

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito dos anticonvulsivantes aromáticos (carbamazepina,
fenitoína e fenobarbital) e de seus areno-óxidos na função e no
estresse oxidativo mitocondrial em fígado de rato**

Wanessa Silva Garcia Medina

**Ribeirão Preto
2008**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito dos anticonvulsivantes aromáticos (carbamazepina, fenitoína e fenobarbital) e de seus areno-óxidos na função e no estresse oxidativo mitocondrial em fígado de rato

Wanessa Silva Garcia Medina

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do título de Doutor em Toxicologia, Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

**Ribeirão Preto
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

Medina, Wanessa Silva Garcia

Efeito dos anticonvulsivantes aromáticos (carbamazepina, fenitoína e fenobarbital) e de seus areno-óxidos na função e no estresse oxidativo mitocondrial em fígado de rato

Ribeirão Preto, 2008.

88 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:

Toxicologia.

Orientador: Santos, Antonio Cardozo dos.

1. Antiepilépticos Aromáticos (AEA). 2. Hepatotoxidade. 3. Mitocôndia. 4. Biotransformação. 5. Estresse Oxidativo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Efeito dos anticonvulsivantes aromáticos (carbamazepina, fenitoína e fenobarbital) e de seus areno-óxidos na função e no estresse oxidativo mitocondrial em fígado de rato

Wanessa Silva Garcia Medina

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Defendida e aprovada pela Comissão Julgadora em: _____

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	iii
Lista de Figuras e Tabelas	vi
Resumo	viii
Summary	x
Introdução	2
Objetivos.....	18
Materiais e Métodos	20
Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato	21
Determinação de Proteína Mitocondrial	22
Preparação dos microsomas hepáticos	22
Ensaio de toxicidade induzida pelo fármaco e metabólitos in vitro.....	23
A. Estudos relacionados à respiração mitocondrial	24
Determinação do Consumo de Oxigênio (estado 3 e 4) e do RCR.....	24
B. Estudos relacionados à Transição da Permeabilidade da Membrana Mitocondrial.....	24
Intumescimento Osmótico Mitocondrial	24
Potencial de Membrana Mitocondrial.....	25
Determinação da Liberação de Cálcio Mitocondrial	25
Captação/Liberação de Cálcio Mitocondrial	25
C. Estudos relacionados ao Estresse Oxidativo	26

Determinação de MDA (lipoperoxidação).....	26
Determinação de Proteína Sulfidril(P-SH).....	26
Determinação de Proteínas Carboniladas (PC).....	27
Determinação da Glutaciona Reduzida (GSH) e da Glutaciona Oxidada (GSSG).....	27
Determinação da Cardiolipina	28
Resultados	30
Efeitos na respiração mitocondrial.....	30
Efeitos sobre a síntese de ATP	32
Indução do Estresse Oxidativo.....	33
Efeitos relacionados à Transição de Permeabilidade de Membrana Mitocondrial (TPPM) ...	34
Discussão	54
Conclusões	68
Referências	71
Anexos	

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
AE	Antiepilépticos
AEA	Antiepilépticos Aromáticos
AMP	Adenosina Monofosfato
ANS	1-anilino-8-naftaleno sulfonato
Ant A	Antimicina A
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Bovina
CBZ	Carbamazepina inalterada
CBZB	Carbamazepina bioativada
CCCP	Carbonil Cianeto P-Triclorometoxifenilhidrazona
CI ₅₀	Concentração da droga que produz 50% de inibição
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNPH	2,4 Dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ácido 5,5'-Ditiobis [2-Nitrobenzóico]
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido Etileno Glicol-Bis(P-Aminoetil Éter)-N,N,N',N'-Tetracético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FNB	Fenobarbital inalterado
FNBB	Fenobarbital bioativado
FNT	Fenitoína

FNTB	Fenitoína bioativada
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSG	Glutathiona Dissulfeto ou Glutathiona Oxidada
GST	Glutathiona S-Transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HEPES	Ácido N-(2-Hydroxietyl)-Piperazina-N'-2-Etanosulfônico
LPOs	Lipooxigenases
MDA	Malondialdeído
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (estado oxidado)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (estado reduzido)
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (estado oxidado)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (estado reduzido)
NAO	10-N-nonil-acridine orange
O ₂ ^{•-}	Radical Aniônico Superóxido
OH [•]	Radical Hidroxil
PC	Proteínas Carboniladas
p-HPPH	Para-Hidroxi-Fenil Fenitoína
PHS	Prostaglandina H Sintetase
Pi	Fosfato Inorgânico
P-SH	Proteína Sulfidrila
RCR	Razão de Controle Respiratório
RLO	Radicais Livres de Oxigênio
RNA	Ácido Ribonucleico
Rot	Rotenona

SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Ácido Tricloroacético
TPMM	Transição da Permeabilidade de Membrana Mitocondrial
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)propane-1,3-diol

LISTA DE FIGURAS E TABELA

FIGURAS:

FIGURA. 1. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados no estado 4 da respiração mitocondrial.....	36
FIGURA. 2. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados no estado 3 da respiração mitocondrial.....	37
FIGURA. 3. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados na Razão do Controle Respiratório (RCR) mitocondrial.....	38
FIGURA. 4 - Efeito do fenobarbital inalterado (FNB) na oxidação de malato + glutamato pelas mitocôndrias de fígado de ratos.....	39
FIGURA. 5 - (A): Efeito do fenobarbital inalterado (FNB) na respiração de mitocôndrias de fígado de ratos energizadas com malato 5 mM + glutamato 5 mM, estimulada com ADP (0,4 µmol) ou com o desacoplador CCCP (1 µg/ml). (B): Efeito da rotenona (1µg/ml), antimicina A (1µg/ml), KCN (0,33 mM), oligomicina (1µg/ml), atractilosídeo (50 µm) e CCCP (0,1 µg/ml).....	40
FIGURA. 6 - Efeito do fenobarbital inalterado (FNB) na respiração de mitocôndrias de fígado de ratos energizadas com succinato 10 mM + rotenona 1 µg/ml ou ascorbato 4 mM + TMPD 0,1 mM.....	41
FIGURA. 7. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados na síntese de ATP.....	42
FIGURA. 8. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de malondialdeído (MDA) mitocondrial.....	44

FIGURA. 9. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de cardiolipina mitocondrial	45
FIGURA. 10 - Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de proteína sulfidril (Prot-SH) mitocondrial.....	46
FIGURA. 11. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de proteína carbonil (PC) mitocondrial.....	47
FIGURA. 12. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) mitocondrial	48
FIGURA. 13. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de glutathiona oxidada (GSSG) mitocondrial.....	49
FIGURA. 14. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados (A) e bioativados (B) na captação e liberação do cálcio	50
FIGURA. 15. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados no potencial de membrana mitocondrial	51
FIGURA. 16. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) bioativados no intumescimento de mitocôndrias de fígado de ratos	52

TABELAS

TABELA 1. Tipos comuns de danos hepáticos induzidos por fármacos	04
TABELA. 2. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) na formação do MDA, e teores de GSH, GSSG, proteína carbonil (PC) e proteína sulfidril (P-SH) em mitocôndrias de fígado de rato	43

RESUMO

O fígado desempenha um papel central na disposição metabólica de vários agentes químicos endógenos e exógenos, incluindo quase todos os fármacos. Neste processo de biotransformação pode ocorrer a formação de metabólitos intermediários altamente reativos que se não forem convenientemente eliminados podem interagir com macromoléculas celulares lesando o órgão. A hepatotoxicidade idiossincrática associada ao uso de antiepilépticos aromáticos (AEA) é bem conhecida e tem sido atribuída ao acúmulo de intermediários tóxicos (areno-óxidos) formados durante a bioativação hepática. Embora a participação de processos imunológicos no mecanismo de ação tóxica dos AEA tenha sido demonstrada, existe a possibilidade de mecanismos adjuvantes envolvendo a toxicidade mitocondrial, evento ainda não explorado na literatura científica. Neste estudo avaliou-se, *in vitro*, o efeito dos AEA: carbamazepina, fenitoína e fenobarbital, bem como dos seus respectivos metabólitos na função mitocondrial e na indução do estresse oxidativo em mitocôndrias de fígado de rato, como possível mecanismo de ação hepatotóxica desses fármacos. Sistema microsomal hepático de rato foi utilizado para bioativação dos fármacos e produção dos respectivos metabólitos *in vitro*. Sem a bioativação, somente o fenobarbital (em concentrações elevadas) apresentou efeitos inibidores sobre o estado 3 da respiração, síntese de ATP e potencial de membrana, sem, contudo induzir o estresse oxidativo. Quando bioativados, todos os fármacos apresentaram efeitos sobre a função mitocondrial através de processo mediado por estresse oxidativo. Todos os fármacos bioativados afetaram a respiração mitocondrial, causando diminuição do consumo de oxigênio no estado 3, diminuição do RCR e aumento do consumo de oxigênio no estado 4. Foram também evidenciadas alterações na captação/liberação de cálcio, inibição da síntese de ATP, diminuição do potencial de membrana e inibição do intumescimento mitocondrial induzido pelo cálcio. A oxidação de proteínas e lipídeos mitocondriais foi demonstrada pela formação

de proteínas carboniladas, diminuição de proteínas com grupamentos sulfidríla, aumento de malondialdeído (MDA) e pela oxidação da cardiolipina. O sistema de defesa antioxidante mitocondrial também foi afetado, como evidenciado pela diminuição da relação GSH/GSSG (glutathiona reduzida/glutathiona oxidada). Os resultados sugerem fortemente a participação do dano mitocondrial, mediado pelo estresse oxidativo causado pelos metabólitos dos AEA, no desenvolvimento da hepatotoxicidade idiossincrática induzida por esses fármacos.

Palavras-chave: fenobarbital; carbamazepina; fenitoína; mitocôndria; estresse oxidativo; hepatotoxicidade; areno-óxidos; antiepilépticos aromáticos (AEA)

SUMMARY

The liver plays a central role in the metabolic disposition of various endogenous and exogenous chemicals, including almost all drugs. During the biotransformation process, highly reactive metabolites can be produced, and if they are not detoxified, they can interact with cellular macromolecules and cause organ injury. Idiosyncratic hepatotoxicity is a well-known complication associated with aromatic antiepileptic drugs (AAED), and it has been suggested to occur due to the accumulation of toxic arene oxide metabolites. Although the participation of an immune process in the toxic action mechanism of AAED has been demonstrated, adjuvant mechanisms involving mitochondrial toxicity is also possible and such event has not been studied yet. Therefore, we investigated, *in vitro*, the effects of carbamazepine (CB), phenytoin (PT), phenobarbital (PB) and their respective metabolites on the hepatic mitochondrial function as well as their ability to induce oxidative stress in rat liver mitochondria, as a possible hepatotoxic action mechanism. The murine hepatic microsomal system was used to bioactivate the drugs and to produce the anticonvulsant metabolites *in vitro*. As an unaltered drug, only phenobarbital (in high concentrations) presented inhibitory effects on state 3 respiration, ATP synthesis, and membrane potential; however, it did not induce oxidative stress. All the bioactivated drugs affected mitochondrial function through an oxidative stress-mediated process. All the bioactivated drugs affected mitochondrial function causing decrease in state 3 respiration, decrease in RCR and increase in state 4 respiration. They also caused impairment of Ca^{+2} uptake /release, decrease in ATP synthesis, decrease in membrane potential and inhibition of calcium-induced swelling. Oxidation of proteins and lipids was evidenced by carbonil proteins formation, decrease in thiol proteins, increase in malonaldehyde (MDA) and cardiolipin oxidation. The mitochondrial antioxidant defense system was also affected, as evidenced by the decreased GSH/GSSG ratio (reduced glutathione/oxidized glutathione). Results strongly suggest the involvement of mitochondrial

damage, which is mediated by the oxidative stress caused by the AAED metabolites, in the development of AAED-induced idiosyncratic hepatotoxicity.

Key words: phenobarbital; carbamazepine; phenytoin; mitochondria; oxidative stress; hepatotoxicity; arene-oxides; aromatic antiepileptic drugs (AAED)

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Hepatotoxicidade induzida por Fármacos

As lesões hepáticas induzidas por fármacos representam um grande problema de saúde, não apenas para os profissionais da área, mas também para a indústria farmacêutica e as agências reguladoras. Nos Estados Unidos, mais de 50% das falências agudas do fígado devem-se às lesões hepáticas induzidas por fármacos, sendo que 39% são causadas pelo acetaminofeno e 13% por outros fármacos. Devido às significativas morbidade e mortalidade associadas às lesões hepáticas induzidas por fármacos, vários medicamentos têm sido retirados do mercado pela agência reguladora americana FDA (Food and Drug Administration) (HOLT e JU, 2006).

As lesões hepáticas representam uma complicação em potencial para qualquer medicamento prescrito, visto que o fígado é o órgão central de disposição metabólica de praticamente todos os fármacos e xenobióticos (KAPLOWITZ, 2005; NAVARRO E SÊNIOR, 2006).

Muitos xenobióticos são biotransformados e eliminados pelo fígado, principalmente na forma de conjugados sem que esse processo acarrete qualquer dano hepático. No entanto, alguns xenobióticos são concentrados a níveis tóxicos, enquanto outros são bioativados a reativos intermediários que podem lesar o fígado de diversas maneiras, inclusive por indução do câncer (PARK et al., 2005; WALGREN et al., 2006; UETRECHT, 2007).

Embora o mecanismo exato dos danos hepáticos induzidos por fármacos não tenha sido ainda delineado, duas vias parecem estar envolvidas: a hepatotoxicidade direta e as reações adversas imunes. Na maioria das vezes tais danos hepáticos são iniciados pela bioativação dos fármacos à metabólitos quimicamente reativos, os quais podem interagir com macromoléculas tais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, resultando em disfunção

protéica, danos ao DNA, lipoperoxidação e estresse oxidativo. Adicionalmente, esses metabólitos reativos podem induzir perturbações no gradiente de íons e na concentração intracelular de cálcio resultando em disfunção mitocondrial e diminuição da produção energética. Essa disfunção celular pode culminar na morte hepatocelular e possivelmente em falência hepática (HOLT e JU, 2006).

Dentre os fatores que contribuem para o acúmulo de toxinas nos hepatócitos estão (1) as alterações genéticas em sistemas enzimáticos, acarretando a formação e/ou acúmulo de metabólitos reativos; (2) a competição com outros fármacos e (3) a depleção dos sistemas de detoxificação do metabólito (LEE, 1995; KAPLOWITZ, 2004).

Sendo os hepatócitos as principais centrais metabólicas do fígado, muitas reações adversas podem acarretar sua morte. A reação mais comum conduzindo à morte celular é a formação de ligações covalentes entre o reativo metabólico e macromoléculas biológicas. Reações de oxidação também podem produzir compostos eletrofilicos ou intermediários de oxigênio (tais como o ânion superóxido e outros radicais livres) que danificam componentes celulares (RECKNAGEL et al., 1991).

Além de hepatócitos, os agentes hepatotóxicos podem afetar outras estruturas do fígado. Algumas substâncias lesam os ductos biliares ou canalículos, causando colestase sem danos importantes nos hepatócitos. Outras substâncias afetam as células sinusoidais ou endoteliais, resultando em doenças veno-oclusivas ou fibrose, esteatose das células de Ito ou até mesmo lesões generalizadas. Dessa forma, as lesões hepáticas podem ser classificadas em hepatocelulares, colestásicas ou mistas (WELLS e WINN, 1996). As lesões hepáticas mistas incluem manifestações clínicas das lesões hepatocelulares e colestásicas (MICHAEL P. HOLT, 2006). A Tabela 1 resume os tipos mais freqüentes de danos induzidos no fígado como resultado da ação de diferentes xenobióticos.

Tabela 1. Tipos comuns de danos hepáticos induzidos por fármacos (LEE, 1995; KASS, 2006; ZACCARA et al., 2007).

DANOS HEPÁTICOS	AGENTES
Dano hepatocelular direto	acetaminofeno (paracetamol), tetracloreto de carbono
Esteatohepatite	etanol, tamoxifeno
Reação idiossincrática	isoniazida, halotano, ácido valpróico, antiepilépticos aromáticos (ex: carbamazepina, fenobarbital, fenitoína)
Colestase	clorpromazina, ciclosporina A, estradiol
Reação granulomatosa	diltiazem, quinidina, fenitoína, procainimida
Hepatite crônica	nitrofurantoína, metildopa, isoniazida, trazodone
Esteatose microvesicular	tetraciclina, aspirina, zidovudina, didanosina, fialuridina
Fibrose ou Cirrose	metotrexato, vitamina A, metildopa
Doença veno-oclusiva	ciclofosfamida
Lesão isquêmica	cocaina, ácido nicotínico

Antiepiléticos Aromáticos (AEA) e Hepatotoxicidade Idiossincrática

Os antiepiléticos (AE) clássicos têm sido extensivamente usados no tratamento da epilepsia, um dos mais frequentes distúrbios do sistema nervoso central, o qual afeta aproximadamente 1,5% da população mundial (COGNATO et al., 2007).

Atualmente, o uso dos AE não está restrito ao tratamento da epilepsia. Esses fármacos são também largamente empregados em um amplo espectro de distúrbios neurológicos e psiquiátricos (AHMED e SIDDIQI, 2006). Há muitos estudos recentes sugerindo que os AE apresentam propriedades ansiolíticas e poderiam então constituir um tratamento alternativo nos distúrbios de ansiedade (ZWANZGER et al., 2007). Os AE são também utilizados no tratamento da dor neuropática (NASREDDINE e BEYDOUN, 2007), sendo que a carbamazepina ainda é o fármaco de escolha no tratamento da neuralgia do trigêmeo (EISENBERG et al., 2007).

A hepatotoxicidade idiossincrática é uma complicação associada ao tratamento com AE bastante conhecida (KAUFMAN, 2002). Pode ocorrer como um evento isolado ou como parte de um distúrbio múltiplo, caracterizado por febre, erupções cutâneas, eosinofilia, linfocitose atípica, artralgia, linfadenopatia, com o acometimento de vários órgãos, incluindo o fígado (hepatite) (PEYRIÈRE et al., 2006). As reações idiossincráticas associadas ao uso de AE são raras, mas potencialmente fatais e têm sido mais comumente relatadas com o uso dos antiepiléticos aromáticos (AEA), tais como fenitoína, carbamazepina e fenobarbital (BAVDEKAR et al., 2004). Os efeitos dos anticonvulsivantes aromáticos sobre o fígado podem ser muito severos e há indicações de que os mecanismos envolvidos possam ser os mesmos para os três fármacos. A síndrome secundária ao uso desses fármacos foi descrita como um estado febril associado, entre outros eventos, ao dano hepático, e foi inicialmente denominada de “Síndrome de Hipersensibilidade” (SHEAR e SPIELBERG, 1988).

A idiossincrasia refere-se à susceptibilidade de alguns indivíduos à toxicidade de um fármaco que, em doses convencionais, é usualmente seguro. Dois mecanismos gerais têm sido propostos para a hepatotoxicidade idiossincrática: idiossincrasia metabólica e imuno-alergia. A idiossincrasia metabólica pode resultar de alterações, genéticas ou adquiridas, no metabolismo de fármacos, nas mitocôndrias, na secreção canalicular ou na sinalização dos receptores de morte. A imuno-alergia refere-se a reações adversas mediadas pelo sistema imune. Esses dois mecanismos provavelmente estão inter-relacionados (FARREL, 2002).

Os AEA são biotransformados a metabólitos hidroxilados, os quais são estáveis e não tóxicos, por reações de oxidação mediadas pelas isoenzimas do citocromo P₄₅₀. Nesse processo são formados intermediários reativos, areno-óxidos, cuja detoxificação é realizada pelas epóxido- hidrolases (SHEAR e SPIELBERG, 1988; BOHAN et al., 2007; GEORGE e FARRELL, 1994; SIERRA et al, 2005). Um mecanismo sugerido para o desenvolvimento da reação idiossincrática associada aos AEA é o acúmulo dos metabólitos areno-óxidos em decorrência de defeitos ou deficiências no processo de detoxificação pelas epóxido-hidrolases (BAVDEKAR et al., 2004).

Embora existam claras evidências de que as reações adversas induzidas pelos AEA sejam mediadas por um processo imune, a toxicidade direta também tem sido sugerida (NEUMAN et al., 2000, ZACCARA et al., 2007). Os areno-óxidos são metabólitos eletrofílicos, potencialmente tóxicos, que quando não são convenientemente eliminados podem: (1) atuar como pró-haptenos que se ligam às células T e iniciam uma resposta imune e/ou (2) se ligar covalentemente (irreversivelmente) a macromoléculas biológicas para direta ou indiretamente oxidar DNA, proteínas e lipídios, alterando de forma irreversível a função celular e levando à morte celular (GEORGE e FARRELL, 1994; WELLS e WINN, 1996; PARKINSON, 2001; BOHAN et al., 2007). As conseqüências dessa interação com constituintes celulares variam na dependência dos diferentes compostos formados e podem

resultar em necrose, apoptose, mutagênese ou teratogênese (WELLS et al., 2005; DENNERY, 2007).

Toxicidade Mitocondrial induzida por Fármacos

A principal via capaz de eliminar os metabólitos reativos provenientes da biotransformação de fármacos consiste nas reações de conjugação, principalmente com a glutatona. Esse tripeptídeo contém um grupamento tiólico capaz de se ligar a compostos eletrofílicos diretamente ou através de reações catalisadas pela glutatona transferase produzindo conjugados com o ácido mercaptúrico. A glutatona também pode servir de substrato na eliminação de peróxidos resultantes da dismutação do radical superóxido, reação catalisada pela diferentes formas da glutatona peroxidase (GOLDSTEIN e SCHELLMANN, 1994).

Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de fármacos e toxinas (NIEMINEM et al., 1990; BELLOMO et al., 1991; IMBERTI et al., 1993; HOLT, 2006; CERVINKOVÁ, 2007). Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, incluindo a quebra da homeostasia intracelular de íons, inibição enzimática, danos às membranas celulares e anóxia (RAHN et al., 1991; XIONGA, 2004).

Numerosos agentes tóxicos são capazes de interferir nos mecanismos responsáveis pela manutenção da integridade celular. Muitos desses mecanismos dependem do suprimento constante de ATP para as células. O ATP é necessário para a ativação de compostos endógenos através de fosforilação ou adenilação, podendo ser incorporado nos ácidos nucleicos ou utilizado como cofator. É necessário para a contração muscular, polimerização do citoesqueleto, divisão celular, transporte vesicular e manutenção da morfologia celular. É particularmente importante para a função de transportadores tais como Na^+/K^+ -ATPase na

membrana citoplasmática, Ca^{2+} -ATPase na membrana citoplasmática e retículo endoplasmático e H^+ -ATPase na membrana lisossomal. Esse conjunto de transportadores é essencial para manutenção de muitas funções celulares. A energia química necessária para a realização desse trabalho químico, mecânico e osmótico é fornecida pela hidrólise do ATP a ADP ou AMP. O ADP é re-fosforilado a ATP na mitocôndria através da enzima F_0F_1 -ATP sintetase, que funciona acoplada à redução do oxigênio à água, num processo conhecido como fosforilação oxidativa (KARPLUS, 2005).

A F_0F_1 -ATP sintetase é, então, a enzima responsável pela síntese mitocondrial de ATP, acoplada ao gradiente eletroquímico de prótons, e catalisa tanto a síntese quanto a hidrólise do ATP. É formada por um componente hidrofílico (F_1), e um intrinsecamente associado à membrana (F_0). O componente F_1 contém os sítios catalíticos e regulatórios, enquanto que F_0 supostamente forma um canal de prótons através da membrana interna. Os componentes F_0 e F_1 estão ligados através da proteína que confere sensibilidade à oligomicina e do componente F_6 (PEDERSEN e AMZEL, 1993; HATEFI, 1993; KARPLUS, 2005; REINDERS, 2007). Sobre os mecanismos envolvidos nos sítios catalíticos dessa enzima, os modelos experimentais propostos sugerem que a síntese e a hidrólise do ATP ocorrem com a participação de três sítios catalíticos e que a regulação ocorre principalmente através da interação entre F_1 e um inibidor protéico endógeno (GOMEZ-PUYOU et al., 1995).

Durante o transporte de elétrons transferidos por substratos oxidáveis à cadeia respiratória, a mitocôndria é capaz de gerar um gradiente eletroquímico de prótons na membrana interna que, de acordo com o modelo quimiosmótico proposto por Mitchell (1961), conduz a síntese de ATP (YAGUZHINSKY, 2006).

Além de fornecer mais de 95% da energia utilizada pela célula através da fosforilação oxidativa, a mitocôndria desempenha diferentes funções na regulação de vários processos celulares, participando da modulação do estado redox celular, da regulação osmótica, do

controle de pH, da sinalização celular, e, sobretudo, da manutenção da homeostasia do cálcio. Devido a essa diversidade de funções, a mitocôndria é uma organela alvo de agentes tóxicos e várias situações lesivas, estando envolvida nos mecanismos de dano e morte celular (ORRHENIUS et al., 1989; GUNTER et al., 1994; WALLACE et al., 1997; CAVANAGH, 2007).

Muitos agentes são capazes de interferir nos processos envolvidos na fosforilação oxidativa, e podem ser divididas em desacopladores e inibidores (VERCESI, 1984). Os desacopladores permitem o transporte de elétrons na mitocôndria, mas impedem a fosforilação do ADP a ATP através da dissipação do gradiente eletroquímico, desfazendo o acoplamento entre o transporte de elétrons e a síntese do ATP. O 2,4-dinitrofenol e a valinomicina são exemplos dessa classe de agentes. Os inibidores atuam especificamente em cada complexo da cadeia respiratória: a rotenona bloqueia o transporte de elétrons do NADH para a ubiquinona; a antimicina A bloqueia a transferência de elétrons da ubiquinona para o citocromo c e o cianeto bloqueia a redução do oxigênio pelo citocromo aa₃. Agentes como o fluoracetato, que inibem o ciclo de Krebs com conseqüente diminuição da geração de cofatores reduzidos, também diminuem a fosforilação oxidativa. O atractilosídeo, um glicosídeo tóxico de origem vegetal, inibe a enzima adenina-nucleotídeo translocase, impedindo que o ADP citosólico seja transportado para o interior da mitocôndria para ser reconvertido em ATP, e que o ATP, produzido dentro da mitocôndria, seja transportado para o citosol. E, finalmente, existem os inibidores da F₀F₁-ATPase, como por exemplo, a oligomicina, que se associa à porção F₀ da enzima numa ligação dependente da membrana mitocondrial, inibindo a síntese de ATP (KARPLUS, 2005).

Existem evidências de que alguns fármacos exercem efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos interagindo com os mecanismos envolvidos na produção de energia pela mitocôndria. É o caso de alguns compostos psicoativos, tais como reserpina, butirofenonas,

fenotiazinas, antidepressivos tricíclicos, valproato e benzodiazepínicos. A imipramina e seus análogos, antidepressivos tricíclicos muito utilizados, apresentam efeito acentuado sobre a fosforilação oxidativa mitocondrial de vários tecidos, além de uma alta solubilidade na membrana mitocondrial (KATYARE e RAJAN, 1995; COLLEONI, 1996; LORES-ARNAIZ, 2004; ROSCA, 2005; GRIVENNIKOVA, 2006).

Os neurolépticos, medicamentos prescritos a milhões de pacientes, têm o uso clínico limitado pelos seus efeitos colaterais extrapiramidais, semelhantes à neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina, que produz parkinsonismo, aparentemente pela inibição da NADH:ubiquinona oxidoreductase (complexo I) da cadeia transportadora de elétrons. Da mesma forma, a clorpromazina e tiotixina também inibem, *in vitro*, o complexo I em mitocôndrias de cérebro. A clonazina, um antipsicótico atípico, apresenta poucos efeitos extrapiramidais, mas inibe o complexo I em altas concentrações (BURKHARDT, 1993; CASADEMONT e JORDI, 2007).

Os benzodiazepínicos por sua vez, usados largamente como relaxantes musculares, anticonvulsivantes, sedativos hipnóticos e ansiolíticos exercem seu efeito pela ligação específica a receptores do SNC: os receptores benzodiazepínicos centrais, acoplados ao GABA e canais de cloro (TALLMAN et al., 1980). Além disso, os benzodiazepínicos ligam-se a outros receptores localizados na mitocôndria, e, por isso, chamados de receptores benzodiazepínicos mitocondriais (VERNA e SNYDER, 1989). Os receptores benzodiazepínicos mitocondriais parecem estar envolvidos na modulação de diversas funções fisiológicas, tais como crescimento e diferenciação celular, homeostasia do cálcio (CODE et al., 1991) e metabolismo de lipídios, incluindo-se a secreção de hormônios esteroidais (YANAGIBASHI et al., 1989). Os benzodiazepínicos afetam também o controle respiratório das mitocôndrias (HIRSCH et al., 1988).

Estresse Oxidativo

Durante diversos processos patológicos/toxicológicos pode haver produção excessiva das espécies reativas de oxigênio provocando lipoperoxidação dos sistemas de membrana mitocondrial e/ou aumento na permeabilidade conhecido como transição da permeabilidade de membrana mitocondrial (TPMM). Esse fenômeno é dependente da abertura de um poro não seletivo com a participação dos íons cálcio e de um agente indutor tais como: substâncias pró-oxidantes, P_i , ou desacopladores da fosforilação oxidativa. Esse aumento aparente da permeabilidade pode ser um evento chave no curso de uma série de processos tóxicos, patológicos e da apoptose. Dessa forma, agentes que induzem a TPMM bem como a lipoperoxidação da membrana mitocondrial podem ser de interesse toxicológico (VALKO, 2006).

A lipoperoxidação inicia-se pela ação de qualquer espécie capaz de subtrair um hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas. Dessa forma, um radical peroxil é formado. Esse radical pode atacar um ácido graxo adjacente e, assim propagar a reação (peroxidação lipídica). Dessa forma, uma série de reações é estabelecida e peróxidos se acumulam na membrana. Os lipídios peroxidados desestabilizam a membrana e fazem com que ocorra um vazamento de íons. Os radicais peroxil podem atacar não somente os lipídios, mas também proteínas de membranas, danificando enzimas, receptores e sistemas de transdução de sinais, além de oxidar o colesterol (HALLIWELL, 1994; VALKO, 2006).

As proteínas mais sensíveis são aquelas que possuem grupamentos tiólicos em sua estrutura. A modificação na estrutura dessas proteínas pelo estresse oxidativo geralmente é acompanhada de um enfraquecimento de várias funções celulares, tais como inibição do metabolismo do fosfoinosítídeo, quebra da homeostasia intracelular do cálcio e do citoesqueleto normal da célula. Esse último efeito pode ser o responsável pela formação de

vesículas na membrana plasmática, observadas em células expostas a concentrações citotóxicas de pró-oxidantes (OLIVER et al., 1990).

A cadeia transportadora de elétrons tem sido reconhecida como a principal fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO). Na presença de vários fármacos ou toxinas, como por exemplo, inibidores da cadeia transportadora de elétrons, desacopladores da fosforilação oxidativa, compostos quinonoídeos e metais, a geração de radicais livres de oxigênio pela mitocôndria pode ser aumentada substancialmente (GERLACH et al., 1995). O radical aniônico superóxido ($O_2^{\bullet-}$) parece ser o principal produto da redução incompleta do oxigênio sob condições fisiológicas e patológicas. Sob a ação da superóxido dismutase, o radical superóxido é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cuja redução pode originar o radical hidroxil (OH^{\bullet}). Enquanto parte do superóxido e do peróxido de hidrogênio pode se difundir da mitocôndria e lesar componentes celulares distantes do seu sítio de formação, o hidroxil, devido à sua alta reatividade e conseqüente meia vida muito curta, não possui capacidade de difusão. Dessa forma, os efeitos das ERO podem ser maiores na membrana mitocondrial interna, cujo principal componente da bicamada fosfolipídica é a cardiolipina, um derivado do difosfatidil glicerol, que possui uma alta relação de ácidos graxos insaturados/saturados. A cardiolipina tem uma importante função no controle da permeabilidade da membrana, bem como no estabelecimento do gradiente eletroquímico de prótons. Também é um regulador da respiração no estado 3, podendo modular a estrutura secundária de proteínas da membrana mitocondrial interna, tais como os transportadores de substratos, NADH desidrogenase, citocromo bc_1 , citocromo c oxidase e ATP sintetase (MASSOTTI et al., 1974; SHIDOJI et al., 1999; HAUFF e HATCH, 2006). Além disso, a membrana mitocondrial interna possui enzimas contendo ferro e cobre, as quais podem catalisar a reação do superóxido e da H_2O_2 (ZHANG et al., 1990; OLIVEIRA, 2007).

A mitocôndria possui um complexo sistema de defesa antioxidante, que consiste nas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione transferase, bem como oxidantes não enzimáticos, tais como glutathione reduzida (GSH), NADPH, vitamina C e vitamina E (HALLIEWELL e GUTTERIDGE, 1989). Sob condições de excesso de produção de ERO na mitocôndria, o seu sistema de defesa pode ser insuficiente para neutralizar esses radicais, conduzindo a uma situação conhecida como estresse oxidativo (MEHROTRA et al., 1991).

A geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria é um processo contínuo e fisiologicamente normal em condições aeróbicas, sendo que cerca de 1-2% do oxigênio reduzido pela mitocôndria é convertido a superóxido (VERCESI, 1993).

A mais importante defesa contra as lesões oxidativas induzidas pelas espécies reativas de oxigênio é a manutenção da homeostasia da glutathione (GSH). A glutathione reduzida serve como substrato para a ação: (1) da glutathione peroxidase, na remoção do peróxido de hidrogênio produzido pela ação da superóxido dismutase sobre o radical superóxido; (2) da glutathione transferase na formação do ácido mercaptúrico e eliminação de xenobióticos; além de atuar como seqüestrador de radicais livres. Atua também como reguladora intracelular de tióis dissulfeto de enzimas glicolíticas e ATPase-Ca⁺⁺ (BENZI E MORETTI, 1995). A ação da glutathione peroxidase leva à produção da glutathione dissulfeto (GSSG) ou glutathione oxidada. Sob a forma oxidada, a glutathione é tóxica para a célula pela formação de derivados cisteinil, especialmente na presença de metais de transição (JENNER, 1994; CHOI, 2005).

As reações dependentes da glutathione reduzida são de fundamental importância para a proteção da célula contra o estresse oxidativo, pois mantém a célula em um ambiente reduzido sob condições fisiológicas normais. A quebra da homeostasia dos tióis em células tratadas com pró-oxidantes provoca um enfraquecimento do sistema de translocação do cálcio, estimulação dos canais de cálcio, e inibição do seqüestro de cálcio pelo retículo

endoplasmático e mitocôndria. Isto resulta na incapacidade da célula em manter a concentração do cálcio intracelular em níveis fisiológicos. A quebra da homeostasia do cálcio intracelular está associada à progressão da lesão celular (ORRENIUS et al., 1992; VERCESI, 1993; TRUMP e BEZISKY, 1995).

Homeostasia Intracelular do Cálcio

O cálcio pode ser transportado do citosol para a matriz mitocondrial utilizando a energia do gradiente eletroquímico de prótons na membrana interna da mitocôndria. O influxo ocorre em resposta ao potencial negativo existente no interior da membrana, enquanto que o efluxo ocorre por troca com o H^+ do exterior, ou com o sódio do citosol. Entre outros fatores, a concentração citosólica de cálcio é o resultado do balanço entre efluxo e influxo do cátion na mitocôndria. Embora o cálcio apresente uma importante função regulatória, ativando desidrogenases mitocondriais, a sua presença em concentrações não fisiológicas é responsável pelo comprometimento da função energética mitocondrial (VERCESI et al., 1978; ORRENIUS et al., 1989; ZIMA, 2003).

O cálcio é um íon biologicamente muito ativo e está envolvido na regulação de diversos processos celulares; a elevação dos níveis citosólicos de cálcio causa ativação de vários sistemas enzimáticos cálcio-dependentes, incluindo fosfolipases, desidrogenases, proteases e endonucleases, sendo que essa elevação pode ser crítica em uma variedade de processos fisiopatológicos e toxicológicos. O ciclo mitocondrial de cálcio, determinado pelo influxo e efluxo do íon, poderia proteger a célula de grandes variações citosólicas que ocorrem em resposta a diversas situações, tais como isquemia-reperusão, ação tóxica de metais pesados e outras situações adversas (ORRENIUS et al., 1989; GUNTER e PFEIFFER, 1990; NICOTERA et al., 1992; REED, 1994; LITSKY e PFEIFFER, 1997). Acredita-se ainda que a formação de espécies reativas de oxigênio, a oxidação de grupamentos tiólicos de

proteínas da membrana mitocondrial e a diminuição do poder redutor da célula sejam eventos envolvidos no dano celular causado pelo aumento da concentração citosólica de cálcio (CASTILHO et al., 1996).

A mitocôndria apresenta a capacidade de seqüestrar rapidamente grandes quantidades de cálcio, limitando, dessa forma, seus efeitos deletérios sobre a célula. Esse influxo ocorre através de um transportador específico que utiliza principalmente a energia do gradiente eletroquímico de prótons. Vários estudos têm demonstrado que a mitocôndria não consegue seqüestrar cálcio na ausência do potencial de membrana (KÀPUS et al., 1991; GUNTER e PFEIFFER, 1990; BABCOCK et al., 1997).

O cálcio em altas concentrações, ou na presença de fosfato inorgânico, pró-oxidantes e desacopladores, pode ocasionar uma rápida alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, associada à despolarização da membrana, desacoplamento da fosforilação oxidativa, perda de intermediários metabólicos, liberação de íons intramitocondriais e um intumescimento mitocondrial de larga amplitude, resultante da perda de seletividade da membrana mitocondrial interna (LEMASTERS et al., 1997). Esse evento, conhecido como transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (TPMM), é dependente de cálcio e está associado à formação de pontes dissulfeto nas proteínas da membrana mitocondrial (PEREIRA et al., 1992), podendo ser revertido por EGTA (VERCESI et al., 1993). Além disso, a oxidação de nucleotídeos de piridina e a geração de espécies reativas de oxigênio podem induzir a TPMM (LEMASTERS et al., 1997). Estudos anteriores têm mostrado que durante a oxidação de nucleotídeos de piridina ocorre liberação de cálcio pelas mitocôndrias. A redução desses nucleotídeos por substratos oxidáveis reverte essa situação fazendo com que ocorra influxo de cálcio nas mitocôndrias (LEHNINGER et al., 1978; VERCESI et al., 1984).

Uma vez que a TPMM e os eventos subsequentes (intumescimento mitocondrial, dissipação do potencial de membrana, quebra da homeostase de cálcio e falência energética celular) estão envolvidos nos processos de dano e morte celular, o estudo dos fármacos que alterem tais eventos é importante para: (1) o estabelecimento de seus potenciais toxicológicos e (2) o delineamento dos mecanismos bioquímicos envolvidos.

Relevância do Estudo e Perspectivas Futuras

Pouco se sabe a respeito das formas não-imunes de hepatotoxicidade idiossincrática induzida por fármacos (KASS, 2006). Os metabólitos quimicamente reativos têm sido propostos como responsáveis por muitos tipos de hepatotoxicidade induzidas por fármacos, mas evidências sobre o papel desses metabólitos em tais eventos são difíceis de obter devido à falta de modelos *in vitro* e *in vivo* apropriados. Além disso, os mecanismos pelos quais esses metabólitos iniciam e propagam o dano celular são ainda pouco compreendidos (PARK et al., 2005). A toxicidade direta dos metabólitos reativos pode envolver a disfunção mitocondrial, um dos mais importantes mecanismos de danos hepáticos induzidos por fármacos. A mitocôndria é o ponto de convergência dos diferentes sinais que culminam com a morte de hepatócitos, independentemente do tipo de morte celular induzida: apoptose, necrose ou autofagia (PESSAYRE et al., 1999; KASS, 2006). Os efeitos dos AEA sobre a função mitocondrial não foram ainda esclarecidos. O conhecimento dos mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade idiossincrática associada ao uso dos AEA pode contribuir para: (1) o desenvolvimento de terapias adjuvantes de proteção hepática e (2) para prevenção do dano hepático através do estabelecimento dos fatores de predisposição e do perfil dos indivíduos susceptíveis.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Avaliar o potencial da carbamazepina, fenitoína e fenobarbital de interferir nos processos bioenergéticos celulares, por meio da investigação dos efeitos *in vitro* dos fármacos inalterados ou de seus metabólitos reativos (areno-óxidos) sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes:

Fenobarbital, fenitoína e carbamazepina foram obtidos da Sigma-Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes utilizados foram de, no mínimo, grau analítico. As soluções dos fármacos foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO). As demais soluções foram preparadas com água purificada em sistema Gradient Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

Animais:

Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, por estarem de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº05.1.1068.53.5).

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, pesando 200-220 g, obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Os animais foram alojados em gaiolas mantidas em salas com temperatura ambiente controlada (22-24°C), com ciclos de 12 horas de claro e escuro. Água e ração padrão foram fornecidas ad libitum durante todo o experimento.

Modelo Experimental

Todos os estudos foram realizados *in vitro*. Foram avaliados tanto o efeito direto dos fármacos quanto dos seus respectivos metabólitos (areno-óxidos) gerados *in vitro* através da incubação de cada fármaco com sistema microsomal hepático de rato.

Estudos Realizados:

A. Estudos relacionados à respiração mitocondrial

- ◆ Consumo de oxigênio no estado 3 (ativado) da respiração
- ◆ Consumo de oxigênio no estado 4 (não ativado) da respiração
- ◆ Determinação da Razão do Controle Respiratório (RCR)

B. Estudos relacionados à Transição da Permeabilidade da Membrana Mitocondrial

- ◆ Intumescimento osmótico mitocondrial
- ◆ Potencial de membrana mitocondrial
- ◆ Captação e liberação de cálcio

C. Estudos relacionados ao estresse oxidativo

- ◆ Determinação do malondialdeído (MDA) – lipoperoxidação
- ◆ Determinação de proteína sulfidril
- ◆ Determinação de proteínas carboniladas
- ◆ Estado redox mitocondrial: relação GSH/GSSG
- ◆ Determinação da cardiolipina

Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado (10-15 gramas) de cada animal foi imediatamente retirado e picotado em 50 ml de um meio contendo 250 mM de sacarose, 1 mM de EGTA e 10 mM de Hepes-KOH, pH 7,4 e homogeneizado em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (3 ciclos de 15 segundos com intervalos de um minuto). As mitocôndrias foram isoladas de acordo com o procedimento descrito por Pedersen et al. (1978), com algumas modificações. O homogenato foi centrifugado a 770 x g por 5 minutos, e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 9.800 x g por 10 minutos. O precipitado foi retomado em 10 ml de um meio contendo 250 mM de sacarose, 0,3 mM de

EGTA e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,4 e centrifugado a 4.500 x g por 15 minutos. O precipitado mitocondrial foi suspenso em 1 ml de um meio contendo 250 mM de sacarose e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,4 na concentração de 20 mg de proteína mitocondrial/ml. Todos os procedimentos foram realizados à 4°C e a solução mitocondrial foi utilizada em um prazo máximo de 3 horas após o isolamento. As soluções foram preparadas com água bi-distilada e deionizada. Cada experimento foi repetido usando-se de 3 a 6 diferentes preparações mitocondriais.

Determinação de Proteína Mitocondrial

A proteína foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão. A 25 µl da suspensão mitocondrial foram adicionados 10 ml do reagente de cor composto por Coomassie 250 R 0,01% (w/v), metanol 8,5% (v/v) e ácido fosfórico 85% (v/v). Após agitação e repouso por 5 minutos, a absorbância foi determinada a 595 nm contra o reagente de cor.

Preparação dos microssomas hepáticos

Os animais foram pré-tratados com fenobarbital (10 mg/kg, via intraperitoneal, 3 dias) para indução do sistema citocromo P-450. Então, os animais permaneceram sem alimentação por 24 h e foram sacrificados por deslocamento cervical. Os fígados foram removidos, lavados em NaCl 0,9% (imerso em banho de gelo) e cortados em pequenos pedaços. Porções de 5 g de fígado foram adicionadas de 15 mL de KCl 150 mM (imerso em banho de gelo) e homogeneizadas em Potter-Elvehjem (3 vezes por 15 segundos, 1 minuto de intervalo). O homogenato assim obtido foi centrifugado a 9.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante resultante (fração S9) foi centrifugado a 100.000 x g por 60 min a 4°C. O precipitado assim obtido foi retomado em 10 mL de KCl 150 mM (gelado), centrifugado a 100.000 x g a 4°C

por 30 min e novamente retomado em 10 mL de KCl 150 mM, imerso em banho de gelo (fração microssomal) (Martin and Garner, 1987).

Ensaio de toxicidade induzida pelos fármacos e metabólitos in vitro

O ensaio de toxicidade *in vitro* induzida por areno-óxidos em linfócitos humanos, previamente descrito por Spielberg et al. (1981), foi modificado e adaptado para a avaliação da toxicidade hepática mitocondrial. As concentrações dos fármacos (0,025 mM – 1 mM) utilizadas nos ensaios também foram escolhidas com base no estudo mencionado acima. O meio de incubação foi composto de 210 mM de manitol, 70 mM de sacarose, 10 mM de HEPES-Na, 1mM de EGTA, BSA 0,01%, 2,4 mM de glicose-6-fosfato, 0,6 mM de NADP e 2 U de glicose-6-fosfato desidrogenas. Os ensaios foram realizados em três diferentes condições experimentais: (A) controle: proteína mitocondrial (5mg/mL); (B) fármaco inalterado: proteína mitocondrial (5 mg/mL) juntamente com diferentes concentrações (0,025 mM – 1mM) de cada fármaco; (C) fármaco bioativado: proteína mitocondrial (5 mg/mL) juntamente com proteína microssomal (1mg/mL) e diferentes concentrações (0,025 mM – 1 mM) de cada fármaco. O volume das soluções dos fármacos nunca excedeu 20 µL para assegurar que o veículo utilizado (DMSO) não interferisse nos ensaios. Após o término da incubação as suspensões mitocondriais foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos e retomadas em 250 mM de sacarose e 10mM de HEPES-Na, pH 7,4. A concentração final foi ajustada para de 20 mg de proteína mitocondrial/ml com exceção das mitocôndrias utilizadas na determinação do MDA, as quais foram retomadas com 150 mM de KCl e 5 mM de Tris-HCl, pH 7,4 e ajustadas para concentração final de 1 mg de proteína mitocondrial /ml.

A. Estudos relacionados à respiração mitocondrial

◆ *Determinação do Consumo do Oxigênio (estados 3 e 4) e do RCR*

O consumo de oxigênio foi analisado polarograficamente, a 30°C, em um oxígrafo equipado com um eletrodo de Clark (Gilson Medical Eletronics, USA).

Os substratos respiratórios 5 mM de succinato de potássio + 1 µg/ml de rotenona ou 5 mM de glutamato de potássio + 5mM de malato de potássio foram incubados em um meio de respiração contendo: 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de fosfato de potássio, 0,5 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,4 à 30°C, de forma a obter-se um volume final de 1,5 ml. Utilizou-se 1 mg de proteína mitocondrial em cada ensaio e a respiração foi iniciada pela adição de 0,5 µmol de ADP. A Razão de Controle Respiratório (RCR), bem como o consumo de O₂ nos estados 3 (ativado) e 4 da respiração (não ativado) foram determinados a partir do traçado polarográfico, de acordo com o método descrito por Estrabook (1967).

B. Estudos relacionados à Transição da Permeabilidade da Membrana Mitocondrial

◆ *Intumescimento Osmótico Mitocondrial*

As mitocôndrias (0,4 mg de proteína) foram incubadas em 1,5 ml de um meio contendo: 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 2 mM de succinato de potássio, 5 µM de rotenona e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,4, a 30°C e as alterações na absorvância foram determinadas à 540 nm. O intumescimento foi iniciado pela adição de 10 µM de CaCl₂ e após 2 minutos, foram adicionados 1,5 mM de fosfato de potássio ou 500 µM dos fármacos.

◆ ***Potencial de Membrana Mitocondrial***

O potencial elétrico da membrana mitocondrial interna foi avaliado pelo monitoramento da captação mitocondrial de rodamina 123 realizado em espectrômetro de fluorescência (F-2500, Hitachi) operando a 535 nm (emissão) e 505 nm (excitação). Utilizou-se 1 mg de proteína mitocondrial e o meio de incubação foi composto da seguinte forma: KCl 160 mM, fosfato de potássio 8,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, rotenona 5 μ M e rodamina (123) 5 μ M. Utilizou-se succinato 10 mM como substrato respiratório. A reação foi iniciada pela adição de ADP 0,4 μ mol e o ensaio foi realizado a 30°C (Emaus et al., 1986).

◆ ***Determinação da Liberação de Cálcio Mitocondrial***

A cinética de liberação de cálcio pelas mitocôndrias de fígado foi determinado com a utilização do Arsenazo III no par de 675-685 nm (Scarpa, 1979). O meio de incubação (volume final de 1 mL) foi composto por 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 5 μ M de rotenona, 5 mM de succinato de potássio, 25 μ M de arsenazo III, e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,4, a 30°C, na ausência ou presença de 20 μ M de CaCl_2 .

◆ ***Captção/Liberação de Cálcio Mitocondrial***

A captação/liberação de cálcio pelas mitocôndrias (1 mg de proteína) foi monitorada conforme descrito acima para os ensaios de liberação de cálcio. O meio de incubação foi composto de 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 5 μ M de rotenona, 25 μ M de arsenazo III, 20 μ M de CaCl_2 , e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,4, a 30°C. A captação de cálcio foi iniciada pela adição do succinato de potássio 5 mM.

C. Estudos relacionados ao Estresse Oxidativo

◆ *Determinação de MDA (lipoperoxidação)*

Mitocôndrias recém isoladas (0,5 mg) foram incubadas em frasco tipo Erlenmeyer, sob agitação (100 ciclos/minuto) por 15 minutos, a 30°C em um meio contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 5mM de glutamato + 5mM de malato, 1µg de rotenona, 20µM de Fe⁺⁺ 100 µM de ADP e 10 mM de Hepes-KOH, pH 7,4 (volume final de 1 ml). As condições de incubação foram as seguintes: (1) na presença de 500 µM de carbamazepina, fenitoína ou fenobarbital; (2) na presença do veículo (DMSO) utilizado para solubilização do fármaco (controle negativo); (3) na presença de 0,5 mM de t-butil-hidroperóxido (controle positivo). A reação foi finalizada pela adição de 2 ml de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0,35% em HCl 0,25 mM e ácido tricloro acético 15%. A mistura resultante foi deixada em repouso por 12 horas no escuro e a coloração resultante foi determinada a 533 nm. A quantidade de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 1,49 x 10⁵ M⁻¹ (BUEGE e AUST, 1978).

◆ *Determinação de Proteína Sulfidrílica (P-SH)*

Após 15 minutos de incubação as mitocôndrias foram tratadas com ácido perclórico (concentração final de 7%) para precipitar as proteínas, e centrifugadas a 4.500 x g por 5 minutos. O precipitado foi suspenso com 100µl de ácido perclórico, suplementado com 1 ml de água e centrifugado a 4.500 x g por 5 minutos. O precipitado final foi retomado com 0,2 ml de Triton X-100 a 10% e 0,8 ml de água. Uma alíquota de 0,2 ml de 500 mM de fosfato de potássio, pH 7,6 foi adicionada a 0,8 ml da suspensão. A quantidade de grupos sulfidrílicos foi determinada pela diferença das absorvâncias à 412 nm antes e após 5 minutos da adição de DTNB (concentração final de 0,2 M). Considerou-se o coeficiente de extinção molar de 13.600 M⁻¹.

◆ ***Determinação de Proteínas Carboniladas (PC)***

A suspensão mitocondrial (9 partes) foi tratada com sulfato de estreptomicina 10% em HEPES, pH 7,2 (1 parte), e após 15 minutos centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos. A 300 µl do sobrenadante foram adicionados 300 µl de 2,4-dinitro-fenil-hidrazina 0,2% em 2M de HCl. Após 1 hora de incubação à 25°C foram adicionados 50 µl de TCA 50% e a mistura centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos. O sedimento foi lavado três vezes com 1,0 ml de uma mistura etanol/acetato de etila 1/1 (v/v), e dissolvido com 2,0 ml de 6M de guanidina em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 6,5. A absorbância foi determinada a 365 nm contra uma referência nas mesmas condições, substituindo-se a solução de dinitro-fenil-hidrazina por igual volume de solução de 2 M de HCl. Para determinação da concentração foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 22.000 M⁻¹ x cm⁻¹ (SEDLAK e LINDSAY, 1968).

◆ ***Determinação da Glutathiona Reduzida (GSH) e da Glutathiona Oxidada (GSSG)***

Após o período de incubação a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O precipitado mitocondrial foi tratado com 500µl de HClO₄ 6% e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. Na determinação da GSH, 50 µl do sobrenadante foram adicionados a um meio de reação composto de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,2, 1 mM de EDTA e 0,3 mM de NADPH. Após 5 minutos a 30°C a reação foi iniciada com 0,5 U de glutathiona redutase e a absorbância determinada a 412 nm por 5 minutos. Para a determinação da GSSG, 200 µl do sobrenadante foram adicionados de 100 µg de carbonato de sódio e 4 µl de 2-vinilpiridina. Após 1 hora de repouso ao abrigo da luz, a mistura foi centrifugada a 3.000 x g por 5 minutos e 100µl do sobrenadante foram submetidos ao procedimento acima descrito para o ensaio do GSH (TIETZE, 1969). As concentrações de GSH e GSSG foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas nas mesmas condições experimentais.

◆ ***Determinação da Cardiolipina***

Após a incubação as mitocôndrias foram marcadas com N-nonil-acridina orange (NAO) na concentração de 100 nmol/mg de proteína e após 2 minutos as mitocôndrias foram centrifugadas a 30.000 x g por 5 minutos. No caso das mitocôndrias que passaram pelo processo de bioativação, elas foram marcadas diretamente com o NAO e posteriormente centrifugadas a 30.000 x g por 5 minutos. Nas duas situações, a absorbância do sobrenadante foi determinada em 495 nm (GALLET et al, 1995).

RESULTADOS

RESULTADOS

Efeitos na respiração mitocondrial

Todos os fármacos bioativados foram capazes de: aumentar o consumo de oxigênio no estado 4 (Fig. 1); diminuir o consumo de oxigênio no estado 3 (Fig. 2) e conseqüentemente diminuir o RCR (Fig. 3). O RCR (Razão do controle Respiratório) representa a razão entre o oxigênio consumido após a adição do ADP (estado 3) e o oxigênio consumido na respiração basal (estado 4, não ativado pelo ADP).

O estado 4 da respiração não foi afetado por nenhum dos fármacos inalterados, porém, em elevadas concentrações (a partir de 200 μM ; CI_{50} de aproximadamente 750 μM), o fenobarbital inalterado promoveu inibição da respiração no estado 3 (Fig.2), bem como diminuição do RCR (Fig.3).

No caso da fenitoína, na forma inalterada a mesma não afetou a função mitocondrial, porém após a bioativação tornou-se extremamente ativa, sendo que na concentração de 50 μM já provocou um aumento significativo no estado 4 da respiração ($p < 0,01$). Na concentração de 100 μM se obteve o efeito desacoplador máximo e a partir dessa concentração observou-se um efeito inibidor. A CI_{50} (concentração que provoca 50% de inibição) foi 75 μM (Fig. 1). Em relação ao estado 3, os efeitos foram mais brandos, sendo que somente na concentração de 200 μM se obteve um efeito inibitório estatisticamente significativo ($p < 0,001$), o qual se manteve relativamente constante em concentrações superiores (Fig. 2). O RCR por sua vez começou a diminuir na concentração de 25 μM ($p < 0,05$), sendo que a partir de 200 μM as mitocôndrias foram totalmente desacopladas, evento caracterizado pelo $\text{RCR}=1$ (Fig. 3). Um comportamento similar foi obtido nos ensaios com a carbamazepina. Na forma inalterada a carbamazepina não exerceu nenhum efeito sobre a função mitocondrial, mas após a bioativação, também exerceu

um efeito desacoplador, porém somente em concentrações superiores e com menor intensidade quando comparada à fenitoína e ao fenobarbital. O estado 4 da respiração só começou a ser alterado a partir da concentração de 100 μM ($p < 0,05$) e o efeito desacoplador máximo não foi atingido nas concentrações utilizadas (Fig. 1). Em relação ao estado 3 houve uma diferença marcante em relação aos outros dois fármacos, pois se observou um aumento inicial do consumo do oxigênio em concentrações de 50-100 μM (Fig. 2). Esse consumo de oxigênio manteve-se mais elevado em relação ao controle e compensou o efeito desacoplador de tal forma que o RCR só foi significativamente alterado a partir de 500 μM , sem que a inibição teórica máxima (RCR=1) fosse atingida (Fig. 3).

O fenobarbital, que na forma inalterada já apresentava um razoável efeito inibidor, quando submetido ao processo de bioativação passou a exercer também um efeito desacoplador (aumento do consumo basal de oxigênio). O estado 4 foi alterado a partir de 50 μM ($p < 0,01$) e atingiu o pico máximo em 500 μM , sendo que com 1000 μM já se constatou um efeito inibidor máximo (Fig. 1). O seu efeito inibidor sobre o estado 3 (Fig. 2) foi aparentemente abolido pelo aumento do estado 4. No entanto, quando se analisa o RCR, a relação entre esses dois estágios da respiração, observa-se que essa aparente compensação não ocorreu, pois o RCR foi drasticamente afetado, sendo que na concentração de 100 μM já se obteve cerca de 95% de redução no seu valor (Fig. 3).

Os dados apresentados nas Figs. 1, 2 e 3 foram obtidos utilizando-se glutamato e malato como substratos respiratórios. Nos estudos com succinato ou ascorbato/TMPD como substratos respiratórios (dados não mostrados), o padrão de comportamento para os 3 fármacos analisados foi similar aos obtidos com glutamato/malato, o que demonstra que os fármacos bioativados exercem efeitos inibitórios de forma não específica sobre os três sítios da cadeia respiratória.

A Fig. 4 representa a inibição do estado 3 da respiração por diferentes concentrações de fenobarbital (500 e 1000 μM), bem como a quantidade de oxigênio consumida pelas

mitocôndrias. Enquanto nos ensaios controle foram consumidos 150 n átomos de O/mg de proteína/min, nos ensaios com 500 μM de fenobarbital esse valor caiu para 103 n átomos de O/mg de proteína/ min e nos ensaios com 1000 μM o consumo foi de somente 50 n átomos de O/mg de proteína/ min. Assim, o valor estimado para CI_{50} foi de aproximadamente 750 μM . Valores semelhantes de CI_{50} foram também obtidos para a respiração suportada por succinato, substrato do sítio 2, e por ascorbato/TMPD, substrato do sítio 3 (dados não mostrados).

A Fig. 5(A) mostra a influência do fenobarbital inalterado na oxidação do glutamato/malato, estimulada pelo ADP (estado 3 da respiração) ou pelo desacoplador CCCP. Para termos de comparação, os efeitos dos inibidores da fosforilação oxidativa estão representados na Fig. 5(B), na qual se observa que o padrão de inibição do fármaco foi similar àqueles provocados pelos inibidores de cadeia respiratória de sítio 1 (rotenona, Rot), sítio 2 (antimicina A, Ant A) e sítio 3 (KCN). O efeito foi observado tanto na respiração estimulada pelo ADP como pelo CCCP. Além disso, em contraste com o que foi observado para oligomicina (inibidor da $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$) e atractilosídeo (inibidor dos transportadores de ADP/ATP), a inibição da respiração estimulada pelo ADP não foi alterada pelo desacoplador CCCP, quando na presença do fármaco. Um padrão similar de inibição também foi observado quando o succinato/rotenona ou ascorbato/TMPD foram usados como substratos respiratórios (Fig. 6).

Efeitos sobre a síntese de ATP

O fenobarbital foi o único fármaco inalterado que inibiu a síntese do ATP, o que seria esperado, considerando-se seu efeito sobre a respiração mitocondrial. O CI_{50} foi de 750 μM . A bioativação do fenobarbital intensificou o seu efeito sobre a síntese de ATP, sendo que o seu CI_{50} foi reduzido para cerca de 200 μM e sua atividade inibitória máxima, que era de 30%, aumentada para 55%. A fenitoína mostrou-se altamente inibitória, com CI_{50} de

aproximadamente 100 μM e início de atividade em baixa concentração (50 μM). A carbamazepina apresentou o menor efeito sobre a síntese de ATP quando comparada aos outros fármacos bioativados, sendo que o seu valor de CI_{50} foi 1000 μM , o mais elevado dentre os três (Fig. 7).

Indução do Estresse Oxidativo

Nenhum dos três fármacos inalterados apresentou atividade pró-oxidante ou antioxidante em relação aos indicadores de estresse oxidativo estudados (Tabela 2). Para comparação, os resultados obtidos com *t*-butil hidroperóxido (controle positivo), bem como na ausência dos fármacos (controle negativo) são também apresentados na Tabela 2: nota-se que os valores obtidos na presença dos fármacos inalterados são bastante próximos àqueles obtidos no controle negativo. Complementando esses achados, a inclusão de superóxido dismutase e catalase durante o ensaio da respiração mitocondrial não resultou em nenhum efeito protetor sobre a inibição do estado 3 induzida pelo fenobarbital, eliminando um possível envolvimento das espécies reativas de oxigênio nesse processo (dados não mostrados).

Após o processo de bioativação, os três fármacos promoveram uma intensa lipoperoxidação, alterando todos os indicadores de estresse oxidativo avaliados (malondialdeído, glutathione, proteína carbonilada e proteína sulfidrilada). A fenitoína bioativada promoveu intensa lipoperoxidação, seguida pelo fenobarbital e carbamazepina bioativados, o que pode ser evidenciado pelos valores de malondialdeído (MDA) encontrados (Fig.8). A cardiolipina, principal fração lipídica da membrana mitocondrial interna, também foi particularmente oxidada pela fenitoína bioativada, tendo o efeito se iniciado já a partir de 50 μM . A carbamazepina bioativada promoveu o efeito menos intenso sobre a cardiolipina (somente a partir de 200 μM) e o fenobarbital promoveu um efeito intermediário (Fig. 9). Em

linha com esses achados, a oxidação das proteínas mitocondriais ocorreu de forma similar, ou seja, dentre os 3 fármacos bioativados, a fenitoína provocou o efeito mais intenso, e a carbamazepina provocou o efeito menos intenso. Os dois ensaios que evidenciam esses efeitos, oxidação de grupamentos sulfidrila e a formação de grupamentos carbonila, estão representados nas Figuras 10 e 11 respectivamente.

O estado redox mitocondrial também foi afetado pelos fármacos bioativados, o que pode ser evidenciado pela alteração da relação GSH/GSSG, ou seja, houve diminuição nos níveis da forma reduzida da glutatona, acompanhado do aumento nos níveis da glutatona oxidada. A fenitoína bioativada promoveu o efeito mais intenso e a partir de menor concentração (50 μ M) (Figs. 12 e 13).

Efeitos relacionados à Transição de Permeabilidade de Membrana Mitocondrial (TPPM)

Os fármacos inalterados não apresentaram nenhum efeito sobre a capacidade da mitocôndria em liberar ou captar o cálcio (Fig. 14A); estabelecer o potencial de membrana (Figs. 15A e 15B); além de não induzir (dados não mostrados) nem inibir o intumescimento mitocondrial (Fig. 16 A). Como o fenobarbital inalterado apresenta um efeito inibitório sobre o estado 3 da respiração, observou-se somente uma pequena queda do potencial de membrana após a adição do ADP (Fig. 15B).

Por outro lado, a intensa lipoperoxidação promovida pelos fármacos bioativados afetou a capacidade das mitocôndrias de captar/liberar cálcio (Fig.14B), de formar e manter o potencial de membrana (Figs. 15C, 15D e 15E), bem como de sofrer intumescimento (Fig. 16B), fenômenos relacionados e totalmente dependentes da integridade dos sistemas de membrana da mitocôndria.

Em relação ao transporte do cálcio, na concentração de 200 μ M a fenitoína bioativada além de inibir a captação total do cálcio em cerca de 50 %, promoveu a sua rápida liberação.

O mesmo efeito foi observado com o fenobarbital bioativado, porém em concentrações mais altas (a partir de 500 μM). A carbamazepina (200 μM) não foi capaz de alterar de forma significativa a captação/liberação de cálcio (Fig. 14B).

No caso da fenitoína bioativada, na concentração de 50 μM , houve a formação do potencial de membrana, o qual caiu na presença do ADP em consequência da fosforilação do ADP para ATP, retomou os níveis anteriores, mas não se manteve como seria esperado, desfazendo-se espontaneamente (Fig. 15C). Na concentração de 200 μM , houve a formação do potencial, porém o mesmo não se manteve e não houve resposta à adição do ADP. O mesmo efeito foi observado com 500 μM de fenobarbital bioativado (Fig. 15B). Na concentração de 500 μM a fenitoína bioativada inibiu completamente a formação do potencial de membrana (Fig. 15D). A carbamazepina bioativada, por sua vez, foi menos eficiente em alterar o potencial de membrana, pois em concentração elevada (500 μM) ainda houve a formação do potencial, resposta ao ADP (fosforilação a ATP) e recomposição do potencial, o qual se manteve estável (Fig. 15E).

Os efeitos dos fármacos bioativados sobre a captação e liberação de cálcio se refletiram diretamente no intumescimento mitocondrial, pois o evento não ocorreu nem mesmo na presença do indutor Pi (Fig.16B). Uma das possíveis causas para esse achado seria a incapacidade das mitocôndrias de manter o cálcio intracelular, fundamental para a ocorrência do intumescimento mitocondrial.

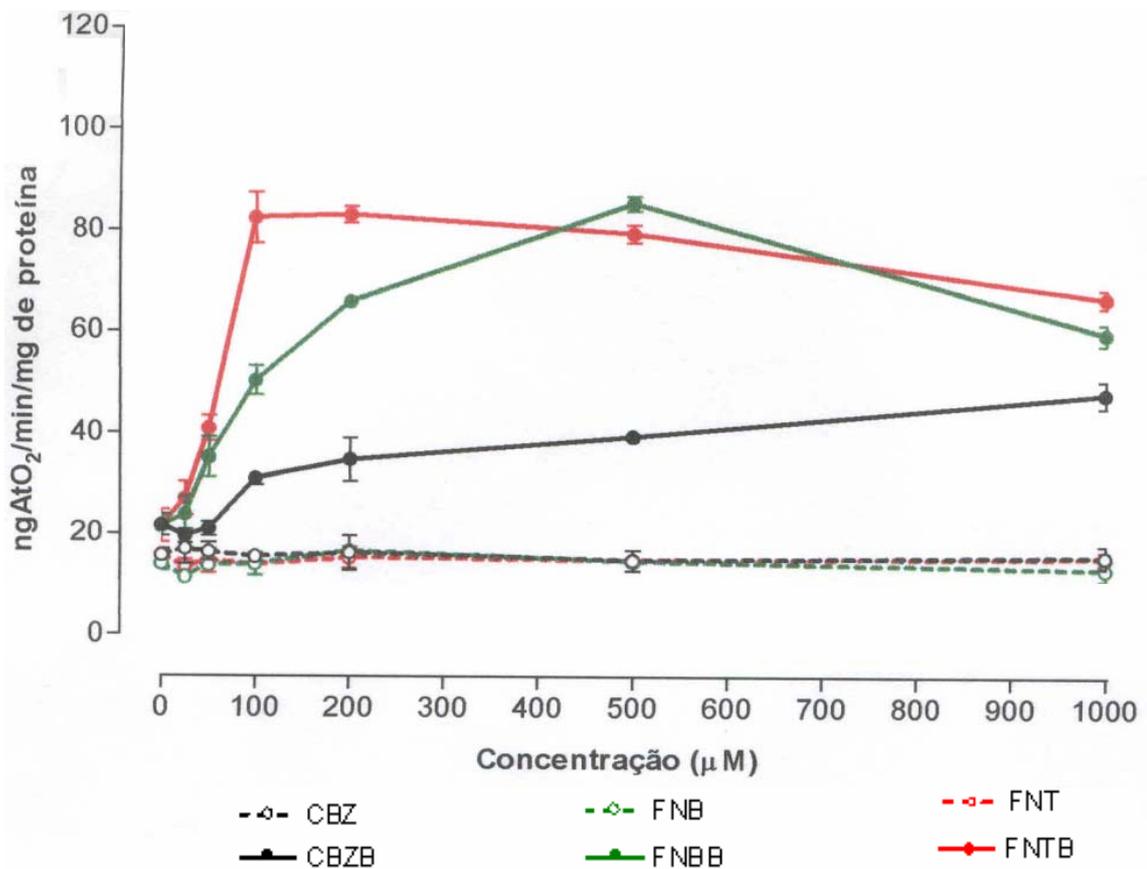


FIGURA 1. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados no estado 4 da respiração mitocondrial (n=6; glutamato + malato). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos.

CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

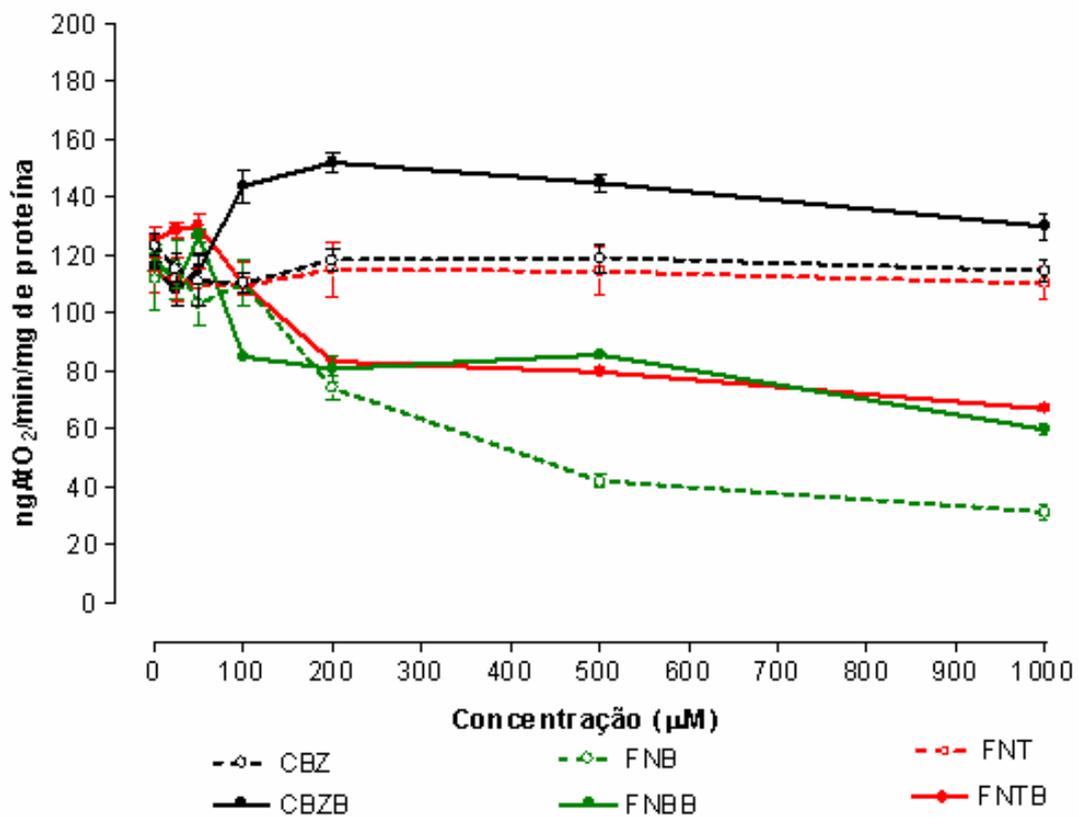


FIGURA 2. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados no estado 3 da respiração mitocondrial (n=6; glutamato + malato). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

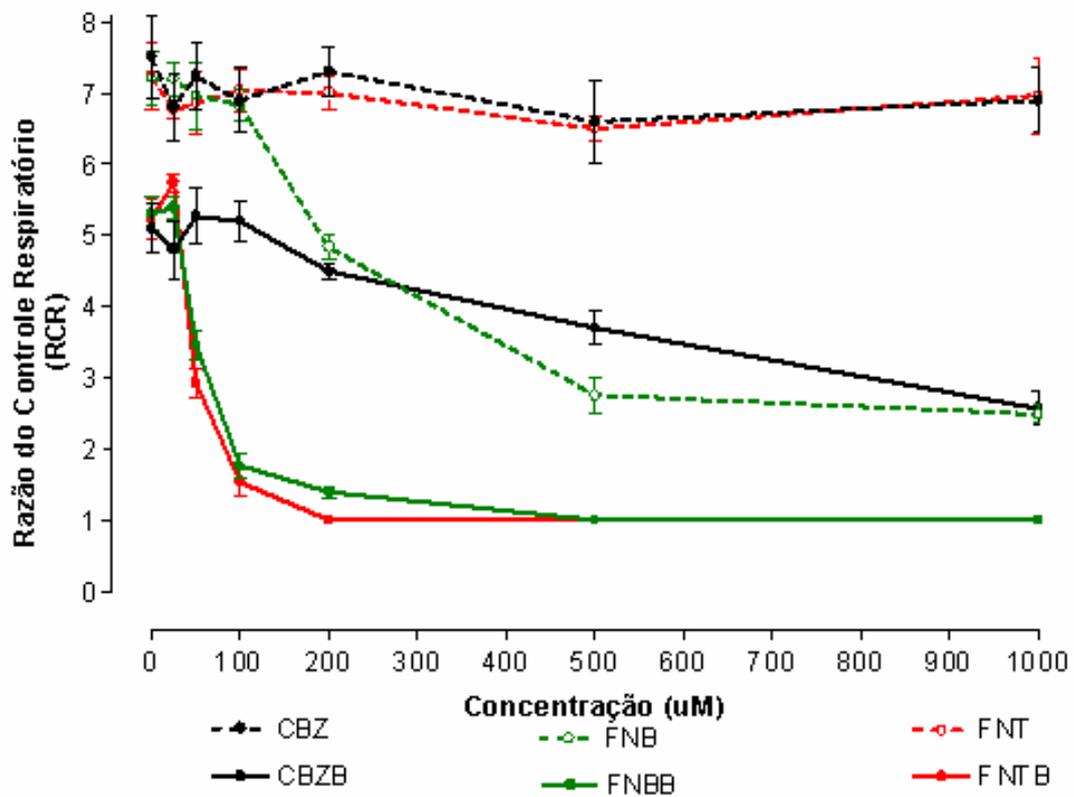


FIGURA 3. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados na Razão do Controle Respiratório (RCR) mitocondrial (n=6; glutamato + malato). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

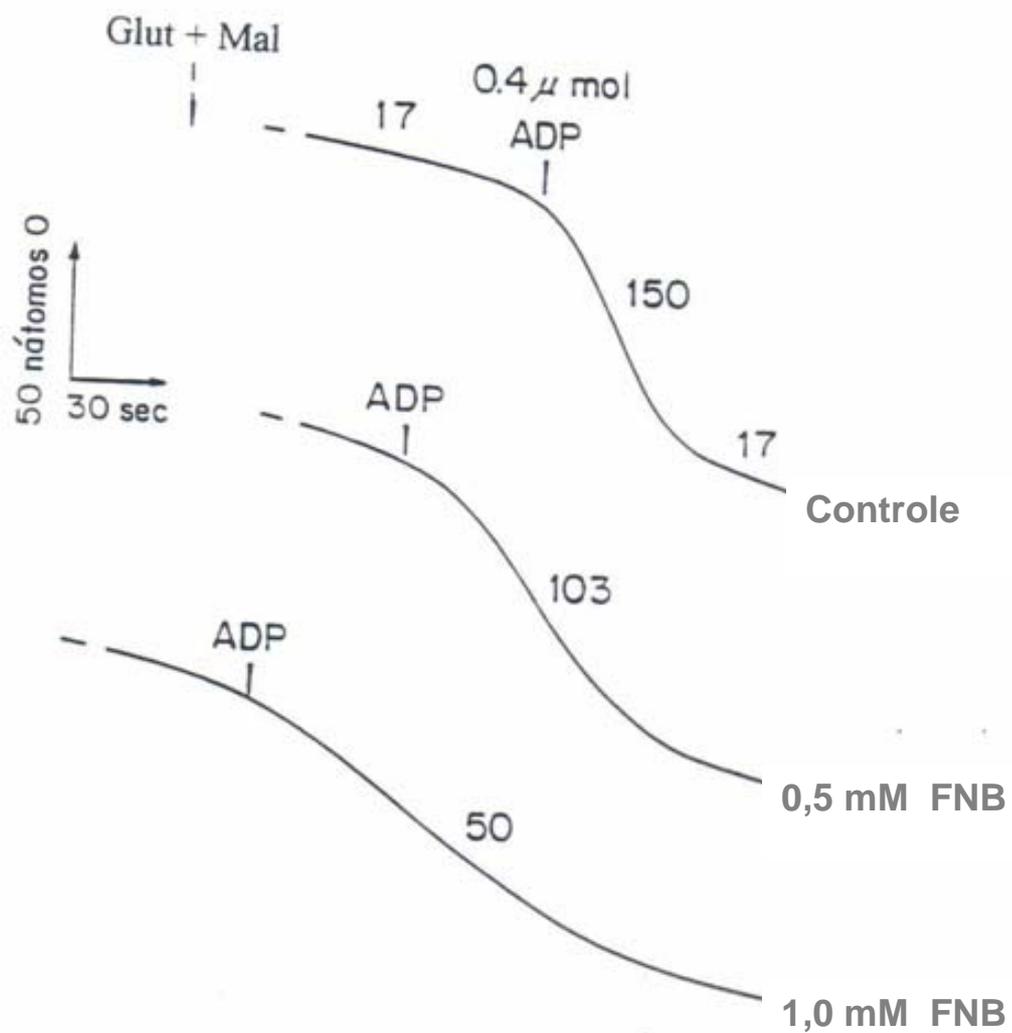


FIGURA 4 - Efeito do fenobarbital inalterado (FNB) na oxidação de malato + glutamato pelas mitocôndrias de fígado de ratos. Os valores foram expressos em n átomos de O/mg de proteína/min. Os traçados são representativos do valor médio obtido com diferentes ensaios (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. FNB = fenobarbital inalterado

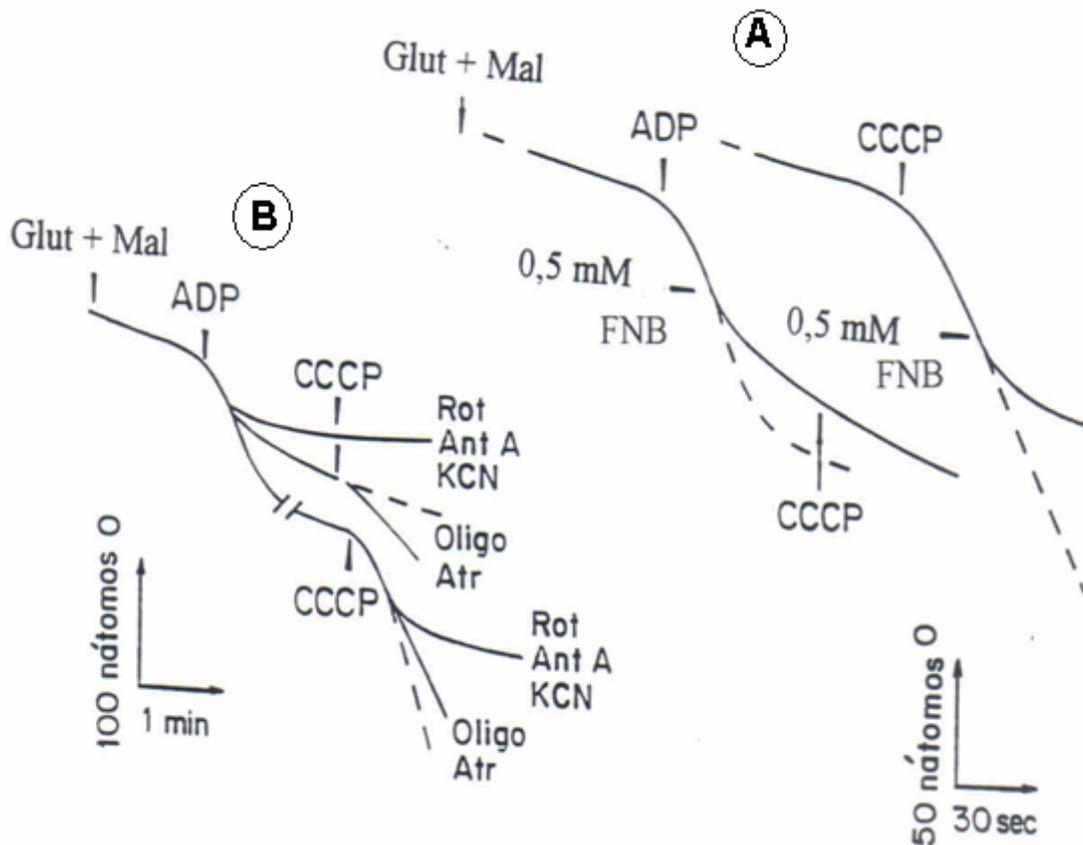


FIGURA 5 - (A): Efeito do fenobarbital inalterado (FNB) na respiração de mitocôndrias de fígado de ratos energizadas com malato 5 mM + glutamato 5 mM, estimulada com ADP (0,4 μ mol) ou com o desacoplador CCCP (1 μ g/ml). (B): Efeito da rotenona (1 μ g/ml), antimicina A (1 μ g/ml), KCN (0,33 mM), oligomicina (1 μ g/ml), atractilosídeo (50 μ m) e CCCP (0,1 μ g/ml) (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. FNB = fenobarbital inalterado; CCCP= Carbonil Cianeto P-Triclorometoxifenilhidrazona (desacoplador); Rot = rotenona; Ant A = antimicina A; Oligo = oligomicina; Atr = atractilosídeo.

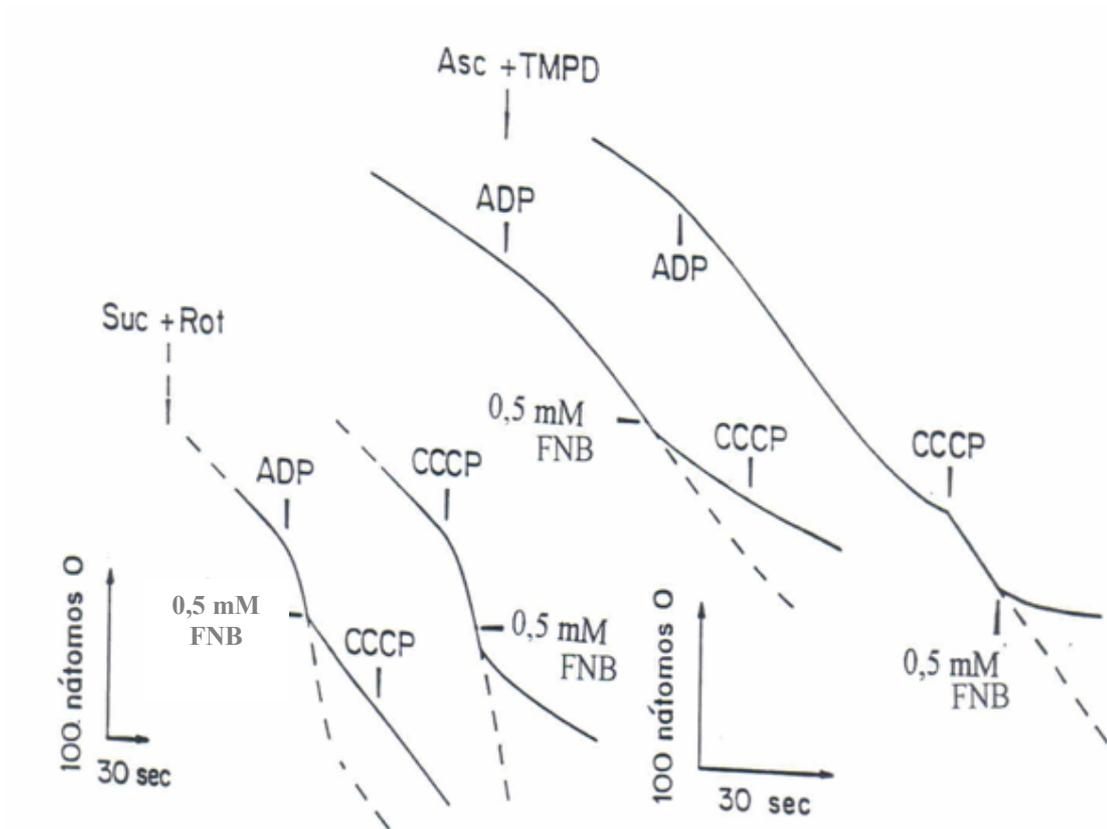


FIGURA 6 - Efeito do fenobarbital inalterado (FNB) na respiração de mitocôndrias de fígado de ratos energizadas com succinato 10 mM + rotenona 1 $\mu\text{g/ml}$ ou ascorbato 4 mM + TMPD 0,1 mM. O consumo de oxigênio no estado 3 da respiração suportado por succinato + rotenona e ascorbato + TMPD são 142 e 184 nãtomos de O/mg de proteína/min, respectivamente (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. FNB = fenobarbital inalterado; CCCP = cianeto de carbonila clorofenilhidrazona (desacoplador)

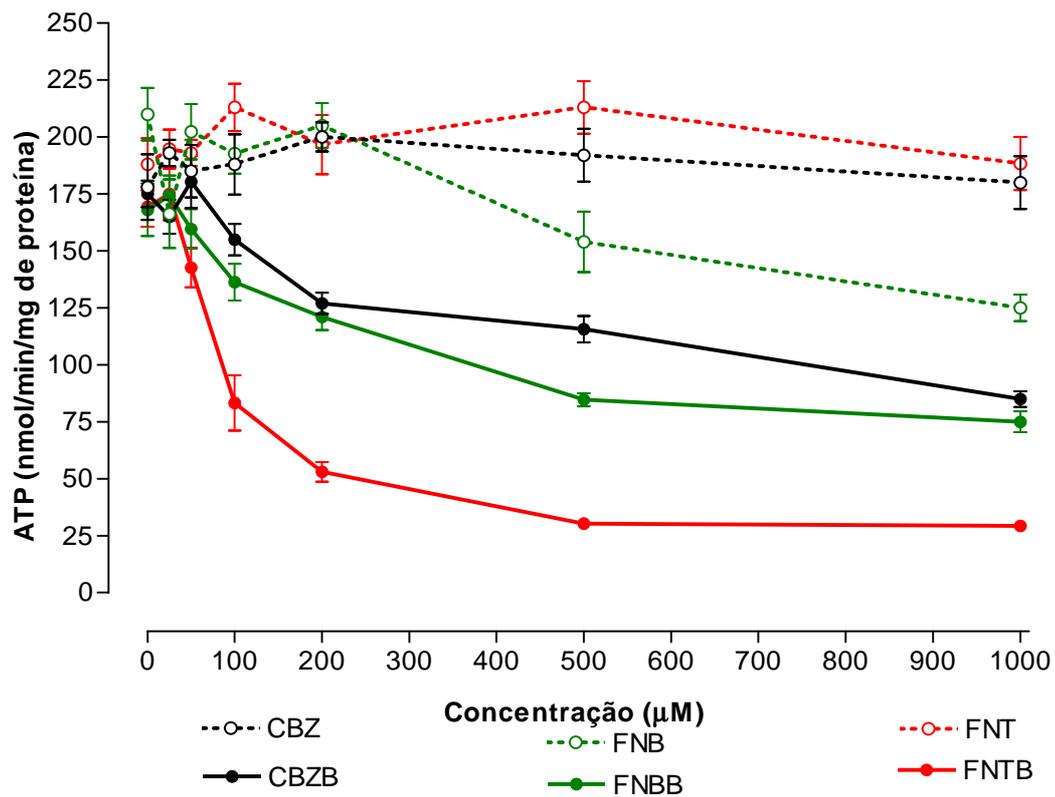


FIGURA 7 - Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados na síntese de ATP (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB= carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

TABELA 2. Efeitos da carbamazepina, fenitoína e fenobarbital inalterados na formação do MDA, nos níveis de GSH, GSSG, proteína carbonil (PC) e proteína sulfidril (P-SH) em mitocôndrias de fígado de rato.

	CBZ	FNT	FNB	CONTROLE POSITIVO (t-BOH)	CONTROLE NEGATIVO
MDA	5,0 ± 0,8	4,53 ± 0,57	4,2 ± 0,47	2,15 ± 0,63	4,50 ± 0,26
GSSG	0,046 ± 0,03	0,044 ± 0,04	0,042 ± 0,01	0,059 ± 0,006	0,044 ± 0,03
GSH	0,70 ± 0,1	0,75 ± 0,37	0,74 ± 0,25	0,68 ± 0,43	0,73 ± 0,13
PC	98,0 ± 6,3	90 ± 5,4	95,0 ± 1,4	53,0 ± 3,5	95,0 ± 12,2
PSH	1,78 ± 0,3	1,81 ± 0,10	1,82 ± 0,07	4,75 ± 0,65	1,84 ± 0,09

t-BOH = t-butil hidroperóxido; CBZ = carbamazepina inalterada; FNB = fenobarbital inalterado; FNT = fenitoína inalterada

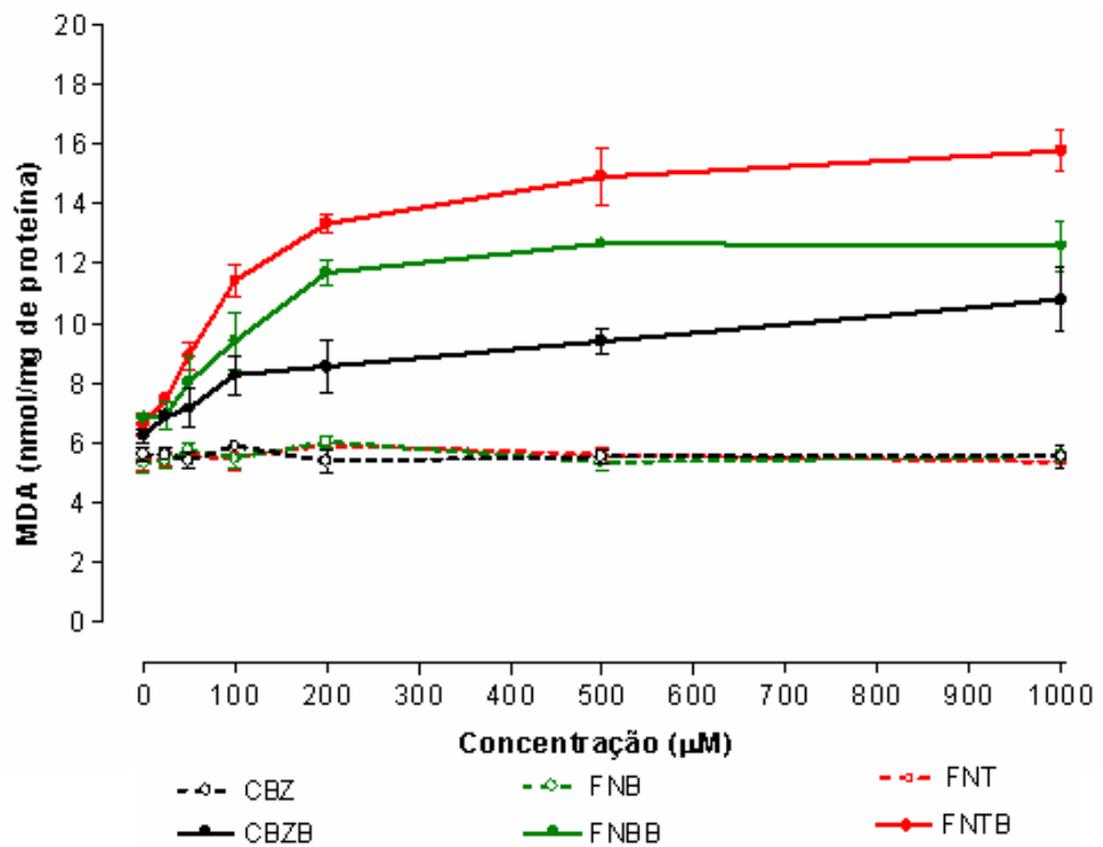


FIGURA 8. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de malondialdeído (MDA) mitocondrial (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

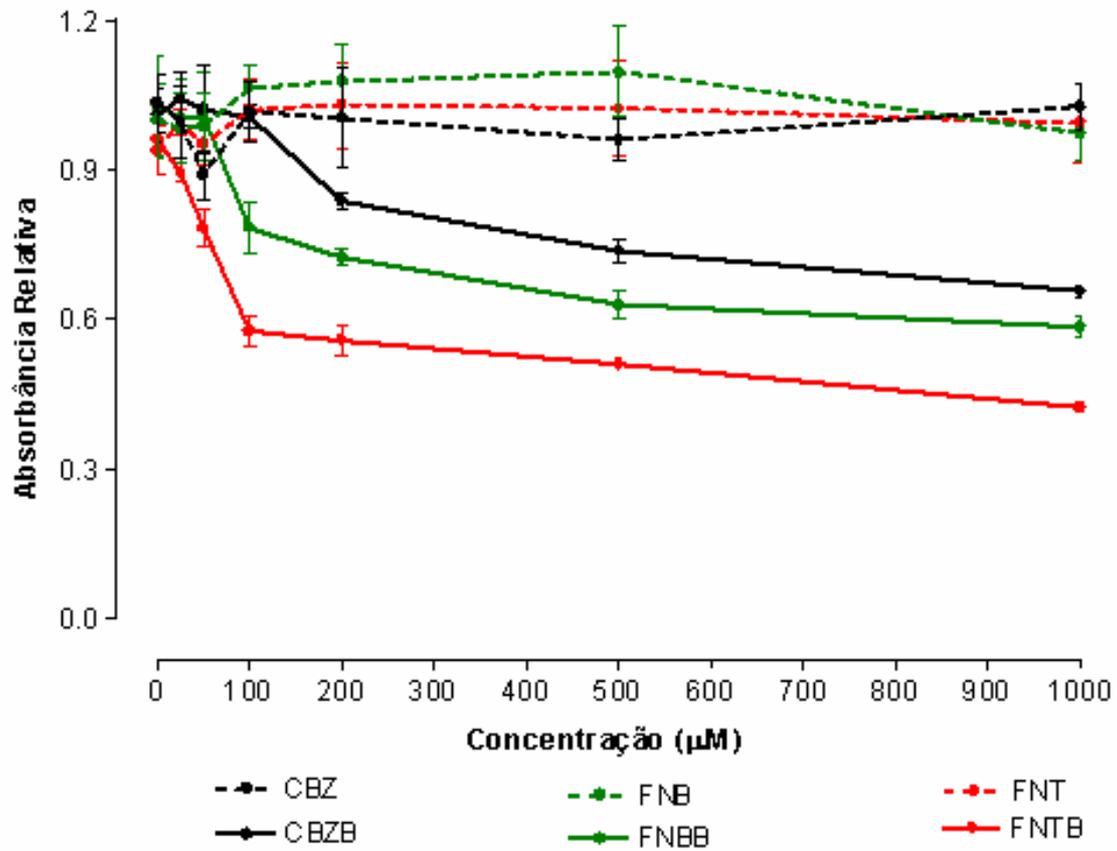


FIGURA 9. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de cardiolipina mitocondrial (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

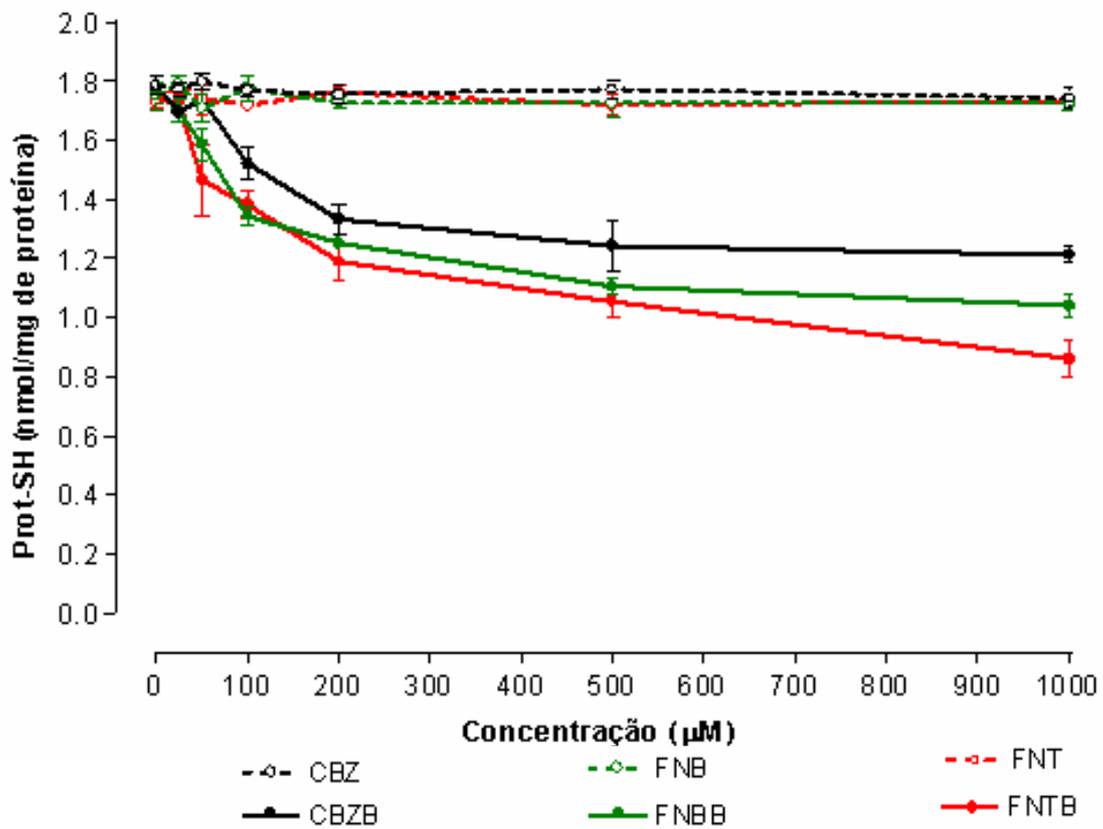


FIGURA 10. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de proteína sulfidril (Prot-SH) mitocondrial (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

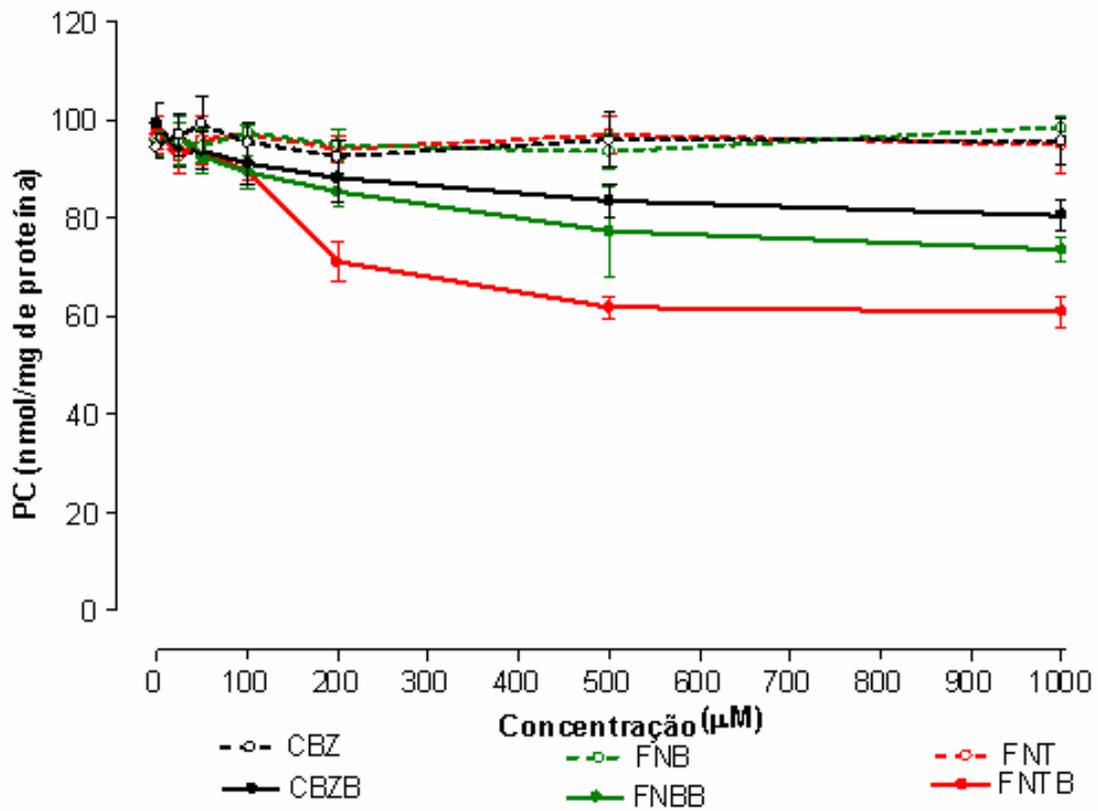


FIGURA 11. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de proteína carbonil (PC) mitocondrial. (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

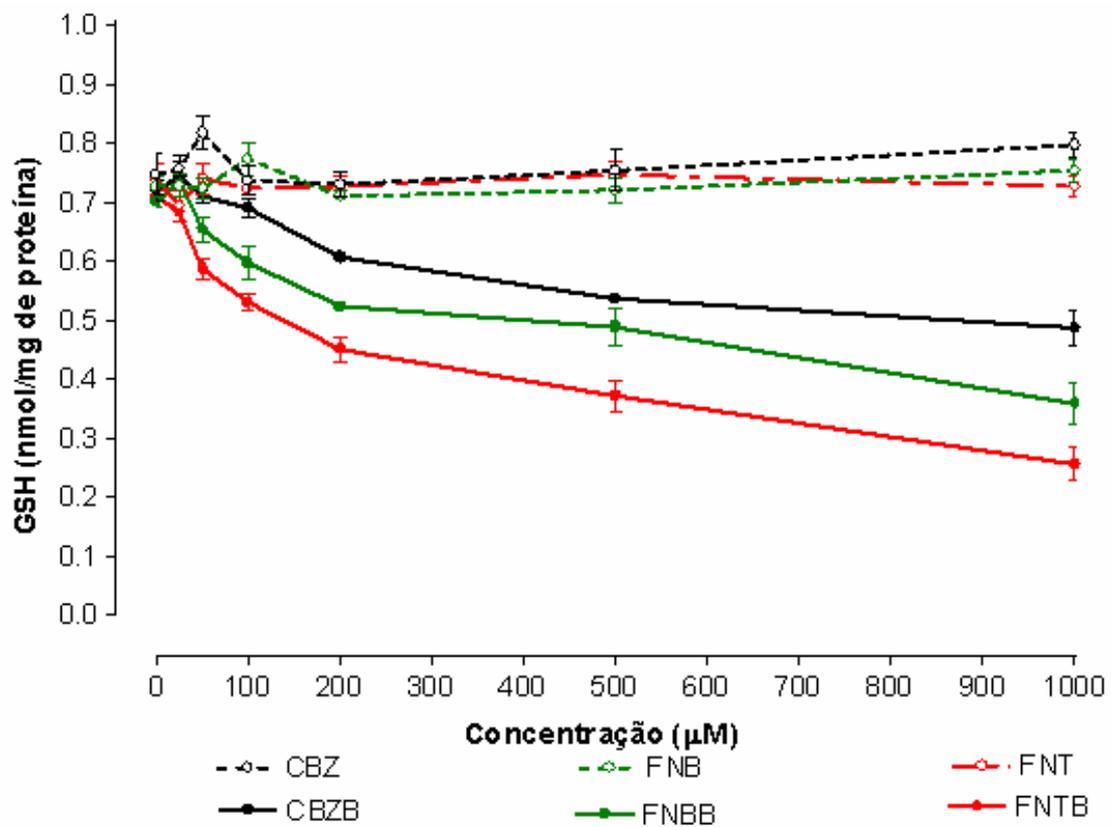


FIGURA 12. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de glutatona reduzida (GSH) mitocondrial (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

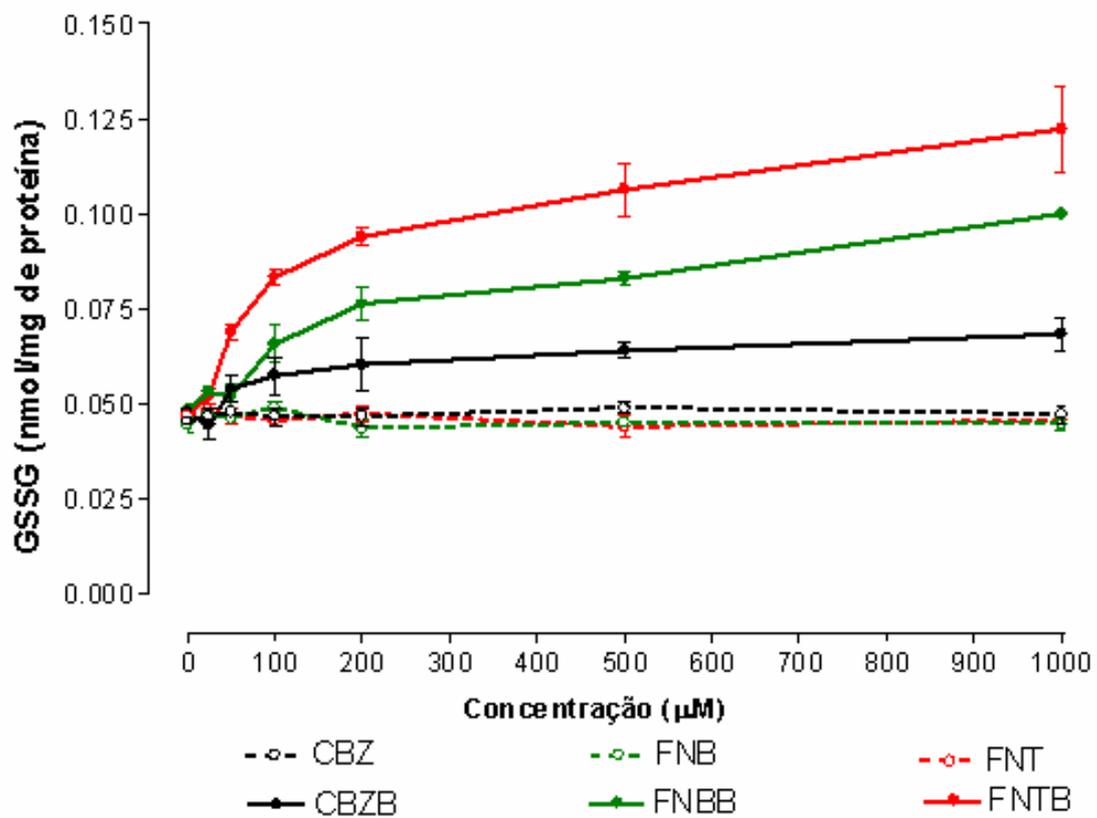


FIGURA 13. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados nos níveis de glutatona oxidada (GSSG) mitocondrial. (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

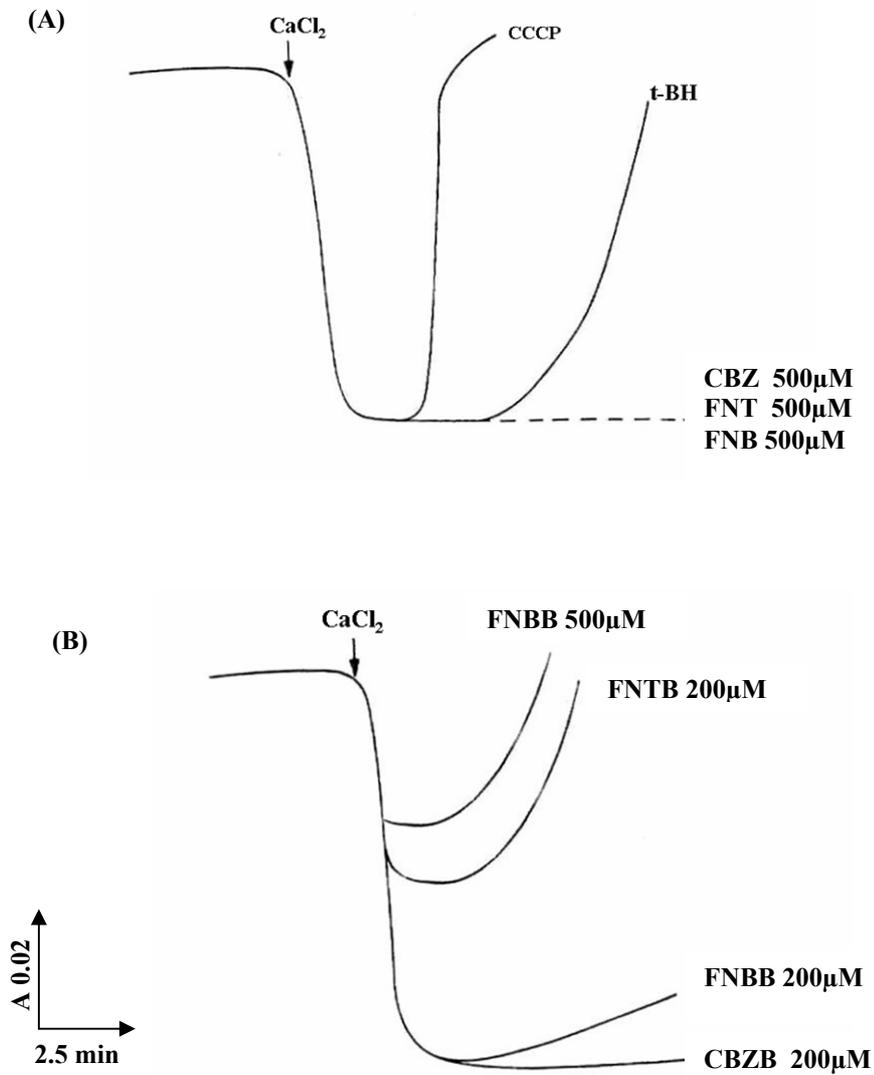


FIGURA 14. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados (A) e bioativados (B) na captação e liberação do cálcio (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada; t-BOOH = t-butil hidroperóxido; CCCP = cianeto de carbonila clorofenilhidrazona (desacoplador)

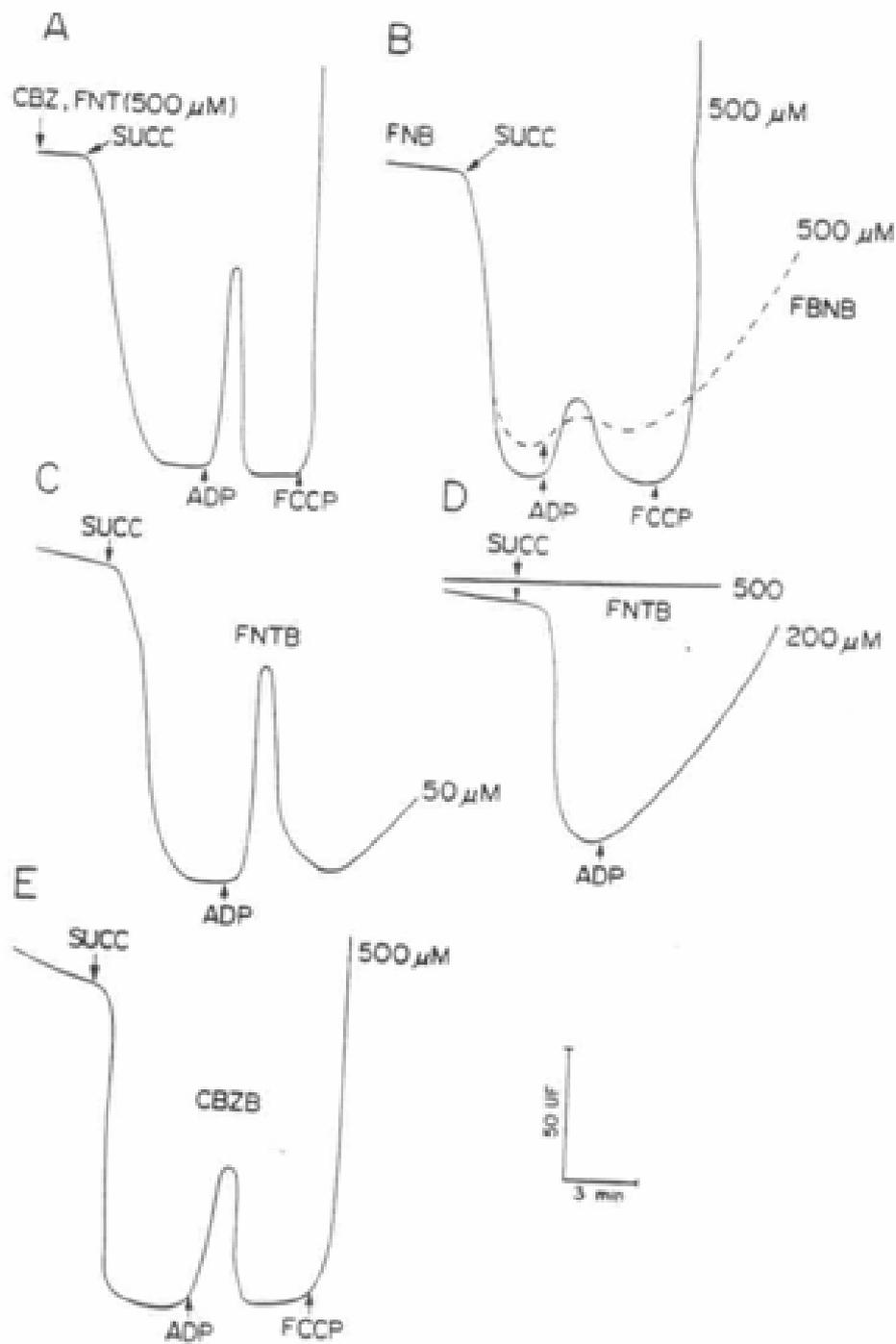


FIGURA 15. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) inalterados e bioativados no potencial de membrana mitocondrial. (n=6). As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

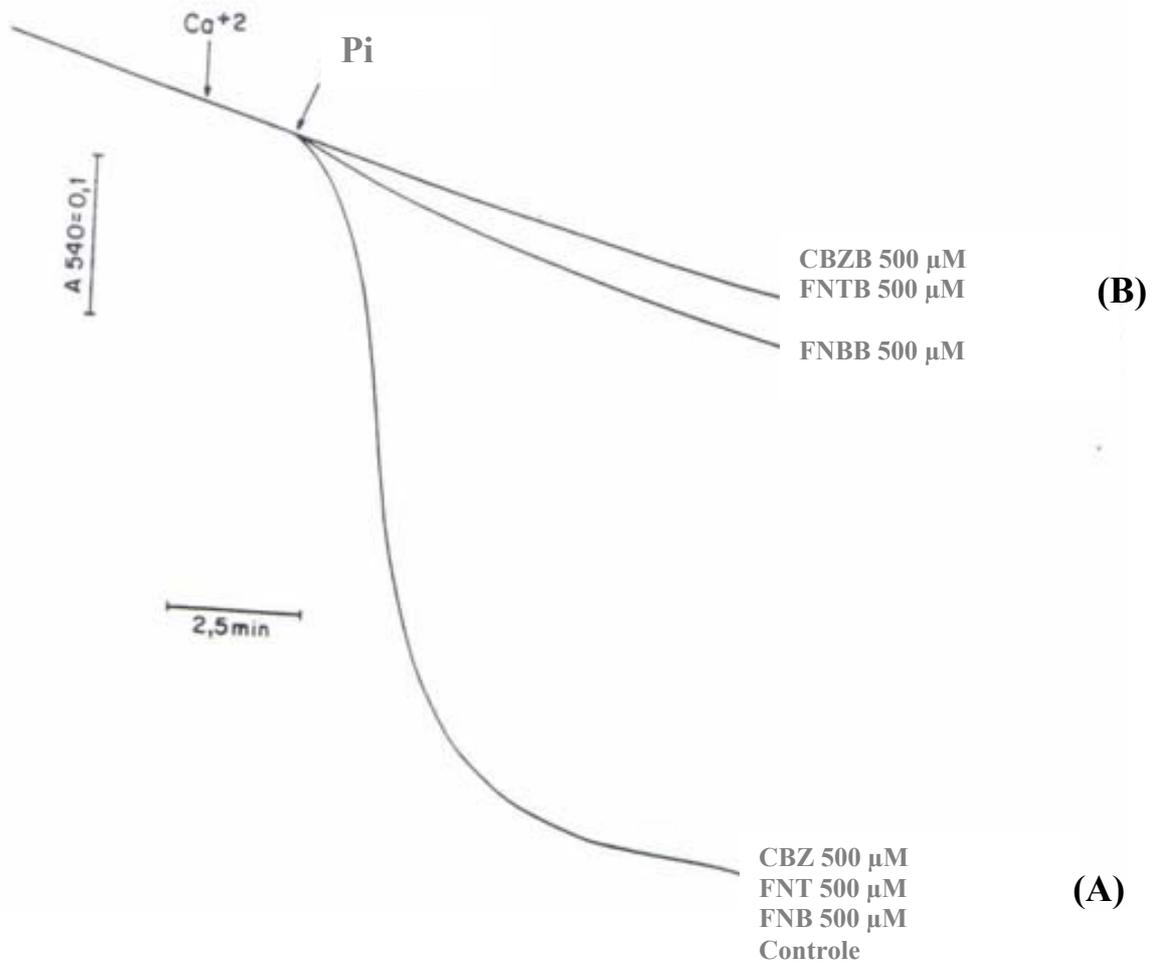


FIGURA 16. Efeitos dos fármacos (carbamazepina, fenobarbital e fenitoína) bioativados no intumescimento de mitocôndrias de fígado de ratos. As condições do ensaio estão descritas em Materiais e Métodos. CBZ = carbamazepina inalterada; CBZB = carbamazepina bioativada; FNB = fenobarbital inalterado; FNBB = fenobarbital bioativado; FNT = fenitoína; FNTB = fenitoína bioativada

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os efeitos tóxicos de muitos fármacos têm sido relacionados aos seus produtos de oxidação, metabólitos intermediários eletrofílicos altamente reativos tais como epóxidos e areno-óxidos. As enzimas que catalisam essa bioativação variam de acordo com o substrato e incluem o sistema citocromo P450, prostaglandina H sintetase (PHS), e possivelmente lipooxigenases (LPOs). Se esses intermediários não forem rapidamente neutralizados pelas epóxido-hidrolases e glutathione S-transferase (GST), seus centros eletrofílicos (positivamente carregados) podem reagir com constituintes celulares com grupamentos ricos em elétrons tais como as proteínas, principalmente as que contêm resíduos tiólicos, formando uma ligação covalente, forte e de caráter irreversível. Se essa ligação covalente não for convenientemente reparada, o aduto formado pode iniciar um processo de lesão celular, que, em última instância, pode levar à morte celular (PUMFORD, 1997).

Um outro mecanismo de ação tóxica de muitos fármacos se dá pela formação direta de um radical livre e/ou subsequente formação indireta de espécies reativas de oxigênio (ERO) e enfraquecimento das defesas antioxidantes. O radical livre derivado diretamente do fármaco pode ser centrado no carbono, nitrogênio ou oxigênio e tem sido associado à ação tóxica (carcinogenicidade, mutagenicidade, necrose celular e peroxidação lipídica) de uma grande variedade de compostos não estruturalmente relacionados. O radical livre pode ser produzido tanto enzimaticamente como não enzimaticamente e, devido à sua alta reatividade, pode participar de um grande número de reações incluindo: (1) transferência de elétrons para o oxigênio molecular originando o anion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio; (2) abstração de átomos de hidrogênio provocando a auto-oxidação de ácidos graxos poliinsaturados; e (3) ligação covalente a macromoléculas. As ERO podem oxidar

macromoléculas diversas tais como proteínas, lipídios e o próprio DNA, processo esse conhecido como estresse oxidativo (TURRENS et al., 2003; FARISS et al., 2005).

Há dois mecanismos básicos através dos quais os fármacos geram radicais livres. O principal deles se dá pela ativação dos fármacos pelo sistema enzimático microsossomal do citocromo P450. Esse sistema pode metabolizar moléculas tornando-as radicais livres pela adição de elétrons (redução) como, por exemplo, no caso do tetracloreto de carbono e do halotano; ou removendo elétrons (oxidação) (GOEL et al., 1988.). No último caso, espécies químicas deficientes de elétrons ou substâncias eletrofilicas são formadas. Os produtos dessas reações podem ou não ser radicais livres. Exemplos típicos de fármacos que são bioativados pelo citocromo P450 incluem o acetaminofeno e os hidrocarbonetos aromáticos, principalmente o bromobenzeno. O segundo mecanismo de formação de radicais livres ocorre através do ciclo redox, que não necessariamente envolve a participação do citocromo P-450 (KALGUTKAR et al., 2007; TOMPKINS et al., 2007).

Embora sejam de ocorrência relativamente rara, as reações idiossincráticas constituem uma preocupação importante quando a terapia com AE é iniciada, constituindo a maior causa de interrupção do tratamento com esses fármacos. A maioria dos AEA, incluindo a carbamazepina, a fenitoína e o fenobarbital, são predominantemente metabolizados no fígado, originando produtos hidroxilados formados através de oxidações mediadas pelo citocromo P450. Durante esse processo são formados intermediários altamente reativos conhecidos como areno-óxidos, os quais possuem meia vida muito curta e podem provocar danos nos sítios de formação. Assim sendo, o fígado é um órgão particularmente vulnerável à toxicidade dos metabólitos intermediários altamente reativos produzidos durante a biotransformação.

Os areno-óxidos são caracterizados por duas ligações duplas no anel aromático que lhes conferem alta reatividade, reagindo rapidamente com centros nucleofílicos das

macromoléculas celulares, tais como DNA, RNA, proteínas e lipídios. Os efeitos tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos dos compostos aromáticos têm sido freqüentemente correlacionados à extensão da sua ligação aos biopolímeros e há fortes evidências de que os areno-óxidos sejam os agentes indutores desses efeitos. A extensão da ligação dos areno-óxidos com constituintes celulares depende da velocidade com que são formados bem como da velocidade com que são convertidos em fenóis, hidratados e conjugados com a glutathione (BAVDEKAR et al., 2004).

A hepatotoxicidade induzida pelos antiepilépticos pode ocorrer como parte de uma reação idiossincrática generalizada ou como um evento isolado, sendo que a sua prevalência é de cerca de 9% dentre os pacientes em tratamento com carbamazepina, fenitoína e fenobarbital (JEAVONS, 1983; AHMED e SIDDIQI, 2006, ZACCARA et al., 2007).

As reações adversas induzidas pelos AEA têm sido atribuídas ao acúmulo dos areno-óxidos formados, o que, por sua vez, pode ocorrer como consequência de deficiências metabólicas genéticas ou adquiridas, como por exemplo, deficiências na enzima epóxido hidrolase, responsável pela detoxificação desses metabólitos (SIERRA et al., 2005).

Essas reações idiossincráticas têm sido relatadas principalmente como imunesmediadas; entretanto efeitos tóxicos diretos também podem ocorrer. Os efeitos citotóxicos dos areno-óxidos formados durante a biotransformação dos AEA foram previamente avaliados por diferentes autores através de ensaios de toxicidade com linfócitos humanos (SPIELBERG et al., 1981; TABATABAEI et al., 1997; NEUMAN et al., 2000; BAVDEKAR et al., 2004; DIWIVEDI et al., 2004; BOHAN et al., 2007), mas o papel da mitocôndria no desenvolvimento desses efeitos ainda não foi esclarecido.

No presente estudo, avaliamos a capacidade dos AEA de alterar a função mitocondrial e promover o estresse oxidativo, quando submetidos ou não ao processo de bioativação com os sistemas enzimáticos do citocromo P450. Tomando por base o método previamente

descrito por Spielberg et al. (1981), a biotransformação de três AEA clássicos foi realizada, *in vitro*, pela ação das enzimas presentes nos microsomas de fígado de ratos. Esse foi o primeiro estudo da literatura científica a demonstrar a toxicidade mitocondrial induzida por esses fármacos e a delinear os mecanismos envolvidos. Até então, a disfunção mitocondrial havia sido associada apenas à hepatotoxicidade induzida pelo ácido valpróico, um antiepiléptico não aromático (TONG et al., 2005).

Os resultados encontrados nos permitem supor que a disfunção mitocondrial possa estar envolvida tanto na (1) idiosincrasia associada às deficiências da enzima epóxido-hidrolase quanto na (2) idiosincrasia associada às anormalidades mitocondriais genéticas ou adquiridas. No primeiro caso, ocorreria acúmulo de metabólitos reativos que, além de atuar como pró-haptenos e iniciar uma resposta imune, como já proposto anteriormente (BOHAN et al., 2007), também atuariam exercendo efeito tóxico direto sobre as mitocôndrias hepáticas. No segundo caso, o acúmulo dos areno-óxidos não necessariamente ocorreria, mas sim uma maior susceptibilidade mitocondrial aos efeitos tóxicos diretos desses metabólitos, resultando em dano e morte hepatocelular.

De fato, as anormalidades mitocondriais genéticas ou adquiridas têm sido apontadas como o principal fator determinante da susceptibilidade a um grande número de fármacos capazes de afetar as mitocôndrias e causar danos hepáticos (BOELSTERLI e LIM, 2007). Nossos dados sugerem fortemente que as anormalidades mitocondriais pré-existentes constituem fatores que aumentam a predisposição à hepatotoxicidade de natureza idiosincrática associada ao uso de AEA.

Em nosso estudo o metabolismo energético mitocondrial foi afetado pelos metabólitos dos três AEA avaliados. Como fármaco inalterado (sem a bioativação) somente o fenobarbital foi capaz de afetar a função mitocondrial. Assim, com relação à disfunção mitocondrial a potência dos fármacos estudados foi: fenitoína ativada > fenobarbital ativado >

carbamazepina ativada > fenobarbital inalterado. Os demais fármacos inalterados não produziram nenhum efeito sobre a função mitocondrial.

O efeito produzido pelo fenobarbital ocorreu somente em concentrações mais elevadas, porém no caso de doenças hepáticas pré-existentes tal efeito poderia se tornar particularmente importante. Qualquer comprometimento da função hepática que resultasse na inibição da biotransformação, poderia causar acúmulo do fármaco inalterado e exacerbar o seu efeito hepatotóxico.

Em concentrações superiores a 200 μM , o fenobarbital causou uma inibição do transporte de elétrons de maneira concentração-dependente e não-específica. O padrão de inibição da fosforilação oxidativa pelo fenobarbital apresentou as características típicas dos inibidores da cadeia respiratória de sítio I (rotenona), sítio II (antimicina A) e sítio III (KCN). O fenobarbital inibiu a respiração estimulada tanto pelo ADP como pelo CCCP, indicando que ambos, a fosforilação oxidativa e o transporte de elétrons, foram inibidos. Além disso, a inibição do estado 3 ocorreu com diferentes substratos, o que sugere que os complexos I, II e IV provavelmente foram afetados, uma vez que malato/glutamato doam elétrons para a cadeia respiratória através do complexo I, succinato através do complexo II e ascorbato/TMPD através do complexo IV. Esses dados demonstram uma interação não específica do fármaco inalterado com os componentes da cadeia respiratória, com conseqüente diminuição do fluxo de elétrons nos três sítios conservadores de energia.

Por outro lado, o fenobarbital não alterou o estado 4 da respiração (respiração não ativada pelo ADP), o que sugere que a membrana mitocondrial interna permaneceu intacta. O efeito do fenobarbital (inalterado) sobre a função mitocondrial ocorreu somente em concentrações elevadas e, de acordo com os indicadores avaliados, não foi mediado pelo estresse oxidativo, o que explica o fato de que a membrana mitocondrial interna não foi danificada pelo fármaco.

Em contrapartida, todos os fármacos bioativados inibiram a respiração no estado 3 e aumentaram o consumo de oxigênio no estado 4, o que sugere que além de inibir o transporte de elétrons, os metabólitos dos três AEA também afetaram a membrana mitocondrial interna. No caso específico do fenobarbital, a bioativação promoveu a intensificação do efeito sobre a cadeia respiratória, levando à inibição com metade da concentração (100 μM) quando comparado ao fármaco inalterado (200 μM). Tal inibição sugere que o fenobarbital e particularmente os metabólitos dos AEA podem danificar a cadeia respiratória e, portanto, interferir no metabolismo energético. Confirmando esses achados, o fenobarbital inalterado e todos os fármacos bioativados inibiram a síntese de ATP.

Tanto o fenobarbital inalterado quanto os fármacos bioativados afetaram o potencial de membrana mitocondrial, sendo que a bioativação intensificou o efeito do fenobarbital sobre esse parâmetro. O fenobarbital bioativado foi dez vezes mais eficaz (50 μM) em promover tal efeito se comparado aos outros fármacos bioativados (500 μM), dado esse, em concordância com os achados relativos à respiração mitocondrial e síntese de ATP. O potencial de membrana mitocondrial resulta do efluxo de prótons da matriz para o espaço inter-membranas e fornece a energia necessária para a síntese de ATP pelo complexo V. Assim, baseado no seu efeito sobre o potencial eletroquímico seria esperado que o fenobarbital bioativado fosse mais efetivo em inibir a síntese de ATP quando comparado ao fármaco inalterado.

No caso do transporte do cálcio, somente após a bioativação os fármacos apresentaram algum efeito. Conseqüentemente, a inibição do intumescimento mitocondrial induzido pelo cálcio também somente ocorreu com os fármacos bioativados. Esse fato provavelmente se deve à incapacidade da mitocôndria de manter a concentração de cálcio necessária para a abertura do poro de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (TPMM) e o subseqüente intumescimento osmótico da organela. Na forma inalterada os fármacos não

foram capazes de induzir/inibir o intumescimento mitocondrial e nem alterar a captação e liberação de cálcio pelas mitocôndrias.

A fenitoína, em particular, parece ter originado o metabólito com maior potencial tóxico, uma vez que menores concentrações do fármaco bioativado afetaram o estado 4 da respiração, o RCR e a síntese de ATP. Contrariamente, maiores concentrações foram necessárias para inibir o estado 3 da respiração, o que sugere que o metabólito da fenitoína atua primariamente causando dano estrutural à membrana mitocondrial interna e não por inibição direta da transferência de elétrons.

Pode-se atribuir o maior efeito tóxico da fenitoína à extensa lipoperoxidação, evidenciada pelos indicadores de estresse oxidativo e pelos subseqüentes danos à membrana mitocondrial. De fato, o aumento observado inicialmente no estado 4 da respiração é consistente com essa afirmação, uma vez que danos à membrana mitocondrial normalmente conduzem ao desacoplamento da respiração mitocondrial, visto a dificuldade da mitocôndria em manter o potencial eletroquímico necessário para síntese de ATP. Esse esforço maior é parcialmente compensado pelo aumento do consumo do oxigênio. Em condições normais, cerca de 2% do oxigênio utilizado pela mitocôndria não sofre a redução tetravalente a H_2O e escapa da cadeia transportadora de elétrons na forma, principalmente, de superóxido. O principal ponto da cadeia transportadora de elétrons onde ocorre essa produção do superóxido é a região da ubisemiquinona-citocromo b. A geração de ERO ocorre principalmente no estado 4 da respiração, na ausência do ADP e na presença de um excesso de substratos respiratórios. Nessas condições, os carreadores de elétrons estão em um estado altamente reduzido e é possível que ocorra um aumento dos níveis de ubisemiquinona capaz de reduzir o oxigênio provocando um aumento na produção de ERO. A geração dessas ERO, e sua conseqüente interação com o ferro livre (reação de Fenton) resultam na produção do radical hidroxil ($OH\cdot$). Essa espécie química é altamente reativa podendo atacar componentes

biomoleculares e iniciar a lipoperoxidação das membranas mitocondriais, resultando na disfunção mitocondrial (FLORA, 2007; VALKO et al., 2007).

A maior reatividade do metabólito da fenitoína poderia ser explicada por dois fatores: (1) formação de um epóxido mais reativo e/ou (2) biotransformação em maior escala. O primeiro fator poderia ser atribuído à conformação mais planar da molécula na qual o grupamento epóxido encontra-se mais exposto e livre para reagir. Quanto ao segundo fator, sabe-se que, *in vivo*, a fenitoína de fato sofre extensa biotransformação pelas enzimas do sistema microsomal hepático, sendo que mais de 95% da fenitoína é biotransformada no fígado e somente 5% é eliminada de forma inalterada na urina (AHMED e SIDDIQI, 2006). Sabe-se que ocorre a formação de um areno-óxido intermediário durante a conversão da fenitoína no derivado *para*-hidroxi-fenil fenitoína (p-HPPH). Supõe-se que esse metabólito intermediário esteja envolvido nas reações idiossincráticas hepáticas associadas à fenitoína, embora esse composto nunca tenha sido isolado no plasma ou urina, muito provavelmente devido à sua elevada instabilidade (ZACCARA et al., 2007).

O dano hepático causado pela fenitoína é raro, mas fatal em 10 a 38% dos casos (DRIEFUS e LANGER, 1987). O mecanismo responsável pela hepatotoxicidade da fenitoína tem sido associado principalmente a reações de hipersensibilidade envolvendo o sistema imune (KAPLOWITZ, 2005; KASS, 2006; AHMED e SIDDIQI, 2006). A citotoxicidade não foi ainda sugerida como mecanismo para tal evento. Diwivedi et al. (2004) demonstraram a correlação entre a toxicidade dos areno-óxidos e as erupções cutâneas induzidas pela fenitoína. Nossos dados sugerem fortemente que a citotoxicidade também está envolvida na hepatotoxicidade induzida pela fenitoína e, além disso, que a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo são possíveis vias de mediação desse efeito tóxico.

Dentre os fármacos bioativados a carbamazepina foi o que apresentou efeitos menos acentuados. Uma explicação plausível para esse fato é a possibilidade de que, relativamente

aos demais AEA estudados, a carbamazepina seja biotransformada em menor extensão pelo sistema microsomal hepático ou de que seus produtos de biotransformação sejam mais rapidamente metabolizados a produtos oxidados, mais estáveis e menos reativos. O metabólito mais importante da carbamazepina, carbamazepine-10,11-epóxido, é farmacologicamente ativo (AHMED e SIDDIQI, 2006). Sua menor atividade sobre a mitocôndria pode ser devida ao fato de que o grupo epóxido encontra-se protegido por anéis adjacentes não-planares por mecanismo de obstrução estérica e, portanto, menos disponível para reagir, se comparado ao metabólito planar da fenitoína. Embora estável, a carbamazepina -10,11- epóxido pode reagir covalentemente com macromoléculas (BU et al., 2005). Adicionalmente a hepatotoxicidade da carbamazepina já foi correlacionada, em alguns casos, a um outro metabólito: carbamazepina-2,3-epóxido (MADDEN et al., 1996; ZACCARA et al., 2007). Dois diferentes tipos de hepatotoxicidade induzida pela carbamazepina foram propostos: (1) reação de hipersensibilidade e (2) reação induzida por toxinas, ambas associadas ao acúmulo de areno-óxidos e perturbações no metabolismo da glutathione (KALAPOPOS, 2002). A reação de hipersensibilidade se desenvolve na forma de hepatite granulomatosa, com febre e testes de função hepática anormais. O segundo tipo de dano hepático resulta da toxicidade direta do fármaco e é caracterizado por hepatite aguda e necrose hepatocelular, com febre, erupções cutâneas e linfadenopatia (DRIEFUS AND LANGER, 1987; AHMED E SIDDIQI, 2006). O prognóstico é usualmente favorável, obtendo-se melhora com a suspensão do tratamento, entretanto, casos fatais têm sido relatados (HAUKELAND et al., 2000). Nossos achados sustentam a ocorrência do dano hepático causado pelo efeito tóxico direto dos metabólitos provenientes da biotransformação da carbamazepina e sugerem que esse efeito tóxico se dá sobre as mitocôndrias hepáticas. O perfil dos pacientes susceptíveis à hepatotoxicidade induzida pela carbamazepina ainda não foi estabelecido (AHMED e SIDDIQI, 2006). De acordo com nossos achados, um possível

perfil de susceptibilidade à carbamazepina e aos demais AEA, seria o daqueles indivíduos com anormalidades mitocondriais. Dados da literatura científica demonstram que as anormalidades mitocondriais mais frequentes na população em geral são aquelas relacionadas a alterações no complexo I e no complexo IV da cadeia respiratória (COON et al., 2006; BOELSTERLI e LIM, 2007). Portanto, esses indivíduos estariam mais predispostos à hepatotoxicidade induzida por fármacos que apresentam toxicidade mitocondrial, e de acordo com nossos resultados, os AEA se incluem nesse grupo de fármacos.

A cardiolipina é um fosfolípido encontrado principalmente na membrana mitocondrial interna e tem importante papel na estrutura e função da mitocôndria (HOCH, 1992). A deficiência desse lipídio mitocondrial tem sido associada à inibição do estado 3 da respiração e ao aumento do consumo de oxigênio no estado 4, sendo que esse último evento parece estar associado à produção de ERO. A cardiolipina interage com várias proteínas da membrana mitocondrial interna e tem um papel central na manutenção de suas atividades. Dentre proteínas da membrana mitocondrial interna pode-se citar a citocromo oxidase, o translocador ADP/ATP, o translocador de fosfato, transportadores de substrato, sistemas palmitoil-carnitina-transferase/carnitina-transferase e FoF1-ATPase. Além disso, a cardiolipina parece exercer um papel central no controle da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a pequenas moléculas, bem como na manutenção do gradiente de prótons da mitocôndria. A cardiolipina contém uma alta relação de ácidos graxos insaturados/saturados se comparada a outros fosfolípidios da membrana mitocondrial interna, uma característica que a torna particularmente sensível ao estresse oxidativo (HOCH, 1988; SHIDOJI et al., 1999; HAUFF e HATCH, 2006). Nossos resultados demonstram que a cardiolipina foi oxidada em grande extensão pelos fármacos bioativados, o que pode explicar parte dos efeitos observados.

Uma hipótese que tenta explicar o mecanismo envolvido no intumescimento mitocondrial propõe que esse evento depende da diminuição do potencial de membrana mitocondrial estando diretamente relacionado à modificação nos grupamentos sulfidrílicos (BERNARDI, 1996). Outra hipótese propõe que o acúmulo de ERO é devido ao esgotamento das defesas antioxidantes. As ERO interagem com grupamentos sulfidrílicos das proteínas da membrana mitocondrial provocando a sua oxidação e a abertura do poro de transição de permeabilidade, na presença de íon cálcio. Entre os possíveis eventos que mediam a inibição da abertura do poro pode-se relacionar a interação direta das moléculas com o poro, manutenção do potencial de membrana, deslocamento da ligação do cálcio com a cardiolipina e regeneração dos grupamentos sulfidrílicos (CASTILHO, 1995). Como a oxidação dos grupamentos sulfidrílicos está envolvida no intumescimento mitocondrial, podemos especular que as mitocôndrias já se encontravam intumescidas no momento do ensaio, daí a não observância do fenômeno. Uma evidência para essa afirmação é que durante o experimento do intumescimento mitocondrial, a absorvância observada era sensivelmente inferior nos ensaios com bioativação em relação aos controles realizados com igual concentração de proteína. Este fato também pode estar relacionado com a observação de que as mitocôndrias tratadas com a fenitoína e fenobarbital bioativados (200 μM), promoveram a captação do cálcio, mas foram incapazes de reter o íon, liberando-o em seguida. Richer et al. (1991) propuseram que a combinação de cálcio e estresse oxidativo provoca a ativação de um mecanismo específico para o efluxo de cálcio que envolve a hidrólise do NADP para nicotinamida e ADP-ribose. Uma outra possibilidade é que a liberação do cálcio seria consequência de um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial devido aos danos na membrana provocados pela lipoperoxidação, particularmente a oxidação dos grupamentos tiólicos da membrana mitocondrial interna (VERCESI, 1993), o que ocorreu em grande extensão em nosso modelo experimental.

Com base nos dados obtidos no presente estudo, poderíamos postular duas hipóteses para o mecanismo toxicidade mitocondrial dos metabólitos intermediários formados durante a bioativação dos AEA:

(1) Os metabólitos reagiriam covalentemente com os centros nucleofílicos das macromoléculas críticas para o funcionamento da mitocôndria e provocar danos aos diversos sistemas de membrana mitocondrial, tendo como conseqüência o desacoplamento da respiração mitocondrial (efeito direto). Esse desacoplamento resultaria em aumento do consumo de oxigênio e conseqüentemente em maior geração de ERO, o que favoreceria a lipoperoxidação com danos suplementares à membrana mitocondrial. Nesse contexto, a lipoperoxidação seria conseqüência de um dano anterior provocado pela ligação dos areno-óxidos a macromoléculas mitocondriais. A somatória desses fatores levaria a mitocôndria à uma total perda dos seus parâmetros funcionais como ficou evidente pelos resultados apresentados;

(2) Os metabólitos reagiriam com os resíduos de cisteína da glutathiona, grupos com os quais apresentam alta afinidade. Na ausência de catalase, o sistema glutathiona/glutathiona peroxidase constitui o principal sistema de defesa da mitocôndria contra as ERO normalmente produzidas pela mitocôndria. A depleção da glutathiona mitocondrial induzida pelos AEA bioativados e evidenciada em nossos estudos, poderia tornar a mitocôndria susceptível à lipoperoxidação com conseqüente oxidação de constituintes das membranas mitocondriais (efeito indireto). A mitocôndria é uma organela cuja função é inteiramente dependente da integridade dos sistemas de membranas e qualquer alteração de um constituinte desse sistema pode trazer conseqüências danosas para o seu funcionamento. Nesse caso, a lipoperoxidação atuaria como fator primário para a ocorrência dos efeitos observados na função mitocondrial. A lipoperoxidação promoveria um comprometimento dos diversos sistemas de membrana da mitocôndria, que progressivamente e na dependência da concentração dos fármacos e de seus

respectivos produtos de biotransformação, comprometeriam a função mitocondrial a tal ponto que as mitocôndrias se tornariam não funcionais. Tal evento foi evidenciado pela incapacidade das mitocôndrias de responder ao ADP, de formar o potencial de membrana e conseqüentemente de sofrer intumescimento osmótico. Além disso, após a ativação inicial do estado 4 (desacoplamento), houve até mesmo inibição do fluxo de elétrons, particularmente no caso da fenitoína, revelando uma disfunção nos carreadores de elétrons da cadeia respiratória.

Em suma, nossos resultados sugerem fortemente que a toxicidade mitocondrial é um dos mecanismos envolvidos no dano hepático idiossincrático associado ao tratamento com AEA e ocorre principalmente devido ao efeito tóxico dos metabólitos produzidos pela ação das enzimas hepáticas durante a biotransformação desses fármacos. Assim, além das deficiências na epóxido-hidrolase, já apontadas anteriormente por outros autores, as anormalidades mitocondriais constituem também potenciais fatores de predisposição individual ao desenvolvimento da hepatotoxicidade induzida por AEA. A toxicidade mitocondrial induzida por esses fármacos não havia sido demonstrada anteriormente na literatura científica.

Dado o amplo uso desses fármacos no tratamento da epilepsia, sua recente e crescente indicação para o tratamento de transtornos psiquiátricos e neurológicos e a gravidade dos seus efeitos adversos, novas estratégias de proteção contra as reações idiossincráticas tornam-se necessárias. Nesse contexto, o delineamento dos possíveis mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade induzida pelos AEA pode fornecer ferramentas úteis para o diagnóstico, tratamento e prevenção do dano hepático, o que contribuiria para a otimização da terapia com esses fármacos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Na forma inalterada, somente o fenobarbital afetou a função mitocondrial, sem que esse efeito estivesse relacionado ao estresse oxidativo. O estado 3 da respiração induzida por (a) piruvato/malato, (b) succinato, ou (c) ascorbato/TMPD foi significativamente inibido, mas não houve alteração no estado 4. Em relação ao piruvato/ malato a CI_{50} foi de 0,15 mM. O padrão de inibição foi similar ao exibido pelos inibidores da cadeia respiratória: rotenona, antimicina A e KCN. Em decorrência desse fato, o potencial de membrana também foi afetado. O fenobarbital inibiu a velocidade de síntese de ATP em mitocôndrias energizadas com piruvato/malato e deprimiu o potencial de fosforilação (CI_{50} 0,2 mM). Foi proposto que a inibição da fosforilação oxidativa em mitocôndrias de rato promovida pelo fenobarbital na forma não bioativada foi devida à interação do fármaco com a membrana mitocondrial, mais especificamente sobre os componentes da cadeia respiratória. Essas alterações na cadeia transportadora de elétrons e na fosforilação oxidativa não foram capazes de induzir alterações significativas no intumescimento mitocondrial e nem na cinética da captação e liberação do cálcio.
2. Quando bioativados, todos os fármacos tiveram um acentuado efeito na função mitocondrial e induziram estresse oxidativo. Os efeitos ocorreram em concentrações muito inferiores à observada para o fenobarbital (cerca de 50 μ M). A ordem de potência dos fármacos bioativados foi: fenitoína > fenobarbital > carbamazepina. Diferentemente do fenobarbital, os produtos de bioativação dos anticonvulsivantes tiveram um efeito desacoplador representado pelo aumento do consumo base de oxigênio (estado 4 da respiração) com conseqüente repercussão no estado 3 e RCR. O desacoplamento é um sinal evidente de danos à membrana mitocondrial interna. Esses efeitos se devem ao

intenso estresse oxidativo observado, e a conseqüente oxidação de macromoléculas (proteínas e lipídios, entre eles a cardiolipina), essenciais para a manutenção dos sistemas de membrana da mitocôndria. Particularmente sensíveis são as proteínas que contém grupamentos sulfidrílicos, constituintes do sítio catalítico de muitas enzimas mitocondriais.

3. A toxicidade mitocondrial exercida pelos metabólitos provenientes da biotransformação hepática dos AEA é provavelmente um dos mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade idiossincrática associada ao uso desses fármacos.

4. As anormalidades mitocondriais pré-existentes, de origem genética ou adquirida, constituem fatores que possivelmente contribuem para a predisposição individual à hepatotoxicidade induzida pelos AEA.

REFERENCIAS

REFERENCIAS*

- AHMED, S.N.; SIDDIQI, Z.A. Antiepileptic drugs and liver disease. **Seizure**, London v. 15, p. 156-164, 2006.
- BABCOCK, D.F.; HERRINGTON, J.; GOODWIN, P.C.; PARK, Y.B.; HILLE, B. Mitochondrial participation in the cellular Ca²⁺ network. **J.Cell Biol**, New York, v. 136, n. 4, p. 833 -844, 1997.
- BAVDEKAR, S.B.; MURANJAN, M.N.; GOGTAY, N.J.; KANTHARIA, V.; KSHIRSAGAR, N.A. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: lymphocyte toxicity assay for the confirmation of diagnosis and risk assessment. **The Annals of Pharmacotherapy**, Cincinnati, OH, v. 38, p. 1648-1650, 2004.
- BELLOMO, G.; FULCERI, R.; ALBANO, E.; GAMBERUCCI, A.; POMPELLA, A.; PAROLA, M.; BENEDETTI, A. Ca(2+)-dependent and independent mitochondrial damage in hepatocellular injury. : **Cell Calcium**. Edinburgh, New York, v. 12, n. 5 p. 335-41, 1991.
- BENZI, G.; MORETTI, A. Age-and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. **Free Radic Biol Med**. New York, v. 19, p. 77-101, 1995.
- BERNARDI, P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1275, p. 5-9, 1996.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **NBR 6023**: informação e documentação: referências : elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BOELSTERLI, U.A.; LIM, P.L. Mitochondrial abnormalities--a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 220, p. 92-107, 2007.
- BOHAN, K.H.; MANSURI, T.F.; WILSON, N.M. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: implications for pharmaceutical care. **Pharmacotherapy**, Boston, MA., v. 27, p. 1425-1439, 2007.
- BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, Orlando Fl., v. 72, p. 248-254, 1976.
- BU, H.Z.; KANG, P.; DEESE, A.J.; ZHAO, P.; POOL, W.F. Human in vitro glutathionyl and protein adducts of carbamazepine-10,11-epoxide, a stable and pharmacologically active metabolite of carbamazepine. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 33, p. 1920-1924, 2005.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. Gleischer, S.; Packer, L. In: Meth. Enzimol, **Academic Press**, New York, v. 52C, p. 302-310, 1977.
- BURKHARDT, C.; KELLY, J.P.; LIM, Y.H.; FILLEY, C.M.; PARKER, W.D. JR., Neuroleptic medications inhibit complex I of the electron transport chain., **Ann Neurol.**, Boston, v. 33, n. 5, p. 512-517, 1993.
- CASADEMONT, J.; GARRABOU, G.; MIRO, O.; LOPEZ, S.; PONS, A.; BERNARDO, M.; CARDELLACH, F., Neuroleptic Treatment Effect on Mitochondrial Electron Transport Chain: Peripheral Blood Mononuclear Cells Analysis in Psychotic Patients. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, Baltimore, Md, v. 27, n. 3, p. 284-288, 2007.
- CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; BECHARA, E.J.; VERCESI, A.E., Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions

- is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radic Biol Med.** New York, v. 18, n. 3, p. 479-86, 1995.
- 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. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v. 28, n. 6, p. 523-529, 1996.
 - CAVANAGH, F.; INSERRA, M.; FERDER, L., From Mitochondria to Disease: Role of the Renin-Angiotensin System **Am J Nephrol.**, Basel ; New York : Karger, v. 27, p. 545–553, 2007.
 - CERVINKOVÁ, Z.; LOTKOVÁ, H.; KRIVÁKOVÁ, P.; ROUSAR, T.; KUCERA, O.; TICHÝ, L.; CERVINKA, M.; DRAHOTA, Z., Evaluation of mitochondrial function in isolated rat hepatocytes and mitochondria during oxidative stress. **Altern Lab Anim.**, London, v. 35, n. 3, p. 353-361, 2007.
 - CHOI, J.; HOWARD, D.; REES, S.T.; WEINTRAUB, A.I.; LEVEY; CHIN, L.-S. AND LI, L., Oxidative Modifications and Aggregation of Cu,Zn-Superoxide Dismutase Associated with Alzheimer and Parkinson Diseases **The Journal Of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 12, Issue of March 25, p. 11648–11655, 2005.
 - CODE, W.D.; WHITE, H.S.; HERTZ, L. The effect of midazolam on calcium signaling in astrocytes. **Ann. N. Y. Sci.**, New York, v. 625, p. 430-432, 1991.
 - COGNATO, G.D., BRUNO, A.N; DA SILVA, R.S.; BOGO, M.R.; SARKIS, J.J.; BONAN, C.D. Antiepileptic Drugs Prevent Changes Induced by Pilocarpine Model of Epilepsy in Brain Ecto-Nucleotidases. **Neurochemical Research**, New York, Plenum Press, DOI10.1007/s11064-006-9272-y, 2007.

- COLLEONI, M.; COSTA, B.; GORI, E.; SANTAGOSTINO, A. Biochemical characterization of the effects of the benzodiazepine, midazolam, on mitochondrial electron transfer. **Pharm. Toxicol.**, Copenhagen, Denmark, v. 78, p. 69-76, 1996.
- COON, K.D.; VALLA, J.; SZELINGER, S.; SCHNEIDER, L.E.; NIEDZIELKO, T.L.; BROWN, K.M.; PEARSON, J.V.; HALPERIN, R.; DUNCKLEY, T.; PAPASSOTIROPOULOS, A.; CASELLI, R.J.; REIMAN, E.M.; STEPHAN, D.A. Quantitation of heteroplasmy of mtDNA sequence variants identified in a population of AD patients and controls by array-based resequencing. *Mitochondrion* v. 6, p. 194–210, 2006.
- DENNERY, P. A. Effects of Oxidative Stress on Embryonic Development, **Birth Defects Research (Part C)**, Hoboken, NJ, v. 81, p. 155–162, 2007.
- DRIEFUS, F.E.; LANGER, D.H. Hepatic considerations in the use of antiepileptic drugs. **Epilepsia**, New York, v. 28 (Suppl. 2), p. S23—29, 1987.
- DWIVEDI, R.; GOGTAY, N.; KHARKAR, V.; AMLADI, S.; KSHIRSAGAR, N. In-vitro lymphocyte toxicity to a phenytoin metabolite in phenytoin induced cutaneous adverse drug eruptions. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, Vellore, v. 70, p. 217-20, 2004.
- EISENBERG, E.; RIVER, Y.; SHIFRIN, A.; KRIVOY, N. Antiepileptic drugs in the treatment of neuropathic pain. **Drugs**, New York, v. 67, p. 1265-1289, 2007.
- EMAUS, R. K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J. J. Rhodamine-123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria - spectral and metabolic properties. **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdam, v. 850,p. 436-48, 1986.
- ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. **Methods Enzymol.** New York v. 10, p. 41-47, 1967.

- FARISS, M. W.; CHAN, C. B.; PATEL, M.; VAN HOUTEN, B. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. **Mol. Interv.**, Bethesda, v. 5, n. 2, p. 94-111, 2005.
- FARRELL, G.C. Liver Disease Caused by Drugs, Anesthetics, and Toxins. In: Feldman M., Friedman L.S., Sleisenger M.H. (Eds.), Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management. **Elsevier**, Philadelphia, p. 1411-1415, 2002.
- FLORA, S.J. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. **Cell Mol Biol**, (Noisy-le-grand), Oxford ; Elmsford, N. Y., v. 53, n. 1, p. 1-2, 2007.
- GALLET, P.F.; MALTAH, A.; PETIT, J-M.; DENIS-GAY, M.; JULIEN, R. Direct cardiopilin assay in yeast using the red fluorescent emission of 10-N-nonyl acridine orange. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, New York, Springer, v. 228, p. 113-119, 1995.
- GEORGE, J. AND FARRELL, G.C. Anticonvulsivant Hepatotoxicity. In: Farrell G.C. (Ed.), Drug-induced liver disease. Edinburgh: **Churchill Livingstone**, London, p. 143-144, 1994.
- GOEL, M.R.; SHARA, M.A.; STOHS, S.J. Induction of lipid peroxidation by hexchlorocyclohexezene, dieldrin, TCDD, carbon tetrachloride, and hexachlorobenzene in rats. **Bull Environ Contam Toxicol.**, Springer Verlag, v. 40, p. 255-62, 1988.
- GOLDSTEIN, R.S.; SCHELLMANN. Toxic Response of the Kidney; In: KLAASSEN, C.D. CASARETT and DOULL'S. Toxicology. The Basis of Poisons. 5 ed., **Mc Graw-Hill, Inc.**, New York, p. 417-443, 1994.
- GÓMEZ-PUYOU, A.; SAAVEDRA-LIRA, E.; BECKER, I.; ZUBILLAGA, R.A.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; PÉREZ-MONTFORT, R. Using evolutionary changes to

- achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase. **Chem Biol.**, London, v. 2, n. 12, p. 847-855,1995.
- GÓMEZ-PUYOU, M.T.; GARCIA, J.J.; GÓMEZ-PUYOU,A. The H⁺-ATP synthase: A biochemical challenge. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 47, p. 122-130, 1995.
 - GRIVENNIKOVA, V. G., ANDREI D. VINOGRADOV , Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I., **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdam, v. 1757, p. 553–561, 2006.
 - GUNTER, T. E.; GUNTER, K. K.; SHEU, S-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.
 - HALLIWELL, B.; Free radicals and antioxidants: a personal review. **Nutr. Rev.**, Baltimore, v. 52, p. 253-265, 1994.
 - HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity. em: Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free Radical in **Biological and Medicine**. Clarendon Press, p. 86, 1989.
 - HATEFI, Y. ATP synthesis in mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, New York, Springer, v. 218, p. 759-767, 1993.
 - HAUFF, K. D.; HATCH, G. M. Cardiolipin metabolism and Barth Syndrome. **Prog. Lipid Res.**, Elmsford, v. 45, n. 2, p. 91-101, 2006.
 - HAUKELAND, J.W.; JAHNSEN, J.; RAKNERUD, N. Carbamazepine-induced hepatitis. **Tidsskrift for den Norske Laegeforening**, Oslo, v. 120, p. 2875-2877, 2000.

- HIRSCH, J.D.; BEYER, F.; MALKOWITZ,L.; BEER, B.; BLUME, A.J. Mitochondrial benzodiazepine receptors mediated inhibition of mitochondrial respiratory control. **Mol Pharmacol.**, New York, v. 34, p. 157-163, 1988.
- HOCH, F.L. Cardiolipins and biomembranes fuction. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1113, p. 71-133, 1992.
- HOCH, F.L. Lipids and thyroid hormones. **Prog. Lipid Res.**, Elmsford, v. 27, p. 199-270, 1988.
- HOLT, M.P.; JU, C. Mechanisms of drug-induced liver injury.**The AAPS Journal**, Arlington, v. 8 ,n. 1, p. E48-54, 2006.
- IMBERTI, R.; NIEMINEN, A-L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. **J Pharm. Exp.Ther.**, Bethesda, v. 265, p. 392-400, 1993.
- JEAUVONS, P.M. Hepatotoxicity of antiepileptic drugs. In: Oxley, J.; Janz, D.; Meinardi, H. (Eds.). Antiepileptic therapy: chronic toxicity of antiepileptic drugs. **Raven Press**, New York, p. 1-45, 1983.
- JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. **Lancet**, London, v. 344, p. 769-778, 1994.
- KALAPOUS, M.P. Carbamazepine-provoked hepatotoxicity and possible aetiopathological role of glutathione in the events. Retrospective review of old data and call for new investigation. **Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews**, Oxford, v. 21, p. 123-141, 2002.
- KALGUTKAR, A.S.; OBACH, R.S.; MAURER, T.S. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 enzymes: chemical mechanisms, structure-activity relationships

and relationship to clinical drug-drug interactions and idiosyncratic adverse drug reactions. **Curr Drug Metab.**, Hilversum, Netherlands, v. 5, p. 407-47, 2007.

- KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 4, p. 489-99, 2005.
- KAPLOWITZ, N. Drug-Induced Liver Injury. **Clinical Infectious Diseases**, Los Angeles, v. 38, Suppl 2, p. 44-48, 2004.
- KAPUS, A.; SZÁSZI, K.; KÁLDI, K.; LIGETI, E.; FONYÓ, A. Is the mitochondrial Ca^{2+} uniporter a voltage- modulated transport pathway? **FEBS LETTERS**, Amsterdam, v. 282, n. 1, p. 61 - 64, 1991.
- KARPLUS, M.; YI QIN GAO; JIANPENG, M.A.; ARJAN, V.D. V. AND W, Y., Protein structural transitions and their functional role., **Phil. Trans. R. Soc. A**, London, v. 363, p. 331–356, 2005.
- KASS, G.E. Mitochondrial involvement in drug-induced hepatic injury. **Chemical Biological Interactions**, Elsevier, v. 163, p. 145-159, 2006.
- KATYARE, S.S.; RAJAN, R.R. Effect of long-term in vivo treatment with imipramine on the oxidative energy metabolism in rat brain mitochondria. **Comp. Biochem. Physiol.**, London ,v. 112C, p. 353-357, 1995.
- KAUFMAN, K.R. Carbamazepine, hepatotoxicity, organic solvents, and paints. **Seizure**, London, v. 8, p. 250-252, 1999.
- KAUFMAN, K.R. Comparative bioethics in bipolar and epilepsy research. **Seizure**. London : Baillière Tindall., v. 11, n. 1, p. 51-56, 2002.
- LEE, W.M. Drug-induced hepatotoxicity. **New Eng J of Med.**, Massachusetts Medical Society, v. 333, n. 17, p. 1118-26, 1995.

- LEHNINGER, A.L.; REYNAFARJE, B.; VERCESI, A.; TEW, W.P. Transport and accumulation of calcium in mitochondria. **Ann N Y Acad Sci.**, New York, NY, v. 28, n. 307, p. 160-176, 1978.
- LEMASTERS, J.J.; NIEMINEN, A-L.; QIAN, T.; TROST, L.C.; HERMAN, B. The mitochondrial permeability transition toxic, hypoxic and reperfusion injury. **Mol. and Cell. Biochem.**, Kluwer Academic, Netherlands, v. 174, p. 159-165, 1997.
- LITSKY, M.L.; PFEIFFER, D.R. Regulation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by external adenine nucleotides: The uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations. **Biochemistry**, Washington, v. 36, p. 7071 - 7080, 1997.
- LORES-ARNAIZ, S.; D_AMICO, G.; CZERNICZYNIENEC, A.; BUSTAMANTE, J.; BOVERIS, A. Brain mitochondrial nitric oxide synthase: in vitro and in vivo inhibition by chlorpromazine., **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, NY, v. 430, p. 170–177, 2004.
- MADDEN, S.; MAGGS, J.L.; PARK, B.K. Bioactivation of carbamazepine in the rat in vivo. Evidence for the formation of reactive arene oxide(s). **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 24, p. 469–479, 1996.
- MARTIN, C.N.; GARNER, R.C. The identification and assessment of covalent binding *in vitro* and *in vivo*. In: Snell K, Mullock B (Eds). *Biochemical Toxicology: a practical approach*. **IRL Press**, Oxford, p. 109-126, 1987.
- MASSOTI, L.; LENAZ, G.; SPISNI, A.; URRY, D.W. Effect of phospholipids on the protein conformation in the inner mitochondrial membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 56, p. 892-897, 1974.
- MEHROTRA, S.; KAKKAR, P.; VISWANATHAN, P.N. Mitochondrial damage by

active oxygen species *in vitro*. **Free Radic Biol Med.** New York : Pergamon v. 10, n. 5, p. 277-285,1991.

- MEHROTRA, S.; VISWANATHAN, P.N.; KAKKAR, P. Influence of some biological response modifiers on swelling of rat liver mitochondria *in vitro*. **Mol. Cell. Biochem.**, Kluwer Academic, Netherlands, v. 124, p. 101-106, 1993.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, London, v. 191, p. 144-148, 1961.
- KHIN, A.G.; PAPADOULOS, V.; COSTA, E.; KRUEGER, K.E. Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 86, p. 9813-9816, 1989.
- NASREDDINE, W.; BEYDOUN, A. Oxcarbazepine in neuropathic pain. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, London, v. 16, p. 1615-1625, 2007.
- NEUMAN, M.G.; MALKIEWICZ, I.M.; SHEAR, N.H. A novel lymphocyte toxicity assay to assess drug hypersensitivity syndromes. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 33, p. 517-524, 2000.
- NICOTERA, P.; BELLOMO, G.; ORRENIUS, S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** Palo Alto, Calif.; v. 32, p. 449-470, 1992.
- NIEMINEM, A-L.; DAWASON, T.L.; GORES, G.J.; KAWNISCH, T.; HERMAN, B.; LEMASTERS, JJ. Protection by acidic pH and fructose against lethal injury to rat hepatocytes from mitochondrial inhibition, ionophores and oxidant chemicals. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 167, p. 600-606, 1990.
- OLIVEIRA, M. R., MOREIRA, J. C. F., Acute and chronic vitamin A supplementation at therapeutic doses induces oxidative stress in submitochondrial

- particles isolated from cerebral cortex and cerebellum of adult rats. **Toxicology Letters**, Elsevier, v. 173, p. 145–150, 2007.
- OLIVER, C.N.; STARKE-REED, B.; STADMAN, E.R.; LIU, G.J.; CARNEY, J.M.; FLOYD, R.A. Oxidative damage on glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia reperfusion-induced injuries to gerbil brain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 87, p. 5144-47, 1990.
 - ORRENIUS, S.; MCCABE, M.J. JR.; NICOTERA, P. Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. **Toxicol Lett.**, Elsevier, v. 64-65 Spec p. 357-364, 1992.
 - ORRENIUS, S.; McCONKEY, D.J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. **TIPS**, Cambridge, UK, v. 1°, p. 281-285, 1989.
 - PARK, B.K.; KITTERINGHAM, N.R.; MAGGS, J.L.; PIRMOHAMED, M.; WILLIAMS, D.P. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** Palo Alto, Calif.; v. 45, p. 177-202, 2005.
 - PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen CD (Ed.), Casarett and Doll's Toxicology. The Basic Science of Poisons. **McGraw-Hill**: New York, p. 133-224, 2001.
 - PEDERSEN, P.L.; AMZEL, L.M. ATP synthases - structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. **J. Biol. Chem**, Baltimore, v. 268, p. 9937-9940, 1993.
 - PEREIRA, R.S.; BERTOCCHI, A.P.F.; VERCESI, A.E. Protective effect of trifluoperazine on the mitochondrial damage induced by Ca²⁺ plus prooxidants. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 24, p. 1795-1801, 1992.

- PESSAYRE, D.; MANSOURI, A.; HAOUZI, D.; FROMENTY, B. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. **Cell Biology and Toxicology**, Kluwer, v. 15, p. 367-373, 1999.
- PEYRIÈRE, H.; DEREURE, O.; BRETON, H.; DEMOLY, P.; COCIGLIO, M.; BLAYAC, J-P.; BUYS, D.H. Variability in the clinical pattern of cutaneous sideeffects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist? **Therapeutiques**, Paris, v. 155, p. 422–428, 2006.
- PUMFORD, N. R.; HALMES, N.C.; Hindson, J.A. Covalent binding of xenobiotics to specific proteins in the liver. **Drug Metab Rev.**, New York, v. 29, n. 1&2, p. 39-57, 1997.
- RAHN, C.A.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity. **Fundam. Appl. Toxicol.**, Orlando Fl., v. 16, p. 435-48, 1991.
- RECKNAGEL, R.O.; GLENDE, E.A.; BRITTON, R.S. Free Radical Damage and Lipid Peroxidation; em: MEEKS, R. G.; HARRISON, S.D.; BULL, R.J. **Hepatology**, Baltimore, p. 401-436, 1991.
- REED, D.J. Mechanisms of chemically induced injury and cellular protection mechanisms. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. (eds.), Introduction to Biochemical Toxicology, **Appleton & Lange**, Connecticut, p. 265-294, 1994.
- REINDERS, J.; WAGNER, K.; RENE, P.; ZAHEDI, D.; STOJANOVSKI, B. E.; VAN DER LAAN, M.; REHLING, P.; SICKMANN, A.; PFANNER, N. AND MEISINGER, C. Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase, Downloaded from www.mcponline.org at CAPES Usage on October 11, 2007 www.mcponline.org

Downloaded , MCP Papers in Press. Published on August 29, 2007 as **Manuscript M700098-MCP200**, 2007.

- ROSCA, M. G.; MUSTATA, T.G.; KINTER, M. T.; OZDEMIR, A.M.; KERN, T. S.; SZWEDA, L. I.; BROWNLEE, M.; MONNIER, V. M. AND WEISS, M.F. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation . **Am J Physiol Renal Physiol.**, Bethesda, v. 289, p. F420–F430, 2005.
- SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. Fleisher, S.; Packer, L.(eds) In: **Meth. Enzymol. Academic Press**, New York, v. 56, p. 301 - 352, 1979.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein-bound, non-protein sulphhydryl group in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, Orlando Fl., v. 25, p. 192-205, 1968.
- NAVARRO, V. J. and SENIOR, J. R. Drug-Related Hepatotoxicity., **N Engl J Med**; Boston, v. 354, p. 731-9, 2006
- SHEAR, N.H.; SPIELBERG, S.P. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. In vitro assessment of risk. **The Journal of Clinical Investigation.**, New Haven, v. 82, p. 1826-1832, 1988.
- SHIDOJI, Y.; HAYASHI, K.; KOMURA. S.; OHISHI, N.; YAGI, K. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 264, n. 2, p. 343-7, 1999.
- SIERRA, N.M.; GARCIA, B.; MARCO, J.; PLAZA, S.; HIDALGO, F.; BERMEJO, T. Cross hypersensitivity syndrome between phenytoin and carbamazepine. **Pharmacy World & Science.**, The Hague, v. 27, p. 170-174, 2005.

- SPIELBERG, S.P.; GORDON, G.B.; BLAKE, D.A.; MELLITS, E.D.; BROSS, D.S. Anticonvulsant toxicity in vitro: possible role of arene oxides. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 217, p. 386-389, 1981.
- TABATABAEI, A.R.; THIES, R.L.; FARRELL, K.; ABBOTT, F.S. A rapid *in vitro* assay for evaluation of metabolism-dependent cytotoxicity of antiepileptic drugs on isolated human lymphocytes. **Fundamental and Applied Toxicology: official Journal of the Society of Toxicology**, Orlando Fl., v. 37, p. 181-189, 1997.
- TALLMAN, J.F.; PAUL, S.M.; SKOLNICK, P.; GALLAGER, D.W. Receptors for the age of anxiety: pharmacology of the benzodiazepines. **Science**. New York.; v. 207, n. 4428, p. 274-281, 1980.
- TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem**, Orlando Fl., v. 27, p. 502-522, 1969.
- TOMPKINS, L.M.; WALLACE, A.D. Mechanisms of cytochrome P450 induction. **J Biochem Mol Toxicol.**, New York, NY, v. 21 n. 4, p. 176-81, 2007.
- TONG, V.; TENG, X.W.; CHANG, T.K.; ABBOTT, F.S. Valproic acid II: effects on oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and cytotoxicity in glutathione-depleted rat hepatocytes. **Toxicological Sciences**, Orlando, FL, v. 86, p. 436-43, 2005.
- TRUMP, B.F.; BEREZESKY, I.K. Calcium-mediated cell injury and cell death. **Faseb J.**, Bethesda, v. 9, p. 219-228, 1995.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol.**, Oxford, v. 552, n. 2, p. 335-44, 2003.
- UETRECHT, J., Idiosyncratic Drug Reactions: Current Understanding **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. Palo Alto, Calif.; v. 47, p. 513-539, 2007.

- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, Pergamon, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.**, Elsevier, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.
- VERCESI, A.; REYNAFARJE, B.; LEHNINGER, A.L. Stoichiometry of H⁺ ejection and Ca⁺ uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 253, p. 6379-6385, 1978.
- VERCESI, A.E. Ca transport and oxidative damage of mitochondria. **Braz. J. Med. Res.**, São Paulo, v. 26, p. 441-457, 1993.
- VERCESI, A.E.; Dissociation of NAD(P)⁺-stimulated mitochondrial Ca²⁺ efflux from swelling and membrane damage. **Arch. of Biochem. Biophys.**, New York, NY, v. 232, p. 86-91, 1984.
- VERCESI, A.E.; HOFFMANN, M.E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: The role of calcium. In: JONES, D.P.; LASH, L.H. (eds.). *Methods in toxicology*, **Academic Press**, New York, p. 256-265, 1993.
- VERMA, A.; SNYDER, S.H. Peripheral type benzodiazepine receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** Palo Alto, Calif.; v. 29, p. 307-22, 1989.
- WALGREN, J. L.; MITCHELL, M. D. and THOMPSON, D. C. “ Role of Metabolism in Drug-Induced Idiosyncratic Hepatotoxicity”.,**Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 35, p. 325–361, 2005

- WALLACE, K. B.; EELLS, J. T.; MADEIRA, M. C.; CORTOPASSI, G.; JONES, D. P. Mitochondria-mediated cell injury. **Fund. Applied Toxicol**, Orlando Fl Academic Press v. 38, p. 23-37, 1997.
- WELLS, P.G.; WINN, L.M. Biochemical toxicology of chemical teratogenesis. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.**, Philadelphia, PA, v. 31, p. 1-40, 1996.
- WELLS, P. G.; BHULLERA, Y.; CHENA, C. S.; JENGA, W.; KASAPINOVICA, S.; KENNEDYA, J. C.; KIMA, P. M.; LAPOSA, R. R.; MCCALLUMA, G. P.; NICOLB, C. J.; PARMANA, T.;MICHAEL, J.; WILEYC; WONGA, A. W. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 207, p. S354– S366, 2005.
- XIONGA, J.; CAMELLO, P.J.; VERKHRATSKY, A.; TOESCU, E. C.Mitochondrial polarisation status and $[Ca^{2+}]_i$ signalling in rat cerebellar granule neurones aged in vitro., **Neurobiol Aging.**, Fayetteville, N.Y., v. 25, n. 3, p. 349-359, 2004.
- YAGUZHINSKY, L. S.; VLADIMIR, I.; YURKOV, I. P.; KRASINSKAYA On the localized coupling of respiration and phosphorylation in mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdam, v. 1757, p. 408–414, 2006.
- YANAGIBASHI, K.; OHNO, Y.; NAKAMICHI, N.; MATSUI, T.; HAYASHIDA, K.; TAKAMURA, M.; YAMADA, K.; TOU, S.; KAWAMURA. M. Peripheral-type benzodiazepine receptors are involved in the regulation of cholesterol side chain cleavage in adrenocortical mitochondria. **J Biochem.**, Tokyo, v. 106, n. 6, p. 1026-1029, 1989.

- ZACCARA, G.; FRANCIOTTA, D.; PERUCCA, E. Idiosyncratic adverse reactions to antiepileptic drugs. **Epilepsia**, New York, v. 48, p. 1223-1244, 2007.
- ZHANG, Y.; MARCILLAT, O.; GIULIVI, C.; ERNSTER, L.; DAVIES, K.J.A. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, p. 27-31, 1990.
- ZIMA, A. V.; KOCKSKÄMPER, J.; MEJIA-ALVAREZ, R. BLATTER, AND L. A. Pyruvate modulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rats via mitochondria-dependent and -independent mechanisms **J Physiol.**, Paris, v. 550, n. 3, p. 765–783 2003.
- ZWANZGER, P.; ESER, D.; RUPPRECHT, R. Anticonvulsants in the treatment of anxiety - an alternative treatment option? **Nervenarzt**, Berlin, v. 78, p. 1274-82, 2007.

**AROMATIC ANTIPILEPTIC DRUGS AND MITOCHONDRIAL TOXICITY:
EFFECTS ON MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RAT LIVER**

Short running title: AAED and hepatic mitochondrial toxicity

Medina WSG^a, Santos NAG^a, Martins NM^a, Mingatto FE^b, Curti C^c, Santos AC^a

^aDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, Av. do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brasil;

^bLaboratório de Bioquímica, Faculdade de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Dracena, 17900-000 Dracena, SP, Brasil;

^cDepartamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, Av. do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Correspondence should be addressed to: Antonio Cardozo dos Santos, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Avenida do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brasil (telephone: 551636024725, fax: 551636024725, e-mail: acsantos@fcrp.usp.br)

Abbreviations

AAED- aromatic antiepileptic drugs; **AED** - antiepileptic drugs; **CB** carbamazepine; **CB-B**- bioactivated carbamazepine; **CCCP**- carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine; **PB**- phenobarbital; **PB-B** bioactivated phenobarbital; **PT**- phenytoin; **PT-B** bioactivated phenytoin; **RCR**- Respiratory Control Rate; **suc** – succinate; **rot** - rotenone; **TMPD**- N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine; **t-BH**- t-butylhydroperoxide.

ABSTRACT

Idiosyncratic hepatotoxicity is a well-known complication associated with aromatic antiepileptic drugs (AAED), and it has been suggested to occur due to the accumulation of toxic arene oxide metabolites. Although there is clear evidence of the participation of an immune process, a direct toxic effect involving mitochondria dysfunction is also possible. The effects of AAED on mitochondrial function have not been studied yet. Therefore, we investigated, *in vitro*, the cytotoxic mechanism of carbamazepine (CB), phenytoin (PT) and phenobarbital (PB), unaltered and bioactivated, in the hepatic mitochondrial function. The murine hepatic microsomal system was used to produce the anticonvulsant metabolites. All the bioactivated drugs (CB-B, PB-B, PT-B) affected mitochondrial function causing decrease in state 3 respiration, RCR, ATP synthesis and membrane potential, increase in state 4 respiration as well as impairment of Ca^{+2} uptake/release and inhibition of calcium-induced swelling. As an unaltered drug, only PB, was able to affect mitochondrial respiration (except state 4 respiration) ATP synthesis and membrane potential; however, Ca^{+2} uptake/release as well as swelling induction were not affected. The potential to induce mitochondrial dysfunction was $\text{PT-B} > \text{PB-B} > \text{CB-B} > \text{PB}$. Results suggest the involvement of mitochondrial toxicity in the pathogenesis of AAED-induced hepatotoxicity.

INTRODUCTION

Classical antiepileptic drugs have been extensively used for the treatment of epilepsy, one of the most frequent disorders of the central nervous system which affects nearly 1.5% of the world population. (Cognato et al, 2007). Nowadays antiepileptic drugs (AED) are no longer restricted to the treatment of epilepsy. They are also widely used in a broad spectrum of psychiatric and neurological disorders (Ahmed and Siddiqi, 2006). There are numerous recent studies suggesting that anticonvulsants have potentially anxiolytic properties and might therefore be an alternative treatment option in anxiety syndromes (Zwanzger et al., 2007). Anticonvulsants are also used to treat neuropathic pain (Nasreddine and Beydoun, 2007), and carbamazepine remains the drug of choice for trigeminal neuralgia (Eisenberg et al., 2007). Idiosyncratic hepatotoxicity is a well-known complication associated with anticonvulsants treatment (Kaufman, 2002). It may occur as an isolated event or as a part of the spectrum of a multisystem disorder which is characterized by fever, skin eruption, eosinophilia, atypical lymphocytosis, arthralgia, lymphadenopathy and multiorgan involvement, including hepatitis (Peyrière et al., 2006). Anticonvulsant idiosyncratic reactions are rare but potentially fatal and have been most commonly reported with the use of aromatic antiepileptic drugs (AAED), such as phenytoin, carbamazepine, and phenobarbital (Bavdekar et al., 2004). The syndrome secondary to phenytoin, carbamazepine and phenobarbital was described as a febrile illness associated, among other events, with hepatic damage and was first named anticonvulsant hypersensitivity syndrome (Shear and Spielberg, 1988). Two general types of mechanisms have been proposed to account for idiosyncratic hepatotoxicity: metabolic idiosyncrasy and immunoallergy. Metabolic idiosyncrasy refers to the susceptibility of rare individuals to hepatotoxicity from a drug that, in conventional doses, is usually safe. Such susceptibility may be a result of genetic or acquired

differences in drug metabolism, mitochondrial defects, canalicular secretion, or cell death receptor signaling. Immunoallergy indicates that the immune system mediates the response to a drug. These two mechanisms may be interrelated (Farrel, 2002). In the case of AAED, reports of cross-reactivity suggest a common mechanism. These drugs are metabolized by the cytochrome P-450 isoenzymes, with generation of reactive arene oxide intermediates, whose detoxification is performed by epoxide hydrolases (George and Farrell, 1994; Sierra et al, 2005). Therefore, one possible mechanism for the idiosyncratic reaction is the accumulation of toxic arene oxide metabolites due to a defect in the epoxide hydrolase-mediated detoxification (Bavdekar et al., 2004). Arene oxides are electrophilic and therefore potentially toxic metabolites which can act as prohaptens that bind to T cells, initiating an immune response. They can also directly affect cell biochemistry, causing cell death (George and Farrell, 1994; Parkinson, 2001; Wells and Winn, 1996; Bohan et al., 2007). Although there is clear evidence of an immune-mediated process, direct toxicity is also possible (Neuman et al., 2000, Zaccara et al., 2007). Little is known about the cause of delayed, non-immune forms of idiosyncratic hepatotoxicity (Kass, 2006). Chemically reactive metabolites have been proposed as being responsible for most types of drug-induced hepatotoxicity, but direct evidence for the role of such metabolites is difficult to obtain because of the lack of suitable *in vitro* and *in vivo* models. Moreover, the mechanism by which these toxic species initiate and propagate tissue damage is still poorly understood (Park et al., 2005). The direct toxicity of reactive metabolites may involve mitochondrial dysfunction, one of the most important mechanisms of drug-induced liver injury. Mitochondria are the central point where the different signals responsible for initiating hepatocyte cell death converge, irrespective of whether the cells ultimately die by apoptosis, necrosis or autophagy (Pessayre et al., 1999; Kass, 2006). The inhibitory

effects of the aromatic antiepileptic drugs (AAED) on mitochondrial function have not been studied yet. Therefore, in the present study, we investigated, *in vitro*, the mechanism of a possible direct effect of the metabolites of three classical AAED: carbamazepine (CB), phenytoin (PT) and phenobarbital (PB), on hepatic mitochondrial function. For this purpose, we used an *in vitro* model in which the anticonvulsants were metabolized by the hepatic enzymes present in the murine microsomes, based on the method previously described by Shear and Spielberg (1988). The toxic effect of the parent drugs themselves was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Phenobarbital, phenytoin and carbamazepine were obtained from Sigma-Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Other reagents were of analytical grade. Drug solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). Other solutions were prepared with ultra-pure water purified by a Milli-Q Gradient system (Millipore, Bedford, USA).

Animals. Research protocols were approved by the local ethics committee (Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto – USP, CEUA-USP) and were performed in strict accordance with the “Ethical principles and guidelines for experiments on animals” of the Swiss Academy of Medical Sciences and Swiss Academy of Sciences.

Preparation of liver homogenate, post-mitochondrial supernatant (S9) and microsomes. Male Wistar rats weighing approximately 200 g were pretreated with phenobarbital (10 mg/kg of body weight, given intraperitoneally for 3 days) to induce cytochrome P-450. Then, animals were starved for 24 h and sacrificed by cervical dislocation. Livers were removed, washed in ice-cold 0.9% saline and cut into pieces. Portions of liver (5g) were added of 15 mL of 150 mM ice-cold KCl and homogenized with a Potter-Elvehjem (three times for 15 seconds, 1-minute intervals). Homogenate was then centrifuged at 9,000 x g for 10 min at 4°C. The resulting supernatant (S9 fraction) was centrifuged at 100,000 x g for 60 min at 4°C. The obtained pellet was resuspended in 10 mL of ice-cold 150 mM KCl, centrifuged again for 30 min at 100,000 x g at 4°C and resuspended as above. Microsomal fraction was stored at – 90°C until needed (Martin and Garner, 1987).

Preparation of the mitochondrial fraction. Male Wistar rats weighing approximately 200 g were sacrificed by cervical dislocation. Livers were immediately removed, washed in ice-cold 0.9% saline solution and cut into pieces. Portions of liver (10g –

15g) were added of 50 mL of a medium containing 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.2% bovine serum albumin and 10 mM HEPES-KOH, pH 7.4, and homogenized with a Potter-Elvehjem (three times for 15 seconds, 1-minute intervals). Liver mitochondria were isolated by standard differential centrifugation (Pedersen et al, 1978). The homogenate was centrifuged at 755 x g for 5 minutes and the resulting supernatant was centrifuged at 13,300 x g for 10 minutes. The pellet was resuspended in 10 ml of medium containing 250 mM sucrose, 0.1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 0.14% bovine serum albumin and 10 mM HEPES-KOH, pH 7.4, and centrifuged at 13,300 x g for 10 minutes. All centrifugation procedures were performed at 4°C. The mitochondrial pellet obtained was resuspended in 1 ml of a medium containing 160 mM KCl and 10 mM HEPES-KOH, pH 7.4. Mitochondrial suspension was kept on ice and used within a 3-hour period. Protein concentration was determined according to the method described by Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

In vitro drug-metabolite-induced toxicity assay. The *in vitro* assay for arene oxides toxicity on isolated human lymphocytes, previously described by Spielberg et al. (1981) was modified and adapted to the evaluation of the hepatic mitochondrial toxicity. The drugs concentrations range (0.025 mM – 1mM) used was also based on the above mentioned study. An incubation medium containing 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES-Na, 1mM EGTA, 0.01% BSA, 0.6 mM NADP, 2.4 mM glucose-6-phosphate and 2 U of glucose-6-phosphate dehydrogenase was used. Three different experimental conditions were evaluated: (A) control: mitochondrial protein (5mg/mL); (B) unaltered drug: mitochondrial protein (5 mg/mL) along with different concentrations (0.025 mM – 1mM) of each drug and (C) bioactivated drug: mitochondrial protein (5 mg/mL) along with microsomal protein (1mg/mL) and different concentrations (0.025 mM – 1 mM) of each drug. The volume of the drug

solution added never exceeded 20 μ L to ensure that DMSO would have no effect on the assays. After incubation at 30°C for 30 min, mitochondrial suspensions were centrifuged at 10,000 \times g for 10 min and resuspended in 250 mM sucrose, 10 mM HEPES-Na, pH 7.4 in order to obtain a final concentration of 20 mg mitochondrial protein/mL.

Mitochondrial respiration

Oxygen was measured by a Clark oxygen electrode (Gilson Medical Electronics, Middleton, WI, USA), in a 1.5 ml glass cell, thermostatically controlled at 30 °C, with constant stirring. Mitochondria (1.0 mg protein) were incubated in a respiration medium containing 160 mM KCl, 8.5 mM potassium phosphate, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.4. Substrate concentrations were 10 mM succinate and 5 mM ascorbate + 0.5 mM N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD). Inhibitor concentrations included 5 μ M rotenone (to inhibit complex I of the respiratory chain) and 3 μ M myxothiazole (to inhibit complex III). The active state of respiration (state 3) was initiated by the addition of 0.4 μ mol ADP (Santos et al, 1997). The uncoupled state of respiration was initiated by the addition of 2 μ M of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). The respiratory parameters were determined from the polarographic traces as previously described (Chance and Williams, 1956).

Mitochondrial Membrane Potential. The electrical potential of the mitochondrial inner membrane was assessed by monitoring the mitochondrial uptake of rhodamine 123 in a fluorescence spectrophotometer (F-2500, Hitachi) operating at an emission wavelength of 535 nm and an excitation wavelength of 505 nm. One mg of mitochondrial protein was used, and the incubation medium had the following composition: 160 mM KCl, 8.5 mM potassium phosphate, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.4, added of 5 μ M rotenone and 5

μM rhodamine 123. The respiratory substrate was 10 mM succinate. The reaction was initiated with 0.4 μmol ADP and the assay was performed at 30°C (Emaus et al., 1986).

Ca⁺² uptake/release measurement. The kinetics of Ca⁺² uptake by mitochondria was studied by a spectrophotometric method with Arsenazo III, a free calcium indicator, at wavelengths of 685 nm and 675 nm. The following incubation medium (2 ml final volume) was used: 160 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH, 5 μM rotenone, 20 μM CaCl₂ and 25 μM arsenazo III, pH 7.4. One mg of mitochondrial protein was used. The assay was performed at 30°C, and calcium uptake was induced by 10 mM potassium succinate (Scarpa, 1979).

Measurement of ATP synthesis. The rate of ATP synthesis was measured in mitochondria energized with 10 mM potassium succinate using the glucose/hexokinase trap system. The composition of the medium was 250 mM sucrose, 22 mM glucose, 5 mM potassium phosphate, 2 mM ADP, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 20 units of hexokinase, at 30°C (1 ml final volume). The reaction was initiated by the addition of mitochondria (1 mg of protein) and shaking. After 10 min, the reaction was stopped with 50 μl of 70% perchloric acid. ATP formation was monitored by the decrease in phosphate levels (Cain and Skilleter, 1987).

Determination of the mitochondrial swelling. Mitochondrial protein was incubated, at 30°C, in a medium containing 125 mM sucrose, 10 mM HEPES-KOH buffer, 2 mM succinate, 5 μM rotenone, 65 mM KCl, pH 7.4. Reaction was initiated by the addition of 10 μM CaCl₂. After 2 minutes, 1.5 mM potassium phosphate was added. Mitochondrial swelling was estimated based on the decrease in absorbance at 520 nm (Kowaltowski et al. 1996).

Statistical analysis. Data were expressed as mean \pm SD of three different experiments, each one performed in triplicates. Statistical analyses were conducted by Student's t-test

and were performed using the GraphPad Prism, version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ was considered the level of significance. Lower values of P ($P < 0.01$ and $P < 0.001$) were also indicated in the figures.

RESULTS

Effects on mitochondrial respiration

Phenobarbital (PB) was the only parent drug able to induce impairment of the respiratory chain, characterized by a decrease in state 3 respiration (Fig. 1A) and RCR (Fig. 1B). RCR refers to the ratio of oxygen consumed after adding ADP (state 3) to that consumed in the basal non-phosphorylating respiration (state 4). State 4 respiration was not affected by any of the parent drugs (Fig. 1C). The inhibition of state 3 respiration by PB started at 200 μM and the IC₅₀ was of approximately 750 μM . Sites I, II and IV were equally affected by PB, as depicted respectively in Fig. 2A (succinate-linked mitochondrial respiration), Fig. 2B (malate/glutamate-linked mitochondrial respiration) and Fig. 2C (ascorbate/TMPD-linked mitochondrial respiration).

After bioactivation, all the studied drugs, especially phenytoin, were able to intensely affect mitochondrial respiration, including state 3 respiration (Fig. 3A), RCR (Fig. 3B) and state 4 respiration (Fig. 3C). Phenytoin did not affect mitochondrial respiration as a parent drug; however, after bioactivation, it was able to induce a significant increase ($p < 0.05$) in oxygen consumption during state 4 respiration, starting at 50 μM . The maximum uncoupling effect (RCR=1) was obtained when 100 μM phenytoin was assayed. Therefore, the IC₅₀ value of bioactivated phenytoin (PT-B) for inhibiting state 4 respiration was in between 50 and 100 μM . Above 100 μM , an inhibitory effect was observed. Concerning state 3 respiration, PT-B produced a less accentuated effect, observed only above 200 μM ($p < 0.001$). From 25 μM , PT-B induced a decrease in RCR ($p < 0.05$), which reached the value 1 ($p < 0.001$) at 200 μM , indicating that mitochondria were completely uncoupled. A similar behavior was observed with carbamazepine, which only altered mitochondrial respiration after bioactivation.

Bioactivated carbamazepin (CB-B) also presented an uncoupling potential, although less intense and only in higher concentrations (above 100 μM) as compared to PB-B and PT-B. The maximum uncoupling effect was not reached in the assayed concentrations of carbamazepine. Considering state 3 respiration, CB-B produced a completely different effect as compared to those of the other studied drugs. A significant increase in oxygen consumption was observed from 100 μM up to 500 μM . Such increase counteracted the uncoupling effect of CB-B, and thus, RCR was only significantly decreased above 500 μM , never reaching the maximum inhibition (RCR=1). In the case of phenobarbital, the effect on the mitochondrial respiration was intensified after the bioactivation process. Besides the effect on the state 3 respiration, PB-B also presented an uncoupling effect characterized by increased oxygen consumption during state 4 respiration. Such effect was observed from 50 μM ($p < 0.01$) and reached the maximum value at 500 μM ($p < 0.001$). PB-B markedly decreased RCR from 50 μM . At 100 μM , RCR was 95% lower as compared to control.

Effects on ATP synthesis

As occurred in mitochondrial respiration, PB was the only parent drug able to decrease ATP synthesis (Fig. 4A). IC₅₀ for this effect was 750 μM . All the bioactivated drugs affected ATP synthesis (Fig. 4B). IC₅₀ of PB-B for ATP synthesis rate was 200 μM , indicating an intensified inhibitory ability after bioactivation. PT-B exhibited marked ability to impair ATP synthesis, with significant effect starting at 50 μM and IC₅₀ equivalent to 100 μM . CB-B presented the lowest ability to decrease ATP synthesis, and higher IC₅₀ (approximately 1,000 μM).

Effects on Ca⁺² uptake and release

Figure 7A shows Ca⁺² release due to the presence of protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) or pro-oxidant t-butylhydroperoxide (t-BH). None of

the parent drugs affected Ca^{+2} movement across the mitochondrial inner membrane as compared to control (Fig. 5A).

Traces in Fig. 5B represent the effects of the bioactivated drugs. PT-B (200 μM) inhibited Ca^{+2} uptake in approximately 50% and also induced its rapid release. A similar effect was observed with a higher concentration (500 μM) of PB-B. At 200 μM , PB-B did not inhibit the uptake, but was enough to induce Ca^{+2} release. CB-B did not affect this event at 200 μM , but only from 500 μM (data not shown).

Effects on mitochondrial membrane potential

The mitochondrial transmembrane potential was assessed by rhodamine 123 fluorescence decay rate. The trace in Fig. 6A represents the data obtained in control, CB (500 μM) and PT (500 μM) assays, demonstrating that these parent drugs did not affect such parameter. After the addition of the oxidizable substrate, potassium succinate, a similar electrical potential was developed in the three assays. The transition to state 3 respiration was induced with the addition of ADP, causing a decrease in the mitochondrial membrane potential due to the ATP synthesis. In the three assays (control, CB and PT), the membrane potential quickly resumed to the pre-ADP level. The addition of uncoupler FCCP (carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine) immediately collapsed the transmembrane electrical potential. Among the parent drugs, only PB had an effect on the membrane potential, and the trace relative to 500 μM is represented in Fig 6B. In this assay, liver mitochondria were able to develop a normal electrical potential; however, the time required to phosphorylate ADP was longer, and the return to the previous level was slower as compared to control. The bioactivated drug (PB-B) assayed in the same concentration caused a more potent effect, leading to mitochondrial inability to phosphorylate and to resume to the pre-ADP potential (Fig. 6B). Bioactivated phenytoin

(PT-B) was even more effective in disrupting the membrane potential, starting at smaller concentration (50 μM). The trace in Fig. 6C shows that mitochondria were able to develop a normal electrical potential, to phosphorylate and to resume to the previous potential, but not to sustain it. A higher concentration of PT-B (200 μM) caused the inability to phosphorylate and eventually mitochondrial membrane depolarization. In the same concentration of PB-B (500 μM), PT-B completely prevented mitochondrial membrane from developing an electrical potential (Fig. 6D). In the presence of CB-B (500 μM), phosphorylation of ADP was slower than in control, but the previous potential was achieved afterwards (Fig. 6E).

Effects on mitochondrial swelling

The traces in Fig. 7 demonstrate that the aromatic anticonvulsants did not interfere in mitochondrial swelling when assayed as parent drugs. On the other hand, all the drugs inhibited calcium-induced mitochondrial swelling when bioactivation was carried out.

DISCUSSION

Although rare, idiosyncratic reactions are the major cause of antiepileptic drug treatment discontinuation. Most of the aromatic antiepileptic drugs, including carbamazepine, phenytoin and phenobarbital, are predominantly metabolized by the liver. During this process, very short half life reactive metabolites (arene oxides) are formed and can potentially damage their sites of formation. Therefore, the liver is particularly vulnerable to the toxicity of these intermediate metabolites produced after biotransformation. Hepatotoxicity is rare, but a real concern when initiating antiepileptic therapy and it may occur as part of a generalized hypersensitivity or idiosyncratic reaction seen in about 9% of the patients taking PB, CBZ and PT (Jeavons, 1983; Ahmed and Siddiqi, 2006, Zaccara et al., 2007).

Idiosyncratic adverse reactions to AAED have been attributed to the accumulation of arene oxides, which might be secondary to a genetic or acquired defective drug metabolism. These idiosyncratic reactions have been reported as immune mediated; however, direct toxic effect might occur. The direct cytotoxic effects of the arene oxides formed during AAED biotransformation have been previously studied by means of lymphocyte toxicity assays (Spielberg et al., 1981; Tabatabaei et al., 1997; Neuman et al., 2000; Bavdekar et al., 2004; Diwivedi et al., 2004; Bohan et al., 2007), but the role of mitochondria in such effects remain unclear. In the present study, we demonstrated the implication of mitochondrial toxicity in the pathogenesis of the idiosyncratic hepatic injury induced by AAED. We hypothesize that mitochondrial dysfunction might be involved in both, idiosyncrasy associated with epoxide hydrolase deficiency/defect and idiosyncrasy associated with genetic or acquired mitochondrial abnormalities (Fig. 8). In fact, genetic or acquired mitochondrial abnormalities have been suggested as a major determinant of susceptibility for a number of drugs that target

mitochondria and cause idiosyncratic drug-induced liver injury (Boelsterli and Lim, 2007). Our results strongly suggest that underlying deficiencies in mitochondrial function are possible susceptibility factors for hepatic AAED idiosyncrasy.

Based on the method previously described by Spielberg et al. (1981), we performed, *in vitro*, the metabolism of some AAED by the hepatic enzymes present in murine microsomes and evaluated their effects on hepatic mitochondrial function. This is the first study to demonstrate mitochondrial toxicity induced by AAED.

Mitochondrial dysfunction has been reported as implicated in the pathogenesis of idiosyncratic hepatotoxicity induced by valproic acid, a non aromatic antiepileptic compound (Tong et al., 2005). We demonstrated that mitochondrial energetic metabolism was impaired by the metabolites of three aromatic antiepileptic drugs. As a parent drug, PB also affected mitochondrial function. The potency in relation to the mitochondrial dysfunction was PT-B > PB-B > CB-B > PB.

Phenobarbital was the only unaltered drug which showed some ability to impair mitochondrial function, but only in higher concentrations. This could become particularly important in the case of pre-existent liver disease. Any hepatic functional compromise, impairing biotransformation and causing the accumulation of the parent compound could eventually contribute to hepatotoxicity. Phenobarbital (above 200 μ M) presented a concentration-dependent, non-specific pattern of electron transport inhibition, which suggests that the parent drug probably does not specifically affect any of the respiratory chain components. Moreover, state 3 inhibition in NADH-, succinate- and ascorbate-linked respirations suggests that complexes I, II and IV might have been damaged because malate and glutamate donate electrons to the respiration chain through complex I, succinate through complex II and ascorbate and TMPD through complex IV. The most frequent changes associated with abnormal mitochondrial function are

alterations in complex I and complex IV (Coon et al., 2006; Boelsterli and Lim, 2007), which in combination with AAED-induced mitochondrial toxicity could result in idiosyncratic liver injury.

PB also inhibited the CCCP-uncoupled respiration indicating that both, mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation were inhibited. PB did not affect state 4 respiration, suggesting an intact mitochondrial inner membrane.

After bioactivation, all the studied aromatic anticonvulsants inhibited state 3 respiration and RCR as well as increased state 4 respiration, suggesting that besides impairing electron transport, metabolites also damaged the mitochondrial inner membrane. In the specific case of PB, the metabolism by the hepatic enzymes intensified the effect on the respiratory chain, leading to inhibition even when half of the concentration was assayed (100 μM) as compared to the unaltered drug (200 μM). Such inhibition suggests that PB and particularly the metabolites of the aromatic anticonvulsants cause damage to the respiratory chain and, therefore, impair the energetic metabolism. Accordingly, PB and the bioactivated drugs also disrupted ATP synthesis.

Phenytoin seems to have originated the most toxic metabolite, since lower concentrations of the drug affected state 4, RCR and ATP synthesis, as compared to the other bioactivated drugs. Contrarily, higher concentration was required to inhibit state 3 respiration, suggesting that phenytoin metabolite might act primarily through structural damage to the inner membrane, rather than to electron transfer disruption.

Unaltered PB and all the bioactivated drugs affected the mitochondrial membrane potential. In the case of PB, bioactivation led to an intensification of the effect. PT-B was approximately 10 times more effective (50 μM) in producing such effect as compared to the other bioactivated drugs (500 μM), which is in accordance with the

results concerning mitochondrial respiration and ATP synthesis. The mitochondrial membrane potential results from the efflux of protons from the matrix to the inter-membrane space and provides the energy to drive ATP synthesis by Complex V. Therefore, based on its effect on the electrochemical potential, it would be expected that PT-B would be more effective in decreasing ATP synthesis.

Only after bioactivation were AAED able to impair Ca^{+2} transport and, therefore, to inhibit mitochondrial swelling. This was probably due to mitochondrial inability to maintain the required Ca^{2+} concentration to trigger the opening of the permeability transition pore (PTP) and induce mitochondrial swelling.

The major damage caused by PT metabolites could be explained by both: production of a more reactive epoxide or biotransformation to a larger extent. The former might be attributed to the planar conformation of the molecule, in which the epoxide group is exposed and free to react. The latter could be supported by the extensive biotransformation of PT by hepatic enzymes, known to occur *in vivo*. More than 95% of PT is biotransformed by the liver and less than 5% is eliminated unchanged in urine (Ahmed and Siddiqi, 2006). A reactive arene oxide intermediate is known to be formed during the conversion of PT to para-hydroxy-phenyl-metabolite (p-HPPH). This intermediate is considered to be involved in PT-induced idiosyncratic reactions affecting the liver and has never been isolated from plasma or urine, presumably because of its high instability (Zaccara et al., 2007).

The hepatic injury associated with PT is rare, but fatal in 10-38% of cases (Driefus and Langer, 1987). The mechanism of liver injury caused by PT has been mainly associated with hypersensitivity reactions involving the immune system (Kaplowitz, 2005; Kass, 2006; Ahmed and Siddiqi, 2006). Cytotoxicity has not yet been suggested as a pathway in the pathogenesis of PT-induced hepatic injury. Diwivedi et al. (2003)

reported a correlation between the toxicity of arene oxide metabolites and PT-induced cutaneous eruptions. Our data strongly suggest that cytotoxicity is also involved in PT-induced hepatotoxicity and, moreover, that hepatic mitochondrial dysfunction is one of the possible pathways.

Among the drugs studied, CB-B was the least effective in impairing mitochondrial function. The most important metabolic product of CB, carbamazepine 10,11 epoxide, has been shown to be pharmacologically active (Ahmed and Siddiqi, 2006). Its lowest activity might be due to the fact that the epoxide group is protected by the non planar adjacent rings by means of steric obstruction and therefore, less available to react as compared to PT metabolite. Although stable, the reactivity of carbamazepine 10,11 epoxide and its potential to covalently interact with macromolecules have been shown (Bu et al., 2005). Additionally, the ability of CBZ to cause liver toxicity has been related, at least in some cases, to another intermediate metabolite: carbamazepine-2,3-epoxide (Madden et al., 1996; Zaccara et al., 2007). Two different types of CBZ-associated hepatotoxicity have been suggested: hypersensitivity and toxin induced, both associated with arene oxides accumulation and disturbance of glutathione metabolism (Kalapos, 2002). The hypersensitive reaction develops in the form of granulomatous hepatitis, with fever and abnormal liver functions tests. A second type of liver injury, which may result from direct drug toxicity, is characterized by acute hepatitis and hepatocellular necrosis with fever, rash, and lymphadenopathy simulating biliary tract infection (Driefus and Langer, 1987; Ahmed and Siddiqi, 2006). Accordingly, our data support the occurrence of liver injury due to CB-induced toxicity probably associated with arene oxides. Additionally, our data suggest that this toxicity is mediated by mitochondrial dysfunction. The profile of patients susceptible to serious hepatotoxicity induced by CB is not established (Ahmed and Siddiqi, 2006). The prognosis of

carbamazepine-induced hepatitis is usually favorable, and improvement is quickly obtained after drug withdrawal; however, fatal cases have been reported (Haukeland et al., 2000).

Our results strongly suggest that mitochondrial toxicity is one of the mechanisms involved in idiosyncratic hepatic damage associated not only with carbamazepine, but also with other AAED, such as phenytoin and phenobarbital. In fact, hepatic mitochondrial toxicity induced by PB and PT has not been previously demonstrated.

Given the wide use of AAED in the treatment of epilepsy, their increasing indications for psychiatric and neurological disorders and the severity of their adverse effects, strategies to protect against idiosyncratic reactions are imperative. In this context, the knowledge of potential hepatotoxicity as well as the delineation of possible mechanisms involved can provide important tools for the diagnosis, treatment and prevention of idiosyncratic hepatic damage, a real challenge in optimizing AAED therapy.

REFERENCES

- Ahmed, S.N., Siddiqi, Z.A. 2006. Antiepileptic drugs and liver disease. *Seizure* 15, 156-164.
- Bavdekar, S.B., Muranjan, M.N., Gogtay, N.J., Kantharia, V., Kshirsagar, N.A. 2004. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: lymphocyte toxicity assay for the confirmation of diagnosis and risk assessment. *The Annals of Pharmacotherapy* 38, 1648-1650.
- Boelsterli, U.A., Lim, P.L. Mitochondrial abnormalities--a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? 2007. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220, 92-107.
- Bohan, K.H, Mansuri, T.F., Wilson, N.M. 2007. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: implications for pharmaceutical care. *Pharmacotherapy* 27, 1425-1439.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bu, H.Z., Kang, P., Deese, A.J., Zhao, P., Pool, W.F. 2005. Human in vitro glutathionyl and protein adducts of carbamazepine-10,11-epoxide, a stable and pharmacologically active metabolite of carbamazepine. *Drug Metabolism and Disposition* 33, 1920-1924.
- Chance, B., Willians, G.R. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry* 17, 65-134.
- Cain. K., Skilleter, D.N. 1987. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: K. Snell, B. Mullock (Eds), *Biochemical Toxicology – A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp 217– 254.

- Cognato, G.D., Bruno, A.N, da Silva, R.S., Bogo, M.R., Sarkis, J.J., Bonan, C.D. 2007. Antiepileptic Drugs Prevent Changes Induced by Pilocarpine Model of Epilepsy in Brain Ecto-Nucleotidases. *Neurochemical Research* DOI10.1007/s11064-006-9272-y
- Coon, K.D., Valla, J., Szelinger, S., Schneider, L.E., Niedzielko, T.L., Brown, K.M., Pearson, J.V., Halperin, R., Dunckley, T., Papassotiropoulos, A., Caselli, R.J., Reiman, E.M., Stephan, D.A., 2006. Quantitation of heteroplasmy of mtDNA sequence variants identified in a population of AD patients and controls by array-based resequencing. *Mitochondrion* 6, 194–210.
- Driefus, F.E., Langer, D.H. 1987. Hepatic considerations in the use of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 28 (Suppl. 2), S23—29.
- Dwivedi, R., Gogtay, N., Kharkar, V., Amladi, S., Kshirsagar, N. 2004. In-vitro lymphocyte toxicity to a phenytoin metabolite in phenytoin induced cutaneous adverse drug eruptions. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* 70, 217-20.
- Eisenberg, E., River, Y., Shifrin, A., Krivoy, N. 2007. Antiepileptic drugs in the treatment of neuropathic pain. *Drugs* 67, 1265-1289.
- Emaus, R. K., Grunwald, R., Lemasters, J. J. 1986. Rhodamine-123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria - spectral and metabolic properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 850, 436-48.
- Farrell, G.C. 2002. Liver Disease Caused by Drugs, Anesthetics, and Toxins. In: Feldman M., Friedman L.S., Sleisenger M.H. (Eds.), *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management*. Elsevier, Philadelphia, pp.1411-1415.

- George, J. and Farrell, G.C. 1994. Anticonvulsivant Hepatototoxicity. In: Farrell G.C. (Ed.), Drug-induced liver disease. Edinburgh: Churchill Livingstone, London, pp. 143-144.
- Haukeland, J.W., Jahnsen, J., Raknerud, N. 2000. Carbamazepine-induced hepatitis. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening* 120, 2875-2877.
- Jeavons, P.M. Hepatototoxicity of antiepileptic drugs. 1983. In: Oxley, J., Janz, D., Meinardi, H. (Eds.). *Antiepileptic therapy: chronic toxicity of antiepileptic drugs*. Raven Press, New York, 1-45.
- Kalapos, M.P. 2002. Carbamazepine-provoked hepatotoxicity and possible aetiopathological role of glutathione in the events. Retrospective review of old data and call for new investigation. *Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews* 21, 123-141.
- Kaplowitz, N. 2005. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 4, 489-99.
- Kass GE. 2006. Mitochondrial involvement in drug-induced hepatic injury. *Chemical Biological Interactions*. 163, 145-159.
- Kaufman KR. 1999. Carbamazepine, hepatotoxicity, organic solvents, and paints. *Seizure* 8, 250-252.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. 1996. Opening of mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{+2} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Letters* 378, 150-2.
- Madden S, Maggs JL, Park BK. 1996. Bioactivation of carbamazepine in the rat in vivo. Evidence for the formation of reactive arene oxide(s). *Drug Metabolism and Disposition* 24:469–479.

- Martin CN, Garner RC. 1987. The identification and assessment of covalent binding *in vitro* and *in vivo*. In: Snell K, Mullock B (Eds). Biochemical Toxicology: a practical approach. IRL Press, Oxford, p. 109-126.
- Nasreddine W, Beydoun A. 2007. Oxcarbazepine in neuropathic pain. Expert Opinion on Investigational Drugs 16, 1615-1625.
- Neuman MG, Malkiewicz IM, Shear NH. 2000. A novel lymphocyte toxicity assay to assess drug hypersensitivity syndromes. Clinical Biochemistry 33, 517-524.
- Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, Williams DP. 2005. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45, 177-202.
- Parkinson A. 2001. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen CD (Ed.), Casarett and Doll's Toxicology. The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill: New York, 133-224.
- Pedersen PL, Grenawalt JW, Reynafarje B, Hullihen J, Decker GL, Soper JW, Bustamente E. 1978. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver-derived tissues. Methods in Cell Biology. 20, 411-481.
- Pessayre D, Mansouri A, Haouzi D, Fromenty B. 1999. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. Cell Biology and Toxicology. 15, 367-373.
- Peyrière H, Dereure O, Breton H, Demoly P, Cociglio M, Blayac J-P, Buys DH. 2006. Variability in the clinical pattern of cutaneous sideeffects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist? Therapeutics 155, 422-428.

- Santos AC, Uyemura SA, Santos NA, Mingatto FE, Curti C. 1997. Hg(II)-induced renal cytotoxicity: in vitro and in vivo implications for the bioenergetic and oxidative status of mitochondria. *Molecular and Cellular Biochemistry* 177, 53-59.
- Scarpa A. 1979. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. *Methods Enzymology* 56:301-338.
- Shear NH, Spielberg SP. 1988. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. In vitro assessment of risk. *The Journal of Clinical Investigation*. 82, 1826-1832.
- Sierra NM, Garcia B, Marco J, Plaza S, Hidalgo F, Bermejo T. 2005. Cross hypersensitivity syndrome between phenytoin and carbamazepine. *Pharmacy World & Science*. 27, 170-4.
- Spielberg SP, Gordon GB, Blake DA, Mellits ED, Bross DS. 1981. Anticonvulsant toxicity in vitro: possible role of arene oxides. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 217, 386-389.
- Tabatabaei AR, Thies RL, Farrell K, Abbott FS. 1997. A rapid *in vitro* assay for evaluation of metabolism-dependent cytotoxicity of antiepileptic drugs on isolated human lymphocytes. *Fundamental and Applied Toxicology: official Journal of the Society of Toxicology* 37, 181-189.
- Tong V, Teng XW, Chang TK, Abbott FS. 2005. Valproic acid II: effects on oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and cytotoxicity in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicological Sciences* 86, 436-43.
- Wells PG, Winn LM. 1996. Biochemical toxicology of chemical teratogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 31, 1-40.
- Zaccara G, Franciotta D, Perucca E. 2007. Idiosyncratic adverse reactions to antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 48, 1223-44.

- Zwanzger P, Eser D, Rupprecht R. 2007 Anticonvulsants in the treatment of anxiety - an alternative treatment option? *Nervenarzt*. 78, 1274-82.

Figure Legends

Figure 1 – Effects of the parent drugs, CBZ - carbamazepine, PB- phenobarbital and PT - phenytoin, on mitochondrial respiration. (A) state 3 respiration; (B) RCR and (C) state 4 respiration. Data were expressed as means \pm SD of three independent experiments; each experiment was performed in triplicates. ★ $p < 0.05$; ■ $p < 0.01$; □ $p < 0.001$

Figure 2 - Effects of phenobarbital (PB) as an unaltered drug on (A) succinate and rotenone-, (B) glutamate and malate- and (C) ascorbate and TMPD-linked respirations (sites I, II and IV of the respiratory chain, respectively). Traces are representative of three independent experiments; each experiment was performed in triplicates. CCCP: carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone

Figure 3 - Effects of bioactivated drugs, CBZ-B- bioactivated carbamazepine, PB-B- bioactivated phenobarbital, PT-B- bioactivated phenytoin on (A) state 3 respiration; (B) RCR and (C) state 4 respiration. Data were expressed as means \pm SD of three independent experiments; each experiment was performed in triplicates. ★ $p < 0.05$; ■ $p < 0.01$; □ $p < 0.001$

Figure 4 - Effects of carbamazepine (CBZ), phenobarbital (PB) and phenytoin (PT) on ATP synthesis. (A) unaltered drugs; (B) bioactivated drugs; CBZ-B: bioactivated carbamazepine; PB-B: bioactivated phenobarbital; PT-B: bioactivated phenytoin. Data were expressed as means \pm SD of three independent experiments; each experiment was performed in triplicates. ★ $p < 0.05$; ■ $p < 0.01$; □ $p < 0.001$

Figure 5 - Effects of carbamazepine (CBZ), phenobarbital (PB) and phenytoin (PT) on Ca^{+2} uptake/release. (A) unaltered drugs; (B) bioactivated drugs; CBZ-B: bioactivated carbamazepine; PB-B: bioactivated phenobarbital; PT-B: bioactivated phenytoin. Traces are

representative of three independent experiments; each experiment was performed in triplicates. CCCP: carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone; t-BH: t-butylhydroperoxide.

Figure 6 - Effects of carbamazepine (CBZ), phenobarbital (PB) and phenytoin (PT) on mitochondrial membrane potential. (A) CB and PT; (B) PB and PB-B; (C) and (D) PT-B; (E) CB-B. CBZ-B: bioactivated carbamazepine; PB-B: bioactivated phenobarbital; PT-B: bioactivated phenytoin. Traces are representative of three independent experiments; each experiment was performed in triplicates. FCCP: carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenyl hydrazone; FU = Fluorescence Units

Figure 7 - Effects of carbamazepine (CBZ), phenobarbital (PB) and phenytoin (PT) on calcium-induced mitochondrial swelling. CBZ-B: bioactivated carbamazepine; PB-B: bioactivated phenobarbital; PT-B: bioactivated phenytoin. Traces are representative of three independent experiments; each experiment was performed in triplicates.

Figure 8 - Mechanisms involved in idiosyncratic hepatic injury induced by aromatic anticonvulsants. The role of mitochondrial dysfunction in the cytotoxic mechanism is investigated. (1) Immune-mediated hepatotoxicity associated with epoxide hydrolase deficiency; (2) Direct toxicity mediated by mitochondrial dysfunction and associated with epoxide hydrolase deficiency. A third possibility is speculated: (3) Idiosyncrasy due to genetic or acquired mitochondrial defect.

Figure 1

A

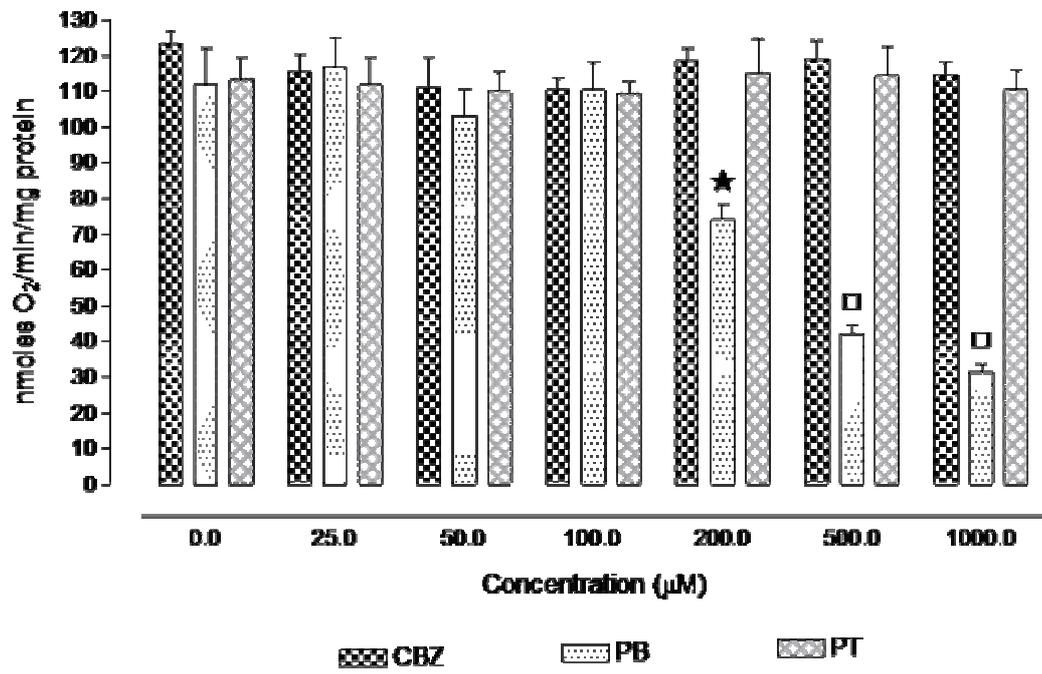


Figure 1

B

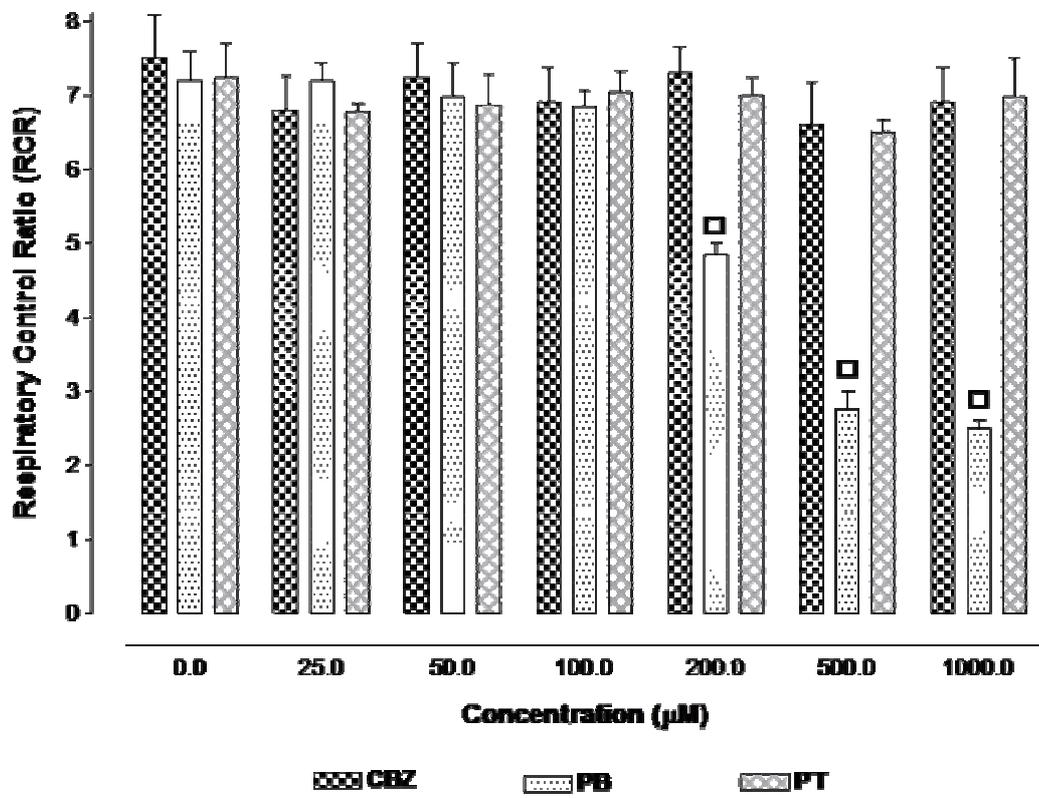


Figure 1

C

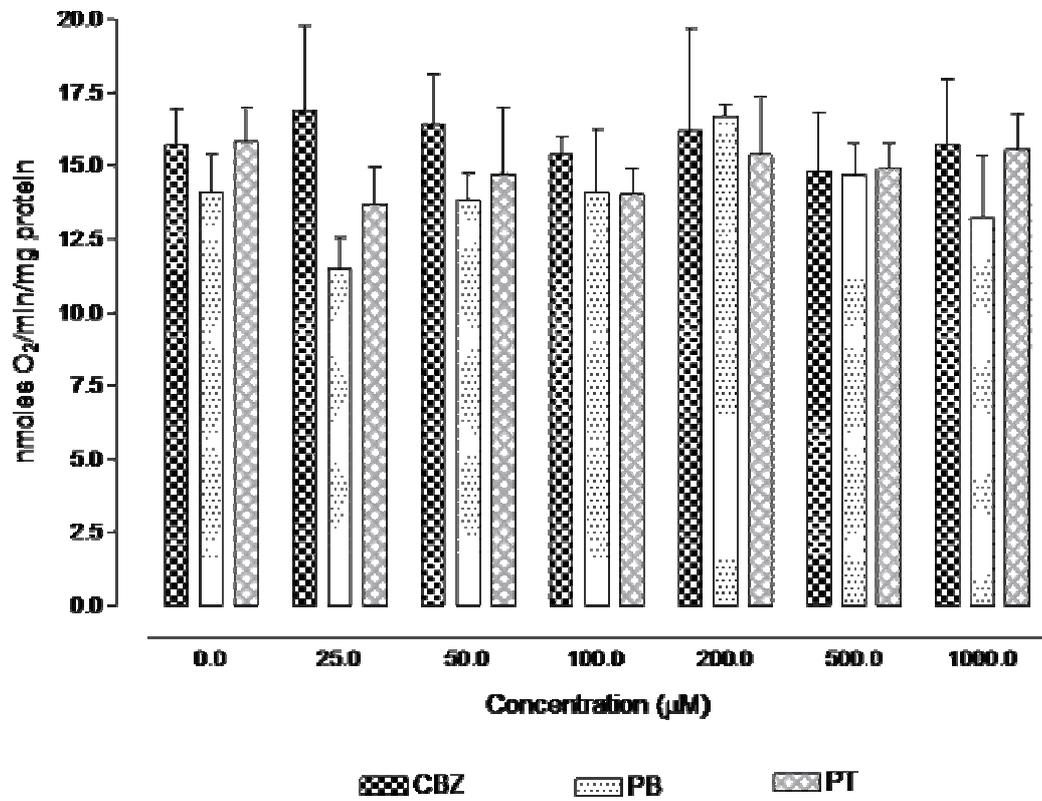
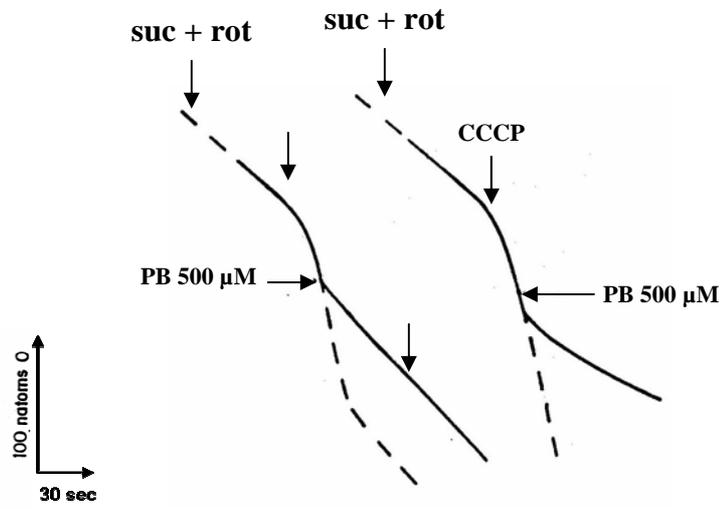
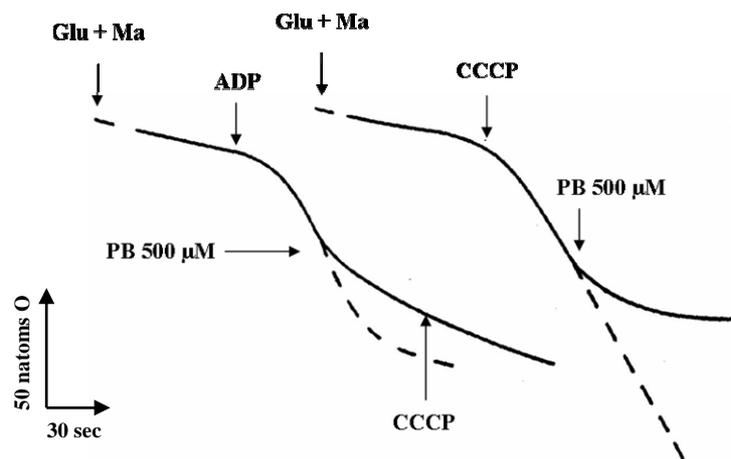


Figure 2

A



B



C

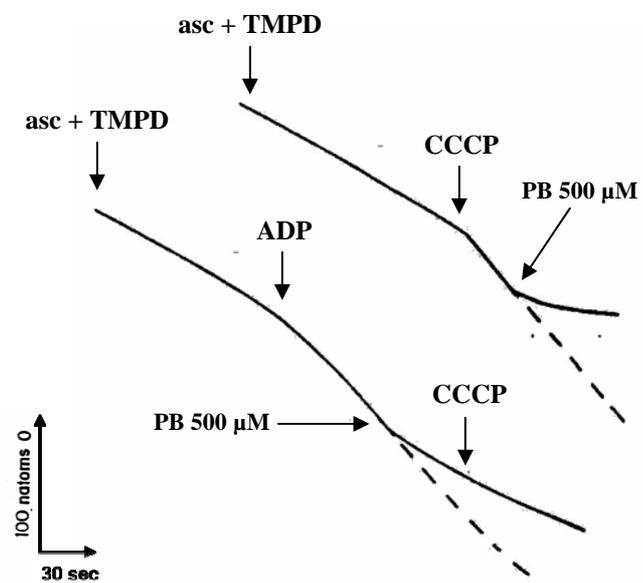


Figure 3

A

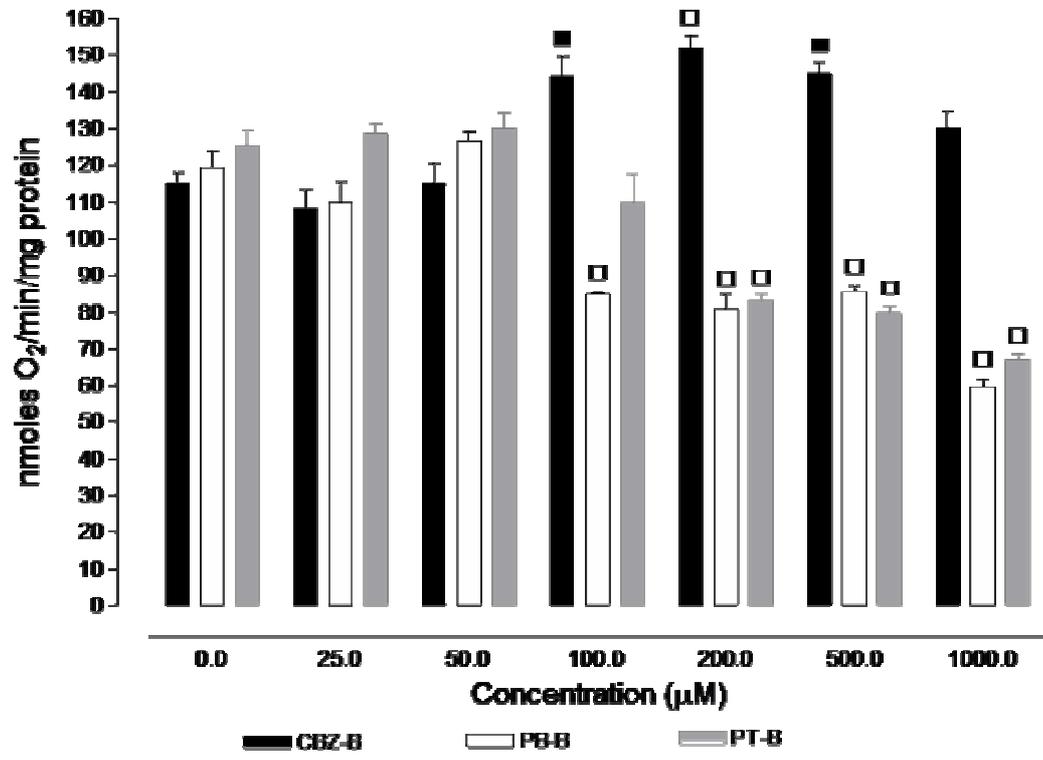


Figure 3

B

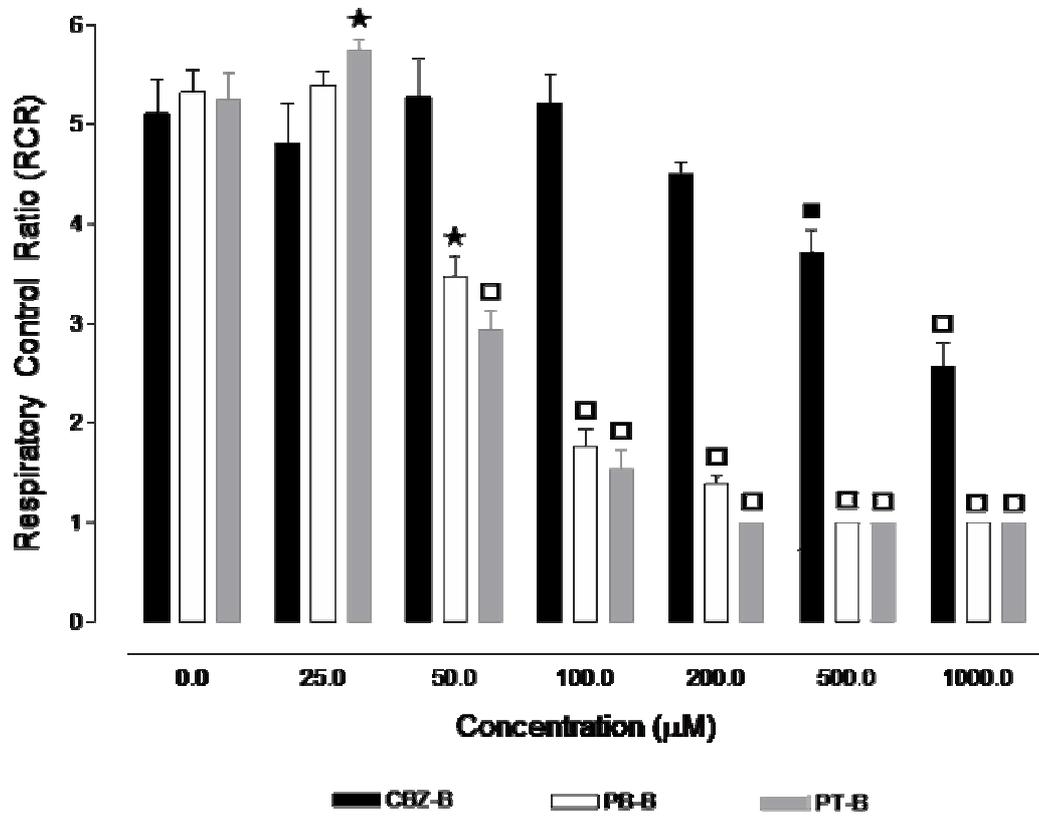


Figure 3

C

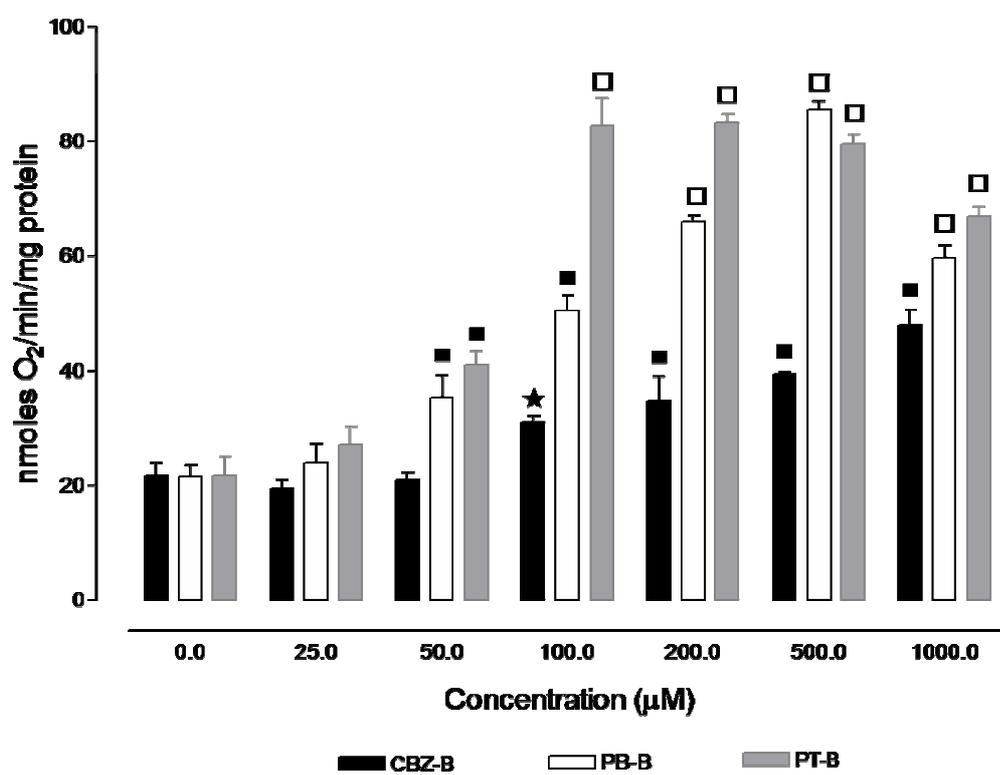


Figure 4

A

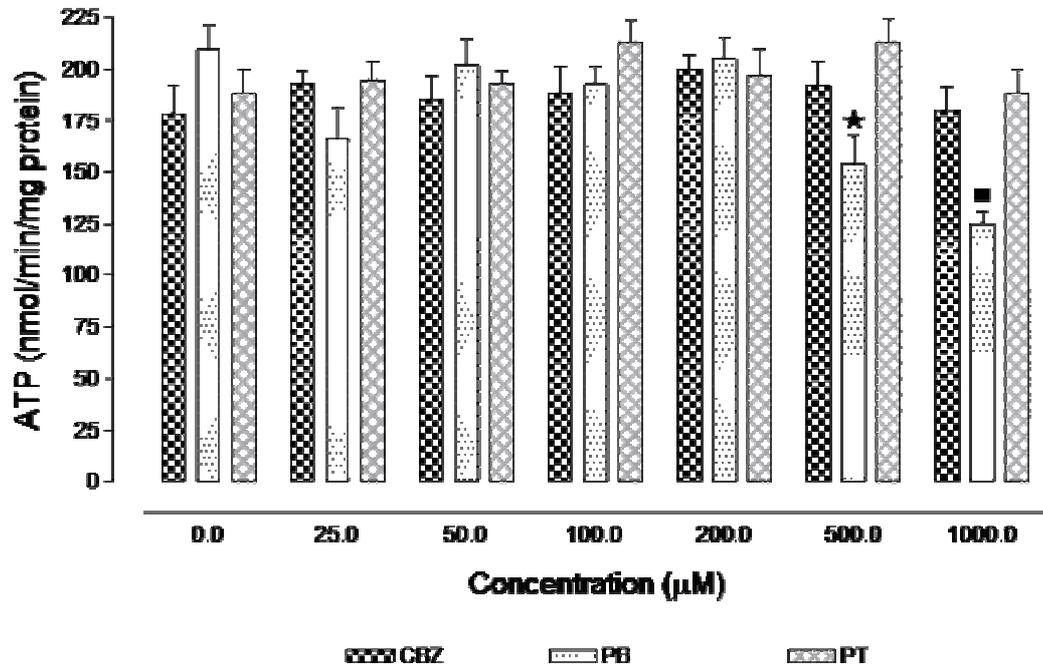


Figure 4

B

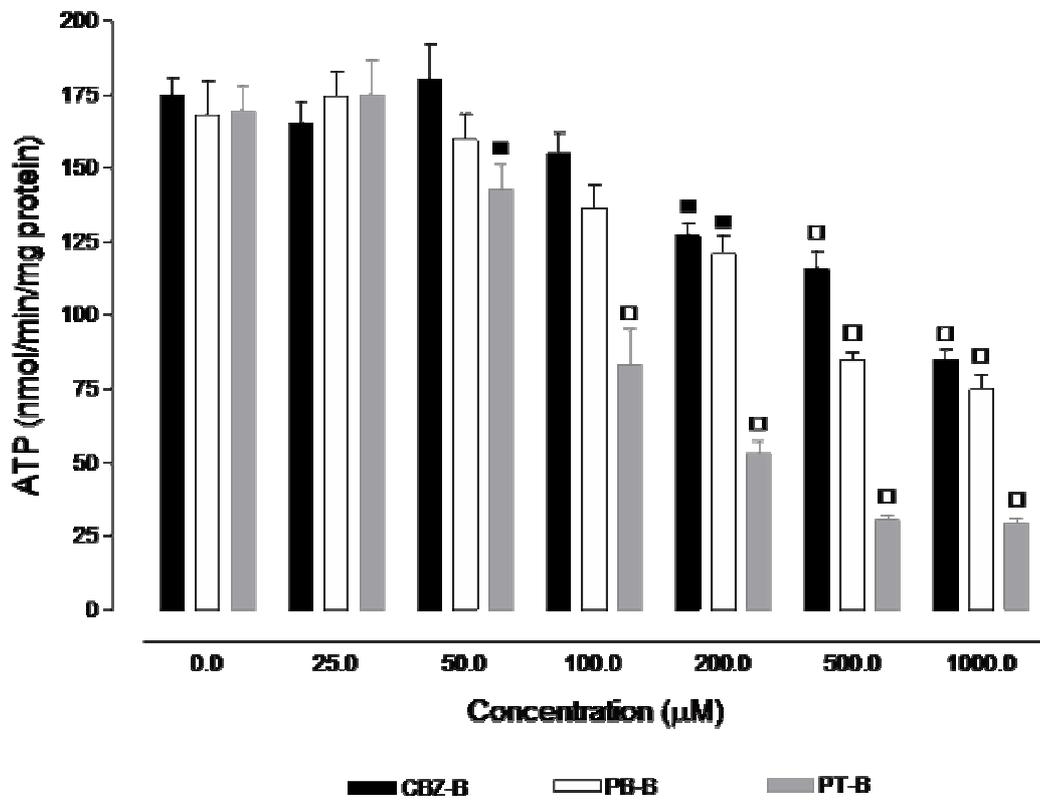
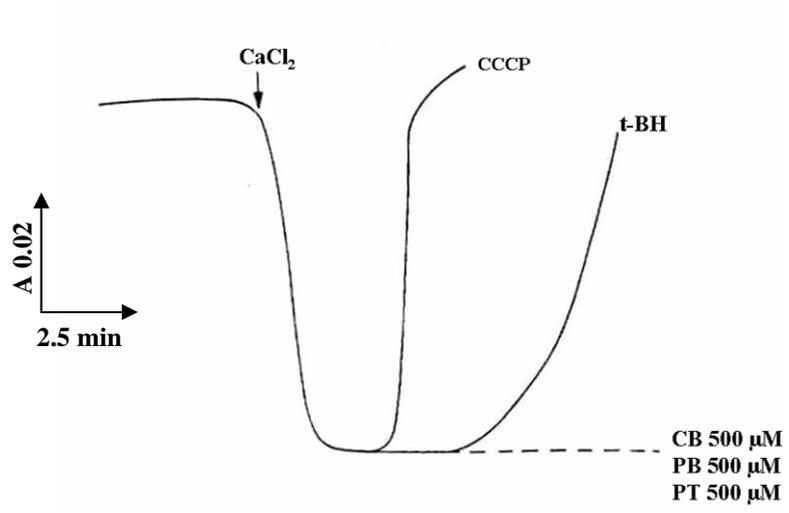


Figure 5

A



B

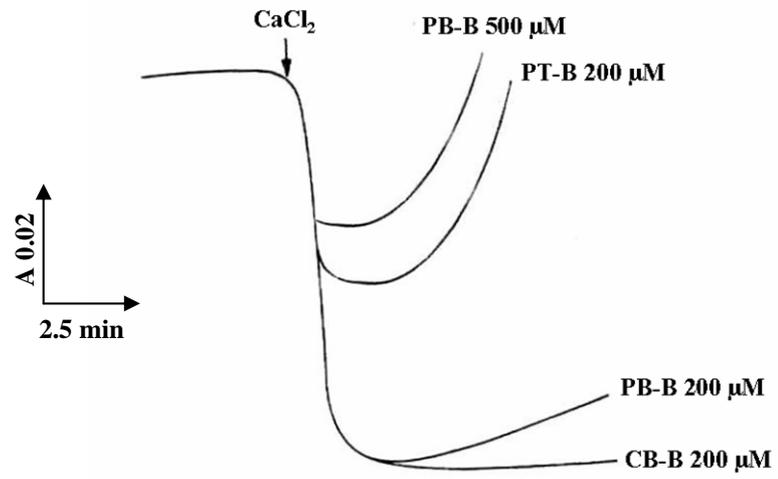


Figure 6

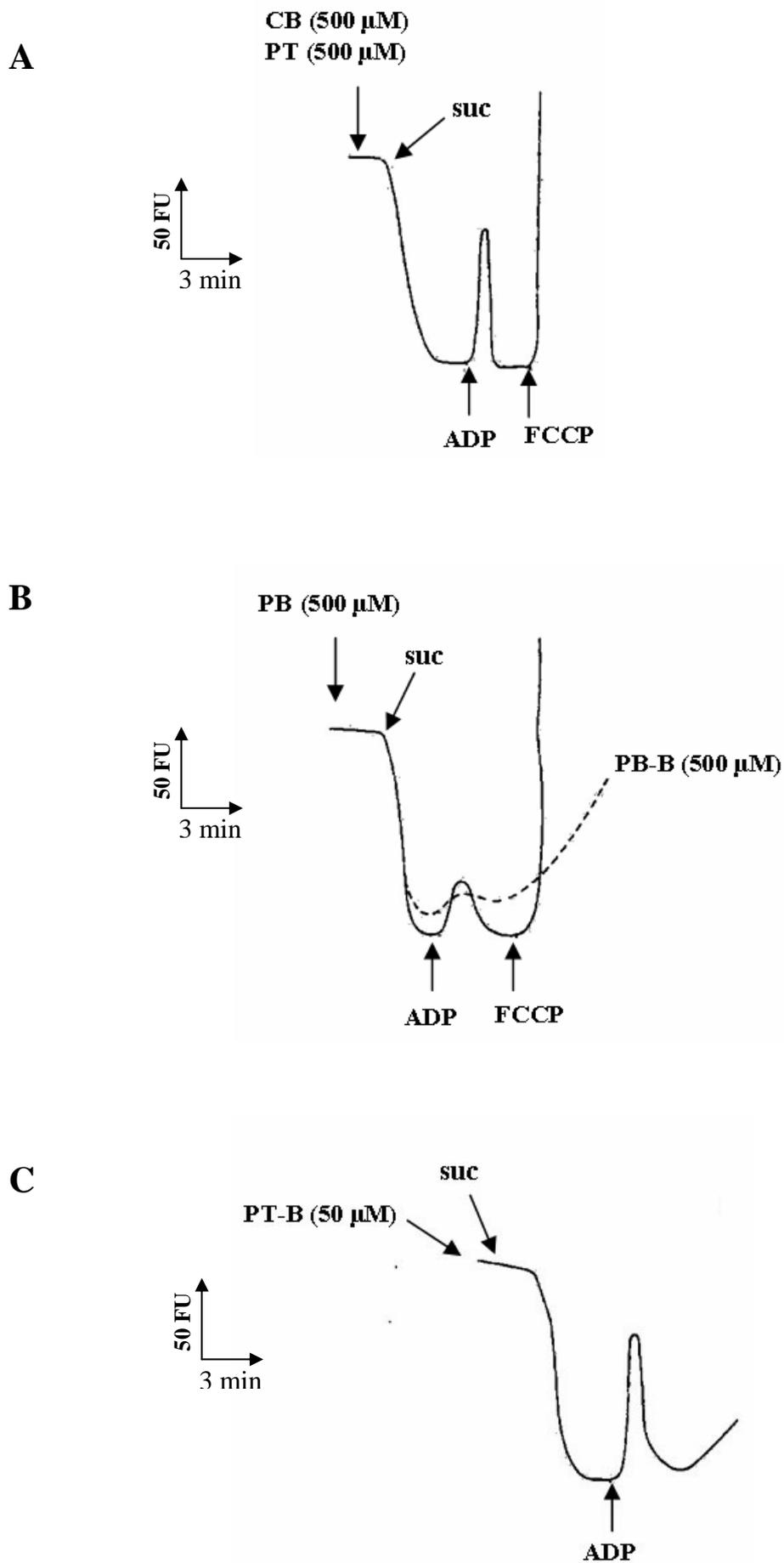
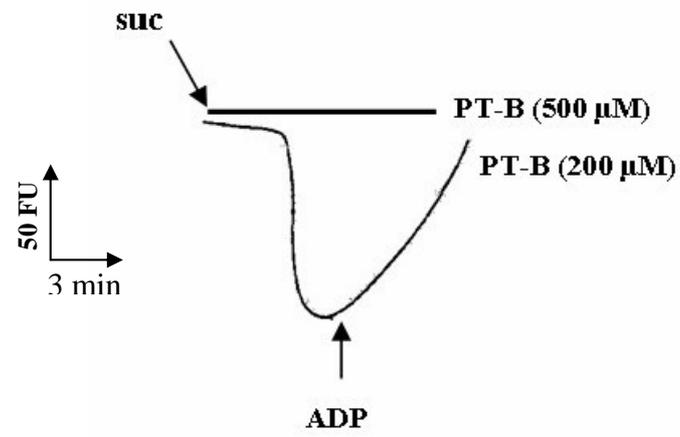


Figure 6

D



E

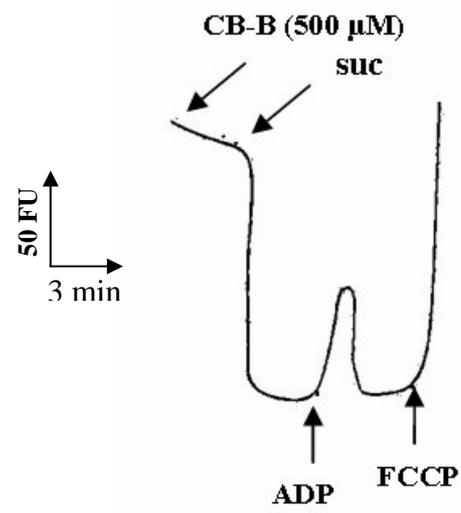


Figure 7

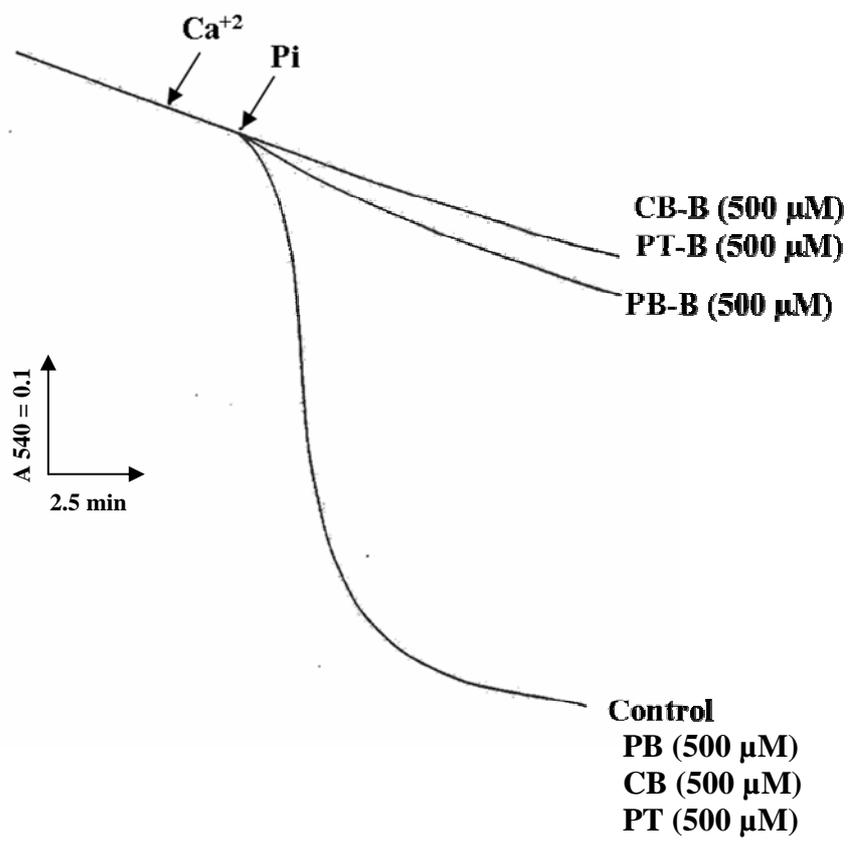


Figure 8

