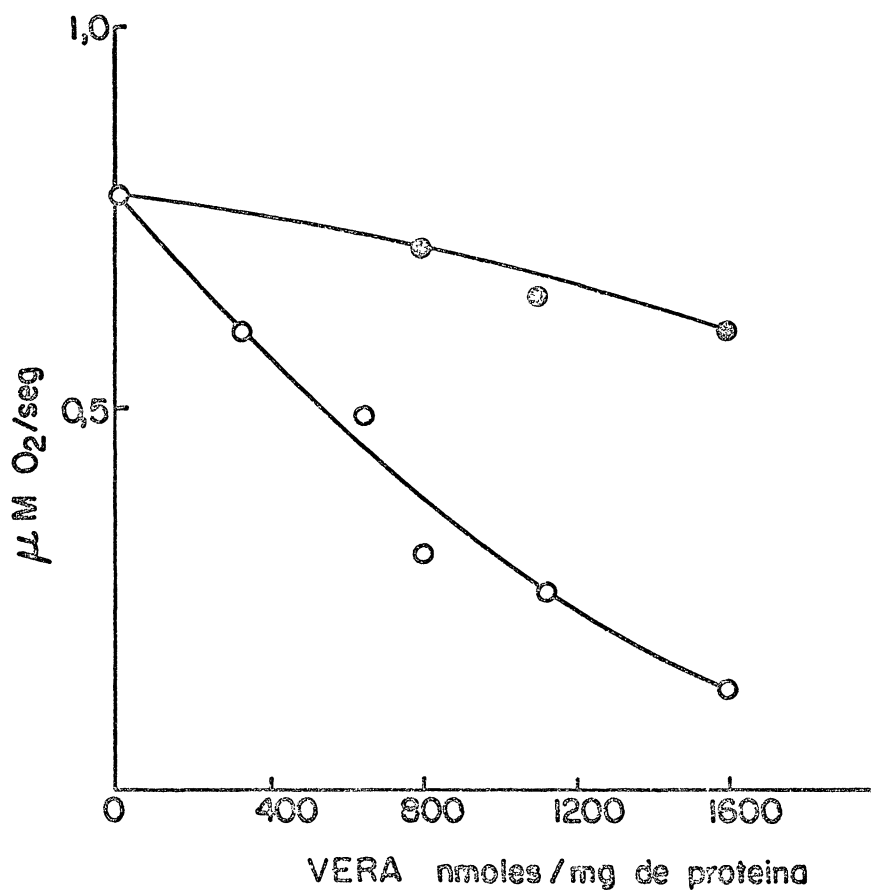


FIGURA 8 - Efeito do azul de metileno em restabelecer a atividade das partículas EP₁ (NADH-oxidase) inibidas por verapamil.

Sistema: Meio de reação de Voss et al. (125); partículas EP₁, com atividade NADH-oxidase (2,07 mg de proteína), NADH 0,33¹mM; verapamil nas concentrações indicadas. Azul de metileno 4 x 10⁻⁵M. Volume final 2,4 ml. A reação foi iniciada pela adição do NADH. O consumo de oxigênio foi registrado polarograficamente.

(o) Enzima + verapamil (●) Enzima + VERA + AM.

NADH-ferricianeto redutase, os quais demonstram que, usando ferricianeto como aceitador de elétrons, não há alteração na atividade específica da enzima na ausência de verapamil (controle) e na presença das várias concentrações usadas. A atividade enzimática manteve-se inalterada, tanto em partículas isoladas pelo método de Kielley e Kielley (50), como em mitocôndrias rompidas por congelamento, mesmo na presença de concentrações elevadas da droga.

Os resultados mostrados nas tabelas II, III, IV e na figura 8 confirmam a existência de um sítio de inibição para o verapamil, no segmento da cadeia respiratória entre NADH e citocromo c.

Os resultados mostrados na figura 8, nos quais a atividade enzimática NADH-oxidase inibida pelo verapamil foi prontamente restabelecida pelo azul de metileno, indicam que esta inibição é após a flavoproteína, do lado do oxigênio da NADH desidrogenase. O azul de metileno aceita elétrons de enzimas capazes de catalizar a oxidação de sistemas flavina ligados (90); por outro lado, a atividade NADH-ferricianeto redutase (tabela V), não foi afetada. Este resultado confirma um sítio de inibição, próximo ao da rotenona, no sítio I da cadeia respiratória, já que o ferricianeto aceita elétrons da própria enzima NADH desidrogenase (108). A fim de esclarecer este aspecto foi testado o efeito do verapamil sobre a atividade de NADH-CoQ redutase.

3.3.4. Efeito do verapamil sobre a atividade da NADH - CoQ redutase.

A tabela VI mostra os resultados obtidos sobre a atividade da NADH CoQ redutase, demonstrando inibição desta atividade enzimática. Tais resultados confirmam um sítio de inibição do verapamil entre NADH e coenzima Q. Com apoio nestes resultados e naqueles discutidos no parágrafo anterior, podemos afirmar que verapamil atua como inibidor do transporte de elétrons entre a flavoproteína e o coenzima Q, do lado do oxigênio, na cadeia respiratória.

3.4. Efeito sobre a atividade enzimática da succinato desidrogenase.

Os resultados apresentados na figura 6 mostram um poten

TABELA IV - Efeito do verapamil sobre a atividade NADH-citocromo c redutase.

Verapamil nmoles/mg proteína	moles Cit c red. min ⁻¹ .mg ⁻¹	% Atividade relativa
Controle*	72,4	100
680*	39,4	55
Controle**	315,8	100
133**	252,6	80
266**	231,5	73
666*	221	70

* NADH-cit c redutase isolada pelo método de Hatefi e Rieski (58)

** NADH-cit c redutase em partículas submitocondriais obtidas pelo método de Low e Vallin (63). Sistema de reação conforme descrito no item 2.2.6 em Materiais e Métodos.

Cada resultado corresponde a média de dois experimentos independentes.

TABELA V - Efeito do verapamil sobre a atividade NADH ferricianeto redutase.

Verapamil nmoles mg/proteína	µmoles ferrocianeto min ⁻¹ .mg ⁻¹	% Atividade relativa
Controle*	5.048	100
330*	5.048	100
660*	5.048	100
1320*	5.048	100
Controle**	5.532	100
1100**	5.532	100
2200**	5.532	100

Sistema de reação: Descrito em Materiais e Métodos. Item 2.2.5.

*Partículas submitocondriais obtidas pelo método de Kyelley e Kyelley (50). **Mitocôndrias rompidas por congelamento. Cada resultado corresponde a média de dois experimentos independentes.

TABELA VI - Efeito do verapamil sobre a atividade NADH-CoQ redutase.

Verapamil nmoles/mg de proteína	$\mu\text{moles NADH oxidado.}$ $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	% Inibição
Controle	1,304	---
310	1,105	15,4
625	0,703	46,2
1250	0,703	46,2
3125	0,602	54

Sistema: Tampão tris-sulfato 50 mM pH 8,0; CoQ₆ 0,1 mM diluído em metanol; KCN 1,0 mM; NADH 0,130 mM; enzima NADH CoQ redutase, extrato alcoólico (480 μg de proteína). A reação foi iniciada pela adição da enzima. Volume final de 3 ml. Temperatura 30°C. Leitura 340 nm.

TABELA VII - Efeito do verapamil sobre a atividade da succinato desidrogenase.

Verapamil nmoles/mg de proteína	Atividade específica minutos de incubação		
	10	20	30
Controle	0,94	0,94	0,86
190	0,93	0,93	0,89
470	0,95	0,99	0,90

Sistema: tampão fosfato 5 mM pH 7,6; KCN 1 mM; PMS 0,03 mM; succinato de sódio 20 mM; enzima (10 unidades) Volume final 3,0 ml. Temperatura 37°C. A reação foi iniciada pela adição do succinato. Agitação = 100 por minuto. Unidade de enzima = quantidade que consome 1 μl O₂/min. Atividade específica: Unidade de enzima/mg de proteína/min.

te efeito estimulante do verapamil na respiração dependente do succinato. Lindahl e Oberg (61) demonstraram que a rotenona, inibidor do sítio I da cadeia respiratória, estimula a oxidação mitocondrial do succinato. O estímulo da oxidação do succinato pelo malato é maior na presença de rotenona (39). Com o objetivo de esclarecer o efeito estimulante do verapamil na respiração do succinato foram realizadas as experiências que seguem.

3.4.1. Efeito do verapamil sobre a atividade da succinato desidrogenase purificada.

Como pode ser observado (Tabela VII), a atividade específica da enzima manteve-se inalterada na presença das concentrações de verapamil utilizadas. Na figura 6 pode-se observar, que a respiração dependente do succinato foi estimulada em 330%, em 30 minutos, em relação ao normal, na presença de 330 nmoles de verapamil/mg de proteína, enquanto que 470 nmoles/mg de proteína, em 30 minutos, não alteraram a atividade da succinato desidrogenase purificada (Tabela VII). Este resultado mostra que o verapamil não exerce qualquer efeito sobre a enzima succinato desidrogenase isolada.

3.4.2. Efeito do verapamil sobre as atividades da succinato desidrogenase (succinato: fenazina metassulfato óxidoredutase) e succinato citocromo c redutase.

A atividade da succinato desidrogenase [succinato fenazina metassulfato óxido-redutase] e a atividade da succinato citocromo c redutase em mitocôndrias rompidas, não foram afetadas pelas concentrações usadas de verapamil, conforme descrito em Materiais e Métodos, Ítens 2.2.8 e 2.2.9.

3.4.3. Efeito do verapamil sobre a atividade da succinato coenzima Q redutase.

A atividade específica desta enzima, determinada conforme descrito em Materiais e Métodos, Ítem 2.2.10, não foi alterada na presença do antiarrítmico.

3.5. Efeito do verapamil sobre a atividade da citocromo c oxidase [ferricitocromo c: oxigênio óxido-redutase].

A atividade específica da enzima citocromo c oxidase não foi afetada pela presença de VERA, mesmo em altas concentrações conforme descrito em Materiais e Métodos. Ítem 2.2.11.

Todos estes resultados indicam que o verapamil, dentro das concentrações usadas, apesar de estimular a oxidação do succinato, não exerce efeito na cadeia de transporte de elétrons localizada entre o succinato e o oxigênio molecular.

Do exposto, e sabendo-se que o oxaloacetato exerce um importante papel de controle no metabolismo oxidativo *in vivo*, passamos a determinar os níveis de oxaloacetato formado na oxidação do succinato ativada pelo verapamil. Os resultados são mostrados na tabela VIII. Como pode ser observado, o nível de oxaloacetato foi reduzido em 33 vezes na presença de 330 μ moles de verapamil/mg de proteína, após incubação de 60 minutos.

É fato conhecido que o oxaloacetato é um potente inibidor competitivo da desidrogenase succínica (5, 16, 83, 115). Sob condições em que há acúmulo de oxaloacetato, a oxidação do succinato é inibida (133). O oxaloacetato se liga ao sítio de ligação do substrato, induzindo uma troca conformacional na enzima, transformando a forma ativa em inativa. O oxaloacetato pode ser considerado um modulador negativo da desidrogenase succínica (1). O nível de oxaloacetato controla a velocidade do consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas, tanto na presença de succinato como na malato. A remoção do oxaloacetato por transaminação com o glutamato, estimula a velocidade do consumo de oxigênio (1, 5, 16).

A diminuição dos níveis de oxaloacetato intramitocondrialmente, após o efeito do verapamil, tanto pode ser devido à sua remoção por estímulo da reação de transaminação com o glutamato, ou a sua descarboxilação formando piruvato, ou ainda por inibição da malato desidrogenase, diminuindo a síntese de oxaloacetato.

A tabela IX mostra que verapamil não exerce qualquer tipo de efeito sobre a malato desidrogenase isolada, enquanto que a aspartato aminotransferase foi inibida em apenas 15%, com concentração bastante elevada de verapamil. Apesar disso, os níveis de aspartato, após a respiração mitocondrial do succinato

TABELA VIII - Efeito do verapamil sobre os níveis de oxaloacetato.

Substrato	Verapamil μ moles/ mg de proteína	OAA formado
---	-0-	0
---	330	0
Succinato	-0-	$33,1 \times 10^{-5} M$
Succinato	330	$1,0 \times 10^{-5} M$

Sistema: Sobrenadante neutro da suspensão mitocondrial obtido como descrito em Materiais e Métodos. Ítem 2.2.13; tampão Tris acetato 0,05 M, pH 8,0; NADH 100 mM; enzima malato desidrogenase 200 unidades. Leitura em 340 nm em espectrofotômetro Varian 635 D. Volume final = 3,0 ml. Uma unidade = a quantidade de enzima que oxida 482 μ moles de NADH/min.

TABELA IX - Efeito do verapamil sobre a atividade da malato desidrogenase e aspartato amino transferase.

Enzima	Verapamil	% inibição
Malato desidrogenase	$1,37 \times 10^{-3} M$	0
Aspartato amino transferase	$6,5 \times 10^{-4} M$	14

Sistema de reação: descrito em Materiais e Métodos. Ítems 2.2.12 e 2.2.14, respectivamente.

mais glutamato e do malato mais glutamato, na presença de verapamil, mostraram-se diminuídos em relação ao controle, conforme demonstrado por Sakurada et al. (99). Determinações quantitativas realizadas por nós, confirmaram esses resultados (dados não mostrados). Também os níveis de piruvato apresentaram-se diminuídos na presença de verapamil, conforme demonstrado por Sakurada e colaboradores (99).

Kluppel et al. (51, 52) e Sakurada et al. (98) propuseram que o aumento da oxidação do succinato mitocondrial, na presença de verapamil e outros antiarrítmicos, é devido aos baixos níveis de OAA por um sistema de retro inibição, provocado pelo acúmulo de malato e insuficiência de NAD^+ , já que a reação está inibida nas condições mitocondriais, conforme observado nas figura 4 e tabelas II, III, IV e VI .

Do exposto acima e baseados nos resultados apresentados na tabela VIII, podemos propor que os baixos níveis de OAA, na presença de verapamil, atuam como "modulador positivo" da desidrogenase succínica, aumentando a velocidade de oxidação do succinato. Efeito semelhante foi observado com outro inibidor do sítio I, a rotenona (106).

3.6. Efeito do verapamil sobre a atividade ATPásica

O complexo ATPase em sistemas biológicos é um sistema complexo, possui um componente de membrana hidrofóbico F_0 , embebido na bicamada lipídica da membrana interna e um componente solúvel F_1 que cataliza tanto a síntese como a hidrólise de ATP (55, 71, 89). O componente hidrofóbico F_0 serve como canal para capturar e transportar prótons através da membrana (45, 130). F_1 e F_0 estão ligados através de duas proteínas: OSCP, proteína que confere sensibilidade a oligomicina (66, 105) e F_6 (46, 92). Estas duas últimas proteínas aparentemente não tem atividade catalítica, mas na sua ausência, F_1 torna-se frouxamente ligado a membrana, ocasionando vazamento de prótons, com conseqüente perda de energia (33). A enzima, quando ligada ao complexo hidrofóbico, requer fosfolipídeos para a sua atividade, é estável à baixa temperatura e é sensível a oligomicina e ao DCCD. O F_1 -isolado é insensível a esses inibidores, é ativo na ausência de lipídeos e é criossensível (89, 117).

O postulado central da hipótese quimiosmótica da fosforilação oxidativa é a existência de um gradiente eletroquímico de prótons (força próton motriz $\Delta\bar{\mu} H^+$), através da membrana mitocondrial (70).

Uma das técnicas que podem ser empregadas para estudar o desacoplamento da fosforilação oxidativa, consiste em medidas da atividade ATPásica, isto é, em medidas da hidrólise de ATP. A hidrólise pode ocorrer tanto em mitocôndrias acopladas como em mitocôndrias desacopladas.

Em mitocôndrias acopladas, a hidrólise do ATP é mais lenta e a energia resultante da quebra da ligação fosfato pode ser utilizada para reverter o fluxo de elétrons (55, 71). A atividade ATPásica gera uma ejeção ativa de prótons do meio intra para o extramitocondrial, formando um gradiente protônico, a exemplo do que ocorre quando os elétrons fluem dos substratos em direção ao oxigênio (55, 71).

Em mitocôndrias desacopladas, a atividade ATPásica não leva à formação de um gradiente protônico, pois não há energização da membrana. O efeito mais comum dos desacopladores é o de aumentar de tal maneira a permeabilidade da membrana interna das mitocôndrias a prótons, a ponto de tornar impossível o estabelecimento de um gradiente (55, 71).

No presente trabalho verificou-se o efeito do verapamil sobre a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas, em mitocôndrias rompidas por congelamento e em F_1 -isolado. Em mitocôndrias intactas, a atividade ATPásica foi medida paralelamente na presença de FCCP e oligomicina, tanto na presença como na ausência de verapamil e em relação ao controle (ausência de drogas). A atividade ATPásica em mitocôndrias intactas e em mitocôndrias rompidas por congelamento foi determinada pela liberação do fosfato inorgânico. Em mitocôndrias rompidas por congelamento foi usado um sistema regenerador de ATP, contendo íons Mg^{2+} , já que o rompimento das mitocôndrias resulta na perda do Mg^{2+} endógeno, necessário à atividade enzimática.

A figura 9 mostra os resultados do efeito do verapamil sobre a atividade ATPásica empregando os três tipos de preparações mencionados.

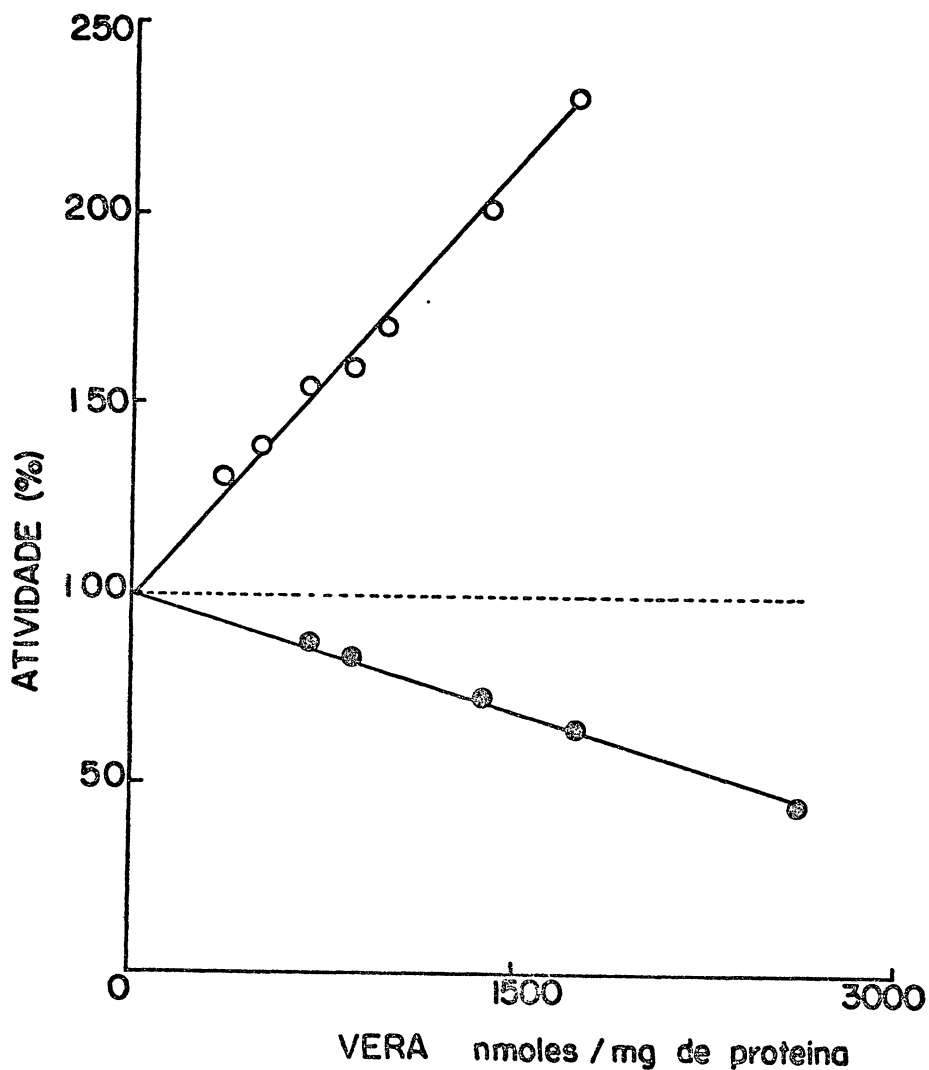


FIGURA 9 - Efeito do verapamil sobre a atividade ATP-ásica mitocondrial..

(○) Mitocôndrias intactas. Sistema conforme descrito em Materiais e Métodos. Ítem 2.2.15.a. 100% de atividade corresponde a 62 nmoles de Pi liberado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Média de 4 experimentos. (●) Mitocôndrias rompidas por congelamento. Sistema conforme descrito em Materiais e Métodos. Ítem 2.2.15.b. 100% de atividade corresponde a 2,49 μmoles de Pi liberado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Média de 2 experimentos.

----- F₁ isolado. Sistema conforme descrito em Materiais e Métodos. Ítem: 2.2.15.c. 100% de atividade corresponde a 19,14 μmoles de ATP hidrolisado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Média de 5 experimentos.

Como pode ser observado na figura 9, em mitocôndrias intactas, houve um estímulo de 202% da atividade ATPásica com uma concentração de verapamil de 1,4 μ moles/mg de proteína. A atividade ATPásica em mitocôndrias intactas é baixa. O estímulo de duas vezes causado pelo verapamil, não significa tão alta atividade hidrolítica da ATPase, já que o estímulo causado pelo FCCP (desacoplador clássico da fosforilação oxidativa) foi de oito vezes em relação ao controle. Por outro lado, verapamil incubado junto com FCCP, impediu parcialmente o efeito estimulante do FCCP, bem como impediu o efeito inibidor da oligomicina, quando incubado com a mesma (resultados não mostrados).

Em mitocôndrias rompidas por congelamento a atividade ATP hidrolase já está ativada; na concentração de 1,4 μ moles/mg de proteína inibiu em 27% a atividade ATPásica.

Em virtude dos resultados obtidos, foi testado o efeito do verapamil sobre a atividade ATPásica em F_1 purificado, usando meio de incubação conforme descrito em Materiais e Métodos. Em concentrações de verapamil de até 20 μ moles/mg de proteína, não houve alteração na atividade específica da enzima. Este resultado indica que verapamil não exerce qualquer tipo de efeito sobre o sítio catalítico da enzima.

Do exposto acima podemos deduzir que verapamil, atua sobre os componentes de membrana do complexo ATPásico produzido alterações, provavelmente sobre a fração lipídica, já que é um composto lipossolúvel e que, conforme demonstrado, não atua no sítio catalítico que é hidrossolúvel.

Estas alterações poderiam afetar a permeabilidade da membrana dissipando o gradiente eletroquímico e conseqüentemente aumentando a atividade ATPásica em mitocôndrias acopladas.

É possível que verapamil, atuando sobre a porção lipídica da membrana mitocondrial, produza alguma alteração conformational no complexo F_0F_1 ATPase, o que justificaria a alteração da sensibilidade da ATPase à oligomicina e ao FCCP, na presença do verapamil.

3.7. Efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial.

O potencial de membrana é o maior componente do gradiente

te eletroquímico de prótons e a medida deste potencial é essencial para entender o mecanismo de fosforilação oxidativa e o transporte de íons em mitocôndrias (2, 70,111).

Este potencial de membrana pode ser gerado: a) pelas enzimas de oxidorredução da cadeia respiratória; b) pela $H^+ATPases$. A força próton-motriz ($\Delta\mu H^+$) gerada pelos sistemas redox da cadeia respiratória é usada para reverter a reação ATPase (isto é: para sintetizar ATP). Como a capacitância elétrica da membrana é menor do que a capacitância tampão de pH das soluções separadas por esta membrana, o potencial elétrico ($\Delta\Psi$) concorre mais do que o Δ pH para o $\Delta\bar{\mu}H^+$ gerado pelo transporte de H^+ , através da membrana. Assim o $\Delta\Psi$ pode ser a forma primária do $\Delta\bar{\mu}H^+$ (70, 111).

O potencial de membrana ($\Delta\Psi$) neste trabalho foi determinado pela captação da safranina. A safranina é um corante carregado positivamente e apresenta características espectrais que variam em função da sua concentração. As diferenças espectrais são devidas ao aumento da concentração, agregação ou "stacking" da safranina do lado da matriz mitocondrial. A agregação se deve à associação dos radicais positivos da safranina com poliânions ou sítios aniônicos, localizados na porção hidrofóbica da membrana interna (2,131).

A safranina move-se do lado externo para o espaço interno da matriz sob a influência do $\Delta\Psi$. Esta propriedade da safranina pode ser usada para medir o estado energizado em mitocôndria, obtido ou pela oxidação de substratos ou pela hidrólise do ATP e as variações espectrais podem ser usadas como medida quantitativa do potencial de membrana.

A figura 10 ilustra a influência de concentrações crescentes do medicamento sobre o potencial de membrana, induzido pelo succinato, ou pela hidrólise do ATP, usando mitocôndrias intactas de coração. Os dados de $\Delta\Psi$ em mV foram obtidos a partir da curva padrão apresentada na figura 2.

Pequenas variações de potencial foram observadas com baixas concentrações do antiarrítmico. Como se observa na figura 10, são concentrações acima de 1 250 nmoles por mg de proteína, produzem uma queda mais rápida do potencial. Com concentrações de VERA de até 600 nmoles/mg de proteína, o potencial manteve-se

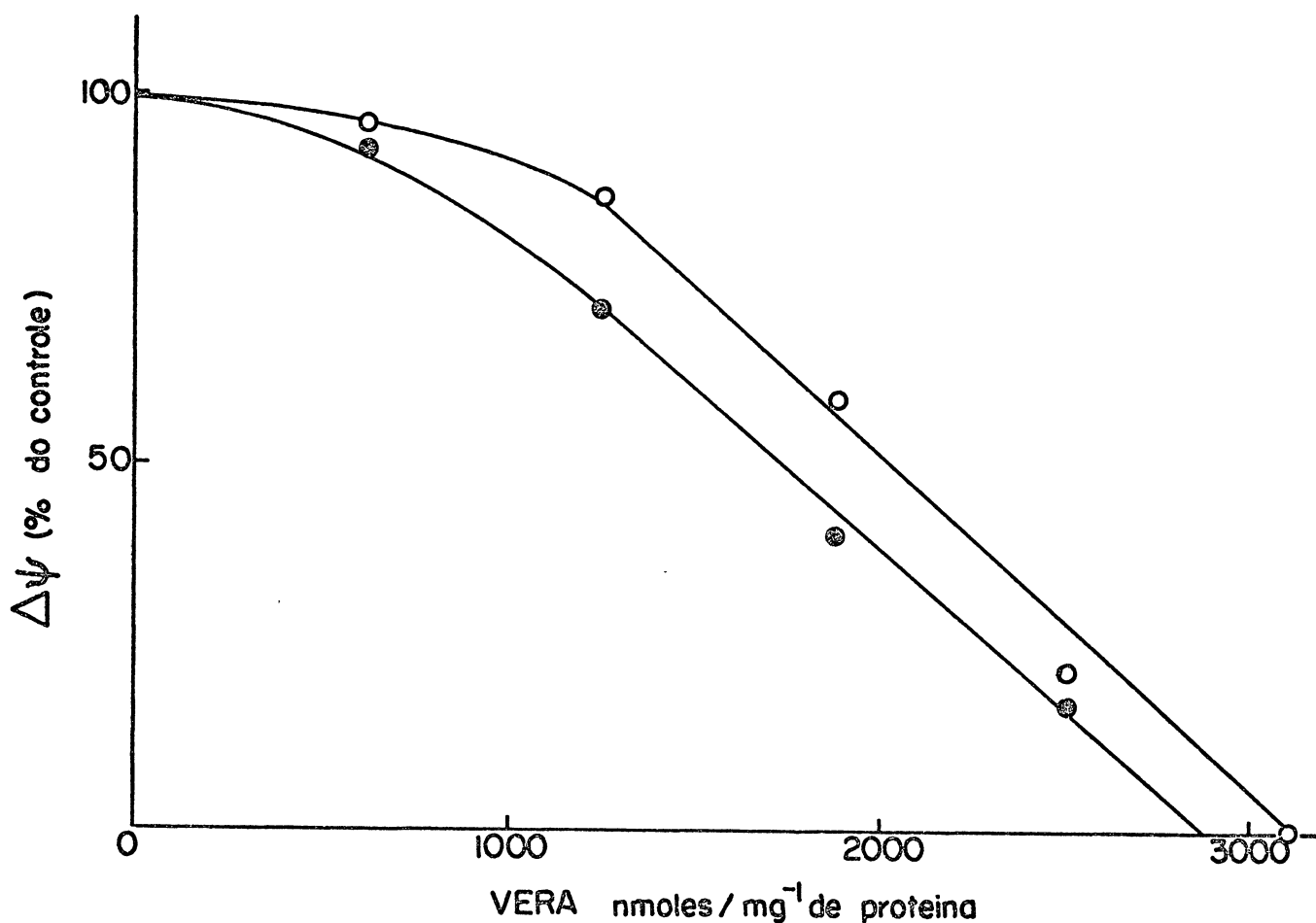


FIGURA 10 - Efeito do verapamil sobre o potencial de membrana.

Sistema: Sacarose 0,2 M, HEPES 20 mM pH 7,2, EDTA 0,38 mM, KCl 20 mM, safranina 10 μ M, proteína mitocondrial 0,8 mg/ml, suplementada com rotenona 4,2 μ M, oligomicina 2 μ g, NaCN 1 mM. Volume final 3 ml. Temperatura 28°C. As alterações na densidade óptica foram registradas em 511-533 nm. A reação foi iniciada pela adição do substrato (●) succinato de sódio 5 mM. 100% corresponde a 196 mV. (o) ATP 1,67mM. 100% corresponde a 226 mV. Os cálculos em $\Delta\Psi$ foram feitos com base na curva de calibração mostrada na figura 2.

Estes resultados correspondem a média de 5 experiências independentes.

acima de 90%, independente da fonte de energia empregada; 50% de queda de potencial foi obtida com 1,78 μ moles/mg de proteína, quando a fonte de energia era o succinato e 2,03 μ moles/mg de proteína, usando ATP como fonte de energia. Concentrações superiores a 2,8 μ moles/mg de proteína, foram necessários para o colapso total do potencial de membrana, dependente da oxidação do succinato. Com ATP, foi necessário 3,125 μ moles de verapamil /mg de proteína, para obter 100% de inibição deste potencial.

3.8. Efeito sobre a fluidez da membrana mitocondrial interna

As mitocôndrias são impermeáveis a íons K^+ . A restrição da permeabilidade a íons K^+ é essencial à função mitocondrial (60).

De acordo com Pressman (88), a impermeabilidade da membrana mitocondrial interna a íons potássio é devida a bicamada fosfolipídica, a qual é energeticamente desfavorável à penetração de cátions, com cargas concentradas, na fase apolar da bicamada lipídica da membrana interna. No complexo valinomicina- K^+ a carga está distribuída dentro da molécula e a característica apolar da parte externa da valinomicina torna o complexo lipossolúvel, ganhando mobilidade dentro da fase apolar da membrana. O complexo se dissocia na superfície oposta da membrana. Desta maneira o transporte de K^+ é determinado pela velocidade com que ele se difunde na membrana e pela quantidade de valinomicina disponível. Isto significa que qualquer substância que altere a fluidez da porção hidrocarbonado dos fosfolipídeos da membrana modificará a velocidade de transporte do K^+ , através da membrana, mediado por valinomicina.

Em mitocôndrias energizadas, na presença de valinomicina e de anion permeante (acetato ou fosfato) há uma rápida captação de K^+ e inchamento ou "swelling" mitocondrial, que pode ser determinado espectrofotometricamente (60). A velocidade do "swelling" mitocondrial nesta situação reflete a velocidade com a qual o K^+ é captado. Alteração desta velocidade, sobre influência da droga ou de algum outro agente estranho ao sistema de reação, indiretamente dará indícios de modificações da fluidez dos lipídios nesta membrana.

As curvas ilustradas na figura 11 mostram o efeito de

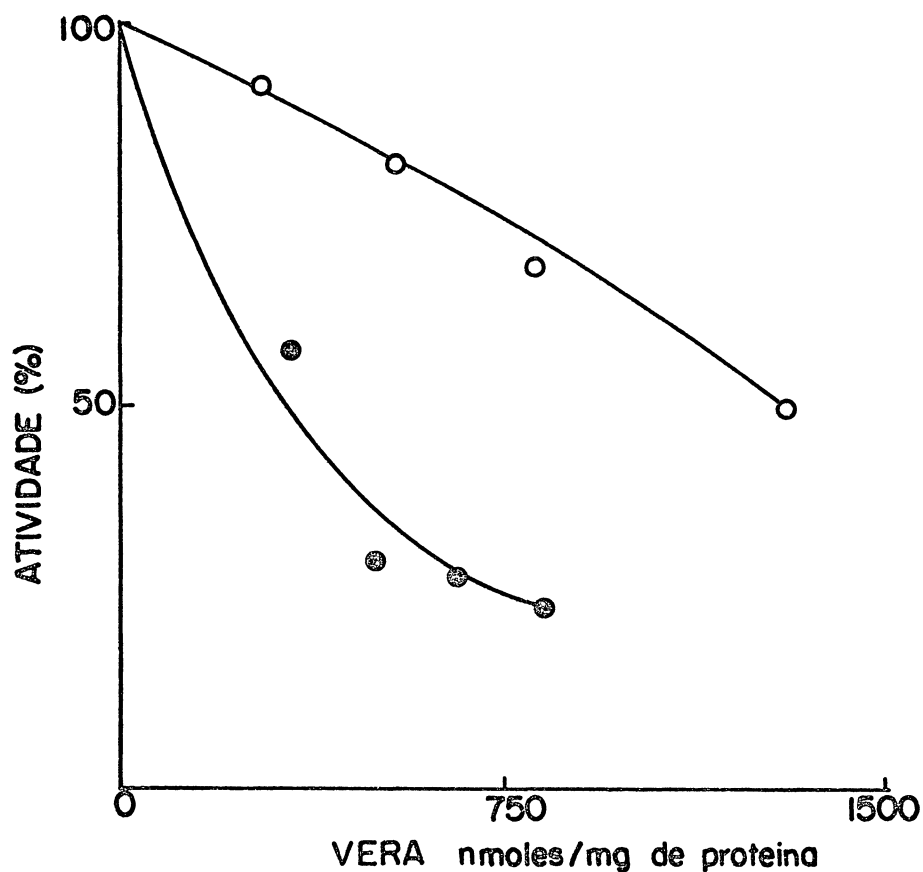


FIGURA 11 - Efeito do verapamil sobre o "swelling" mitocondrial induzido por valinomicina - K^+ .

Sistema: Sacarose 243 mM, KCl 10 mM, tris-fosfato 1 mM, tampão fosfato de sódio 4 mM, pH final 7,0; valinomicina 1,2 $\mu\text{g/ml}$, rotenona 1 μM , KCN 1 mM, FCCP 0,3 μM . A reação foi iniciada pela adição do substrato. Leitura em 346 nm . Temperatura: 28°C. (●) Succinato de sódio, na presença de 0,6 mg de proteína mitocondrial. 100% de atividade: $\Delta\text{DO}/\text{min.} = 0,190$. (o) ATP, na presença de 0,375 mg de proteína. 100% de atividade. $\Delta\text{DO}/\text{min} = 0,224$. Os resultados correspondem a média de dois experimentos.

concentrações crescentes da droga, no "swelling" mitocondrial, induzido por valinomicina- K^+ na presença de fosfato de sódio, como anion permeante e usando succinato ou ATP, como fontes de energia. Os dados percentuais correspondentes a $\Delta DO/min$ mostram inibição do "swelling". 50% de inibição foi atingido com 315 η moles/mg de proteína, tendo-se o succinato como fonte de energia. Na presença de ATP a inibição foi bem mais lenta, obtendo-se apenas 10% na presença de 300 η moles/mg de proteína. Paralelamente, foi determinado o controle respiratório (RC) com succinato, o qual estava acima de 5. Foram necessários 1 330 η moles/mg de proteína para atingir 50% de inibição, tendo-se a hidrólise do ATP como fonte de energia.

Esses resultados de inibição da velocidade do "swelling" são uma consequência da diminuição da mobilidade do complexo valinomicina - K^+ , o que nos leva a crer em uma alteração na fluidez da bicamada lipídica mitocondrial, por interferência da droga.

Nota-se também que o "swelling" dirigido pelo succinato é muito mais sensível à ação da droga do que aquele dirigido pelo ATP. É provável que este efeito seja uma consequência da eficiência termodinâmica das reações. Sob condições ótimas, a relação $K^+/\sim P$ pode ser de 3 quando energizada pela oxidação do substrato e de 7 quando energizada pelo ATP (10). Se 7 K^+ são translocados por cada ATP hidrolizado, nos parece coerente que, na presença da droga, o grau de inibição seja menor com ATP. Além disso, verapamil atua como um desacoplador fraco e na concentração de 750 η moles/mg de proteína a eficiência termodinâmica deve ser elevada, enquanto que o "swelling" já apresenta 25% de inibição na presença de ATP. Estes resultados indicam mais uma ação primária da droga sobre a fração lipídica da membrana mitocondrial, do que propriamente um efeito no sistema gerador de energia.

3.9. Efeito sobre o transporte de cálcio mitocondrial

Está bem estabelecido que as mitocôndrias de todos os tecidos tem a capacidade de transportar e acumular Ca^{++} e que a entrada de cálcio na mitocôndria é dependente da energia gerada pelo transporte de elétrons ou da hidrólise do ATP (57, 122, 123).

O transporte de Ca^{++} em mitocôndrias é um processo cíclico e envolve dois sistemas distintos: influxo e efluxo.

O influxo é eletroforético e depende da força próton-motriz (6, 17, 80, 81, 87, 114).

O efluxo é mediado por um sistema separado do influxo (3, 17, 87, 114). Prova essencial disto é a inibição pelo vermelho de rutênio, que bloqueia completamente o uniporte eletroforético (6, 80, 87), sem inibir o efluxo. Provas experimentais tem demonstrado que o efluxo do Ca^{++} é feito por um sistema antiporte $\text{Ca}^{++}/2 \text{Na}^+$ em mitocôndrias de coração e de tecidos excitáveis (6, 14, 15, 80). Quando o vermelho de rutênio é adicionado a estas mitocôndrias, após o acúmulo de Ca^{++} e em meio de reação livre de sódio, somente um lento efluxo de cálcio é observado. A adição de 10 mM de NaCl aumenta a velocidade do efluxo em torno de 10 vezes (14, 15).

Tem sido sugerido que verapamil bloqueia o influxo de cálcio transmembrana em célula muscular cardíaca (26, 67, 75, 77, 78, 79).

Há portanto grande interesse em conhecer a ação do antiarrítmico sobre a captação e liberação do cálcio mitocondrial.

Com o objetivo de esclarecer estes aspectos foram realizados experimentos que nos permitiram determinar o influxo e o efluxo do Ca^{2+} , através de alterações espectrais, usando Arsenazo III (102) como indicador.

A figura 12A ilustra a velocidade de captação e liberação do Ca^{++} , na presença do indicador Arsenazo III. Os resultados estão expressos em $\mu\text{moles Ca}^{++} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ e em relação a concentrações crescentes da droga. A figura 12 B apresenta esses resultados em porcentagem de atividade, relativa ao controle (ausência da droga).

Esses resultados mostram que o efluxo do Ca^{++} é bem mais sensível à ação do antiarrítmico do que o influxo. A inibição de 50% do influxo foi obtido com aproximadamente 1000 $\mu\text{moles}/\text{mg}$ de proteína, enquanto que o efluxo antiporte $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$ na presença de R R apresentou 50% de inibição, com apenas 480 $\mu\text{moles}/\text{mg}$ de proteína. O medicamento interfere muito pouco na liberação do Ca^{++} induzida por FCCP e só em altas concentrações. É interes-

sante notar que 165 η moles/mg de proteína são suficientes para produzir 20% de inibição do efluxo de Ca^{++} , enquanto que a captação é inibida em apenas 8% e o potencial de membrana nesta faixa apresenta-se inalterado. Não dispondo de equipamento adequado para medir simultaneamente o transporte de Ca^{++} e o potencial de membrana, tentamos relacionar a velocidade do transporte de Ca^{++} com os resultados de potencial de membrana apresentados na figura 10, já que o tempo de incubação da mitocôndria com a droga para medida do influxo do Ca^{++} , ou medida de $\Delta\Psi$ são similares (30 segundos a 1 minuto). Com 750 η moles/mg de proteína, quando os resultados mostram 39% de inibição do influxo do Ca^{++} e 69% do efluxo, o potencial de membrana ainda é de 90%. Acreditamos portanto que esses resultados são consequência direta da ação da droga sobre o influxo e sobre o efluxo do Ca^{++} , independente de interferência na força próton motriz.

Experiências prévias foram realizadas com $^{45}\text{Ca}^{++}$, utilizando mitocôndrias de fígado e o grau de inibição de captação de Ca^{++} foi semelhante ao obtido com coração, usando arsenazo III.

Verapamil, como antagonista do Ca^{++} parece ser um inibidor mais seletivo do antiporte $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$, já que 50% de inibição do antiporte na presença de R R foi obtido com (480 η moles / mg de proteína), menos de metade da concentração que produziu 50% de inibição do uniporte (1000 η moles/mg de proteína).

Também o efluxo passivo na presença de R R e ausência de Na^+ , o qual é muito lento, mostrou-se inibido. Por outro lado o efluxo provocado pelo desacoplador FCCP, mostrou um grau bem menor de inibição, demonstrando que o uniporte só é sensível a ação do medicamento em muito altas concentrações, confirmando uma seletividade da ação do verapamil para o efluxo no sistema antiporte. Vaghy et al. (119) tem indicado diltiazem, e outras drogas antagonistas do Ca^{++} , entre elas o verapamil, como inibidores seletivos do antiporte $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$ em mitocôndrias de coração, na mesma proporção em que o R R é inibidor do uniporte. Os mesmos autores afirmam não haver efeito dessas drogas nos processos de captação do Ca^{++} e liberação provocada por FCCP. Estas afirmações nos levam a concluir que as concentrações do medicamento por eles usadas, são mais baixas do que as mostradas neste trabalho, o que é de se esperar já que eles ob-

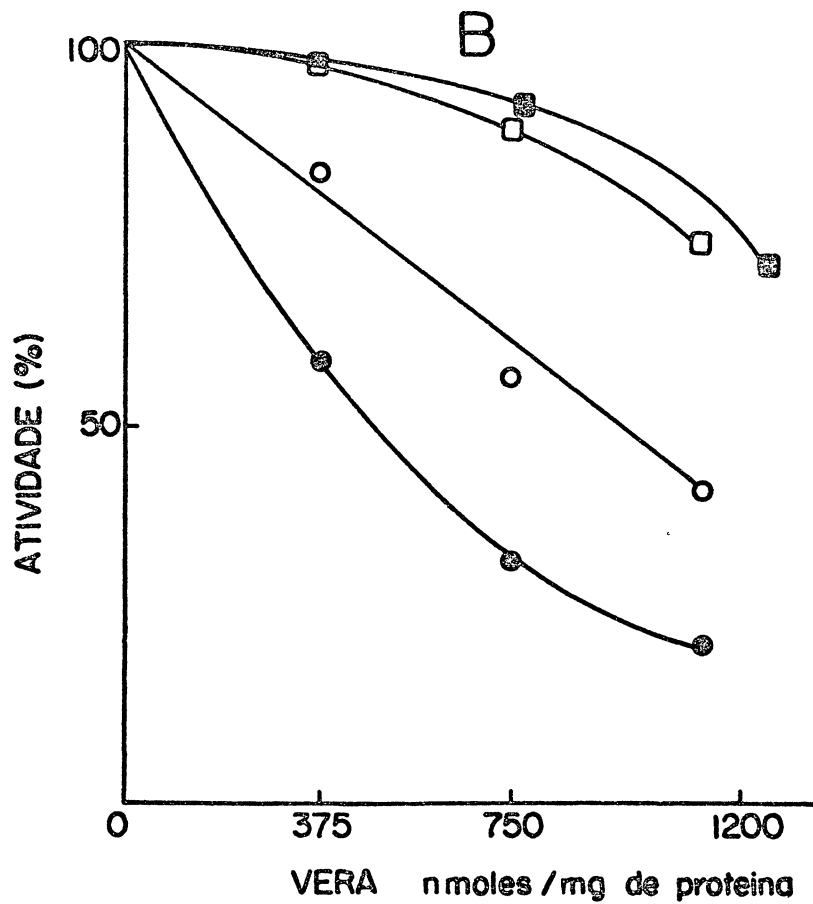
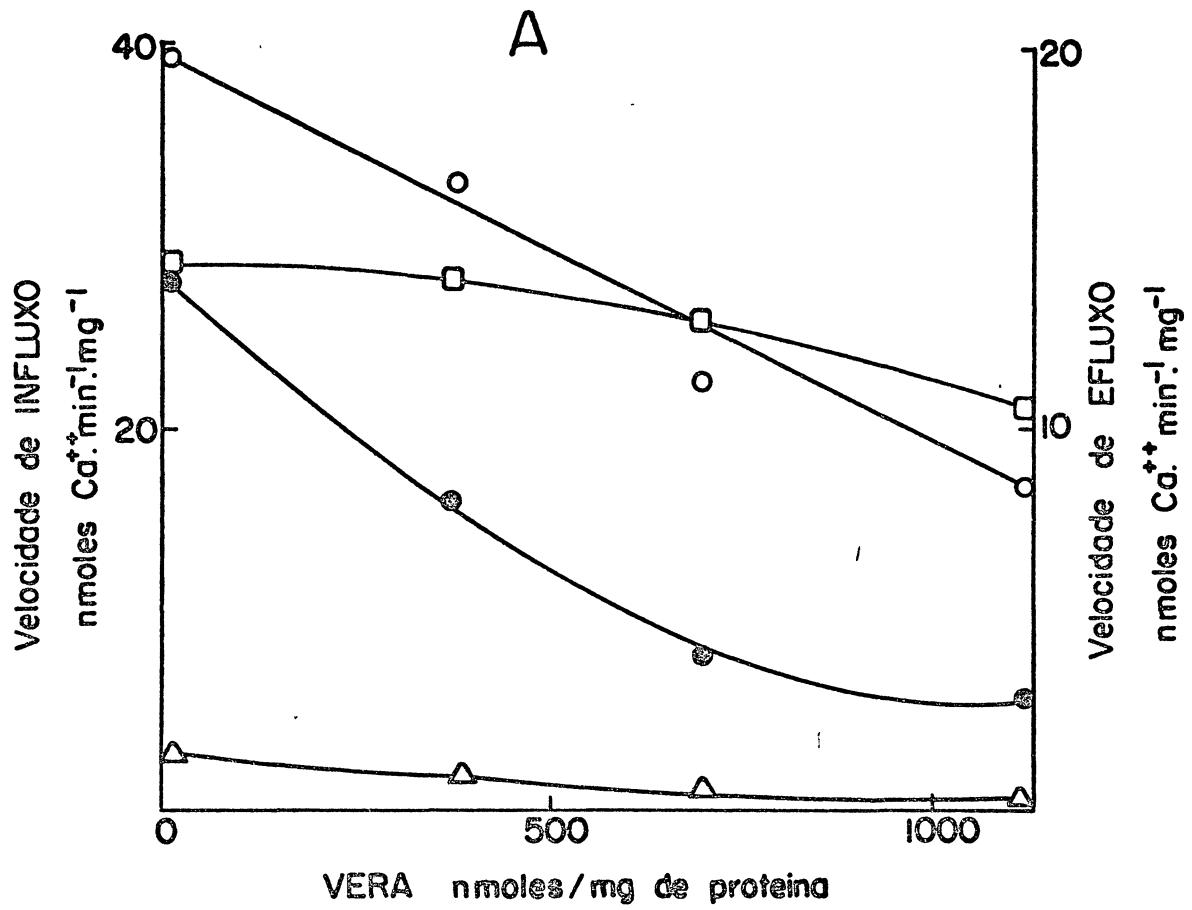


FIGURA 12A - Efeito do verapamil sobre o transporte mitocondrial de cálcio.

Sistema: Conforme descrito em Materiais e Métodos. Ítem 2.2.8. (o) Influxo de Ca^{2+} após a adição de 5 mM de succinato de potássio. (□) Efluxo de Ca^{2+} após a adição de FCCP 0,3 μM . (●) Efluxo de Ca^{2+} após a adição de 0,5 μM de RR e 10 mM de NaCl (Δ) Efluxo de Ca^{2+} na presença de RR. Estes resultados correspondem a média de 3 experiências.

FIGURA 12B - (o) (□) e (●) dados obtidos a partir da figura 12A. (■) potencial de membrana. Dados obtidos a partir da figura 10.

tiveram 50% de inibição do antiporte $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^{+}$, com concentração de verapamil de 150 μM (única concentração citada).

3.10. Efeito sobre a estrutura mitocondrial.

De acordo com Greem et al. (35) e Penniston et al. (85) as cristas da membrana interna mitocondrial podem apresentar três estados conformacionais distintos: 1) estado conformacional não energizado (NE), que pode ser considerado um estado conformacional relaxado; 2) estado conformacional energizado (E), o qual é gerado pelo transporte de elétrons ou pela hidrólise do ATP; 3) estado conformacional torcido (ET), que é a transição do estado energizado, induzido pelo fosfato inorgânico em meio contendo sacarose ou altas concentrações salinas. Nos estados E e ET as cristas mitocondriais apresentam-se numa conformação de tensão. A identificação dos três estados conformacionais, pode ser facilmente diagnosticado através da microscopia eletrônica, pelas características da respectiva membrana.

A forma que a membrana assume, ou seja, as trocas configuracionais na membrana, são determinadas por 2 fatores: a geometria das unidades repetidas que forma a membrana contínua e forças externas atuando na membrana, Green et al. (35). Há assim três formas configuracionais de cristas: 1 - ORTODOXA (cristas não agrupadas) as cristas são espaçadas e não há interação direta entre uma crista e as cristas vizinhas. 2 - AGREGADAS (cristas agrupadas) e 3 - FRAGMENTADAS (cristas agrupadas e rearranjadas por fragmentação, para túbulos). A forma ORTODOXA é encontrada nas mitocôndrias *in situ* e as outras duas formas em mitocôndrias isoladas. Como cada modo configuracional pode existir nos três estados conformacionais citados, há 9 possíveis estados para as cristas.

A microscopia eletrônica foi realizada neste trabalho, com a finalidade de investigar as possíveis alterações morfológicas em mitocôndrias de coração de rato E e NE sob o efeito do verapamil. Foram testadas duas concentrações: a concentração máxima usada em respirometria 660 $\eta\text{moles/mg}$ de proteína e a concentração média 330 $\eta\text{moles/mg}$ de proteína.

A figura 13 A e B mostra as micrografias dos controles (ausência da droga) na forma conformacional NE e E respectiva-

mente. Pelas condições de isolamento e fixação, as cristas mitocondriais na figura 13 A apresentam-se no estado conformacional NE e na forma AGREGADA (NEag), e na figura 13 B na conformação E na forma AGREGADA (Eag). As mitocôndrias Eag são caracterizadas por membrana fortemente corada e a espessura das cristas é aparentemente o dobro da NE.

A figura 14 corresponde a micrografias de mitocôndrias no estado conformacional NE, tratadas com verapamil em diferentes tempos de incubação. A figura 14 A mostra as mitocôndrias no tempo zero de incubação e tratadas com VERA 330 η moles/mg de proteína. Uma análise desta micrografia, em relação ao controle NE, mostra alterações morfológicas nas cristas da membrana interna, que apresentam-se mais espaçadas, rompidas e menos densas. A maioria delas apresentam a membrana externa rompida. A figura 14 B: 10 minutos de incubação na presença de VERA 330 η moles/mg de proteína. Além das alterações morfológicas já citadas na figura 14 A, as mitocôndrias apresentam-se aglutinadas, ou empacotadas, comprimidas umas às outras, havendo alterações configuracionais generalizadas. A figura 14 C: tempo zero de incubação na presença de VERA 660 η moles/mg de proteína. As alterações morfológicas são maiores; apresentam "swelling" mitocondrial e mitocôndrias com membranas interna e externa rompidas. A figura 14 D: 10 minutos de incubação com VERA 660 η moles/mg de proteína. As alterações morfológicas são completas, com rompimento das membranas e esvaziamento das cristas.

Na figura 15 estão ilustradas as micrografias de mitocôndrias no estado conformacional E e tratadas com verapamil, em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação. A fonte de energia foi o α KG. A figura 15 A, corresponde ao tempo zero de incubação na presença de VERA 330 η moles/mg de proteína. Como pode ser verificado, se comparada ao controle E, apenas algumas mitocôndrias apresentam um espaçamento maior entre as cristas. De uma maneira geral não há alterações morfológicas. Figura 15 B: 10 minutos de incubação na presença de VERA 330 η moles/mg de proteína. As alterações morfológicas são marcantes em relação ao tempo de incubação, nas mesmas condições. Aparece esvaziamento das cristas da membrana interna, estando grande parte das mitocôndrias com ambas as membranas fragmentadas. A figura 15 C: tempo zero de incubação na presença de VERA 660 η moles/mg de proteína. Uma a-

nálise desta micrografia demonstra que temos mitocôndrias no estado conformacional E_g iguais ao controle e outras completamente rompidas. Figura 15 D: 10 minutos de incubação na presença de 660 η moles/mg de proteína. Apresentam alterações morfológicas intensas, em geral com fragmentação das cristas e da membrana externa.

Dos resultados aqui apresentados, podemos concluir que o efeito da droga é potencializado na ausência de substrato exógeno. A energização protege a mitocôndria contra os efeitos deteriorantes do medicamento sobre a morfologia mitocondrial. O efeito depende da concentração e do tempo de incubação. As alterações na morfologia são maiores em relação ao tempo de contato da mitocôndria com a droga, do que em relação a dose propriamente dita, 330 η moles/mg de proteína não afetam a morfologia mitocondrial no tempo zero de incubação, quando no estado E e o efeito de 660 η moles/mg de proteína é parcial, apresentando ainda grande parte das mitocôndrias com aspectos morfológicos iguais ao normal. Após 10 minutos de incubação, mesmo na forma conformacional E, parte das mitocôndrias apresentam as membranas interna e externa rompidas.

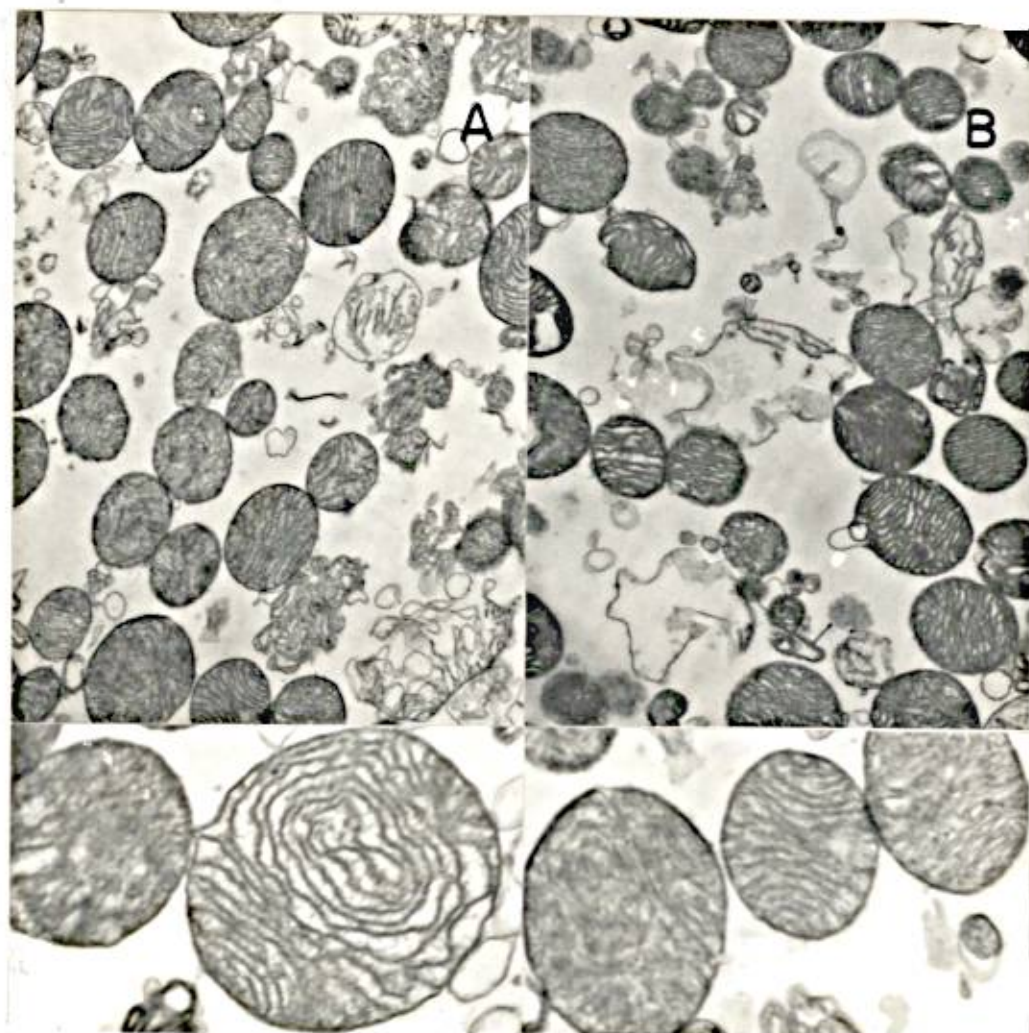


FIGURA 13 - Micrografias de mitocôndrias de coração de rato usadas como controle.

Sistema: Conforme descrito em Materiais e Métodos.

Aumentos: 15.624 e 31.248 vezes

A: desenergizadas

B: energizadas com α -cetoglutarato.

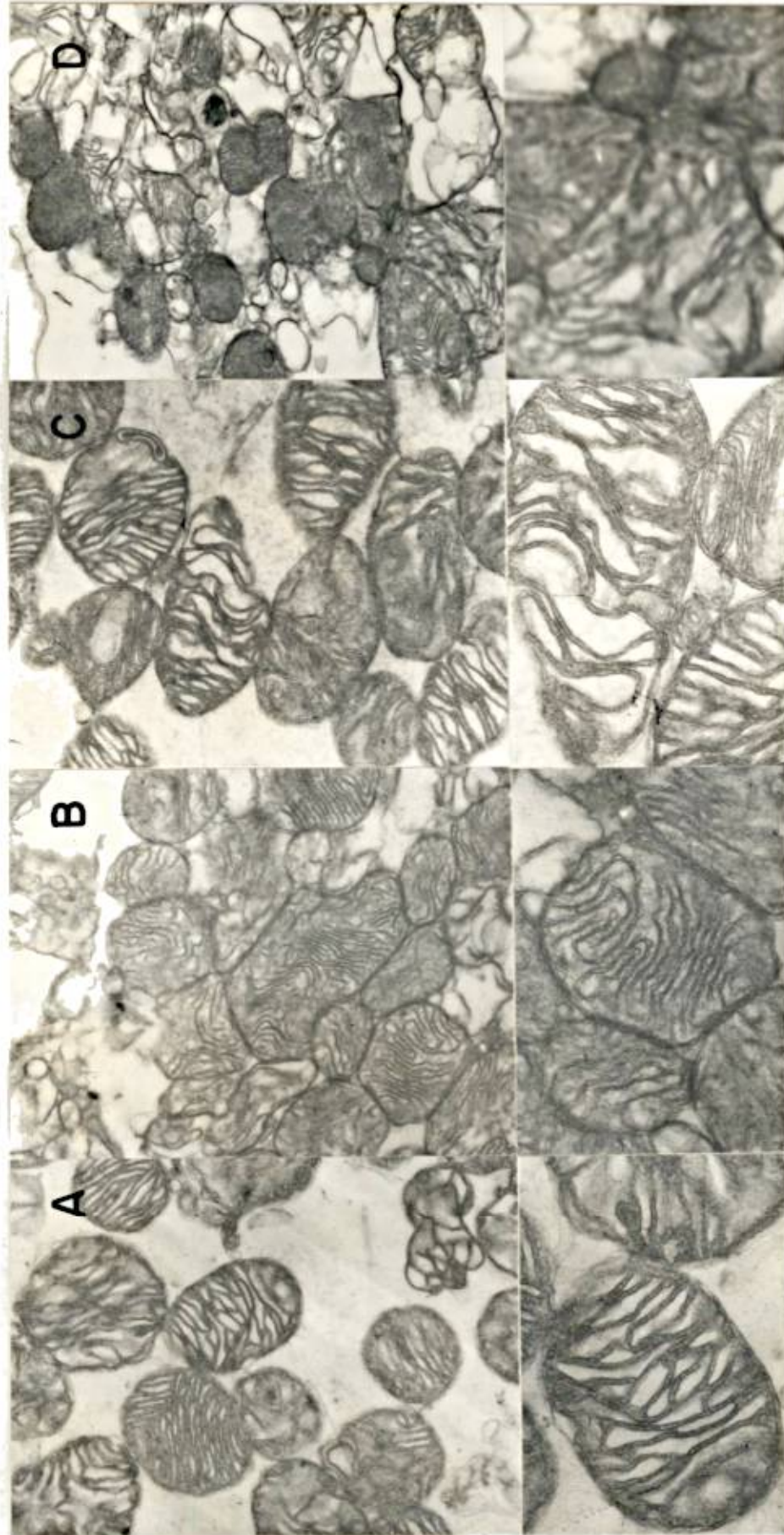


FIGURA 14 - Efeito do verapamil sobre a morfologia de mitocôndrias desenergizadas.

Sistema: Conforme descrito em Materiais e Métodos.

A e B: 330 μmoles de VERA/mg de proteína, com incubação de zero e de 10 minutos respectivamente.

C e D: 660 μmoles de VERA/mg de proteína, com incubação de zero e de 10 minutos respectivamente.

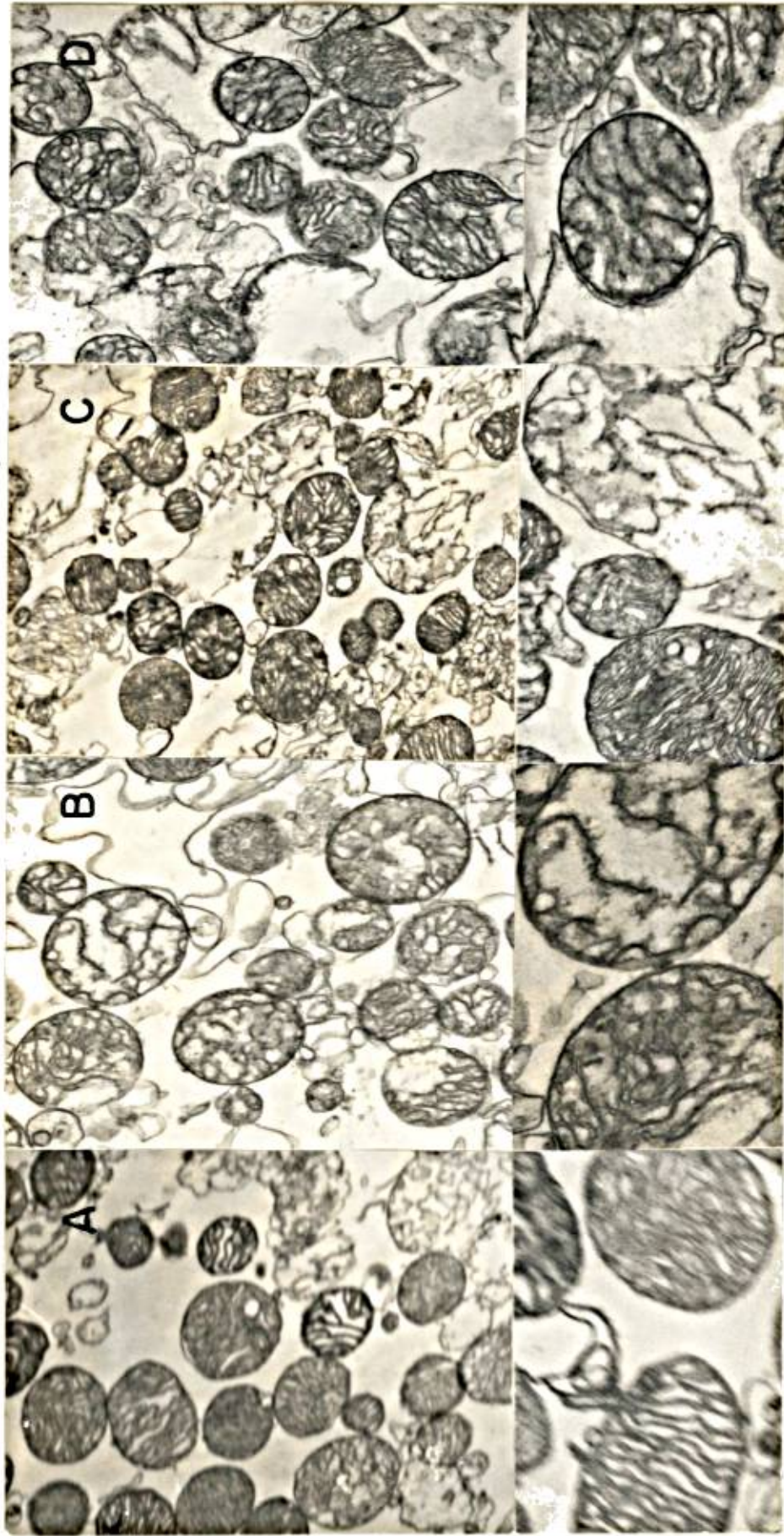


FIGURA 15 - Efeito do verapamil sobre a morfologia de mitocôndrias energizadas com α -cetoglutarato.

Sistema: Conforme descrito em Materiais e Métodos.

A e B: 330 nmoles de VERA/mg de proteína, com incubação de zero e de 10 minutos respectivamente.

C e D: 660 nmoles de VERA/mg de proteína, com incubação de zero e de 10 minutos respectivamente.

4. DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitem melhor visualização da ação do verapamil sobre as diversas funções mitocondriais. Este estudo, onde foram utilizados vários sistemas mitocondriais, veio demonstrar a existência de efeitos ainda desconhecidos, bem como evidenciar novos aspectos sobre os efeitos já conhecidos. A interrelação entre os resultados obtidos formam um quadro complexo. Alguns efeitos divergentes podem ser resultantes de vários fatores interligados, fatores esses que se fazem sentir em intensidades diferentes e que dependem especialmente das condições impostas a organela.

Os efeitos já conhecidos em mitocôndrias isoladas foram descritos pela primeira vez por Haas e Hartfelder (36), que obtiveram 90% de inibição na respiração do succinato, num tempo de incubação de 60 minutos, usando uma concentração de verapamil de 10^{-3} M. Nossos resultados apresentados na figura 6 mostram um estímulo de 371% com $1,15 \times 10^{-3}$ M. Esta discrepância de resultados pode ser explicada pelo meio de incubação utilizado por esses autores (sacarose 0,25M em tampão fosfato de potássio 17 mM), tendo como uma possível consequência, o "swelling" mitocondrial. O efeito inibidor sobre o estado III da respiração, o estímulo da velocidade do estado IV e diminuição dos valores de RC (tabela I) estão em concordância com os efeitos recentemente relatados por Vaghy et al. (120) dentro das concentrações e condições empregadas. São também condizentes com os resultados obtidos por Rodrigues et al. (95) em mitocôndrias isoladas de coração, após a administração endovenosa de verapamil.

Entre os novos aspectos trazidos à luz neste trabalho, cita-se: a) o efeito inibidor da velocidade respiratória sobre os substratos NADH-dependentes; b) efeito estimulante na velocidade de oxidação do succinato; c) efeito sobre o nível de oxaloacetato; d) efeito sobre as atividades enzimáticas; e) efeito sobre a atividade ATPásica; f) efeito sobre o potencial de membrana; g) efeito inibidor do influxo de Ca^{++} em concentrações inferiores às anteriormente relatadas, além do efeito agora já conhecido (119) sobre o efluxo de Ca^{++} ; h) efeito inibidor do "swelling" induzido por valinomicina- K^+ ; i) efeito sobre a estrutura mitocondrial.

Efeito sobre as atividades enzimáticas

Os estudos das atividades enzimáticas ligadas a cadeia de transporte de elétrons, revelaram um efeito inibidor sobre a atividade da NADH-oxidase, da NADH-citocromo c redutase e da NADH coenzima Q redutase. Não houve efeito sobre a succinato desidrogenase, succinato CoQ redutase, succinato citocromo c redutase, citocromo oxidase e NADH ferricianeto redutase.

Estes resultados falam a favor de um sítio de ação para este composto, entre NADH e Coenzima Q porque: a) existe inibição dos três diferentes sistemas mitocondriais empregados, mostrando inibição na atividade NADH-oxidase; b) existe inibição da NADH-cit c redutase nos dois sistemas utilizadas; e c) há inibição da NADH-CoQ redutase.

Resultados que indicam ser este local de ação entre o NADH e a flavoproteína, antes da coenzima Q: a) a reversão da inibição da NADH-oxidase pelo azul de metileno e pelo ferricianeto; b) a ausência de efeito sobre a atividade enzimática NADH-ferricianeto redutase; c) a inibição da atividade NADH CoQ redutase.

Efeito independente sobre NADH-oxidase e NADH-citocromo c redutase

Analisando os resultados obtidos sobre os três tipos de preparações usados para medida da atividade de NADH-oxidase, podemos verificar que o efeito inibidor foi mais intenso em partículas submitocondriais, obtidas por sonicação (tabela II), 94% de inibição com 650 μ moles de VERA/mg de proteína, do que em partículas EP₁ (figura 7), 44% de inibição com 650 μ moles/mg de proteína, cuja preparação foi submetida a tratamento com detergentes, apresentando uma concentração fosfolipídica mais baixa. No terceiro tipo de preparação, mitocôndrias rompidas por congelamento (tabela III) foram usadas e o grau de inibição foi menor em relação a concentração da droga, cujo resultado é atribuído ao menor tempo de contato entre a droga e os sistemas enzimáticos. Esta observação pode também ser comprovada através das alterações morfológicas (figuras 14 e 15), apresentadas pelas mitocôndrias em relação ao tempo de incubação com a droga, na presença ou ausência do substrato.

Os resultados sobre a atividade da NADH-citocromo c reductase (tabela IV) usando dois tipos de preparações diferentes, mostram diferentes graus de inibição em relação à concentração da droga. É provável que a explicação do menor grau de inibição encontrado nas partículas de Low e Vallin (63) esteja relacionada com a assimetria da bicamada fosfolipídica mitocondrial.

Efeito sobre a respiração do succinato

A figura 10 mostra o potencial de membrana obtido durante a oxidação do succinato e o colapso deste potencial com concentrações crescentes da droga. 660 nmoles de VERA/mg de proteína foi a concentração máxima testada na respiração do succinato (figura 6) com alto grau de estímulo e que apresenta 14% de colapso do potencial de membrana. Esta queda lenta de potencial em função de concentrações crescentes da droga, em mitocôndrias ainda acopladas, faz com que aumente a velocidade respiratória, a fim de repor a energia perdida. Outro fator que regula esta velocidade é a concentração de oxaloacetato na mitocôndria. O baixo nível de oxaloacetato detectado (tabela VIII) funciona como um modulador positivo da desidrogenase succínica, aumentando a velocidade de oxidação do succinato (1, 5, 16).

Evidências a favor de um efeito desacoplador

a) Vieira Lopes et al. (124) obtiveram resultados que depõem a favor de um efeito desacoplante em mitocôndrias isoladas de coração, usando DNP antes e após a adição do verapamil. Verapamil adicionado antes do DNP inibiu o efeito desacoplador e adicionado após, estimulou o efeito desacoplador. Por outro lado os resultados apresentados por esses autores mostram um grau de inibição menor no índice de RC e relação ADP/O, adicionando a droga sobre a mitocôndria energizada, em relação aos resultados apresentados na tabela I, adicionando o substrato após a droga.

b) Os resultados sobre a atividade ATPásica (figura), mostram estímulo da hidrólise do ATP em mitocôndrias intactas, o que é uma evidência de desacoplamento.

c) Paralelamente ao estímulo da atividade ATPásica, há

colapso do potencial de membrana (figura 10); lento a princípio e mais rápido a partir de 1 200 nmoles de VERA/mg de proteína.

Evidências a favor de alterações na permeabilidade da membrana

A membrana mitocondrial não é livremente permeável a íons como K^+ e Ca^{++} . Há muitas evidências que dizem a favor de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial.

Verapamil alterou significativamente a morfologia mitocondrial; o "swelling" mitocondrial promovido por valinomicina - K^+ e o transporte de Ca^{++} . Inibiu as atividades de NADH-oxidase, da NADH-citocromo c redutase e da NADH-coenzima Q redutase, sem afetar os demais complexos enzimáticos da cadeia de transporte de elétrons.

A manutenção de um nível ótimo de fluidez na membrana é imprescindível para as funções de transporte, de permeabilidade e da atividade das enzimas ligadas à membrana. Como está demonstrado na figura 12 o transporte de Ca^{++} é fortemente inibido. Os resultados apresentados nas figuras 12 A e B mostram grande sensibilidade à ação da droga para a liberação do cálcio. De acordo com Bondi (4) verapamil bloqueia a entrada de Ca^{++} na membrana celular, pelas suas propriedades lipofílicas, penetrando na zona hidrofóbica da membrana. Mas Oliva e Nayler (67) e Nayler et al. (75) tem demonstrado em sarcolema que o cálcio possui mais de um tipo de sítio de ligação. Um sítio que é rapidamente saturável, independente de energia e um outro sítio que requer ATP para a ligação. Estes sítios envolvem glicolipídeos e glicoproteínas. Mas Oliva e Nayler (67) em estudo com ^{14}C demonstraram que verapamil se associa com as glicoproteínas no sarcolema, provavelmente nos sítios de ligação do Ca^{++} . Essa associação envolve predominantemente os glicolipídeos, apresentando menor afinidade com as glicoproteínas. A remoção dos resíduos de N-acetilglucosamina e das cabeças polares dos fosfolipídeos do sarcolema, diminuem a ligação do verapamil, confirmando a afinidade do verapamil por estes resíduos. Estes resultados demonstram que em sarcolema, verapamil reage com a membrana, alterando a sua permeabilidade para o Ca^{++} . Por outro lado, tem sido demonstrada a habilidade da droga para penetrar na célula, sendo a sua disponibilidade para as organelas intracelulares cardíacas, aproximadamente 30 vezes maior do que no compartimento extra

celular (65). Parece evidente que se verapamil complexa com glicolipídeos e com as cabeças polares dos fosfolipídeos em membrana celular (67) como sítio de alta afinidade e com glicoproteínas, sítio de menor afinidade, o mesmo possa ocorrer na membrana mitocondrial. Evidência maior deste fato é a inibição do efluxo de Ca^{++} , em mitocôndrias, mesmo com baixas concentrações da droga (figura 12) e Vaghy et al. (119).

De acordo com Lenaz et al. (58, 59) a perda da sensibilidade a oligomicina é uma consequência de mudanças conformacionais, com deslocamento das subunidades da ATPase, devido a modificações nos lipídeos da membrana e nas interações lipídeo-proteína. Os resultados apresentados na figura 11 indicam alteração na fluidez da membrana, sendo portanto mais um comprovante da interação dos lipídeos da membrana mitocondrial com o antiarrítmico. Esses resultados tornam explicável os diferentes graus de inibição obtidos nos sistemas NADH-oxidase (tabela II e III e figura 7) e NADH citocromo c redutase (tabela IV) com os diferentes tipos de preparações utilizados e a inibição da atividade da ATPase em mitocôndrias rompidas. Por outro lado, segundo Vanderkooi et al. (121), se a interação com o lipídeo altera o encaixe normal da proteína produzindo alterações conformacionais, consequentemente altera a função da proteína. Seguindo este raciocínio é esperado que o complexo I da cadeia respiratória, sendo o complexo enzimático transmembrana mais volumoso da cadeia de transporte de elétrons (20), seja o mais atingido.

Trabalhos realizados em nossos laboratórios com verapamil (107), ou verapamil e outros antiarrítmicos como maleato de perexilina, lidoflazina e propranolol (51, 52, 99, 100, 124) tem mostrado o mesmo tipo de efeito sobre a respiração mitocondrial e as atividades enzimáticas ligadas à cadeia de transporte de elétrons.

O efeito desses antiarrítmicos sobre o estado oscilatório e sobre o "swelling" mitocondrial obtidos por Fortes et al. (30, 31) são condizentes com alterações na fase lipídica da membrana interna e com os resultados aqui apresentados nas alterações da permeabilidade mitocondrial à íons.

Através das microscopias eletrônicas (figuras 13, 14 e 15) pode-se verificar o grau de alteração pelo qual as membranas mitocondriais passam, sob o efeito do verapamil. Ressalta-

se que as alterações são dependentes do tempo de contato e da concentração da droga e que essas alterações são mais drásticas em sistemas desenergizados.

Possíveis ligações entre os efeitos obtidos *in vivo* e *in vitro*

Apesar de ser difícil extrapolar os efeitos aqui obtidos com os obtidos *in vivo* usando doses terapêuticas, parece-nos que, em se tratando do verapamil, o uso de mitocôndrias isoladas é conveniente, já que um dos efeitos terapêuticos desejado é a proteção da parte energética impedindo o "swelling" mitocondrial. Este pode ser provocado pelo aumento da concentração de fosfato no citosol, como acontece no "stress" e em alguns tipos de patologias cardíacas, que levam a um alto consumo energético. A concentração efetiva em inibir o "swelling" mitocondrial provocado pelo fosfato *in vitro* varia de 25 a 200 μM (120). Com concentrações acima de 20 μM obtemos muitos dos efeitos tóxicos apresentados nesta tese. Um possível efeito protetor proposto pelo autor acima referido (120) ou por outros autores, passa a ser questionável, em virtude dos resultados aqui apresentados.

Ressalta-se ainda que os resultados relatados por Rodrigues et al. (95) e por Clements et al. (8) com mitocôndrias isoladas de coração de animais tratados com verapamil, mostraram inibição do estado III da respiração, comparável àquela obtida quando verapamil é adicionado sobre a mitocôndria isolada. Isto é um indício de que os resultados ocorridos *in vitro* podem também ocorrer *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

1. ACKRELL, B.A.C. Metabolic regulatory functions of oxalacetate. Horizons Biochem. Biophys., 1: 175-206, 1974.
2. ÅKERMAN, K.E.O. & WIKSTRÖM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Lett., 68 (2): 191-197, 1976.
3. ÅKERMAN, K. and NICHOLLS, D. Mitochondrial calcium transport. Biochim. Biophys. Acta, 683: 57-88, 1982.
4. BONDI, A.Y. Effects of verapamil on excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther., 205: 49-57, 1978.
5. BORST, P. The pathway of glutamate oxidation by mitochondria isolated from different tissues. Biochim. Biophys. Acta., 57: 256-269, 1962.
6. CARAFOLI, E. The calcium cycle of mitochondria. FEBS Lett., 104: 1-5, 1979.
7. CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. Nature, 175: 1120-1121, 1955.
8. CLEMENTS, I.P.; VLIESTRA, R.E.; DEWEY, J.D.; HARRISON JR., C.E. Protective effect of verapamil infusion of mitochondrial respiratory function in ischemic myocardium. Coron. Heart Dis., 3: 284-297, 1978.
9. COIRO, J.R.R.; WEIGL, D.R.; KISIELIUS, J.; MENEZES, H.; BILLOTTA, J.A.T. A new embedding medium (polyte 8001) for biological material. Cienc. Cult., 24 (7): 660-662, 1972.
10. COCKRELL, R.S.; HARRIS, E.J.; PRESSMAN, B.C. Energetics of potassium transport in mitochondria induced by valinomycin. Biochemistry, 5: 2326-2335, 1966.
11. CRANE, F.L.; GLEEN, J.L. ; GREEN, D.E. Studies on the

electron transfer system: The electron transfer particle. Biochim. Biophys. Acta., 22: 475-487, 1956.

12. CRANFIEL, P.F. The action of antiarrhythmic drugs. In: THE CONDUCTION of the cardiac impulse. New York. Futura, 1975. p. 319-337.
13. CREUTZ, C. & SUTIN, N. Reduction of ferricytochrome c by dithionite ion: electron transfer by parallel adjacent and retome pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 70: 1701-1703, 1973.
14. CROMPTON, M.; CAPANO, M.; CARAFOLI, E. The sodium - induced efflux of calcium from heart mitochondria. A possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. Eur. J. Biochem., 69: 453-462, 1976.
15. CROMPTON, M.; MOSER, R.; LÜDI, H.; CARAFOLI, E. The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. Eur. J. Biochem., 82: 25-31, 1978.
16. DOUCE, R.; JOURNET, E.P.; BONNER, W.D. Glutamate metabolism triggered by oxalacetate in intact plant mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 214 (1): 366-375, 1982.
17. DRAHOTA, Z.; CARAFOLI, E.; ROSSI, C.S.; GAMBLE, R.L.; LEHNINGER, A.L. The steady state maintenance of accumulated Ca^{++} in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 240: 2712-2720, 1965.
18. ENGLARD, S. & SIEGEL, L. Beef heart malic dehydrogenase . I. Properties of the enzyme purified from extracts of acetone dried powers. Biochim. Biophys. Acta., 54: 67-76, 1961.
19. ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. eds. Oxidation and Phosphorylation. New York Academic, 1967. p. 41-47. (Methods in Enzymology, 10).

20. FARIAS, R.N.; BLOY, J.; MORERO, R.D.; SINERIZ, F.; TRUCCO, R.E. Regulation of allosteric membrane bound enzymes through changes in membrane lipid composition. Biochim. Biophys. Acta, 415: 231-251, 1975.
21. FERRARI, R.; BONGRANI, S.; LISA, F.; RAD-DINO, R. Fusione mitocondriale e omeostasi del calcio in corso di ischemia sperimentali. G. Ital. Cardiol., 10: 877-888, 1980.
22. FLECKSTEIN, A. Myokarstoffwechsel und nekrose. In: Heilmeyer, L. & Holtmeyer, H.J. eds. SYMPOSIUM DER DEUTSCH. GES. FÜR. FORTSCHRITTE AUF DEM GEBIET DER INNEREN MEDIZIN ÜBER HERZINFARKT UND SCHOCK, VI, Freiburg, 1968. p. 94-109.
23. FLECKENSTEIN, A. Pathophysiologische kausal-faktoren bei myokardnekrose und infarkt-14-kardio-angiologische diskussion der oesterreichischen kardiologischen gesellschaft. Wien Inn Med., 52: 133-143, 1969.
24. FLECKENSTEIN, A. Control of myocardial metabolism by verapamil, sites of action, and therapeutic affects. Arzneim. Forsch., 20 (9a): 1317-22, 1970.
25. FLECKENSTEIN, A. Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions. In: HARRIS, P. & OPIE, L.H. eds. Calcium and the heart. London, Academic, 1971. p.135-188.
26. FLECKENSTEIN, N.; DOERING, H.J.; LEDER, O. The significance of high-energy phosphate exhaustion in the etiology of isoproterenol-induced cardiac necrosis and its prevention by iproveratril, compound D 600 or prenylamine: In: La Marche, M. & Royer, R. eds. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DRUGS AND METABOLISM OF MYOCARDIUM AND STRIATED MUSCLE. Nancy, 1969. p. 11-22.
27. FLECKENSTEIN, A.; HAMMERMEIER, H.; DORING, H.J. u FREUDH. Zum Wirkungsmechanismus neuartiger coronardilatatore mit

- gleichzeitig sauerstoffsparenden Myocard-Effekten, Pre nilamin and Iproveratrik. Z. Kreisf-Forsch., 56:716-744, 1967.
28. FLECKENSTEIN, A.; JANKE, J.; DOERING, H.J.; LEDER, O. Myocardial fiber necrosis due to intracellular calcium overload, a new principle in cardiac pathophysiology. Rec. Adv. Card. Struct. Metab. 4: 563-580, 1974.
 29. FLECKENSTEIN, A.; JANKE, J.; DOERING, H.J.; PACHINGER, O. Ca^{++} overload as the determinant factor in the production of catecholamine - induced myocardial lesions. Rec. Adv. Card. Struct. Metab., 2: 455-466, 1973.
 30. FORTES, J.C.; KLÜPPEL, M.L.W.; SILVEIRA, O., VIEIRA LOPES, L.C.; CAMPELLO, A.P. Biochemical aspects of the mechanism of action of anti-arrhythmic drugs on mitochondria. V. Effect on the oscillatory states. Arq. Biol. Tecnol., 26: 545-555, 1983.
 31. FORTES, J.C.; VIEIRA LOPES, L.C.; KLÜPPEL, M.L.W.; SILVEIRA, O.; CAMPELLO, A.P. Biochemical aspects of the mechanism of action of anti-arrhythmic drugs on mitochondria. IV. Effect on mitochondrial swelling. Arq. Biol. Tecnol. 26: 419-425, 1983.
 32. GÓMEZ-PUYOU, A. & GÓMEZ-PUYOU, M.T. A simple method of purification of a soluble oligomycin insensitive mitochondrial ATPase. Arch. Biochem. Biophys., 182: 82-86, 1977.
 33. GÓMEZ-PUYOU, M.T.; GÓMEZ-PUYOU, A.; NORDENBRAND, K.; ERNSTER, L. Interaction of soluble ATPase (F_1) and its subunits with F_1 -depleted submitochondrial particles. In: QUAGLIARELLO, E. ed. Function and molecular aspects of Biomembrane transport, Amsterdam, Elsevier/Noth-Holland, 1979. p. 119-133.
 34. GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J. Biol. Chem., 177: 751-766, 1949.

35. GREEN, D.E.; ASAI, J.; HARRIS, R.A.; PENNISTON, J.T. Conformation basis of energy transformation in membrane systems. III. Configurational changes in the mitochondrial inner membrane induced by changes in functional states. Arch. Biochem. Biophys., 125: 684-705, 1968.
36. HAAS, H. & HARTFELDER, G. α -Isopropyl- α -(N-methyl-N-homoveratryl)- σ -aminopropyl)-3,4-dimethoxyphenylacetonitril, Eine substanz unit coronargefaberweiternden eigenshaften. Arzeim. Forsch., 12: 549-558, 1962.
37. HAYAT, L.H. & CROMPTON, M. Evidence for the existence of regulatory sites for Ca^{++} on the Na/Ca^{2+} carrier of cardiac mitochondria. Biochem. J., 202: 509-518, 1982.
38. 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. eds. Oxidation and Phosphorylation, New York, Academic, 1967, p. 225-239. (Methods in Enzymology, 10).
39. HILLAR, M.; LOTT, V.; LENNOX, B. Correlation of the effects of citric acid cycle metabolites on succinate oxidation by rat liver mitochondria and submitochondrial particles. Bioenergetics, 7: 1-16, 1975.
40. HIRS, C.H.W.; MOORE, S.; STEIN, H.W. The chromatography of aminoacids on ion exchange resins. Use of volatile acids for elution. J. Am. Chem. Soc., 76: 6063-6065, 1954.
41. JAEDICKE, W.; JANKE, J.; FLECKENSTEIN, A. Potential of isopreterenol-induced cardiac necrosis by augmentation of transmembrane Ca influx with the use of 9- α -fluorocortisol acetate-neutralization of this effect by K or Mg salts. Pfluegers Arch. Ges. Physiol., 319: R9, 1970.
42. JANKE, J.; FLECKENSTEIN, A.; JAEDICKE, W. Inhibition of the isopreterenol-induced radio-calcium uptake into the ventricular myocardium by Ca-antagonistic inhibitors of excitation-contraction coupling (Isoptin=verapamil, iproveratril or compound D 600). Pfluegers Arch. Ges. Physiol.,

316: R 10, 1970.

43. JANKE, J.; JAEDICKE, W.; FLECKENSTEIN, A. Inhibition of isopreterenol-induced cardiac necrosis by reduction of transmembrane Ca influx with the use of K and Mg salts or of Ca-antagonistic inhibitors of excitation-contraction coupling. Pfluegers Arch. Ges. Physiol., 319: R 8, 1970.
44. JONES, K.M. Artificial substrates and biochemical reagents. In: DATA FOR BIOCHEMICAL RESEARCH OXFORD, Clarendon, 1967, p. 436-465.
45. KAGAWA, Y. & RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. IX Reconstruction of oligomycin sensitive adenosine triphosphatase. J.Biol.Chem., 241: 2467-2474, 1966.
46. KANNER, B.I.; SERRANO, R.; KANDRACH, M.A.; RACKER, E. Preparation and characterization of homogeneous coupling factor 6 from bovine heart mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1050-1056, 1976.
47. KEARNEY, E.B. & SINGER, T.P. Studies on succinic dehydrogenase. J. Biol. Chem., 219: 963-975, 1956.
48. KEEFE, D.L.D.; KATES, R.E.; HARRISON, D.C. New antiarrhythmic drugs: Their place in therapy. Drugs, 22: 363-400, 1981.
49. KEYHANI, J. & KEYHANI, E. Cytochrome c oxidase biosynthesis and assembly in *Candida utilis* yeast cells. Arch.Biochem. Biophys., 167: 588-595, 1975.
50. KIELLEY, W.W. & KIELLEY, R.K. A specific adenosinetriphosphatase of liver mitochondria. J. Biol. Chem., 200: 213-222, 1953.
51. KLÜPPEL, 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.

52. KLÜPPEL, M.L.W.; SILVEIRA, O.; LOPES, L.V.C., CAMPELLO, A. P. Biochemical aspects of the mechanism of action of antiarrhythmic drugs on heart mitochondria. II. Enzymatic activities. Arq. Biol. Tecnol., 21: 13-18, 1978.
53. KOHDA, C. & GEMBA, M. Effect of verapamil on the calcium and magnesium transports of rat kidney cortex mitochondria. Jpn. J. Pharmacol., 29: 745-751, 1979.
54. KOPACZYK, K.C. Preparation and properties of the heart mitochondrial electron transporting particles (Inner membrane). In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. Oxidation and Phosphorylation. New York, Academic, 1967. p. 253 - 258. (Methods in Enzymology, 10).
55. KOZLOV, I.A. & SKULACHEV, V.P. H⁺ Adenosine triphosphatase and membrane energy coupling. Biochem. Biophys. Acta, 463: 29-89, 1977.
56. LEE, C.P. & ERNSTER, L. Studies of the energy-transfer system of submitochondrial particles 1. Competition between oxidative phosphorylation and the energy-linked nicotinamide dinucleotide transhydrogenase reaction. Eur. J. Biochem., 3: 385-390, 1968.
57. LEHNINGER, A.L. Mitochondria and calcium ion transport. Biochem. J., 119: 129-138, 1970.
58. LENAZ, G., CURATOLA, G., MAZZANTI, G., PARENTI-CASTELLI, G., BERTOLI, E. Effects of general anesthetics on lipid protein interactions and ATPase activity in mitochondria. Biochem. Pharmacol., 27: 2835-2844, 1978.
59. LENAZ, G.; PARENTI-CASTELLI, G.; SECHI, A.M. Lipid-protein interactions in mitochondria changes in mitochondrial adenosine triphosphatase activity induced by n-butyl alcohol. Arch. Biochem. Biophys., 167: 72-79, 1975.
60. LIGETI, E. & FONYÓ, A. Competitive inhibition of valino-

mycin-induced K^+ transport by Mg^{2+} -ions in liver mitochondria. FEBS Lett., 79 (1): 33-36, 1977.

61. LINDAHL, P.E. & OBERG, K.E. The effect of rotenone on respiration and its point of attack. Exp. Cell. Res.:228-237, 1961.
62. LIVESLEY, B.; CATLEY, P.F.; CAMPELL, R.C.; ORAM, S. Double blind evaluation of verapamil, propranolol and isorsobide dinitrate against, placebo in the treatment of angina pectoris. Br. Med. J., 1: 135, 1973.
63. LOW, H. & VALLIN, J. Succinate-linked diphosphopyridine nucleotide reduction in submitochondrial particles. Biochim. Biophys. Acta, 69: 361-374, 1963.
64. 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.
65. LÜLLMANN, H.; TIMMERMANS, P.B.M.W.M. ; ZIEGLER, A. Accumulation of drugs by resting or beating cardiac tissue. Eur. J. Pharmacol., 60: 277-285, 1979.
66. MAC LENNAN, D.H. & TZAGOLOFF, A. Studies on the mitochondrial adenosine triphosphate. System IV. Purification and characterization of the oligomycin sensitivity conferring protein. Biochemistry, 7: 1603-1610, 1968.
67. MAS-OLIVA, J. & NAYLER, W.G. The effect of verapamil on the Ca^{2+} transporting and Ca^{2+} ATPase activity of isolated cardiac sarcolemmal preparations. Br. J. Pharmacol., 70: 617-624, 1980.
68. MASON, T.L.; PORTON, R.O.; WHARTON, D.C.; SCHATZ, G. Cytochrome c oxidase from baker's yeast isolation and properties. J. Biol. Chem., 248 (4): 1346-1354, 1973.
69. MARGOLIASH, E. The chromatographic behaviour of cytochrome c on cation exchangers. Biochem. J., 56: 535-543, 1954.

70. MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, 191: 144-148, 1961.
71. MITCHELL, P. & MOYLE, J. Proton translocation coupled to ATP hydrolysis in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 4: 530-539, 1968.
72. NAYLER, W.G. Cardioprotective effects of calcium ion antagonists in myocardial ischemia. Clin. Invest. Med. 3:91-99, 1980.
73. NAYLER, W.G.; FERRARI, R. ; WILLIAMS, A. Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium. Am. J. Cardiol., 46: 242-248, 1980.
74. NAYLER, W.G.; MAS-OLIVA, J.; WILLIAMS, A.G. Cardiovascular receptors and calcium. Circ. Res., 46: 1161-1166, 1980.
75. NAYLER, W.G.; MAS-OLIVA, J. ; WILLIAMS, A.J. Sarcolemmal calcium transport and drug action. Adv. Myocardiol., 1: 77-94, 1980.
76. NAYLER, W.G.; MCLUNES, I.; SWANN, J.B.; PRICE, J.M.; CARSON, V.; RACE, D.; LOWE, T.E. Some effects of iproveratriol (Isoptin) on the cardiovascular system. J. Pharmacol. Exp. Ther., 161: 247-261, 1968.
77. NAYLER, W.G. & GRINWALD, P. Calcium entry blockers and myocardial function. Fed. Proc. 40: 2855-2861, 1981.
78. NAYLER, W.G. & KRIKLER, D. Verapamil and myocardium. Postgrad. Med. J., 50: 441-446, 1974.
79. NAYLER, W.G. & SZETO, J. Effect of verapamil on contractility, oxygen utilization and calcium exchange-ability in human heart muscle. Cardiovasc. Res., 6: 120, 1972.
80. NICHOLS, D. & ÅKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. Biochim. Biophys. Acta, 683: 57-88, 1982.

81. NICHOLS, D. & CROMPTON, M. Mitochondrial calcium transport. FEBS Lett., 111: 261-268, 1980.
82. OPIE, L.H. Drugs and the heart. IV Antiarrhythmic agents. Lancet, 19: 861-868, 1980.
83. PARDEE, A.B. & POTTER, V.R. Inhibition of succinic dehydrogenase by oxalacetate. J. Biol. Chem., 176: 1085-1094, 1948.
84. PENIN, F.; GODINOT, G.; COMTE, J.; GAUTHERON, D.C. Vesicular preparation of a highly coupled ATPase ATP synthase complex from pig heart mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 679: 198-209, 1982.
85. PENNISTON, J.T.; HARRIS, R.A., ASAI, J.; GREEN, D.E. The conformational basis of energy transformations in membrane system. I. Conformational changes in mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 59: 624-631, 1968.
86. POOLE-WILSON, P.A. Measurement of myocardial intracellular pH in pathological states. J. Mol. Cell. Cardiol., 10: 511, 1978.
87. POZZAN, T.; BRAGADIN, M.; AZZONE, G.F. Disequilibrium between steady-state Ca^{2+} accumulation ratio and membrane potential in mitochondria pathway and role of Ca^{2+} efflux. Biochemistry, 16: 5618-5625, 1977.
88. PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. Annu. Rev. Biochem., 45: 501-530, 1976.
89. PULLMAN, M.E.; PENEFSKI, H.S., DATTA, A. ; RACKER, E. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphate. J. Biol. Chem., 235: 3322-3329, 1960.
90. QUASTEL, J.H. Use of artificial electron acceptors in the study of dehydrogenases. In: COLLOWICK, S.P. & KAPLAN, N. O. eds. Special techniques for the Enzymologist. New York Academic, 1957. p. 329-336. (Methods in Enzymology, 4).

91. RACKER, E. I. Purification and properties of soluble, di-nitrophenol-stimulated adenosine triphosphate. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem., 235: 3322-3329, 1960.
92. RACKER, E. Preparation of coupling Factor 6 (F_6). In: FLEISCHER, S. & PACKER, L. eds. Biomembranes; Bioenergetics-oxidative phosphorylation. New York, Academic, 1979. p. 398-399. (Methods in Enzymology, 55 F).
93. RAW, I.; MALINARI, R.; AMARAL, D.F.; AHLER, H.R. The purification of cytochrome 556 from pig liver. J. Biol. Chem., 233: 225-229, 1958.
94. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17: 208-212, 1963.
95. RODRIGUES, L.E.; PINTO, R.S.S.; COSTA, D.M.F. Estudo polarográfico do efeito do verapamil sobre a atividade respiratória e a fosforilação oxidativa das mitocôndrias. Arq. Bras. Cardiol., 1: 15-18, 1978.
96. RONA, G.; CHAPPEL, C.I.; BALAZS, T.; GAUDRY, R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. Arch. Pathol. 67: 443, 1959.
97. ROSSI, E. & AZZONE, G.F. Ions transport in liver mitochondria. Energy barrier and stoichiometry of aerobic K^+ translocation. Eur. J. Biochem., 7: 418-426, 1969.
98. SAKURADA, A.; CAMPELLO, A.P.; BRANDÃO, D. Regulation of succinic dehydrogenase activity of heart mitochondria by propranolol. Res. Biochem. Cardiovasc. System Pharmacol., 2: 1469, 1979.
99. SAKURADA, A.; SILVEIRA, O.; WAMBIER, M.L.; BRANDÃO, D. ; CAMPELLO, A.P. Regulation of succinic dehydrogenase activity of heart mitochondria by antiarrhythmic drugs. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 11: 89-96, 1975.

100. SAKURADA, A.; VOSS, D.O.; BRANDÃO, D.; CAMPELLO, A.P. Effects of propranolol on heart muscle mitochondrial. Biochem. Pharmacol., 21: 532-540, 1972.
101. SANADI, D.R., PHARO, R.L.; SORDAHL, L.A. NADH-CoQ reductase-assay and purification. In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. eds. Oxidation and Phosphorylation. New York, Academic, 1967. p. 297-302 (Methods in Enzymology, 10).
102. SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. In: FLEISCHER, S. & PACKER, L. eds. Biomembranes; Bioenergetics: biogenesis of mitochondria, organization, and transport. New York, Academic, 1979.p. 301-352 (Methods in Enzymology, 56 G).
103. SEHOLLMEYER, P. & KLINGENBERG, M. Oxalacetate and adenosinetriphosphate levels during inhibition and activation of succinate oxidation. Biochem. Biophys. Res. Comm., 4: 43-47, 1961.
104. SCHWARTZ, M.K. Clinical aspects of aspartate and alanine aminotransferases. In: TABOR, H. & TABOR, C.W. eds. Metabolism of Amino Acids and Amines. New York, Academic, 1971. p. 866-875. (Methods in Enzymology, 17B).
105. SENIOR, A.E. Oligomycin-sensitivity-conferring protein. In: FLEISCHER, A. & PACKER, L. eds. Biomembranes; Bioenergetics - oxidative phosphorylation. New York, Academic, 1979. p. 391-397. (Methods in Enzymology, 55 F).
106. SILVEIRA, O.; KLÜPPEL, M.L.W.; ODEBRECHT, S.; CAMPELLO, A. P. Effects of rotenone on succinate oxidation by isolated heart mitochondria. Arq. Biol. Tecnol., 21: 9-12 , 1978.
107. SILVEIRA, O. & CAMPELLO, A.P. Effects of iproveratril on isolated heart mitochondria. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol., 10: 149-154, 1975.
108. SINGER, T.P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenase. In:

Methods of Biochemical Analysis. New York, . J. Wiley ,
1974, v. 22, p. 123-175.

109. SINGER, T.P.; KEARNEY, E.B. ; BERNATH, P. Studies on succinic dehydrogenase. II. Isolation and properties of the dehydrogenase from beef heart. J. Biol. Chem., 223: 599-613, 1956.
110. SINGH, B.N.; COLLETT, J.T.; CHEW, C.Y.C. New perspectives in the pharmacologic therapy of cardiac arrhythmias. Prog. Cardiovasc. Dis., 22: 243-301, 1980.
111. SKULACHEV, V.P. Membrane electricity as a convertible energy currency for the cell. Can. J. Biochem., 58: 161 - 175, 1980.
112. SOMLO, M. Induction des lacto-cytochrome c reductases (D-ET L-) de la levure aerobique par les lactates (D-ETL-). Biochim. Biophys. Acta., 97: 183-201, 1965.
113. SUMNER, J.B. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. Science, 100: 413-414, 1949.
114. STUCKI, J.W. & INEICHEN, E.A. Energy dissipation by calcium recycling and the efficiency of calcium transport in rat-liver mitochondria. Eur. J. Biochem., 48: 365-375, 1974.
115. SWINGLE, K.F.; AXELROD, A.E.; EFVEHJEM, C.A. The mechanism of the effect of calcium salts on the succinoxidase system. J. Biol. Chem., 145: 581-591, 1942.
116. TYLER, D.B. Effects of metal ions adenosine triphosphate on an oxalacetate-inhibited succinoxidase activity. J. Biol. Chem., 216: 395-403, 1955.
117. TZAGOLOFF, A.; BRINGTON, K.H.; Mac LENNAN, D.H. Studies on the mitochondrial adenosine triphosphatase system.II. The isolation and characterization of an oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase from bovine heart mito-

chondria. J. Biol. Chem., 243; 2405-2412, 1968.

118. UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H.; STAUFFER, J.F. Manometric & Biochemical Techniques. 5.ed. Minneapolis. Burgess, 1972, 387 p.
119. VAGHY, P.L.; JOHNSON, J.D.; MATLIB, M.S.; WANG, T. & SCHWARTZ, A. Seletive inhibition of Na^+ induced Ca^{2+} release from heart mitochondria by diltiazem and certain other Ca^{2+} antagonist drugs. J. Biol. Chem., 257: 6000 - 6002, 1982.
120. VAGHY, P.L.; MATLIB, M.A.; SZEKERES, L. ; SCHWARTZ, A. Protective effects of verapamil and diltiazem against inorganic phosphate induced impairment of oxidative phosphorylation of isolated heart mitochondria. Biochem. Pharmacol. 30: 2603-2610, 1981.
121. VANDERKOOI, J.M.; LANDESBERG, R.; SELICK II, H.; MC DONALD. Interaction of general anesthetics with phospholipid vesicles and biological membranes. Biochim. Biophys. Acta., 464: 1-16, 1977.
122. VASINGTON, F.D. & MURPHY, J.V. Active bindind of calcium by mitochondria. Fed. Proc., 20: 146, 1961.
123. VASINGTON, F.D. & MURPHY, J.V. Ca^{++} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. J. Biol. Chem., 237: 2670-2677, 1962.
124. VIEIRA LOPES. L.C.; SILVEIRA, O.; KLÜPPEL, M.L.W. ; CAMPELLO, A.P. Biochemical aspects of the mechanism of action of anti-arrythmic drugs on heart mitochondria. I. Oxygen uptake and oxidative phosphorylation. Arq. Biol. Tecnol. 20: 7-14, 1977.
125. VOSS, D.O.; CAMPELLO, A.P. ; BACILA, M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Comm., 4: 48-51, 1961.
126. VOSS, D.O.; COWLES, J.C.; BACILA, M. A new oxygen elec-

- trode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. Anal. Biochem., 6: 211 - 222, 1963.
127. WATANABE, A. & MAND BESCH, H.R. Subcellular myocardial effects of verapamil and D-600-comparison with propranolol. J. Pharmacol. Exp. Ther., 191: 241-251, 1974.
128. WIKSTRÖM, M. & SAARI, H. A spectral shift in cytochrome a induced by calcium ions. Biochim. Biophys. Acta., 408: 170-179, 1975.
129. YONETANI, T. & RAY, G.S. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome oxidase. J. Biol. Chem., 240 (8): 3398, 1965.
130. YOSHIDA, M.; OKAMOTO, H.; SONE, N.; HIRATA, H. ; KAGAWA, Y. Reconstitution of thermostable ATPase capable of energy coupling from its purified subunits. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 936-940, 1977.
131. ZANOTTI, A. & AZZONE, G.F. Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 201: 255-265, 1980.
132. ZIEGLER, D. & RIESKE, J.S. Preparation and properties of succinate dehydrogenase-coenzyme Q reductase (Complex II). In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. eds. Oxidation and Phosphorylation. New York, Academic, 1967. p. 231 - 235. (Methods in Enzymology, 10).
133. ZOLLNER, N. & ROTH e MUND, E. Observation on the measurement of the activity of succinic dehydrogenase. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 298: 97-109, 1954.