

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA

Diretor: Prof. Dr. Metry Bacila

INTERAÇÃO PROMETAZINA-MITOCÔNDRIA EM SARCOSOMA
ISOLADO DE CORAÇÃO DE COBAIA *

(PROMETHAZINE-MITOCHONDRIA INTERACTION IN GUINEA-PIG
HEART SARCOSOME)

METRY BACILA
Prof. Catedrático

ARNALDO COSTA
Prof. Assistente Docente

HEITOR MEDINA **

INTRODUÇÃO

Os efeitos de compostos fenotiazínicos (PTZ) sobre as propriedades respiratórias da célula foram investigados, de início, por ALLENBY e COLLIER (1952), quando verificaram que as referidas substâncias deprimem o consumo de oxigênio por tecidos animais e homogenados, além de inibirem hexoquinase cerebral e succinoxidase de mitocôndria de fígado de rato. BERNSOHN, NAMAJUSKA e COCHRANE (1956) e DAWKINS, JUDAH e REES (1959) atribuíram o efeito de compostos de PTZ à sua ação sobre citocromo-oxidase, ATPase e NADH-citocromoc-c-reductase. BACILA e MEDINA (1962), por outro lado, verificaram que compostos fenotiazínicos têm a propriedade de inibirem o efeito estimulante que o 2,4 dinitrofenol exerce sobre a mitocôndria isolada de coração de cobaia. MEDINA, DMYTRACZENKO e BACILA (1964), estudando o efeito exercido por compostos de PTZ sobre a estrutura e a atividade metabólica de sarcosoma de coração de cobaia, verificaram que a maioria dos efeitos sobre a mitocôndria isolada pode ser considerada como consequência da sua ação sobre a mitocôndria propriamen-

* Com a cooperação da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

** Prof. Cat. de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná.

te dita, já que se observou, por estudos de turbidimetria e microscopia eletrônica, que os PTZ alteram a estrutura fina dessas partículas subcelulares. Foi verificado ainda que os PTZ são capazes de inibirem, de forma indistinta, a fosforilação oxidativa exercida pelo sarcosoma isolado.

Diversas investigações (1958-1961), por outro lado, foram levadas a efeito com a finalidade de verificar a ação que os PTZ exercem sobre membranas biológicas, tendo sido assinaçadas variadas ações que se caracterizam, em geral, pela inibição na absorção de determinadas substâncias, tais como a noradrenalina por fatias de tecidos e água e sacarose no caso de mitocôndria isolada de fígado de rato.

Os dados experimentais disponíveis indicam, pois, a possibilidade de ação dos PTZ sobre a membrana da mitocôndria isolada, o que implicaria ainda em provável interação desses compostos com um ou mais dos seus constituintes. MEDINA, DMYTRAZENKO e BACILA (1964), haviam já aventado a possibilidade de interação dos PTZ com proteínas, em base a experiências preliminares de MEDINA e BACILA (dados não publicados) indicando que PTZ, adicionados à suspensão de actomiosina causam aumento de densidade óptica das referidas suspensões, além de impedirem a transformação da actomiosina G em actomiosina F.

Dada a fundamental importância das possíveis interações de PTZ com mitocôndria isolada, foi então, o presente trabalho elaborado com a finalidade de estabelecer os dados quantitativos obtidos quando concentrações conhecidas de PTZ são adicionadas à suspensão de sarcosoma isolado de coração de cobaia, na formação de um possível "complexo mitocôndria-PTZ".

MATERIAL E MÉTODOS

Sarcosoma isolado de coração de cobaia *Cavia porcellus* foi obtido segundo a técnica de MEDINA e BACILA (1959). Músculo cardíaco de cobaia era cortado em pequenas peças, lavado e depois homogenizado em homogenizador de Potter-Elvehjem. O meio usado para lavar e extrair o material continha manitol 0,21 M, sacarose 0,075 M, TRIS 0,01 M e EDTA (etilenodiamino tetracetato de sódio), 0,2 mM, pH final 7,4. O homogenado era centrifugado por 5 minutos a 1500 x g, o sedimento desprezado e o sobrenadante centrifugado 15 minutos a 10.000 x g. O sarcosoma sedimentado era, então, lavado duas vezes e a suspensão final de sarcosoma preparada pela adição ao sedimento de 1 ml de meio de extração para cada coração usado.

O efeito da concentração da prometazina sobre a formação de complexo-PTZ-mitocôndria foi estudado em sistema contendo 0,1 ml de suspensão de sarcosoma adicionada de quantidades cres-

centes de prometazina (50 μg , 100 μg , 200 μg , 400 μg), completando-se o volume para 4,0 ml com meio de manitol. A incubação foi procedida por 10 minutos à temperatura ambiente e seguida de centrifugação, por 15 minutos, a 16.500 rpm em Centrífuga Internacional PR2. Aliquota de 2 ml do sobrenadante foi utilizada para determinação colorimétrica da prometazina. Os tubos de reação, após o desenvolvimento da reação com PdCl₂, foram conservados à temperatura ambiente por 12 horas e, então, centrifugados a 16.500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante usado para determinação espectrofotométrica. Prometazina foi determinada colorimetricamente segundo o método de COSTA, MEDINA e BACILA (em preparação).

Prometazina Rhodia, EDTA Baker's, TRIS, E. Merck, Manitol, E. Merck, foram os reativos usados.

RESULTADOS

1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA PROMETAZINA SÔBRE A FORMAÇÃO DO "COMPLEXO" PROMETAZINA-SARCOSOMA. Diferentes concentrações de prometazina foram adicionadas a volume idêntico de suspensão de mitocôndria contendo 1,4 mg de proteínas por ml, e a incubação procedida por 10 minutos. De cada tubo foi retirada aliquota de 2 ml para determinação de prometazina residual do sobrenadante, após centrifugação por 15 minutos a 16.500 rpm. A tabela I mostra os resultados obtidos da determinação procedida logo em seguida e após repouso do sistema por 12 horas, quando, então, nova centrifugação de 15 minutos a 16.500 rpm foi procedida e seguida de leitura espectrofotométrica a 480 m μ .

TABELA I — Efeito da concentração de prometazina sôbre a formação do complexo "prometazina-mitocôndria.

Sistema: Concentração de proteína, 1/4 mg/ml. Sistema contém 0,1 ml de suspensão de mitocôndria, prometazina (50, 100, 200, 400 μg respectivamente) e meio de extração de manitol até completar 4 ml de volume final. Absorbância assinalada corresponde à da reação de prometazina com cloreto de paládio-sulfato ferroso.

| Sistemas | Padrões Absorbância (m μ) | Sobrenadante da reação Absorbância (m μ) | Absorbância (m μ) | Prometazina utilizada (μg) | Prometazina consumida por mg de proteína (μg) |
|----------|--------------------------------------|--|---------------------------|---|---|
| 1 | 0,053 | 0,010 | 0,043 | 33 | 23,5 |
| 2 | 0,110 | 0,025 | 0,085 | 68 | 48,5 |
| 3 | 0,234 | 0,077 | 0,157 | 136 | 97,14 |
| 4 | 0,446 | 0,266 | 0,180 | 160 | 114,17 |

Verifica-se pelos resultados da Tabela I que na incubação de mitocôndria com prometazina ocorre desaparecimento do PTZ, proporcional à sua concentração até que esta atinja a 200 μg , ou seja a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do sistema de reação quando então ocorre saturação da mitocôndria, já que o aumento da concentração de prometazina para 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ não determinou desaparecimento proporcional da prometazina da solução, fato que é bem ilustrado pela fig. 1.

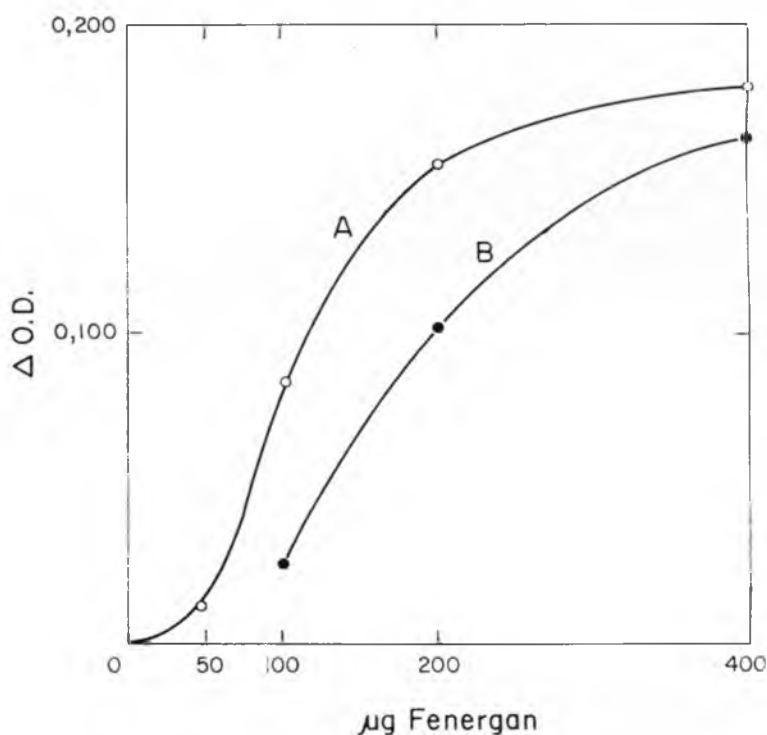


Fig. 1 — Medida do efeito da concentração da prometazina sobre a formação do «complexo prometazina-fenegan». O sistema corresponde ao da Tabela I. A curva A representa a D.O. da reação da prometazina com o reativo de cloreto de paládio-sulfato-ferroso, imediatamente após a reação; a curva B foi obtida após 12 horas de repouso e centrifugação de precipitado formado.

Verifica-se pelo estudo da fig. 1 que há evidente correlação entre a concentração de PTZ e a capacidade de “saturação” da suspensão de mitocôndria, já que a partir da concentração inicial de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a curva de desaparecimento do PTZ entra em platô.

3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOBRE A FORMAÇÃO DO COMPLEXO “MITOCÔNDRIA-FENOTIAZINICO”. A fim de verificar o comportamento da concentração de proteína sobre o desaparecimento de PTZ da solução, foi levada a efeito a experiência da fig. 2. Em sistema semelhante ao da Tabela I, 100 μg de prometazina foram incubados, com 100, 200, 400, 500 μl de suspensão de sarcosoma, correspondendo a 140, 280, 560 e 720 μg de proteína, respectivamente. A reação da prometazina com o reativo do cloreto de paládio-sulfato-ferroso foi levada a efeito em aliquota do sobrenadante centrifugado a 16.500 rpm e o espectro de absorção (fig. 3) de cada um determinado.

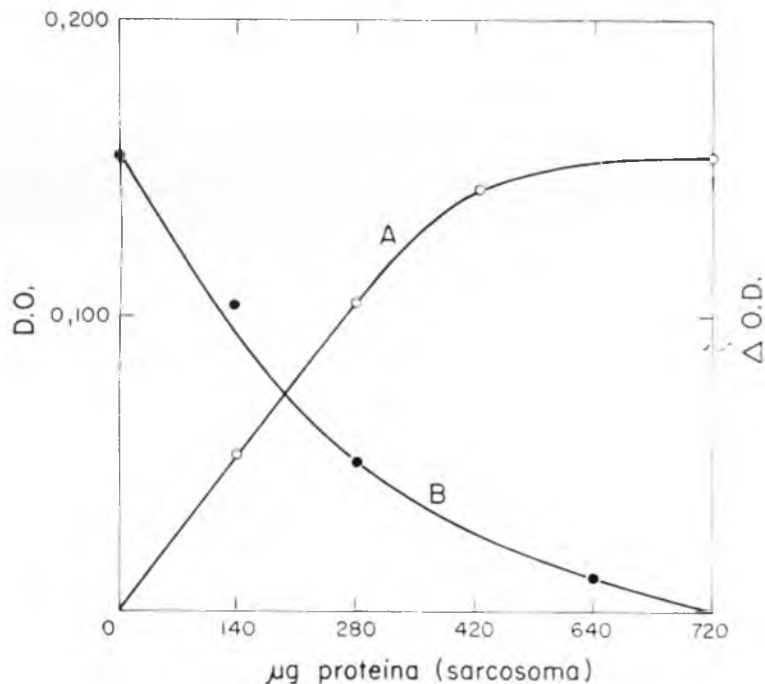


Fig. 2 — Efeito da concentração de sarcosoma sobre a formação do «complexo fenotiazina-sarcosoma». Curva A corresponde ao desaparecimento de prometazina frente a diferentes concentrações sarcosoma. Curva B corresponde à diferença de absorbância da reação prometazina — cloreto de paládio nos sobrenadantes de 16.500 rpm.

Verifica-se pela análise da fig. 2 que o desaparecimento de prometazina da solução é diretamente proporcional à concentração da proteína.

DISCUSSÃO

Experiências anteriores de MEDINA, DMYTRACZENKO e BACILA (1964) demonstraram que o efeito exercido pelos fenotiazínicos sobre a mitocôndria isolada interfere de modo direto com as suas propriedades normais e se distingue muito daquele dos desacopladores. Assim êsses compostos dificilmente poderão ser considerados como desacopladores da fosforilação oxidativa, com o mesmo significado que se empresta ao 2,4 dinitrofenol. BACILA e MEDINA (1962) demonstraram, ainda, que a préincubação com sarcosoma isolado de coração de cobaia com concentrações de prometazina variando de $6,2 \times 10^{-5}M$ a $6,2 \times 10^{-1}M$ inibe o consumo do oxigênio por estas partículas durante o estado ativo de respiração, sendo tal efeito proporcional à concentrações da droga. A verificação de que a adição de PTZ a uma suspensão de mitocôndria causa imediata elevação da densidade óptica da suspensão, como consequência de aglutinação que ocorre, bem como a demonstração de que tais compostos atuam de modo muito intenso, alteran-

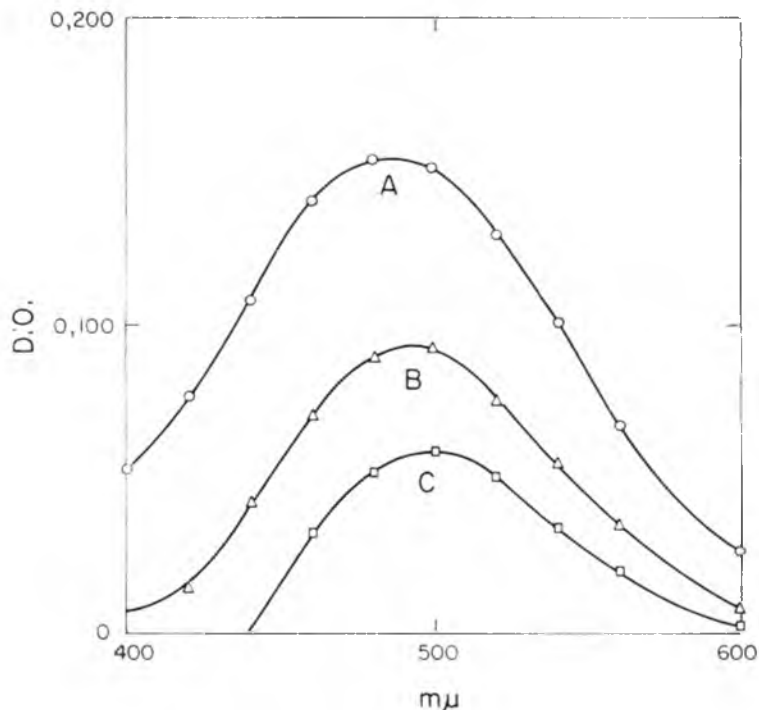


Fig. 3 — Espectro de absorção da reação prometazina-cloreto de paládio-sulfato-ferroso dos sobrenadantes das experiências da Fig. 2 (A) corresponde à reação do padrão; (B), do sobrenadante de 140 mg de proteína (C), de 280 mg de proteína.

do a estrutura íntima da mitocôndria, leva admitir que ocorre possível interação de PTZ com proteínas como consequência da ação de tais compostos. Outrossim, como os efeitos encontrados dizem respeito ao PTZ de modo geral, pode-se atribuir tais fenômenos ao núcleo fenotiazínico propriamente dito, e não às cadeias laterais que entram na constituição de seus derivados.

A possibilidade de quantificação do fenômeno de interação da prometazina com a mitocôndria, como se demonstra no presente trabalho, permite analisar o assunto sob aspectos mais concretos. Questão de maior interesse é a da possível natureza das relações entre prometazina e mitocôndria, já que, pelo que se demonstra no presente trabalho, há desaparecimento de prometazina dos sistemas de reação em que ela é incubada em diferentes condições, com sarcosoma. Isso leva a crer que a prometazina pode penetrar na mitocôndria, permeabilizando a sua membrana; pode se adsorver à superfície da mitocôndria, quando o fenômeno teria que se ajustar à equação de Freundlich; ou então combinar-se quimicamente com constituintes da região periférica da mitocôndria.

As experiências realizadas por GUTH e SPIRITES (1958, 1961) e por FREEMAN e SPIRITES (1962) demonstravam já que a clorpromazina exerce nítido e evidente efeito sobre as membranas biológicas, enquanto que AXELROD, WHITBY e HERTTING (1961) e DENGLER e TITUS (1961) demonstraram que a clorpromazina é capaz de inibir a permeabilidade da membrana celular. Esses efeitos de membrana, mais os resultados já indicados de MEDINA, BACILA e DMYTRACZENKO (1964) e os de SPIRITES e GUTH (1963) que verificaram o efeito aglutinante de clorpromazina sobre a suspensão de mitocôndria isolada de fígado, levam a admitir que os compostos PTZ atuam sobre a mitocôndria isolada, fixando-se à mesma por possível combinação com componentes da região periférica dessas partículas celulares, o que ocorre de modo quantitativo como se demonstra no presente trabalho; resulta desse fato, então, alteração total das propriedades da membrana mitocondrial, e, assim, da própria mitocôndria.

Os dados de MEDINA, COSTA e BACILA (em preparação) demonstram que a fenotiazina exerce efeito muito específico sobre as propriedades da actomiosina, na indicação importante de que ela pode agir mediante a formação de um complexo fenotiazina-proteína, inespecífico e capaz de ocorrer dadas as peculiaridades estruturais do grupo fenotiazínico.

SUMÁRIO

Pela determinação colorimétrica e espectrofotométrica da prometazina, são estudadas as correlações entre esse composto e suspensões de sarcosoma isolado de coração de cobaia. Verificou-se

que em sistemas com concentração conhecida de prometazina e de proteína, ocorre o desaparecimento de prometazina, fenômeno que é diretamente proporcional à concentração de proteína, já que em sistemas com variadas concentrações de prometazina, foi possível determinar um efeito de saturação da suspensão de sarcosoma.

SUMMARY

The uptake of prometazine by sarcosome suspensions of guinea pig heart was studied by colorimetric and spectrophotometric methods.

It was shown that in systems containing known concentrations of prometazine and protein, a disappearance of the former occurs, which is directly proportional to the amount of protein; this is understandable, since in systems containing varying amounts of prometazine it was possible to demonstrate a saturation effect of the sarcosome suspension.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ALLENBY, G. M. & COLLIER, H. B. — 1952 — Inhibition of rat-brain hexokinase by phenothiazine. *Canad. J. med. Sci.*, 30: 549.
- 2 — AXELROD, J.; WHITBY, L. G. & HERTTING, G. — 1961 — Effect of psychotropic drugs on the uptake of norepinephrine- H^3 by tissues. *Science*, 133: 383.
- 3 — BACILA, M.; MEDINA, H. — 1962 — Inhibition of phenothiazinic compounds on the effect of 2, 4-dinitrophenol on the respiration of heart muscle sarcosomes. *Nature (Lond.)*, 194: 547.
- 4 — BERNSOHN, J.; NAMAJUSKA, I. & COCHRANE, L. S. G. — 1956 — Inhibition of brain cytochrome oxidase and ATPase by chlorpromazine analogues. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 92: 201.
- 5 — CLELAND, K. W. & SLATER, E. C. — 1953 — Respiratory granules of heart muscle. *Biochem. J.*, 53: 547.
- 6 — COLLIER, H. & ALLENBY, G. M. — 1952 — Enzyme inhibition by derivatives of phenothiazine. IV. Inhibition of succinoxidase activity of rat-liver mitochondria. *Canad. J. med. Sci.*, 30: 443.
- 7 — DAWKINS, M. J. R.; JUDAH, J. D. & REES, K. R. — 1959 — Action of some phenothiazine derivatives on the respiratory chain. *Biochem. Pharmacol.*, 2: 112.
- 8 — DENGLER, H. J. & TITUS, E. O. — 1961 — The effect of drugs on the uptake of isotopic norepinephrine in various tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 8: 64.
- 9 — FREEMAN, A. R. & SPIRITES, M. A. — 1962 — Effect of some phenothiazine derivatives on the hemolysis of red blood cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, 11: 161.

- 10 — GUTH, P. S. & SPIRITES, M. A. — 1958 — Mitochondrial permeability as affected by chlorpromazine. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 122: 28A.
- 11 — MEDINA, H. & BACILA, M. — 1959 — Reversal by acetylcholine of the inhibition by thyroxine of oxidative phosphorylation in guinea-pig heart sarcosomes. *Nature (Lond.)*, 184: 1066.
- 12 — MEDINA, H.; DMYTRACZENKO, A. & BACILA, M. — 1964 — The effect of certain phenothiazines on the structure and metabolic activity of sarcosomes of guinea pig heart. *Biochem. Pharmacol.*, 13: 461.
- 13 — SPIRITES, M. A. & GUTH, P-S. — 1961 — An effect of chlorpromazine on rat mitochondrial membranes. *Nature (Lond.)*, 190: 274.
- 14 — SPIRITES, M. A. & GUTH, P. S. — 1963 — Effect of chlorpromazine on biological membranes. I. Chlorpromazine-induced changes in liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, 12: 37.
- 15 — VOSS, D. O.; CAMPELLO, A. P. & BACILA, M. — 1961 — The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat-brain mitochondria. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 4: 48.
- 16 — OVERHOLSER, L. G. & YOE, J. H. — 1942 — Colorimetric determination of phenothiazine with palladous chloride. *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed)*, 14:646.