

FABIANA POSTIGLIONE MANSANI



**EFEITOS DA AMIODARONA SOBRE OS FLUXOS
MITOCONDRIAIS DE Ca^{2+} E LIPOPEROXIDAÇÃO EM
MEMBRANAS ARTIFICIAIS E NATIVAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a obten-
ção do título de Doutor em Bioquímica.

CURITIBA

1999

FABIANA POSTIGLIONE MANSANI

**EFEITOS DA AMIODARONA SOBRE OS FLUXOS
MITOCONDRIAIS DE Ca^{2+} E LIPOPEROXIDAÇÃO EM
MEMBRANAS ARTIFICIAIS E NATIVAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a obten-
ção do título de Doutor em Bioquímica.

CURITIBA

1999

**EFEITOS DA AMIODARONA SOBRE OS FLUXOS MITOCONDRIAIS DE Ca²⁺ E
LIPOPEROXIDAÇÃO EM MEMBRANAS ARTIFICIAIS E NATIVAS**

por

Fabiana Postiglione Mansani

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, Curso de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Banca Examinadora formada pelos professores:



Profa. Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri - UFPR



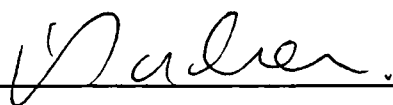
Profa. Dra. Glaci Therezinha Zancan - UFPR



Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros - USP



Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi - UNICAMP



Prof. Dr. Claudio da Cunha - UFPR (Depto. de Farmacologia)

Curitiba, 25 de março de 1999.

Orientadora: Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri

Co-orientador no exterior: Dr. Vítor M. C. Madeira

"Façamos o que fizemos, reconstruímos sempre o monumento a nossa maneira. Mas já é muito utilizar senão pedras autênticas".

Marguerite Yourcenar

Meu Eterno Agradecimento

A Gyanna, filha adorada, que iluminada na sua sensibilidade sempre soube respeitar os nossos limites de tempo e de espaço, com muito carinho e companheirismo; e que nestes 5 anos me presenteou com sua amizade, seu sorriso meigo, seu crescimento e seu amor!

Gy, por você tudo...

Aos meus pais Neuza Helena e Luiz Conrado, que como exemplo de caráter, profissionalismo e trabalho vitorioso, me ensinaram o caminho da realização; pelo incentivo e apoio em todos os momentos pelos quais passei até chegar aqui, cruzando caminhos difíceis, solitários e inesquecíveis, mas com a certeza de que estariam sempre perto, para proporcionar meu crescimento pessoal e intelectual.

A vocês o meu amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sensibilizada, a minha Orientadora Prof. Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri, mestra e amiga, pelas excelentes contribuições científicas e orientações recebidas, em especial pelo respeito a minha construção intelectual, durante a qual pude revelar minhas idéias, meus ideais, minhas crenças e minhas esperanças.

O meu profundo agradecimento à Prof. Dra. Maria Benigna M. de Oliveira, amiga que, em momentos certos, dava-me força e incentivo para realizar o que deveria ser realizado.

À Prof. Dra. Glaci T. Zancan, que me sensibilizou com seu apoio, na minha caminhada além dos limites do nosso espaço científico.

À Prof. Dra. Maria Lúcia Wambier Klüppel, pelo exemplo de trabalho.

Ao Prof. Dr. Annibal de Paiva Campello, pela amizade e colaboração durante este meu caminhar científico.

À Prof. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha, pelas palavras de apoio e ajuda durante a escrita deste trabalho.

Ao prof. Dr. Shigehiro Funayama pela especial colaboração nos estudos do influxo mitocondrial de Ca^{2+} .

O meu agradecimento ao Prof. Dr. Vítor M. C. Madeira, Departamento de Zoologia, Universidade de Coimbra, pelo constante incentivo, pelo apoio, pela amizade, por suas valiosas contribuições e pelas excelentes condições de trabalho que me foram fornecidas pelo seu laboratório, durante o período que estive em Coimbra, Portugal.

Agradeço à Prof. Dra. Teresa C. P. Dinis, Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, pela convivência, pelo dia a dia de trabalho e por tudo que aprendi ao seu lado.

À Dra. Maria do Carmo Antunes Madeira, pelos cuidados, pelo carinho e pela atenção a mim dispensados, durante minha estadia científica em Coimbra.

No meu coração ficará eternamente a lembrança dos amigos Portugueses.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica pela colaboração e amizade, especialmente a Priscila lanzen dos Santos, pela fundamental ajuda durante o preparo do material que, foi por mim utilizado nos experimentos realizados na Universidade de Coimbra, Portugal.

Aos colegas do Laboratório de Oxidações Biológicas Eneida J. Da Lozzo, Silvia Maria S. Cadena, Regina Maria V. Babiak, Guilhermina Rodrigues Noletto, Luiz Fernando Pereira, André B. Mariano pelo incentivo e amizade constantes.

À amiga Fabiane Fortes pelo carinho da amizade, pelo companheirismo nas alegrias e dificuldades deste meu crescimento científico e, também, pela colaboração no transcorrer deste trabalho.

Ao colega Renato Bochicchio por sua indispensável participação durante as fases de digitação desta tese.

Agradeço aos Professores do Departamento de Bioquímica, Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, pela acolhida e pela possibilidade de tornar-me pesquisadora.

Agradeço, também, à Universidade Estadual de Ponta Grossa, que me proporcionou o tempo para construção de minha formação científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao PRONEX, pelo suporte financeiro.

E a todas as pessoas que cruzaram meu caminho de pesquisa, deixando marcas sensíveis em minha vida pessoal e profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
I.INTRODUÇÃO.....	1
I.1 AMIODARONA.....	2
1.1 Aspectos gerais da ação da amiodarona.....	3
1.2 Propriedades químicas e farmacocinética da amiodarona.....	5
1.3 Efeitos adversos da amiodarona.....	9
1.4 Ações fármaco-bioquímicas da amiodarona.....	11
I.2 FLUXOS MITOCONDRIAIS DE Ca ²⁺	17
2.1 Aspectos gerais dos fluxos mitocondriais de Ca ²⁺	18
2.2 Fluxos mitocondriais de Ca ²⁺ em mitocôndrias de coração.....	22
2.3 Transição de permeabilidade induzida pelo Ca ²⁺	25

2.3.1 Aspectos gerais.....	25
2.3.2 Indutores da transição de permeabilidade.....	26
2.3.3 Mecanismos da transição de permeabilidade.....	27
I.3 LIPOPEROXIDAÇÃO.....	33
3.1 Aspectos gerais da lipoperoxidação.....	33
3.2 Mecanismos da lipoperoxidação.....	37
3.3 Efeitos da lipoperoxidação em membranas.....	44
3.4 Defesas antioxidantes.....	45
II. OBJETIVOS.....	51
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
III.1 MATERIAIS.....	55
1.1 Reagentes.....	55
1.2 Preparo da solução de amiodarona.....	55
1.3 Animais.....	55
1.4 Isolamento de mitocôndrias de coração de rato.....	56
1.5 Isolamento de mitocôndrias de coração de boi.....	56
1.6 Preparo das partículas submitocondriais de coração de boi.....	57
1.7 Extração de lipídeos das mitocôndrias de coração de boi.....	58
1.8 Preparo de liposomas.....	59
1.8.1 Liposomas de fosfatidilcolina de soja.....	59

1.8.2 Liposomas de lipídeos mitocondriais	60
III.2 MÉTODOS.....	61
2.1 Determinação do consumo de oxigênio, cálculo do controle respiratório (CR)...	61
2.2 Determinação do potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$).....	61
2.3 Determinação espectrofotométrica do transporte mitocondrial de Ca^{2+}	62
2.4 Determinação da transição de permeabilidade através do inchamento mitocondrial.....	64
2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.....	64
2.6 Separação, identificação e quantificação das classes de lipídeos polares.....	65
2.7 Avaliação da peroxidação lipídica.....	67
2.7.1 Medida da fluorescência do ácido <i>cis</i> -PnA.....	67
2.7.2 Consumo de oxigênio.....	70
2.7.3 Quantificação das cadeias alifáticas (ácidos graxos) dos fosfolipídeos por GLC.....	72
2.7.3.1 Preparo dos ésteres metílicos.....	72
2.7.3.2 Procedimento cromatográfico.....	73
2.7.4 Análise dos dienos conjugados.....	76
2.8 Determinação de proteínas.....	78
2.9 Dosagem do fosfato dos fosfolipídeos.....	78

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
IV.1 EFEITOS DA AMIODARONA SOBRE OS FLUXOS MITOCONDRIAIS DE Ca²⁺	80
1.1 Efeitos da amiodarona sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias de coração de rato.....	81
1.2 Efeitos da amiodarona sobre o potencial elétrico de membrana em mitocôndrias de coração de rato.....	84
1.3 Efeito da amiodarona sobre a captação de Ca ²⁺ em mitocôndrias de coração de rato.....	88
1.4 Efeitos da amiodarona sobre o efluxo de Ca ²⁺ em mitocôndrias de coração de rato.....	99
1.5 Estudo dos efeitos da amiodarona sobre a transição de permeabilidade em membranas de mitocôndrias de coração de rato.....	105
IV.2 EFEITOS DA AMIODARONA SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO.....	112
2.1 Estudo da lipoperoxidação em liposomas de fosfatidilcolina de soja.....	113
2.1.1 Justificativa para o uso do <i>cis</i> -PnA como sonda da peroxidação lipídica em liposomas de PC de soja.....	113
2.1.2 A degradação oxidativa do <i>cis</i> -PnA na lipoperoxidação de PC de soja induzida por Fe ²⁺ /ácido ascórbico.....	116
2.1.3 Peroxidação dos liposomas multilamelares de PC de soja e efeitos da amiodarona.....	121

2.1.4 Interação da amiodarona com radicais peroxil em liposomas de PC de soja.....	123
2.2 Estudo da lipoperoxidação em liposomas de lipídeos mitocondriais.....	135
2.2.1 Classes fosfolipídicas dos lipídeos mitocondriais de coração de boi.....	135
2.2.2 O <i>cis</i> -PnA na sondagem da peroxidação lipídica em liposomas de lipídeos mitocondriais.....	138
2.2.2.1 Otimização das condições de ensaio.....	138
2.2.2.2 Degradação oxidativa do <i>cis</i> -PnA de lipídeos mitocondriais de coração de boi, dependente do sistema indutor.....	141
2.2.3 Interação da amiodarona com radicais peroxil em liposomas de lipídeos mitocondriais de coração de boi.....	146
2.2.4 Validação da utilização do <i>cis</i> -PnA como sonda de peroxidação de lipídeos de mitocôndrias de coração de boi.....	148
2.3 Estudo da lipoperoxidação em partículas submitocondriais de coração de boi.....	152
2.3.1 Dependência da fluorescência do <i>cis</i> -PnA sobre a concentração de fosfolipídeos das SMP de coração de boi.....	154
2.3.2 Lipoperoxidação em membranas de SMP de coração de boi induzida por NADH.....	156
2.3.3 Efeito da amiodarona sobre a lipoperoxidação das SMP induzida por Fe ²⁺ /NADH.....	160
2.3.4 Lipoperoxidação de SMP de coração de boi em presença de rotenona.....	165
2.3.5 Interação da amiodarona com radicais peroxil em SMP de coração de boi.....	172

2.3.6 Determinação das cadeias alifáticas das membranas das SMP de coração de boi.....	176
V. DISCUSSÃO FINAL.....	180
VI. CONCLUSÕES.....	186
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	188

LISTA DE TABELAS

Tabela I -	Características das principais formas de ERO.....	36
Tabela II -	Efeito da amiodarona sobre a velocidade inicial de captação de Ca^{2+}	97
Tabela III -	Classes dos fosfolípídeos de mitocôndrias de coração de boi.....	137
Tabela IV -	Composição das cadeias alifáticas dos fosfolípídeos de liposomas mitocondriais de coração de boi.....	150
Tabela V -	Composição das cadeias alifáticas dos fosfolípídeos das partículas submitocondriais de coração de boi.....	179

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura química da amiodarona.....	6
2. Esquema da proposta do processo molecular envolvido na permeabilização da membrana mitocondrial.....	32
3. Representação das reações de iniciação e propagação da lipoperoxidação.....	41
4. Esquema geral das vias de formação dos produtos de oxidação de um ácido graxo tetraenólico.....	42
5. Mecanismo da formação dos hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico.....	49
6. Possíveis mecanismos de ação do ubiquinol, vitamina E e ascorbato.....	50
7. Registro da intensidade do <i>cis</i> -PnA, incorporado em liposomas de fosfatidilcolina de soja, correspondente a ensaio típico de degradação oxidativa induzida por Fe ²⁺ /ácido ascórbico.....	69
8. Registro contínuo do consume de oxigênio, por fosfatidilcolina de soja, na presença de AAPH.....	71
9. Cromatograma representativo dos ésteres metílicos dos ácidos graxos constituintes dos lipídeos de mitocôndrias de coração de boi.....	75
10. Espectro de absorção UV dos lipídeos de fosfatidilcolina de soja, após peroxidação induzida.....	77
11. Efeito da amiodarona sobre a velocidade respiratória mitocondrial.....	83

12. Curva de calibração para o potencial elétrico de membrana em mitocôndrias de coração de rato.....	86
13. Efeito da amiodarona sobre o potencial elétrico transmembrana em mitocôndrias de coração de rato, energizadas com succinato.....	87
14. Efeito da amiodarona sobre a captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de coração de rato, energizadas com succinato.....	91
15. Efeito da amiodarona sobre a captação de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato, energizadas com glutamato.....	92
16. Efeito da amiodarona sobre as velocidades iniciais de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de coração de rato, energizadas com succinato.....	93
17. Correlação entre o potencial de membrana e as velocidades iniciais de captação de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato.....	94
18. Gráfico da velocidade inicial de captação de Ca^{2+} mitocondrial (v) x diferentes concentrações $[\text{Ca}^{2+}]$	98
19. Efeito da amiodarona sobre a velocidade inicial do efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato, induzida por FCCP.....	101
20. Efeito da amiodarona sobre a velocidade inicial do efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato, dependente de Na^+	102
21. Efeitos da amiodarona sobre o inchamento mitocondrial de Ca^{2+} , energizado com succinato.....	109
22. Efeito da amiodarona sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} , energizado com glutamato.....	110
23. Eletroforese em gel poliacrilamida SDS de proteína de membrana de mitocôndria de coração de rato.....	111

24. Espectro de fluorescência do <i>cis</i> -PnA incorporado em liposomas de fosfatidilcolina de soja.....	118
25. Intensidade de fluorescência do <i>cis</i> -PnA incorporado em liposomas de fosfatidilcolina de soja, em função das concentrações de fosfolídeos e de sonda.....	119
26. Degradação oxidativa típica do <i>cis</i> -PnA, incorporado em liposomas de fosfatidilcolina de soja, induzida por Fe ²⁺ /ácido ascórbico.....	120
27. Efeitos da amiodarona sobre a degradação oxidativa do <i>cis</i> -PnA, incorporado em liposomas multilamelares de PC de soja, induzida por Fe ²⁺ /ácido ascórbico.....	122
28. Efeito da amiodarona na lipoperoxidação induzida por AAPH, em liposomas de PC de soja, avaliado pelo "quenching" de fluorescência do <i>cis</i> -PnA.....	126
29. Efeito da amiodarona sobre a lipoperoxidação induzida por AAPH, em liposomas de PC de soja, medida pelo consumo de oxigênio.....	129
30. Efeito da amiodarona na degradação oxidativa do <i>cis</i> -PnA iniciada por AMVN incorporado em liposomas de PC de soja.....	130
31. Efeito da amiodarona na velocidade de propagação da peroxidação de liposomas multilamelares de fosfatidilcolina de soja, induzida por AMVN, medida pelo consumo de O ₂	131
32. Formação de dienos conjugados seguindo a oxidação induzida por AMVN de fosfatidilcolina de soja.....	134
33. Classificação dos lípidos de mitocôndrias de coração de boi.....	136
34. Intensidade de fluorescência do <i>cis</i> -PnA em liposomas multilamelares extraídos de mitocôndrias de coração de boi, em função das concentrações dos fosfolídeos e da sonda.....	140

35. Degradação peroxidativa do <i>cis</i> -PnA incorporado em liposomas de lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi, induzida por Fe ²⁺ em presença de ácido ascórbico 20 μM.....	142
36. Efeito da amiodarona na degradação oxidativa do <i>cis</i> -PnA incorporado em liposomas de lipídeos de mitocôndrias de coração de boi, induzido por Fe ²⁺ /ácido ascórbico.....	145
37. Efeito da amiodarona na degradação oxidativa do <i>cis</i> -PnA incorporado em liposomas de lipídeos multilamelares mitocondriais de coração de boi, induzido por AAPH.....	147
38. Intensidade de fluorescência do <i>cis</i> -PnA em membranas de SMP de coração de boi em função de sua concentração.....	155
39. Degradação peroxidativa do <i>cis</i> -PnA incorporado em membranas de SMP de coração de boi, induzida por Fe ²⁺ em presença de NADH.....	159
40. Efeito da amiodarona na degradação oxidativa do <i>cis</i> -PnA incorporado em membranas de SMP de coração de boi, induzida por Fe ²⁺ /NADH.....	161
41. Efeito da amiodarona na lipoperoxidação induzida por NADH e Fe ²⁺ em SMP de coração de boi avaliadas pelo consumo de oxigênio.....	164
42. Efeito da amiodarona sobre a degradação oxidativa do <i>cis</i> -PnA incorporado em partículas submitocondriais de coração de boi na presença de rotenona, induzida por NADH e Fe ²⁺	166
43. Efeito da amiodarona na lipoperoxidação induzida por NADH e Fe ²⁺ em partículas submitocondriais de coração de boi, inibidas com rotenona e avaliadas pelo consumo de oxigênio.....	171

44. Efeito da amiodarona na degradação oxidativa do <i>cis</i> -PnA incorporado em SMP de coração de boi induzida por AAPH.....	174
45. Efeito da amiodarona sobre a lipoperoxidação induzida por AAPH em SMP de coração de boi, medida pelo consumo de oxigênio.....	175

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2,2'- azobis (2-aminopropano) dihidroclorato
ADP	Adenosina - 5' - difosfato
AdNT	Adenina nucleotídeo
AMD	Cloridrato de amiodarona
AMVN	2,2'- azobis (2,4 - dimetilvaleronitrilo)
APD	Duração do potencial de ação
Asc	Ácido ascórbico
ATP	Adenosina - 5' - trifosfato
BSA	Soroalbumina bovina
[Ca ²⁺]	Concentração de Ca ²⁺
CAT	Catalase
<i>cis</i> -PnA	Ácido <i>cis</i> -parinárico
CL	Cardiolipina
CoA	Coenzima A
CR	Controle respiratório
CsA	Ciclosporina A
Da	Dalton
DMPC	Dimiristoil - DL - fosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoil - DL - fosfatidilglicerol

DOPG	Dioleoilfosfatidilglicerol
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol-bis (β -amino éter) N, N, N', N' - tetracético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	Carbonil cianida <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
GLC	Cromatografia gás-líquido
Glu	Glutamato
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HO [•]	Radical hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	[N-(2 hidroxietil) piperazina N' - (2 ácido etanosulfônico)]
[K ⁺] _{in}	Concentração de K ⁺ da matriz mitocondrial
K _m	Constante de Michaelis
LO [•]	Radical alcóxil
LOO [•]	Radical peróxil
MDA	Malonaldeído
MMC	Megacanal mitocondrial
MTP	Transição de permeabilidade mitocondrial
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)

NEM	n-Etilmaleimida
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
Pi	Fosfato inorgânico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PnA	Ácido <i>cis</i> -parinário
PS	Fosfatidilserina
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
ROO [•]	Radicais peroxil
ROOH	Hidroperóxidos lipídicos
ROT	Rotenona
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
-SH	Grupamento sulfidril
SMP	Partículas submitocondriais
Suc	Succinato
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TLC	Cromatografia de camada fina
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano
TRR	Tempos relativos de retenção
u.a.	Unidades arbitrárias
Val	Valinomicina

vitE	Vitamina E
VR	Vermelho de rutênio
Δ^2A/Δ^{2+}	Segunda derivada
$\Delta\psi$	Potencial elétrico de membrana
$\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$	Gradiente eletroquímico de Ca^{2+}
$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradiente eletroquímico de prótons
ΔpH	Gradiente de concentração
λ	Comprimento de onda

RESUMO

Neste trabalho foi demonstrado que o fármaco antiarrítmico amiodarona inibe a velocidade inicial de captação de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato. Inibe também os efluxos mitocondriais de Ca^{2+} pela via Na^+ -dependente e pelo reverso do uniporter. A velocidade inicial de captação de Ca^{2+} mantém sua tendência sigmoide, mesmo em presença da droga. Experimentos de inchamento mitocondrial realizados em presença de amiodarona, permitem propor que baixas concentrações do fármaco conferem proteção ao inchamento induzido por Ca^{2+} e *t*-butilhidroperóxido provavelmente devido à inibição do influxo de Ca^{2+} . Devido à sensibilidade do tecido cardíaco a espécies reativas de oxigênio, os efeitos da amiodarona foram analisados na lipoperoxidação induzida em liposomas de fosfatidilcolina de soja, de lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi e em partículas submitocondriais de coração de boi, usados como sistemas modelo. A lipoperoxidação foi iniciada com Fe^{2+} /ácido ascórbico, e com radicais peroxil gerados a partir de azocompostos (AAPH e AMVN). Foi determinado que a amiodarona não altera significativamente a lipoperoxidação em liposomas de fosfatidilcolina de soja e lipídeos mitocondriais. Quando a lipoperoxidação iniciada pela adição de $\text{NADH}/\text{Fe}^{2+}$ foi analisada em um sistema mais complexo de partículas submitocondriais, na ausência ou presença de rotenona, a amiodarona inibiu o estágio final da lipoperoxidação. As partículas acopladas foram também submetidas à análise da lipoperoxidação iniciada por AAPH, e em presença do antiarrítmico ocorre uma inibição menor do que a observada com NADH e Fe^{2+} . Assim, concluiu-se que o efeito inibitório da amiodarona poderia estar relacionado indiretamente com a lipoperoxidação, ou com a cadeia respiratória pela sua já conhecida inibição causada pela droga a nível do complexo I. Os resultados sugerem que os efeitos terapêuticos e benéficos como fármaco antiarrítmico cardíaco, são independentes do processo de lipoperoxidação. Além disso, a interação da droga com a bicamada lipídica não induz significantes perturbações conformacionais que poderiam favorecer ou diminuir o processo peroxidativo.

ABSTRACT

In this work it was demonstrated that the antiarrhythmic drug amiodarone inhibits the initial rate of Ca^{2+} uptake in rat heart mitochondria, and also inhibit Na^{+} -dependent efflux and the efflux by the reverse of the uniporter. The initial rate of Ca^{2+} uptake maintained its sigmoidal tendency even in the presence of the drug. Mitochondrial swelling experiments in the presence of amiodarone, suggests that low drug concentrations protects the swelling induced by Ca^{2+} and *t*-butylhydroperoxide, probably due to Ca^{2+} influx inhibition. Owing to the sensitivity of heart tissue to reactive oxygen species, amiodarone was assayed in lipid peroxidation induced studies in liposomes of soybean phosphatidylcholine, in liposomes of lipids extracted from bovine heart mitochondria, and in submitochondrial particles from bovine heart, each used as a model system. Lipid peroxidation was initiated with Fe^{2+} /ascorbic acid, and with peroxy radicals generated from azocompounds (AAPH and AMVN). It was found that amiodarone did not change significantly lipid peroxidation in the liposomes of soybean PC or bovine heart mitochondrial lipids. When lipid peroxidation initiated by NADH and Fe^{2+} was assayed in a more complex system of submitochondrial particles, in the presence or absence of rotenone, amiodarone was able to inhibit the final stage of peroxidation. Coupled submitochondrial particles were also submitted to analysis of lipid peroxidation initiated by AAPH, and in the presence of amiodarone an inhibition occurred, but not to the same proportion as with NADH/ Fe^{2+} . It is concluded that the inhibitory effects of amiodarone could be related only indirectly to lipid peroxidation, or could be related to the respiratory chain, by the already known inhibition caused by the drug at levels of complex I. These results suggest that the therapeutic effects and benefits as a heart antiarrhythmic are independent of the lipid peroxidation process. Furthermore, the interaction of the drug with lipid bilayers does not induce significant conformational perturbations that could significantly favor or depress the peroxidation process.

I.INTRODUÇÃO

I.1 AMIODARONA

I.1 AMIODARONA

I.1.1 Aspectos gerais da ação da Amiodarona

Os problemas cardiovasculares, classificados entre as doenças crônicas degenerativas, representam a maior causa de debilidade e mortalidade de pacientes no mundo inteiro. Entre os principais sintomas estão as arritmias, que são desencadeadas por fatores resultantes de distúrbios na formação do impulso nervoso, na sua condução ou em ambos. Na maioria dos casos, a terapia de arritmias envolve a administração de agentes antiarrítmicos, modalidade terapêutica que apresenta um potencial de risco (PODRID, 1995).

Os medicamentos antiarrítmicos foram classificados de acordo com seus efeitos sobre o potencial de ação cardíaco por VAUGHAM (1974); esta classificação foi reavaliada após uma década de novas drogas por VAUGHAM WILLIAMS (1984), quando foi sugerido que a maioria das drogas tem mais que uma das quatro ações descritas na classificação antiarrítmica. Isto merece ênfase pois este critério de classificação não é somente uma categorização dos fármacos de acordo com a estrutura química ou propriedades físicas, mas propriamente descreve quatro caminhos em que os ritmos cardíacos anormais podem ser corrigidos ou prevenidos. Portanto, os antiarrítmicos podem:

- 1 . interferir nos processos pelos quais a despolarização é transferida através da membrana (SZEKERES e VAUGHAN WILLIAMS, 1962) - canal "rápido" de sódio;
- 2 . possuir efeito antissimpático - assim como os bloqueadores β -adrenérgicos;

3 . ser prolongador da duração do potencial de ação (APD) - canal de K^+ (AHFS, 1992);

4 . ser antagonista do canal de cálcio .

Os antiarrítmicos representam ainda as primeiras e mais frequentes terapias usadas para as arritmias. Existem duas indicações para o uso destes fármacos: a) para eliminar os sintomas resultantes de uma arritmia, b) para prevenir a morte súbita cardíaca e prolongar a vida pela eliminação das arritmias associadas com um aumento do risco de morte súbita (PODRID, 1992).

A amiodarona descoberta em 1960, é um importante agente antiarrítmico. Foi originalmente usada como agente antianginal pela sua capacidade de dilatar artérias coronarianas e diminuir a velocidade cardíaca (FUTTERMAN e LEMBERG, 1997). Na década de 70, este fármaco foi descrito como tendo efeito de prolongar a duração do potencial de ação atrial e ventricular no miocárdio (CHARLIER et al. 1968; CHARLIER, 1970; SINGH e VAUGHAN WILLIAMS, 1970). Os primeiros cardiologistas a usarem a amiodarona como um antiarrítmico foram FERRERO e BEN ABDERHAMANE (1972), e seu uso foi aprovado pela Food and Drug Administration nos Estados Unidos em dezembro de 1985 (KODAMA et al., 1997). Desde então o medicamento tem sido indicado para o tratamento de arritmias taquiventriculares, ventriculares e supraventriculares, além daquelas refratárias a outras drogas (MASON, 1987; SAAVEDRA et al., 1992).

O exato mecanismo de ação deste agente antiarrítmico ainda não está conclusivamente demonstrado. Contudo, sabe-se que a amiodarona por sua ação sobre os fluxos de potássio é considerada como agente antiarrítmico da classe III, interferindo na repolarização da membrana e prolongando a duração do potencial de

ação (SINGH, 1993). Apresenta ainda alguma ação bloqueando o canal de sódio sensível a voltagem e diminuindo a velocidade de despolarização na fase 0, como agente da classe I. Atua bloqueando não competitivamente os receptores α e β adrenérgicos, e este último representando um efeito antiarrítmico da classe II. A amiodarona tem também pequena ação bloqueadora dos canais de cálcio cardíacos (classe IV). Esta droga antiarrítmica pode também causar vasodilatação arterial periférica e coronariana, reduzindo a resistência vascular periférica e aumentando o fluxo sanguíneo coronariano. Esta variedade de mecanismos da amiodarona contribui para diminuir a velocidade do fluxo cardíaco. (BACQ et al., 1976; POLSTER e BROEKHYSEN, 1976; PODRID, 1992; PODRID, 1995; KOWEY et al., 1997; TAI et al., 1998). Pela multiplicidade de seus efeitos antiarrítmicos, a amiodarona é considerada útil no tratamento de uma variedade de arritmias cardíacas (KOWEY et al., 1997), sendo considerado como único fármaco que representa o protótipo daqueles compostos complexos que são antifibrilatórios em átrios e ventrículos (FUTTERMAN e LEMBERG, 1997).

I.1.2 Propriedades Químicas e Farmacocinéticas da Amiodarona

Segundo CHATELAIN et al. (1986) a amiodarona é composta por um volumoso anel hidrofóbico com pequena cauda polar (Fig. 1); possui um anel benzeno contendo 2 moléculas de iodo, onde em cada 200 mg de amiodarona, 75 mg são de iodo (WILSON e PODRID, 1991). Este benzofurano iodado contém em sua estrutura um anel similar à tiroxina. Apresenta-se na forma de um pó cristalino

branco.

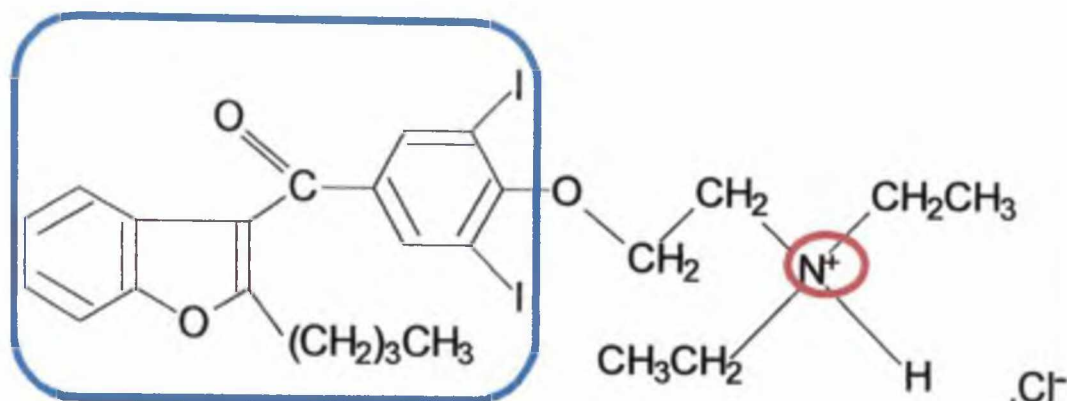


Figura1.Amiodarona,[2-butil-3-(3',5'diiodo-4' α -dietilaminoetoxibenzoil)-benzofurano]

O cloridrato de amiodarona pertence a classe das drogas anfífilas catiônicas, cujas moléculas altamente lipofílicas podem fortemente interagir com membranas (PAILLOUS e FERY-FORGUES, 1994; ANTUNES-MADEIRA, 1995). Seu carácter hidrofóbico é revelado em um alto coeficiente de partição que está na faixa de 10^6 (CHATELAIN e LARUEL, 1985; TRUMBORE et al., 1988; REKKA et al., 1990).

O valor de pKa da amiodarona é de $8,5 \pm 0,5$, e foi determinado medindo-se o potencial de superfície, que não é afetado pela falta de solubilidade da droga. Este valor de pKa parece ser o mais correto para uma amina terciária (FERREIRA et al., 1987; PAILLOUS e FERY-FORGUES, 1994), em relação a outros valores descritos (ANDREASEN et al., 1981; CANADA et al., 1981; BONATI et al., 1984). Portanto, em pH fisiológico, a amiodarona está principalmente na forma protonada.

Os parâmetros da farmacocinética do cloridrato de amiodarona estão razoavelmente bem estudados. Administrada por via oral, a droga é lenta e

variavelmente absorvida pelo trato gastrointestinal (22 - 86 %); seu pico de concentração plasmática é atingido de 2 a 10 h, com biodisponibilidade de aproximadamente 40% (GILL et al., 1992). Esta baixa biodisponibilidade é provavelmente devido a uma N-desalquilação da amiodarona no lúmen intestinal ou mucosa gastrointestinal que ocorre antes de alcançar o sistema porta, ou então por características da baixa dissolução da droga. Após dose oral de 400 mg em jejum (adultos saudáveis), o pico plasmático é aproximadamente 0,15 a 0,7 µg/mL. Uma terapia prolongada com amiodarona por via oral, não produz um "steady-state" da concentração plasmática por pelo menos 1 mês, porém, uma resposta terapêutica pode chegar dentro de 2 a 3 dias. O tempo do efeito antiarrítmico máximo ocorre de 1 a 5 meses após início da terapia por via oral. Estes efeitos podem persistir por até 150 dias após a retirada de terapia prolongada com amiodarona. Com base na supressão das arritmias, concentrações plasmáticas de amiodarona de aproximadamente 1-2,5 µg/mL são normalmente necessárias para um ótimo efeito terapêutico (MARTINDALE, 1989; SAAVEDRA et al., 1992; AHFS, 1992). Estudos em que foram utilizadas grande dose oral ou intra-venosa levando a níveis de concentração plasmática > 2,5µg/mL, mostraram atividade precoce da droga (MASON, 1987; GOODMAN GILMAN et al., 1991; AHFS,1992). A amiodarona administrada por via intravenosa atinge o pico de concentração plasmática em cerca de 30 minutos (KOWEY et al., 1997).

A distribuição de amiodarona nos tecidos e fluidos do corpo humano, ainda não está totalmente caracterizada. Após administração intra-venosa (IV) em ratos, a amiodarona é distribuída extensivamente na maioria dos tecidos, incluindo tecido adiposo, fígado, rins, coração e em menor extensão no SNC. Uma distribuição

semelhante ocorre em humanos, após administração oral crônica. "*In vitro*", a amiodarona liga-se a proteínas plasmáticas em aproximadamente 96%, com cerca de 62% ligada à albumina e 33,5% à β lipoproteína (LALLOZ et al., 1984; REYNOLDS, 1989).

Quando a amiodarona chega ao miocárdio sua concentração em relação à do plasma, é de 10 a 50 vezes maior. Pelo fato deste fármaco ser largamente distribuído em todos os órgãos que contém células adiposas e muitas vezes acumulado em tecidos pouco perfundidos, tem a velocidade de "clearance" diminuída; o que pode ser a causa de seus muitos efeitos tóxicos (ADAMS et al., 1985; ADAMS et al., 1986). Supõe-se que a amiodarona e seu metabólito ativo sejam armazenados nos adipócitos de onde são lentamente mobilizados (77 dias) e distribuídos aos outros tecidos (PLOMP et al., 1990; FREEDMAN e CRAPO, 1991).

O atraso da eficácia antiarrítmica da amiodarona pode ser devido ao uso de dose relativamente baixa, resultando em nível inadequado da droga no plasma, até que ocorra seu extensivo acúmulo nos tecidos. O tempo de meia vida biológica da amiodarona em terapia prolongada é de 14 a 107 dias (MASON, 1987; REYNOLDS, 1989; AHFS, 1992). A amiodarona é metabolizada e deiodinizada no fígado (KOWEY et al., 1997), e possui dois metabólitos conhecidos: a mono-N-desetilamiodarona que é um metabólito ativo e pode contribuir com o efeito antiarrítmico de forma menos potente, e a bis-N-desetilamiodarona. A eliminação da droga é bifásica: inicialmente a concentração plasmática cai à metade e posteriormente ocorre uma segunda fase de eliminação lenta e prolongada. Este padrão resulta de rápida distribuição de amiodarona no coração, seguido por lento "clearance" de amiodarona nos tecidos periféricos. Após dose oral e intra-venosa, a

amiodarona parece ser excretada quase completamente pelas fezes como droga não alterada, presumivelmente por eliminação via biliar, o mesmo ocorrendo com o seu metabólito, a desetilamiodarona. Alguns dados sugerem que a amiodarona pode seguir circulação enterohepática e que a excreção renal parece sem importância, sendo responsável pela eliminação de menos de 1% da dose administrada (MASON, 1987; REYNOLDS, 1989; AHFS, 1992; GILL et al., 1992).

A superdosagem de amiodarona tem sido descrita como 4 g, seguida de uma segunda administração após 12 h (GODDARD e WHORWELL, 1989).

1.1.3. Efeitos Adversos da Amiodarona

Os efeitos adversos relacionados ao uso crônico da amiodarona são decorrentes da sua ampla distribuição nos tecidos que contém células adiposas, onde se observou a formação de corpos de inclusão lisossomiais multilamelares (ADAMS et al., 1985); a disposição de amiodarona e seus metabólitos difundidos nos tecidos levam a mudanças estruturais indicativas de lipidoses (MURPHY et al., 1996). Existe considerável sobreposição entre as concentrações necessárias para a eficácia terapêutica e a dose associada com a toxicidade (HAFFAJEE et al., 1983). MASON (1985) relata que a toxicidade está relacionada com o acúmulo da dose total administrada, e não pode ser avaliada apenas pela dose diária ou só pela duração do tratamento.

Complicações cardiovasculares como bradicardia, agravamento das arritmias e insuficiência cardíaca congestiva tem sido descritas (McGOVERN et al., 1983;

WAXMAN et al., 1987). Complicações pulmonares como pneumonite (MASON, 1985; WAXMAN et al., 1987) e a fibrose pulmonar (RAEDER et al., 1985), além de toxicidades gastrointestinais constituem importantes efeitos colaterais deste fármaco (WAXMAN et al., 1987), sendo a pneumonite a mais séria das toxicidades não cardíacas causadas pela amiodarona. Muitos dos efeitos colaterais da amiodarona estão relacionados com o desenvolvimento de fosfolipidose em grande variedade de tecidos, como consequência da inibição da fosfolipase A que parece ser semelhante em todos os casos estudados (LÜLLMANN et al., 1978; HOESTETLER e MATSUZAWA, 1981; REASOR et al., 1989; KODAVANTI e MEHENDELE, 1991; MEHENDELE et al., 1994; REASOR et al., 1996). Esta inibição foi observada através do teste de atividade *in vitro*, em pacientes recebendo a droga. Como consequência desta inibição a nível da fosfolipase A ocorre fibrose e fosfolipidose hepática; e a nível da fosfolipase A lisossomal ocorre fosfolipidose pulmonar (acúmulo de fosfolipídeos) (LÜLLMANN et al., 1978; HOESTETLER e MATSUZAWA, 1981; REASOR et al., 1989; KODAVANTI e MEHENDELE, 1991).

Os outros efeitos caracterizam-se como complicações neurológicas, sendo um dos efeitos adversos mais comuns a neuropatia periférica (MORADY et al., 1983), além de alterações oculares caracterizadas pelo desenvolvimento de microdepósitos na córnea, que são o resultado da secreção da droga na glândula lacrimal seguido de sua captação pelas células da córnea (INGRAM, 1983; KAPLAN e CAPPAERT, 1984). Em estudos usando microscopia eletrônica, foram encontrados corpos lamelares membranosos intracitoplasmáticos em células de epitélio basal da córnea, que continham grandes quantidades de iodo (MANTYJARVI et al., 1998). Considerando que a amiodarona contém 37% de iodo

em sua molécula, pacientes em tratamento com esta medicação podem apresentar alterações de função da glândula tireóide bem como sobre o metabolismo da tiroxina (T4), cuja estrutura é semelhante a amiodarona (WILSON e PODRID, 1991). O fármaco inibe a atividade da iodotironina-5'-monodeiodinase, bloqueando a conversão do T4 para o T3 (KOWEY et al., 1997). Como consequência, as concentrações plasmáticas e teciduais de triiodotironina (T3) diminuem e as de tiroxina (T4) aumentam (KODAMA et al., 1997). A tireóide se adapta a esta situação causando hipotireoidismo (KANNAN et al., 1990; UNGER, 1990; BJORN-HANSEN et al., 1991).

Efeitos dermatológicos como fotossensibilidade também são comuns, assim como o acúmulo cutâneo, especialmente em áreas expostas ao sol. Segundo ZACHARY et al. (1984) a radiação UV intensificaria a ligação da amiodarona nas membranas, o que justificaria os pigmentos amarelo-marrom semelhantes ao iodo em macrófagos perivasculares dermais.

1.1.4. Ações Fármaco-Bioquímicas da Amiodarona

Vários estudos tem sido realizados com o objetivo de melhor esclarecer o mecanismo de ação da amiodarona, como também seus efeitos colaterais.

O fármaco exerce importante ação de relaxamento do músculo liso cardíaco e vascular; dilata artérias sistêmicas e coronarianas. Estudos em seres humanos e animais também sugerem que a amiodarona reduz o consumo de oxigênio miocárdial. Este efeito poderia surgir como resultado da redução do ritmo cardíaco,

da redução da pressão sanguínea, da baixa redução da pressão sistólica e ventricular que expressam a tensão desenvolvida pela contração cardíaca (BAUDINE et al., 1967; CHARLIER et al., 1967 a, b, c; AHFS, 1992).

A amiodarona inibe a atividade da Na^+/K^+ ATPase das membranas plasmáticas de células de pulmão (REASOR et al., 1989), de miocárdio (BROEKHUTSEN et al., 1972; CHATELAIN et al., 1985 ; ALMOTREFI e DZIMIR, 1991) e sinaptossoma cerebral (PRASADA et al., 1986). Este último efeito foi relacionado com a neuropatia observada nas situações de terapia prolongada com o fármaco (PRASADA et al., 1986). A neurotoxicidade induzida pela amiodarona pode ocorrer por vias diferentes: a) pelo antagonismo à calmodulina (DEZIEL et al., 1989); b) pelo seu efeito inibitório sobre as atividades da proteína-quinase C de membrana neuronal (VIG e DESAIAH, 1991); c) pela inibição da fosfodiesterase (DEZIEL et al., 1989); d) por um aumento de Ca^{2+} livre intracelular através da modulação de canal, mediado por receptor (KODAVANTI et al., 1992).

GUERREIRO (1984) e GUERREIRO et al. (1986a, b) observaram que a amiodarona em altas doses inibe a fosforilação oxidativa bem como estimula a atividade hidrolítica da ATPase em mitocôndrias intactas. Este antiarrítmico promove inibição da redução do NADP^+ pela energização mitocondrial por ATP ou por succinato, e uma pequena inibição de NADH oxidase e de succinato oxidase em mitocôndrias rompidas; nenhum efeito foi observado na atividade da enzima citocromo c oxidase. Em altas doses o efeito da amiodarona na ultraestrutura de mitocôndrias de coração de rato mostrou ruptura na membrana interna e cristas extendidas com o aumento do volume da matriz, e uma progressiva saída do conteúdo das vesículas inchadas para o meio externo. Em altas doses a amiodarona

também colapsa o potencial de membrana e também o ΔpH , promovendo um efeito de desorganização generalizada da estrutura mitocondrial, além de modificar a permeabilidade da membrana ao K^+ . GUERREIRO e colaboradores (1986 a, b) sugeriram então que esta droga tem uma ação primária na membrana mitocondrial, agindo como um desacoplador.

Com o objetivo de tentar determinar a localização da amiodarona na bicamada lipídica, TRUMBORE et al. (1988) utilizaram a metodologia de difração de raio X e conformações cristalográficas (mecanismos moleculares programa MMP2), onde mostraram que a amiodarona se localiza dentro do core de hidrocarboneto da bicamada lipídica, próximo da região metil terminal, afetando a dinâmica de fosfolipídeos. CHATELAIN et al. (1986) através de polarização de fluorescência, encontraram que a droga penetra profundamente na matriz lipídica, com seu núcleo hidrofóbico localizado ao longo da cadeia carbonada de lipídeos, como ocorre com o colesterol, e o resíduo amino na interface lipídeo água. Além disso, FERREIRA et al. (1987) demonstraram, através de estudo calorimétrico, que diferentes localizações da amiodarona na fase líquida cristalina ocorre pela variação de seu estado de ionização. Na forma ionizada, a amiodarona poderia estar localizada na região próxima a interface da bicamada e o grupo amina terciária próximo a região do grupo cabeça da matriz lipídica. JENDRASIAK et al. (1990) realizaram experimentos usando lipossoma, RNM e difração de raio X. Os resultados obtidos mostram que os átomos de iodo da amiodarona estão localizados próximos da interface lipídeo/água e que a amina terciária está na região da cabeça polar da bicamada. Já SAUTEREAU et al. (1992) utilizando sondas DMPG (dimiristoil-DL-fosfatidilglicerol) e DMPC (dimiristoil-DL-fosfatidilcolina) incorporadas em liposomas, verificaram que a

amiodarona se localizou na parte apolar da bicamada lipídica, o resíduo amino próximo a interface lipídeo/água, sendo que o núcleo hidrofóbico da droga se estendeu ao longo da cadeia hidrocarbonada da fração lipídica.

ANTUNES/MADEIRA et al. (1995) relataram o efeito da amiodarona na organização de membranas, avaliado por polarização de fluorescência, em membranas nativas mitocondriais e membranas sintéticas (dimeristoilfosfatidilcolina - DMPC e dipalmitoilfosfatidilcolina - DPPC). Nesse trabalho verificou-se que a amiodarona provavelmente se localiza ao longo da região da bicamada entre o C1 e o C9, podendo se estender para a superfície da bicamada lipídica de membrana, induzindo mudanças na organização da mesma. Durante o processo de interação da amiodarona com componentes de membranas existe a participação de forças hidrofóbicas e eletrostáticas. Estas forças são influenciadas pela exata posição da droga na membrana, a qual depende da geometria e do estado físico da membrana. Na preparação de membranas nativas em função da temperatura ou em presença de colesterol, as forças hidrofóbicas predominam e conseqüentemente são observados os efeitos de desorganização promovidos pela droga. Por outro lado, em membranas fluidas, as forças eletrostáticas também ocorrem e conseqüentemente a amiodarona induz os efeitos de organização. Estas mudanças na organização induzida pela amiodarona estão presumivelmente envolvidas nos efeitos bioquímicos e fisiológicos da droga (BROEKHUYSEN et al., 1972; CHATELAIN et al., 1985; DEZIEL et al., 1989; VIG e DESAIAH, 1991). Porém, a localização da amiodarona em membranas de acordo com a predominância de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas é ainda uma questão aberta. De acordo com a opinião de PAILLOUS e FERY-FORGUES (1994) a droga pode ser

encontrada em sua forma ionizada ou neutra interagindo com os lipídeos em sua fase de gel ou líquida cristalina.

SAUTEREAU e colaboradores (1992) examinaram as propriedades da amiodarona irradiada, quando incorporada em lipossomas preparados com dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG). A quantidade de oxigênio captado foi maior do que aquela observada na ausência da droga, provavelmente porque a droga desalogenada promoveu um processo de oxidação. A captação do oxigênio oxidaria o ácido graxo insaturado e poderia levar a peroxidação de fosfolipídeos insaturados. Isto pode ser justificado pelo fato de que a amiodarona é desalogenada por clivagem homolítica da ligação carbono-halogênio, sob irradiação (LI e CHIGNELL, 1987; PAILLOUS e VERRIER, 1988). O radical derivado da droga pode sequestrar um hidrogênio alílico de um lipídeo, produzindo facilmente um radical oxidável. Portanto, a proximidade de amiodarona com uma ligação dupla nos lipídeos é essencial para ocorrer a peroxidação.

REKKA et al. (1990) demonstraram que a amiodarona poderia inibir não enzimaticamente, a lipoperoxidação induzida por Fe^{2+} /ácido ascórbico através da medida do material reativo ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em fração microssomal inativada de fígado de rato. Sugeriram também, que a atividade antioxidante da droga pode ser parte de seu modo de ação.

Estudos "*in vitro*" da atividade antioxidante da amiodarona, também foram realizados no Laboratório de Oxidações Biológicas, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, por RIBEIRO et al. (1997). Nestes estudos observou-se a capacidade da droga de diminuir a formação de malondialdeído (dialdeídomalônico) (TBARS) em um sistema contendo mitocôndrias energizadas

com α -cetoglutarato e succinato, enriquecidos com Fe^{3+} -ADP, onde foi observada uma inibição da lipoperoxidação de 70 %, quando a amiodarona (16,6 μM) foi incubada em presença de mitocôndrias. Verificaram também que a amiodarona não tem efeito na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase, sugerindo que a amiodarona não promove aumento na formação do ânion superóxido dependente da atividade redox mitocondrial.

Estes efeitos da amiodarona podem revelar fatores fisiológicos que são importantes no desenvolvimento de desordens a nível de membrana mitocondrial, incluindo efeitos bioquímicos do transporte mitocondrial de cálcio e a nível de peroxidação de componentes lipídicos da membrana.

Para melhor fundamentar esta questão, uma revisão referente aos mecanismos dos fluxos mitocondriais de Ca^{2+} , bem como dos efeitos relacionados a este íon na integridade da membrana, é importante. Da mesma forma, considerando as inúmeras evidências de fatores interdependentes envolvendo Ca^{2+} , "stress" oxidativo e lipoperoxidação, uma abordagem destes parâmetros também será feita nesta Introdução.

I.2 FLUXOS MITOCONDRIAIS DE Ca^{2+}

I.2. FLUXOS MITOCONDRIAIS DE Ca^{2+}

I.2.1 Aspectos Gerais dos Fluxos Mitocondriais de Ca^{2+}

Descrito pela primeira vez na década de 60, o transporte mitocondrial de Ca^{2+} tem sido mostrado em mitocôndrias isoladas de todos os vertebrados, alguns invertebrados, plantas e protozoários (DeLUCA e ENGSTROM, 1961; VASINGTON e MURPHY, 1962; MARTINS et al., 1986; VERCESI, 1993). Estas organelas possuem um elaborado sistema para o transporte deste cátion através da membrana interna (GUNTER e PFEIFFER, 1990), que opera através de mecanismos específicos para influxo e efluxo (CROMPTON et al., 1976; CROMPTON, 1977; CROMPTON e HEID, 1978).

Vários estudos têm proposto que a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria é mediada por um carreador, localizado na membrana interna mitocondrial (MELA, 1968; VINOGRADOV e SCARPA, 1973; REED e BYGRAVE, 1975; BYGRAVE, 1977; CROMPTON et al., 1977; CROMPTON et al. 1978).

A via de influxo ou uniporter, (NICHOLLS e FERGUSON, 1992), permite à organela acumular Ca^{2+} pelo seu gradiente eletroquímico, $\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$ (GUNTER et al., 1990; VERCESI, 1993), que é fundamentado pela hipótese quimiosmótica de MITCHELL (1961-1962) (NICHOLLS e AKERMAN, 1982; VASINGTON et al., 1962).

Na hipótese quimiosmótica, o evento primário é a translocação de H^+ através da membrana mitocondrial com o desenvolvimento de um gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$), constituído de dois componentes : um gradiente de concentração

(ΔpH), alcalino na matriz, e um potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$), negativo no interior da mitocôndria (equação 1). Este gradiente é responsável pelo movimento eletroforético do cátion através da membrana mitocondrial, resultando em uma distribuição equilibrada de Ca^{2+} intra e extramitocondrial (LEHNINGER, 1973).

$$\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\psi - 60 \Delta\text{pH} \quad (1)$$

Em mitocôndrias isoladas, e "*in situ*", sob condições de repouso, o potencial de membrana ($\Delta\psi$) alcança valores entre 150 e 180 mV (negativo internamente) enquanto o componente $60 \Delta\text{pH}$ varia de 20 a 50 mV (MITCHELL e MOYLE, 1969; SCOTT et al., 1980). Sendo assim, a captação de Ca^{2+} para o interior da mitocôndria será impulsionada pelo seu potencial eletroquímico ($\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$) de acordo com a equação 2:

$$\Delta\mu \text{Ca}^{2+} = 2\Delta\psi - 60 \log \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{matriz}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{meio}}} \quad (2)$$

onde $\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$ representa o potencial eletroquímico de Ca^{2+} e $\Delta\psi$ representa o potencial elétrico transmembrana (LEHNINGER, 1970; SARIS e AKERMAN, 1980; TEDESCHI, 1981).

Em condições de equilíbrio quando $\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$ é igual a zero, tem-se (3):

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{matriz}} = \frac{10^{\Delta\psi/30}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{meio}}} \quad (3)$$

De acordo com esta equação o gradiente de concentração de Ca^{2+} livre através da membrana seria teoricamente 10^6 ; entretanto, este valor calculado é discordante dos valores experimentais encontrados, onde o gradiente de Ca^{2+} através da membrana é muito inferior ao valor termodinâmico obtido pela equação de Nernst (DENTON e McCORMACK, 1985; HANSFORD et al., 1985; GUNTER e PFEIFFER, 1990).

Apesar do influxo de Ca^{2+} não estar diretamente acoplado ao transporte de qualquer outro íon (GUNTER et al., 1994), para ocorrer um acúmulo significativo de Ca^{2+} a presença no meio de um ânion permeante à membrana interna é importante para que a eletroneutralidade do processo seja mantida. Dentre estes ânions estão incluídos o fosfato, acetato, bicarbonato, β -hidroxibutirato, entre outros; a entrada destes, junto com o Ca^{2+} , recupera a alteração do ΔpH e assim o $\Delta\psi$ pode ser mantido (AKERMAN e NICHOLLS, 1983). A atividade do uniporter, é influenciada por fatores como a concentração de Ca^{2+} , pH externo, temperatura, $\Delta\psi$ e a presença de inibidores, como o vermelho de rutênio (AKERMAN e NICHOLLS, 1983). A inibição da via de influxo por este último agente, permite a visualização de vias de efluxo, que operam continuamente em oposição ao influxo, por mecanismos independentes deste. Sob condições fisiológicas, a via de efluxo parece operar independentemente do $\Delta\psi$ (AKERMAN e NICHOLLS, 1983), porém evidências contrárias também tem sido descritas (GUNTER e PFEIFFER, 1990), sugerindo que

a mitocôndria permanece impermeável e acoplada durante o processo (NICHOLLS, 1978 a, b). Por outro lado, a presença de protonóforos, como o FCCP, estimula a liberação de Ca^{2+} , consistente com o conhecido efeito desses agentes desacopladores que agindo como condutores de prótons suprimem o gradiente transmembrana de H^+ (SCARPA, 1976). O Ca^{2+} , neste caso, seria liberado da mitocôndria pelo caminho reverso do uniporter. Portanto, a velocidade total de efluxo observada seria a soma do efluxo através de qualquer caminho independente do influxo, acrescido da contribuição pelo reverso do uniporter.

Em tecidos excitáveis como o coração, o efluxo de Ca^{2+} independente do uniporter, parece ser mediado preferencialmente por uma via dependente de Na^+ , enquanto que nos tecidos não excitáveis, o efluxo ocorreria preferencialmente por uma via independente de Na^+ , que troca $\text{Ca}^{2+}/n\text{H}^+$ (FISKUM e LEHNINGER, 1979; GUNTER e PFEIFFER, 1990). Todavia foi constatada a existência de trocador $\text{Ca}^{2+}/n\text{Na}^+$ em mitocôndrias hepáticas (NEDERGARD, 1984), bem como efluxo de Ca^{2+} independente de Na^+ em coração (CROMPTON, 1977). A quantidade relativa e a importância destes mecanismos pode diferir de tecido para tecido e depende do nível de Ca^{2+} mitocondrial (CARAFOLI, 1979).

A operação simultânea dos processos independentes de transporte de Ca^{2+} , influxo e efluxo, estabelece um "steady state" de Ca^{2+} livre extramitocondrial, no limite entre 0,1 e 1,0 μM (NICHOLLS, 1978; GUNTER e GUNTER, 1994), resultando em movimento cíclico e contínuo do Ca^{2+} através da membrana interna (AKERMAN e NICHOLLS, 1983; GUNTER e PFEIFFER, 1990), já que a concentração de Ca^{2+} livre intramitocondrial é da ordem de 0,1-2,0 μM (VERCESI, 1993).

1.2.2 Fluxos mitocondriais de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração

O Ca^{2+} citosólico está envolvido no controle de uma variedade de processos celulares, como por exemplo nos mecanismos de contração e relaxamento do músculo cardíaco, tecido em que o retículo sarcoplasmático é escasso (PARR e HARRIS, 1976; CROMPTON et al., 1978), e as mitocôndrias são abundantes (NICHOLLS, 1978).

É conhecido de longa data que neste tecido, as mitocôndrias podem acumular grandes quantidades de Ca^{2+} (FANBURG et al., 1964; GERGELY et al., 1965; WEBER, 1966) sem efeitos deletérios à organela (VERCESI et al., 1978).

Os resultados de VERCESI et al. (1978) demonstram que, em mitocôndrias de coração, a razão estequiométrica entre o Ca^{2+} e o sítio do carreador é 2,0 - respeitada a ativação do fluxo de elétrons e o acúmulo de Ca^{2+} . Neste caso, segundo KASPARINSKY e VINOGRADOV (1996) e outros autores (BYGRAVE et al., 1971; SCARPA e GRAZZIOTTI, 1973; VINOGRADOV e SCARPA, 1973; REED e BYGRAVE, 1975; HEATON e NICHOLLS, 1976; HUSTON et al., 1976; BRAGADIN et al., 1979; GUNTER e GUNTER, 1994) o sistema de captação de Ca^{2+} segue uma cinética de segunda ordem, sigmoideal, onde a $[\text{Ca}^{2+}]$ exerce cooperatividade positiva. Este aparente efeito cooperativo, poderia ser devido a lenta ativação de um uniporter específico de Ca^{2+} que é inativo na ausência de Ca^{2+} externo (KASPARINSKY e VINOGRADOV, 1996). O coeficiente de Hill estimado é de cerca de 2,0. Este coeficiente indicaria a presença de 2 sítios ligantes, onde a ligação de um íon em um sítio de ativação aumentaria a afinidade para a ligação de outro íon em um sítio de transporte (VINOGRADOV e SCARPA, 1973). A velocidade máxima da captação de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração varia entre 280 e 600

nmoles Ca^{2+} . min^{-1} . mg^{-1} (CROMPTON et al., 1976; McMILLIN-WOOD et al., 1980; GUNTER e PFEIFFER, 1990; GUNTER e GUNTER, 1994).

Alguns pesquisadores observaram que as mitocôndrias de coração possuem um antiporter específico e muito ativo para as trocas $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o qual também ocorre em mitocôndrias de outros tecidos como músculo esquelético, córtex adrenal, glândula salivar, tecido da gordura marrom e cérebro; enquanto que o efluxo insensível ao Na^+ ($\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$) é bem menos ativo (CROMPTON et al., 1979).

Em mitocôndria de coração a velocidade do efluxo de Ca^{2+} está relacionada diretamente a concentração adicionada de Na^+ , por uma relação sigmoideal. A 25°C , e na presença de 8 mM de sódio, a velocidade de efluxo é 0,12 nmol Ca^{2+}/mg proteína/segundo, cerca de 6 vezes menor do que a da captação (CARAFOLI e CROMPTON, 1978).

Em mitocôndrias de coração, como de outras fontes, as propriedades cinéticas do influxo - efluxo de Ca^{2+} são compatíveis com a hipótese na qual o sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial regula a concentração do íon cálcio livre na matriz (DENTON e McCORMACK, 1985; HANSFORD, 1985).

O aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ na matriz mitocondrial, na faixa de 0,1 a 10 μM , ativa o metabolismo oxidativo intramitocondrial através do estímulo das enzimas piruvato desidrogenase, NAD^+ - isocitrato desidrogenase e 2-oxoglutarato desidrogenase. Também estimula a piruvato desidrogenase ativando a piruvato desidrogenase fosfato fosfatase, enzima que catalisa a desfosforilação da primeira (DENTON et al., 1972; HANSFORD, 1981). Assim, a principal função do sistema de transporte de Ca^{2+} para o interior da mitocôndria poderia ser interpretada como um modo pelo qual mudanças na concentração de Ca^{2+} citosólico seriam retransmitidas para dentro da

mitocôndria, e influenciariam a atividade de desidrogenases intra mitocondriais sensíveis ao Ca^{2+} (DENTON e HALESTRAP, 1979; DENTON e McCORMACK, 1980), o que estimularia o metabolismo oxidativo e a produção de ATP.

Sob algumas condições patológicas, a concentração de Ca^{2+} citosólico é sustentada a níveis compatíveis com a capacidade tamponante mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}] > 0,5\mu\text{M}$). Sob tais circunstâncias a concentração de Ca^{2+} intramitocondrial é elevada para níveis que danificam as funções da organela, o que parece ocorrer por 2 mecanismos independentes: a) formação de um complexo CaADP , que inibe a fosforilação oxidativa porque compete com MgADP pelo sítio ativo da F_0F_1 - ATPase (FAGIAN et al., 1990; VERCESI et al., 1990), e b) sob condições de "stress" oxidativo, o acúmulo de Ca^{2+} por mitocôndrias conduz a uma condição referida como "transição de permeabilidade de membrana mitocondrial", caracterizada por inchamento mitocondrial, queda do potencial de membrana e saída de K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , nucleotídeos de adenina e piridina e proteínas, pela membrana interna (GUNTER et al., 1990).

Portanto, os papéis fisiológicos mais plausíveis para o transporte de Ca^{2+} são o de proteger o citosol contra o dano devido a altas concentrações de Ca^{2+} citosólico; e de regular o Ca^{2+} livre da matriz mitocondrial afim de controlar o nível de ativação das desidrogenases sensíveis ao Ca^{2+} , bem como outros processos metabólicos sensíveis ao Ca^{2+} (GUNTER et al., 1994).

I.2.3 Transição de Permeabilidade Induzida pelo Ca^{2+}

1.2.3.1. Aspectos Gerais

O termo **Transição de Permeabilidade** foi primeiramente definido por HUNTER e HAWORTH (1979a), que demonstraram um inchamento mitocondrial induzido pelo acúmulo de Ca^{2+} , ocorrendo quando a mitocôndria passa de estado acoplado com configuração agregada para estado desacoplado e matriz mitocondrial expandida. Estas alterações mitocôndriais causadas pelo Ca^{2+} , permitem a passagem de moléculas de baixo peso molecular ($\text{PM} \leq 1500$), componentes do suporte osmótico, que se deve ao aumento inespecífico da permeabilidade da membrana. Este fenômeno pode ser considerado como uma forma inespecífica de dano na membrana (BERNARDI et al., 1998).

A **transição de permeabilidade mitocondrial (MTP)** é caracterizada também por oxidações de grupos tióis de proteínas da membrana mitocondrial interna, conforme pode ser observado pela reversibilidade deste fenômeno quando se adicionou quelantes de Ca^{2+} e agentes redutores como o ditioneitol logo após seu início (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999).

Provavelmente o único dogma da transição de permeabilidade é que esta requer o acúmulo de Ca^{2+} na matriz. A quantidade de Ca^{2+} necessária para a observação do fenômeno varia com a espécie ou órgão de origem da mitocôndria, sendo via de regra, a mitocôndria de coração, mais resistente do que a de fígado (ZORATTI e SZABÓ, 1995).

1.2.3.2. Indutores da Transição de Permeabilidade

Embora a adição de Ca^{2+} seja suficiente para induzir a transição de permeabilidade pelo menos em mitocôndrias de fígado, coração, rim e córtex adrenal, este processo pode ser acelerado por ação de algumas substâncias designadas como indutores (ZORATTI e SZABÓ, 1995). Adicionalmente, agentes protetores também são descritos (VERCESI, 1984; BERNARDES et al., 1986; CROMPTON et al., 1987; VALLE et al., 1993; NOVGORODOV et al., 1994).

O indutor da transição de permeabilidade mais estudado é o Pi, o qual apresenta características sinérgicas em relação ao Ca^{2+} , na indução do fenômeno (HACKENBROCK e CAPLAN, 1969). Outros indutores foram estudados destacando-se os agentes oxidantes, como os nucleotídeos de piridina, hidroperóxidos (t-butilhidroperóxido, peróxido de hidrogênio) e espécies que geram radicais como a menadiona, xantina, xantina oxidase, Fe^{2+} , Fe^{3+} , ácido 5-aminolevulínico, glutationa e ascorbato (GUNTER e PFEIFFER, 1990; ZORATTI e SZABÓ, 1995). Reagentes capazes de interferir no estado redox dos grupos SH, também parecem estar envolvidos na indução de transição de permeabilidade. Dentre estes, destacam-se os metais pesados e de transição e seus complexos (Hg^{2+} e mercuriais, mersalil, Cu^{2+} , Zn^{2+}), além das substâncias que induzem a formação de ligações cruzadas e pontes dissulfeto como a diamida e a n-etilmaleimida (NEM). Os ligantes do translocador de adenina nucleotídeo como o atractilosídeo, carboxiatractilosídeo e acil-CoA; os agentes causadores de depleção de nucleotídeos de adenina da matriz como o fosfoenolpiruvato; as substâncias que reduzem o potencial transmembrana, como os desacopladores incluindo o FCCP; os ácidos graxos (GUNTER e

PFEIFFER, 1990; HERMES-LIMA et al., 1991; PINTO, 1993; VERCESI e HOFFMANN, 1993; ZORATTI e SZABÓ, 1995); e a tiroxina que causa uma intensificação da produção dos ácidos graxos, bem como a triiodotironina que foram também relatados como agentes indutores (CASTILHO et al., 1998).

1.2.3.3.Mecanismos da Transição de Permeabilidade

Um dos mecanismos propostos para explicar o fenômeno da Transição de Permeabilidade, baseia-se na ligação do Ca^{2+} a sítios internos da membrana permitindo a abertura de um canal hidrofílico transmembrana (HUNTER e HAWORTH, 1979 a, b). A identidade molecular deste canal ainda não está bem estabelecida, sendo sugerido o envolvimento do translocador de nucleotídeo de adenina (AdNT). Esta proposta tem base nos efeitos dos ligantes de AdNT. Por outro lado, as propriedades eletrofisiológicas de um megacanal mitocondrial (MMC) identificado como poro de transição de permeabilidade (PTP) em experimentos de "patch-clamp", sugerem que este poderia se constituir em um dímero de moléculas de AdNT (ZORATTI e SZABÓ, 1995).

Este poro é regulado pela ligação de Ca^{2+} na membrana no lado da matriz, revertido por EGTA e inibido por H^+ , Mg^{2+} e nucleotídeos de adenina (HUNTER e HAWORTH, 1979 a, b). Esta transição de permeabilidade quando exposta à concentrações submicromolares de Ciclosporina A, é inibida com alta especificidade (BERNARDI et al., 1992; SZABÓ et al., 1992), provavelmente devido a sua ligação com ciclofilinas da membrana mitocondrial interna, as quais são necessárias para a

abertura do poro de MTP (CONNERN e HALESTRAP, 1994; NICOLLI et al., 1996). Por outro lado a queda do $\Delta\psi$ devido a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) é revertida por redutores de nucleotídeos de piridina (VERCESI, 1984), EGTA (BERNARDES et al., 1986; CROMPTON et al., 1987), ditioneitol (VALLE et al., 1993) ou ciclosporina A em presença de Mg^{2+} ou ADP (NOVGORODOV et al., 1994).

A oxidação de grupos tiol de proteínas da membrana mitocondrial por ação das espécies reativas de oxigênio, e a consequente formação de ligações cruzadas, contribuem com a formação do poro não específico e permeabilização da membrana. Segundo esta proposição, o mecanismo para gerar o poro de transição de permeabilidade iniciaria quando o Ca^{2+} da matriz interagisse com componentes da membrana mitocondrial interna, como proteínas, lipídeos ou ambos. GRIJALBA et al. (1996) propuseram que esta interação provavelmente ocorreria a nível da cardiolipina (CL), resultando em alterações importantes na organização lipídica que comprometem a conformação e consequentemente o funcionamento de todas as proteínas/enzimas da membrana. Nestas condições, a produção de radicais livres no sistema de transporte de elétrons poderia ser otimizada, levando a uma maior formação de ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) à nível da NADH-coenzima Q, succinato-coenzima Q e coenzima QH_2 - citocromo c redutases (complexos I, II e III da cadeia respiratória). É amplamente conhecido que o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) leva a um aumento da produção de ERO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989 a, b), os quais podem atuar sobre os grupamentos tiol das proteínas da membrana levando a abertura de poro inespecífico. Outras propostas para explicar a transição de permeabilidade estão relacionadas ao dano de membrana como a ADP ribosilação

de proteínas, a oxidação de grupos sulfidríla de uma ou mais proteínas específicas e a hidrólise de fosfolípídeos da membrana mitocondrial interna pela fosfolipase A_2 (MADESH e BALASUBRAMANIAN, 1998).

Segundo alguns autores a ativação desta enzima pelo Ca^{2+} leva ao acúmulo de lisofosfolípídeos na membrana causando aumento da permeabilidade (PFEIFFER et al., 1979; BEATRICE et al., 1980). Esta hipótese foi fortalecida através da constatação do aparecimento de produtos da ação da fosfolipase A_2 durante a transição e pela capacidade dos inibidores de fosfolipase A_2 em inibir a transição (GUNTER e PFEIFFER, 1990).

Segundo CARBONERA et al. (1988) o fenômeno é consequência do dano da membrana causado pela peroxidação de fosfolípídeos e outros processos envolvendo a ação de radicais de oxigênio.

VERCESI e colaboradores (FAGIAN et al., 1990; KOWALTOWSKI et al., 1995; CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 1996; CASTILHO et al., 1996; VERCESI et al., 1997; CASTILHO et al., 1998) têm demonstrado que a MTP induzida por fosfato inorgânico ou pró-oxidantes, tais como o t-butilhidroperóxido e diamida, ocorre por uma produção de ERO pela cadeia respiratória estimulada por cálcio, à nível da coenzima Q. A permeabilização induzida por P_i e Ca^{2+} é inibida por catalase ou pela ausência do oxigênio molecular, reforçando a idéia da participação de ERO neste mecanismo (VERCESI et al., 1997). Em presença de altas concentrações de P_i (≥ 4 mM) a permeabilização mitocondrial é causada pelo MTP e lipoperoxidação da membrana mitocondrial. O P_i portanto, estimularia a lipoperoxidação da membrana por catalisar a tautomerização de aldeídos, produtos da lipoperoxidação, favorecendo a oxidação de formas enólicas pelas

hemoproteínas, tais como o citocromo c (Fig.2).

FAGIAN et al. (1990) apresentaram evidências de que o aumento na permeabilidade de membrana está associado com a produção de agregados protéicos devido a ligações cruzadas de grupamentos tiólicos. Demonstraram também que os processos de permeabilização e polimerização podiam ser revertidos pela adição de ditioneitol (DTT) ou β -mercaptoetanol, conhecidos redutores de grupos dissulfeto.

Segundo KOWALTOWSKI e VERCESI (1999) a oxidação dos grupos tiol das proteínas é um processo extenso na MTP, isto é provável porque a permeabilização mitocondrial não específica, *per se*, seria promovida pela oxidação de uma proteína específica ou grupo de proteínas. Isto poderia contribuir para as características reguladas e temporariamente reversíveis do MTP.

A permeabilização da membrana mitocondrial devido a oxidação dos grupos tiol é reversível dentro de um breve período de tempo (10-20 minutos), quando o Ca^{2+} é removido do meio de incubação. Após este período de tempo, a permeabilização torna-se irreversível, em função do alto grau de oxidação e agregação das proteínas de membrana, devido ao "stress" oxidativo. Considerando que o "stress" oxidativo é uma condição associada a uma variedade de estados patológicos tais como isquemia e reperfusão (PASTORINO et al., 1993; ZAMZAMI et al., 1997; LEMASTERS e NIEMININ, 1997), a MTP estaria também envolvida na injúria e morte celular observadas em tais condições (MEHENDALE et al., 1995).

Segundo estes autores a injúria mitocondrial mediada por um agente oxidante indutor de transição de permeabilidade levaria a despolarização mitocondrial, desacoplamento da fosforilação oxidativa, depleção de ATP, e por último, a morte

celular. Portanto, a transição de permeabilidade, apesar de bem caracterizada, ainda necessita de esclarecimentos quanto ao seu verdadeiro significado e mecanismo de ação (ZORATTI & SZABÓ, 1995).

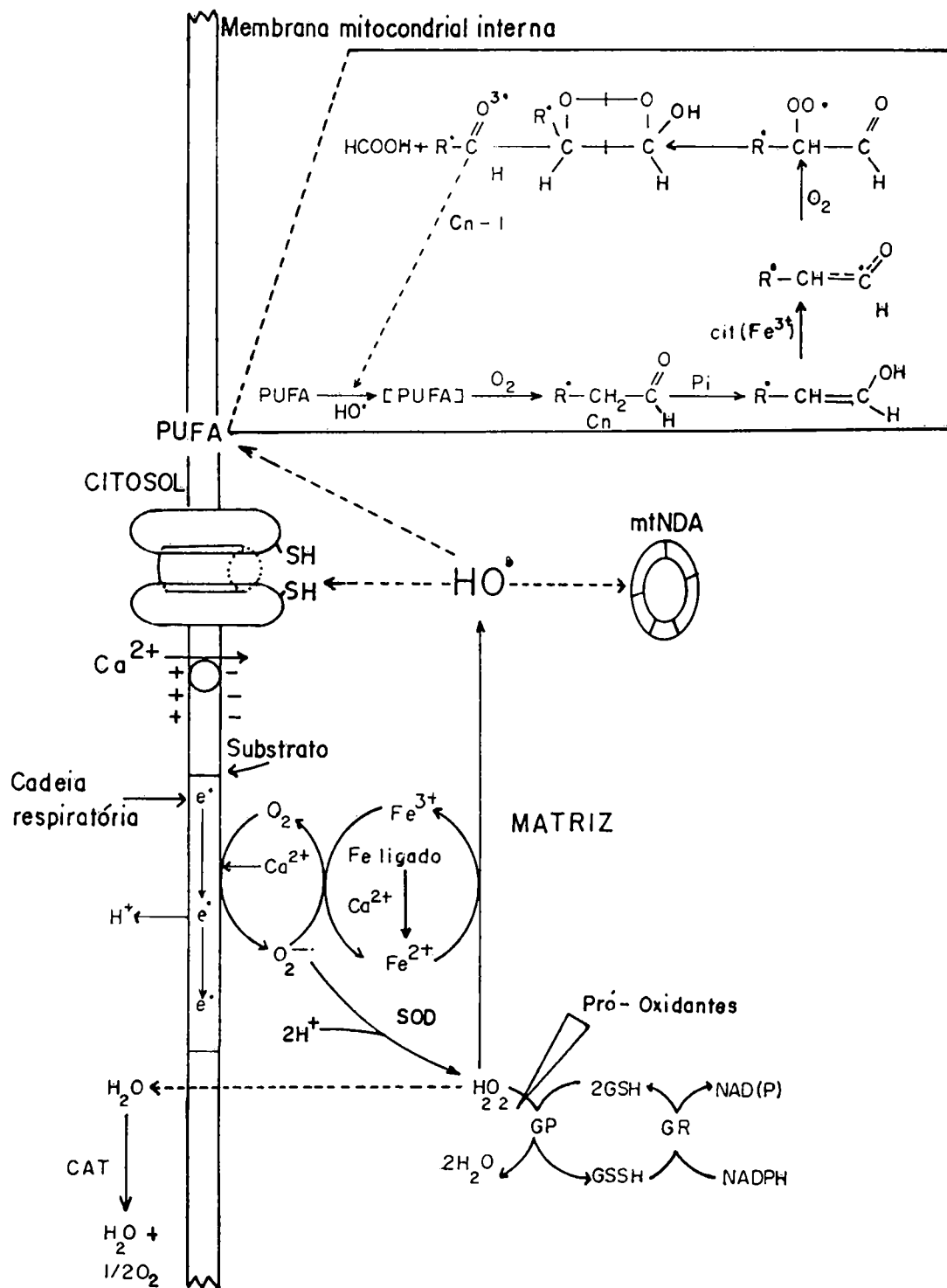


Figura 2. Esquema resumindo a proposta do processo molecular envolvido na permeabilização da membrana mitocondrial induzida por Ca^{2+} /ERO, segundo VERCESI et al. (1997) com algumas modificações.

I.3 LIPOPEROXIDAÇÃO

I.3 LIPOPEROXIDAÇÃO

I.3.1. Aspectos Gerais da Lipoperoxidação

O "stress" oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio que leva a um aumento na produção de *radicais livres e/ou a um decréscimo das defesas antioxidantes, culminando com um aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO), e na velocidade de reação em cadeia de espécies reativas (SIES, 1998). As principais ERO e algumas de suas características estão descritas na Tabela I.

Embora o "stress" oxidativo seja uma condição observada em diversos estados patológicos, os radicais de oxigênio podem ser benéficos em outras situações, como por exemplo durante a fagocitose (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; BARJA, 1993).

Os mecanismos pelos quais os lipídeos insaturados reagem com o oxigênio molecular, processo denominado de autooxidação ou peroxidação, foram referidos pela primeira vez por investigadores da British Rubber Producers Association, por volta de 1940 (FARMER e SUTTON, 1943; BOLLAND e KOCH, 1945; BOLLAND e TENHAVE, 1947; BATEMAN et al., 1951; INGOLD, 1956). Contudo, só em 1950 começou-se a dar ênfase à lipoperoxidação associada a Biologia e Medicina (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990).

* O Termo Radical tem sido usado para designar qualquer espécie química que possui um ou mais elétrons desemparelhados; tomando-as fracamente atraídas para o campo magnético, e algumas vezes altamente reativas. Este conceito inclui o átomo de hidrogênio, a maioria dos íons e metais de transição e o oxigênio molecular (HILL, 1981; HALLIWELL, 1987; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

A **lipoperoxidação** foi definida por A. L. TAPPEL e citada por HALLIWELL e GUTTERIDGE (1989), como a deterioração oxidativa de lipídeos poliinsaturados, i.e. lipídeos que contém mais do que duas duplas ligações covalentes entre carbonos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Tem sido sugerido que a lipoperoxidação possa ser responsável por numerosos eventos bioquímicos e biofísicos que levam à inativação de funções enzimáticas em várias organelas subcelulares, especialmente porque inicia simultaneamente um processo de reação de *radicais livres (SLATER, 1972; DIANZANI et al., 1978; VLADMIROV et al., 1980; RECKNAGEL et al., 1982).

As mitocôndrias são uma das maiores fontes intracelulares de ERO. Cerca de 1-2% do consumo de oxigênio mitocondrial total resulta na geração de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), pelo vazamento de elétrons da cadeia respiratória a nível da NADH coenzima Q redutase, succinato coenzima Q redutase e coenzima QH_2 -citocromo c redutase (complexos I, II e III) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). O radical superóxido gerado dispara a reação de Fenton produzindo uma espécie altamente reativa, o radical hidroxil (HO^{\bullet}) que pode ser consumido pelas defesas antioxidantes da organela que são as enzimas glutaciona peroxidase, dependente de glutatióna e a glutaciona redutase (dependente de NADPH). E ainda o H_2O_2 sofre dismutação pela ação da enzima catalase, o que também protege contra o dano mitocondrial (VERCESI et al., 1997).

As espécies reativas de oxigênio, em particular o radical hidroxila, podem reagir potencialmente com todas as biomoléculas, porém os alvos preferenciais são o DNA e os lipídeos, além das proteínas.

No que se refere à lipoperoxidação, a importância do radical hidroxila está relacionada com a capacidade deste radical de retirar um átomo de hidrogênio das cadeias laterais de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares, iniciando, portanto, uma reação em cadeia, que ocorre em condições de "stress" oxidativo.

Tabela I. CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS FORMAS DE ERO	
ERO/ORIGEM	EFEITOS
O₂⁻ (ânion superóxido)	
<ul style="list-style-type: none"> ☆ a partir da redução de 1 elétron do O₂ catalisado por uma variedade de enzimas como xantina oxidase, NADPH-citocromo P-450 redutase e hemoproteínas como hemoglobina e citocromo P-450; ☆ autooxidação de pequenas moléculas endógenas como as catecolaminas; ☆ vazamento de elétrons na mitocôndria e retículo endoplasmático; ☆ produzido por células fagocitárias: neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. 	Pode provocar dano oxidativo e pode gerar outros produtos como peroxinitrito e HO [•] , que é um oxidante mais potente que o O ₂ ⁻ e o H ₂ O ₂
¹O₂ (oxigênio singlet)	
<ul style="list-style-type: none"> ☆ a partir da dismutação espontânea do O₂⁻ $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + {}^1O_2$	Ocorre nos principais sistemas pigmentados do organismo, que estão sujeitos a serem expostos à luz. É improvável que o ¹ O ₂ das células derivado da dismutação espontânea do O ₂ ⁻ seja responsável pelo início da oxidação lipídica.
H₂O₂ (peróxido de hidrogênio)	
<ul style="list-style-type: none"> ☆ a partir da dismutação do O₂⁻ catalisada ou não por SOD: $2 O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + {}^1O_2$ <ul style="list-style-type: none"> ☆ por redução de 2 elétrons do O₂, catalisada por uma variedade de enzimas como a monoaminaoxidase; ☆ produzido por bactérias, células fagocíticas, membranas e mitocôndrias. 	Puro, o H ₂ O ₂ tem baixa reatividade por não se tratar de um radical livre porém, pode atravessar membranas biológicas e atingir o interior das células onde pode converter-se em espécies mais reativas.
HO₂[•] (radical hidroperoxil)	
<ul style="list-style-type: none"> ☆ a partir da protonação de O₂⁻; ☆ quantidades consideráveis de O₂⁻ gerado por macrófagos ativados devem existir como HO₂[•]. 	Não há evidências claras de que o HO ₂ [•] seja tóxico a sistemas biológicos mas ele é menos polar que o O ₂ ⁻ e deve ser capaz de atravessar membranas biológicas e, além disso, é mais reativo que o O ₂ ⁻ e pode atacar diretamente ácidos graxos, gerando peróxidos lipídicos.
HO[•] (radical hidroxil)	
<ul style="list-style-type: none"> ☆ a partir do H₂O₂ na reação de Fenton, com íons metais como Fe²⁺: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$ <ul style="list-style-type: none"> ☆ a partir de O₂⁻ e H₂O₂ na reação de Haber Weiss: $H_2O_2 + O_2^- \xrightarrow{\text{catalisada por metal}} O_2 + HO^{\bullet} + HO^-$	Pode gerar mais ERO e radicais orgânicos como radicais peróxidos lipídicos (ROO [•]) e hidroperoxídeos lipídicos (ROOH) produzidos durante a peroxidação lipídica. Pode ser altamente reativo, atuando também muito próximo ao seu sítio de formação.

(Fonte : GUTTERIDGE e ROWLEY, 1982; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1982; HOLAND et al., 1982; ZINGLER e GOOSEY, 1982; GORDON, 1986; COTGREAVE et al., 1988; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

I.3.2.Mecanismos da Lipoperoxidação

As espécies reativas de oxigênio quando formadas podem atacar as duplas ligações dos ácidos graxos que compõem os fosfolípidos insaturados das membranas plasmáticas e de organelas, iniciando a reação em cadeia que leva à lipoperoxidação (ROBBINS, 1994). São particularmente susceptíveis à peroxidação os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

A autooxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), compreende três fases: iniciação, propagação e término (GARDNER, 1989), (Fig. 3). A fase de iniciação é caracterizada pelo ataque de qualquer espécie química que tenha reatividade suficiente para retirar um átomo de hidrogênio do grupamento metila ligado ao carbono de cadeia lateral do PUFA. Através da remoção deste hidrogênio gera-se um radical centrado no carbono. A facilidade com que esta reação ocorre está relacionada com a presença dos grupos metila entre as duplas ligações das cadeias poliinsaturadas dos fosfolípidos das membranas, e ainda com o enfraquecimento da ligação carbono-hidrogênio pela proximidade das duplas ligações tornando os PUFA mais susceptíveis ao ataque dos radicais (GARDNER, 1989; KOPPENOL, 1990).

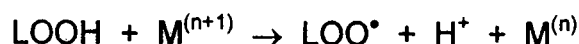
O radical centrado no carbono resultante (L^{\bullet}) pode ter vários destinos, porém, o mais provável em células aeróbicas é submeter-se a um rearranjo molecular formando um dieno conjugado, que rapidamente reage de forma reversível com o O_2 formando um radical peroxil (LOO^{\bullet}). Este último remove um átomo de hidrogênio de uma molécula lipídica adjacente, propagando a reação de lipoperoxidação, ou de

uma outra molécula doadora de H, por exemplo proveniente de um antioxidante, resultando em qualquer um dos casos, na formação de hidroperóxido lipídico (LOOH) (ERNSTER, 1993). Além de remover o hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), os radicais peroxil podem estar envolvidos cooperativamente em reações de β -fragmentação, e ciclização por rearranjo intramolecular. Na reação de β -fragmentação, tanto a posição onde ocorre a oxidação como a geometria da conjugação diênica podem se rearranjar, e o oxigênio troca com o oxigênio gasoso levando à isomerização *trans, trans* (Fig. 4). Quando o ácido gerado contém três ou mais duplas ligações, pode também ocorrer a ciclização do radical peroxil levando a formação de peróxidos monocíclicos, bicíclicos e epoxialcoois (PORTER et al., 1981; PORTER, 1986; GARDNER, 1989).

A figura 4 representa as três vias competitivas de autooxidação de um ácido graxo tetraenólico, enquanto a β -fragmentação e a ciclização são processos unimoleculares. A formação de hidroperóxidos é um processo bimolecular, pois envolve a transferência de um átomo de hidrogênio. A formação de hidroperóxidos depende da capacidade global do meio em ceder átomos de hidrogênio e torna-se mais competitiva com concentrações superiores às do ácido graxo oxidável (PORTER et al., 1981; GARDNER, 1989).

O quociente dos isômeros *trans, cis / trans, trans* formados durante a autooxidação está sob controle termodinâmico e, embora dependente da constante de velocidade (KP), não varia durante a fase inicial da peroxidação (GARDNER, 1989).

Os hidroperóxidos lipídicos, embora razoavelmente estáveis em condições fisiológicas, podem ser oxidados ou reduzidos por íons metálicos de transição dando origem a radicais peroxil (LOO^\bullet) ou alcoxil (LO^\bullet) (GARDNER, 1989).



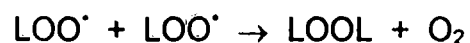
Tanto LOO^\bullet como LO^\bullet podem reiniciar a oxidação, removendo um átomo de hidrogênio de uma nova molécula lipídica, continuando a propagação da cadeia. No entanto, a formação de radical alcoxil é preferencial, dado que a reação do Fe^{2+} com os hidroperóxidos lipídicos é mais rápida do que aquela com o peróxido de hidrogênio e do que a reação do Fe^{3+} com os hidroperóxidos lipídicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). No entanto, a remoção de H dos ácidos graxos pelo radical alcoxil leva a um rearranjo intramolecular para formar radicais epoxialílicos (GARDNER, 1989), assim podendo decompor-se através da β -clivagem em aldeídos citotóxicos (CHAUDIÈRE, 1994). Esta é a principal via de formação de aldeídos “*in vivo*” que inclui os aldeídos insaturados e o propanodiol ou malonaldeído (MDA).

Alguns destes aldeídos são altamente reativos e são considerados como segundos mensageiros tóxicos, que ao contrário dos radicais livres, são espécies de vida média longa e podem se difundir do seu local de formação até alvos intra e extracelulares (ESTERBAUER et al., 1991).

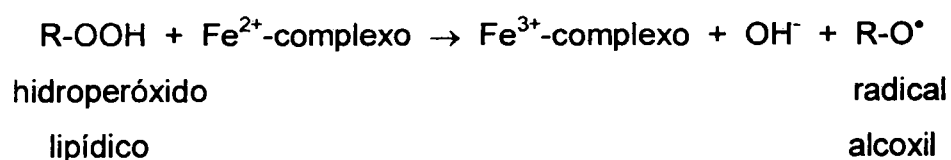
O malonaldeído (MDA) forma-se a partir dos PUFA com mais de três duplas ligações, majoritariamente a partir do ácido araquidônico (20:4) e de docosa-hexaenóico (22:6). PRYOR e STANLEY (1975) sugerem a formação de

endoperóxidos bicíclicos intermediários, que posteriormente se degradam cataliticamente (calor ou ácido) em malonaldeído livre (Fig. 5). Além dos aldeídos, podem ser formados cetonas, ésteres, álcoois e hidrocarbonetos como produtos finais da degradação oxidativa dos lipídeos, que posteriormente podem ser metabolizados por enzimas (ERNSTER, 1993).

A peroxidação lipídica pode também terminar após a reação entre duas espécies de radicais livres com a formação de produtos estáveis:



Tem sido sugerido por alguns autores (WATERS, 1976; DAVIES e SLATER, 1987) que o ferro desempenha um papel importante na lipoperoxidação. Os hidroperóxidos formados durante o processo de peroxidação lipídica são razoavelmente estáveis em pH fisiológico, mas quando em presença de metais de transição, especialmente sais de ferro, sua decomposição é muito acelerada. Assim, um complexo de ferro reduzido pode reagir com peróxidos lipídicos de modo similar à reação com H_2O_2 , isto causa a ruptura da ligação O-O para formar radicais alcóxil, seguindo a reação abaixo:



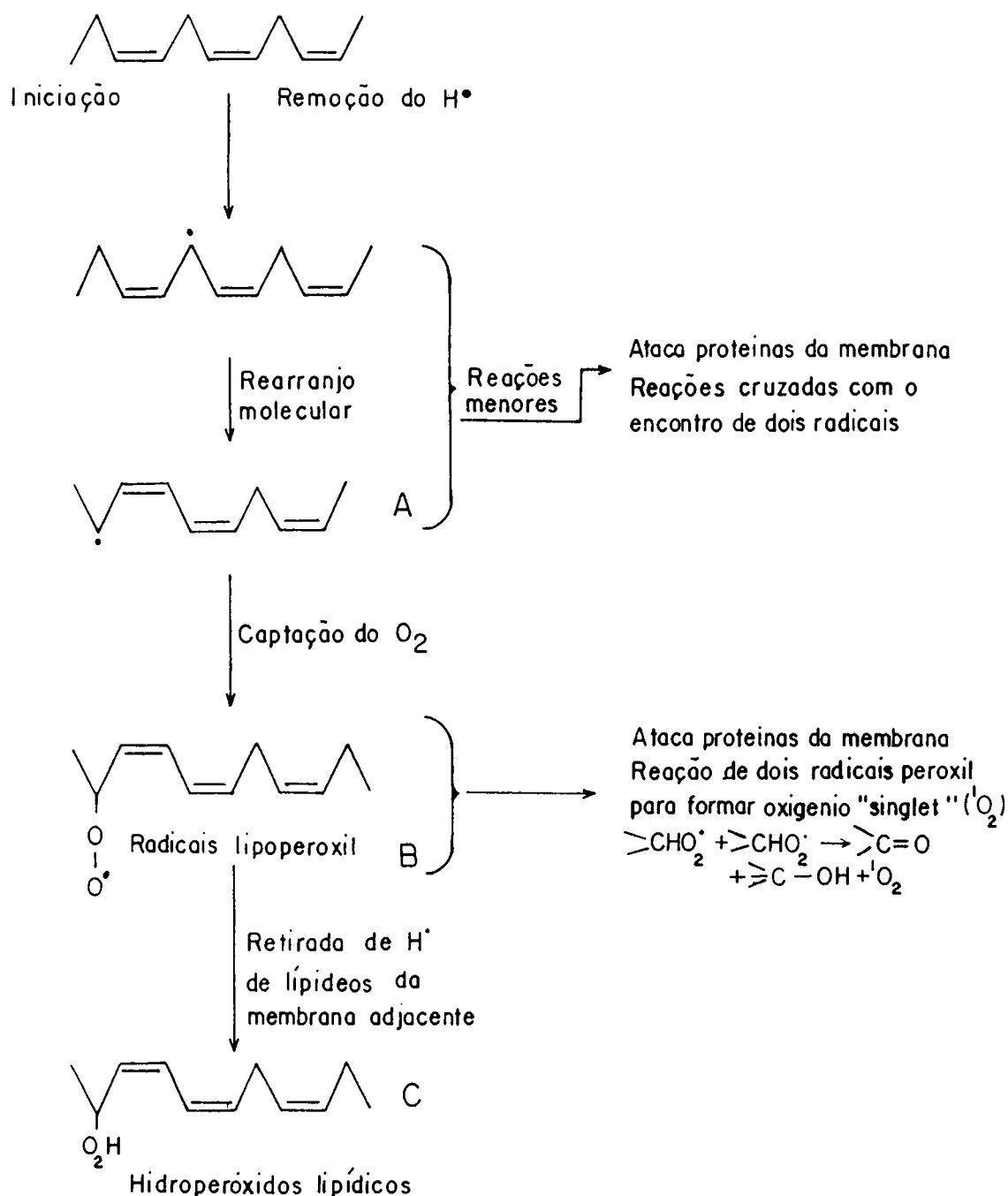


Figura 3. Representação das reações de iniciação e propagação da lipoperoxidação (peroxidação de um ácido graxo com três duplas ligações) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; com algumas modificações).

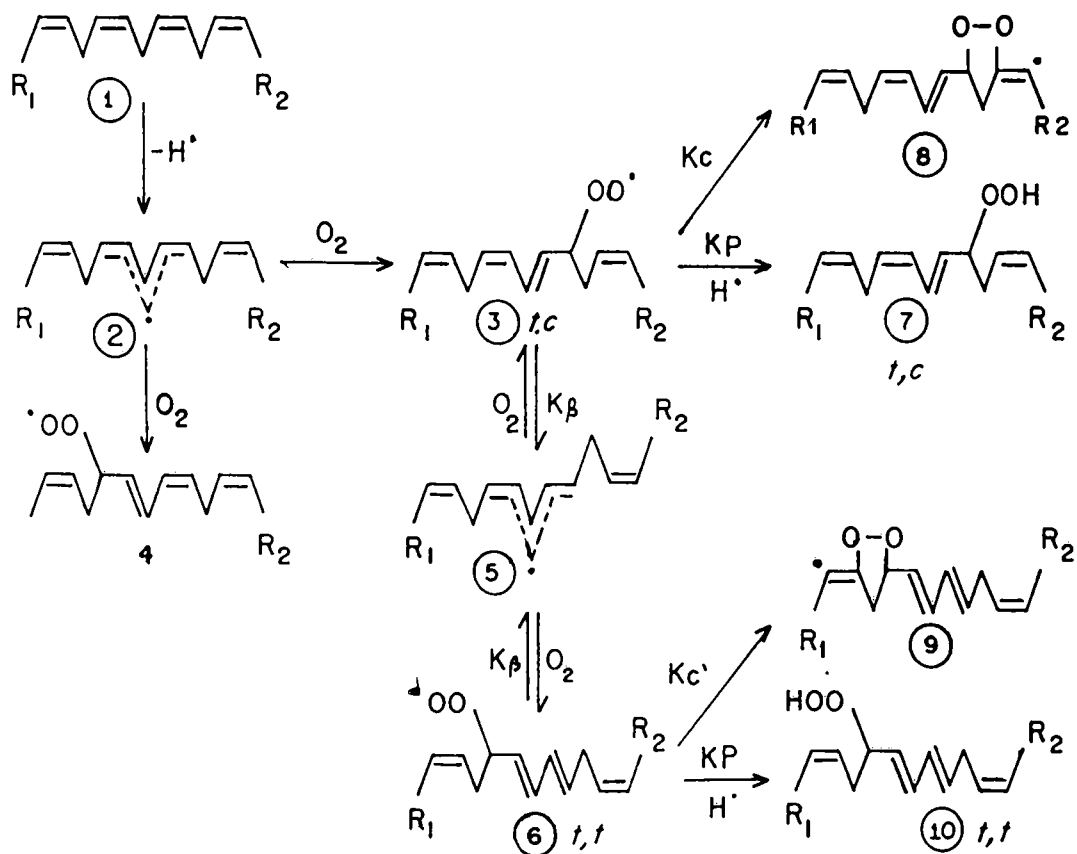
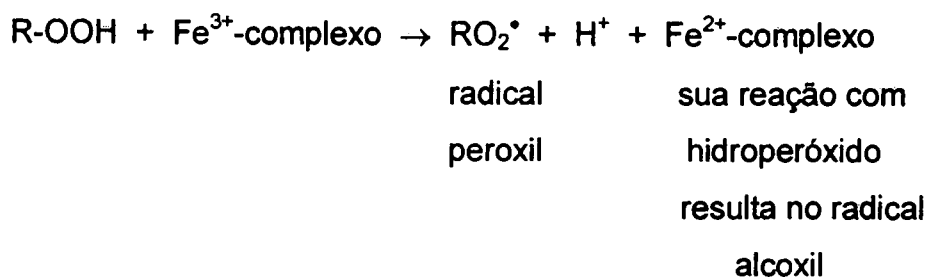


Figura 4. Esquema geral das vias de formação dos produtos de oxidação de um ácido graxo tetraenólico. O radical peroxil t, c (3) pode remover um átomo de hidrogênio do meio e formar o hidroperóxido correspondente (7), ou ciclizar com uma constante de velocidade K_c (8), ou ainda, pode sofrer rearranjo (constante de velocidade K_β) originando o isômero t, t (6). Este pode também captar H do meio e formar o hidroperóxido correspondente (10) assim como ciclizar (constante de velocidade $K_{c'}$ - 9). O esquema representa apenas os produtos derivados do radical peroxil (3), mas situações idênticas podem ser esperadas para o radical peroxil (4). (PORTER et al., 1981; com algumas modificações).

Já um complexo de Fe^{3+} pode formar um radical peroxil e um alcoxil, segundo a equação, que provavelmente representa a soma de vários estágios:



De uma maneira geral pode-se dizer que existem dois tipos de lipoperoxidação, a enzimática e não enzimática. A peroxidação enzimática envolve basicamente duas enzimas: a lipoxigenase e a cicloxigenase, que funcionam cataliticamente para produzir hidroperóxidos. A peroxidação não enzimática é iniciada por radicais livres e estimulada por catalisadores como: Fe^{2+} , Fe^{3+} , NADPH, ácido ascórbico, grupamentos tióis, azoiniciadores, dentre outros. Estes últimos são azocompostos que se decompõem em velocidade controlada pela temperatura para formar um conhecido fluxo de radicais centrados no carbono (NIKI, 1987; NIKI, 1990; KAGAN et al., 1992).

Contudo, da mesma forma que a enzimática, a lipoperoxidação não enzimática produz como principais produtos finais os hidroperóxidos lipídicos.

1.3.3. Efeitos da Lipoperoxidação em Membranas

As consequências da lipoperoxidação em membranas são: a) alteração da fluidez, b) falência do potencial de membrana, c) aumento da permeabilidade a H⁺ e outros íons, d) ruptura da membrana, liberando o conteúdo celular, e) mudanças no microambiente lipídico afetando enzimas ligadas a membrana, canais iônicos ou receptores, aumentando ou diminuindo suas atividades, f) formação de novos canais na membrana, alterando sua permeabilidade, g) formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídeos, inativando-os irreversivelmente, h) oxidação de grupos -SH nos sítios ativos de enzimas ligadas a membrana, acarretando perdas de suas propriedades funcionais, i) toxicidade dos aldeídos formados como produtos finais da fragmentação dos peróxidos lipídicos: malonaldeído e 4-hidroxinonenal (TURNER et al., 1975; GUTTERIDGE et al., 1976; SCHAUENSTEIN et al., 1977; McBRIEN e SLATER, 1982; BARROWCLIFFE et al., 1984; BENEDETTI et al., 1984; WINKLER et al., 1984; ESTERBAUER et al., 1988; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Os peróxidos lipídicos e/ou aldeídos citotóxicos derivados deles podem: a) bloquear a ação dos macrófagos, b) inibir a síntese de proteínas, c) matar algumas bactérias, d) inativar enzimas, e) provocar "cross-linking" entre proteínas, f) gerar trombina e g) agir como quimiotoxinas para fagócitos (TURNER et al., 1975; GUTTERIDGE et al., 1976; SCHAUENSTEIN et al., 1977; McBREIN e SLATER, 1982; BENEDETTI et al., 1984; WINKLER et al., 1984; BARROWCLIFFE et al., 1984; ESTERBAUER et al., 1988; CURZIO, 1988).

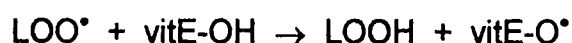
I.3.4. Defesas Antioxidantes

Os seres vivos dispõem de mecanismos para evitar a formação excessiva e o acúmulo de ERO, peróxidos e seus efeitos deletérios (NIKI, 1993; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1994). Este sistema de defesa é sofisticado e pode ser enzimático ou não, operando na fase aquosa intra e extracelular e nas membranas. O conhecimento dos antioxidantes biológicos constitui excelente campo de investigação no domínio da toxicidade do oxigênio em geral e da peroxidação lipídica em particular. De modo geral, os antioxidantes biológicos podem ser divididos em enzimáticos ou não enzimáticos (ERNSTER, 1993). Os antioxidantes enzimáticos incluem aqueles que removem as espécies reativas, como as enzimas *superóxido dismutase* (SOD), *catalase* e *glutathione peroxidase* (PRYOR, 1976; FRIDOVICH, 1978; KAPPUS et al., 1982; LIND et al., 1982; URSINI et al., 1985; FRIDOVICH, 1986; MAIORINO et al., 1990; CADENAS et al., 1992; TAYLOR et al., 1993; CADENAS, 1995).

Os antioxidantes não enzimáticos são uma classe de agentes com grande número de produtos, tanto naturais quanto sintéticos. Estes antioxidantes podem ser classificados em lipofílicos (*tocoferóis*, *carotenóides* e *biflavonóides*) e hidrofílicos (*glutathione*, *ascorbato*, *indóis* e *catecóis*). Estas substâncias ("scavengers") neutralizam radicais livres na fase de iniciação ou de propagação da lipoperoxidação pela formação de produtos menos tóxicos, ou por absorver a energia de excitação desses radicais ("quencher") (PRYOR, 1976; KAPPUS et al., 1982).

O termo *vitamina E* inclui todos os derivados tocóis e tocotrienóis que exibem a atividade biológica do α -tocoferol (SIES, 1993). A *vitamina E* é reconhecida como

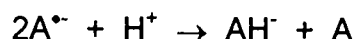
um inibidor da peroxidação lipídica, protegendo os ácidos graxos poliinsaturados das membranas biológicas e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) plasmáticas. A figura 6 representa a ação da *vitamina E* e da *ubiquinona* nos eventos de iniciação e propagação da lipoperoxidação. A *vitamina E* reage primariamente com os radicais peroxil por transferência de um átomo de H, formando um hidroperóxido e um radical tocoferoxil.



O radical tocoferoxil é relativamente estável, e a constante de velocidade para esta reação é superior à da reação do peroxil com uma nova molécula lipídica; assim, a propagação da peroxidação lipídica é interrompida na presença da *vitamina E* (MAIORINO e URSINI, 1992). Além de funcionarem como "scavengers" de radicais, os tocoferóis, em especial o α -tocoferol, reage também com o oxigênio singlet (KAISER et al., 1990).

Entre os antioxidantes naturais solúveis em água, o *ácido ascórbico* e a *glutathiona*, são os mais estudados. No entanto, outros são de interesse, como o *ácido úrico*, *cisteína* e *bilirrubina*. O *ácido ascórbico* (AH₂ - vitamina C) realiza uma série de funções celulares vitais, entre as quais a de antioxidante, dada a sua capacidade redutora (NAVAS et al., 1994; BEYER, 1994). Em pH fisiológico, encontra-se predominantemente na forma de ânion ascorbato (AH⁻). Trata-se de uma molécula instável que pode ser oxidada sequencialmente dando origem inicialmente ao radical ascorbil (A[•]) e depois ao desidroascorbato (A). Nos sistemas biológicos, o ascorbato é um eficiente doador de equivalentes redutores,

convertendo-se melhor em radical ascorbil do que em desidroascorbato. O ascorbil é capaz de recombinar-se, e esta reação é dependente do pH, uma vez que necessita de prótons (COASSIN et al., 1991; BEYER, 1994):



O *ácido ascórbico* reage com uma série de espécies de radicais livres e também com oxigênio singlet (GIULIVI e CADENAS, 1993; BEYER, 1994). Inibe a oxidação de lipídeos quando os radicais livres se formam na fase aquosa, impedindo o ataque desses radicais aos lipídeos das membranas (NIKI et al., 1984; NIKI, 1987; DOBA et al., 1985; MIKI et al., 1989). Contudo, a pouca solubilidade do *ácido ascórbico* no interior hidrofóbico das membranas, limita sua capacidade em inativar os radicais livres ali formados. Um interessante mecanismo de interação química entre o *ácido ascórbico* na fase aquosa e a *vitamina E* na fase hidrofóbica tem sido proposto. Já que o grupo OH fenólico da *vitamina E* localiza-se aparentemente próximo dos grupos polares dos fosfolipídeos da bicamada, isto é, próximo da interfase membrana lipídeo (ARANDA et al., 1989), a *vitamina E* reagiria diretamente com o radical lipídico interrompendo a propagação da cadeia oxidativa. O radical tocoferil assim formado ficaria então acessível à redução pelo *ácido ascórbico*. Desta forma o α -tocoferol é regenerado (CADENAS, 1989; BUETTNER, 1993) e o *ácido ascórbico*, posteriormente reciclado enzimaticamente (COASSIM et al., 1991) ou diretamente (CONSTANTINESCU et al., 1993; MEISTER, 1994).

A lipoperoxidação ocorrendo sob condições de "stress" oxidativo (DEL MAESTRO, 1980; REYNOLDS et al., 1980; SLATER, 1972) é sempre uma hipótese

atrativa nos estudos envolvendo a compreensão do mecanismo de toxicidade dos fármacos. No caso da amiodarona as evidências de que este fármaco diminui a formação de malonaldeído, sem afetar as defesas antioxidantes ou o aumento da produção de ânion superóxido pela cadeia respiratória (RIBEIRO et al., 1997), indicam a necessidade de estudos mais aprofundados.

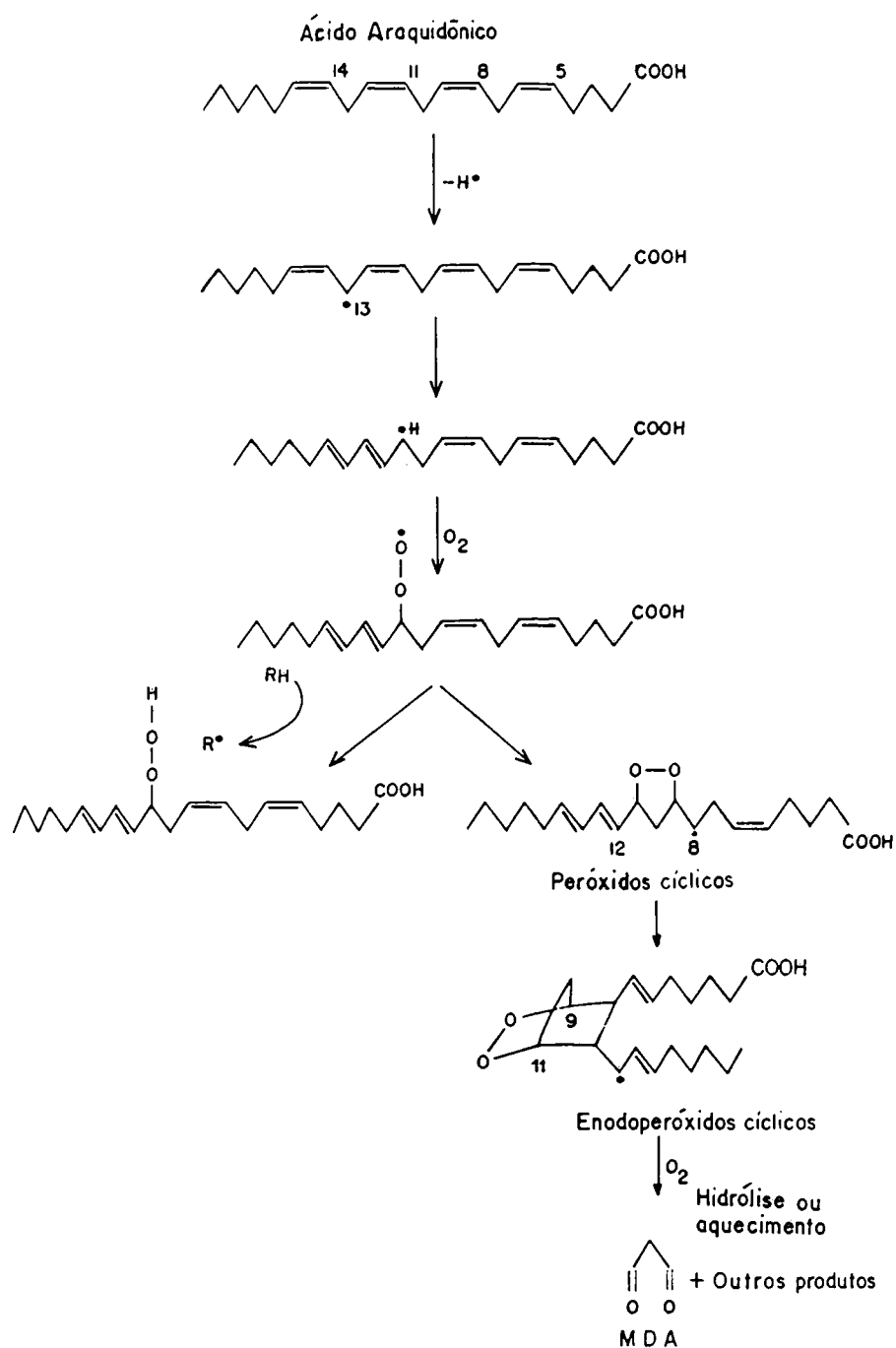


Figura 5. Mecanismo proposto para a formação dos hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico. A retirada inicial de H em C-13 pode ser observada. O átomo H pode ser também retirado em C-10 ou C-7, formando vários outros produtos finais na forma de peróxidos. MDA, Malonaldeído. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; com algumas modificações).

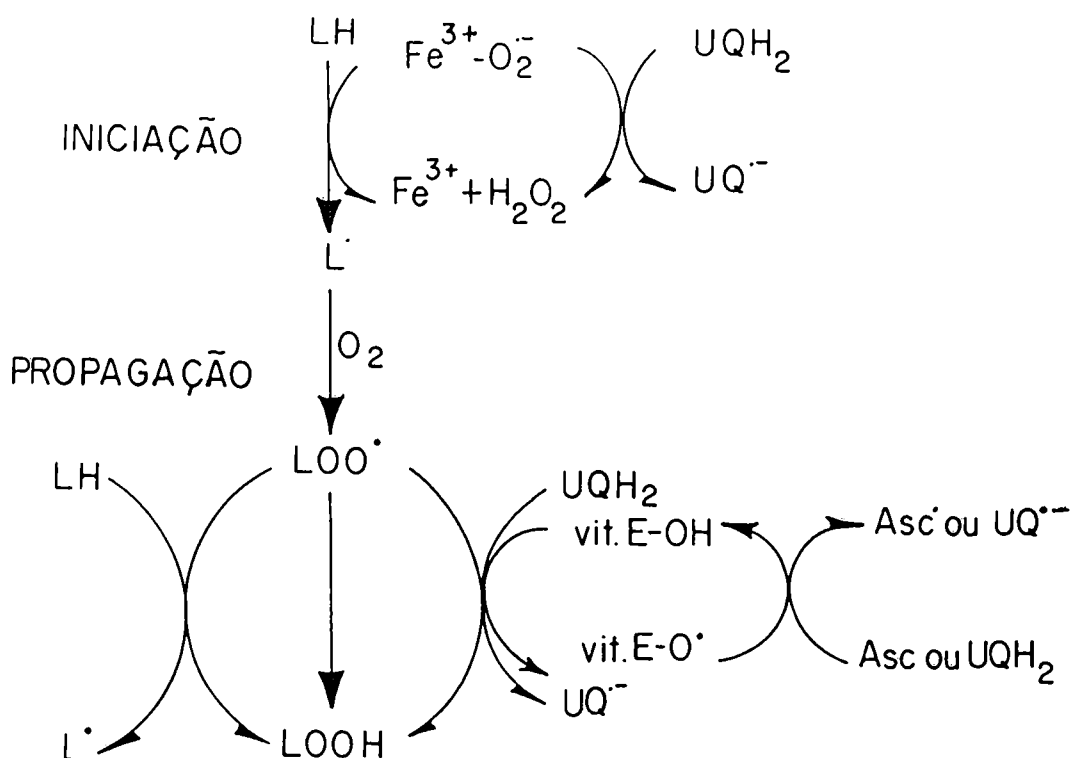


Figura 6. Possíveis mecanismos de ação do ubiquinol (UQH_2), vitamina E ($vit-OH$) e ascorbato (Asc) na peroxidação lipídica. O ubiquinol pode captar radicais livres a nível da fase de propagação tal como a vitamina E e também na fase de iniciação (radical perferil). Pode também, como o ascorbato, ter um efeito sinérgico com a vitamina E. (ERNSTER e FORSMARK-ANDRÉE, 1993; com modificações).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Dentre os muitos estudos realizados com a amiodarona, com o intuito de analisar e comprovar os efeitos da droga sobre o metabolismo celular, alguns foram realizados no Laboratório de Oxidações Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná (Maria Helena Guerreiro et al., 1984, 1986 a, b; Maria Lúcia W. Klüppel et al., 1995).

Nestes estudos, observaram-se os seguintes efeitos da ação da amiodarona sobre as mitocôndrias de coração e fígado de rato:

- a) inibe a fosforilação oxidativa e a atividade da ATPase em mitocôndrias intactas;
- b) provoca um efeito de desorganização generalizada na estrutura mitocondrial;
- c) causa decréscimo do potencial de membrana e modifica sua permeabilidade ao K^+ e ao Na^+ ;
- d) altera a fluidez de membrana;

Estes resultados sugerem que a amiodarona possa causar alterações sobre o sistema de transporte mitocondrial de cálcio considerando também a possibilidade de sua atuação sobre o processo de transição de permeabilidade.

Os estudos realizados por SAUTEREAU et al. (1992) mostram a possibilidade de ocorrência de lipoperoxidação, quando o radical derivado da amiodarona desalogenada se encontra próximo a uma dupla ligação lipídica. Entretanto, os resultados obtidos por RIBEIRO et al. (1997), utilizando um processo de medida de malonaldeído (TBARS) e indicam que a amiodarona é capaz de inibir a lipoperoxidação em mitocôndrias de fígado de rato energizadas, sem afetar as enzimas ligadas ao "stress" oxidativo.

Portanto, uma investigação mais aprofundada com relação à atividade da droga sobre o transporte de Ca^{2+} e transição de permeabilidade induzida por Ca^{2+} , bem como sobre a lipoperoxidação em membranas, se faz necessária para comprovar a natureza destes efeitos.

Assim, são objetivos deste trabalho:

- 1) Avaliar os efeitos da amiodarona sobre o influxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato;
- 2) Determinar os efeitos da amiodarona sobre o efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato, com o uso de FCCP e vermelho de rutênio;
- 3) Verificar os efeitos da amiodarona sobre a transição de permeabilidade de membrana mitocondrial causada por Ca^{2+} na presença de agente indutor (*t*-butilhidroperóxido), através do inchamento mitocondrial e pela agregação molecular;
- 4) Avaliar os efeitos da amiodarona sobre a lipoperoxidação com o uso do ácido *cis*-parinárico, consumo de oxigênio, formação dos dienos conjugados e cromatografia gás-líquido, em liposomas de fosfatidilcolina de soja, liposomas de lipídeos mitocondriais e em partículas submitocondriais de coração de boi.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. MATERIAIS

1.1.Reagentes

Os seguintes reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co.: Cloridrato de Amiodarona, Arsenazo III, Rotenona, FCCP (Carbonil cianida *p*-trifluorometoxifenilhidrazona), valinomicina, Chelex-100, BSA (soroalbumina bovina), HEPES ácido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2- etanosulfônico]), succinato, glutamato, safranina O, *t*-butilhidroperóxido, ditiotreitól e fosfatidilcolina de soja.

Os seguintes reagentes foram obtidos da Merck do Brasil: cloreto de cálcio, manitol, sacarose, cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio. O clorofórmio, metanol, acetonitrilo e hexano foram obtidos da Merck. O ácido *cis*-parinárico foi obtido da Molecular Probes e a sílica gel H tipo DO da Camag Chemical Co.

Os demais reagentes utilizados foram igualmente do maior grau de pureza possível.

1.2. Preparo da solução de Amiodarona

O Cloridrato de Amiodarona por ser pouco solúvel em água foi dissolvido em N-N-Dimetilformamida (Merck), tendo sido verificado previamente que o solvente não apresenta qualquer interferência nos sistemas experimentais utilizados.

1.3. Animais

Foram utilizados Ratos Wistar, de aproximadamente 200g, alimentados com ração Purina[®] e água, decapitados em guilhotina sem uso de anestésicos.

Corações de boi foram removidos imediatamente após o sacrifício do animal (Frigorífico Argus), e armazenados em gelo durante o transporte.

1.4. Isolamento de mitocôndrias de coração de rato para determinação do consumo de oxigênio, potencial de membrana, transporte de Ca^{2+} e inchamento mitocondrial

Mitocôndrias de coração de rato foram isoladas de acordo com o método descrito por VOSS et al.(1961) com pequenas modificações. Os animais foram decapitados, e os corações removidos e lavados em meio de extração gelado, constituído de: D-manitol 0,21 M, sacarose 0,075 M, HEPES 10 mM / KOH (pH 7,2), BSA 0,1%, EGTA 1 mM e EDTA 0,5 mM. Após lavados, os corações foram picados com tesoura, passados no homogeneizador Turrtec TE 102 (1 segundo) e então homogeneizados no homogeneizador Van Potter-Elvehjem. O homogeneizado assim obtido foi centrifugado a 800 g por 10 minutos, a fim de eliminar células não rompidas e restos celulares. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 7800 g, por 10 minutos. A fração sedimentada resultante foi suspensa no meio de extração e centrifugada a 5000 g por 10 minutos. O "pellet" obtido, foi ressuspensa em meio de extração sem EGTA e EDTA e centrifugado a 5000 g por 10 minutos. Finalmente a fração sedimentada contendo as mitocôndrias intactas foram ressuspensas em uma quantidade mínima de meio de extração sem EGTA e EDTA. Todas as centrifugações foram feitas em centrífuga refrigerada Beckman a 4° C.

1.5. Isolamento de mitocôndrias de coração de boi

Mitocôndrias de coração de boi foram isoladas pelo método descrito por LOW

e VALLIN (1963). Coração fresco de boi foi dissecado, eliminando-se as fibras e as gorduras. O músculo foi cortado em pequenos pedaços e moído em um liquidificador Waring Blendor, acrescido de pequeno volume do tampão de isolamento, constituído por sacarose 0,25 M, HEPES 10 mM / KOH (pH 7,4) e EDTA 1 mM. A ruptura do tecido muscular foi realizada combinando-se o tempo e a velocidade de trituração. A primeira trituração foi feita por 10 segundos em velocidade baixa no Waring Blendor, e em seguida por 5 segundos em velocidade média. Em seguida o homogenato teve seu pH corrigido para 7,4. Novamente sofreu mais uma trituração durante 5 segundos em velocidade média, e rapidamente foi feito o ajuste de pH para 7,4. Na última etapa o tempo de trituração foi de 5 segundos em velocidade média, seguida do ajuste de pH para 7,4. Após o ajuste do meio de isolamento para um volume de 3000 mL e do pH para 7,4; a suspensão foi em seguida homogeneizada com homogeneizador Van Potter-Elvehjem. O homogenato assim obtido foi centrifugado a 800 g durante 10 minutos e o sobrenadante filtrado em dupla camada de gaze e centrifugado a 8500 g durante 15 minutos a 4° C. O precipitado contendo as mitocôndrias foi lavado uma vez com o tampão de isolamento e posteriormente centrifugado a 5000 g durante 10 minutos. O precipitado mitocondrial foi ressuspensado em tampão de isolamento, usando o menor volume possível e, em seguida armazenado em nitrogênio líquido.

1.6. Preparo das partículas submitocondrias de coração de boi

As partículas submitocondriais de coração de boi foram preparadas segundo o método descrito por PENIN et al (1982), onde as mitocôndrias, isoladas como anteriormente descrito, foram armazenadas em nitrogênio líquido. A suspensão de

mitocôndrias foi descongelada e ressuspensa em tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7,4), diluindo-se de forma a se obter 10 mg de mitocôndrias por mL. Esta suspensão ficou 30 minutos sob agitação em banho de gelo e em seguida foi centrifugada a 105000 g por 60 minutos em ultracentrífuga Beckman L80 refrigerada, a 4° C.

A fração sedimentada contendo os mitoplastos, foi ressuspensa em meio contendo sacarose 250 mM, TRIS 10 mM / H₂SO₄ (pH 7,5), ATP 1 mM, MgSO₄ 15 mM e submetida a ultrasonicação, a uma potência de 80 W, por 1 minuto a 4° C. Esta operação foi repetida por 4 vezes com intervalos de 1 minuto entre as sonicações.

A suspensão sonicada foi centrifugada a 22500 g a 4° C por 10 minutos, em centrífuga refrigerada Sorvall RC5-B. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 105000 g a 4° C por 75 minutos, em ultracentrífuga Beckman L80 refrigerada.

O precipitado obtido foi ressuspensa em sacarose 250 mM, TRIS 10 mM / H₂SO₄ (pH 7,5) e MgSO₄ 15 mM, em seguida, novamente centrifugado nas mesmas condições. As partículas assim obtidas, foram ressuspensas neste mesmo tampão de lavagem, conservadas em pequenas alíquotas e mantidas em nitrogênio líquido.

1.7. Extração de lipídeos das mitocôndrias de coração de boi

Os lipídeos foram extraídos das mitocôndrias de coração de boi como previamente descrito por MADEIRA e ANTUNES-MADEIRA (1976) com algumas modificações.

Porções de 1,0 mL da suspensão contendo as mitocôndrias de coração de boi, foram incubadas com 10,0 mL de metanol por 5 minutos sob agitação lenta. O

processo de extração ocorreu por igual período após a adição de 10 mL de clorofórmio destilado. A suspensão foi então centrifugada a 3000 rpm e o sobrenadante foi coletado em erlenmeyer, após filtração em papel de filtro Whatman n°1. Ao volume do extrato total foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 20 mL de KCl 0,1 M. Após forte agitação, esta suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. A camada de clorofórmio inferior obtida foi removida com o auxílio de uma pipeta de vidro, e em seguida foi evaporada em evaporador rotatório sob baixa pressão a 37° C. A pressão foi finalmente restabelecida por um fluxo de N₂. O resíduo foi então dissolvido em volume conhecido de clorofórmio e armazenado a -60° C sob atmosfera de N₂.

1.8. Preparo de Liposomas

1.8.1.Liposomas de Fosfatidilcolina de Soja

Liposomas unilamelares e multilamelares foram preparados a partir de fosfatidilcolina de soja (PC) (SIGMA) dissolvida em clorofórmio (64 µM) como descrito por DINIS et al.(1993) e com pequenas modificações.

Alíquotas do extrato lipídico (PC) foram secas durante 10 minutos em um evaporador rotatório, sob baixa pressão e fluxo de nitrogênio a 37° C. A seguir um volume adequado de tampão, contendo TRIS 10 mM / HCl (pH 7,4), foi adicionado de forma a se obter uma concentração lipídica final de 5 mM. A mistura foi levemente agitada em um banho-maria a 37° C, com a finalidade de obter rapidamente os liposomas multilamelares.

Os liposomas unilamelares foram preparados pela técnica de extrusão como

descrito por MacDONALD et al. (1991). Os liposomas obtidos de fosfatidilcolina de soja foram submetidos a 7 passagens através de um filtro simples (Membranes Avestin, 50x membrana de policarbonato, poros com diâmetro de 200 nm e a membrana com diâmetro de 0,75") (GONÇALVEZ et al., 1998).

1.8.2. Liposomas de Lipídeos Mitocondriais

Os liposomas multilamelares foram preparados a partir de alíquotas dos lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi em CHCl_3 , como descrito por DINIS et al. (1993), com algumas modificações.

Após a evaporação do clorofórmio através de vapor de N_2 , o filme lipídico foi hidratado em tampão contendo HEPES 10 mM, NaCl 50 mM (pH 8,5), sob agitação a 37° C por 1 minuto. A mistura foi submetida a banho de sonicação por 15 segundos (3 vezes) e em seguida agitada em Vortex por 1 minuto. A concentração lipídica final foi de 500 μM .

III.2. MÉTODOS

2.1. Determinação do consumo de oxigênio, cálculo do controle respiratório (CR)

O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas foi determinado polarograficamente com eletrodo específico tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), em oxígrafo GILSON, segundo o método descrito por VOSS et al. (1963), com algumas modificações.

O sistema de reação composto por D-manitol 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM / KOH (pH 7,2), EGTA 0,1 mM e EDTA 0,5 mM, foi suplementado com glutamato de potássio 20 mM, fosfato de potássio 2 mM e ADP 200 nmoles. mL⁻¹. A quantidade de mitocôndrias usada, expressa em função da concentração de proteína mitocondrial foi de 0,5 miligramas por mililitro do sistema de reação, a temperatura foi mantida a 30° C, por banho-maria termostaticado.

As velocidades respiratórias foram expressas em nanoátomos de oxigênio consumido por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, considerando-se que a solubilidade do oxigênio na água a 28° C e pressão de 1 atmosfera é de 250 micromoles por litro (ESTABROOK, 1967). O coeficiente de controle respiratório (CR) foi determinado pela relação entre a velocidade de respiração na presença de ADP (estado 3) e a velocidade após o consumo de ADP (estado 4).

2.2. Determinação do potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$)

O potencial elétrico da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$) foi determinado segundo o método descrito por AKERMAN e WIKSTRÖM (1976), que usa safranina

como sonda do potencial de membrana.

O meio de reação, em volume final de 3 mL, foi constituído por : D-manitol 250 mM e HEPES 10 mM / NaOH (pH 7,2). Este meio foi suplementado com safranina 10 μM , rotenona 5 μM , fosfato de sódio 1 mM, succinato de sódio 3 mM, valinomicina 16 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1,5 mg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de substrato, succinato ou glutamato. Quando o substrato usado foi glutamato de sódio 3mM, a rotenona não foi adicionada ao meio de reação.

As alterações da densidade óptica foram registradas a 511-533 nm, a 28^o C, em espectrofotômetro Aminco Chance Dual Wavelength Double Beam acoplado a registrador. O potencial foi calculado de acordo com a equação de Nernst, considerando a $[\text{K}^+]_{\text{in}}$ como sendo 120mM, conforme ROSSI e AZZONE (1969) e modificado por MORENO et al. (1991).

Os valores de $\Delta\psi$ foram calculados de acordo com a equação de Nernst, utilizando os valores das adições de K^+ (mM) na curva de calibração. Os traçados das figuras dos experimentos de $\Delta\psi$ são demonstrativos de no mínimo quatro repetições independentes.

2.3. Determinação espectrofotométrica do transporte mitocondrial de Ca^{2+}

As variações na concentração de Ca^{2+} livre foram seguidas pela medida das mudanças no espectro de absorvância do indicador metalocrômico arsenazo III, usando o espectrofotômetro Aminco Chance Dual Wavelength Double Beam acoplado a registrador, nos comprimentos de onda de 675-685 nm a $29 \pm 1^\circ \text{C}$ (SCARPA, 1979).

Para os estudos relacionados ao sistema de transporte de Ca^{2+} utilizou-se as

mitocôndrias de coração de rato, as quais foram obtidas como descrito anteriormente.

O meio de reação, para um volume final de 3 mL continha: D-manitol 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM / KOH (pH 7,2), fosfato de sódio 1mM, arsenazo III 31 μ M, rotenona 5 μ M e CaCl_2 variando entre 5 e 30 μ M.

O influxo de Ca^{2+} foi iniciado pela adição de succinato de sódio 4 mM, ou então por glutamato de sódio 4 mM, neste caso a rotenona foi excluída do meio de reação.

Após a finalização da captação, o efluxo de Ca^{2+} foi induzido por FCCP 1 μ M, ou por vermelho de rutênio 2,5 μ M (ANTÔNIO et al., 1991).

Nos experimentos de captação de Ca^{2+} , a amiodarona foi pré-incubada por 5 minutos antes do início do experimento; quando os experimentos avaliavam efluxo, a amiodarona foi incubada por 5 minutos após o Ca^{2+} ter sido captado pelas mitocôndrias.

O meio de reação utilizado nestes experimentos, foi considerado livre de Ca^{2+} pelo tratamento com Chelex-100, por 12 horas, entre 0 e 40 C, e filtrado com papel de filtro livre de Ca^{2+} .

Os traçados das figuras dos experimentos de influxo e efluxo de Ca^{2+} são demonstrativos de no mínimo quatro repetições independentes.

Os resultados do influxo de Ca^{2+} para o estudo da cinética foram analisados graficamente conforme recomendado por Hill (SCARPA e GRAZIOTTI, 1973; KASPARINSKY e VINOGRADOV, 1996; WEISS, 1997).

2.4. Determinação da Transição de Permeabilidade através do inchamento mitocondrial

A transição de permeabilidade foi avaliada através do inchamento mitocondrial, segundo o método descrito por MUSTAFA et al. (1966) com algumas modificações. O inchamento mitocondrial foi acompanhado a 540 nm a 30°C, utilizando-se espectrofotômetro Aminco Chance Dual Wavelength Double Beam, acoplado a registrador.

O sistema de reação utilizado para a determinação da variação do volume de mitocôndrias de coração, em volume final de 3 mL, era constituído de D-manitol 125 mM, HEPES 10 mM / KOH (pH 7,2) e KCl 65 mM. Este sistema foi suplementado com fosfato de potássio 1 mM, rotenona 5 µM, CaCl₂ variando de 30 µM a 45 µM. Os substratos utilizados foram 4 mM de succinato de sódio ou glutamato de sódio, na presença ou ausência de rotenona, respectivamente. Foram adicionados ainda *t*-butilhidroperóxido e amiodarona nas concentrações indicadas nas legendas das figuras.

Os traçados das figuras dos experimentos de inchamento mitocondrial são demonstrativos de no mínimo quatro repetições independentes.

2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Alíquotas da suspensão de mitocôndrias de coração de rato isoladas como descrito, foram incubadas no mesmo meio usado para inchamento mitocondrial (sem KCl), durante o tempo correspondente de cada experimento. As mitocôndrias foram rompidas por 3 etapas sucessivas de congelamento e descongelamento de acordo com o método descrito por CASTILHO et al. (1995). Estas amostras foram

centrifugadas a 15000 rpm por cerca de 2 minutos, lavadas com água destilada e centrifugadas novamente. O sedimento obtido foi ressuspensão em solução tampão da amostra contendo TRIS 0,0625 M / HCl (pH 6,8), SDS 2%, glicerol 10% e as amostras foram fervidas por cerca de 2 minutos. Após a dosagem das proteínas, 30 µg de proteína das amostras foram aplicadas em placa com adição de azul de bromofenol 0,001 g% como corante. O gel de poliacrilamida foi preparado a 10% e o gel de estaqueamento a 3,5% de acrilamida/bisacrilamida. A voltagem usada foi 100V, 250 mA. As proteínas foram reveladas com Comassie Blue R-250 (LAEMMLI 1970).

2.6. Separação, identificação e quantificação das classes de lipídeos polares

As diferentes classes de lipídeos do extrato polar, extraídas das mitocôndrias de coração de boi, foram separadas por cromatografia monodimensional em placas de sílica gel H. As placas foram preparadas ressuspensão-se 45 g de sílica gel H em 100 mL de água destilada, agitando-se vigorosamente por alguns minutos. A suspensão de sílica foi distribuída em placas de vidro desengorduradas, mediante a utilização de aplicador apropriado, regulado para produzir uma camada de sílica com cerca de 0,5 mm de espessura. Após a secagem, as placas foram ativadas pela exposição ao calor em uma estufa a 120° C, por pelo menos 2 horas.

O extrato lipídico a ser analisado foi evaporado sob corrente de N₂ e o resíduo foi dissolvido em pequena quantidade de clorofórmio destilado, para que apenas alguns microlitros do extrato pudessem saturar a camada de sílica, em um único ponto de aplicação da amostra. A quantidade de lipídeo total aplicado por amostra foi de 250-300 µg de lipídeo por ponto de aplicação.

As placas para cromatografia foram introduzidas em câmaras saturadas com solventes, e desenvolvidas em dois sistemas diferentes: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, volumes) e $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (70:30:4:1, volumes).

As diversas classes lipídicas separadas por cromatografia de camada fina monodimensional foram caracterizadas por revelação com vapor de iodo que permitiu localizar os lipídeos sem diferenciar as diversas classes. Os fosfolipídeos foram revelados por pulverização das placas com reagente de azul de molibdênio e ácido sulfúrico (DITTMER e LESTER, 1964) adquirindo cor azul. Os aminolipídeos foram identificados por pulverização das placas com ninhidrina a 0,2% em butanol a 95% e ácido acético a 0,5%. Após aquecimento a 120° C em estufa, durante 10 minutos, as manchas de aminofosfolipídeos adquiriram cor vermelho-lilás. Os glicolipídeos foram revelados por reações específicas com pulverização de α -naftol-ácido sulfúrico (JACIN e MASHIKIN, 1965). Após pulverização, as placas foram aquecidas a 100° C em estufa durante 3 a 6 minutos, e as manchas dos glicolipídeos desenvolveram coloração púrpura.

Para a determinação das proporções relativas das diferentes classes de fosfolipídeos, as placas foram reveladas com vapor de iodo, e os contornos das manchas foram marcados com o auxílio de estilete. A sílica correspondente a cada mancha foi raspada com bisturi e separada em tubos de ensaio. Procedeu-se, a seguir, a análise quantitativa do fosfato contido no pó de sílica, respeitando cada um dos compostos do extrato lipídico. As amostras foram hidrolisadas e analisadas de acordo com seus conteúdos em fosfato inorgânico, segundo os métodos descritos, respectivamente, por BÖTTCHER et al. (1967) e FISKE e SUBBAROW (1925) modificado. Antes da leitura da absorbância a 830 nm, as amostras foram

centrifugadas a 2000 g por 5 minutos, para sedimentação da sílica.

2.7. Avaliação da Peroxidação Lipídica

2.7.1 Medida de Fluorescência do ácido *cis*-Parinárico

A solução estoque de ácido *cis*-parinárico foi preparada a 1 mM em etanol, e conservada em alíquotas sob atmosfera de N₂, a -30° C para evitar a autooxidação. A concentração desta solução foi determinada com base na absorvidade molar a 304 nm, usando ϵ 78000 M⁻¹.cm⁻¹ que corresponde à banda de maior intensidade do espectro de absorção (SKLAR et al., 1977 a, b).

As determinações fluorimétricas do ácido *cis*-parinárico (PnA) foram realizadas em espectrofluorímetro computadorizado Perkin Elmer Model LS 50, provido com cubeta termostatizada e agitação eletromagnética. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 324 nm (banda de excitação 3,5 nm) e o comprimento de onda de emissão foi de 413 nm (banda de emissão 3,5 nm para os liposomas de PC e de lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi; banda de emissão 5,0 nm para as partículas submitocondriais de coração de boi).

Os ensaios foram realizados diretamente na cubeta do espectrofluorímetro, em volume final de 2 mL, com registro contínuo da intensidade de fluorescência.

A incorporação da sonda PnA foi iniciada pela adição de uma alíquota da solução etanólica de ácido *cis*-parinárico a 2 mL de uma suspensão de membranas, sob leve agitação, tendo sido concluída após cerca de 2 minutos, e a intensidade de fluorescência foi registrada ao longo do tempo. A reação de oxidação foi iniciada pela adição de pequenos volumes das soluções dos indutores da lipoperoxidação e

a velocidade do "quenching" de fluorescência foi usada como índice da velocidade da degradação oxidativa do ácido *cis*-parinárico. As várias concentrações de amiodarona foram pré-incubadas, por 5 minutos, à solução de membranas antes da incorporação da sonda. A figura 7 representa um ensaio típico da oxidação do PnA incorporado em liposomas de fosfatidilcolina de soja.

Os traçados das figuras dos experimentos utilizando *cis*-PnA são demonstrativos de no mínimo quatro repetições independentes.

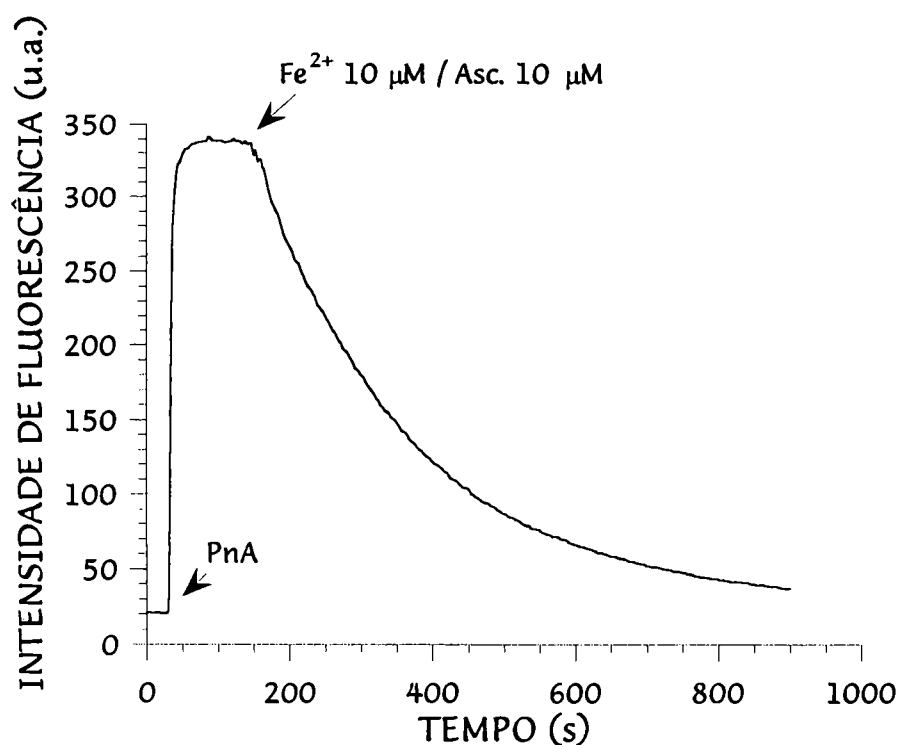


Figura 7. Registro da intensidade de fluorescência do ácido *cis*-parinário, incorporado em liposomas de fosfatidilcolina de soja, correspondente a ensaio típico de degradação oxidativa induzida por Fe²⁺/ácido ascórbico. A intensidade de fluorescência registrada ao longo do tempo evidencia a dispersão de luz inicial da suspensão de liposomas, o sinal de fluorescência subsequente à incorporação da sonda nos liposomas e a degradação oxidativa após adição dos indutores. As setas indicam o momento da adição do ácido *cis*-parinário (PnA) e dos iniciadores da degradação oxidativa.

2.7.2. Consumo de Oxigênio

A oxidação lipídica das membranas (liposomas de fosfatidilcolina de soja e partículas submitocondriais) foi seguida cineticamente pelo registro do consumo de oxigênio detectado por intermédio de um eletrodo de oxigênio do tipo Clark (modelo 5331, Yellow Spring Inst.) acompanhado de registrador Altech, modelo Linear 1200 (TAKENAKA et al. 1991; CUSTÓDIO et al. 1994). As reações foram realizadas em câmara de vidro fechada com capacidade de 1 mL, termostatizada, protegida da luz e com agitação magnética eficiente. As reações foram iniciadas com adição dos iniciadores da peroxidação lipídica a 1 mL das preparações de membranas em solução tampão específica. As várias concentrações de amiodarona foram pré-incubadas, com as membranas por 5 minutos, antes do início da peroxidação lipídica. As variações da tensão de oxigênio foram registradas continuamente ao longo do tempo, em registrador ligado a uma unidade de controle. Esta unidade de controle foi utilizada como fonte de voltagem para polarizar o eletrodo, bem como para calibrá-lo. A calibração do eletrodo foi feita tomando-se como referência a concentração saturante do oxigênio na água deionizada.

A figura 8 representa um ensaio típico que registra continuamente o consumo de oxigênio dos liposomas de fosfatidilcolina de soja, iniciado pelo azoiniciador AAPH.

Os traçados das figuras dos experimentos de consumo de O₂ para avaliar a lipoperoxidação, são demonstrativos de no mínimo quatro repetições independentes.

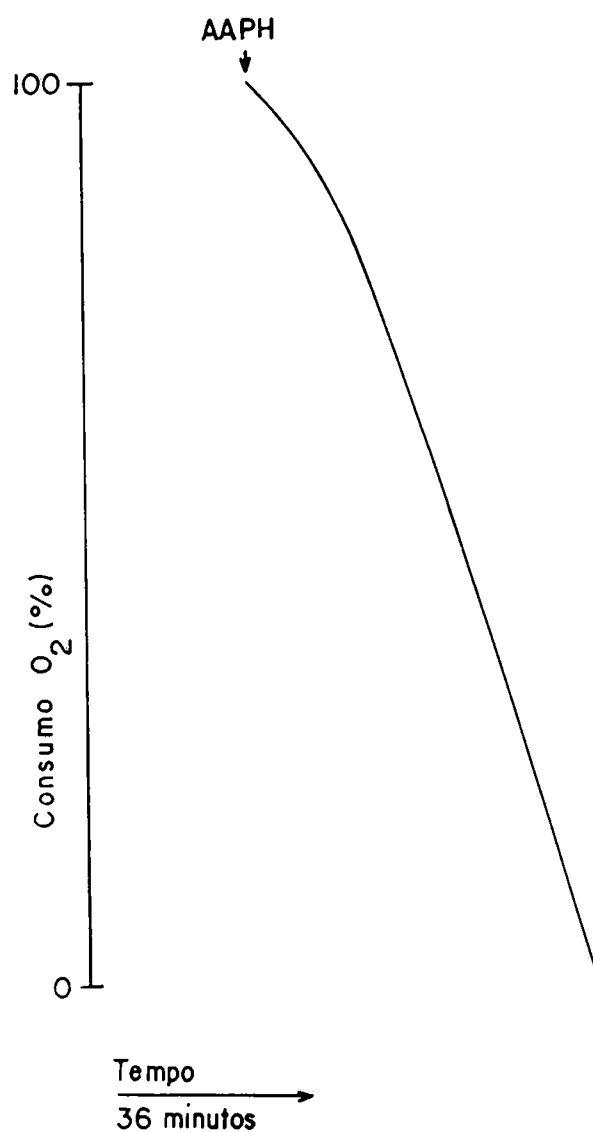


Figura 8. Registro contínuo do consumo de oxigênio, por liposomas de fosfatidilcolina de soja ($800 \mu\text{M}$ em fosfolípidos), na presença de AAPH 10 mM . A reação foi induzida a 37°C , em câmara fechada e com agitação, em 1 mL de meio contendo Na_2HPO_4 20 mM , NaCl 100 mM pH $7,4$. A concentração de O_2 na temperatura usada foi de $66,67 \mu\text{M}$ (ROBINSON e COOPER, 1970)

2.7.3. Quantificação das cadeias alifáticas (ácidos graxos) dos fosfolipídeos por cromatografia gás-líquido

As alterações do conteúdo dos ácidos graxos dos liposomas de lipídeos extraídos de mitocôndrias e de partículas submitocondriais de coração de boi resultantes de processo de peroxidação, foram avaliadas por cromatografia gás-líquido.

A oxidação dos liposomas de lipídeos mitocondriais (500 μ M em fosfolipídeos) foi induzida por AAPH 20 mM, incubados por 1 hora, na presença e na ausência de diferentes concentrações de amiodarona, a 37° C. A amiodarona nas diferentes concentrações foi pré-incubada com os liposomas por 5 minutos antes da indução da oxidação.

A oxidação das partículas submitocondriais de coração de boi (1,5 μ moles em fosfolipídeo) foi induzida por AAPH 30 mM e incubada por 1 hora e 30 minutos, na ausência e na presença de amiodarona, a 37° C. As diferentes concentrações de amiodarona foram pré-incubadas com as partículas por 5 minutos antes da indução da lipoperoxidação. Após a extração e quantificação dos lipídeos totais, os derivados voláteis na forma de ésteres metílicos, a temperaturas adequadas para a cromatografia gás-líquido (GLC), foram obtidos como descrito por DINIS et al. (1993).

2.7.3.1. Preparo dos ésteres metílicos

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram preparados por transesterificação a quente com um excesso de metanol e na presença de ácido; onde um volume do extrato lipídico correspondente a cerca de 1000 nmol de

fosfolípido foi transferido a um tubo apropriado (tampa com vedação de "teflon") . O solvente do extrato lipídico foi evaporado com corrente de N_2 . Adicionou-se ao resíduo seco 5 mL de uma mistura metanol-ácido sulfúrico (5% em ácido sulfúrico, p/v) e incubou-se em banho-maria a $70^\circ C$, durante 2 horas (tubo hermeticamente fechado e atmosfera de N_2). Em seguida, procedeu-se à extração dos ésteres metílicos com hexano pela adição de 5 mL de água destilada e 10 mL de hexano; agitou-se vigorosamente durante 2 minutos e centrifugou-se para a separação das fases. A fase superior (hexano) foi transferida para um erlenmeyer e a fase inferior foi reextraída com hexano (10 mL). Às fases de hexano reunidas no erlenmeyer, adicionou-se 10 mL de água destilada e misturou-se vigorosamente. A fase superior foi transferida para um balão e em seguida adicionou-se sulfato de sódio anidro para retirar do extrato de hexano qualquer resíduo de água. Após 30 minutos em repouso, o extrato foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1, para um balão periforme. O solvente foi então evaporado sob vácuo em evaporador rotatório. O resíduo seco dos ésteres metílicos foi dissolvido em 100 μL de dissulfeto de carbono (CS_2), que foi evaporado sob corrente de N_2 . Finalmente, o resíduo seco foi redissolvido em CS_2 e estocado a $-20^\circ C$ sob atmosfera de N_2 até o momento da análise cromatográfica.

2.7.3.2.Procedimento Cromatográfico

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo Varian Series 2700 modificado para utilização de colunas capilares, equipado com detector de ionização de chama. Utilizou-se para tanto coluna de polioxietileno (BPX 70 SGE) de 25 m de comprimento e 0,53 mm de diâmetro, percorrida por fluxo de

N_2 de $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Esta coluna tem uma fase estacionária de polietilenoglicol, que é suficientemente polar para as separações necessárias, sendo também estável aos peróxidos das amostras. A temperatura de injeção foi de 250°C e a temperatura de separação variou entre $150\text{-}220^\circ \text{C}$. Os primeiros 10 minutos ocorreram a 150°C e, a partir daí, a temperatura aumentou até 220°C com velocidade de $4^\circ \text{C}/\text{min}$.

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação com os respectivos tempos relativos de retenção (TRR), tendo o ácido palmítico (C16:0) como referência, com os ésteres metílicos de padrões autênticos.

A determinação das proporções relativas dos ácidos graxos foi obtida a partir da integração da área dos picos realizada com integrador computadorizado Milton-Roy CI-4100 associado ao cromatógrafo, após programação adequada.

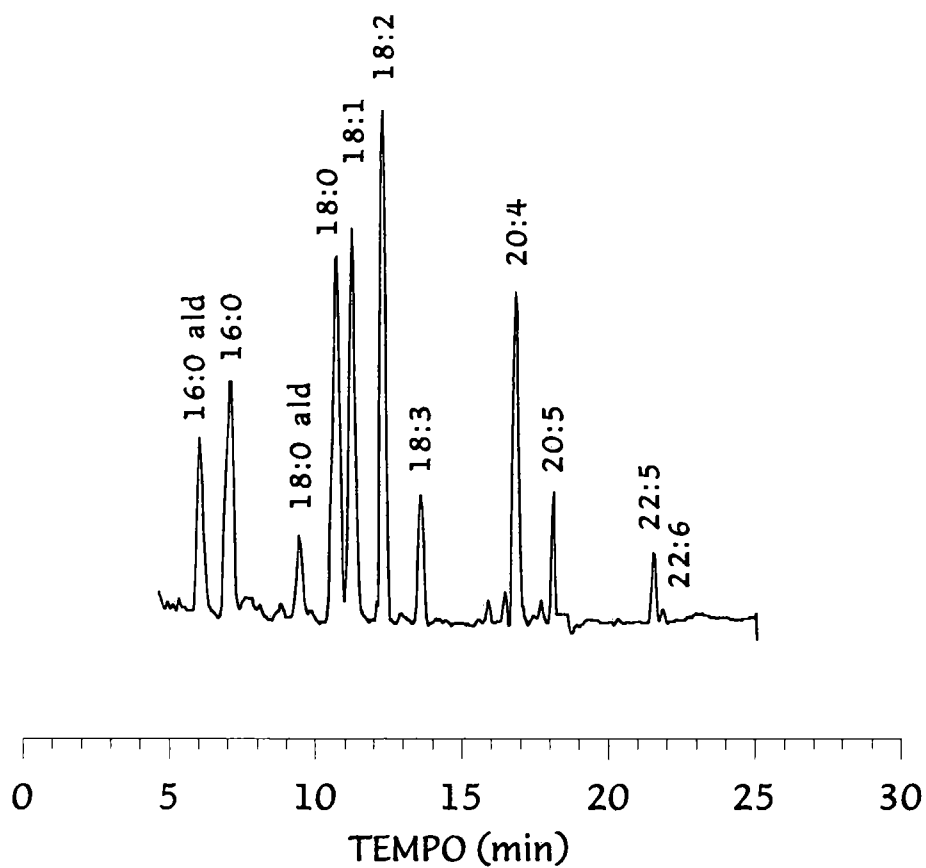


Figura 9. Cromatograma representativo dos ésteres metílicos dos ácidos graxos constituintes dos lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi, com identificação dos mais significativos, obtido por cromatografia gás-líquido.

2.7.4. Análise dos Dienos Conjugados

A oxidação dos lipídeos de fosfatidilcolina de soja (170 µg de fosfolipídeos em hexano) foi iniciada pelo azoiniciador AMVN (2 mM em acetonitrilo), na ausência e na presença de diferentes concentrações de amiodarona, neste caso preparada em acetonitrilo, segundo PALOZZA e KRINSKY (1991).

A formação dos dienos conjugados foi detectada e avaliada contra o tempo de oxidação por espectrofotometria de alta resolução, usando espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 6 UV/VIS.

Aplicou-se a segunda derivada ao espectro de absorção de UV dos extratos lipídicos de fosfatidilcolina de soja, tal como referido por CORONGIU et al (1983) e os dienos conjugados foram semiquantitativamente avaliados com referência a altura do pico negativo, em unidades arbitrárias. A figura 10 mostra o espectro de absorção característico de extrato lipídico de fosfatidilcolina de soja peroxidado e a correspondente segunda derivada, com evidência dos picos negativos a 234 e 242 nm correspondentes aos isômeros *trans-trans* e *cis-trans*, respectivamente.

Os traçados das figuras dos experimentos da medida dos dienos conjugados são demonstrativos de no mínimo quatro repetições independentes.

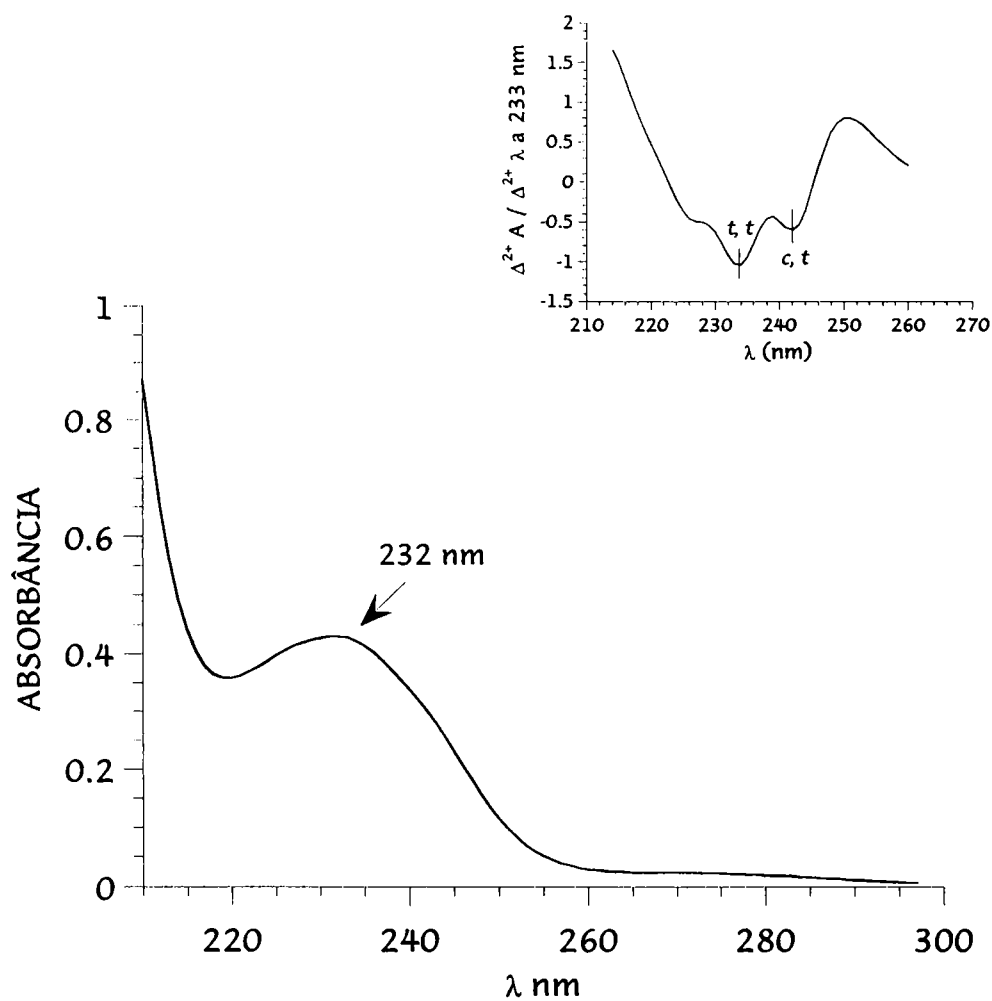


Figura 10. Espectro de absorção UV dos lipídeos de fosfatidilcolina de soja, após peroxidação induzida. O gráfico inserido representa a segunda derivada do espectro, com evidência de dois picos negativos distintos correspondentes a duas formas isoméricas diferentes, *trans-trans* (t, t) e *cis-trans* (c, t).

2.8. Determinação de Proteínas

Todas as concentrações de proteínas foram determinadas de acordo com o método descrito por LOWRY et al. (1951), utilizando soro albumina bovina como padrão. As leituras foram realizadas a 700 nm, com auxílio de espectrofotômetro B-380 (MICRONAL).

2.9. Dosagem do Fosfato dos Fosfolípidos

A quantificação de fosfolípidos das soluções lipídicas de fosfatidilcolina de soja, das extraídas de mitocôndrias de coração de boi e das partículas submitocondriais, foram realizadas pela determinação do fosfato lipídico de acordo com o método descrito por FISKE e SUBBAROW (1925), após os lípidos terem sido submetidos a uma hidrólise ácida com ácido perclórico (HClO_4 70%) a 170°C , por 2 horas (BÖTTCHER et al., 1967).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**IV.1. EFEITOS DA AMIODARONA SOBRE OS FLUXOS
MITOCONDRIAIS DE Ca^{2+}**

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Efeitos da amiodarona sobre os fluxos mitocôndrias de Ca^{2+}

1.1. Efeitos da amiodarona sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias de coração de rato

Mitocôndrias de coração de rato foram energizadas com glutamato e o consumo de oxigênio foi medido. As velocidades de consumo de oxigênio após adição de ADP (estado 3) e seu consumo (estado 4) estão representadas nas figuras 11 A e B. O coeficiente do controle respiratório (CR) nos ensaios controle (ausência de amiodarona), variou entre os valores absolutos 10 e 15, mostrando que as mitocôndrias isoladas estavam com ótimo grau de acoplamento. Observa-se na figura 11 A, que a amiodarona nas concentrações usadas (5-30 μM) inibiu a velocidade respiratória do estado 3 - ADP, de forma dose dependente. A inibição do estado 3 com a maior dose do fármaco usada (30 μM) foi cerca de 55 %. Com relação ao efeito da amiodarona sobre a velocidade respiratória mitocondrial do estado 4, usando glutamato como substrato, observa-se (Fig. 11 B) que na concentração 15 μM da droga, ocorreu um estímulo de 50 % da velocidade respiratória, retornando então gradativamente à velocidade controle.

Este efeito bifásico da amiodarona sobre o estado 4, foi muito semelhante aquele mostrado por FROMENTI et al. (1990) para este fármaco, porém, em concentrações mais elevadas (20-400 μM).

O efeito inibitório sobre a velocidade respiratória do estado 3, ao lado do estímulo no estado 4, determina a redução acentuada do índice do controle respiratório.

O efeito da amiodarona sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias de coração de rato desacopladas por tratamento com o ionóforo FCCP mostrou uma inibição gradativa das velocidades do consumo de O_2 , quando glutamato era o substrato oxidável (dados não mostrados).

Estes experimentos permitiram estabelecer condições para o uso de baixas concentrações de amiodarona, as quais são semelhantes aos picos de concentrações encontradas no plasma durante o uso crônico do fármaco. Além disso, cabe ressaltar que nos experimentos deste trabalho não se utilizou como protetor o BSA que sabidamente se liga à amiodarona em cerca de 60 %, quando no plasma (LALLOZ et al., 1984; REYNOLDS, 1989).

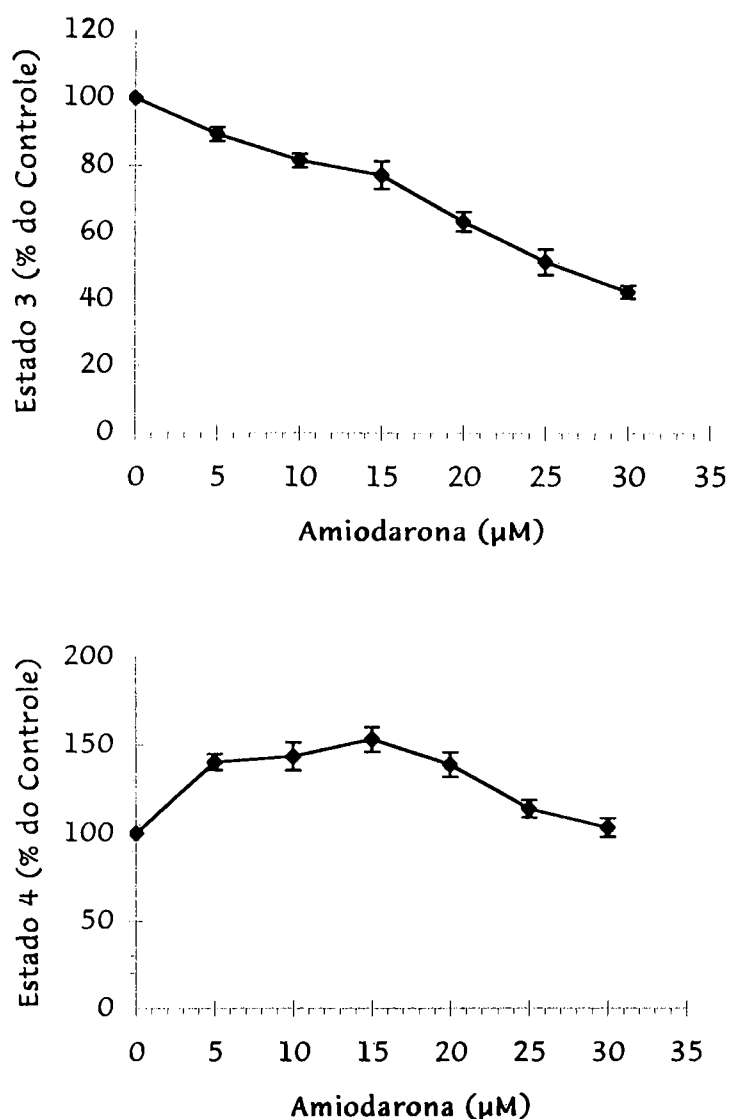


Figura 11. Efeito da amiodarona sobre a velocidade respiratória mitocondrial: Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foram pré-incubadas por 5 minutos em um meio contendo: D-manitol 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM / KOH pH 7,2, EGTA 0,1 mM, EDTA 0,5 mM e suplementados com fosfato de potássio 4 mM, glutamato de potássio 20 mM e 200 nmoles de ADP, na ausência e na presença de amiodarona nas concentrações indicadas na figura, em um volume final de 1,2 mL a 30° C. A respiração mitocondrial foi medida pelo consumo de oxigênio, dada em $\text{nAtgO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteínas.

(A) velocidade respiratória do estado 3; 100% representa $205,7 \text{ nAtgO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

(B) velocidade respiratória do estado 4; 100% representa $11,04 \text{ nAtgO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

1.2. Efeitos da amiodarona sobre o potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) em mitocôndrias isoladas de coração de rato.

O potencial elétrico de membrana mitocondrial é considerado como o maior componente do gradiente eletroquímico de prótons na maioria das espécies estudadas, e a sua determinação é portanto, essencial para o entendimento do mecanismo do transporte mitocondrial de íons, que são transportados de modo eletrogênico, como é o caso do Ca^{2+} (AKERMAN e WIKSTRÖM, 1976).

Neste trabalho utilizou-se a safranina O como indicador de potencial elétrico. A variação espectral da safranina O sob indução de uma diferença de potencial elétrico através da membrana mitocondrial foi observada após a criação de um potencial de difusão de íons potássio (AKERMAN e WIKSTRÖM, 1976; MORENO et al., 1991), para possibilitar a calibração do sistema. A curva de calibração do $\Delta\psi$, figura 12, mostra então a adição de valinomicina a mitocôndrias respirando tendo como substrato o succinato, na ausência de K^+ . Subsequentemente às adições seqüenciais de K^+ ocorrem despolarizações também seqüenciais, pelo movimento eletroforético de K^+ , mediado pelo ionóforo valinomicina.

Os resultados apresentados na figura 13, mostram os efeitos da amiodarona sobre os valores de $\Delta\psi$ quando as mitocôndrias isoladas de coração de rato foram energizadas com succinato de sódio. A análise destes dados indica que nesta condição experimental as mitocôndrias desenvolvem um potencial elétrico da ordem de 150 mV (negativo internamente). Nos experimentos mostrados na figura 13 inserida, a amiodarona foi pré-incubada por 5 minutos antes da energização com o substrato. Observa-se que o potencial elétrico diminuiu em cerca de 20 mV pelo uso

do fármaco antiarrítmico na concentração 15 μM , e que foi drasticamente reduzido na presença de amiodarona 30 μM .

A figura 13 compara duas situações do potencial elétrico de membrana frente a amiodarona pré-incubada (**a**) e quando adicionada após o $\Delta\psi$ máximo alcançado em condições de fluxo constante (**b**). O perfil dos gráficos foi semelhante em ambas as condições, porém, quando a mitocôndria foi pré-incubada com 30 μM de amiodarona há uma despolarização de 85 mV, enquanto que na ausência da pré-incubação a queda de potencial foi de 55 mV.

Analisando a figura 13, observa-se que a queda de $\Delta\psi$ causada nas situações de pré-incubação difere aproximadamente em 5 μM de amiodarona da condição não pré-incubada na maioria das concentrações usadas. Este fato sugere que o tempo de penetração do fármaco na membrana tem importância no processo.

Os efeitos da amiodarona sobre o $\Delta\psi$ de mitocôndrias de coração de rato foram também estudados energizando o sistema com glutamato de sódio. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles com succinato de sódio, destacando-se apenas o fato de que as mitocôndrias de coração de rato respondem mais lentamente à energização com glutamato (resultados não mostrados).

Considerando que as concentrações de 5 a 15 μM de amiodarona causaram somente alterações muito discretas em termos deste importante parâmetro funcional da organela, estas concentrações foram usadas nos experimentos subsequentes envolvendo o estudo do transporte de Ca^{2+} e da lipoperoxidação de membranas.

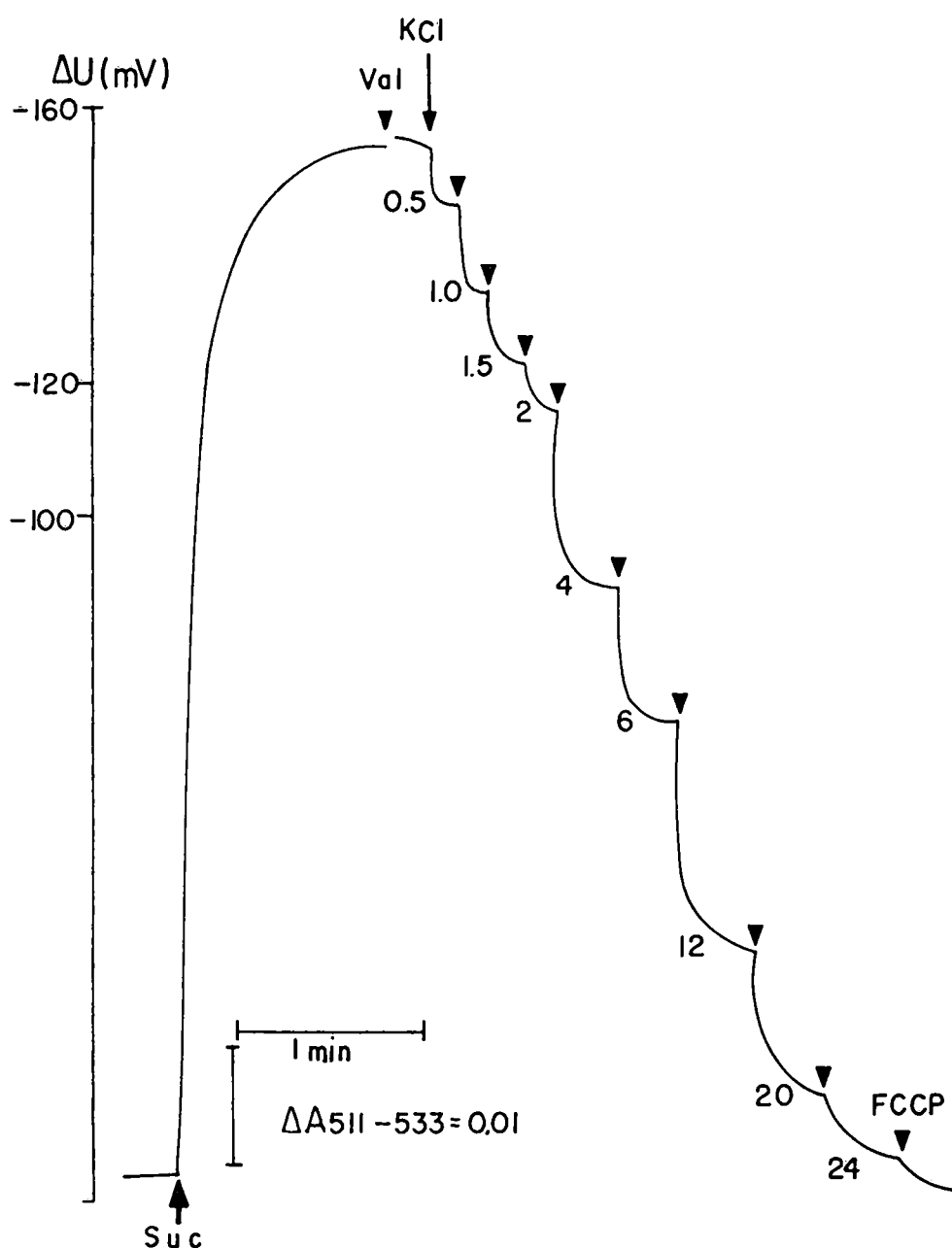


Figura 12. Curva de calibração para o potencial elétrico de membrana em mitocôndrias de coração de rato:

Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foram pré-incubadas por 5 minutos em um sistema contendo: D-manitol 250 mM, HEPES 10 mM / NaOH pH 7,2, suplementado com safranina O 0,01 mM, rotenona 5 μ M, fosfato de sódio 1 mM, em um volume final de 3 mL, a 30° C. A reação foi iniciada com a adição de succinato de sódio 3 mM, e após o potencial máximo ter sido formado a valinomicina 16 ng/mL foi adicionada, e em seguida a calibração foi iniciada com a adição sucessiva de KCl (mM) para uma molaridade final indicada no gráfico.

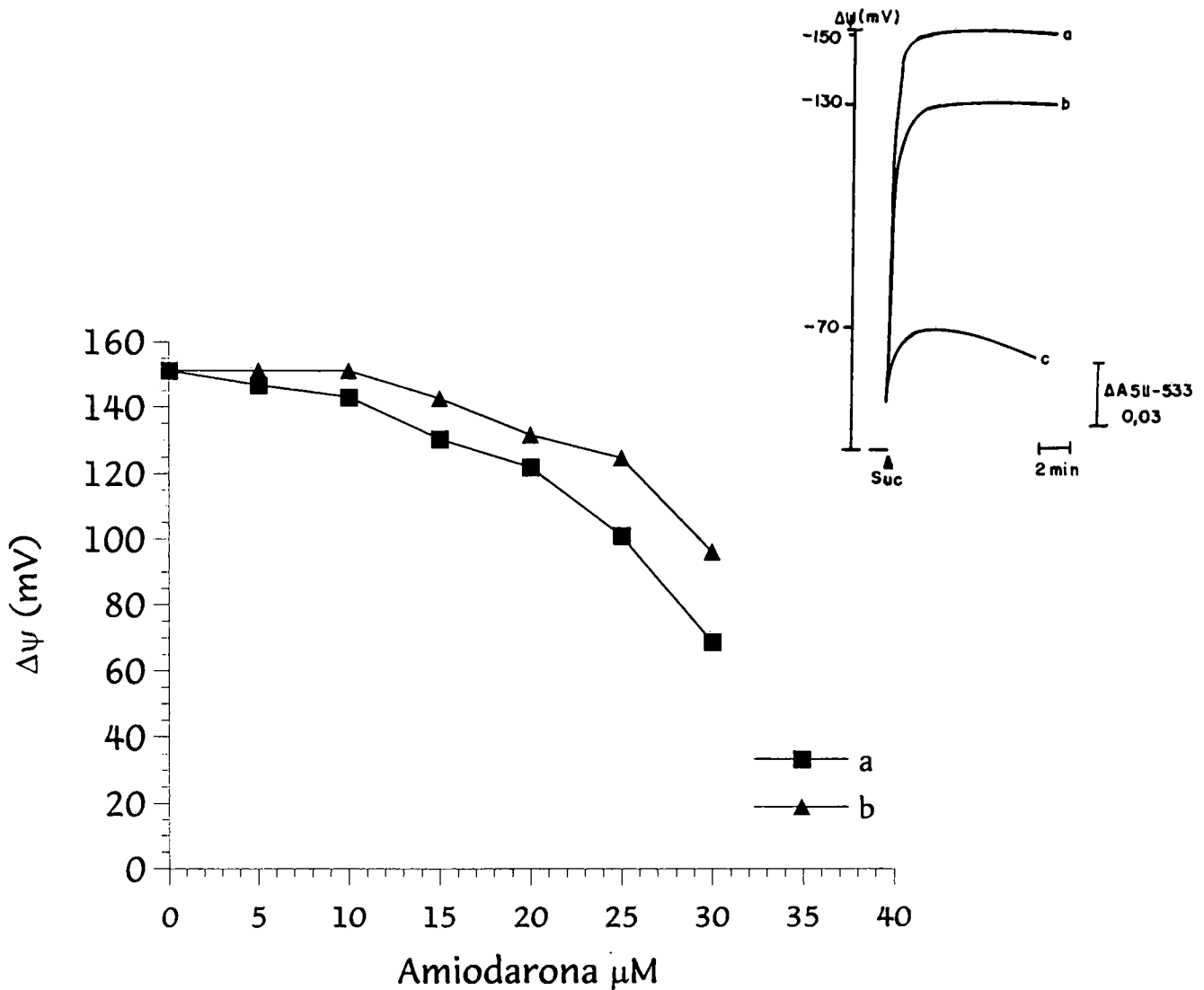


Figura 13. Efeito da amiodarona sobre o potencial elétrico transmembrana em mitocôndrias de coração de rato energizadas com succinato:

a. Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foram pré-incubadas por 5 minutos em um meio de reação contendo: D-manitol 250 mM, HEPES 10 mM / NaOH pH 7,2, suplementado com safranina O 10 μM, rotenona 5 μM, fosfato de sódio 1 mM, e diferentes concentrações de amiodarona, em um volume final de 3 mL, e o sistema mantido a 30° C. A reação foi iniciada pela adição de succinato de sódio 3 mM.

b. Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foram suspensas na mesma mistura de reação e condições da figura 14 **a**., suplementada com safranina O 10 μM, rotenona 5 μM, fosfato de sódio 1 mM e a reação foi iniciada com a adição de succinato de sódio 4 mM. Após o potencial de membrana ser formado foi adicionado a amiodarona, como indicado na figura.

A figura inserida mostra mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) pré-incubadas e suplementadas como descrito em 14 **a**., com a adição de duas concentrações finais de amiodarona (**a**. ausência, **b**. 15 μM, **c**. 30 μM).

1.3.Efeito da amiodarona sobre a captação de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato.

Como já mencionado, o influxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato, bem como de outros mamíferos, ocorre em resposta a um potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$) (GUNTER et al., 1990). Considerando os efeitos da amiodarona sobre o $\Delta\psi$, seria possível pensar que o fármaco interferisse nos fluxos mitocondriais de Ca^{2+} . Com a finalidade de investigar tal possibilidade, os efeitos da amiodarona sobre o mecanismo de captação de Ca^{2+} foram avaliados medindo-se as alterações espectrais do arsenazo III em presença do Ca^{2+} .

A figura 14 apresenta um experimento representativo do efeito da amiodarona sobre a captação de Ca^{2+} . Observa-se que quando o influxo de Ca^{2+} é iniciado com succinato de sódio na presença de fosfato de sódio e ausência de amiodarona, a mitocôndria capta todo o Ca^{2+} adicionado ao final de 50 segundos, sendo a velocidade inicial muito rápida. Já em presença de amiodarona (15, 30 μM) verifica-se diminuição da captação de Ca^{2+} , no mesmo período de tempo, em função da dose usada. Experimentos similares realizados com a captação de Ca^{2+} sendo iniciada por um substrato do complexo I, o glutamato de sódio, mostram que o efeito da amiodarona não é dependente do tipo de substrato oxidável (Fig. 15).

O efeito do fármaco antiarrítmico em mitocôndrias energizadas com succinato pode ser melhor analisado na figura 16, onde várias concentrações de amiodarona (5 a 30 μM) foram pré-incubadas ao sistema contendo as mitocôndrias, antes do início da captação, sendo isso repetido para duas concentrações distintas de cálcio (a. 10 μM ; b. 15 μM).

Na figura 16, cada ponto dos traçados (a e b) representa a medida da velocidade inicial de captação de Ca^{2+} . Observa-se que houve inibição das velocidades iniciais de captação em presença de amiodarona. Esta inibição ocorreu tanto em a ($10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}), como em b ($15 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}), porém, com a menor concentração do cátion a inibição causada pela amiodarona foi ligeiramente menor quando comparada com a maior concentração. Em presença de $10 \mu\text{M}$ (a) e $15 \mu\text{M}$ (b) de Ca^{2+} , a amiodarona $15 \mu\text{M}$ inibiu 45 % e 50 %, respectivamente. A inibição da velocidade inicial de captação de Ca^{2+} na presença de $30 \mu\text{M}$ de amiodarona foi de 70 % e 79% quando as concentrações de Ca^{2+} utilizadas eram de $10 \mu\text{M}$ e $15 \mu\text{M}$, respectivamente. Portanto, a inibição da velocidade inicial de influxo causada pela amiodarona foi de mesma magnitude, independentemente da $[\text{Ca}^{2+}]$ adicionada.

A relação encontrada neste trabalho entre os valores do potencial elétrico de membrana e da captação de Ca^{2+} ($15 \mu\text{M}$) frente as concentrações de amiodarona, estão apresentadas na figura 17. Observa-se que na concentração de $15 \mu\text{M}$ do fármaco, quando o potencial de membrana diminui em 20 mV, a captação de Ca^{2+} é inibida em torno de 50 %.

Considerando que o efeito despolarizante da amiodarona sobre a membrana mitocondrial interna, torna-se irreversível (queda de mais de 80 mV) a partir de $30 \mu\text{M}$ da droga, este fato não permite à membrana exercer aquelas funções que demandem energia do $\Delta\psi$. A captação de Ca^{2+} é reconhecida como uma das mais importantes destas funções, pois ocorre em resposta ao potencial elétrico transmembrana (negativo internamente), gerado pela passagem de elétrons pela cadeia respiratória, quando energizada.

Analisando então os resultados das figuras 14 a 16, observa-se que houve inibição de cerca de 50 % da velocidade inicial de captação de Ca^{2+} na presença de amiodarona 15 μM , tornando-se bastante intensa pela exposição das mitocôndrias à concentração 30 μM da droga (inibição de cerca de 80 %). Uma despolarização de 20 mV, como acontece no experimento mostrado na figura 16, na presença de amiodarona 15 μM , poderia ser seguida de recuperação do potencial elétrico alcançado. Por isso, talvez, a queda de $\Delta\psi$ não fosse responsável por si só pelo alto grau de inibição da captação de Ca^{2+} , como relatado por GUNTER e GUNTER (1994) e por GUNTER et al. (1994) que descrevem experimentos de captação de Ca^{2+} para uma faixa de potencial elétrico de membrana acima de 110 mV. Esta informação somada à inibição da captação de Ca^{2+} pela amiodarona (Fig. 14 a 16) leva a possibilidade de que nesta inibição haja outros fatores envolvidos além do colapso do $\Delta\psi$, como através de uma ação direta do fármaco sobre o sistema de transporte mitocondrial de Ca^{2+} .

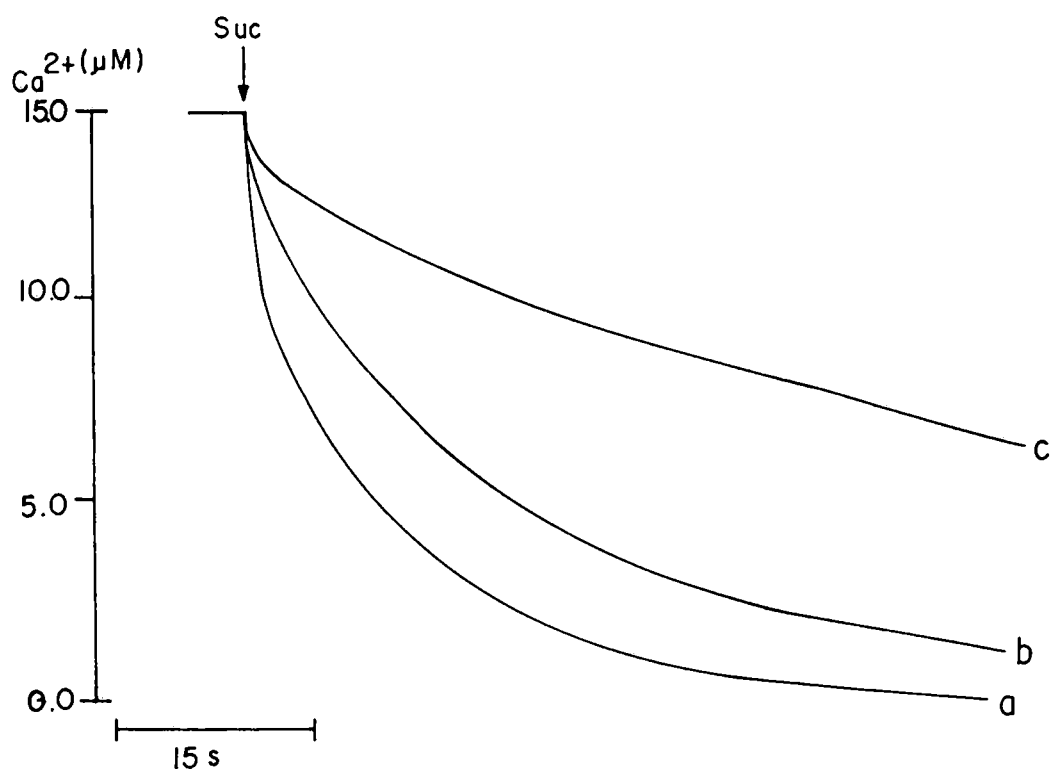


Figura 14. Efeito da amiodarona sobre a captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de coração de rato, energizadas com succinato.

Mitocôndrias de coração de ratos (0,5 mg/mL) foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de reação contendo: D-manitol 125 mM, HEPES 10 mM / KOH pH 7,2, KCl 65 mM, arsenazo III 31 μM e suplementado com fosfato de sódio 1 mM, rotenona 5 μM , 3 adições de CaCl_2 5 μM e diferentes concentrações de amiodarona (a ausência, b 15 μM , c 30 μM), em um volume final de 3 mL, a 30° C. A reação foi iniciada pela adição de 4 mM de succinato de sódio.

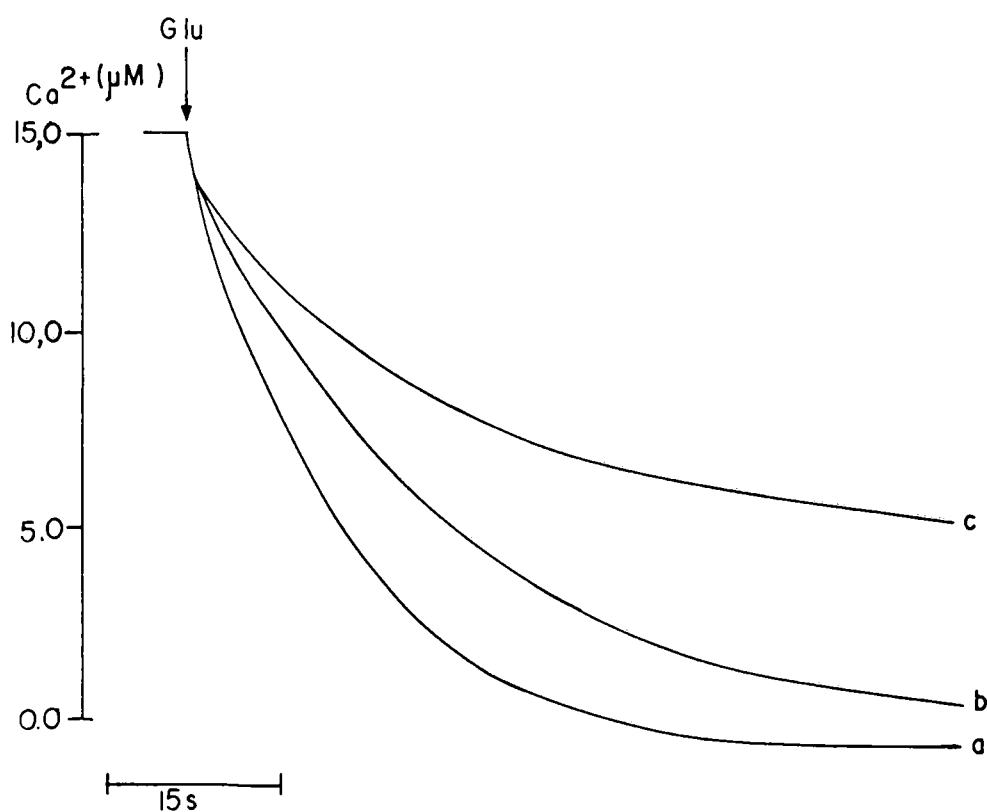


Figura 15. Efeito da amiodarona sobre a captação de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato, energizadas com glutamato.

Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foram pré-incubadas por 5 minutos em meio de reação contendo: D-manitol 125 mM, HEPES 10 mM / KOH pH 7,2, KCl 65 mM, arsenazo III 31 μM e suplementado com fosfato de sódio 1 mM, 3 adições subsequentes de CaCl_2 5 μM e diferentes concentrações de amiodarona (a. ausência, b. 15 μM , c. 30 μM) o volume final foi de 3 mL, a reação ocorreu a 30° C.

A captação de Ca^{2+} foi iniciada pela energização da mitocôndria com glutamato de sódio 4 mM.

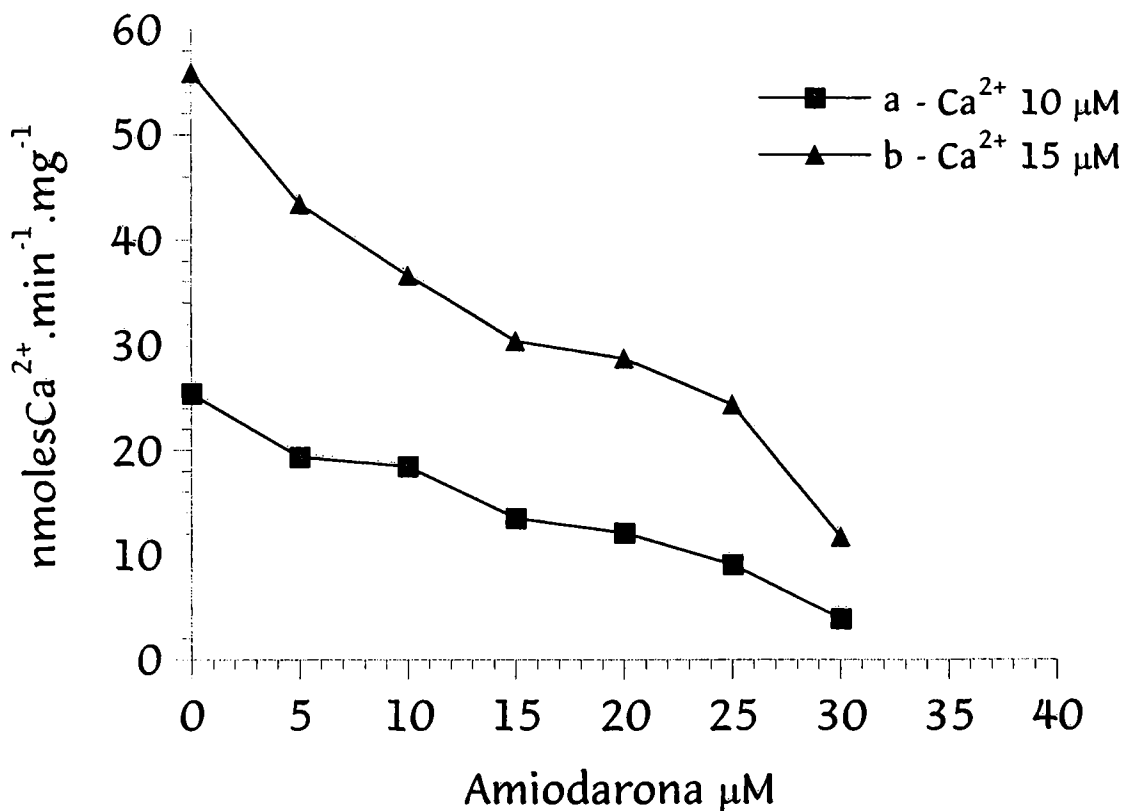


Figura 16. Efeito da amiodarona sobre as velocidades iniciais de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de coração de rato, energizadas com succinato.

Mitocôndrias de coração de ratos (0,5 mg/mL) foram pré-incubadas e suplementadas de acordo com a figura 15, com adição de CaCl_2 10 μM em a e 15 μM em b, nas concentrações de amiodarona indicadas na figura, em um volume final de 3 mL, a 30° C. As velocidades iniciais foram expressas como nmoles Ca^{2+} \cdot min $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$ proteínas.

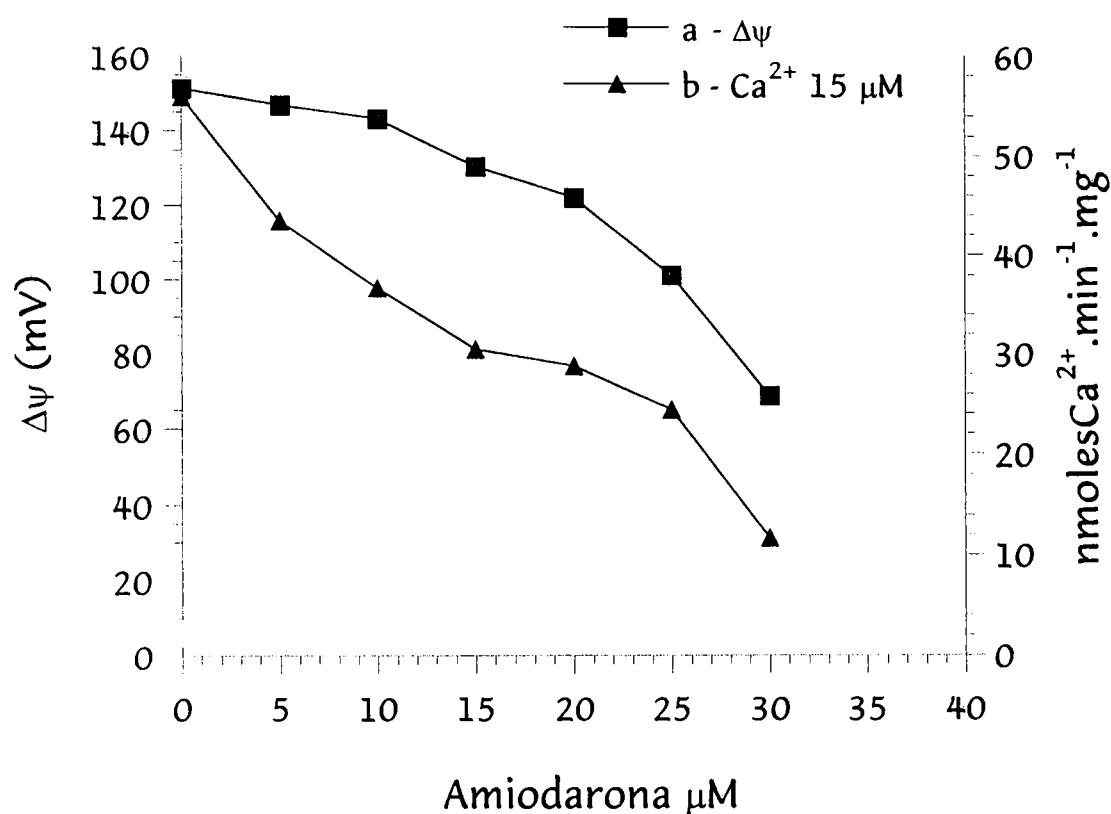


Figura 17. Correlação entre o potencial de membrana e as velocidades iniciais de captação de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato.

a. Determinação do $\Delta\psi$ em mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foi realizada como descrito na figura 14, com adição de várias concentrações de amiodarona como descrito na figura.

b. Determinação da captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foi realizada como descrito na figura 16 **b**, com adição de várias concentrações de amiodarona como indicado na figura.

Com a finalidade de um melhor entendimento dos efeitos inibitórios da amiodarona sobre a velocidade inicial de captação mitocondrial de Ca^{2+} , foram realizados estudos frente a diferentes concentrações deste cátion e do fármaco.

Deve-se salientar o cuidado a ser tomado na execução de tais experimentos, particularmente quanto às concentrações máximas de Ca^{2+} possíveis de serem utilizadas sem resultar em efluxo espontâneo do íon. Desta forma o estabelecimento da condição ideal foi monitorado em experimentos preliminares aos estudos (dados não mostrados).

Nos experimentos cujos resultados estão listados e descritos na Tabela II e figura 18, respectivamente, a amiodarona foi pré-incubada por 5 minutos com a preparação mitocondrial antes do início da captação, a qual foi desencadeada pela adição do substrato succinato. A Tabela II mostra os valores das velocidades de captação de Ca^{2+} , na ausência e na presença de amiodarona, com as quatro concentrações de Ca^{2+} usadas (5, 10, 15, 20 μM).

Observa-se que na ausência e presença de amiodarona a velocidade inicial de captação de Ca^{2+} aumenta com o aumento da quantidade de Ca^{2+} adicionado ao meio. Na Figura 18, os valores das velocidades iniciais da captação de Ca^{2+} em função das concentrações de Ca^{2+} utilizadas, apresentam uma tendência sigmoideal, semelhante ao obtido por SCARPA e GRAZIOTTI (1973). Esta sigmoidealidade tem sido interpretada por vários autores como uma cooperatividade positiva do Ca^{2+} sobre seu próprio transporte (BYGRAVE et al., 1971; SCARPA e GRAZIOTTI, 1973; VINOGRADOV e SCARPA, 1973; REED e BYGRAVE, 1975; HEATON e NICHOLLS, 1976; HUSTON et al., 1976; BRAGADIN et al., 1979).

SCARPA e GRAZIOTTI (1973) afirmam que o alto K_m aparente para o Ca^{2+} e o efeito devido à cooperatividade tornam a captação de Ca^{2+} muito lenta quando a concentração de Ca^{2+} está abaixo de 10-15 μM , para mitocôndrias de coração de rato. Os autores usaram 5 μM como concentração mínima de Ca^{2+} nos estudos de cinética e obtiveram uma velocidade que variou entre 0,05 a 0,3 $nmolCa^{2+}.s^{-1}.mg$ proteína⁻¹, a 25° C, o que está em concordância com os resultados obtidos neste estudo (Tabela II).

Em presença de concentrações crescentes de amiodarona, os valores das velocidades iniciais de captação de Ca^{2+} diminuem, o que mostra, mais uma vez, que o fármaco antiarrítmico inibe a captação do cátion pela mitocôndria de coração de rato, de modo semelhante em todas as concentrações de Ca^{2+} usadas. A amiodarona 15 μM inibe em torno de 40 a 50 % em todas as concentrações do cátion (Tabela II). Estes mesmos resultados representados graficamente (Figura 18) mostram que a presença da amiodarona não altera o caráter sigmóide da velocidade inicial de captação, e ocorre decréscimo tanto da velocidade inicial quanto da velocidade máxima aparente ($V_{m\acute{a}x\ app}$) para cada concentração do inibidor. Este termo, $V_{m\acute{a}x\ app}$, está sendo usado neste trabalho de modo semelhante ao usado por GUNTER e GUNTER (1994).

A análise dos dados da figura 18 sugere que a amiodarona provoca uma alteração do efeito cooperativo positivo durante o processo de captação de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato.

Tabela II. Efeito da amiodarona sobre a velocidade inicial de captação de Ca^{2+} :
 Velocidade inicial de captação de Ca^{2+} (nmoles Ca^{2+} . min^{-1} . mg^{-1}) frente a
 diferentes concentrações de Ca^{2+} e amiodarona :

Amiodarona (μM)	Ca^{2+}			
	5 μM	10 μM	15 μM	20 μM
0	10,71	33,85	71,05	103,81
5	8,82	22,95	58,13	76,07
10	6,93	19,67	47,24	70,06
15	5,35	16,11	42,12	62,54
20	2,9	13,38	37,64	54,49
25	2,6	11,2	30,59	52,47
30	2,29	9,08	24,6	45,60

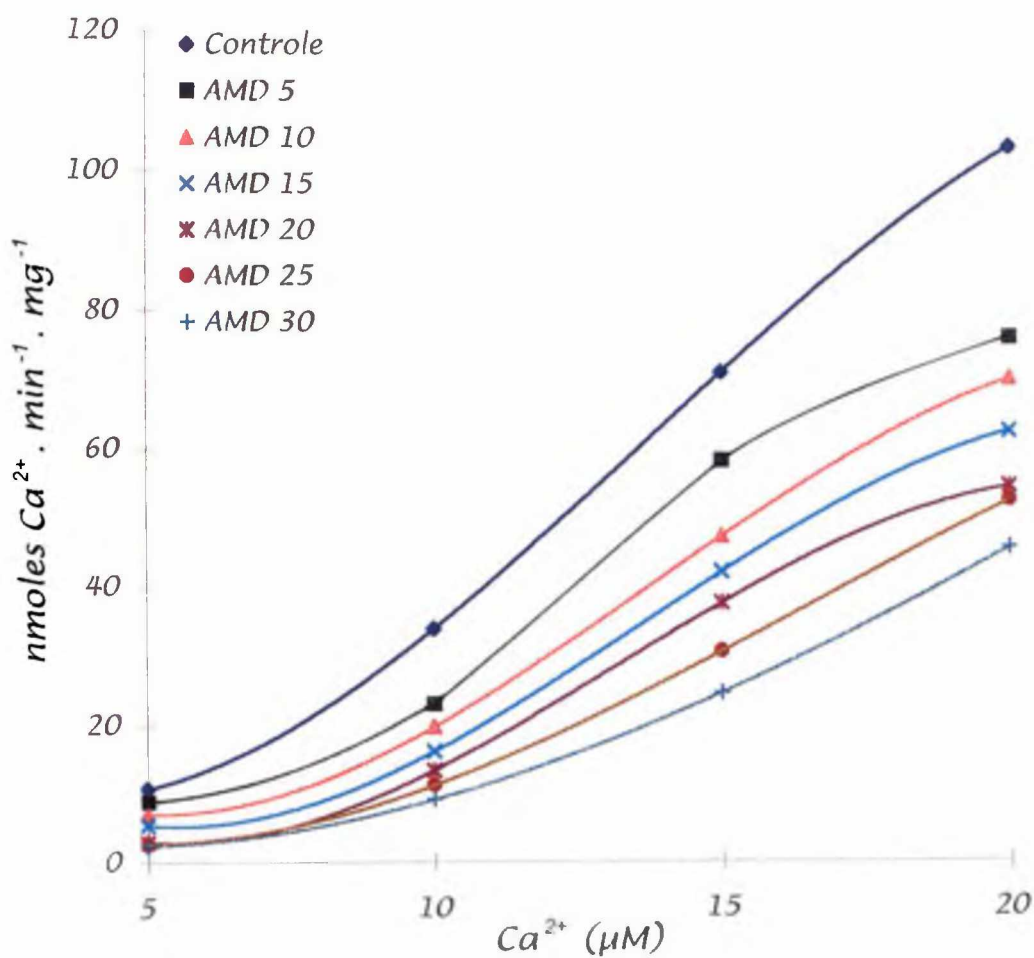


Figura 18. Gráfico da velocidade inicial de captação de Ca^{2+} mitocondrial (v) x diferentes concentrações $[Ca^{2+}]$:

Velocidade inicial de captação de Ca^{2+} na ausência e na presença de diferentes concentrações de amiodarona.

Mitocôndrias de coração de rato foram ensaiadas como na figura 16, e a medida da captação de Ca^{2+} está descrito em Materiais e Métodos. As concentrações de Ca^{2+} usadas, foram através de adições de $CaCl_2$ 5 μM , conforme a concentração final desejada.

1.4.Efeitos da amiodarona sobre o efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato.

O estudo dos efeitos da amiodarona sobre as vias de efluxo de Ca^{2+} em mitocôndrias de coração de rato, foi realizado com o uso de FCCP, que induz a liberação de Ca^{2+} pelo colapso causado no $\Delta\psi$, ou seja, pelo reverso da via de influxo de Ca^{2+} (NICHOLLS, 1978 a, b). O efluxo foi também observado na presença de vermelho de rutênio, que inibe o uniporter com um alto grau de especificidade (MOORE, 1971; VASINGTON et al., 1972) e em baixas concentrações (REED e BYGRAVE, 1974), permitindo a visualização do efluxo líquido de Ca^{2+} pelas vias dependente e independente de Na^+ .

Tem sido descrito que o efluxo de Ca^{2+} induzido por FCCP em mitocôndrias de fígado de rato ocorre com velocidade inicial de $25 \text{ nmolesCa}^{2+}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (PUSKIN et al., 1976; RIGONI et al., 1980; ZOCCARATO e NICHOLLS, 1982). No presente trabalho (Fig. 19), a velocidade inicial do efluxo de Ca^{2+} nos experimentos controle foi de $23,4 \text{ nmoles Ca}^{2+}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, semelhante portanto, aos dados da literatura. Conforme pode ser observado nesta figura, a presença de amiodarona causa uma inibição dose dependente do efluxo de Ca^{2+} induzido por FCCP, na ausência de Na^+ . Este efeito apresentou-se de forma bifásica, mostrando uma acentuada tendência de inibição até à dose de $10 \mu\text{M}$ do fármaco antiarrítmico, tornando-se mais lenta para as concentrações subsequentes. Detectou-se uma inibição da velocidade inicial de efluxo de Ca^{2+} da ordem de 24 % para a concentração de amiodarona $10 \mu\text{M}$ e cerca de 36 % para a dose máxima utilizada.

Os experimentos cujos resultados estão descritos na figura 20, foram realizados na presença de Na^+ (succinato de sódio e fosfato de sódio), sendo o efluxo induzido pela adição de vermelho de rutênio.

A velocidade inicial do efluxo de Ca^{2+} no ensaio controle (Fig. 20) foi de 5,8 nmoles $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, resultado que está em concordância com os dados relatados por CARAFOLI e CROMPTON (1978), os quais relatam ser a velocidade do efluxo do Ca^{2+} ligada diretamente à concentração de Na^+ (cerca de 8 mM) presente no sistema, e em torno de $0,12 \text{ nmoles } \text{Ca}^{2+} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, a 25° C . Ainda segundo CARAFOLI (1974), em presença de vermelho de rutênio, o uso de 2 a 5 mM de Na^+ é suficiente para produzir uma liberação de Ca^{2+} mensurável em mitocôndrias de coração de rato.

Na figura 20, observa-se o efeito inibitório da amiodarona sobre esta modalidade de efluxo de Ca^{2+} , dependente de Na^+ . A dependência da dose é também observada chegando a ser cerca de 42 % para $30 \mu\text{M}$ do fármaco antiarrítmico.

Segundo CROMPTON et al. (1978) a velocidade de efluxo na ausência de Na^+ ($1 \text{ nmolCa}^{2+} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) é muito menor do que na presença de Na^+ ($4\text{-}18 \text{ nmoles } \text{Ca}^{2+} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Considerando que os valores encontrados para a situação controle em nmoles $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para o efluxo causado por vermelho de rutênio é de 5,8, e para o causado por FCCP é de 23,43, nota-se que a velocidade inicial do efluxo frente ao vermelho de rutênio é muito menor do que o induzido por FCCP, como o esperado de acordo com a velocidade máxima de transporte, mencionado por AKERMAN e NICHOLLS (1983).

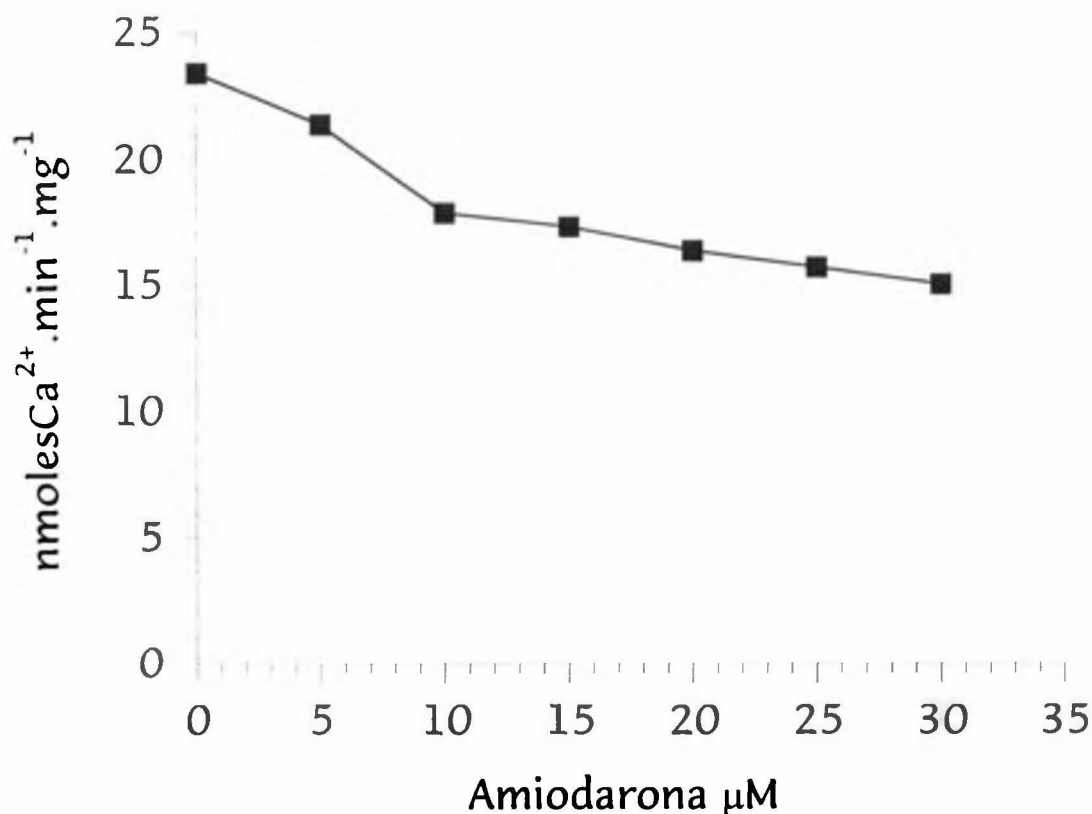


Figura 19. Efeito da amiodarona sobre a velocidade inicial do fluxo de Ca²⁺ em mitocôndrias de coração de rato, induzida por FCCP.

Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foram suspensas no meio de reação contendo: D-manitol 124 mM, HEPES 10 mM / KOH pH 7,2, KCl 65 mM, arsenazo III 31 µM, rotenona 5 µM, fosfato de potássio 1 mM, CaCl₂ 15 µM, em volume final de 3 mL. A captação de Ca²⁺ foi iniciada com a adição de succinato de potássio 4 mM. Após o influxo de Ca²⁺ e alcançada a condição de fluxo constante, foram adicionadas várias concentrações de amiodarona indicadas na figura as quais ficaram incubadas por 5 minutos. O efluxo de Ca²⁺ foi então evidenciado pela adição de FCCP 1 µM, em um volume final de 3 mL, a 30° C. Os resultados estão expressos em nmoles Ca²⁺ .min⁻¹ .mg⁻¹.

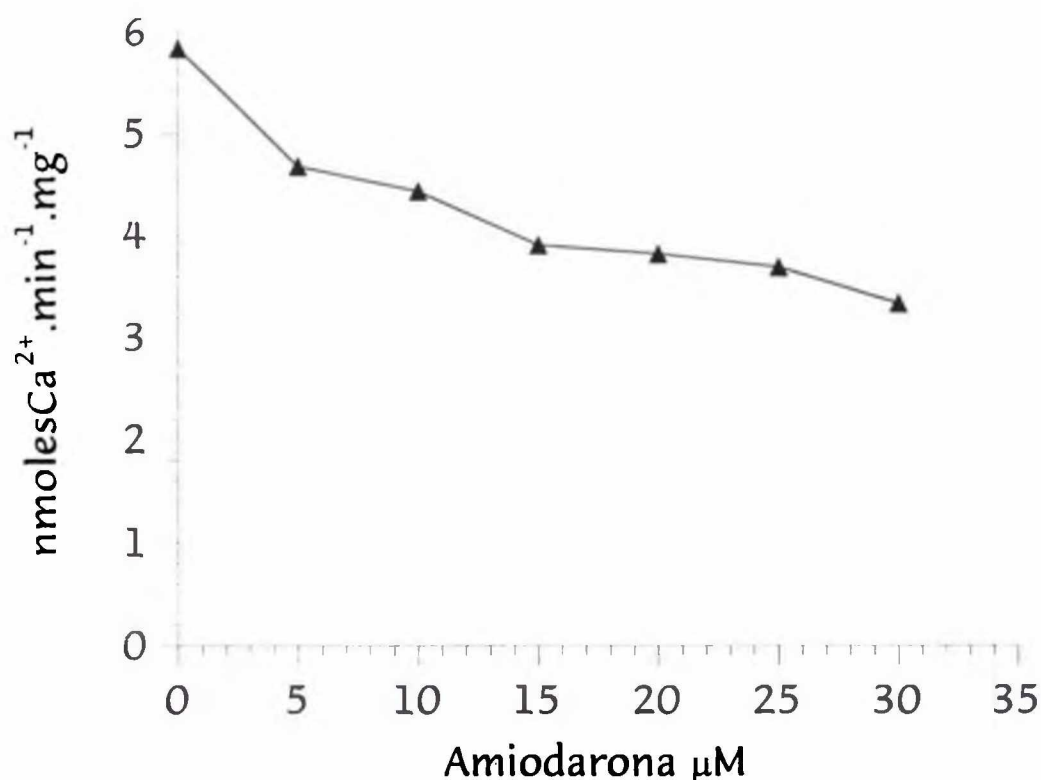


Figura 20. Efeito da amiodarona sobre a velocidade inicial do efluxo de Ca²⁺ em mitocôndrias de coração de rato, dependente de Na⁺.

Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foram suspensas no meio de reação contendo : D-manitol 125 mM, HEPES 10 mM / KOH pH 7,2, KCl 65 mM, arsenazo III 31 µM, rotenona 5 µM, fosfato de sódio 1 mM, CaCl₂ 15 µM. A captação de cálcio foi iniciada com succinato de sódio 4 mM. Após o completo influxo de Ca²⁺ e alcançada a condição de fluxo constante, foram adicionadas várias concentrações de amiodarona (5, 10, 15, 20, 25, 30 µM) as quais ficaram incubadas por 5 minutos. O efluxo de Ca²⁺ foi então evidenciado pela adição de vermelho de rutênio 2,5 µM, em um volume final de 3 mL, a 30° C. Os resultados estão expressos em nmoles Ca²⁺ .min⁻¹ .mg⁻¹.

Os efeitos da amiodarona, inibindo tanto o influxo de Ca^{2+} (50 %) quanto o efluxo dependente de Na^+ (35 %), permitem algumas especulações. A diminuição do influxo nas condições experimentais aqui descritas foi da ordem de 50 % para 15 μM de amiodarona enquanto que o decréscimo para o efluxo dependente de Na^+ foi de 35 %, para a mesma concentração do fármaco. Esta condição levaria à proposta de que os níveis intramitocondrias de Ca^{2+} pudessem estar diminuídos por ação da amiodarona. Em primeira instância, poder-se-ia supor que uma diminuição de tal magnitude no influxo de Ca^{2+} , poderia comprometer o rendimento da organela, quanto ao funcionamento das enzimas do ciclo do ácido cítrico, cuja atividade é modulada pelo íon o que, para um tecido como o coração, seria prejudicial.

Também são relevantes os estudos pioneiros de SCARPA e GRAZIOTTI (1973) que consideram uma média de 80 mg de proteína mitocondrial/g de coração, e que a quantidade total de Ca^{2+} trocado entre miofibrilas e sarcoplasma durante um batimento cardíaco é cerca de 25 nmol/g de tecido, observando-se então que mitocôndrias são requeridas para "transportar" cerca de 0,3 nmol $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$ (proteína).batimento⁻¹. Este simples cálculo mostra que uma fração marginal da capacidade total da mitocôndria em ligar Ca^{2+} seria utilizada durante o processo de contração-relaxamento (CARAFOLI, 1975). Correlacionando esta estimativa com os dados obtidos neste trabalho, os quais mostram que 15 μM de amiodarona inibe em cerca de 50 % a captação de Ca^{2+} e ao redor de 35 % o efluxo dependente de Na^+ , pode-se dizer que esta inibição seria significativa para alterar o ciclo mitocondrial de Ca^{2+} , levando a uma alteração da quantidade livre deste cátion citosólico disponível para as trocas entre miofibrilas e sarcoplasma durante o batimento cardíaco.

Por outro lado também poder-se-ia supor que as concentrações citosólicas extramitocondriais de Ca^{2+} , pudessem estar aumentadas pela ação da droga. No entanto para que tal ocorresse, a capacidade do retículo sarcoplasmático deveria ser superada. Neste aspecto são relevantes as informações de que esta organela é escassa no músculo cardíaco (FAUNBURG et al., 1964; GERGELY et al., 1965; WEBER, 1966).

1.5. Estudo dos efeitos da amiodarona sobre a transição de permeabilidade em membranas de mitocôndrias de coração de rato.

Compostos que interferem nos fluxos de Ca^{2+} , podem também interferir no fenômeno da transição de permeabilidade (GUNTER et al., 1994). No caso da amiodarona, seu efeito em inibir o influxo de Ca^{2+} , poderia estar relacionado com uma eventual proteção da transição de permeabilidade.

Estudos de ANTONENKO et al. (1991) mostraram que a amiodarona diminui a probabilidade da abertura do canal dependente de voltagem da membrana mitocondrial interna (MCC - canal de multicondutância), através de experimentos de "patch-clamp". Segundo ZORATTI e SZABÓ (1995), existem propriedades em comum entre o MCC e o PTP.

Portanto, com a finalidade de se avaliar o efeito do fármaco nas condições em que o fenômeno de transição de permeabilidade ocorre, estudos com amiodarona em presença de Ca^{2+} e de um agente indutor, o *t*-butilhidroperóxido, foram realizados (SIES, 1985; GUNTER e PFEIFFER, 1990). O *t*-butilhidroperóxido é reduzido pela glutatona peroxidase, levando a oxidação da glutatona reduzida (GSH), e conseqüentemente de NADPH e NADH; esta situação parece também produzir radicais *t*-butoxi e *t*-butilperóxido, os quais podem causar peroxidação de membranas lipídicas insaturadas (SIES, 1985).

A transição de permeabilidade pode ser convenientemente visualizada através da avaliação do inchamento mitocondrial (item III.2.4 em Materiais e Métodos). Na figura 21, o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e *t*-butilhidroperóxido (**a**), é comparado com o inchamento em presença de 15 μM de

amiodarona (**b**). Neste experimento utilizou-se como substrato oxidável o succinato. O resultado mostra que a amiodarona 15 μM diminui a velocidade e também a amplitude do "swelling" mitocondrial. O efeito da amiodarona é de menor magnitude que aquele aparente pelo uso de EGTA (**c**) que preveniu quase por completo o inchamento.

A figura 22 mostra resultados dos experimentos semelhantes realizados na presença de glutamato, como substrato oxidável. Observa-se o inchamento mitocondrial provocado por Ca^{2+} e *t*-butilhidroperóxido (**b**) e o efeito da amiodarona 15 μM (**c**) inibindo a amplitude total do inchamento em mitocôndria de coração de rato. Nesta concentração de amiodarona (15 μM), ocorre uma queda de 20 mV do potencial de membrana, assim como o influxo de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial, encontra-se inibido em aproximadamente 50 %, sugerindo que estes efeitos estejam relacionados.

Segundo FAGIAN et al. (1990) o aumento da permeabilidade da membrana em partículas submitocondriais de coração e mitoplastos de fígado incubados, em presença de Ca^{2+} e diamida está associado a formação de agregados proteicos devido as ligações cruzadas dos grupamentos tiólicos das proteínas; estes agregados de alto peso molecular, podem ser visualizados em eletroforese em gel de poliacrilamida.

Portanto, para verificar se os efeitos da amiodarona envolveriam tal possibilidade, preparações mitocondriais tratadas nas condições de transição de permeabilidade na presença e na ausência de amiodarona, foram submetidas a eletroforese nas condições descritas por FAGIAN et al. (1990), a fim de verificar a formação de agregados proteicos.

Os resultados de tais experimentos estão demonstrados na figura 23. Nesta figura observa-se na lane A que preparações de mitocôndrias de coração de rato incubadas com Ca^{2+} não leva a formação de agregados proteicos, ao contrário do que ocorre nas lanes B e I, onde a preparação foi incubada com Ca^{2+} em presença do indutor de transição de permeabilidade, o *t*-butilhidroperóxido. Estes dados controle estão de acordo e reproduzem aqueles descritos por FAGIAN et al. (1990) e CASTILHO et al.(1995).

A presença de amiodarona (30 e 50 μM) neste sistema não alterou a formação de agregados, conforme pode ser verificado nas lanes C e D. É provável que este resultado seja uma consequência do efeito sobre o $\Delta\psi$ observado quando concentrações de 30 e 50 μM de amiodarona são utilizadas.

Verifica-se ainda nesta figura que a adição de EGTA ao sistema não reverteu a formação dos agregados, quer na presença ou ausência da amiodarona (lanes E e F, respectivamente). Isto justifica-se pelo fato de que a transição de permeabilidade ocorre em presença de Ca^{2+} e *t*-butilhidroperóxido e não apenas com o Ca^{2+} isoladamente (lane A).

Os resultados mostrados nas lanes G e H, onde não se verifica a formação de agregados proteicos, foram obtidos pela adição de DTT ao sistema. O DTT tanto em presença de amiodarona (lane G) quanto na ausência do fármaco (lane H), impediu a formação de tais agregados, mostrando o envolvimento dos grupos -SH no processo, conforme anteriormente descrito por FAGIAN et al. (1990).

Os resultados aqui mostrados permitem algumas considerações. Pode-se propor inicialmente que baixas concentrações de amiodarona conferem uma proteção quanto ao inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e *t*-butilhidroperóxido

devido a inibição do influxo de Ca^{2+} . Adicionalmente nas concentrações maiores em que se verificou o colapso do $\Delta\psi$ pela amiodarona, os efeitos causados pelo fármaco são drásticos prevalecendo os danos causados pelo Ca^{2+} e *t*-butilhidroperóxido.

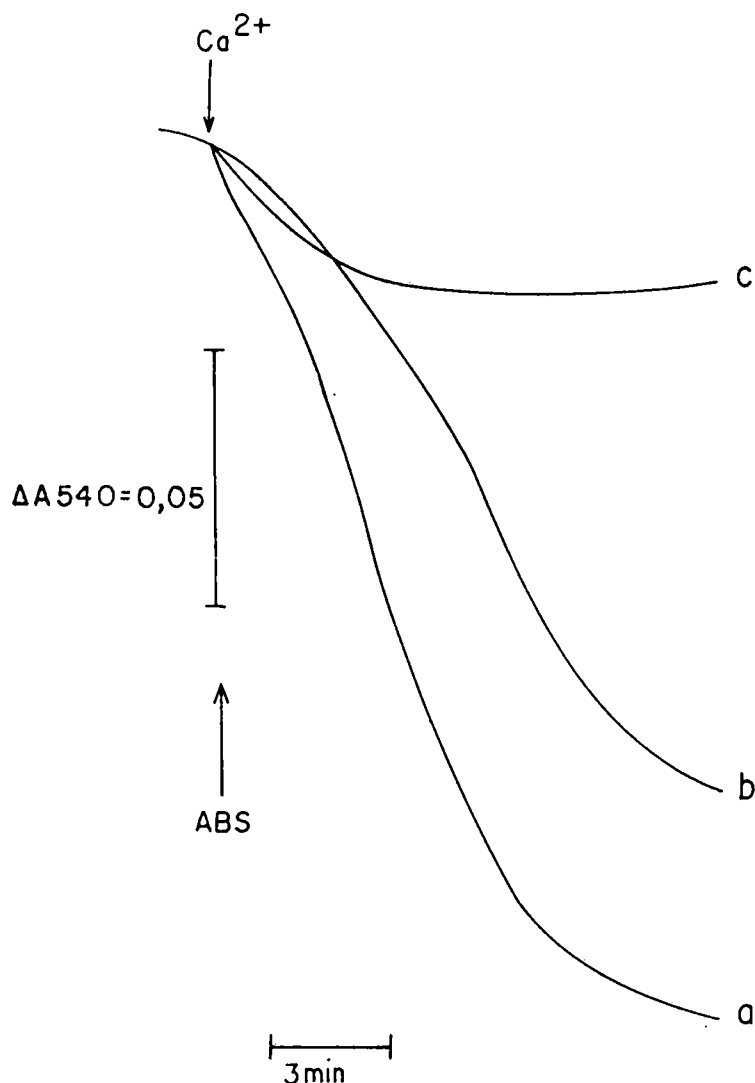


Figura 21. Efeitos da amiodarona sobre o inchamento mitocondrial pelo cálcio, energizado com succinato:

Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foram pré-incubadas por 5 minutos em uma solução contendo: D-manitol 125 mM, HEPES 10 mM / KOH pH 7,2, KCl 65 mM. Após a incubação, a solução foi suplementada com fosfato de sódio 1 mM, rotenona 5 μM , CaCl_2 45 μM , succinato de sódio 4 mM, em um volume final de 3 mL, a 30° C, em condições saturantes de oxigênio.

Em a. foi adicionado *t*-butilhidroperóxido 100 μM .

Em b. foi pré-incubado por 5 minutos 15 μM de amiodarona, e em seguida adicionado *t*-butilhidroperóxido 100 μM .

Em c. foi adicionado *t*-butilhidroperóxido 100 μM e EGTA 1 mM.

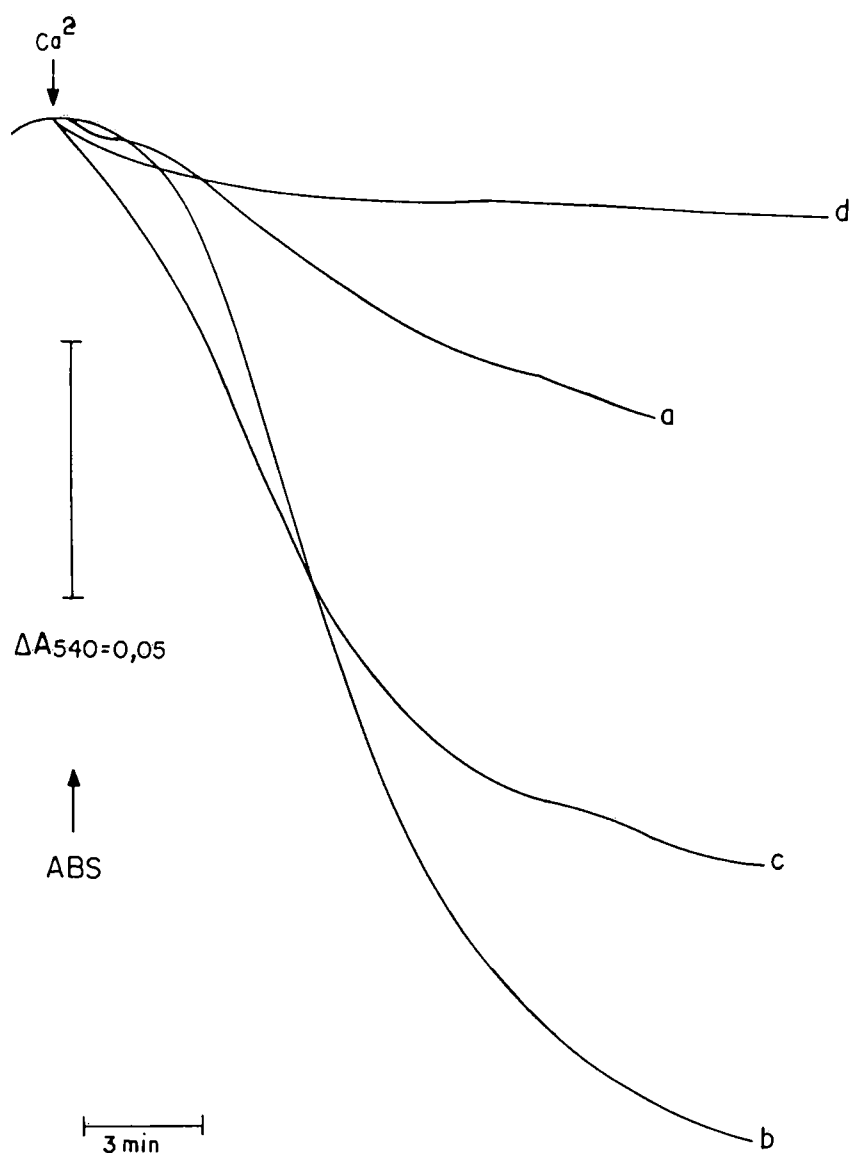


Figura 22. Efeito da amiodarona sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} , energizado com glutamato:

Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/mL) foram pré-incubadas por 5 minutos em uma solução contendo: D-manitol 125 mM, HEPES 10 mM / KOH pH 7,2, KCl 65 mM. Após a incubação, a solução foi suplementada com fosfato de sódio 1 mM, rotenona 5 μM , CaCl_2 30 μM , glutamato de sódio 20 mM, em um volume final de 3 mL, a 30° C (a), em condições saturantes de oxigênio.

Em b. foi adicionado *t*-butilhidroperóxido 100 μM .

Em c. foi pré-incubado por 5 minutos 15 μM de amiodarona, e em seguida adicionado *t*-butilhidroperóxido 100 μM .

Em d. foi adicionado *t*-butilhidroperóxido 100 μM e EGTA 1 mM.

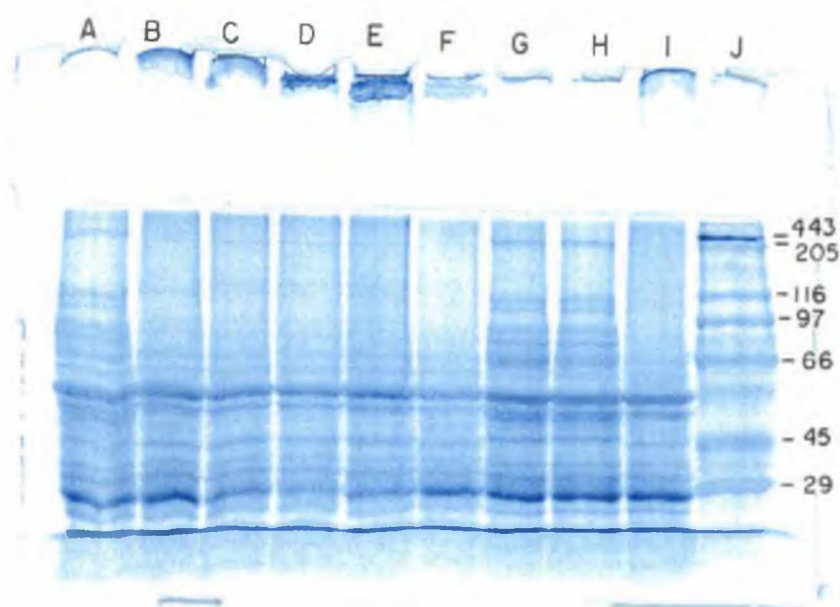


Figura 23. Eletroforese em gel poliacrilamida SDS de proteína de membrana de mitocôndria de coração de rato:

Em cada lane, amostras de 30 μg de proteínas mitocondriais foram aplicadas em gel de corrida com acrilamida 10 %, após 45 minutos de incubação a 30° C em presença de fosfato de sódio 1 mM, rotenona 5 μM , succinato de sódio 4 mM e:

Lane A: Ca^{2+} 500 μM ;

Lane B: Ca^{2+} 500 μM , *t*-butilhidroperóxido 500 μM ;

Lane C: Ca^{2+} 500 μM , *t*-butilhidroperóxido 500 μM , amiodarona 30 μM ;

Lane D: Ca^{2+} 500 μM , *t*-butilhidroperóxido 500 μM , amiodarona 50 μM ;

Lane E: Ca^{2+} 500 μM , *t*-butilhidroperóxido 500 μM , amiodarona 50 μM , EGTA 5 mM;

Lane F: Ca^{2+} 500 μM , *t*-butilhidroperóxido 500 μM , EGTA 5 mM;

Lane G: Ca^{2+} 500 μM , *t*-butilhidroperóxido 500 μM , amiodarona 50 μM , DTT 5 mM;

Lane H: Ca^{2+} 500 μM , *t*-butilhidroperóxido 500 μM , DTT 5 mM;

Lane I: Ca^{2+} 500 μM , *t*-butilhidroperóxido 500 μM ;

Lane J: padrão proteína.

**IV.2.EFEITOS DA AMIODARONA SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO EM
MEBRANAS ARTIFICIAIS E NATIVAS**

IV.2.Efeitos da Amiodarona sobre a Lipoperoxidação em Membranas Artificiais e Nativas

2.1.Estudo da Lipoperoxidação em Liposomas de Fosfatidilcolina de Soja (PC)

2.1.1. Justificativa para o uso do ácido *cis*-Parinárico como sonda da peroxidação lipídica em liposomas de fosfatidilcolina de soja

A ação das drogas sobre a lipoperoxidação de membranas pode ser comprovada através do uso do ácido *cis*-parinárico (PnA) (DINIS et al., 1993). O ácido *cis*-parinárico (ácido 9,11,13,15-octadecatetraenóico) (C 18:4) incorpora-se na membrana dispondo-se na bicamada paralelamente aos lipídeos, e é usado para sondar o estágio inicial da peroxidação de membranas lipídicas. Este composto tem grande coeficiente de partição em membranas e modelos de membranas, e em meio aquoso não emite fluorescência, porém, ao penetrar na membrana a fluorescência aumenta rapidamente. Quando no sistema há indutores de radicais livres, observa-se a oxidação da sonda, simulando o que se passa com os lipídeos de membrana. Esta oxidação conduz a uma extinção de fluorescência que pode ser seguida e avaliada espectrofluorimetricamente, de forma contínua e sensível. O ensaio experimental do PnA é investigado por meio de vários iniciadores da peroxidação. A degradação da sonda indica a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados intrínsecos.

Como sonda fluorescente de peroxidação lipídica, apenas tem sido utilizado o isômero *cis*, pois partilha quase igualmente entre as fases líquido-cristalina e de gel

dos fosfolipídeos, enquanto o isômero *trans* partilha preferencialmente na fase de gel, como revelam os estudos de transição de fase de lipídeos e de partilha (SKLAR et al., 1975, 1979). Devido à semelhança estrutural e conformacional do ácido *cis*-parinárico com os ácidos graxos normais das membranas biológicas, o PnA não induz perturbações na membrana, como ocorre com a maioria das outras sondas membranares; este método é de melhor sensibilidade quando comparado à dosagem de MDA pela técnica de TBARS, a qual está propensa a vários artefatos. Neste último método, muito frequentemente, a maioria do malonaldeído (MDA) não será formado durante o processo de peroxidação, mas durante a "quebra" dos peróxidos lipídicos na etapa de aquecimento-ácido, especialmente quando um metal catalítico está presente (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990). O método experimental que utiliza PnA foi empregado neste trabalho com a finalidade de avaliar se a amiodarona seria um agente protetor da lipoperoxidação, conforme sugerido pelos resultados de RIBEIRO et al. (1997), referentes à diminuição da produção de malonaldeído em mitocôndrias de fígado de rato.

As figuras 24 e 25 correspondem a padronização do método frente a liposomas de fosfatidilcolina de soja, os quais permitem uma análise do comportamento da sonda sem nenhuma interferência resultante da presença de proteínas, como ocorreria nas membranas celulares nativas.

A figura 24 representa os espectros de excitação (A) e emissão (B) do ácido *cis*-PnA na presença de liposomas de fosfatidilcolina de soja. Verifica-se que o espectro de emissão de fluorescência não é alterado pela presença da fosfatidilcolina de soja, porém a intensidade de fluorescência é fortemente diminuída na ausência destas membranas. No entanto, se os liposomas estão presentes na

solução, devido à partilha do ácido *cis*-PnA na fase membranar, a intensidade de fluorescência aumenta substancialmente (SKLAR et al., 1977 a).

A figura 25 A mostra a variação da intensidade de fluorescência em função da concentração do lipídeo dos liposomas do meio, evidenciando o grande aumento de fluorescência devido à partilha da sonda nas membranas. O perfil do gráfico, hiperbólico, evidencia um processo de saturação, isto é, acima de 140 μM de fosfatidilcolina de soja, a sonda está praticamente toda na fase membranar e a intensidade de fluorescência se mantém constante.

Por outro lado, a intensidade de fluorescência do ácido *cis*-PnA incorporado na membrana depende da sua concentração, como se conclui da análise da figura 25 B. Para baixas concentrações e até 2 μM , a intensidade de fluorescência aumenta linearmente com a concentração da sonda, e acima deste valor o aumento deixa de ser linear. Para valores superiores a 12 μM , a intensidade de fluorescência diminui devido a um efeito de auto-extinção das próprias moléculas ("inner filter effect" ou "self-quenching").

A partir dos resultados mostrados na figura 25 (A, B), estipulou-se as condições experimentais para a utilização do ácido *cis*-PnA como sonda de peroxidação em liposomas de fosfatidilcolina de soja, ou seja, uma concentração de membranas equivalente a 200 μM em fosfolipídeos e ácido *cis*-PnA 1,5 μM . Nestas condições, a concentração lipídica dos liposomas é suficientemente alta para evitar partilha significativa da sonda na fase aquosa (Fig.25 A) ao mesmo tempo em que se tem uma intensidade de fluorescência como uma função linear da sua concentração (Fig.25 B), e portanto, as extinções da fluorescência refletirão a degradação oxidativa da molécula. A diminuição da intensidade de fluorescência

durante o processo oxidativo traduz a alteração da estrutura da molécula e não uma simples redistribuição da sonda na fase membranar (KUYPERS et al., 1987), uma vez que há alteração no espectro de extinção do ácido *cis*-PnA, pois a extinção da fluorescência é acompanhada da diminuição de absorção da luz ultravioleta, indicando destruição da estrutura do polieno pelo processo peroxidativo.

As condições estabelecidas neste trabalho estão de acordo e reproduzem aqueles relatados por GONÇALVES et al. (1998) para lipídeos de fosfatidilcolina de soja.

2.1.2. A degradação oxidativa do ácido *cis*-parinárico na lipoperoxidação de fosfatidilcolina de soja induzida por Fe²⁺/ácido ascórbico.

A velocidade da oxidação do *cis*-PnA em liposomas de fosfatidilcolina de soja, traduzida pela velocidade de decréscimo da fluorescência, depende do sistema iniciador ou indutor e de sua concentração (VAN den BERG et al., 1988; DINIS et al., 1993). Neste trabalho utilizou-se como sistema indutor o complexo Fe²⁺/ácido ascórbico.

A figura 26 representa o resultado de um ensaio típico de degradação do *cis*-PnA induzida por Fe²⁺/ácido ascórbico nos liposomas multilamelares de fosfatidilcolina de soja. Assim, verifica-se que a adição de ácido ascórbico 10 µM aos liposomas, na ausência do íon metálico, não exerce qualquer efeito degradativo, coerente com o fato de o ácido ascórbico isoladamente, ser um agente redutor (antioxidante). No entanto, à medida que se adiciona Fe²⁺, em concentrações

crecentes, o efeito sobre a degradação oxidativa da sonda torna-se mais evidente, o que se traduz pela velocidade de diminuição de fluorescência do *cis*-PnA. Sendo assim, com uma concentração de ácido ascórbico de 10 μM e Fe^{2+} 10 μM , obtém-se uma ótima combinação da razão iniciador/cofator e portanto, uma situação ideal de padrão oxidativo da sonda, incorporada em liposomas multilamelares de fosfatidilcolina de soja. Estes dados estão condizentes com os dados da literatura descritos por DINIS et al. (1993), para membranas de retículo sarcoplasmático. Estes autores demonstraram que o sistema contendo Fe^{2+} /ácido ascórbico foi o mais eficiente frente a outros sistemas testados (peróxido de hidrogênio/ Cu^{2+} , hidroperóxido de cumeno/ Cu^{2+}), pois suas concentrações para desencadear a oxidação da sonda, são extremamente baixas e conduzem a altas velocidades de extinção de fluorescência.

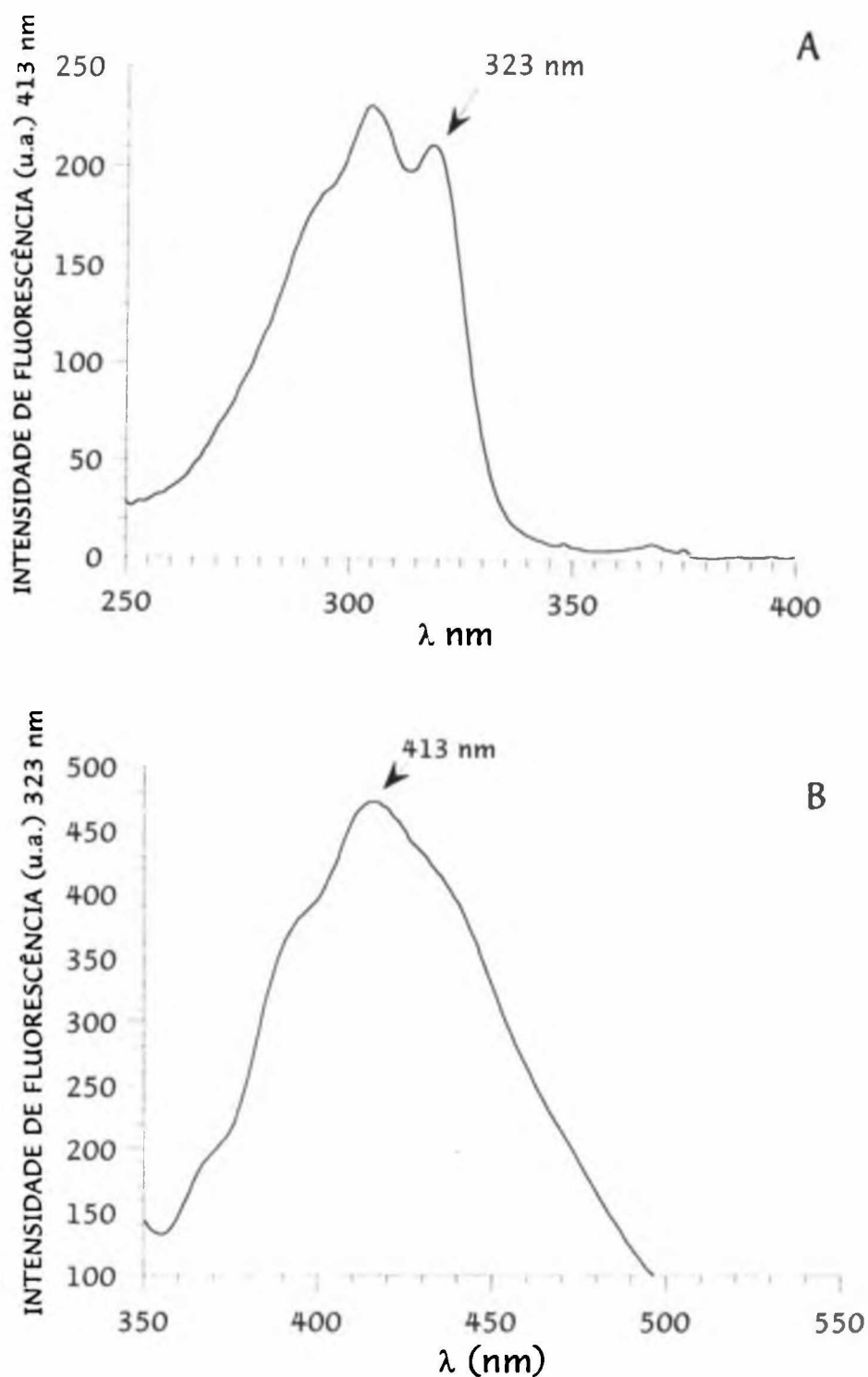


Figura.24 Espectro de fluorescência do ácido *cis*-parinário incorporado em liposomas de fosfatidilcolina de soja.

O *cis*-PnA (1,5 μ M) foi adicionado a 2 mL de meio contendo TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM e 200 μ M e liposomas de fosfatidilcolina de soja equivalente a um teor de fosfolípidos 200 μ M.

(A) espectro de excitação com emissão a 413 nm.

(B) espectro de emissão com excitação a 323 nm.

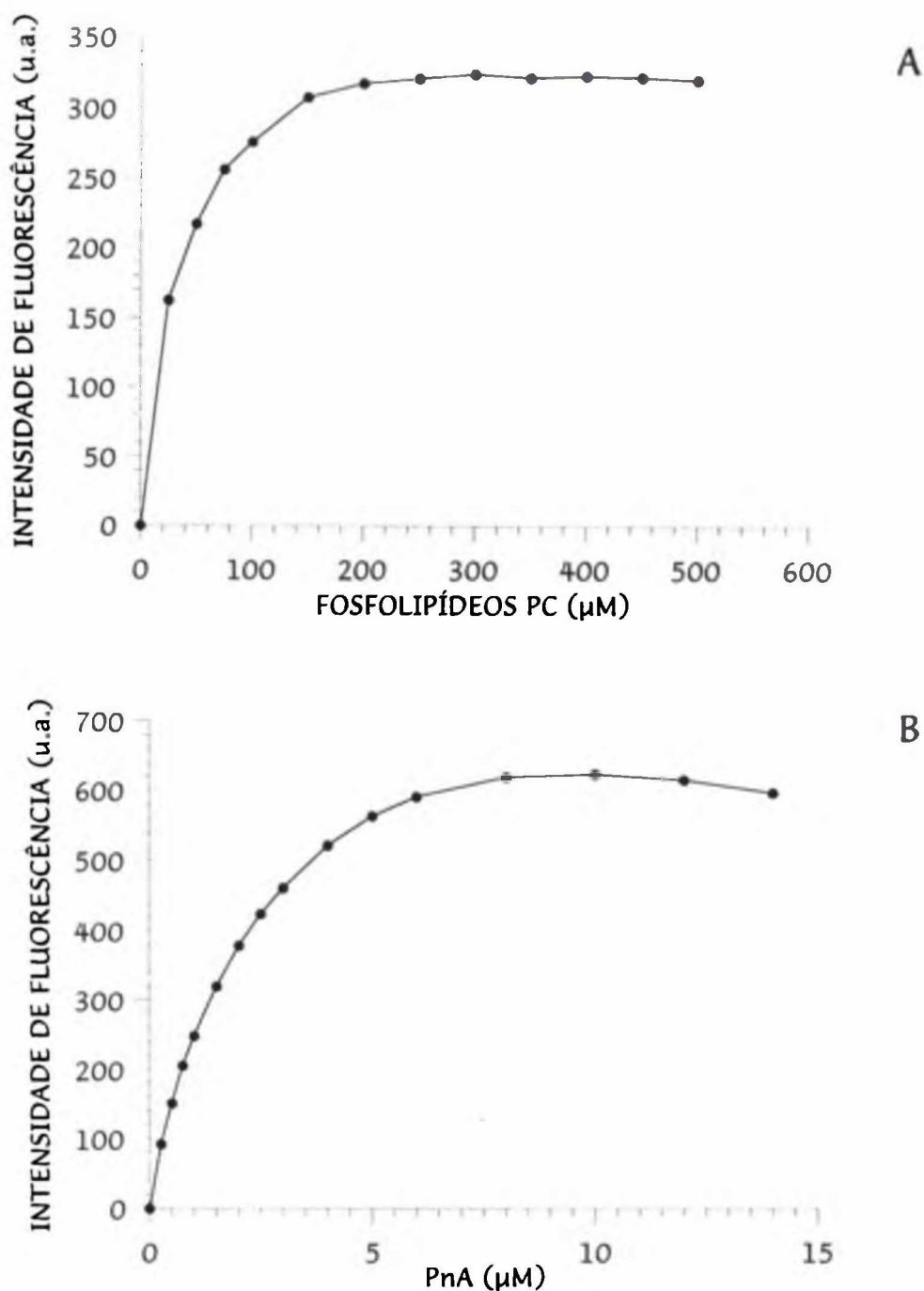


Figura.25 Intensidade de fluorescência do ácido *cis*-parinário incorporado em liposomas de fosfatidilcolina de soja a 25° C, em função das concentrações de fosfolipídeos (A) e de sonda (B).

Em (A), o *cis*-PnA (concentração final 1,5 μM) foi adicionado, sob agitação, a 2 mL de meio contendo TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM e quantidades variáveis de liposomas de PC de soja expressas em termos de teor de fosfolipídeos.

Em (B), quantidades variáveis de uma solução etanólica de *cis*-PnA foram adicionados a 2 mL do meio referido em (A) contendo liposomas equivalente a um teor de fosfolipídeos 200 μM . As intensidades de fluorescência relativas foram medidas 2 minutos após a adição da sonda.

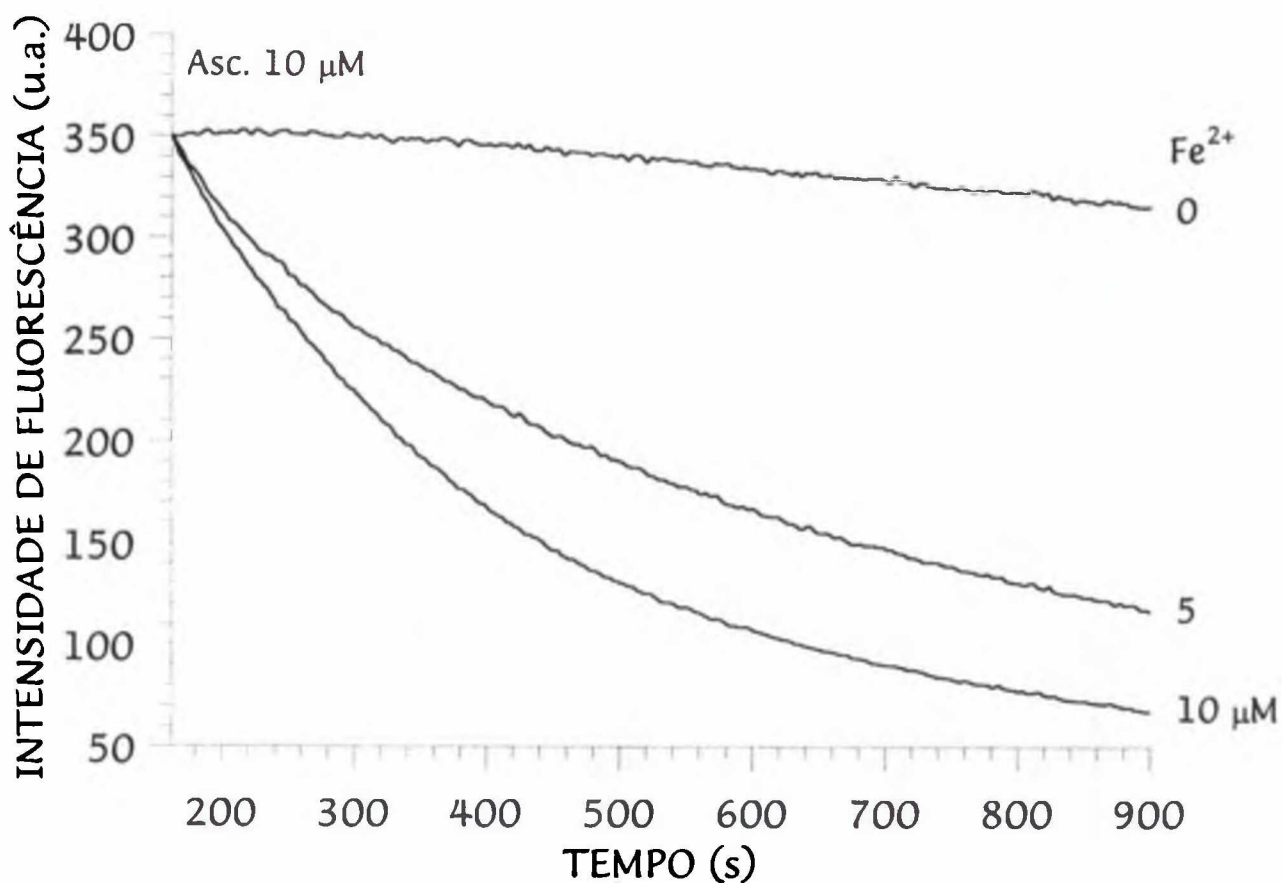


Figura.26 Degradação oxidativa típica do PnA, incorporado em liposomas de fosfatidilcolina de soja, induzida por Fe^{2+} /ácido ascórbico.

O *cis*-PnA foi injetado em 2 mL de liposomas multilamelares (200 μM fosfolipídeos) e a intensidade de fluorescência foi registrada ao longo do tempo. Após 2 minutos adicionou-se o ácido ascórbico (10 μM) na ausência e na presença de Fe^{2+} , e a reação transcorreu durante cerca de 15 minutos. A velocidade de degradação oxidativa do *cis*-PnA, avaliada pela velocidade de decréscimo de fluorescência, está representada em função da concentração de ácido ascórbico para diferentes concentrações de Fe^{2+} .

2.1.3. Peroxidação dos liposomas multilamelares de fosfatidilcolina de soja e efeitos da amiodarona

Alguns autores tem descrito que a amiodarona pode causar dano às membranas, via lipoperoxidação (RIBEIRO et al., 1997; REKKA et al., 1990). Considerando que tais dados são resultantes de avaliações pela técnica do TBARS, um estudo mais aprofundado tornou-se necessário, para se esclarecer esta questão.

Nesta etapa avaliou-se a ação da amiodarona no processo de lipoperoxidação em um modelo de membrana simples composta apenas por uma espécie lipídica, a fosfatidilcolina.

Nos experimentos mostrados na figura 27 a peroxidação de liposomas multilamelares de fosfatidilcolina de soja foi iniciada pela adição do sistema Fe^{2+} /ácido ascórbico (10 μ M/10 μ M). Observa-se que a adição de diferentes concentrações de amiodarona (2,5, 5 e 10 μ M), após 15 minutos do processo peroxidativo, não alterou significativamente o padrão oxidativo dos liposomas de PC de soja, em comparação com a lipoperoxidação controle (ausência de amiodarona). Mesmo na maior concentração usada de amiodarona (10 μ M), o efeito inibitório da lipoperoxidação não chega a 10 %. Contudo, considerando que este fármaco é muito lipofílico, incorporando-se preferencialmente no core da bicamada lipídica (ANTUNES/MADEIRA et al., 1995), poder-se-ia supor então, que a amiodarona não alcançando a região da fase aquosa da bicamada onde os segmentos lipídicos oxidados são gerados, teria a sua suposta ação antioxidante mascarada.

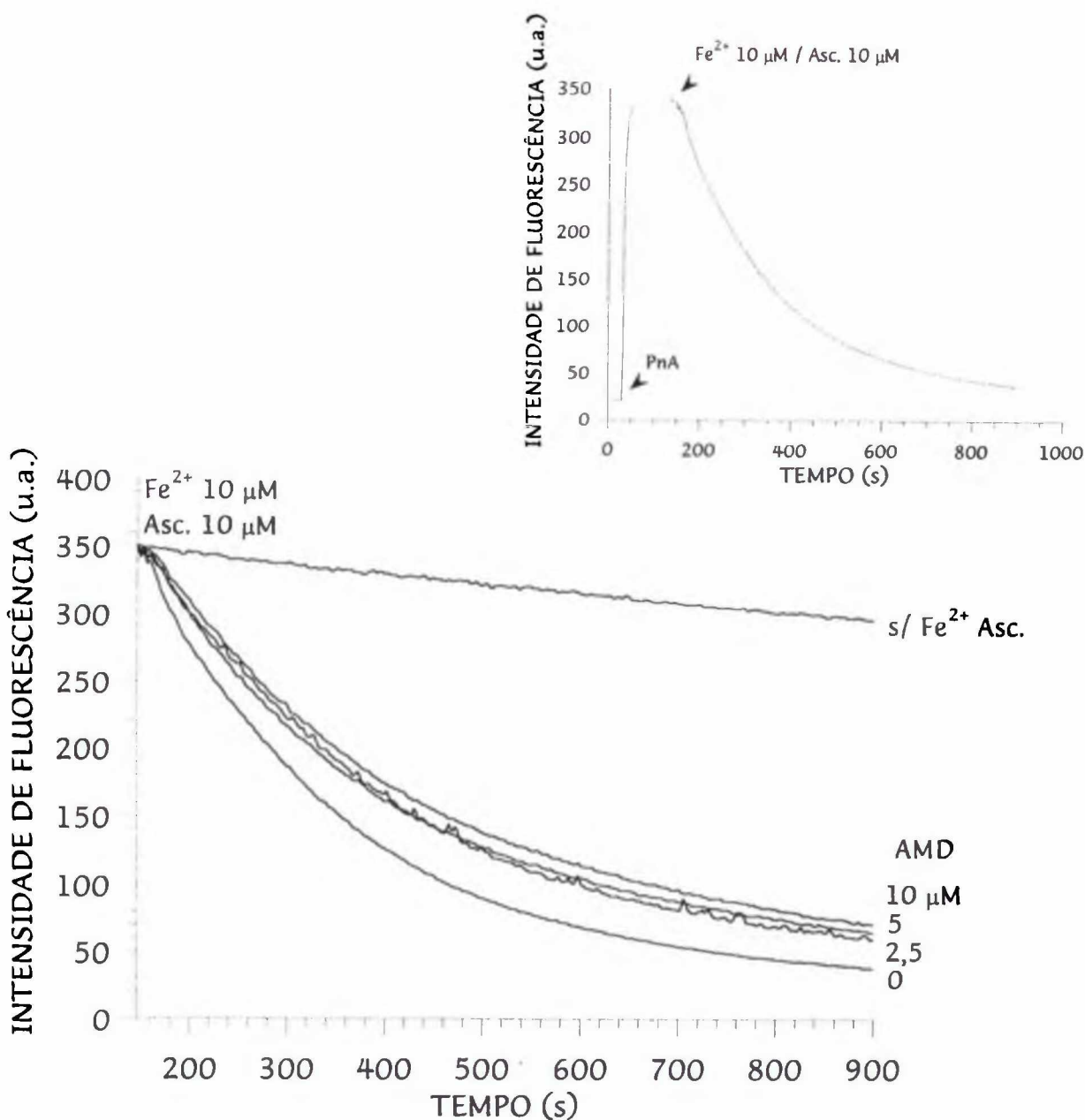


Figura.27 Efeitos da amiodarona sobre a degradação oxidativa do ácido *cis*-parinário, incorporado em liposomas multilamelares de PC de soja, induzida por Fe²⁺/ácido ascórbico

Diferentes concentrações de amiodarona (2,5, 5 e 10 µM) foram pré-incubadas durante 5 minutos na mistura de reação contendo *cis*-PnA 1,5 µM, liposomas multilamelares de PC de soja (200 µM fosfolipídeos) em Na₂HPO₄ 10 mM e NaCl 100 mM em pH 7,4. A peroxidação lipídica foi iniciada pela adição do sistema Fe²⁺/ácido ascórbico (10 µM/10 µM). O decréscimo de fluorescência em presença da amiodarona foi comparado com o experimento controle (ausência de amiodarona).

O gráfico inserido representa a degradação oxidativa do *cis*-PnA 1,5 µM, induzida pelo sistema Fe²⁺/ácido ascórbico (10 µM/10 µM) em liposomas multilamelares (200 µM fosfolipídeos). A intensidade de fluorescência foi registrada em função do tempo.

2.1.4. Interação da amiodarona com radicais peroxil em liposomas de fosfatidilcolina de soja

Uma das características de um sistema biológico é sua heterogeneidade. A relativa contribuição de vários antioxidantes depende da sua concentração local e do sítio de produção do radical, bem como das características dos radicais livres gerados. Esta reatividade pode ser determinada pelo uso de AAPH e AMVN como iniciadores de radicais em um sistema de membranas.

O composto AAPH hidrofílico é um iniciador de radicais que a 37° C, gera radicais peroxil na fase aquosa de membranas. A velocidade de decomposição do AAPH depende essencialmente da temperatura, mas também do solvente e do pH do meio, embora em menor escala. A 37° C e em meio aquoso a pH neutro, a vida média do AAPH é de cerca de 175 h, por esta razão a velocidade de formação de radicais é virtualmente constante para as primeiras horas após sua preparação (NIKI, 1990).

O composto AMVN lipofílico é um iniciador de radicais, que se localiza na região lipídica. Em presença de micelas ou membranas fosfolipídicas, quando exposto a temperaturas que variam entre 37 e 60° C, gera radicais, inicialmente na região lipídica, induzindo uma oxidação em cadeia e uma velocidade constante de captação de oxigênio é observada. Esta variação de temperatura é dependente da origem do material utilizado bem como de sua suscetibilidade à oxidação (NIKI, 1990). Portanto, estes azocompostos são ferramentas úteis para o estudo quantitativo dos danos induzidos por radicais livres em membranas biológicas e em moléculas relacionadas; e a inibição em sistemas modelos. A fim de se investigar

uma potencial atividade "scavenger" de radicais peroxil (ROO^{\bullet}) pela amiodarona, a lipoperoxidação foi induzida com radicais peroxil produzidos pela decomposição térmica de AAPH e AMVN.

O efeito do antiarrítmico sobre a lipoperoxidação desencadeada pelo AAPH, adicionado à fase aquosa dos liposomas de fosfatidilcolina de soja, foi determinado pela diminuição de fluorescência e em função do consumo de oxigênio.

A figura 28, apresenta o resultado dos experimentos acompanhados pela medida da diminuição de fluorescência. Nos experimentos controle verifica-se que a adição de AAPH 10 mM aos liposomas unilamelares de PC de soja, aumenta a velocidade do decréscimo de fluorescência em relação aos ensaios feitos na ausência de AAPH. Como esperado desta condição experimental, os radicais derivados do AAPH provocaram uma degradação oxidativa dos lipídeos dos liposomas com produção de radicais peroxil lipídicos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por GONÇALVES et al. (1998), os quais mostram a oxidação de liposomas de fosfatidilcolina de soja com AAPH 10 mM, e ainda harmonizam-se com os relatos de CUSTÓDIO et al. (1994) para a oxidação de membranas de retículo sarcoplasmático. Verificou-se ainda nesta figura que a incorporação de quantidades crescentes de amiodarona aos liposomas unilamelares de PC de soja não impede a oxidação da sonda fluorescente iniciada por AAPH, pois nenhuma das três concentrações usadas de amiodarona afeta o curso da oxidação, tanto em relação à velocidade inicial como em relação ao final do processo oxidativo. Portanto, apesar da presença de um grupo de amônio quaternário na molécula de amiodarona (Fig.1), esta droga não capta radicais gerados na fase aquosa pela

decomposição térmica de AAPH, não sendo capaz de prevenir a propagação da cadeia de peroxidação na bicamada.

A formação dos radicais peroxil a partir do AAPH na fase aquosa leva a uma oxidação significativa dos lipídeos membranares, pois os radicais peroxil provenientes da decomposição térmica do AAPH podem reagir com lipídeos retirando hidrogênio das cadeias poliinsaturadas, originando peróxidos lipídicos que propagam a reação oxidativa (NIKI, 1990). Este ataque aos lipídeos vesiculares é evidente quando se compara as velocidades de consumo de O₂ induzida pelo AAPH. Assim, com a finalidade de validar os resultados obtidos com os ensaios de fluorescência e também averiguar o comportamento neutro da amiodarona como anti ou pró-oxidante evidenciado nos resultados mostrados na figura 28, o curso da lipoperoxidação foi avaliado pela medida do consumo de oxigênio relacionado com a produção de peróxidos lipídicos induzidos por AAPH. Os resultados estão mostrados na figura 29. No experimento controle (Fig.29 A) nota-se que a presença de 10 mM de AAPH em liposomas unilamelares de PC de soja estimula significativamente a velocidade do consumo de oxigênio, quando comparado com a autodegradação lipídica (figura inserida em 29 A). O efeito é decorrente da formação na fase aquosa de radicais peroxil, os quais induzem uma reação em cadeia consumindo oxigênio. Pré-incubação de amiodarona neste sistema liposômico, antes da indução da oxidação, não modifica significativamente o perfil anterior, uma vez que neste tipo de determinação uma diminuição de cerca de 20 % para a concentração de 10 µM do fármaco não é expressiva. Resultado semelhante é obtido na figura 29 B, quando a amiodarona é adicionada 6 minutos após o início da peroxidação por AAPH.

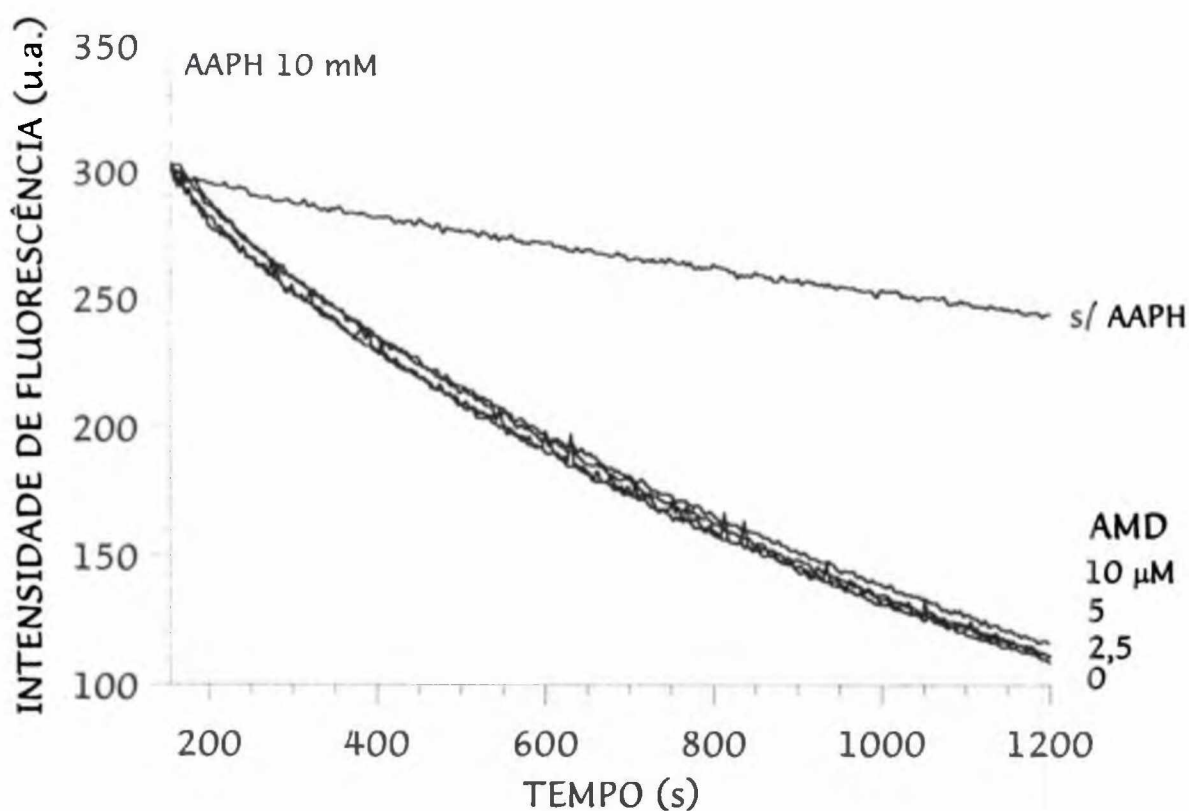


Figura.28 Efeito da amiodarona na lipoperoxidação induzida por radicais peroxil, gerados pela decomposição térmica de AAPH em liposomas de PC de soja, avaliado pelo "quenching" de fluorescência do *cis*-PnA

A amiodarona (2,5, 5 e 10 µM) foi pré-incubada por 5 minutos com liposomas unilamelares de fosfatidilcolina de soja contendo 200 µM de fosfolípido a 37° C, antes da incorporação do *cis*-PnA à suspensão lipídica. O *cis*-PnA 1,5 µM foi injetado em 2,0 mL da suspensão de liposomas e a degradação peroxidativa foi induzida por 10 mM de AAPH, a 37° C. A intensidade de fluorescência foi medida em função do tempo.

A ausência de efeitos significativos sobre a reação de lipoperoxidação em cadeia, iniciada na fase aquosa, poderia ser decorrente da localização do fármaco no core da bicamada lipídica (ANTUNES/MADEIRA et al., 1995), não alcançando eficientemente os radicais que foram gerados na fase aquosa. Sob este aspecto os resultados aqui descritos, seriam esperados.

Com a finalidade de avaliar se o efeito antioxidante deste fármaco, como provável captador de radicais peroxil no core da bicamada, a peroxidação lipídica foi induzida com radicais peroxil produzidos no interior de liposomas de PC de soja, pela decomposição térmica do azocomposto AMVN.

Considerando as dificuldades encontradas para incorporar o AMVN dentro de estruturas unilamelares, os estudos foram realizados em vesículas multilamelares.

O AMVN incorporado em liposomas de PC de soja promove a degradação oxidativa do *cis*-PnA, avaliada pelo decréscimo da sua intensidade de fluorescência. Nos experimentos cujos resultados estão mostrados na figura 30, a incorporação de amiodarona por pré-incubação com a preparação de liposomas durante 5 minutos, antes da adição de PnA, não tem efeito antioxidante, embora nos tempos finais do experimento um discreto, porém, reproduzível efeito se torne evidente na concentração de amiodarona 10 μ M. Estes dados sugerem que a amiodarona não capta radicais peroxil na região lipofílica, bem como é incapaz de induzir um claro período de inibição oxidativa.

A neutralidade dos efeitos da amiodarona são observados também quando o experimento é acompanhado por consumo de O₂ (Fig.31). O pequeno efeito observado neste caso parece não ser dependente da dose do fármaco, sugerindo que sua simples presença na bicamada lipídica é suficiente para causar uma

pequena alteração no padrão oxidativo dos liposomas de PC de soja, quando comparado com o ensaio controle. Tal possibilidade é baseada no fato de que a amiodarona quando incorporada em membranas causa uma desorganização generalizada da estrutura conformacional dos lipídeos constituintes (ANTUNES/MADEIRA et al., 1995).

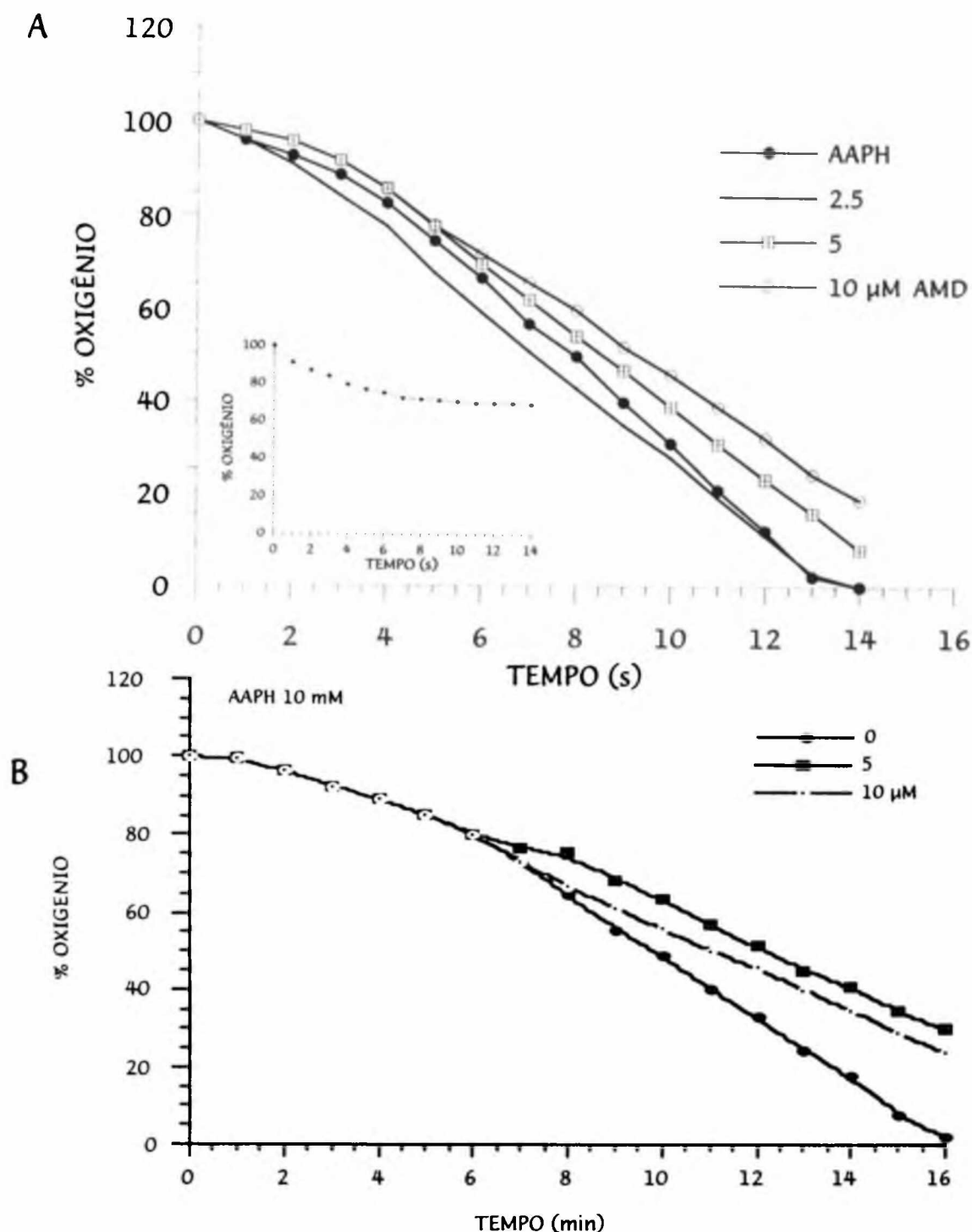


Figura.29 Efeito da amiodarona sobre a lipoperoxidação induzida por radicais peroxil gerados pela decomposição térmica de AAPH em liposomas de fosfatidilcolina de soja, medida pelo consumo de oxigênio.

(A) % Consumo de oxigênio durante a oxidação de liposomas unilamelares de PC de soja (800 µM fosfolípidos), induzida por AAPH (10 mM) a 37° C, adicionado no tempo zero à suspensão lipídica, ausência ou presença de concentrações crescentes de amiodarona (2,5, 5 e 10 µM), em um meio de reação contendo Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 100 mM em pH 7,4, com volume final de 1 mL. A amiodarona foi pré-incubada por 5 minutos junto com a suspensão de lípidos.

A figura inserida em (A) representa as velocidades do consumo de oxigênio durante a autoxidação dos liposomas de PC de soja.

(B) A amiodarona (5 e 10 µM) adicionada 6 minutos após o início da lipoperoxidação, nas mesmas condições que em (A).

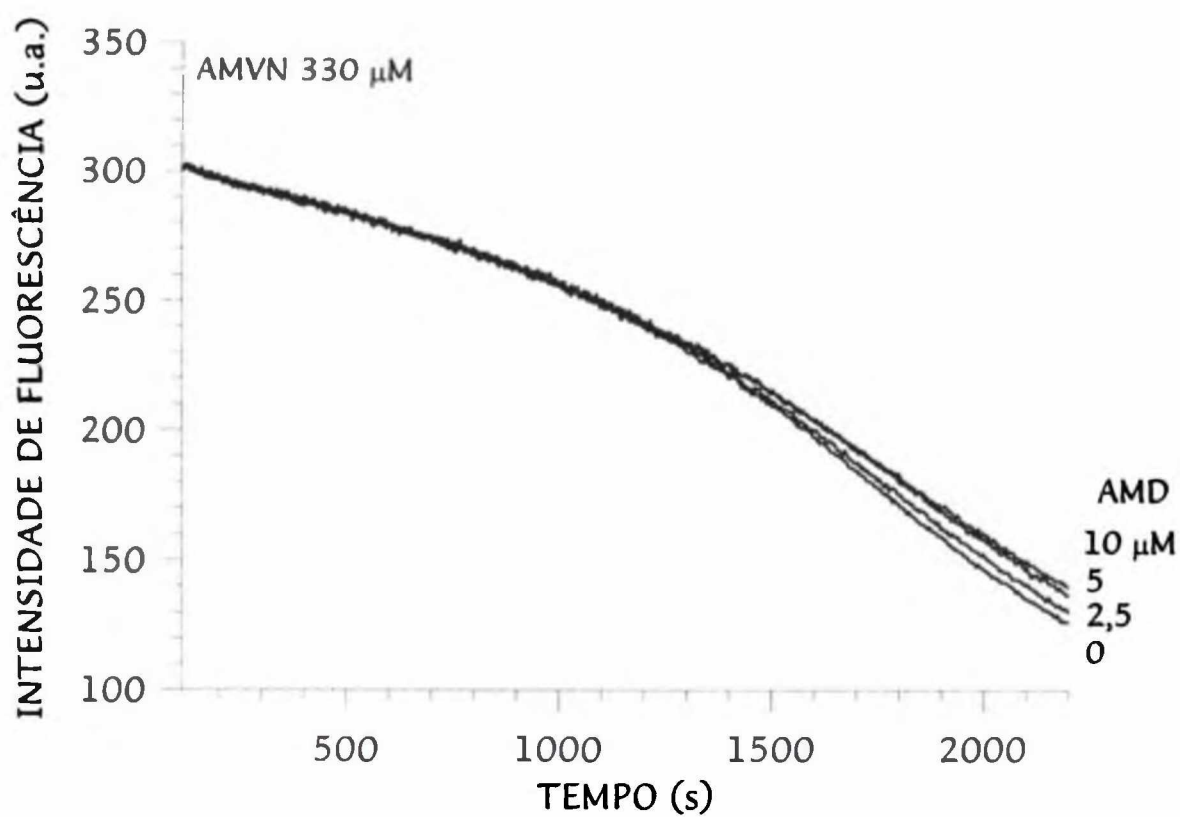


Figura.30 Efeito da amiodarona na degradação oxidativa do *cis*-PnA (7,5 μM) iniciada por AMVN (330 μM) incorporado em liposomas multilamelares de PC de soja (800 μM fosfolipídeos) a 56° C, em um meio de reação contendo Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 100 mM em pH 7,4, em um volume final de 2 mL. A amiodarona (2,5, 5 e 10 μM) foi adicionada ao sistema antes da incorporação do PnA.

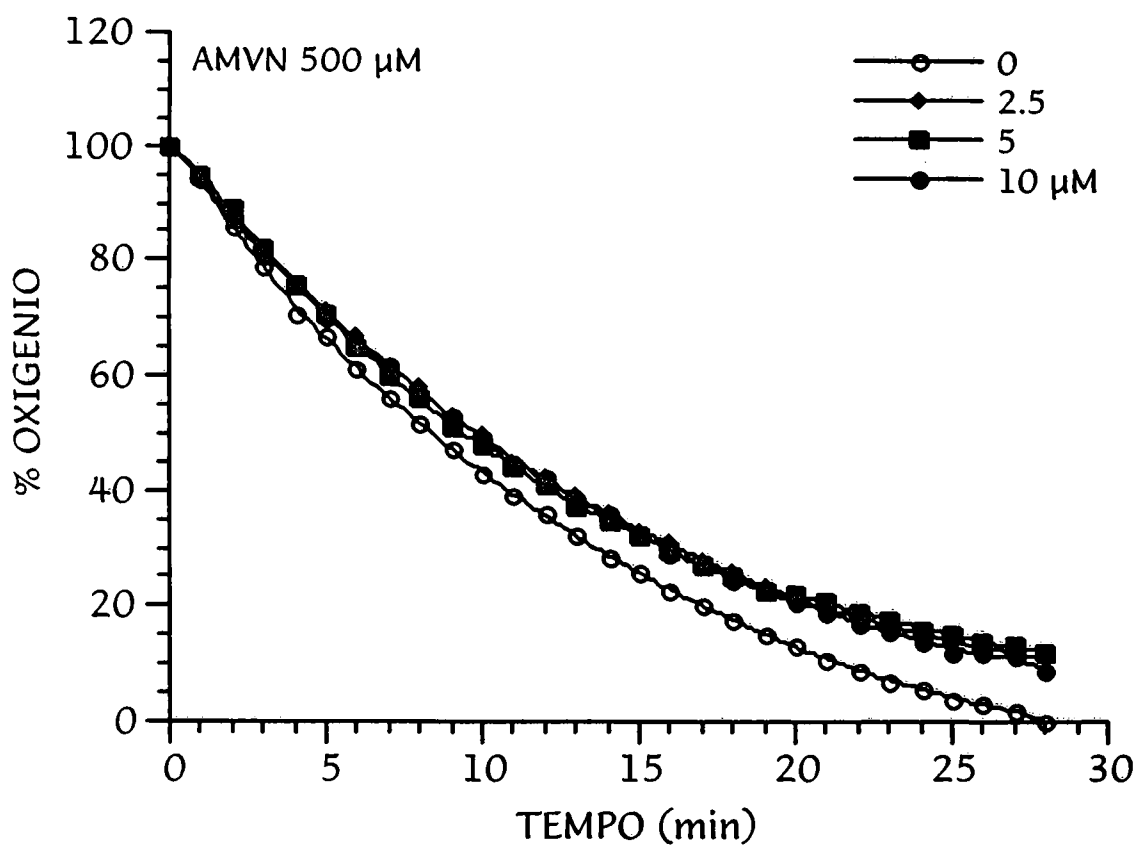


Figura.31 Efeito da amiodarona na velocidade de propagação da peroxidação de liposomas multilamelares de PC de soja (800 μM), em tampão fosfato (Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 100 mM em pH 7,4), induzido por AMVN (330 μM) incorporado em liposomas, em um volume final de 1 mL, a 56° C. A amiodarona (2,5, 5 e 10 μM) foi adicionada no início da oxidação.

Os hidroperóxidos dos dienos conjugados são os primeiros produtos da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (PORTER, 1984) e a sua quantificação, através da medida da absorbância no UV a 242 e 233 nm dos extratos lipídicos, absorvem estruturas isoméricas *cis:trans* (*c, t*) e *trans:trans* (*t, t*), respectivamente (Fig.32 - figura inserida) (PRYOR e CASTLE, 1984; CORONGIU et al., 1986). Esta metodologia está bem estabelecida para detectar a peroxidação lipídica, e a medida da absorbância a 233 nm tem sido usada extensivamente por muitos autores, em lipídeos extraídos de vários sistemas biológicos para acompanhar a lipoperoxidação. Este método tem demonstrado eficiência em eliminar artifícios e interpretações equivocadas, que possam ocorrer durante ensaios com outras metodologias (ESTERBAUER et al., 1989; PALOZZA e KRINSKY, 1991; LARANJINHA et al., 1992; DINIS et al., 1993; GONÇALVES et al., 1998).

No entanto, no comprimento de onda de 233 nm não ocorre a formação de um pico de absorção característico dos dienos, mas sim um alongamento do pico de absorção dos ácidos graxos poliinsaturados (Figura 10 - Materiais e Métodos). Por esta razão o método pode ser significativamente melhorado recorrendo-se a segunda derivada da espectroscopia, como proposto por CORONGIU et al. (1983), possibilitando assim, obter uma informação quantitativa da formação dos dienos nas amostras de fosfatidilcolina de soja, obtidas em tempos diferentes da peroxidação lipídica. A figura 32 mostra a formação dos dienos em solução lipídica de fosfatidilcolina de soja sujeita a peroxidação lipídica, ao longo do tempo, avaliada pela altura do pico negativo da segunda derivada espectral obtidas a 233 nm, em hexano a 37° C. A produção dos dienos foi avaliada a cada 5 minutos até um tempo final de 30 minutos, quando sua velocidade de formação parece diminuir chegando a

um platô. A figura 32 representa ainda o efeito de duas concentrações de amiodarona (2,5 e 5 μM) na formação dos dienos conjugados. A produção dos mesmos com AMVN 2 mM, não é alterada quando em presença de amiodarona 2,5 μM . Porém, com a concentração 5 μM observa-se uma pequena diminuição na oxidação, quando comparada com o controle, que parece ser dependente do tempo.

É importante salientar que os dienos conjugados são os primeiros produtos, formados após o início da sequência oxidativa; deste modo estes resultados podem ser perfeitamente correlacionados com os outros ensaios cinéticos já descritos para fosfatidilcolina de soja.

Embora exista uma tendência à inibição quanto a formação de dienos, esta não parece ser importante, confirmando os resultados anteriores com *cis*-PnA e consumo de O_2 .

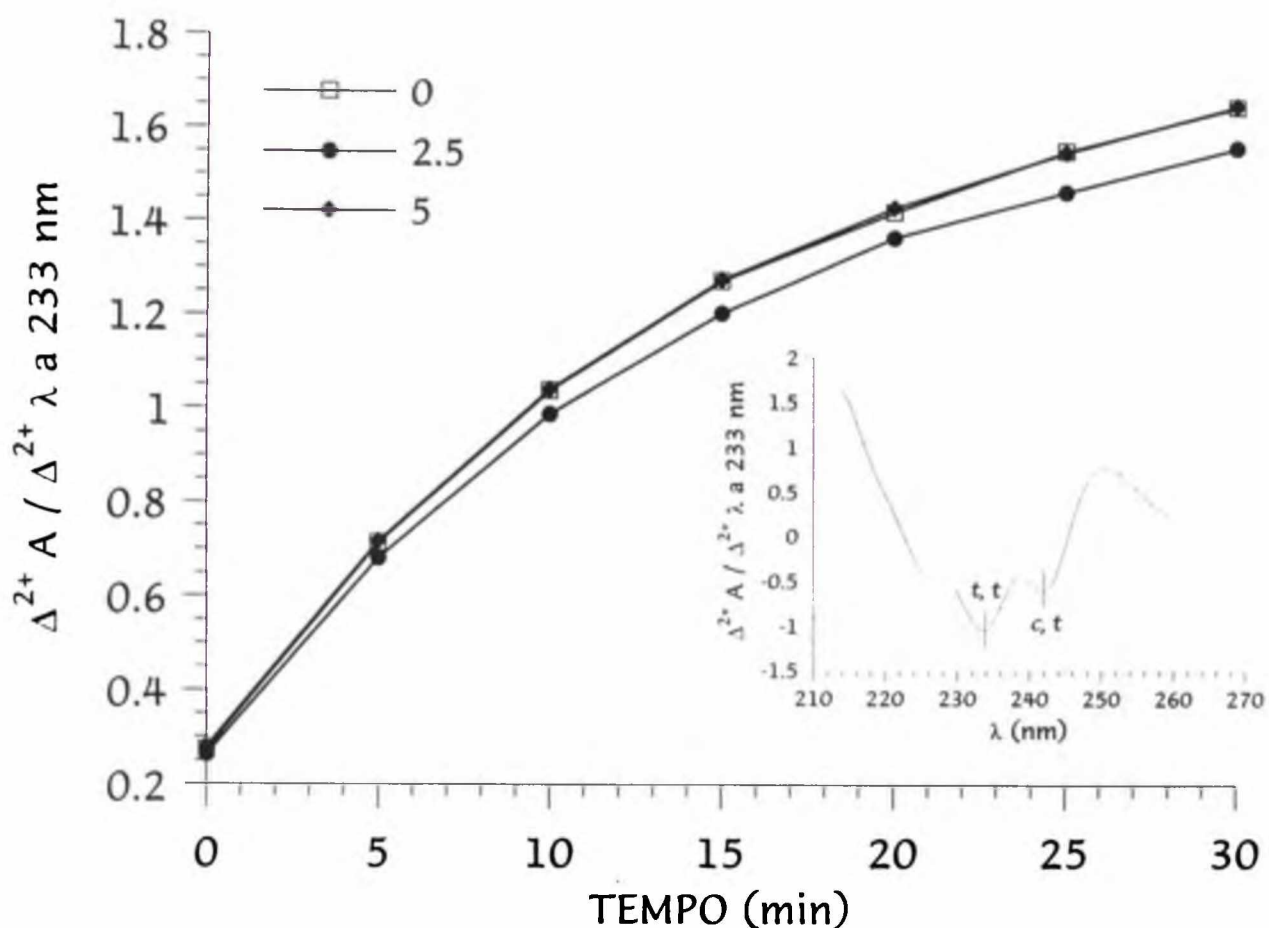


Figura. 32 A formação dos dienos conjugados seguindo a oxidação induzida por AMVN de PC de soja

170 μg de lipídeos de PC de soja foram suspensos em 2 mL de hexano, e a oxidação foi iniciada pela adição de AMVN 2 mM em solução de acetonitrilo, e esta mistura foi incubada a 37° C por vários períodos de tempo. A amiodarona (2,5 e 5 μM) foi suspensa em acetonitrilo e foi pré-incubada por 5 minutos com a solução de lipídeos de PC de soja antes da adição de AMVN. A formação dos dienos conjugados está expressa em unidades arbitrárias de acordo com a altura do pico negativo da segunda derivada do espectro de absorção de PC de soja sujeita a peroxidação induzida.

A figura inserida representa dois isômeros: *trans-trans* (t, t) e *cis-trans* (c, t), expressos em unidades arbitrárias como a altura do pico negativo das segundas derivadas de espectro em 233 e 242 nm.

2.2. Estudo da Lipoperoxidação em Liposomas de Lipídeos Mitocondriais

Considerando a substancial diferença entre os liposomas obtidos artificialmente com fosfatidilcolina de soja e aqueles de lipídeos de membranas mitocondriais nativas, seria importante avaliar também os efeitos da amiodarona em sistemas obtidos a partir de lipídeos mitocondriais. Para tanto utilizou-se como modelo, preparações constituídas de lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi.

2.2.1. Classes Fosfolipídicas dos Lipídeos Mitocondriais de Coração de Boi

As classes de lipídeos identificados a partir de amostras lipídicas extraídas de mitocôndrias de coração de boi estão em concordância com ROUSER e FLEISCHER (1965) (Tabela III), os quais relatam que as principais classes de fosfolipídeos são a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipina.

A membrana interna da mitocôndria é a única membrana de organelas de mamíferos que contém cardiolipina como um dos principais componentes lipídicos (DAUM, 1985). Uma das principais funções deste fosfolipídeo é manter a estrutura da bicamada lipídica (CULLIS et al., 1980). A presença deste tipo de fosfolipídeos em quantidades significativas (16 %) pode originar uma preparação não homogênea de liposomas. Para solucionar esta questão foi determinado empiricamente que o pH ótimo para a preparação dos liposomas de lipídeos mitocondriais é 8,5. Isto evita a formação de agregados como consequência da presença de cardiolipina insaturada

misturada com fosfatidilcolina (WELTI e GLASER, 1994), produzindo uma preparação homogênea. A tentativa de preparar liposomas em pH 7 e 7,5 não tiveram sucesso, independente da composição do tampão de dispersão.

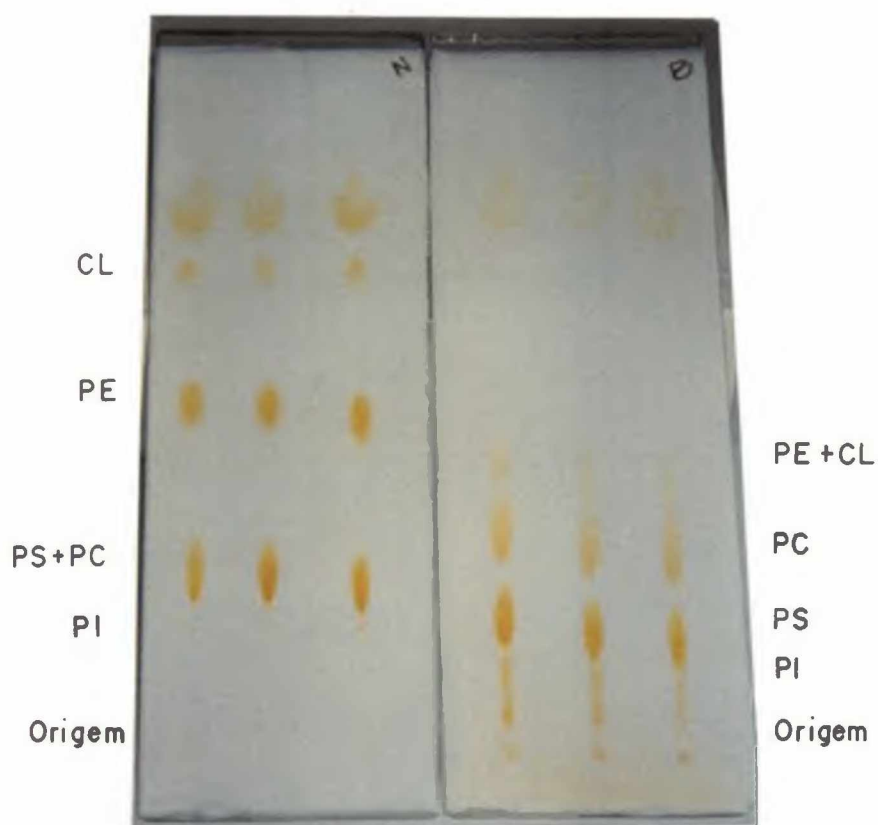


Figura. 33 Classificação dos lipídeos de mitocôndrias de coração de boi

Os lipídeos mitocondriais foram submetidos a TLC, em meio neutro e básico, como está descrito em Materiais e Métodos (item 2.6). CL (cardiolipina); PE (fosfatidiletanolamina); PS (fosfatidilserina); PC (fosfatidilcolina); PI (fosfatidilinositol).

Tabela III . Classes dos fosfolipídeos de mitocôndria de coração de boi.

Ácidos graxos	%
Origem	1.55 ± 0.39
Fosfatidilinositol	3.18 ± 0.39
Fosfatidilserina	4.97 ± 0.68
Fosfatidilcolina	38.29 ± 0.81
Fosfatidiletanolamina	36.17 ± 0.71
Cardiolipina	16.27 ± 0.55

Os valores são médias aritméticas ± SD de determinações em triplicata

2.2.2. O Ácido *cis*-Parinárico na sondagem da peroxidação lipídica em liposomas de lipídeos mitocondriais

2.2.2.1. Otimização das condições do ensaio

As características da partição da sonda fluorescente (PnA) incorporada em liposomas multilamelares de lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi foram avaliadas através das curvas de concentração PnA/fosfolipídeos. A figura 34 resume um experimento típico mostrando a relação entre o sinal de intensidade de fluorescência e a concentração dos lipídeos mitocondriais (Fig.34 A) e o *cis*-PnA (Fig.34 B) na suspensão liposômica.

A intensidade do sinal de fluorescência da sonda, depende fortemente do meio. Quando a sonda é adicionada a um meio polar sem membranas (Fig.34 A), o sinal é pequeno; a partição da sonda dentro dos liposomas é acompanhada por um grande aumento da intensidade de fluorescência, que é dependente da concentração dos lipídeos mitocondriais no meio de reação atingindo a saturação acima de 200 μM de lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi.

Nos liposomas, o sinal fluorescente do ácido *cis*-parinárico depende também da concentração da sonda. Em baixas concentrações de PnA até 3 μM (Fig.34 B), a intensidade de fluorescência aumenta linearmente com a concentração adicionada da sonda, e se aproxima da saturação em concentrações próximas a 8 μM . O decréscimo do sinal acima deste valor é certamente uma consequência do aumento

das concentrações de *cis*-PnA, e portanto, as partículas absorvem a emissão uma das outras ("self-quenching" ou "inner filter effect").

Como Van den BERG et al. (1988) mostraram previamente para membranas de eritrócitos, bem como DINIS et al. (1993) para retículo sarcoplasmático, as condições experimentais no ensaio do *cis*-PnA, em liposomas de lipídeos mitocondrias, foram de 200 μ M em fosfolipídeos e 1,5 μ M de *cis*-PnA, de modo que a intensidade de fluorescência da sonda esteja em função linear da sua concentração (Fig.34 B) e a concentração dos liposomas seja alta o suficiente para evitar uma partição significativa da sonda na fase aquosa (Fig.34 A). Sob estas condições, a velocidade da intensidade de fluorescência diminui em função da velocidade de sua degradação oxidativa.

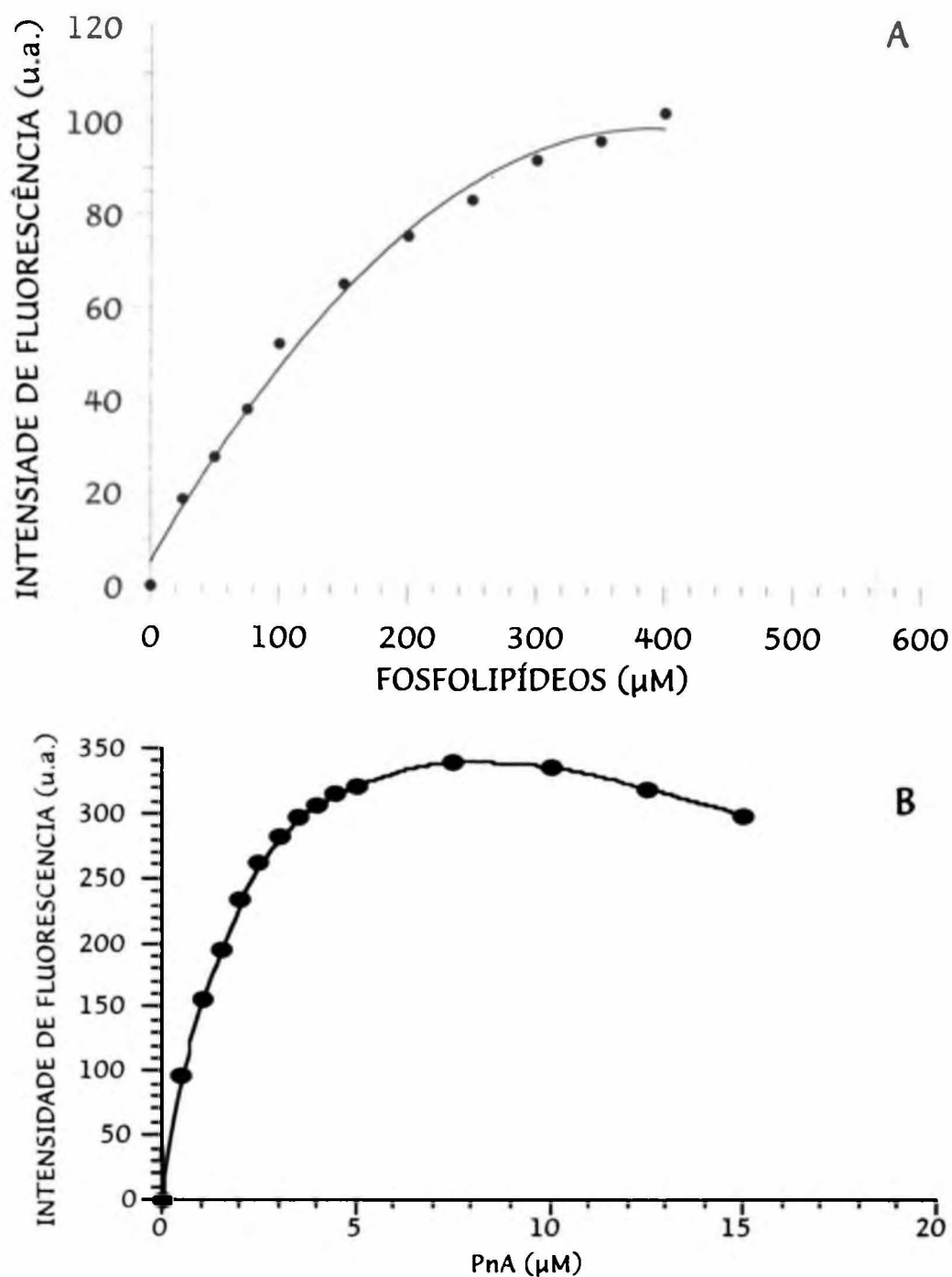


Figura.34 Intensidade de fluorescência do ácido *cis*-parinário em liposomas multilamelares de lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi, em função das concentrações dos fosfolipídeos e da sonda.

(A) Ácido *cis*-parinário (1,5 μM) em 2 mL de tampão (HEPES 10mM, NaCl 50 mM em pH 8,5) contendo quantidades diferentes de liposomas de lipídeos mitocondriais representado em termos de conteúdo fosfolipídico.

(B) A preparação de liposomas, equivalente a 200 μM de fosfolipídeos, em 2 mL do tampão e diferentes concentrações do ácido *cis*-parinário, adicionado por injeção a partir de uma solução etanólica.

2.2.2.2. Degradação oxidativa do ácido *cis*-parinárico de lipídeos mitocondriais de coração de boi, dependente do sistema indutor.

Como já foi relatado para liposomas de fosfatidilcolina de soja, a velocidade da degradação peroxidativa do *cis*-PnA em liposomas de lipídeos mitocondriais (velocidade de decréscimo da fluorescência) também depende de uma razão combinada entre as concentrações de iniciador/cofator.

A figura 35 representa o efeito do sistema Fe^{2+} /ácido ascórbico como indutor da lipoperoxidação. A adição de diferentes concentrações de Fe^{2+} em um sistema contendo ácido ascórbico 20 μM aumenta a degradação do *cis*-PnA, quando comparado com a autodegradação da sonda, na ausência de Fe^{2+} , que pode ser melhor observada na figura inserida (Fig.35). À medida que a concentração do íon cofator aumenta, o efeito do indutor é intensificado. Com isto, acertou-se as condições ótimas da razão Fe^{2+} /ácido ascórbico, para 50 μM e 20 μM , respectivamente. A maior concentração de Fe^{2+} utilizada na figura 35 (75 μM) foi descartada nos experimentos seguintes, pelo fato de que produzir uma velocidade inicial muito rápida, o que não seria ideal para este tipo de experimento de cinética.

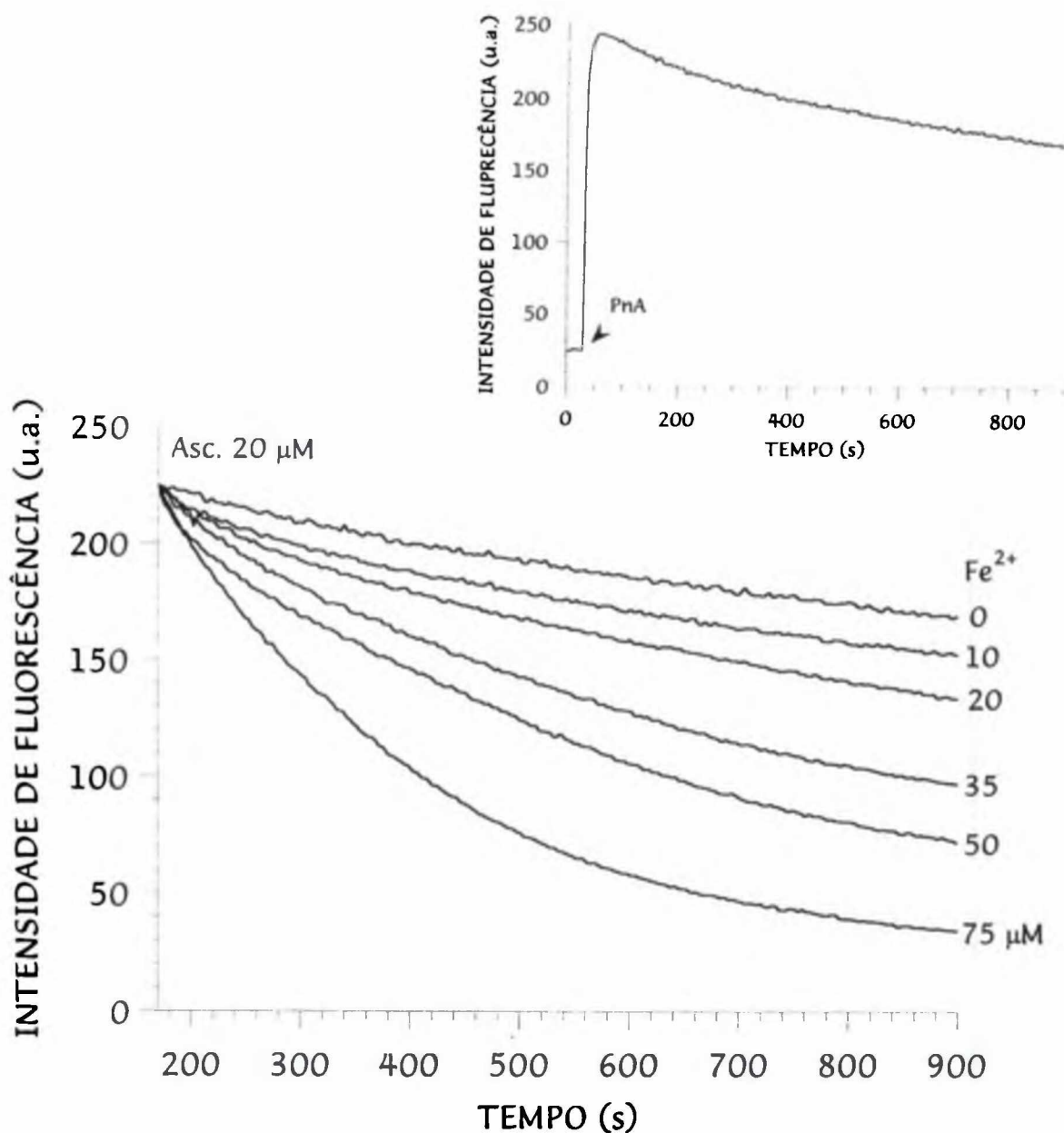


Figura.35 Degradação peroxidativa do ácido *cis*-parinário incorporado em liposomas de lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi, induzida por Fe^{2+} em presença de ácido ascórbico 20 μM .

O *cis*-PnA (1,5 μM) foi injetado em 2 mL do meio de reação (HEPES 10 mM pH 8,5, NaCl 50 mM) contendo a suspensão de liposomas (200 μM em fosfolipídeos), a 25° C. A intensidade de fluorescência foi medida contra o tempo. A velocidade da degradação oxidativa do *cis*-PnA está em função da concentração de ácido ascórbico para várias concentrações de Fe^{2+} .

A figura inserida representa um ensaio típico de autoxidação do *cis*-PnA incorporado em liposomas de lipídeos mitocondriais de coração de boi.

O ferro é particularmente efetivo como catalisador da lipoperoxidação, por ser um metal de transição. Reage com o oxigênio formando espécies que iniciam a degradação oxidativa ou que reagem diretamente com peróxidos lipídicos propagando a reação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Na presença de ácido ascórbico, os íons Fe^{2+} são indutores eficientes da degradação oxidativa do *cis*-PnA incorporado no retículo sarcoplasmático, assim como dos próprios lipídeos extraídos dessas membranas (DINIS et al., 1993).

Os efeitos da amiodarona sobre a peroxidação dos lipídeos extraídos das mitocôndrias de coração de boi foram avaliados pelo decréscimo da intensidade de fluorescência do *cis*-PnA. Foi observado em retículo sarcoplasmático que a degradação da sonda é mais intensa em liposomas do que em membranas nativas (DINIS, 1995), pode-se considerar que em mitocôndrias, semelhante ao que ocorre com as demais membranas nativas, a menor intensidade de degradação também possa ocorrer.

Nos ensaios cujos resultados estão mostrados na figura 36, a amiodarona foi incorporada aos lipídeos mitocondriais durante a fase de preparo dos liposomas. Verifica-se que na ausência da amiodarona (controle), a adição de Fe^{2+} /ácido ascórbico (50 μ M/20 μ M) à preparação promove a degradação oxidativa do *cis*-PnA, a qual se traduz em diminuição da intensidade de fluorescência da sonda em função do tempo de peroxidação. A incorporação da amiodarona na referida suspensão de membranas antes da indução da oxidação, não causa nenhuma mudança no estágio inicial da lipoperoxidação, mas diminui cerca de 30 % a quantidade do *cis*-PnA oxidado ao final de 900 segundos. Este efeito porém, não é dependente da

concentração do fármaco, já que não se observam diferenças entre as concentrações testadas do fármaco.

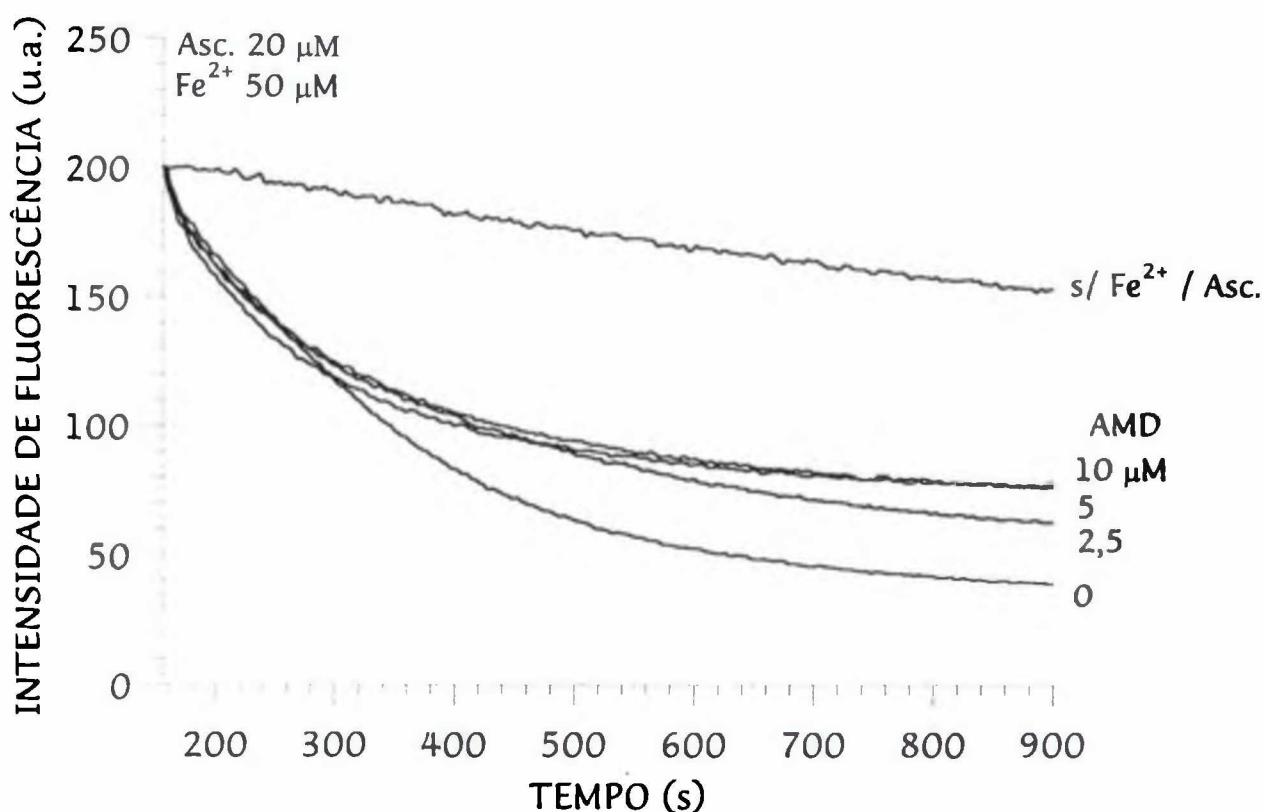


Figura.36 Efeito da amiodarona na degradação oxidativa do ácido *cis*-parinárico incorporado em liposomas de lipídeos de mitocôndrias de coração de boi, induzido por Fe^{2+} /ácido ascórbico.

A amiodarona (2,5, 5 e 10 μM) foi incorporada em liposomas multilamelares, e a lipoperoxidação foi induzida pela adição de Fe^{2+} /ácido ascórbico (50 μM /20 μM). A mistura da reação continha *cis*-PnA 1,5 μM , liposomas de lipídeos mitocondriais (200 μM em fosfolipídeos), HEPES 10 mM pH 8,5, NaCl 50 mM, em um volume final de 2 mL, a 25° C. O decréscimo da fluorescência, em presença da amiodarona, foi comparada com o ensaio controle na ausência de amiodarona.

2.2.3. Interação da amiodarona com radicais peroxil em liposomas de lipídeos mitocondriais de coração de boi.

Da mesma forma que para os fosfolipídeos de soja, o azocomposto AAPH também foi usado nas determinações com lipídeos mitocondriais, devido à sua capacidade em gerar radicais na fase aquosa em velocidade constante, por decomposição térmica.

Como mostra a figura 37 A, AAPH 10 mM gera radicais peroxil o que leva a uma alta velocidade de degradação do *cis*-PnA em liposomas multilamelares, apontando para uma significativa oxidação dos lipídeos totais das mitocôndrias.

Quando a amiodarona (2,5, 5 e 10 μ M) estava presente no sistema de reação (Fig. 37 B) após ter sido incorporada durante o processo de solubilização do filme lipídico, ocorreu uma ligeira diminuição do decréscimo de fluorescência do *cis*-PnA, relativo ao ensaio controle. Estes dados estão de acordo com os observados na figura 36, referentes à oxidação dos lipídeos mitocondriais iniciada com o sistema Fe^{2+} /ácido ascórbico.

Assim como observado com as preparações de PC de soja, liposomas constituídos pela mistura dos lipídeos mitocondriais, não sofreram alterações no perfil oxidativo, em fase aquosa, pela presença da amiodarona.

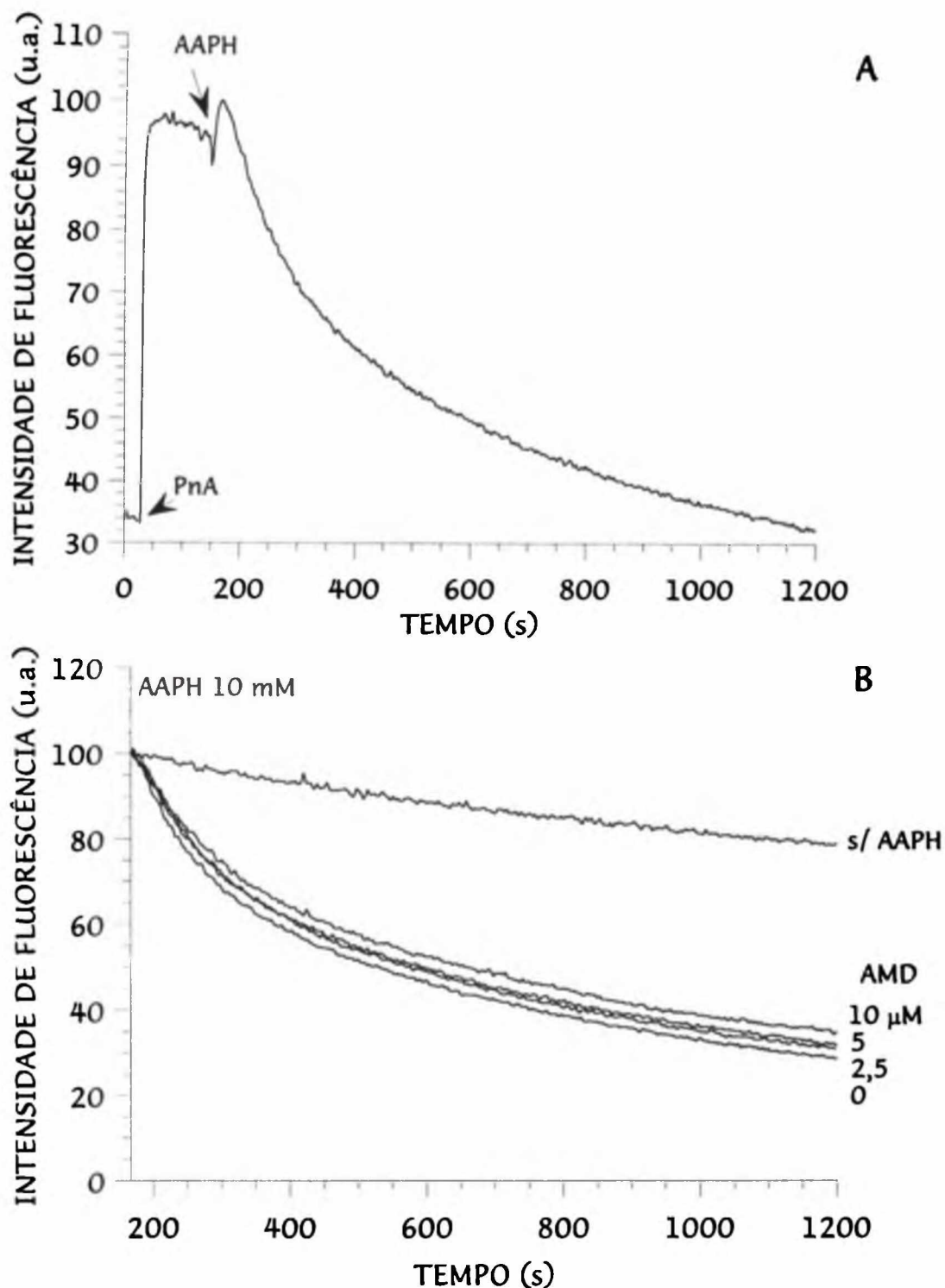


Figura.37 Efeito da amiodarona na degradação oxidativa do ácido *cis*-parinário incorporado em liposomas multilamelares de lipídeos mitocondriais de coração de boi, induzida pela decomposição térmica do AAPH.

(A) Ensaio típico do decréscimo de fluorescência do *cis*-PnA induzido por AAPH 10 mM, o qual foi adicionado após 2 minutos da incorporação da sonda.

(B) Velocidade de oxidação do *cis*-PnA em liposomas multilamelares de lipídeos mitocondriais, induzido por AAPH 10 mM, na ausência e na presença de várias concentrações de amiodarona (2,5, 5 e 10 μ M), as quais foram incorporadas nos liposomas. A mistura de reação continha *cis*-PnA 1,5 μ M, fosfolipídeos mitocondriais 200 μ M, HEPES 10 mM pH 8,5, NaCl 50 mM, em um volume final de 2 mL, a 37° C.

2.2.4. Validação da utilização do ácido *cis*-parinárico como sonda de peroxidação lipídica de lipídeos de mitocôndrias de coração de boi.

O ensaio de fluorescência do *cis*-PnA avalia apenas a sua própria degradação. Uma vez incorporado na fase membranar, é potencialmente tão suscetível à oxidação como qualquer outro ácido graxo da membrana. No entanto, para que possa ser utilizado como sonda, a avaliação da sua degradação necessita ser complementada e correlacionada com a degradação peroxidativa real dos lipídeos das membranas.

Portanto, possíveis artefatos e interpretações equivocadas que possam ter ocorrido durante a utilização dos outros métodos deste trabalho, foram descartados pela avaliação da degradação das cadeias acil lipídicas dos fosfolipídeos, monitorados pela cromatografia gás-líquido (GLC), uma técnica específica e segura para acompanhar o processo de degradação oxidativa (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990).

A quantificação das cadeias alifáticas dos fosfolipídeos das mitocôndrias de coração de boi por GLC, na ausência ou presença de amiodarona, permitiu detectar a degradação oxidativa dos lipídeos induzida por radicais livres, e o efeito do antiarrítmico neste processo (Tabela IV).

A tabela IV demonstra que a incubação de liposomas por 1 hora na ausência (controle) e na presença de AAPH 20 mM a 37° C, diminui a quantidade relativa de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) com um conseqüente aumento relativo da quantidade de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (ver peroxidação sem a droga em relação ao controle); evidentemente também há maior suscetibilidade a

peroxidação lipídica das cadeias hidrocarbonadas mais insaturadas. As mudanças mais significativas foram observadas para PUFA com quatro ou mais duplas ligações: ácidos eicosotetraenóico (araquidônico) (20:4), eicosopentaenóico (20:5), decosopentaenóico (clupanodónico) (22:5) e docoso-hexaenóico (22:6).

Os ácidos linoleico (18:2) e o linolênico (18:3) menos insaturados não são degradados extensivamente, como já descrito para o retículo sarcoplasmático (DINIS et al., 1993).

A incubação com amiodarona (5 e 10 μM) diminui levemente a degradação oxidativa dos PUFA. Observa-se com a dose de 5 μM um maior efeito inibitório que para os ácidos 20:4, 20:5 e 22:5 variou em cerca de 10 a 20 % . Este limitado efeito observado nos experimentos de degradação e quebra das cadeias alifáticas é concordante com aquele detectado pelas outras técnicas cinéticas (Fig.29A, Fig.31, Fig. 37B).

A perda real dos lipídeos dos liposomas de mitocôndrias de coração de boi, traduzida pela diminuição do teor de ácidos graxos ao final de 1 hora de oxidação induzida em condições experimentais semelhantes às do ensaio do *cis*-PnA (Fig.37), valida a utilização deste ácido como sonda de peroxidação lipídica em liposomas de lipídeos mitocondriais. Mais ainda, a diminuição na intensidade de fluorescência do *cis*-PnA incorporado em liposomas, pode ser considerada como um índice altamente sensível da fase inicial da peroxidação lipídica membranar, tal como foi referido para o ácido incorporado nas membranas dos eritrócitos (VAN den BERG et al., 1988) e retículo sarcoplasmático (DINIS te al., 1993).

Tabela IV. Composição das cadeias alifáticas dos fosfolípidos de liposomas mitocondriais de coração de boi (controle), e após 1 hora de peroxidação induzida por AAPH 20 mM a 37° C, na ausência (s/ AMD) e na presença de 5 µM e 10 µM de amiodarona, avaliada por cromatografia gás-líquido e expressa em % das cadeias alifáticas totais.

	Controle	s/ AMD	AMD 5µM	AMD 10µM
16:0 ald	7,89± 0,16	7,58 ± 0,19	7,71 ± 0,27	7,97 ± 0,05
16:0	11,12 ± 0,32	13,19 ± 0,27	11,89 ± 0,53	13,04 ± 0,48
18:0 ald	4,04 ± 0,58	4,11 ± 0,19	4,36 ± 0,19	4,43 ± 0,06
18:0	10,10 ± 0,15	21,04 ± 0,27	20,72 ± 0,23	20,70 ± 0,20
18:1	17,47 ± 0,36	18,85 ± 0,36	18,85 ± 0,37	19,06 ± 0,15
18:2	16,73 ± 0,18	16,96 ± 0,15	17,73 ± 0,23	17,22 ± 0,18
18:3	3,81 ± 0,04	3,44 ± 0,06	3,61 ± 0,20	3,48 ± 0,05
20:4*	12,21 ± 0,20	9,59 ± 0,24	10,48 ± 0,40	9,27 ± 0,57
20:5*	4,30 ± 0,09	2,90 ± 0,02	3,25 ± 0,14	2,79 ± 0,25
22:5*	2,57 ± 0,10	2,26 ± 0,25	2,37 ± 0,11	1,93 ± 0,16
22:6*	0,35 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,21± 0,03	0,19 ± 0,02

Os valores representam a média aritmética ± SD de determinações em triplicata

** Ácidos graxos que sofreram uma maior degradação oxidativa*

A designação ald refere-se às cadeias dimetilacetal das espécies fosfolípídicas plasmalogênicas.

Portanto, através da análise dos resultados obtidos pelos ensaios realizados nos liposomas de fosfatidilcolina de soja, bem como nos liposomas de lipídeos mitocondriais de coração de boi, pode-se concluir que a amiodarona não exerce qualquer efeito significativo sobre a lipoperoxidação tanto como antioxidante ou como pró-oxidante. Deve ser salientado que efeitos antioxidantes não necessariamente significam proporcionar proteção contra a degradação oxidativa, já que os radicais resultantes de "antioxidantes" químicos podem ter uma reatividade aumentada relativamente aos radicais captados pelos chamados compostos antioxidantes.

Um antioxidante pode ser extremamente drástico *in vivo*. Tem sido demonstrado que o próprio ácido ascórbico, sob certas condições, tem comportamento pró-oxidante deletério. O fato da amiodarona não ter comportamento anti-oxidante nem pró-oxidante é uma qualidade acrescida ao valor farmacológico, já que os efeitos colaterais tóxicos relacionados com a lipoperoxidação podem ser descartados.

2.3. Estudo da Lipoperoxidação em Partículas Submitocondriais de Coração de Boi

As mitocôndrias são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, e são o local central do metabolismo aeróbico (ETO et al., 1992), por esta razão são conhecidas como sendo importantes sítios celulares tanto da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como do dano oxidativo causado por estas espécies (CASTILHO et al., 1995).

Tem sido calculado que até 2 % do consumo de oxigênio mitocondrial total resulta na formação de ânion superóxido à nível de três complexos enzimáticos da cadeia respiratória a NADH coenzima Q, succinato coenzima Q redutase e coenzima QH₂ - citocromo c redutase (complexos I, II, III) (BOVERIS et al., 1972; CADENAS et al., 1977).

Apesar da amiodarona não ter apresentado efeitos nem como antioxidante ou como pró-oxidante em liposomas artificiais, a presença dos complexos protéicos nas membranas poderia levar a efeitos diferenciados deste fármaco nestas membranas.

Deste modo, a membrana interna de mitocôndrias vem sendo considerada como um bom modelo para o estudo da lipoperoxidação em um sistema acoplado. CADENAS e BOVERIS (1980) demonstraram que partículas submitocondriais de coração de boi (SMP) são efetivas fontes de O₂^{•-}/H₂O₂. Como as partículas submitocondriais são destituídas de desidrogenases auxiliares, a formação de H₂O₂ pode estar diretamente relacionada com os componentes da cadeia respiratória, característica que torna as SMP muito úteis e interessantes como modelos para o estudo da produção de ERO bem como da lipoperoxidação (TAKESHIGE e

MINAKAMI, 1975; TAKAYANAGI et al., 1980; TAKESHIGE et al., 1980; GLINN et al., 1991; HINGH et al., 1995).

Estes estudos em partículas submitocondriais foram realizados induzindo-se a lipoperoxidação com NADH em presença de íons férrico (Fe^{3+}), ATP e ADP, medidos pela formação de malonaldeído (TBARs) e pelo consumo de oxigênio.

Durante a última década, uma variedade de métodos têm sido desenvolvidos para a detecção de espécies reativas de oxigênio ou para monitorar a lipoperoxidação. Todavia, a maior parte destes métodos requer técnicas sofisticadas tais como ressonância paramagnética eletrônica que são técnicas descontínuas e requerem destruição da amostra, sofrem sérias desvantagens metodológicas ou são indiretamente relacionadas com o processo de lipoperoxidação (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990).

O método desenvolvido por KUYPERS et al. (1987) foi selecionado para este trabalho, é baseado no uso do *cis*-PnA, o qual após incorporado em membranas biológicas é altamente fluorescente, como já foi discutido neste trabalho. As propriedades fluorescentes do *cis*-PnA são destruídas quando as ligações conjugadas alílicas são atacadas por espécies reativas de oxigênio. HINGH e colaboradores (1995) adaptaram este método do *cis*-PnA para as SMP de coração de boi, usando como agente de lipoperoxidação ADP- Fe^{3+} .

No presente trabalho avaliou-se o efeito da amiodarona em partículas submitocondriais de coração de boi, um sistema de membranas mais complexo e funcional, com a membrana mitocondrial interna acoplada, adaptando-se as condições de HINGH et al. (1995) para um sistema indutor de lipoperoxidação constituído de NADH e Fe^{2+} , na ausência de ADP.

2.3.1. Dependência da fluorescência do *cis*-PnA sobre a concentração de fosfolípidos das SMP de coração de boi

As concentrações de *cis*-PnA e sua razão em relação aos fosfolípidos das partículas submitocondriais de coração de boi, estão apresentadas na figura 38. Na figura 38 A observa-se que usando *cis*-PnA 1 μM a fluorescência máxima foi alcançada quando se usou 100 μM de fosfolípidos das SMP. A diminuição da fluorescência observada nas concentrações superiores de fosfolípidos é provavelmente devido ao "quenching" de fluorescência pela presença de citocromos, os quais absorvem parte da energia de excitação do *cis*-PnA. Como os citocromos não emitem fluorescência, transformam esta energia em calor ("energy transfer"). Quando o conteúdo de SMP foi mantido em 100 μM , a intensidade de fluorescência aumentou linearmente com a concentração de *cis*-PnA até 3,0 μM , atingindo a saturação em 8,0 μM (Fig.38 B). Estes resultados são similares aos obtidos por HINGH et al.(1995). Em todos os experimentos que envolvem o uso de SMP foram usados 100 μM de fosfolípidos de membranas de SMP e concentração de *cis*-PnA de 1 μM . Sob estas condições, a intensidade de fluorescência da sonda *cis*-PnA está em função linear com a concentração das membranas.

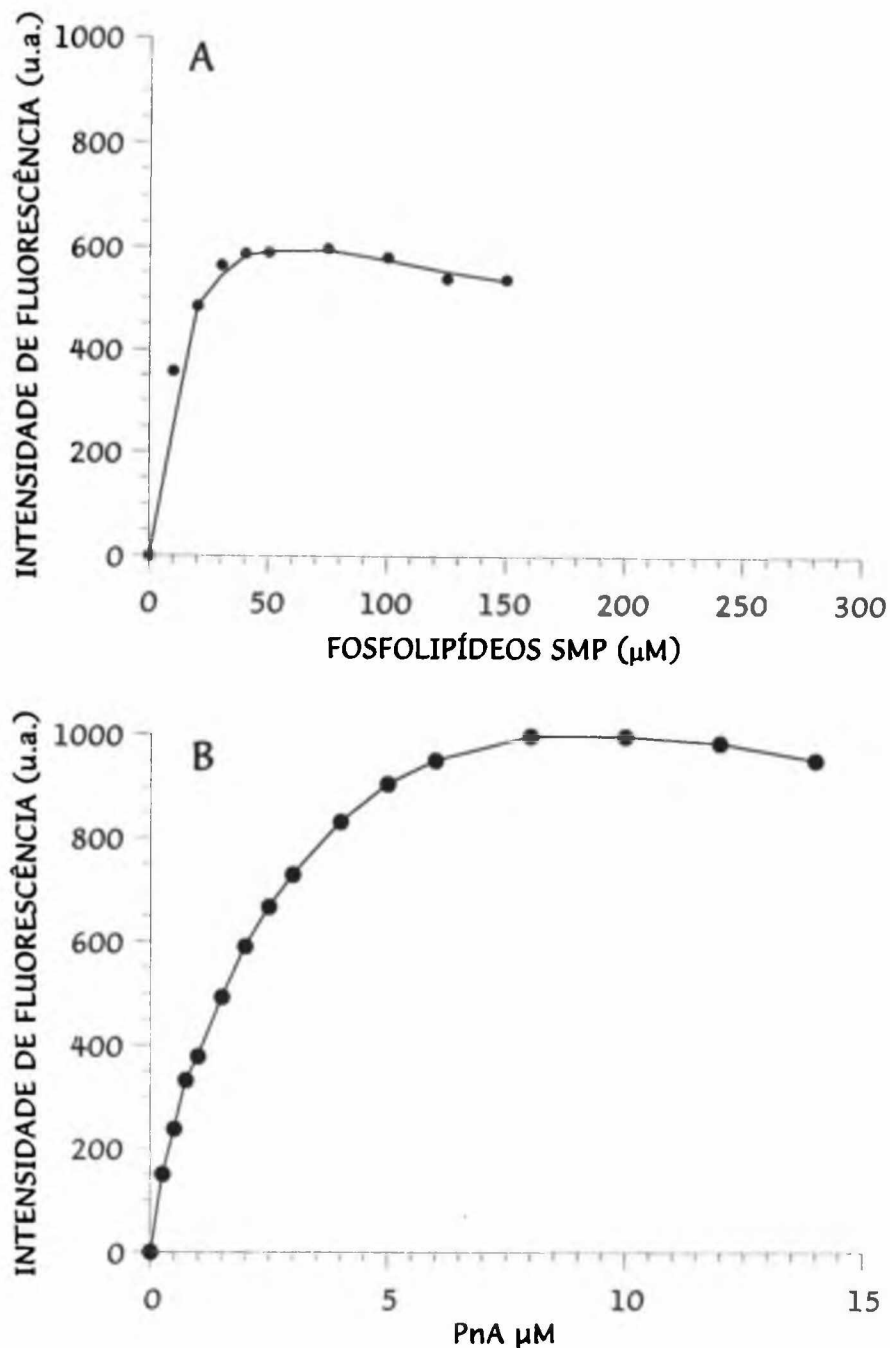


Figura.38 Intensidade de fluorescência do *cis*-PnA em membranas de SMP de coração de boi em função de sua concentração.

(A) 2 mL de tampão (TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM) contendo *cis*-PnA 1,0 μM e várias concentrações de fosfolípidos de membranas de SMP.

(B) 2 mL de tampão contendo 100 μM de fosfolípidos de membranas de SMP e várias concentrações de *cis*-PnA.

As intensidades de fluorescência foram determinadas após 2 minutos da incorporação da sonda.

2.3.2. Lipoperoxidação em membranas de SMP de coração de boi induzida por NADH.

Tem sido demonstrado que SMP de coração de boi catalisam a peroxidação de lipídeos usando o NADH como doador de elétrons em presença do complexo ADP-Fe³⁺, e aparentemente a NADH desidrogenase da cadeia respiratória é responsável por esta reação (TAKESHIGE e MINAKAMI, 1975; TAKAYANAGI et al., 1980). Portanto, as membranas das partículas submitocondriais de coração de boi foram expostas a um sistema iniciador da lipoperoxidação contendo NADH e Fe²⁺, semelhante àqueles já estudados (TAKESHIGE e MINAKAMI, 1975; TAKAYANAGI et al., 1980; TAKESHIGE et al., 1980; HINGH et al., 1995).

A figura 39 A representa um experimento típico no qual a lipoperoxidação de SMP de coração de boi foi acompanhada usando-se o método do *cis*-PnA. Após a adição do *cis*-PnA, observa-se um rápido aumento na intensidade de fluorescência, o qual é devido à incorporação da sonda nas membranas de SMP. Após 2 minutos, o sinal de fluorescência se estabiliza e permanece constante na ausência de compostos indutores de lipoperoxidação, como pode ser observado na figura inserida em 39 A.

A adição de NADH resulta em um pequeno aumento do sinal de intensidade de fluorescência, isto porque o NADH e o *cis*-PnA tem sobreposição do espectro de emissão induzido por excitação a 324 nm, como já descrito por HINGH et al.(1995).

A fluorescência total produzida quando o *cis*-PnA e o NADH estão presentes é o resultado da fluorescência do *cis*-PnA, fluorescência do NADH e o quenching de fluorescência do *cis*-PnA devido a absorção e a transferência de energia pelo NADH

("energy transfer"). Além disso, separadamente da peroxidação do *cis*-PnA, o NADH é também oxidado pelas SMP, e nesta situação esta velocidade é muito lenta. Ainda assim, o sinal de fluorescência do NADH detectado em nossos ensaios não foi tão significativo quanto aquele mostrado por HINGH et al. (1995). Verifica-se que imediatamente após a adição de Fe^{2+} , a lipoperoxidação inicia-se, conforme se visualiza pelo decréscimo do sinal de fluorescência resultante da degradação do *cis*-PnA, e ao final da reação a fluorescência ainda detectável é quase completamente devido à presença do NADH.

Com a finalidade de se determinar as concentrações ideais de NADH e Fe^{2+} para um bom perfil oxidativo, foram ensaiadas várias concentrações de Fe^{2+} em presença de uma concentração fixa de NADH (50 μM). Os resultados de tais experimentos estão mostrados na figura 39 B, onde se pode observar que apenas a presença de NADH não leva a nenhuma alteração do decréscimo da fluorescência do *cis*-PnA em relação a aquela resultante da autooxidação da sonda em membranas de SMP (Fig.39 A). Porém, quando se adicionou Fe^{2+} nas concentrações de 50, 75 e 100 μM , a velocidade do "quenching" de fluorescência do *cis*-PnA aumentou rapidamente, e com a maior concentração de Fe^{2+} (100 μM) a oxidação lipídica foi de cerca de 50 % ao final de 20 minutos (1200 s). O decréscimo da fluorescência nesse tempo é independente da concentração de NADH e é linearmente dependente da concentração de Fe^{2+} entre 0 e 100 μM . Diferente do que foi demonstrado por HINGH et al.(1995), a velocidade da degradação oxidativa do *cis*-PnA foi intensificada na presença de Fe^{2+} , e não de um quelato ADP-Fe. Estes experimentos preliminares permitiram estabelecer as concentrações ótimas de Fe^{2+}

100 μM e NADH 50 μM , que proporcionavam uma boa oxidação da sonda e que foram usadas nos experimentos subsequentes.

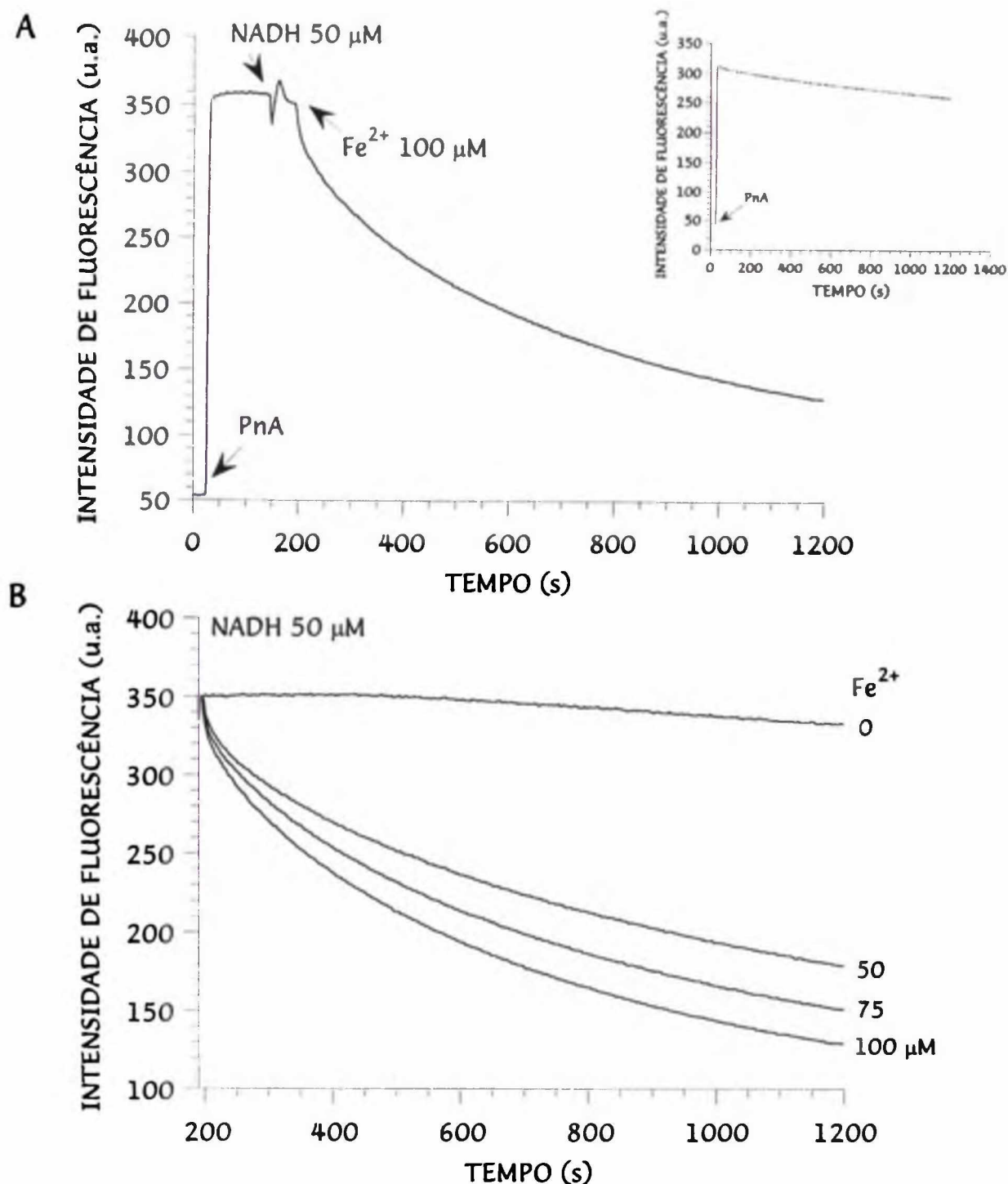


Figura.39 Degradação peroxidativa do ácido *cis*-parinário incorporado em membranas de SMP de coração de boi, induzida por Fe^{2+} em presença de NADH.

(A) Sinal da intensidade de fluorescência seguida contra o tempo durante o experimento de lipoperoxidação em SMP. Condições do ensaio: 2 mL de tampão TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM, membrana fosfolipídica de SMP 100 μM , *cis*-PnA 1 μM , NADH 50 μM e Fe^{2+} 100 μM .

Figura inserida em (A) representa um ensaio típico da autoxidação da sonda *cis*-PnA incorporada em membranas de SMP.

(B) *cis*-PnA 1 μM foi injetado em 2 mL da suspensão de SMP (100 μM em fosfolípidos) e tampão. Após 2 minutos da incorporação do *cis*-PnA foi adicionado NADH 50 μM , e as várias concentrações de Fe^{2+} (50, 75 e 100 μM).

A intensidade de fluorescência do *cis*-PnA foi avaliada em função do tempo.

2.3.3. Efeito da amiodarona sobre a lipoperoxidação das partículas submitocondriais induzida por Fe^{2+} /NADH

O efeito da amiodarona (5, 10 e 15 μM) frente a lipoperoxidação induzida por NADH e Fe^{2+} , foi avaliado após a pré-incubação do fármaco por 5 minutos com as membranas de SMP. Este procedimento é importante para permitir a sua incorporação junto aos lipídeos destas membranas biológicas.

As SMP em presença da amiodarona foram expostas à peroxidação lipídica em presença de Fe^{2+} / NADH (100 μM / 50 μM), e as velocidades da peroxidação lipídica foram monitoradas pelo decréscimo da fluorescência do *cis*-PnA, em função do tempo de reação. Como pode ser observado na figura 40, a incorporação de amiodarona nas referidas suspensões das membranas inibe a oxidação do *cis*-PnA, uma vez que as velocidades de decréscimo da intensidade de fluorescência diminuem quando adiciona-se Fe^{2+} / NADH. O fármaco antiarrítmico diminuiu não só a velocidade inicial bem como a velocidade final da degradação oxidativa da sonda. Estes efeitos foram dependentes da concentração da amiodarona na suspensão das membranas, uma vez que com 5 μM a inibição do final da oxidação foi de 15 %, em relação ao ensaio controle na ausência de amiodarona, e para 10 e 15 μM a inibição foi de cerca de 25 e 40 %, respectivamente.

Estes efeitos da amiodarona sobre a lipoperoxidação em membranas de SMP de coração de boi são maiores que os obtidos naqueles sistemas lipossômicos mais simples, como os de PC de soja e os com lipídeos extraídos de mitocôndrias.

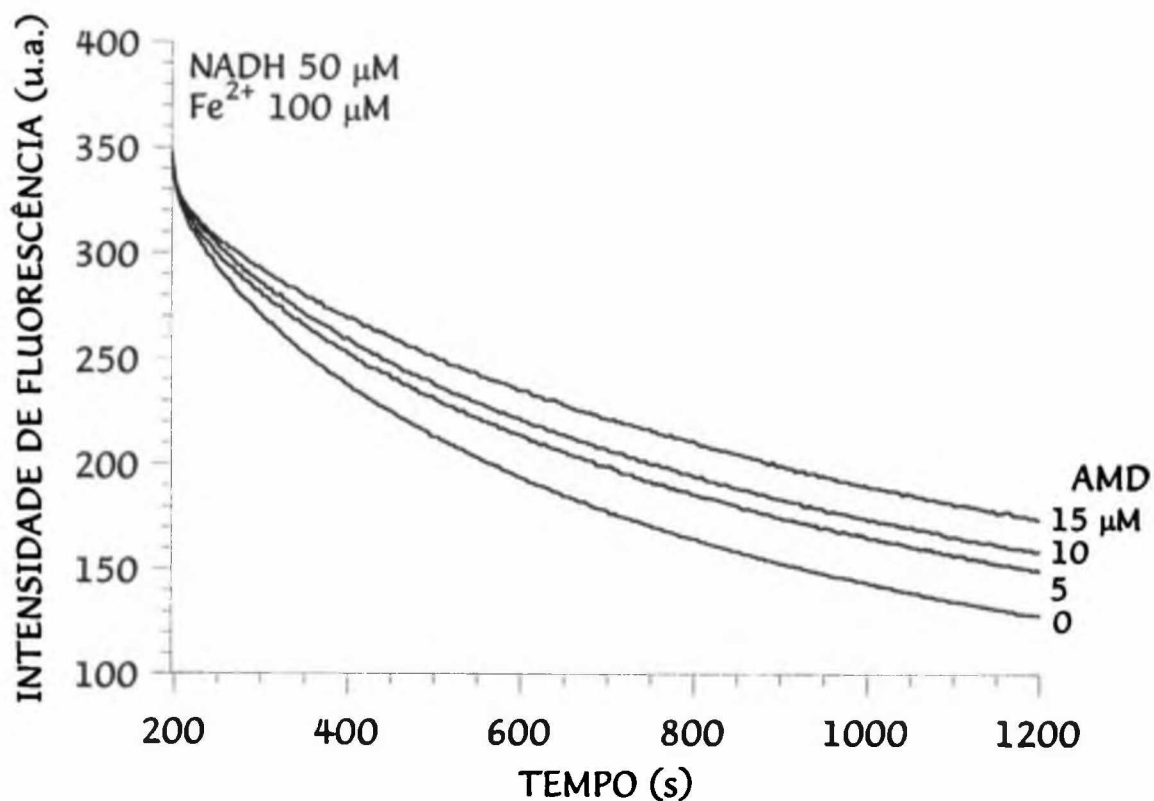


Figura.40 Efeito da amiodarona na degradação oxidativa do *cis*-PnA (1 µM) incorporado em membranas de SMP de coração de boi (100 µM em fosfolípidos ou 0,62 mg/mL de proteínas) dispersas em tampão TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM. O *cis*-PnA foi adicionado à suspensão das membranas após 30 segundos de registro de dispersão da luz e a degradação oxidativa da sonda foi iniciada pelo Fe²⁺ / NADH (100 µM / 50 µM), após a incubação do *cis*-PnA com as membranas durante 2 minutos.

A amiodarona, nas concentrações (µM) indicadas pelos números adjacentes aos registros, foi pré-incubada com as suspensões de membranas a 25^o C durante 5 minutos antes de adicionar o *cis*-PnA. Os registros da fluorescência foram determinados em função do tempo.

Uma vez que as reações de oxidação de lipídeos mediadas por radicais são acompanhadas pelo consumo de oxigênio, este método de acompanhamento foi também utilizado neste trabalho. A dependência da velocidade da lipoperoxidação relacionada com a presença de NADH e Fe^{2+} , está mostrada na figura 41, onde a velocidade do consumo de oxigênio pelo sistema representa a velocidade da lipoperoxidação. Na figura 41 A observa-se que quando o NADH 100 μM é adicionado ao sistema de membranas de SMP (ausência de Fe^{2+}), a velocidade do consumo de O_2 aumenta, mas rapidamente chega a um estágio estacionário; aos 17 minutos foram consumidos 40 % do oxigênio total. Esta velocidade de consumo de O_2 não é muito lenta, porque nas condições em que estes experimentos foram desenvolvidos, omitiu-se a adição de um inibidor da cadeia respiratória, como a rotenona.

Na presença de NADH quando adicionou-se Fe^{2+} (300 μM) ao sistema, observa-se um rápido e imediato aumento da velocidade de consumo de O_2 , que é total ao final de 28 minutos. A adição de Fe^{2+} 300 μM às membranas de SMP tratadas com NADH 100 μM (ausência de rotenona) aumenta consideravelmente a velocidade de consumo de O_2 , quando comparado com a situação em que tem-se apenas NADH presente no meio. Na ausência de Fe^{2+} existe uma pequena velocidade de consumo de O_2 até 10 minutos, e após este tempo a velocidade entra em um platô (Fig.41 A). Nesta situação, figura 41 A, onde 100 % do oxigênio é consumido ao final de 28 minutos, demonstra-se que o sistema Fe^{2+} / NADH (300 μM / 100 μM) induz uma degradação oxidativa dos lipídeos de membranas, iniciando uma reação em cadeia.

Portanto, esta combinação cofator/iniciador foi escolhida para o estudo da lipoperoxidação em SMP em presença da amiodarona.

A figura 41 B mostra os efeitos de três concentrações de amiodarona sobre a peroxidação dos lipídeos intrínsecos das SMP, iniciada por Fe^{2+} / NADH (300 μM / 100 μM), monitorado pelo consumo de oxigênio a 37° C.

A geração indireta de radicais hidroxil (HO^{\bullet}) a partir do sistema Fe^{2+} / NADH levam a oxidação significativa dos lipídeos de SMP, como pode ser observado a partir do consumo de oxigênio verificado na ausência de amiodarona. A pré-incubação do sistema por 5 minutos com concentrações crescentes da droga produz uma progressiva diminuição do consumo de oxigênio (Fig.41 B). A comparação das velocidades da lipoperoxidação das SMP em presença de 5, 10 e 15 μM de amiodarona, com a situação controle na ausência do fármaco, mostra que a inibição é dependente da dose da droga e, que na maior concentração (15 μM), ao final de 25 minutos, a amiodarona inibe 35 % o padrão oxidativo das membranas nativas na presença de Fe^{2+} / NADH.

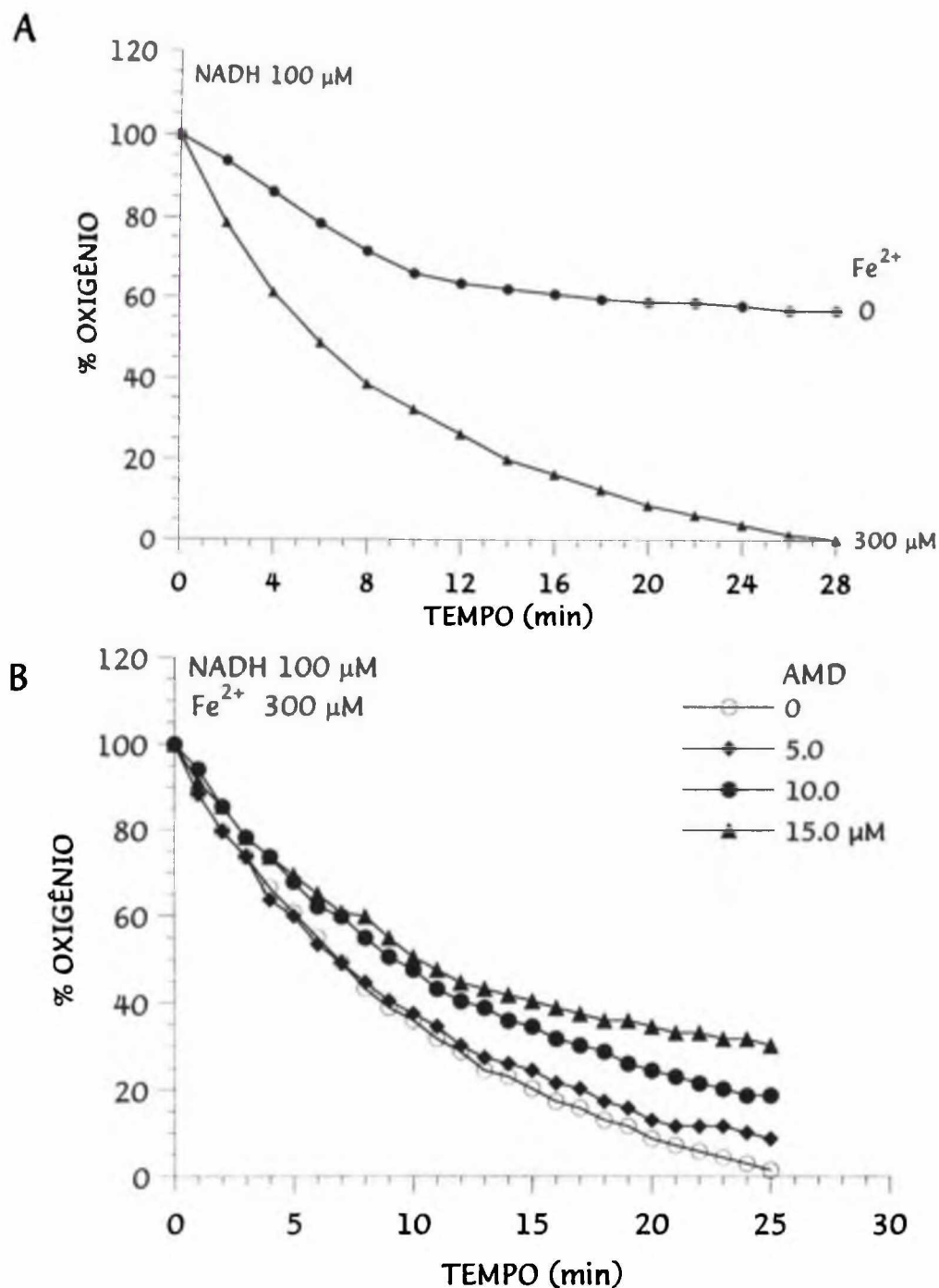


Figura.41 Efeito da amiodarona na lipoperoxidação induzida por NADH e Fe²⁺ em partículas submitocondriais de coração de boi avaliadas pelo consumo de oxigênio.

(A) Velocidades do consumo de O₂ durante a oxidação das SMP na ausência e na presença de Fe²⁺ 300 μM. O sistema de reação continha TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM, SMP (0,5 mg de proteínas) e 100 μM NADH, em volume final de 1 mL, a 37° C.

(B) A amiodarona (5, 10 e 15 μM) foi pré-incubada 5 minutos, antes do início da peroxidação lipídica, no sistema contendo SMP (0,5 mg proteínas), TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM, a 37° C, em volume final de 1 mL. O consumo de oxigênio foi iniciado por NADH / Fe²⁺ (100 μM / 300 μM).

Análise estatística pelo teste de variância ($p < 0,05$):

Amiodarona 5 μM $p=7,85 \cdot 10^{-5}$

Amiodarona 10 μM $p=7,32 \cdot 10^{-13}$

Amiodarona 15 μM $p=2,61 \cdot 10^{-10}$

2.3.4. Lipoperoxidação de partículas submitocondriais de coração de boi em presença de rotenona

Com a finalidade de diminuir a interferência da cadeia respiratória na oxidação do NADH, que poderia mascarar a determinação da velocidade de consumo de O₂ pela lipoperoxidação, os experimentos foram também desenvolvidos na presença de rotenona. Nesta situação os elétrons para a lipoperoxidação seriam fornecidos a partir de um componente localizado antes do sítio sensível a rotenona da NADH desidrogenase da cadeia respiratória (TAKESHIGE e MINAKAMI, 1975; TAKAYANAGI et al., 1980; TAKESHIGE et al., 1980; GLINN et al., 1991).

A figura 42 A ilustra a diferença da leitura fluorimétrica do *cis*-PnA incorporado em SMP de coração de boi com NADH (50 µM) na ausência ou presença de rotenona. Com 5 µM de rotenona a degradação da sonda é menos evidente do que na ausência do inibidor. O sistema de membranas de SMP em presença de rotenona sofreu degradação oxidativa induzida por Fe²⁺ / NADH (100 µM / 50 µM), avaliado pelo "quenching" de fluorescência do *cis*-PnA (Fig.42 B, controle 0 µM).

Tal como anteriormente descrito, a amiodarona foi pré-incubada por 5 minutos com SMP tratadas com rotenona 5 µM, antes da indução da oxidação dos lipídeos de membranas.

Observa-se na figura 42 B que a velocidade inicial da degradação do *cis*-PnA é diminuída com todas as concentrações de amiodarona usadas; esta inibição mostrou-se linear até aos 20 minutos finais da lipoperoxidação, e na concentração de 15 µM do fármaco impediu em cerca de 30 % a degradação oxidativa do *cis*-PnA.

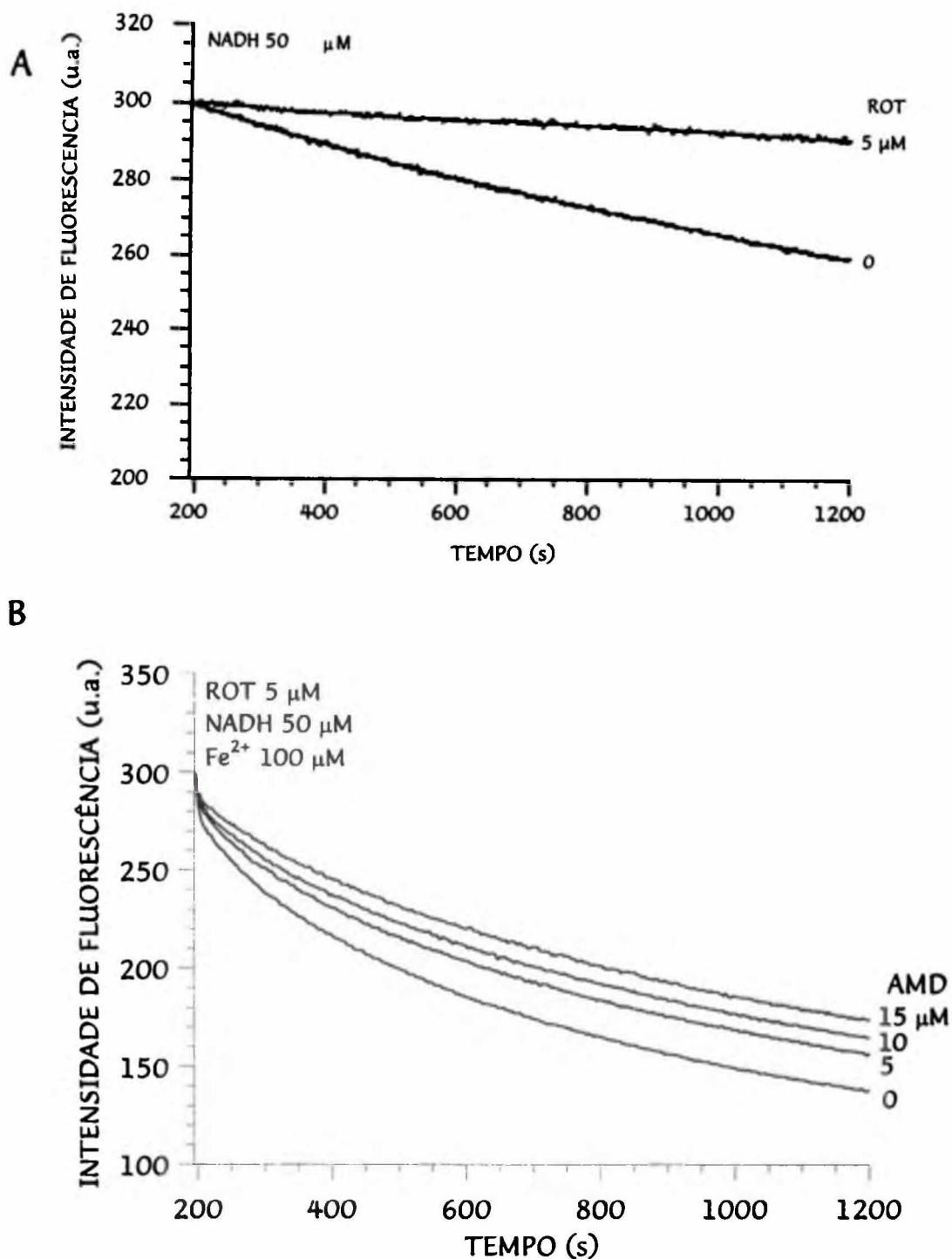


Figura.42 Efeito da amiodarona sobre a degradação oxidativa do *cis*-PnA incorporado em SMP de coração de boi na presença de rotenona, induzida por NADH e Fe^{2+} .

(A) Controle típico da análise da velocidade de oxidação do *cis*-PnA em partículas submitocondriais (100 μM fosfolipídeos ou 0,62 mg/mL proteínas). A mistura de reação continha TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM, NADH 50 μM , na ausência ou presença de rotenona 5 μM .

(B) Diferentes concentrações de amiodarona (5, 10 e 15 μM) foram incubadas durante 5 minutos na mistura de reação contendo *cis*-PnA 1 μM , partículas submitocondriais (100 μM fosfolipídeos) em TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM, suplementado com rotenona 5 μM , a 25° C, em volume final de 2 mL. A lipoperoxidação foi iniciada pela adição de NADH 50 μM e Fe^{2+} 100 μM .

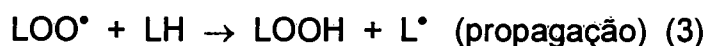
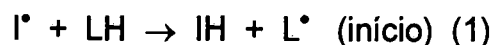
A peroxidação lipídica de SMP avaliada através da medida do consumo de oxigênio está apresentada na figura 43. Em A, verifica-se que o aumento da velocidade do consumo de oxigênio das partículas submitocondriais, quando a cadeia respiratória está inibida a nível da NADH desidrogenase, com o uso da rotenona.

Em presença de NADH 100 μM as SMP consomem cerca de 50% do oxigênio ao final de 28 minutos, enquanto que em presença de Fe^{2+} 300 μM esta velocidade aumenta consideravelmente, e ao final deste mesmo tempo, todo o oxigênio foi consumido. A amiodarona neste sistema (Fig. 43 B), diminui a velocidade inicial da reação em cadeia de modo dependente da concentração usada do fármaco. Estes resultados estão de acordo com os obtidos na figura 42 B, com a análise do "quenching" de fluorescência do *cis*-PnA.

Ao final de 22 minutos da lipoperoxidação (Fig. 43 B), tem-se uma inibição significativa para as concentrações de amiodarona usadas (5, 10 e 15 μM), sendo que com a maior dose (15 μM), a inibição do consumo de oxigênio chega a ser de 25 %, para o sistema contendo Fe^{2+} /NADH e rotenona.

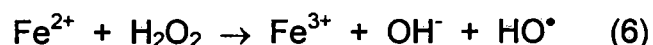
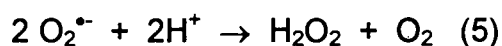
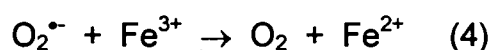
Evidentemente, o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória é um pré-requisito para o início da lipoperoxidação em membranas biológicas, mas o mecanismo pelo qual radicais livres e portanto, espécies reativas de oxigênio são produzidas neste sistema contendo NADH e Fe^{2+} não está completamente claro (HINGH et al., 1995).

Os seguintes processos em lipoperoxidação podem ser considerados (MINOTTI e AUST, 1992):



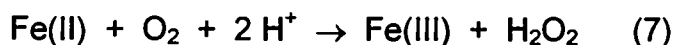
A cadeia é iniciada (induzida) por algum iniciador (I^{\bullet}) o qual catalisa a geração de um radical alquil lipídico (L^{\bullet}). Esta espécie, rapidamente liga oxigênio para formar um radical peroxil lipídico (LOO^{\bullet}), o qual eventualmente converte-se em LOOH via o sequestro de um hidrogênio de uma ligação alílica vizinha.

O ferro e as espécies de dioxigênio reduzidas tem sido relacionadas com a formação de iniciadores, todavia o mecanismo de seus envolvimento ainda não está claro. Um possível mecanismo é o ânion superóxido dirigir a reação de Fenton:



Nessa reação (6) a lipoperoxidação é iniciada pelo oxidante mais reativo, o radical hidroxil (HO^{\bullet}). Alternativamente, a formação do ânion superóxido, ou algum outro sistema redutor promove a redução de Fe^{3+} até alcançar a razão apropriada

$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, a qual leva à geração de espécies iniciadoras de lipoperoxidação (reação 7 seguida pela reação 6) (MINOTTI e AUST, 1992).



YEN et al. (1992) por sua vez, concluíram que o HO^\bullet resultante da reação de Fenton pode não ser a chave para a iniciação da peroxidação, mas sim os complexos do tipo quelante- Fe-O_2 . Apesar do papel exato dos íons ferro no desencadear da peroxidação lipídica não estar ainda totalmente esclarecido, parece que o ferro tem um importante papel na decomposição dos hidroperóxidos lipídicos pré-formados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990), não havendo a necessidade de formação do radical hidroxil para iniciar a peroxidação lipídica. Considerando que as frações de membranas isoladas a partir de células fragmentadas contém peróxidos lipídicos (LOOH), a adição de sais de ferro pode levar à sua decomposição com formação de radicais peroxil e alcoxil.

Assim, o fluxo de elétrons através do complexo I em SMP inibidas ou não por rotenona, pode produzir o radical superóxido para iniciar as reações 4-5-6 diretamente (TURRENTS e BOVERIS, 1980; TAKESHIGE e MINAKAMI, 1979) ou pode estar envolvida na redução do Fe^{3+} , uma atividade catalítica atribuída para NADH desidrogenase (TAKESHIGE et al., 1980), para iniciar as reações 7 e 6.

Pela análise dos resultados obtidos com a amiodarona sobre a lipoperoxidação em SMP induzida por $\text{Fe}^{2+}/\text{NADH}$, pode-se sugerir que o fármaco antiarrítmico foi capaz de inibir a lipoperoxidação, provavelmente por um mecanismo indireto. Este pode estar relacionado com os efeitos inibitórios que a amiodarona

provoca sobre os complexos I e II da cadeia respiratória (GUERREIRO et al., 1986 a, b; FROMENTI et al., 1990), ressaltando-se ainda que as concentrações em que os autores verificaram os efeitos inibitórios do complexo I são muito superiores aquelas aqui utilizadas.

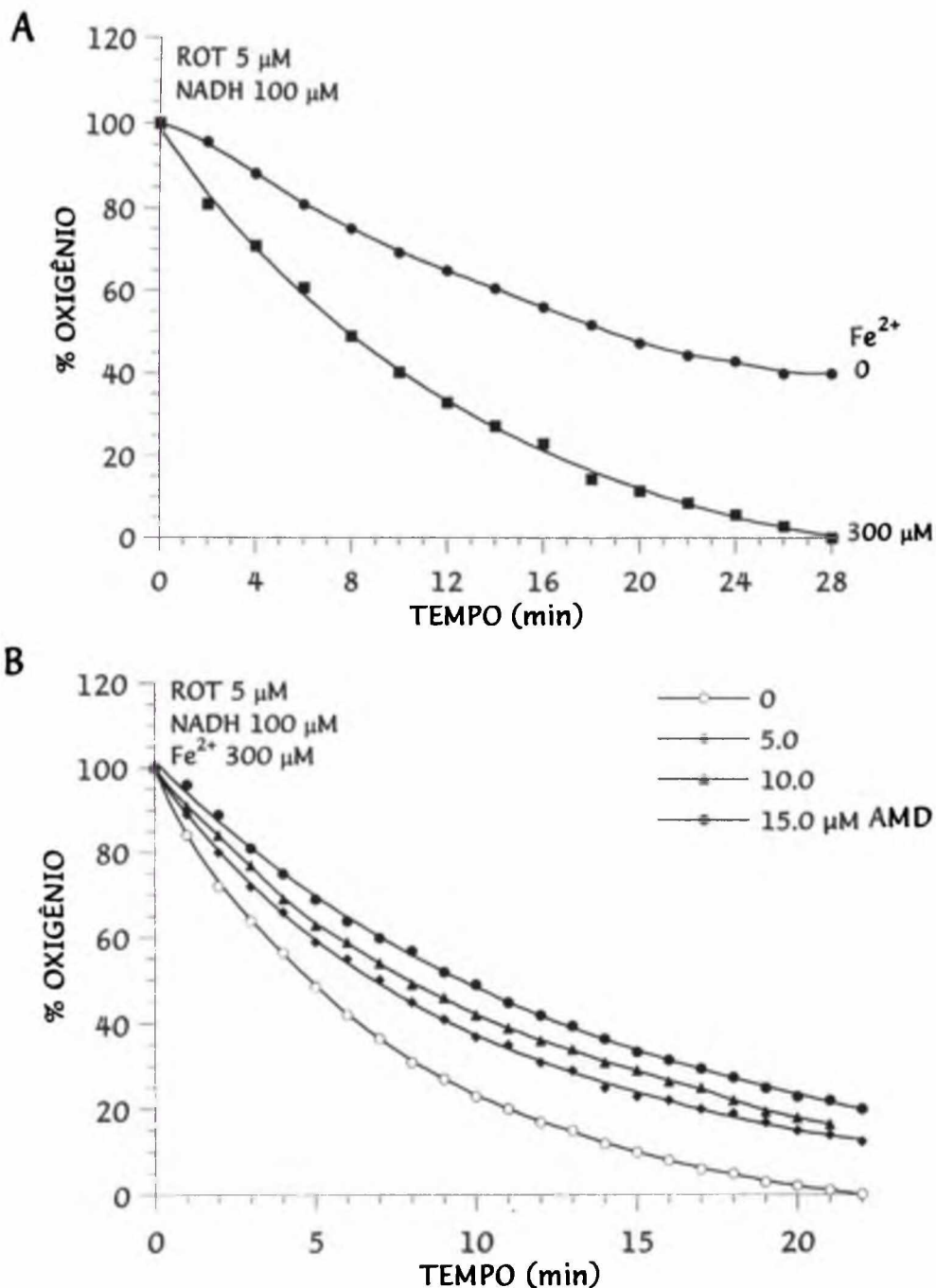


Figura. 43 Efeito da amiodarona na lipoperoxidação induzida por NADH e Fe²⁺ em partículas submitocondriais de coração de boi, inibidas com rotenona e avaliadas pelo consumo de oxigênio.

(A) % Consumo de oxigênio durante a oxidação das SMP na ausência ou presença de Fe²⁺ 300 μM . A mistura de reação continha TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM, SMP (0,5 mg proteínas), rotenona 5 μM e NADH 100 μM , em volume final de 1 mL, a 37° C.

(B) A amiodarona (5, 10 e 15 μM) foi pré-incubada 5 minutos, antes do início da peroxidação lipídica, no sistema contendo SMP (0,5 mg proteínas), TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM, rotenona 5 μM , a 37° C, em volume final de 1 mL. O consumo de oxigênio foi iniciado por NADH/Fe²⁺ (100 μM / 300 μM).

Análise estatística pelo teste de variância ($p < 0,05$)

Amiodarona 5 μM $p=1,72 \cdot 10^{-13}$

Amiodarona 10 μM $p=7,027 \cdot 10^{-14}$

Amiodarona 15 μM $p=1,67 \cdot 10^{-14}$

2.3.5. Interação da amiodarona com radicais peroxil em partículas submitocondriais de coração de boi

Como já foi descrito, o azocomposto AAPH é capaz de gerar radicais na fase aquosa de vesículas lipídicas em velocidade constante, por decomposição térmica.

As SMP foram expostas a 10 mM de AAPH, que foi suficiente para iniciar uma reação em cadeia de peroxidação dos lipídeos das membranas das partículas submitocondriais.

Como mostra a figura 44, a medida do "quenching" de fluorescência do *cis*-PnA do experimento controle na ausência de amiodarona, representa o grau de degradação da sonda ao longo de 20 minutos. Esta situação apresenta-se como um bom padrão para a medida do processo oxidativo.

Diferentes concentrações de amiodarona (5, 10 e 15 μ M) foram pré-incubadas com as SMP antes do início da peroxidação. Na figura 44 observa-se que a droga não foi capaz de interferir de modo expressivo na oxidação gerada a partir de radicais peroxil, como já havia sido constatado com as membranas mais simples de fosfatidilcolina de soja e de lipídeos mitocondriais. Apenas uma discreta e reproduzível tendência a inibição foi observada sugerindo que o fármaco não reage diretamente com os radicais peroxil e assim eles continuam induzindo a lipoperoxidação.

Na figura 45 a interação da amiodarona com os radicais peroxil em SMP foi avaliada pela medida do consumo de oxigênio. Nota-se que no experimento controle não há consumo de oxigênio (s/ AAPH) e quando em presença de AAPH 10 mM, os radicais peroxil são gerados e capazes de iniciar a peroxidação. Esta é efetiva em

consumir todo o oxigênio da câmara ao final de 35 minutos. Nesta situação controle na ausência de amiodarona, as SMP parecem ser menos suscetíveis à oxidação com radicais peroxil, do que quando as membranas foram expostas ao sistema $\text{Fe}^{2+}/\text{NADH}$. Através da medida do consumo de oxigênio confirmou-se, portanto, o limitado efeito da amiodarona em inibir a lipoperoxidação induzida por radicais peroxil.

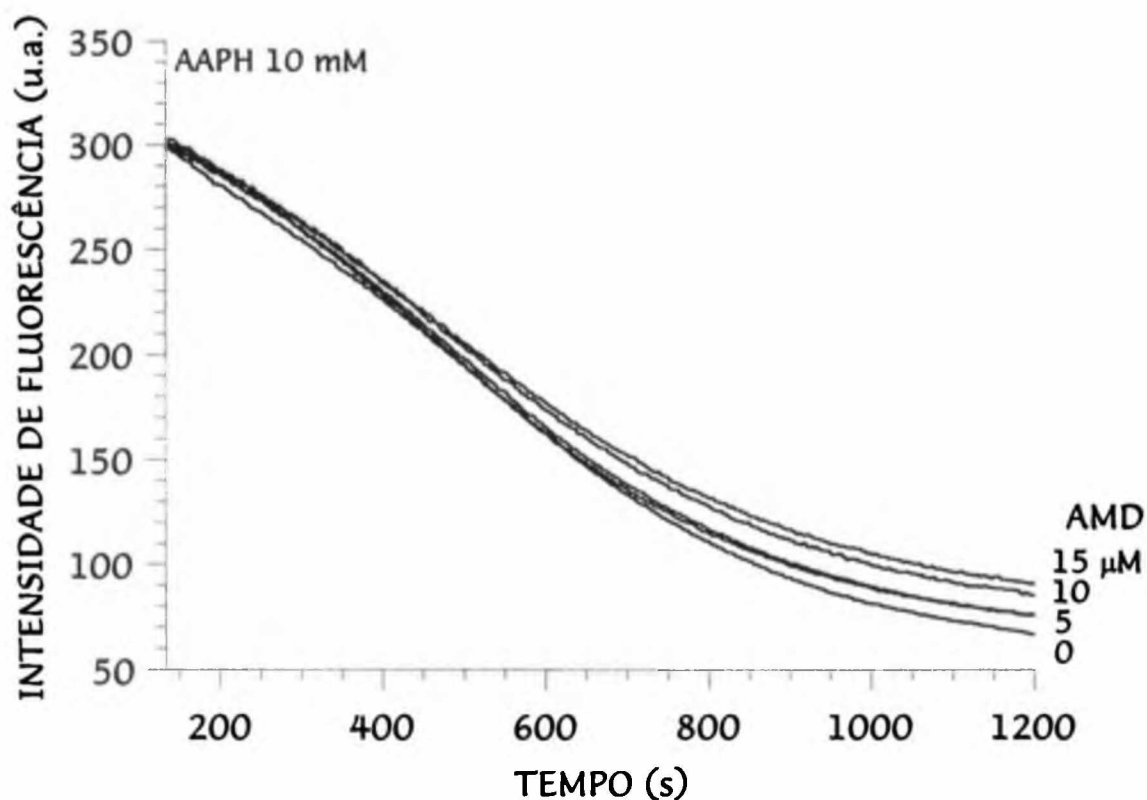


Figura.44 Efeito da amiodarona na degradação oxidativa do ácido *cis*-parinárico incorporado em partículas submitocondriais de coração de boi induzida pela decomposição térmica do AAPH.

Velocidade de oxidação do *cis*-PnA em partículas submitocondriais, induzida por AAPH 10 mM, na ausência ou presença de várias concentrações de amiodarona (5, 10 e 15 μM), as quais foram pré-incubadas por 5 minutos com as SMP.

A mistura de reação continha *cis*-PnA 1 μM, SMP 100 μM (fosfolípidos), TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM, em um volume final de 2 mL, a 37° C.

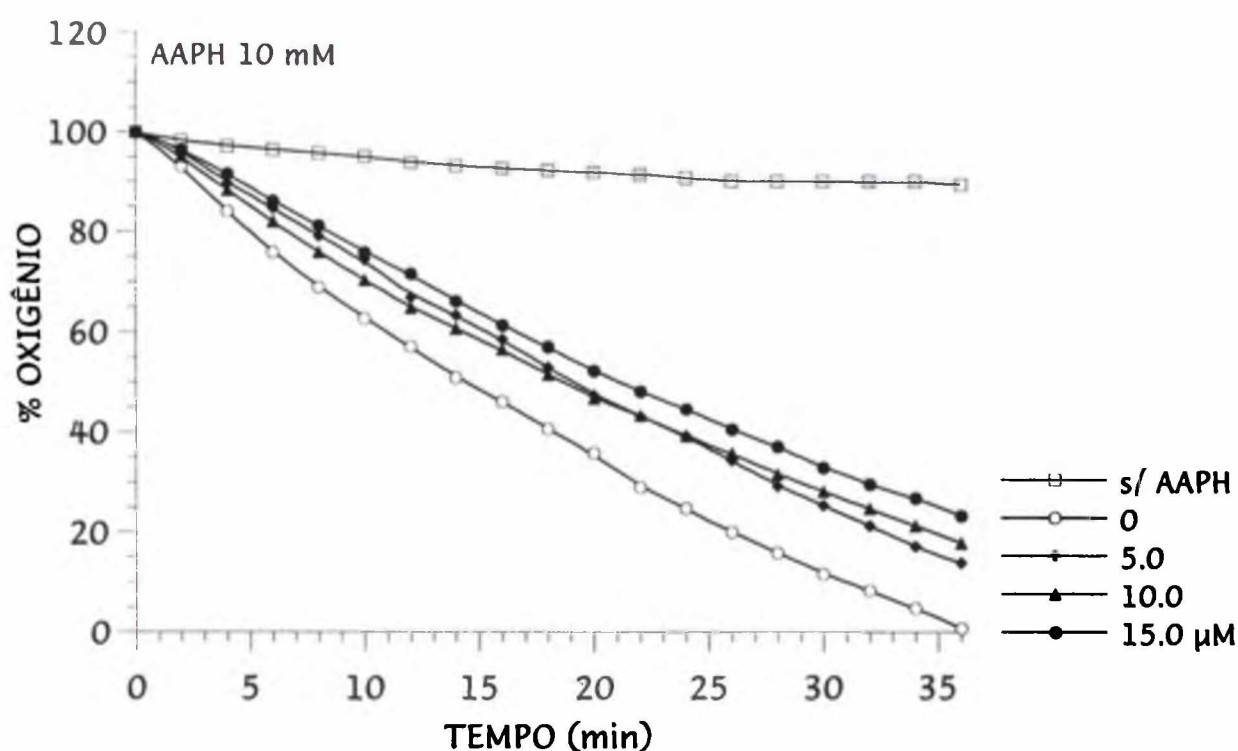


Figura. 45 Efeito da amiodarona sobre a lipoperoxidação induzida por radicais peróxil gerados pela decomposição térmica de AAPH em partículas submitocondriais de coração de boi, medida pelo consumo de oxigênio.

% Consumo de oxigênio durante a oxidação de partículas submitocondriais (0,5 mg proteínas), induzida por AAPH (10 mM) a 37° C, adicionado no tempo zero às SMP, na ausência (0 µM) e na presença de concentrações crescentes de amiodarona (5, 10 e 15 µM), em um meio de reação contendo TRIS 25 mM / HCl pH 7,4, KCl 125 mM, com um volume final de 1 mL.

A amiodarona foi pré-incubada por 5 minutos com as SMP.

A condição "s/ AAPH" representa as velocidades do consumo de oxigênio durante a autoxidação das SMP de coração de boi.

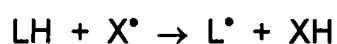
2.3.6. Determinação das cadeias alifáticas das membranas das partículas submitocondriais de coração de boi.

A quantificação das cadeias alifáticas dos fosfolipídeos das membranas de SMP por GLC, na ausência ou presença de AAPH, bem como na presença de amiodarona permitiu detectar a degradação oxidativa dos lipídeos, induzida por radicais livres e o efeito deste antiarrítmico neste processo (Tabela V).

A indução oxidativa com radicais peroxil, formados pela decomposição térmica do AAPH a 37° C, durante 1 hora e 30 minutos provoca uma diminuição acentuada das quantidades relativas dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas de SMP de coração de boi, com um conseqüente aumento das quantidades relativas dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados (Tabela V). Assim como para os liposomas de lipídeos mitocondriais, as alterações mais significativas observam-se para os ácidos graxos com 4 ou mais duplas ligações, os ácidos: eicosotetraenóico (araquidônico) (20:4), eicosopentaenóico (20:5), docopentaenóico (clupanodônico) (22:5) e docoso-hexaenóico (22:6). O ácido octadecatrienóico (linolênico) (18:3), sofre apenas uma pequena degradação, provavelmente pelas condições suaves de peroxidação usadas neste estudo.

Estes resultados estão sustentados pelo fato já perfeitamente demonstrado, de que a suscetibilidade das membranas biológicas à peroxidação lipídica depende da sua composição em ácidos graxos, aumentando com o aumento do teor de ácidos graxos poliinsaturados e com o grau de insaturação (TIEN e AUST, 1982; GARRIDO et al., 1989; ROJAS et al., 1993).

A peroxidação lipídica é iniciada com a subtração de um átomo de hidrogênio da cadeia acíclica (LH) por uma espécie química (normalmente um radical, X[•]) com reatividade suficiente para o efeito. Estes radicais podem ser os radicais peroxil, os quais nestes experimentos são formados a partir da decomposição térmica do azocomposto AAPH. Este radical peroxil é bastante estável (meia vida de 7 segundos) podendo difundir-se para além do local de formação, transportando assim a função oxidante para outros alvos (SIES, 1993).



No entanto, somente os hidrogênios ligados aos carbonos bis-alílicos são candidatos à subtração em condições normais, uma vez que é a estes que corresponde a ligação C-H mais fraca (KOPPENOL, 1990). Assim sendo, teoricamente, quanto maior for o número de hidrogênios em posição bis-alílica em um lipídeo, maior será sua suscetibilidade à oxidação. É o que acontece, por exemplo, com o ácido linolênico que tem apenas 2 H em posição bis-alílica e conseqüentemente tem uma capacidade de oxidação muito pequena, enquanto que o ácido araquidônico, que tem 6 H nesta posição tem suscetibilidade maior (BIELSKI et al., 1983; WAGNER et al., 1994).

A pré-incubação de amiodarona 5 e 10 µM nas referidas membranas diminui discretamente a degradação oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados, um efeito que parece depender das concentrações usadas. Como pode-se observar, ambas as quantidades usadas do antiarrítmico diminuem a degradação oxidativa das cadeias alifáticas. Este fato está demonstrado na Tabela V pelo aumento da

quantidade dos ácidos graxos, quando este aumento foi comparado com membranas cuja peroxidação foi induzida na ausência do fármaco.

Nas concentrações de amiodarona usadas não houve inibição total da degradação oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas de SMP. Observa-se um maior efeito inibitório na concentração de 10 μM , onde a porcentagem média variou ao redor de 25% nos picos mais afetados pela degradação, porém, nesta metodologia este percentual não representa uma ação antioxidante.

Estes resultados confirmam aqueles obtidos pela medida da degradação do *cis*-PnA e pelo consumo de oxigênio, quando as SMP foram oxidadas pelo AAPH.

A análise destes dados sugere que o mecanismo pelo qual a amiodarona age em presença de um substrato da cadeia respiratória (NADH), não é o mesmo quando se tem apenas radical peroxil sendo gerado na fase aquosa da membrana.

Tabela V: Composição das cadeias alifáticas dos fosfolipídeos das partículas submitocondriais de coração de boi (controle), após 1 hora e 30 minutos de peroxidação induzida por AAPH 30 mM a 37° C, na ausência (AAPH) e na presença de 5 µM e 10 µM de amiodarona, avaliada por cromatografia gás-líquido e expressa em % das cadeias alifáticas totais.

	Controle	AAPH	AMD 5 µM	AMD 10 µM
16:0 ald	7,57 ± 0,29	6,39 ± 0,35	5,83 ± 0,12	5,71 ± 0,07
16:0	12,58 ± 0,43	16,62 ± 0,54	15,34 ± 0,43	14,69 ± 0,20
18:0 ald	4,08 ± 0,43	4,08 ± 0,03	3,76 ± 0,13	3,85 ± 0,17
18:0	13,85 ± 0,24	17,08 ± 0,33	17,71 ± 0,22	17,06 ± 0,37
18:1	15,24 ± 0,04	19,01 ± 0,36	19,24 ± 0,18	18,97 ± 0,27
18:2	23,66 ± 0,19	23,23 ± 0,26	24,20 ± 0,20	24,20 ± 0,19
18:3	5,63 ± 0,10	4,45 ± 0,13	4,75 ± 0,03	4,72 ± 0,09
20:4*	9,68 ± 0,39	5,58 ± 0,57	5,77 ± 0,18	6,44 ± 0,39
20:5*	4,99 ± 0,21	1,93 ± 0,48	2,35 ± 0,26	2,72 ± 0,20
22:5*	2,02 ± 0,34	1,08 ± 0,05	1,03 ± 0,03	1,23 ± 0,14
22:6*	0,20 ± 0,01	0,04 ± 0,08	0,09 ± 0,08	0,14 ± 0,09

Os valores representam a média aritmética ± SD de determinações em triplicata.

** Ácidos graxos que sofreram uma maior degradação oxidativa.*

A designação ald refere-se às cadeias dimetilacetal das espécies fosfolipídicas plasmalogênicas.

V. DISCUSSÃO FINAL

V. DISCUSSÃO FINAL

Este trabalho teve por objetivo contribuir para o conhecimento dos efeitos da amiodarona sobre os fluxos de Ca^{2+} e a lipoperoxidação, principalmente com vistas a esclarecer os dados ambíguos da literatura referente aos efeitos inibitórios deste fármaco sobre a lipoperoxidação, descritos por REKKA et al. (1990) e por RIBEIRO et al. (1997).

O uso de modelos experimentais constituídos de membranas construídas artificialmente a partir de fosfatidilcolina de soja, ou de lipídeos extraídos de mitocôndrias isoladas de coração de boi ou ainda partículas submitocondriais de coração de boi, permitiu uma maior variedade de experimentos, onde foram analisados exclusivamente o efeito sobre a porção lipídica da membrana no caso das preparações liposômicas; e comparou-se com os efeitos causados pela presença de proteínas em membranas funcionais como no caso das SMP.

Neste trabalho, a lipoperoxidação foi monitorada pelo uso de métodos mais específicos do que TBARS, como a degradação oxidativa do PnA, consumo de oxigênio, medida dos dienos conjugados e cromatografia gás-líquido das cadeias de ésteres metílicos de ácidos graxos. O uso da sonda fluorescente ácido *cis*-parinárico é apropriado para monitorar o estágio inicial da lipoperoxidação. Este método oferece várias vantagens sobre outros métodos desde que é uma medida direta, sensível e conseqüentemente útil para monitorar cineticamente a suscetibilidade da lipoperoxidação em membranas (Van den BERG et al., 1988; CUSTÓDIO et al., 1994). A medida do "quenching" de fluorescência do PnA pode ser uma boa

alternativa sobre os outros métodos porque pode ser seguida continuamente, sem destruição da amostra (HINGH et al, 1995).

Segundo HINGH et al, (1995), a medida do consumo de oxigênio durante a etapa de propagação da lipoperoxidação também permite o registro contínuo da lipoperoxidação, e, embora indiretamente relacionado com a peroxidação, confirma os dados do PnA. Por outro lado, o monitoramento da formação de dienos conjugados, que são os primeiros produtos da oxidação lipídica, é eficiente em eliminar artifícios e interpretações equivocadas, permitindo uma melhor compreensão dos resultados alcançados com as outras metodologias.

Inicialmente, a lipoperoxidação foi medida em liposomas de fosfatidilcolina de soja e a oxidação foi induzida por Fe^{2+} /ácido ascórbico e pelos azocompostos AAPH e AMVN, respectivamente, na ausência e na presença de amiodarona. Em todas as situações, a amiodarona não alterou significativamente o perfil da oxidação, quando a geração do radical foi ativada na fase aquosa ou na fase lipídica dos modelos de membranas. A análise dos efeitos da amiodarona em liposomas de lipídeos extraídos de mitocôndrias de coração de boi, induzindo-se a lipoperoxidação por Fe^{2+} /ácido ascórbico e AAPH apresentou resultados semelhantes aos obtidos com PC de soja, mesmo quando o fármaco foi incorporado durante a preparação dos liposomas.

Possíveis artefatos e interpretações equivocadas foram descartados pela avaliação da degradação das cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídeos monitorada pela cromatografia gás-líquido, uma técnica confiável e específica para monitorar o processo de degradação oxidativa (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990). Os dados

obtidos pela análise por GLC essencialmente confirmaram que a amiodarona não exerce qualquer efeito significativo, como antioxidante ou pró-oxidante.

Apesar dos modelos serem constituídos de lipídeos qualitativamente diferentes, a amiodarona incorporou-se igualmente nos liposomas de fosfatidilcolina de soja e nos de lipídeos mitocondriais, o que está de acordo com CHATELAIN e LARUELL (1985), que descrevem uma similar incorporação do fármaco em diferentes sistemas lipídicos, como consequência de seu coeficiente de partição (ca. 10^6). Porém, a neutralidade dos efeitos da amiodarona sobre a lipoperoxidação nestes modelos, contrasta com os dados de REKKA et al. (1990) que descrevem uma inibição da lipoperoxidação não enzimática em fração inativa microssomal de fígado de rato. Estes autores realizaram análises baseadas na medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), onde uma expressiva proporção do malonaldeído (MDA) medido pode não ter sido formado durante a peroxidação, mas durante a formação e "quebra" dos peróxidos lipídicos no processo de aquecimento em meio ácido, especialmente na presença de metais catalíticos (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990).

Apesar dos resultados encontrados nos sistemas contendo liposomas, ao se utilizar preparações mais complexas, contendo proteínas, foi demonstrado que a amiodarona apresenta uma atividade inibitória na lipoperoxidação. Os resultados experimentais que permitiram tal afirmação foram aqueles obtidos nas preparações contendo partículas submitocondriais de coração de boi, onde a lipoperoxidação foi induzida com NADH/Fe²⁺, na ausência e presença de rotenona. Vale destacar que a atividade inibitória da lipoperoxidação em sistema mitocondrial foi também descrita por RIBEIRO et al. (1997), usando a técnica do TBARS. A inibição de maior

magnitude descrita por estes autores, pode estar relacionada ao método do TBARS, que como já mencionado é menos específico do que os usados neste trabalho. Embora a inibição da lipoperoxidação observada nas partículas submitocondriais possa estar relacionada com os efeitos já descritos do fármaco sobre o complexo I da cadeia respiratória (GUERREIRO et al, 1986 a, b; FROMENTI et al., 1990), não se pode excluir a possibilidade de uma relação com a inibição da fosfolipase A causada pela amiodarona (HOESTETLER e MATSUZAWA, 1981; HOESTETLER et al., 1986; HOESTETLER et al., 1988; KODAVANTI e MEHENDALE, 1991). Uma ausência de efeitos da amiodarona no processo oxidativo, pode ser vantajosa no seu uso terapêutico, já que os efeitos tóxicos relacionados com a lipoperoxidação podem ser descartados.

Tem sido proposto que o uso da amiodarona confere vantagens a pacientes que apresentam uma tendência a isquemia cardíaca (GILL et al., 1992). Mitocôndrias isoladas de coração isquêmico mostram um pronunciado decréscimo na velocidade respiratória, apesar de uma produção de ATP normal ou levemente reduzida (Di LISA et al., 1998), sendo que a insuficiência cardíaca seria reflexo de um desequilíbrio da economia celular, com a demanda de energia superando o suprimento (HANSFORD, 1994). Em relação aos fluxos de Ca^{2+} durante a insuficiência cardíaca, existem evidências de que o aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico estimula a demanda de energia, enquanto que o aumento na concentração de Ca^{2+} mitocondrial dentro da faixa fisiológica, estimula o suprimento. A situação biológica resultante do uso da amiodarona, leva a suposição de que os níveis de Ca^{2+} do citosol possam estar aumentados por ação do fármaco uma vez que concentrações de amiodarona na ordem de 30 μM inibiram o influxo de Ca^{2+}

mitocondrial em 79 %, acompanhado da inibição do efluxo da via dependente de Na^+ em 42 %, favorecendo portanto, a demanda de energia pela célula cardíaca isquêmica. Deve-se considerar, entretanto, que esta faixa de concentração está acima daquelas usadas em clínica. Já, nas baixas concentrações de amiodarona (5 a 15 μM), os efeitos sobre o influxo, embora presentes, foram menos drásticos assim como sobre o efluxo, porém, da mesma forma sugerem aumento do Ca^{2+} citosólico por ação deste fármaco. Esta situação poderia ser melhor definida através de experimentos utilizando cardiomiócitos intactos, e tratados com amiodarona, com a finalidade de se medir diretamente a concentração de Ca^{2+} citosólico.

O inchamento mitocondrial causado por Ca^{2+} e *t*-butilhidroperóxido, foi de menor magnitude pela presença de amiodarona, constituindo evidência de que o fármaco em baixas concentrações (15 μM) protege a mitocôndria frente ao fenômeno de transição de permeabilidade. Estes resultados somados a ausência de efeitos diretos da amiodarona sobre os lipídeos, e com aqueles indiretamente relacionados com a lipoperoxidação, sugerem que o efeito protetor do fármaco sobre a MTP poderia ser relacionado a inibição do influxo de Ca^{2+} mitocondrial. Esta condição seria vantajosa para situações de isquemia onde a sobrecarga de Ca^{2+} está relacionada com alterações morfológicas e funcionais da organela, que entre outras incluem o inchamento mitocondrial.

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

A amiodarona nas concentrações usadas, determinou os seguintes efeitos:

Sobre os Fluxos Mitocondriais de Ca^{2+} :

- Inibiu a captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias de coração de rato, utilizando glutamato ou succinato como substratos, assim como causou uma alteração no efeito cooperativo positivo deste sistema de captação de Ca^{2+} ;
- Inibiu o efluxo mitocondrial de Ca^{2+} , em coração de rato, pela via dependente de Na^+ e pelo reverso do uniporter, utilizando succinato como substrato;
- Inibiu o inchamento mitocondrial de coração de rato, energizado com glutamato ou succinato e induzido por Ca^{2+} e *t*-butilhidroperóxido.

Sobre a Lipoperoxidação :

- Não inibiu a lipoperoxidação em liposomas de fosfatidilcolina de soja, em liposomas de lipídeos mitocondriais e em partículas submitocondriais de coração de boi, induzida por Fe^{2+} /ácido ascórbico e radicais peroxil;
- Inibiu de modo expressivo o estágio final da lipoperoxidação em partículas submitocondriais de coração de boi, induzida pelo sistema $\text{NADH}/\text{Fe}^{2+}$ na ausência e presença de rotenona.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.C.; HOLT, D.W.; STOREY, C.A; MORLEY, A.R.; CALLAGHAN, J.; CAMPBELL, W.F. Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphologic changes during long-term therapy. **Circulation**, Dallas, v. 72, p. 1064-1075, 1985.
- ADAMS, P.C.; SLOAN, P.; MORLEY, A.R.; HOLT, D.W. Peripheral neutrophil inclusions in amiodarone treated patients. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v.22, p. 736-738, 1986.
- AHFS - Drug Information. Amiodarone Hydrochloride. **Am. Soc. Hospital Pharm.** , Bethesda , p.2363, 1992.
- AKERMAN, K.E.O; NICHOLLS, D.G. Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, Berlin, v. 95, p. 150-187, 1983.
- AKERMAN, K.E.O.; WINKSTRÖM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 68, p. 191-197, 1976.
- ALMOTREFI, A.A.; DZIMIR, N. The influence of potassium concentration on the inhibitory effect of amiodarone on guinea-pig microsomal Na⁺/K⁺ ATPase activity. **Pharmacol. Toxicol.** , Copenhagen, v. 69, p. 140-143 ,1991.
- ANDREASEN, F.; AGERBAEK, H.; BJERREGAARD, P.; GQTZSCHE, H. Pharmacokinetics of amiodarone after intravenous and oral administration. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v.19, p. 292-299, 1981.

- ANTONENKO, Y.N.; KINNALLY, K.W.; PERINI, S.; TEDESCHI, H. Selective effect of inhibitors on inner mitochondrial membrane channels. **Febs Lett.**, Amsterdam, v.285, n. 1, p. 89-93, 1991.
- ANTÔNIO, R.V.; PEREIRA da SILVA, L.; VERCESI, A.E. Alterations in mitochondrial Ca^{2+} flux by the antibiotic X-537A (lasalocid A). **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1056, p. 250-258, 1991.
- ANTUNES/MADEIRA, M.C.; MADEIRA, V.M.C. Membrane partitioning of organophosphorus and organochlorine insecticides and its implications for mechanism of toxicity. **Pestic. Sci.**, Chichester, v. 26, p. 167-179, 1989.
- ANTUNES/MADEIRA, M.C.; VIDEIRA, R.A.; KLÜPPEL, M.L.W.; MADEIRA, V.M.C. Amiodarone effects on membrane organization evaluated by fluorescence polarization. **Int. J. Cardiol.**, Shannon, v. 48, p. 211-218, 1995.
- ARANDA, F.J.; COUTINHO, A.; BERBERAN-SANTOS, M.N.; PRIETO, M.J.E.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.C. Fluorescence study of the location and dynamics of α -tocopherol in phospholipid vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.985, p. 26-32, 1989.
- BACQ, Z.M.; BKAKELEY, G.H.; SUMMERS, R.J. The effects of amiodarone, an alpha and beta receptor antagonist, on adrenergic transmission in the cat spleen. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.25, p. 1195-1199, 1976.
- BAIRD, G.D.; PERRY, S.V. The inhibitory action of relaxing factor preparations on the myofibrillar adenosine triphosphatase. **Biochem. J.**, London, v.77, p. 262-271, 1960.
- BARJA, G. Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? **Free Radical Res. Commun.**, Reading, v.18, n.2, p. 63-70, 1993.

BARROWCLIFFE, T.W.; GRAY, E.; KERRY, P.J.; GUTTERIDGE, J.M.C.

Triglyceride-rich lipoproteins are responsible for trombin generation induced by lipid peroxides. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.52, n. 1, p. 7-10, 1984.

BATEMAN, L.; BOLLAND, J.L.; GEE, G. Determination of absolute constant rate for olefinic oxidations by measurement of photochemical pre- and after effects. II. At "low" oxygen pressures. **Faraday Soc. Trans.**, London, v.47, p. 1274-1285, 1951.

BAUDINE, A.; CHAILLET, F.; CHALIER, R.; HOSSLET, A. Research on the benzofuran series. XXVI. General pharmacological effects of amiodarone. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, Ghent, v. 169, n. 2, p.469-481, 1967.

BEATRICE, M.C.; PALMER, J.W.; PFEIFFER, D.R.J. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential, and the retention of Ca^{2+} by mitochondria. **Biol. Chem.**, Berlin, v.255, p. 8663-8671, 1980.

BENEDETTI, A.; COMPORTI, M.; FULCIERI, R.; ESTERBAUER, E.; SCAHUR, R.J.; KHOSCHSORURU, G.A. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.796, p. 232, 1984.

BERNARDES, C.F.; FERREIRA-DA-SILVA, L.; VERCESI, A.E. *t*-butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg^{2+} and ATP. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.850, p. 41-48, 1986.

BERNARDI, P.; BASSO, E.; COLONNA, R.; CONSTANTINI, P.; DO LISA, F.; ERIKSSON, O.; FONTAINE, E.; FORTE, M.; ICHAS, F.; MASSARI, S.; NICOLLAI, A.; PETRONILLI, V.; SCORRANO, L. Perspectives on the mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1365, p. 200-206, 1998.

BERNARDI, P.; VASSANELLI, S.; VERONESI, P.; COLONNA, R.; SZABO, I.; ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 267, p. 2934-2939, 1992.

BEYER, R.E. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v.26, p. 349-357, 1994.

BIELSKI, B.H.J.; ARUDI, R.L.; SUTHERLAND, M.W. A study of the reactivity of HO_2/O_2^- with unsaturated fatty acids. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.258, p. 4759-4761, 1983.

BJORN-HANSEN, G.; TZSCHE, L.S.; BOYE, M. Amiodarone and thyroid hormone metabolism in the rat heart. **Acta Endocrinol.**, Copenhagen, v. 125, p. 675-679, 1991.

BOLLAND, J.L.; KOCH, H.P. The course of autoxidations reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part IX. The primary thermal oxidation product of ethyl linoleate. **J. Chem. Soc.**, London, p. 445-447, 1945.

BOLLAND, J.L.; TEN HAVE, P. Kinetic studies in the chemistry of rubber and related materials. IV. The inhibitory effect of hydroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate. **Faraday Soc. Trans.**, London, v.43, p. 201-210, 1947.

- BONATI, M.; GASPARI, F.; D'ARANNO, V.; BENFENATI, E.; NEYROZ, P.; GALLETI, F.; TOGNONI, G. Physicochemical and analytical characteristics of amiodarone. *J. Pharm. Sci.*, Washington, DC, v.73, p. 829-831, 1984.
- BÖTTCHER, C.J.F.; VAN GENT, C.M.; PRIES, C.A. A rapid and sub-micro phosphorus determination. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.24, p. 203-204, 1967.
- BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, London, v.128, p. 617-630, 1972.
- BRAGADIN, M.; POZZAN, T.; AZZONE, G.F. Kinetics of Ca^{2+} carrier in rat liver mitochondria. *Biochemistry*, Washington, DC, v.18, p. 5972-5978, 1979.
- BRIERLEY, G.P. The uptake and extrusion of monovalent cations by isolated heart mitochondria. *Mol. Cell Biochem.*, Dordrecht, v.10, p. 41-62, 1976.
- BROEKEMEIER, K.M.; DEMPSEY, M.E.; PFEIFFER, D.R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 264, p. 7826-7830, 1989.
- BROERKHUTSEN, J.; CLINET, M.; DELISE, C. Action of amiodarone on guinea pig heart sodium and potassium activated adenosine triphosphatase. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 21, p. 2951-2960, 1972.
- BRUCH, R.C.; THAYER, W.S. Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 733, p. 216-222, 1983.
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v.300, p. 535-543, 1993.

- BYGRAVE, F.L. Mitochondrial calcium transport. In: SANADI, D.R. **Current Topics in Bioenergetics**, San Diego, Academic Press, p. 260-318, 1977.
- BYGRAVE, F.L.; REED, K.C.; SPENCER, T. Cooperative interactions in energy-dependent accumulation of Ca^{2+} by isolated rat liver mitochondria. **Nat. New Biol.**, Hants, v.230, p. 89-91, 1971.
- CADENAS, E.; BOVERIS, A.; RAGAN, C.I.; STOPPANI, A. O.M. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.180, p. 248-257, 1977.
- CADENAS, E. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.49, p. 127-140, 1995.
- CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.58, p. 79-110, 1989.
- CADENAS, E.; BOVERIS, A. Enhancement of hydrogen peroxide formation by phosphores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. **Biochem. J.**, London, v.188, p. 31-37, 1980.
- CADENAS, E.; HOCHSTEIN, P.; ERNSTER, L. Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductase in mammalian cells. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v.65, p. 97-146, 1992.
- CANADA, A. T.; LESKO, L.J.; HAFFAJEE, C.I. Disposition of amiodarone in patients with tachyarrhythmias. **Curr. Ther. Res.**, Belle Mead, NJ, v39, p. 968-974, 1981.

- CANDINAS, R.; FRIELINGSDORF, J.; HÁ, H.R.; CARREL, T.; TURINA, M.; FOLLATH, F. Myocardial amiodarone concentrations after short- and long-term treatment in patients with end-stage heart failure. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v.53, p. 331-336, 1998.
- CARAFOLI, E.; CROMPTON, M. Regulation of intracellular calcium. **Curr. Top. Membr. Trasp.**, San Diego, v.10, p. 151-216, 1978.
- CARAFOLI, E. In **Miocardial Biology Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism** (DHALLA, N.S. ed), v.4, p. 393-406. University Park Press, Baltimore, 1974.
- CARAFOLI, E. Mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the calcium shifts in cardiac cells. In: HATT, P.Y. **Les surcharges cardiaques**, Paris: INSERM, 1972. p. 193-204.
- CARAFOLI, E. Mitochondrial, Ca^{2+} transport and the regulation of heart contraction and metabolism. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, London, v.7, n.2, p. 83-89, 1975.
- CARAFOLI, E. The calcium cycle of mitochondria. **Febs Lett.**, Amsterdam, v.105, n.1, p. 1-5, 1979.
- CARAFOLI, E.; TIOZZO, R.; ROSSI, C.S.; LUGLI, G. Mitochondrial Ca^{2+} uptake and heart relaxation. In: BOLIS, L.; KEINES, R.; WILBRANDT, W. **Role of membranes in secretory process**. Amsterdam: North Holland, 1972, p.175-181.
- CARBONERA, D.; ANGRILLI, A.; AZZONE, G.F. Mechanism of nitrofurantoin toxicity and oxidative stress in mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 936, p. 139-147, 1988.

- CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J. Bioener. Biomembr.**, New York, v.28, p. 525-531, 1996.
- CASTILHO, R.F.; KOWALROWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R., BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radical Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v. 18, p. 479-486, 1995a.
- CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; VERCESI, A.E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II) citrato or *t*-butylhidroperoxide in the presence of Ca^{2+} : effects of coenzyme Q redox state. **Free Radical Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v.18, n.1, p. 55-59, 1995b.
- CASTILHO, R.F.; KOWASLTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. 3,5,3'-triiodothyronine induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species and membrane potential thiol oxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**; Orlando, v.354, n.1, p. 151-157, 1998.
- CAVALLINI, L.; VALENTE, M.; BINDOLI, A. Comparison of cumenehydroperoxide- and $\text{NADPH/Fe}^{3+}/\text{ADP}$ -induced lipid peroxidation in heart and liver submitochondrial particles. Mechanisms of protection by succinate. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam v.795, n. 3, p. 466-472, 1984.
- CHARLIER, R. Cardiac action in the dog of a new antagonist of adrenergic excitation which does not produce competitive blocklage of adrenoceptores. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v.39, p. 668-674, 1970.

- CHARLIER, R.; BAUDINE, A.; CHAILLET, F. Research on the benzofuran series. XXXII. Mode of action of amiodarone on the cardiovascular system. **Arch. Int. Physiol. Biochem.**, Zutendaal, v. 75, n. 5, p. 787-808, 1967a.
- CHARLIER, R.; BAUDINE, A.; CHAILLET, F.; DELTOUR, G. Studies of the benzofuran series. XXV. Hemodynamic effects of amiodarone in the dog. **Acta Cardiol.**, v. 22, n. 4, p. 323-349, 1967b.
- CHARLIER, R.; DELTOUR, G.; BAUDINE, A. Studies on the benzofuran series. XXVII. Antagonism of amiodarone with respect to certain cardiovascular and metabolic effects of catecholamines in dogs. **Arch. Int. Physiol. Biochem.**, Zutendaal, v. 75, n. 3, p. 508-522, 1967c.
- CHARLIER, R.; DELTOUR, G.; BAUDINE, A.; CHAILLET, F. Pharmacology of amiodarone, an antianginal drug with a new biological profile. **Arzneim. Forsch.**, Aulendorf, v.18, p. 1405-1417, 1968.
- CHATELAIN, P.; FERREIRA, J.; RUYSSCHAERT, J.M. Amiodarone induced modifications of the phospholipid physical state. A fluorescence polarization study. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.35, p. 3007-3013, 1986.
- CHATELAIN, P.; LARUEL, R. Amiodarone partitioning with phospholipid bilayers and erythrocyte membranes. **J. Pharm. Sci.**, Washington, DC, v.74, p. 783-784, 1985.
- CHATELAIN, P.; LARUEL, R.; GILLARD, M. Effect of amiodarone on membrane fluidity and Na⁺/K⁺ ATPase activity in rat-brain synaptic membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 129, p. 148-154, 1985.

- CHAUDIÈRE, J. Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in living cells. In: RICE-EVANS, C.A.; BURBON, R.H. **Free Radical Damage and its Control**, 1994. p. 25-65.
- COASSIN, M.; TOMASI, A.; VANINI, V.; URSINI, F. Enzymatic recycling of oxidized ascorbate in pig heart: one-electron vs two electron pathway. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.290, p. 458-462, 1991.
- COLL, K.E.; JOSEPH, S.K.; CORBEY, B.E.; WILLIAMSON, J.R. Determination of the matrix free Ca^{2+} concentration and kinetics of Ca^{2+} efflux in liver and heart mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.257, p. 8696-8704, 1982.
- CONNERN, C.P.; HALESTRAP, A.P. Recruitment of mitochondrial cyclophylin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of an inner-membrane Ca^{2+} -dependent pore. **Biochim. J.**, London, v.302, p. 321-324, 1994.
- CONSTANTINESCU, A.; HAN, D.; PACKER, L. Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.268, p. 10906-10913, 1993.
- CORONGIU, F.P.; POLI, G.; DIANZANI M.U.; CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. Recognition of two classes of hydroperoxides formed under conditions in vivo. **Chem. Biol. Interact**, Shannon, v.59, n.2, p. 147-155, 1986.
- CORONGIU, F.P.; LAI, M.; MILIA, A. Carbon tetrachloride, bromotrichloromethane and ethanol acute intoxication. **Biochem. J.**, London, v.212, p. 625-631, 1983.
- COTGREAVE, I.A.; MOLDEÚS, P.; ORRENIUS, S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 28, p. 189-212, 1988.

- CROMPTON, M.; COSTI, A. A heart mitochondrial Ca^{2+} -dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. **Biochem. J.**, London, v.266, p. 33-39, 1990.
- CROMPTON, M.; HEID, I. The cycling of calcium, sodium and protons across the inner membranes of cardiac mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v.91, p. 599-608, 1978.
- CROMPTON, M.; CAPANO, M.; CARAFOLI, E. The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v.69, p. 453-462, 1976.
- CROMPTON, M.; CARAFOLI, E. The measurement of Ca^{2+} movements in mitochondria. **Methods Enzymol.**, New York, v.56, p. 338-352, 1979.
- CROMPTON, M.; COSTI, A.; HAYAT, L. Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} - dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. **Biochem. J.**, London, v. 245, p. 915-918, 1987.
- CROMPTON, M.; ELLINGER, H.; COSTI, A. Inhibition by Cyclosporin A of a Ca^{2+} - dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochem. J.**, London, v. 255, p. 357-360, 1988.
- CROMPTON, M.; KUNZI, M.; CARAFOLI, E. The induced and sodium induced effluxes of calcium from heart mitochondria: evidence for sodium-calcium exchange. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v.79, p. 549-558, 1977.
- CROMPTON, M.; MOSER, R.; LUDI, H.; CARAFOLI, E. The interaction between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v.82, p. 25-31, 1978.

- CROMPTON, M; SIEGEL, E.; SALZMANN, M.; CARAFOLI, E. A kinetic study of the energy-linked influx Ca^{2+} into heart mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v.69, p. 429-434, 1976.
- CULLIS, P.R.; DE KRUIJFF, B.; HOPE, M.J.; NAYAR, R.; RIETVELDS, A.; VERKLEIJ, A.J. Structural properties of phospholipids in the rat liver inner mitochondrial membrane. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.600, p. 625-635, 1980.
- CURTIS, M.T.; GILFORD, D.; FARBER, J.L. Lipid peroxidation increase the molecular order of microsomal membranes. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 235, p. 644-649, 1984.
- CURZIO, G. Interaction between neutrophils and 4-hydroxyalkenals and consequences on neutrophil motility. **Free Rad. Res. Commun.**, Reading, v. 5, n.2, p. 55-66, 1988.
- CUSTÓDIO, J.B.A.; DINIS, T.C.P.; ALMEIDA, L.M.; MADEIRA, V.M.C. Tamoxifen and hydroxytamoxifen as intramembraneous inhibitor of lipid peroxidation. Evidence for peroxy radical scavenging activity. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.47, n.11, p. 1989-1998, 1994.
- DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.822, p. 1-42, 1985.
- DAVIES, M.J.; SLATER, T.F. Studies on the metal-ion and lipoxygenase-catalysed breakdown of hydroperoxides using electron-spin-resonance spectroscopy. **Biochem. J.**, London, v.245, p. 167-173, 1987.
- DEL MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta. Physiol. Scand. Suppl.**, Oxford, v. 492, p. 153-168, 1980.

- DeLUCA, H.V.; ENGSTROM, G.W. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v.47, p. 1744-1754, 1961.
- DENTON, R.M.; HALESTRAP, A. P. Regulation of pyruvate metabolism in mammalian tissues. **Essays Biochem.**, London, v. 15, p. 37-77, 1979.
- DENTON, R.M.; McCORMACK, J.G. On the role the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. **Febs Lett.**, Amsterdam, v. 119, p. 1-8, 1980.
- DENTON, R.M.; McCORMACK, J.G. Ca^{2+} transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 249, p. 543, 1985.
- DENTON, R.M.; RANOVE, P.J.; MARTIN, B.R. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. **Biochem. J.**, London, v.128, n.1, p. 161-163, 1972.
- DEZIEL, M.R. DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B.; CODY, V.; GALINDO, J.JR.; BLAS, S.D. Interaction of amiodarone and its analogs with calmodulin. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 274, p. 463-470, 1989.
- DIANZANI, M.U.; UGAZIO, G. In: SLATER, T.F. **Biochemical mechanisms of liver injury**. London: Academic Press, 1978. p. 669-707.
- Di LISA, F.; MENABÒ, R.; CANTON, M.; PETRONILLI, V. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1366, n.1-2, p. 69-78, 1998.
- DINIS, T.C.P. **Peroxidação lipídica membranar. Actividade antioxidante de fármacos fenólicos (acetaminofeno, salicilato e 5-aminosalicilato)**. Coimbra, 1995. p.214. Tese (Doutoramento em Bioquímica), Universidade de Coimbra, Portugal.

- DINIS, T.C.P.; ALMEIDA, L.M.; MADEIRA, V.M.C. Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membranes: effect on functional and biophysical properties. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 301, p. 256-264, 1993.
- DITMER, J.C.; LESTER, R.L. A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin layer chromatography. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.5, p. 126-127, 1964.
- DOBA, T.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.835, p. 298-303, 1985.
- EICHENBERG, K.; BOHNI, P.; WINTERHALTER, K.H.; KAWARO, S.; RICHTER, C. Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain. **Febs Lett.**, Amsterdam, v. 142, p. 59-62, 1982.
- ERNSTER, L. Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications. In: YAGI, K. **Active Oxygens, Lipid Peroxides, and Antioxidants**. Boca Raton: CRC, 1993. P. 1-38.
- ERNSTER, L.; FORSMARK-ANDRÉE, P. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. **Clin. Invest.**, Berlin, v.71, p. s60-s65, 1993.
- ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measured of ADP/O. **Methods Enzymol.**, New York. Academic Press, v. X, p. 41-47, 1967.

- ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v.11, p. 81-128, 1991.
- ESTERBAUER, H.; STRIEGL, G.; PUHL, H.; ROTHENEDER, M. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. **Free Rad. Res. Commu.**, Reading, v.6, n.1, p. 67-75, 1989.
- ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H.; SCHAUR, R.J.; **ISI Atlas Sci. Biochem.**, Philadelphia, v.1, p. 311, 1988.
- ETO, Y.; KANG, D.; EIJI, H.; TAKESHIGE, K. MINAKAMI, S. Succinate-dependent lipid peroxidation and its prevention by reduced ubiquinone in beef heart submitochondrial particles. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.295, n. 1, p. 101-106, 1992.
- FAGIAN, M.M.; PEREIRA DA SILVA, L; MARTINS, I.S.; VERCESI, A.E. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.265, n. 32, p. 19955-19960, 1990.
- FAUNBURG, B.; FINKEL, R.M.; MARTONOSI, A. The role calcium in the mechanism of relaxation of cardiac muscle. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.239, p. 2298-2306, 1964.
- FARMER, E.H.; SUTTON, D.A. The course of autoxidation reactions in polyisoprened and allied compounds. Part V. Observations of fish-oil acids. **J. Chem. Soc. (London)**, p. 122-125, 1943.

- FERNANDES, R.; PEREIRA, P.; RAMALHO, J.S.; MOTA, M.C.; OLIVEIRA, C.R. An experimental model for the evaluation of lipid peroxidation in lens membranes. **Curr. Eye Res.**, Oxford, v.15, p.395-402, 1996.
- FERREIRA, J.; CHATELAIN, P.; CASPERS, J.; RUYSSCHAERT, J.M. Ionization state of amiodarone mediates its mode of interaction with lipids bilayers. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.36, p. 4245-4250, 1987.
- FERRERO, C.; BEM ABDERHAMANE, M. Terapia medica del flutter atriale. **G. Ital. Cardiol.**, Padua, v.2, n. 1, p. 186, 1972.
- FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. LXVI, p.375-400, 1925.
- FISKUM, G.; LEHNINGER, A.L. Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{2+}$ antiport. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 254, p. 6236,1979.
- FREEMAN, M.D.; SOMBERG, J.C. Pharmacology and pharmacokinetics of amiodarone. **J. Clin. Pharmacol.**, Hagerstown, v. 31, p. 1061-1069,1991.
- FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.256, p. 10986-10992, 1981.
- FRIDOVICH, I. Biologic effects of the superoxide radical. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.247, p. 1-11, 1986.
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science (Wash., DC)**, v.201, p. 875-880, 1978.

- FROMENTY, B.; FISCH, C.; BERSON, A.; LETTERON, P.; LARREY, D.; PESSAYRE, D. Dual effect of amiodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect followed by inhibition of the respiratory chain at the levels of complex I and complex II. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.255, n.3, p. 1377-1384, 1990.
- FUTTERMAN, L.G.; LEMBERG, L. Amiodarone: a late comer. **Am. J. Crit. Care**, Aliso Viejo, v.6, n 3, p. 233-239, 1997.
- GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polynsaturated fatty acids. **Free Radical Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v.7, p. 65-86, 1989.
- GARRIDO, A.; GARRIDO, F.; GUERRA, R.; VALENZUELA, A. Ingestion of high doses of fish oil increases the susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress. **Lipids**, Champaign, v.24, p. 833-835, 1989.
- GERGELY, J.; PRAGAY, P.; SCHOLZ, A.F.; SEIDEL, J.C.; STRETER, F.A.; THOMPSON, M.M. Comparative studies in white and red muscle. In: **Molecular Biology of Muscle Contraction. Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.9, p. 145-159, 1965.
- GILL, J.; HEEL, R.C.; FITTON, A. Amiodarone. An overview of its pharmacological properties, and review of its therapeutics use in cardiac arrhythmias. **Drugs**, Auckland, v. 43, p. 69-110, 1992.
- GIULIVI, C.; CADENAS, E. The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. **Febs Lett.**, Amsterdam, v.337, p. 287-290, 1993.
- GLINN, M.; ERNSTER, L.; LEE, C.P. Initiation of lipid peroxidation in submitochondrial particles: effect of respiratory inhibitors. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.290, n. 1, p. 57-65, 1991.

- GODDARD, C.J.R.; WHORWELL, P.J. Amiodarone overdose and its management. **Br. J. Clin. Pract.**, London, v.43, n. 5, p. 184-186, 1989.
- GONÇALVES, E.; ALMEIDA, L.M.; DINIS, T.C.P. Antioxidant activity of 5-aminosalicylic acid against peroxidation of phosphatidyl choline liposomes in the presence of α -tocopherol. A synergistic interaction? **Free Rad. Res.**, Reading, v.29, p. 53-66, 1998.
- GOODMAN GILMAN, A.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8^o ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1991. p. 1232.
- GORDON, T. Purity of catalase preparations: contamination by endotoxin and its role in the inhibition of airway inflammation. **J. Free Radicals Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v.2, n.5/6, p. 373-375, 1986.
- GRIJALBA, M.T.; VERCESI, A.E.; SCHREIER, S. BRASILIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. (25., Caxambú, 1996). Annual Meeting , 1996. p. 151. Resumo.
- GUERREIRO, M.H.C.P.M. **Estudo bioquímico dos efeitos do cloridrato de amiodarona em mitocôndrias**. Curitiba, 1984. p. 81. Tese (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná.
- GUERREIRO, M.H.C.P.M.; CAMPELLO, A.P.; LOPES, L.C.V.; KLÜPPEL, M.L.W. Effect of amiodarone and mitochondrial energy-linked reactins and on mitochondrial morphology. **Arq. Biol. Tecnol. (Curitiba)**, v. 29, p. 621-631, 1986a.

- GUERREIRO, M.H.C.P.M.; LOPES, L.C.V.; CAMPELLO, A.P.; KLÜPPEL, M.L.W. Effect of amiodarone on mitochondrial membranes. **Arq. Biol. Tecnol. (Curitiba)**, v. 29, p. 675-684, 1986b.
- GUNTER, K.K.; GUNTER, T.E. Transport of calcium by mitochondria. **J. Bioener. Biomembr.**, New York, v.26, n.5, p. 471-485, 1994.
- GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.; GAVIN, C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.267, p. C313-C339, 1994.
- GUNTER, T.E.; PFEIFFER, D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 258, p. C755-C786, 1990.
- GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, v.15, p. 129-135, 1990.
- GUTTERIDGE, J.M.; LAMPORT, P.; DORMANDY, T.L. The antibacterial effect of water-soluble compounds from antioxidising linolenic acid. **J. Med. Microbiol.**, Endinburgh, v.9, n. 1, p. 105-110, 1976.
- GUTTERIDGE, J.M.; ROWLEY, O.A. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. **Biochem. J.**, London, v. 206, p. 605-609, 1982.
- HACKENBROCK, C.R.; CAPLAN, A.I. Ion-induced ultrastructural transformations in isolated mitochondria. The energized uptake of calcium. **J. Cell Biol.**, New York, v.42, p. 221-234, 1969.

- HAFFAJEE, C.I.; LOVE, J.C.; CANADA, A.T.; LESKO, L.J.; ADOURIAN, G.; ALPERT, J.S. Clinical pharmacokinetics and efficacy of amiodarone for refractory tachyarrhythmias. **Circulation**, Dallas, v.67, p. 1347-1355, 1983.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, London, v.219, p.1-14, 1984.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 2nd ed, Oxford: Oxford University, 1989. p. 543.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, New York, v.59, n. 5, p. 1609-1623, 1992.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr. Rev.**, Washington, DC, v. 52, p. 252-265, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Superoxide and superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals are important in oxygen toxicity. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, v.3, p. 270-272, 1982.
- HANSFORD, R.G. Effect of micromolar concentrations of free Ca^{2+} ions on pyruvate dehydrogenase interconversion in intact rat heart mitochondria. **Biochem. J.**, London, v.194, p. 1-11, 1981.
- HANSFORD, R.G. Physiological role of mitochondrial Ca^{2+} transport. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v. 26, n. 5, p. 495-508, 1994.
- HANSFORD, R.G. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, Berlin, v. 102, p. 1-72, 1985.

- HAUGAARD, N.; HAUGAARD, E.S.; LEE, N.H.; HORN, R.S. Possible role of mitochondria in the regulation of cardiac contractility. **Fed. Proc.**, Bethesda, v.20, p. 1657-1662, 1969.
- HAWORTH, R.A.; HUNTER, D.R. The calcium-induced membrane transition. II. Nature of the calcium trigger site. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.195, p. 460-467, 1979.
- HEATON, G.M.; NICHOLLS, D.G. The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. **Biochem. J.**, London, v.156, p. 635-646, 1976.
- HERMES-LIMA, M.; VALLE, V.G.R.; VERGESI, A.E.; BECHARA, E.J.H. Damage to rat liver mitochondria promoted by δ -aminolevuline acid-generated reactive oxygen species connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1056, p. 57-63, 1991.
- HINGH, Y.C.M.; MEYER, J.; FISCHER, J.C.; BERGER, R.; SMEITINK, J.A.M.; OP den KAMP, J.A.F. Direct measurement of lipid peroxidation in submitochondrial particles. **Biochemistry**, Washington, DC, v.34, p. 12755-12760, 1995.
- HOESTETLER, K.Y.; GIORDANO, J.R.; JELLISON, E.J. *In vitro* inhibition of lysosomal phospholipase A₁ of rat lung by amiodarone and desethylamiodarone. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.959, p. 316-321, 1988.
- HOESTETLER, K.Y.; MATSUZAWA, Y. Studies on the mechanism of drug-induced lipodosis. Cationic amphiphilic drug inhibition of lysosomal phospholipases A and C. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 30, p. 1121-1126, 1981.

- HOESTLER, K.Y.; REASOR, M.J.; WALKER, E.R.; YAZAKI, P.W.; FRAZEE, B.W.
Role of phospholipase A inhibition in amiodarone pulmonary toxicity rats.
Biochim. Biophys. Acta., Amsterdam, v.875, p. 400-405, 1986.
- HOLLAND, M.K., ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation in
rabbit epididymal spermatozoa; its effect on sperm motility. **Biol. Reprod.**,
Madison, v.27, n. 5, p. 1102-1108, 1982.
- HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. The Ca^{2+} - induced membrane transition in
mitochondria. I. The protective mechanism. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando,
v. 195, p. 453-459, 1979a.
- HUNTER, D.R.; HAWORTH, R.A. The Ca^{2+} - induced membrane transition in
mitochondria. III. Transitional Ca^{2+} release. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando,
v. 195, p. 468-477, 1979b.
- HUTSON, S.M.; PFEIFFER, D.R.; LARPY, H.A. Effect of cations and anions on the
steady state kinetics of energy-dependent Ca^{2+} transport in rat liver mitochondria.
J. Biol. Chem., Bethesda, v.251, p. 5251-5258, 1976.
- INGOLD, K.U. The influence of alkali on the oxidation of tetralin. **Can. J. Chem.**,
Ottawa, v.34, p. 600-608, 1956.
- INGRAM, D.V. Ocular effects on long-term amiodarone therapy. **Am. Heart J.**, St.
Louis, v.106, n. 4, pt. 2, p.902-905, 1983.
- JACIN, H.; MISTTKIN, A.R. Separation of carbohydrates on borate impregnated
silica gel G plates. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.18, p. 170-173, 1965.
- JENDRASIAK, G.L.; McINTOSH, T.J.; RIBEIRO, A.; PORTER, R.S. Amiodarone-
liposome interaction: a multinuclear NMR and X-ray diffraction study. **Biochim.**
Biophys. Acta., Amsterdam, v. 1024, p. 19-31, 1990.

- KAGAN, V.E.; SHVEDOVA, A., SERBINOVA, E.; KHAN, S.; SWANSON, C.; POWELL, R.; PACKER, L. Dihydrolipoic acid-9 universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.44, p. 1637-1649, 1992.
- KAISER, S.; DI MASCIO, P.; MURPHY, M.E.; SIES, H. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.277, p. 101-108, 1990.
- KANNAN, R.; CHOPRA, I.J.; DOKHTENS, M.; SING, B.N. Effect of amiodarone on non-deiodinative pathway of thyroid hormone metabolism. **Acta Endocrinol.**, Oslo, v. 122, p. 249-254, 1990.
- KAPLAN, L.J.; CAPPAERT, W.E. Amiodarone-induced corneal deposits. **Ann. Ophthalmol.**, Ridgefield, v.16, p. 762-766, 1984.
- KAPPUS, H.; KIEUZA, H.; MULIAWAN, H.; SCHULZE, R.M.; OTTEN WALDER, H. In: SNYDER, R.; PARKE, D.V.; KOCSIS, D.J.; JOLLOW, G.G.; WITMER, C.M. **Biological Reactive Intermediates II**. New York: Plenum, 1982. p. 779-791.
- KASPARINSKY, F.O.; VINOGRADOV, A.D. Slow Ca^{2+} -induced inactive/active transition of the energy-dependent Ca^{2+} transporting system of rat liver mitochondria: due for Ca^{2+} influx cooperativity. **Febs Lett.**, Amsterdam, v.389, p. 293-296, 1996.
- KLIMEK, J.; SCHAPP, P.; KIMURA, T. The relationship between NADH-dependent lipi-peroxidation and degradation of cytochrome P-450 in adrenal cortex mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.110, p. 559-566, 1983.

- KODAMA, I.; KAMIYA, K.; TOYAMA, J. Cellular electropharmacology of amiodarone. **Cardiovasc. Res.**, London, v.35, p. 13-29, 1997.
- KODAVANTI, P.R.; PENTYALA, S.N.; YALLAPRAGADA, P.R.; DESAIAH, D. Amiodarone and desethylamiodarone increase intrasynaptosomal free calcium through receptor mediated channel. **Naunyn-schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, Berlin, v. 345, p. 213-221, 1992.
- KODAVANTI, U.P.; MEHENDALE, H.M. Amiodarone and desethylamiodarone - induced pulmonary phospholipidosis, inhibition of phospholipases in vivo, and alterations of [¹⁴C] amiodarone uptake by perfused lung. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, New York, v. 4, p. 369-378, 1991.
- KOPPENOL, W.H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. **Febs Lett.**, Amsterdam, v.264, p. 165-167, 1990.
- KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; GRIJALBA, M.T.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.271, p. 2929-2934, 1996.
- KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Ca²⁺-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.269, n. 1, p. C141-C147, 1995.
- KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v. 26, n. 3/4, p. 463-471, 1999.

- KOWEY, P.R.; MARINCHAK, R.A.; RIALS, S.J.; BHARUCHA, D. Pharmacologic and pharmacokinetic profile of class III antiarrhythmic drugs. **Am. J. Cardiol.**, Newton, v.80, n. 8, p. 16G-23G, 1997.
- KUYPERS, F.A.; VAN den BERG, J.J.M.; SCHALKWIJK, C.; ROELOFSEN, B.; OP den KAMP, J.A.F. Parinaric acid as a sensitive fluorescent probe for the determination of lipid peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.921, p. 266-274, 1987.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (Lond.)**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LALLOZ, M.R.A.; BYEFIELD, P.G.H.; GREENWOOD, R.M. Binding of amiodarone by serum proteins and the effects of drugs, hormones and others interacting ligands. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v.36, p. 366-372, 1984.
- LARANJINHA, J.A.; ALMEIDA, L.M.; MADEIRA, V.M.C. Lipid peroxidation and its inhibition in low density lipoproteins: quenching of *cis*-parinaric acid fluorescence. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.297, p.147-154, 1992.
- LEHNINGER, A.L. Ca^{2+} transport by mitochondria and its possible role in the cardiac contraction-relaxation cycle. **Circ. Res.**, Dallas, v. 3, p. 83-90, 1974.
- LEHNINGER, A.L. In: SHULTZ, J.; CAMERON, B.F. **The molecular basis of electron transport**. New York: Academic Press, 1973. p. 259-273.
- LEHNINGER, A.L. Mitochondria and calcium ion transport: the fifth jubilee lecture. **Biochem. J.**, London, v. 119, p. 129-138, 1970.
- LEMASTERS, J.J.; NIEMINEN, A.L. Mitochondrial oxygen radical formation during reductive and oxidative stress to intact hepatocytes. **Biosci. Rep.**, New York, v.17, n. 3, p. 281-291, 1997.

- LI, A.S.; CHIGNELL, C.F. Spectroscopic studies of cutaneous photosensitizing agents IX. A spin trapping study of the photolysis of amiodarone and desethylamiodarone. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v. 45, p. 191-197, 1987.
- LIND, C.; HOCHSTEIN, P.; ERNESTER, L. DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.216, p. 178-185, 1982.
- LOW, H.; VALLIN, I. Succinate-linked diphosphorydine nucleotide reduction in submitochondrial particles. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.69, p. 361-374, 1963.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.C.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LÜLLMANN, H.; LULLMANN-RAUCH, R.; WASSERMAN, D. Lipidosis induced by amphiphilic cationic drugs. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 27, p. 1103-1108, 1978.
- MacDONALD, R.C.; MacDONALD, R.I.; MENCO, B.; TAKESHITA, K.; SUBBARAO, N.K.; HU, L. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, Orlando, v.1061, p. 297-303, 1991.
- MADEIRA, V.M.C.; ANTUNES-MADEIRA, M.C. Lipid composition of biomembranes: a complete analysis of sarcoplasmatic reticulum phospholipids. **Cienc. Biol.**, Coimbra, v.2, p. 265-291, 1976.

- MADESH, M.; BALASUBRANIAN, K.A. Cyclosporin A inhibits oxidant and calcium stimulated phospholipase D activity in the rat intestinal mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1389, p. 206-212, 1998.
- MAIORINO, M.; URSINI, F. Synergistic effect of lipid hydroperoxyl radical scavenging and lipid hydroperoxide reductions in the inhibition of lipid peroxidation in biomembranes. In: ONG, A.S.H.; PACKER, L. **Lipid-soluble antioxidants: Biochemistry and clinical applications**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1992. p. 47-51.
- MAIORINO, M.; GREGOLIN, C.; URSINI, F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, New York, v.186, p. 448-457, 1990.
- MALIS, C.D.; BONVENTRE, V.J. J.Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 261, p. 14201-14208, 1986.
- MANTYJARVI, M.; TUPPURAINEN, K.; IKÄHEIMO, K. Ocular side effects of amiodarone. **Surv. Ophthalmol.**, Brokline, v.42, n 4, p. 360-366, 1998.
- MARTINDALE, The Extra Pharmacopeia, REYNOLDS, J.E.F., 2nd ed, London. The Pharmaceutical Press, 1989. p. 1896.
- MARTINS, I.S.; CARNIERI, E.G.S.; VERCESI, A.E. Characteristics of Ca²⁺ transport by corn mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.850, p. 49-56, 1986.
- MASON, J.W. Amiodarone toxicity study group. Toxicity of amiodarone. **Circulation**, Dallas, v.72, suppl III, p. III-272, 1985.
- MASON, J.W. Amiodarone. Drug Therapy. **N. Eng. J. Med.**, Boston, v. 316, p. 455-466, 1987.

McBRIEN, D.C.H.; SLATER, T.F. **Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer.**

London: Academic Press, 1982.

McGOVERN, B.; GARAN, H.; KELLY, E.; RUSKIN, J.N. Adverse reactions during treatment with amiodarone hydrochloride. **Br. Med. J.**, London, v. 287, p. 175-180, 1983.

McMILLIN-WOOD, J.; WOLKOWICZ, P.E.; CHU, A.; TATE, C.A.; GOLDSTONE, M.A.; ENTMAN, M.L. Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart. **Biochem. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.591, p. 251-265, 1980.

MEHENDALE, H.M.; ROTH, R.A.; GANDOLFI, A.J.; KLAUNIG, J.E.; LEMASTERS, J.J.; CURTIS, L.R. Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity. **FASEB J.**, Bethesda, v.8, p.1285-1295, 1994.

MEISTER, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.269, p. 9397-9400, 1994.

MELA, L. Interactions of La^{2+} and local anesthetic drugs with mitochondrial Ca^{2+} and Mn^{2+} uptake. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.123, p. 286-293, 1968.

MIKI, M.; MOTOYAMA, T.; MINO, M. Synergistic inhibition of oxidation in RBC ghosts by vitamin C and E. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, New York, v.570, p. 474-477, 1989.

MINOTTI, G.; AUST, S.D. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. **Lipids**, Champaign, v.27, n.3, p. 219-226, 1992.

MITCHELL, P.; MOYLE, M. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, Amsterdam, v. 7, p. 471-484, 1969.

- MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. **J. Mol. Biol.**, London, v.12, p. 88-118, 1965.
- MOORE, C.L. Specific inhibition of mitochondrial calcium transport by ruthenium red. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.42, p. 298-305, 1971.
- MORADY, F.; SAUVE, M. J.; MALONE, P.; SHEN, E.N.; SCWARTZ, A.B.; BHANDARI, A.; KEUNG, E.; SUNG, R.J.; SCHEINMAN, M.M. Long-term efficacy and toxicity of high-dose amiodarone therapy for ventricular tachycardia or ventricular fibrillation. **Am. J. Cardiol.**, Newton, v.52, p. 975-979, 1983.
- MORENO, S.N.J.; VERCESI, A.E.; PINGANATARO, D.P.; DOCAMPO, R. Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi amastigotis* presence of inositol phosphates and lack of an inositol-1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium pool . **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 52, p. 251-262, 1991.
- MURPHY, E.J.; PROWS, D.R.; JEFFERSON, J.R.; SCHROEDER, F. Liver fatty acid-binding protein expression in transfected fibroblasts stimulates fatty acid uptake and metabolism. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1301, p.191-198, 1996.
- MUSCATELLO, U.; ANDERSON-CEDERGREN, E.; AZZONE, G.F. The mechanism of muscle fiber relaxation. Adenosine triphosphatase and relaxing activity of the sarcotular system. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.63, p. 55-74, 1962.
- MUSTAFA, M.G.; UTSUMI, K.E.; PACKER, L. Damped oscillatory control of mitochondrial respiration and volume. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.24, p. 381-385, 1966.

- NARABAYASHI, H.; TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. Alteration of inner-membrane components and damage to electron-transfer activities of bovine heart submitochondrial particles induced by NADPH-dependent lipid peroxidation. **Biochem. J.**, London, v. 202, p. 97-105, 1982.
- NAVAS, P.; VILLALBA, J.M.; CÓRDOBA, F. Ascorbate functions at the plasma membrane. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1197, p. 1-13, 1994.
- NEDERGAARD, J. Na⁺-dependent regulation of extramitochondrial Ca²⁺ by rat-liver mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v.144, p. 159-168, 1984.
- NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics (2)**. 2^a ed. New York: Academic Press, 1992. P. 212.
- NICHOLLS, D.G. Calcium transport and proton electrochemical gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. **Biochem. J.**, London, v.170, p. 511-522, 1978 a.
- NICHOLLS, D.G. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. **Biochem. J.**, London, v. 176, p. 463-474, 1978 b.
- NICHOLLS, D.G.; AKERMAN, K.E.O. Mitochondrial calcium transport. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.683, n.1, p. 57-88, 1982.
- NICOLLI, A.; BASSO, E.; PETRONILLI, V.; WEGNER, R.M.; BERNARDI, P. Interactions of cyclophilin with with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.271, p. 2185-2192, 1996.
- NIKI, E. Antioxidant defenses in eukariotic cells: an overview. In: POLLI, G; ALBANO, E.; DIANZINI, M.U. **Free Radicals: from basic science to medicine**. Basel: Birkhäuser, 1993. p. 365-373.

- NIKI, E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. **Chem. Phys. Lipids**, Limerick, v.44, p. 227-253, 1987.
- NIKI, E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. **Chem. Phys. Lipids**, Limerick, v.44, n.2-4, p. 227-253, 1987.
- NIKI, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. **Methods Enzymol.**, New York, v.186, p. 101-109, 1990.
- NIKI, E.; SAITO, T.; KAWAKAMI, A.; KAMIYA, Y. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.259, p. 4177-4182, 1984.
- NOHL, H.; JORDAN, W. The involvement of biological quinones in the formation of the hydroxyl radicals via the Haber-Weiss reaction. **Bioorg. Chem.**, Orlando, v.15, n.4, p.374-382, 1987.
- NOVGORODOV, S.A.; GUDZ, T.I.; BRIERLEY, G.P.; PFEIFFER, D.R. Drugs and the heart. III. Calcium antagonists. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.311, p. 219-228, 1994.
- PAILLOUS, N.; VERRIER, M. Photolysis of amiodarone, an antiarrhythmic drug. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v. 47, p. 337-343, 1988.
- PAILLOUS, N.; FERY-FORGUES, S. Is there a link between the phototoxic or antioxidant properties of amiodarone, and antiarrhythmic drug, and its lipophilic character? **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.8, p. 851-857, 1994.
- PALOZZA, P.; KRINSKY, H.F. The inhibition of radical-initiated peroxidation of microsomal lipids by both α -tocopherol and β -carotene. **Free Radical Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v.11, p. 407-414, 1991.

- PARR, D.R.; HARRIS, E.J. The effect of lead on the calcium-handling capacity of rat heart mitochondria. **Biochem. J.**, London, v.158, n. 2, p. 289-294, 1976.
- PASTORINO, J.G.; SYNDER, J.W.; SERRONI, A.; HOEK, J.B.; FARBER, J.L. Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 268, p. 13791-13798, 1993.
- PATRIARCA, P.; CARAFOLI, E. A study of the intracellular transport of calcium in rat heart. **J. Cell Physiol.**, New York, v.72, p. 29-38, 1968.
- PENIN, F.; GODINOT, G. COMTE, J.; GAUTHERON, D.C. Vesicular preparation of a highly coupled ATP-ase-ATP syntase complex from pig heart mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 679, p. 198-209, 1982.
- PFEIFER, P.; McCAY, P. Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.247, p. 6763-6769, 1972.
- PFEIFFER, D.R.; SCMID, P.C.; BEATRICE, M.C.; SCMID, H. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca^{2+} plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.254, n.22, p. 11485-11494, 1979.
- PODRID, P.J. Amiodarone: Reevaluation of an old drug. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 122, p. 689-700, 1995.
- PINTO, N.C.S. Dissertação (Tese de Mestrado) São Paulo, 1993. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

- PLOMP, T.A.; HAUER, R.N.; ROBLES DE MEDINA, E.O. Amiodarone and desethylamiodarone concentration in plasma and tissues of surgically treated patients on long-term oral amiodarone treatment. *In Vivo (Attiki)*, v. 4, p. 97-100, 1990.
- PODRID, P.J. Therapy with and assesment of class III antiarrhythmic agents in different pacient populations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, New York, v.20 (suppl. 2), p. S44-S58, 1992.
- POLSTER, P.; BROEKHUYSEN, J. The adrenergic antagonism of amiodarone. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v.25, p. 131-134, 1976.
- PORTER, A.N. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.*, Washington, DC, v.19, p. 262-268, 1986.
- PORTER, A.N.; LEHMAN, L.S.; WEBER, B.A. and SMITH, K.J. Unified mechanism for polynsaturated fatty acid autoxidation. Competition of peroxy radical hydrogen atom abstraction, β -scission, and cyclization. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, DC, v.103, p. 6447-6455, 1981.
- PORTER, N.A. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, New York, v.105, p. 273-282, 1984.
- PRASADA, K.S.; RAO, S.B.; CAMUS, P.H.; MEHENDALE, H.M. Effect of amiodarone on Na^+ - K^+ ATPase and Mg^{2+} ATPase activities in rat brain synaptosomes. *Cell Biochem. Funct.*, Chichester, v. 4, p. 143-151 , 1986.
- PRYOR, W.A.; CASTLE, L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol.*, New York, v.105, p. 293-299, 1984.

- PRYOR, W.A.; STANLEY, J.P. A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. **J. Org. Chem.**, Washington, DC, v.40, p. 3615-3617, 1975.
- PRYOR, W.A. The role of free radical reactions in biological systems. In: PRYOR, W.A. **Free Rad. Biol. Med.** New York: Academic Press, 1976. v.1.
- PUSKIN, J.S.; GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; RUSSELL, P.R. Evidence for more than one Ca^{2+} transport mechanism in mitochondria. **Biochemistry**, Washington, DC, v.15, p. 3834-3842, 1976.
- RAEDER, E.A.; PODRID, P.J.; LOWN, B. Side effects and complications of amiodarone therapy. **Am. Heart J.**, St. Louis, v.109, p. 975-983, 1985.
- REASOR, M.J.; McCLOUD, C.M.; BEARD, T.L.; EBERT, D.C.; KACEW, S.; GARDNER, M.F.; ALDERN, K.A.; HOESTETLER, K.Y. Comparative evaluation of amiodarone-induced phospholipidosis and drug accumulation in Fischer-344 and Sprague Dawley rats. **Toxicology**, Amsterdam, v.106, p. 139-147, 1996.
- REASOR, M.J.; OGLE, C.L.; KACEW, S. Amiodarone and desethylamiodarone - induced pulmonary toxicity in rats: biochemical and pharmacological characteristics. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Orlando, v. 97, p. 124-133, 1989.
- RECKNAGEL, R.O.; GLENDE, E.A.; WALLER, R.L.; LOWREY, K. In: PLAA, G.; HEWITT, W.R. **Toxicology of the liver**. New York: Raven Press, 1982. p. 213-241.
- REED, K.C.; BYGRAVE, F.L. A kinetic study of mitochondrial calcium transport. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v.55, n.3, p. 497-504, 1975.

- REED, K.C.; BYGRAVE, F.L. The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and Ruthenium Red. **Biochem. J.**, London, v.140, p. 143-155, 1974.
- REKKA, E; MANNHOLD, R.M.; BAST, A.; TIMMERMAN, H. Molecular pharmacological aspects of antiarrhythmic activity I. Class I and class III compounds and lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.39, p. 95-100, 1990.
- REYNOLDS, E.S.; MOSLEN, M.T. Free radical damage in liver. **Free Radical Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v. 4, p. 49, 1980.
- REYNOLDS, J.E.F. Amiodarone. **Martindale, The Extra Pharmacopeia**. 2^d ed. London: The Pharmaceutical Press, 1989. p. 1896.
- RIBEIRO, S.M.R.; CAMPELLO, A.P.; NASCIMENTO, ^aJ.; KLÜPPEL, M.L.W. Effects of amiodarone on the antioxidant enzymes, lipid peroxidation and mitochondrial metabolism. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v.15, p. 145-152, 1997.
- RICE-EVANS, C.A. In: RICE-EVANS, C.A.; BURDON, R.H. **Free Radical Damage and its Control**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1994. p. 131-153.
- RIGONI, F.; MATHIEN-SHIRE, Y.; DEANA, R. Effect of ruthenium red on calcium efflux from rat liver mitochondria. **Febs Lett.**, Amsterdam, v.120, n.2, p. 255-258, 1980.
- ROBINS. **Pathologic Basis of Disease**. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994.
- ROBINSON, J.; COOPER, J.M. Method of determining oxygen concentration in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.33, p. 390-399, 1970.

- ROJAS, C.; CADENAS, S.; PÉREZ-CAMPO, R.; LÓPEZ-TORRES, M.; PAMPLONA, R.; PRAT, J. & BARJA, G. Relationship between lipid peroxidation, fatty acid composition, and ascorbic acid in the liver during carbohydrate and caloric restriction in mice. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.306, p. 59-64, 1993.
- ROSSI, E.; AZZONE, G.F. Ion transport in liver mitochondria energy barrier and stoichiometry of aerobic K^+ translocation. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v. 7, p. 418-426, 1969.
- ROUSER, G.; FLEISHER, S. Isolation characterization and determination of polar lipids of mitochondria. **J. Am. Oil Chemists Soc.**, Champaign, v.42, p. 588, 1965.
- SAAVEDRA, I.S.; ORTIZ, M.O. GAETE, L.G.; ASENJO, R.G.; BIANGINI, L.A. Determinaciones plasmáticas de amiodarona y desetilamodarona por cromatografía líquida de alta presión. Experiencia preliminar. **Técnica de Laboratorio, Rev. Méd. Chile**, Santiago, v.120, p. 661-665, 1992.
- SARIS, N.E.; AKERMAN, K.E.O. Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. **Curr. Top. Bioenerg.**, San Diego, v. 10, p. 103-171, 1980.
- SAUTEREAU, A.M.; TOURNAIRE, C.; SUARES, M.; TOCANNE, J.F.; PAILLOUS, N. Interactions of amiodarone with model membranes and amiodarone-photoinduced peroxidations of lipids. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 43, p. 2559-2566, 1992.
- SCARPA, A.; GRAZIOTTI, P. Mechanism for intracellular calcium regulation in heart. **J. Gen. Physiol.**, New York, v.62, p. 756-772, 1973.
- SCARPA, A. In: PACKER, L.; PUYON, A. **Mitochondria, bioenergetics, biogenesis and membrane structure**. New York: Academic Press, 1976.

- SCARPA, A. Measurement of cation transport with metalochromic indications. **Methods Enzymol.**, New York, v. 61, p. 301-358, 1979.
- SCARPA, A.; GRAZIOTTI, P. Mechanisms for intracellular calcium regulation in heart. In: Stopped-flow measurements of Ca^{2+} uptake by cardiac mitochondria. **J. Gen. Physiol.**, New York, v.62, p. 756-772, 1973.
- SCHAUENSTEIN, E.; ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H. **Aldehydes in Biological Systems.**, London: Prion Press, 1977.
- SCOTT, I.D.; NICHOLLS, D.G. Energy transduction in intact synaptosomes. Influence of plasma membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. **Biochem. J.**, London, v. 186, p. 21-23, 1980.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v.215, p. 213-219, 1993.
- SIES, H. **Pathological implications of NO.** IX Biennial Meeting International Society for Free Radical Research. São Paulo, 1997. p. 37.
- SIES, J. In: SIES, H. **Oxidative Stress.** London: Academic Press, 1985. p. 73-90.
- SINGH, B.N. Amiodarone: Historic development and pharmacologic profile. **Am. Heart J.**, St. Louis, v.106, p. 829-839, 1993.
- SINGH, B.N.; VAUGHAN WILLIAMS, E.M. A third class of anti-arrhythmic action. Effects on atrial and ventricular intracellular potentials, and other pharmacological actions on cardiac muscle, of MJ1999 and AH3474. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v.39, p. 675-687, 1970.

- SKLAR, L.A.; HUDSON, B.B.; SIMONI, R.D. Conjugated polyene fatty acids as membrane probes: Preliminary characterization. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v.72, p. 1649-1653, 1975.
- SKLAR, L.A.; HUDSON, B.S.; PETERSEN, M.; DIAMONO, J. Conjugated polyene fatty acids on fluorescent probes: spectroscopic characterization. **Biochemistry**, Washington, DC, v.16, p. 813-819, 1977a.
- SKLAR, L.A.; HUDSON, B.S.; SIMONI, R.D. Conjugated polyene fatty acid as fluorescent probes: synthetic phospholipid membrane studies. **Biochemistry**, Washington, DC, v.16, p. 819-828, 1977b.
- SKLAR, L.A.; MILJANICH, G.P.; DRATZ, E.A. Phospholipid lateral phase separation and the partition of *cis*-parinaric acid and *trans*-parinaric acid among aqueous, solid liquid, and fluid lipid phase. **Biochemistry**, Washington, DC, v.18, p. 1707-1716, 1979.
- SLATER, T.F. **Free Radical Mechanisms in Tissue Injury**. London: Pion Limited, 1972.
- SOHAL, R.S.; DUBEY, A. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. **Free Radical Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v.16, n. 5, p. 621-626, 1994.
- SZABADOS, G.; ANDO, A.; TRETTER, L.; HORVATH, I.. Effect of succinate on mitochondrial lipid peroxidation. 1. Comparative studies on ferrous ion and ADP/Fe/NADPH-induced peroxidation, **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v. 19, p. 21-30, 1987.

- SZABADOS, G.; TRETTER, L.; HORVATH, I. Lipid peroxidation in liver and Ehrlich ascites cell mitochondria. **Free Rad. Res. Commu.**, Reading, v.7, p. 161-170, 1989.
- SZABÓ, I.; ZORATTI, M. The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore. **J. Bioenerg. Biomem.**, New York, v. 24, n. 1, p. 111-117, 1992.
- SZEKERES, L.; VAUGHAN WILLIAMS, E.M. Antifibrillatory action. **J. Phys. Chem.**, London, v.160, p. 470-482, 1962.
- TAI, C.T.; CHEN, S.A.; FENG, A.N.; YU, W.C.; CHEN, Y.J.; CHANG, M.S. Electropharmacologic effects of class I and class III antiarrhythmic drugs on typical atrial flutter. **Circulation**, Dallas, v.97, n 19, P. 1935-1945, 1998.
- TAKAYANAGI, R.; TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. **Biochem J.**, London, v.192, p. 853-860, 1980.
- TAKENAKA, Y.; MEKE, M.; YASUDA, H.; MINO, M. The effect of 2-tocopherol as an antioxidant on the membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.285, p. 344-350, 1991.
- TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. NADH- and NADPH- dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. **Biochem. J.**, London, v.180, n. 1, p. 129-135, 1979.
- TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent lipid peroxidation by beef heart submitochondrial particles. **Biochem. J.**, London, v.77, p. 1067-1073, 1975.

- TAKESHIGE, K.; TAKAYANAGI, R.; MINAKAMI, S. Lipid peroxidation and the reduction of ADP-Fe³⁺ chelate by NADH-ubiquinone reductase preparation from bovine heart mitochondria. **Biochem. J.**, London, v.192, p. 861-866, 1980.
- TAYLOR, S.D.; DAVENPORT, L.D.; ESPERANZA, M.J.; MULLENBACH, G.T.; LYNCH, R.E. Glutathione peroxidase protects cultured mammalian cells from the toxicity of adriamycin and paraquat. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.305, p. 600-605, 1993.
- TEDESCHI, H. The transport of cations in mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 639, p. 157-196, 1981.
- TIEN, M.; AUST, S.D. Rabbit liver microsomal lipid peroxidation. The effect of lipid on the rate of peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 712, p. 1-9, 1982.
- TRETTNER, L.; SZABADOS, G.; ANDO, A.; HORVATH, I. Effect of succinate on mitochondrial lipid peroxidation. 2. The protective effect of succinate against functional and structural changes induced by lipid peroxidation. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v.19, n.1, p. 31-44, 1987.
- TRUMBORE, M.; CHESTER, D.W.; MORING, J.; RHODES, D.; HERBETTE, G. Structure and location of amiodarone in a membrane bilayer as determined by molecular mechanism and quantitative X-ray diffraction. **Biophys. J.**, Bethesda, v.54, p. 535-543, 1988.
- TURNER, S.R.; MPBELL, J.A.; NN, W.S. Polymorphonuclear leucocyte chemotaxis toward oxidized lipid components of cell membranes. **J. Exp. Med.**, New York, v.141, n.6, p. 1437-1441, 1975.

- TURRENTS, J.F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem. J.**, London, v.191, p. 421-427, 1980.
- UNGER, J. Amiodarone and thyroid: the Janus effect. **Rev. Med. Brux..**, Brussels, v. 11, p. 89-95, 1990.
- URSINI, F.; MARIORINO, M.; GREGOLIN, C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.839, p. 62-70, 1985.
- VALLE, V.G.R.; FAGIAN, M.M.; PARENTONI, L.S.; MEINICKE, A.R.; VERCESI, A.E. The participation of reactive oxygen species and protein thiol in the mechanism of mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants. **Arch. Biochim. Biophys.**, Orlando, v. 307, p. 1-71, 1993.
- Van den BERG, J.J.M. Effects of oxidants and antioxidants evaluated using parinaric acid as a sensitive probe for oxidatives stresses. **Redox Rep.**, Edinburgh, v.1, p.11-21, 1994.
- Van den BERG, J.J.M.; KUYPERS, F.A.; LUBIN, B.H.; ROELOFSEN, B.; OP den KAMP, J.A.F. Direct and continuous measurement of hydroperoxide-induced oxidative stress on the membrane of intact erythrocyte. **Free Radical Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v.11, p. 255-261, 1991.
- Van den BERG, J.J.M.; KUYPERS, F.A.; QJU, J.H.; CHIU, D.; LUBIN, B.; ROELOFSEN, B.; Op den KAMP, J.A.F. The use of cis-parinaric acid to determine lipid peroxidation in human erythrocyte membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 944, p. 29-39, 1988.

- VASINGTON, F.D.; MURPHY, J.V. Ca^{2+} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 273, p. 2670-2677, 1962.
- VASINGTON, F.O.; GAZZOTTI, P.; TIOZZO, Z.; CARAFOLI, E. The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.256, p. 43-54, 1972.
- VAUGHAM WILLIAMS, E.M. Eletrophysiological basis for a rational approach to antidysrhythmic drug therapy. **Adv. Drug Res.**, London, v. 9, p. 69-101, 1974.
- VAUGHAN WILLIAMS, E.M. A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drugs. **J. Clin. Pharmacol.**, Hagerstown, v.24, p. 129-147, 1984.
- VERCESI, A.E. Dissociation of NAD(P)^+ stimulated mitochondrial Ca^{2+} efflux from swelling and membrane damage. **Arch. Biochim. Biophys.**, Orlando, v.232, n. 1, p. 86-91, 1984.
- VERCESI, A.E. Ca^{2+} transport and oxidative damage of mitochondria. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 26, n.5, p. 441-457, 1993.
- VERCESI, A.E.; HERMES-LIMA, M.; MEYER-FERNANDES, J.R.; VIEYRA, A. Calcium inhibition of the $\text{ATP} \leftrightarrow [^{32}\text{P}]\text{Pi}$ exchange and of net ATP synthesis catalyzed by bovine submitochondrial particles. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1020, p. 101-106, 1990.
- VERCESI, A.E.; HOFFMANN, M.E. In: Lash, L.H. and Jones, D.P. **Methods Toxicol.**, San Diego, v. 2, p. 21, 1993.

- VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; GRIJALBA, M.T.; MEINICKE, A.R.; CASTILHO, R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosci. Rep.**, New York, v.17, n 1, p. 43-52, 1997.
- VERCESI, A.E.; REYNAFARJE, E.A.; LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of H⁺ ejection and Ca²⁺ uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 253, n. 18, p. 6379-6385 1978.
- VIDEIRA, R.; ANTUNES-MADEIRA, M.C.; KLÜPPEL, M.L.W.; MADEIRA, V.M. Perhexiline effects on membrane organization detected by fluorescence polarization of DPH and DPH-PA. **Med. Sci. Res.**, New York, v. 22, p. 391-393, 1994.
- VIG, P.J.; DESAIAH, D. Modulation of protein kinase C activity by amiodarone and desthylamiodarone. **Neurotoxicology (Little Rock)**, v. 12, p. 595-601 , 1991.
- VINOGRADOV, A.; SCARPA, A. The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 248, p. 5527-5531, 1973.
- VLADIMIROV, Y.A.; OLENEV, V.T.; SUSLOVA, T.B.; KRITCHEVSKY, J. Lipid peroxidation in mitochondrial membranes. **Adv. Lipid Res.**, San Diego, v. 7, p. 173-249, 1980.
- VOSS, D.O.; CAMPELLO, A.P.; BACILA, M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 4, p. 48-51, 1961.
- VOSS, D.O.; COWLES, C.J.; BACILA, M. A new oxygen electrode model for the polarography of cellular and mitochondrial respiration. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.6, p. 211-222, 1963.

- WAGNER, B.A.; BUETTNER, G.R.; BURNS, C.P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. **Biochemistry**, Washington, DC, v.33, p. 4449-4453, 1994.
- WATERS, W.A. Formation of baudish complexes $[\text{Fe}_2(\text{CN})_5\text{RNO}_3]$ from alkyl-aquapentacyanoferrate (3) anions $[\text{Fe}_2(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]_3^-$. **J. Chem. Soc. Perkin Trans 2**, Cambridge, v.6, p. 732-736, 1976.
- WAXMAN, H.L.; GROH, W.C.; MARCHLINSKI, F.E.; BUXTON, A.E.; SADOWSKI, L.M.; HOROWITZ, L.N.; SOSEPHSON, M. E.; KASTOR, J.A. Amiodarone for control of sustained ventricular tachyarrhythmia: clinical and electrophysiologic effects in 51 patients. **Am. J. Cardiol.**, Newton, v.50, p. 1066-1074, 1987.
- WEBER, A. Energized calcium transport and relaxing factors. In: *Current Topics in Bioenergetics*, D.R. SANADI, ed. Academic Press, New York, p. 203-254, 1966.
- WEBER, A.; HERZ, R.; REISS, I. On the mechanism of the relaxing effect of fragmented sarcoplasmic reticulum. **J. Gen. Physiol.**, New York, v.46, p. 679-702, 1963.
- WEFERS, H. Singlet oxygen in biological systems. **Bioelectrochem. Bioenerg.**, New York, v.18, n.1-3, p. 91-104, 1987.
- WEISS, J.N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **FASEB J.**, Bethesda, v.11, p. 835-841, 1997.
- WELTI, R.; GLASER, M. Lipid domain in model and biological membranes. **Chem. Phys. Lipids**, Limerick, v.73, p. 121-137, 1994.
- WILSON, J.S.; PODRID, P.J. Side effects from amiodarone. **Am. Heart J.**, St. Louis, v.121, p. 158-171, 1991.

- WINGROVE, D.E.; GUNTER, T.E. Kinetics of mitochondrial calcium transport. I.Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.261, p. 15159-15165, n 15, 1986.
- WINKLER, B.S.; ORSELLI, S.M.; REX, T.S. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. **Free Radical Bio. & Med.**, Tarrytown, NJ, v.17, p. 333-349, 1994.
- WISWEDEL, I.; ULBRICHT,O.; AUGUSTIN, W. Studies of lipid-peroxidation in isolated rat heart mitochondria. **Biomed. Biochim. Acta**, Berlin, v.48, p. 573-576, 1989.
- YAMAMOTO, S. "Enzymatic" lipid peroxidation: reactions of mammalian lipoxygenases. **Free Radical Biol. & Med.**, Tarrytown, NJ, v.10, p. 149-159, 1991.
- YU, B.P.; SUESCUN, E.A.; YANG S.Y. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phspholipase A₂ : modulation by dietary restriction. **Mech. Ageing Dev.**, Shannon, v. 65, p. 17-33, 1992.
- ZACHARY, C.B.; SLATER, D.N.; HOLT, D.W.; STOREY, G.C.A.; MacDONALD, D.M. The pathogenesis of amiodarone-induced pigmentation and photosensitivity. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.110, p. 451-456, 1984.
- ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; DALLAPORTA, B.; PETIT, P.X.; KROEMER, G. J. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. **J. Bioenerg. Biomemb.**, New York, v.29, n. 2, p. 185-193, 1997.
- ZIGLER, J.S.Jr.; GOOSEY, J.D. Photosensitized oxidation in the ocular lens: evidence for photosensitizers endogenous to the human lens. **Pothochem. Photobiol.**, Augusta, v.33, n. 6, p. 869-874, 1981.

ZOCCARATO, F.; NICHOLLS, D.G. The role of phosphate in the regulation of the independent calcium-efflux pathway of liver mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v.127, p. 333-338, 1982.

ZORATTI, M.; SZABÓ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1241, p. 139-176, 1995.