



## EFEITOS DA SIBUTRAMINA SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO EM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATOS

**Renato Polimeni Constantin<sup>1</sup>; Rodrigo Polimeni Constantin<sup>2</sup>; Leandro Silva Pivato<sup>3</sup>; Aparecida Pinto Munhos Hermoso<sup>4</sup>**

**RESUMO:** A obesidade, definida como índice de massa corporal maior que 30 kg/m<sup>2</sup>, é provavelmente a enfermidade metabólica mais antiga que se conhece. O tratamento farmacológico tem sido indicado quando o indivíduo possui um índice de massa corporal maior que 30 kg/m<sup>2</sup>. Tem sido demonstrado que a sibutramina produz redução de peso em pacientes obesos de forma dose-dependente e atualmente tem sido usada no tratamento desta desordem. Os relatos de alterações no metabolismo basal de animais sugerem que o fármaco possa atuar de forma direta ou indireta no metabolismo energético celular. A possibilidade da sibutramina exercer uma ação direta sobre o metabolismo energético pode ser investigada experimentalmente em mitocôndrias isoladas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos diretos da sibutramina sobre vários processos mitocondriais, incluindo parâmetros de atividade respiratória e fosforilação oxidativa, a atividade de complexos enzimáticos da cadeia respiratória e a atividade do complexo ATPásico. As mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos albinos da linhagem Wistar pesando entre 220 a 250g. Os resultados observados nos experimentos com sibutramina indicam que esta droga age predominantemente como desacopladora da fosforilação oxidativa. Também exerce efeitos inibitórios sobre os complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons. A sibutramina causou inibição dose-dependente da atividade ATPásica. O grau de inibição exercido pela sibutramina foi maior em mitocôndrias desacopladas do que em rompidas, um forte indício de que a sibutramina exerce, simultaneamente, efeito inibidor sobre o carreador de adenina nucleotídeos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Metabolismo Energético; Mitocôndrias; Obesidade; Sibutramina.

### 1 INTRODUÇÃO

A obesidade, definida como índice de massa corporal maior que 30 kg/m<sup>2</sup>, é provavelmente a enfermidade metabólica mais antiga que se conhece. É vista como uma doença que pode se desenvolver a partir de fatores genéticos, metabólicos, ambientais (comportamentais, sociais e culturais) ou da interação desses fatores. A obesidade se caracteriza pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, que traz prejuízos à saúde. Esta doença está intimamente relacionada a um aumento na incidência de doenças cardiovasculares, hiperlipemia, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, entre outras. (CRONFLI, 2002).

<sup>1</sup> Acadêmico do curso de farmácia. Departamento de Bioquímica, Laboratório de Metabolismo Hepático, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR. Bolsistas do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq-UEM (PIBIC-UEM). [rreconstantin@yahoo.com](mailto:rreconstantin@yahoo.com)

<sup>2</sup> Doutorando em Ciências Biológicas. Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular. Departamento de Bioquímica, Laboratório de Metabolismo Hepático, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR. [rrconstantin@hotmail.com](mailto:rrconstantin@hotmail.com)

<sup>3</sup> Docente da Faculdade Ingá (UNINGÁ). Departamento de Ciências Biológicas, Maringá – PR. [lehandruls@hotmail.com](mailto:lehandruls@hotmail.com)

<sup>4</sup> Técnica do Laboratório de Metabolismo Hepático. Departamento de Bioquímica. Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR. [aparecidahermoso@yahoo.com.br](mailto:aparecidahermoso@yahoo.com.br)

O tratamento da obesidade exige identificação e mudanças de componentes inadequados de estilo de vida do indivíduo, incluindo mudanças na alimentação e na prática de atividade física (SILVA, 2006). Por outro lado, o tratamento farmacológico tem sido indicado quando o indivíduo possui um índice de massa corporal maior que 30 kg/m<sup>2</sup>. A sibutramina foi inicialmente avaliada na década de 1980 como um antidepressivo potencial, por causa do seu provável mecanismo de ação similar aos antidepressivos tricíclicos, como a amitriptilina (LUQUE; REY, 2002). A descoberta da sibutramina como um agente terapêutico conduziu à sua possível aplicação na perda de peso corporal pela observação da perda de peso durante o tratamento de depressão, mais notavelmente em pacientes obesos deprimidos. Tem sido demonstrado que a sibutramina produz redução de peso em pacientes obesos de forma dose-dependente e atualmente tem sido usada no tratamento desta desordem.

Acredita-se que a sibutramina induz perda de peso em humanos e em ratos, pelo aumento da saciedade, ou seja, reduzindo a ingestão de alimentos, mas existem também evidências de que a redução do peso corpóreo está ligada ao aumento do gasto energético em mamíferos. De fato, foi demonstrado que o tratamento agudo com este fármaco produz um aumento no consumo de oxigênio, no metabolismo basal e também na temperatura corporal de ratos (CONNOLEY et al., 1999). Apesar do reconhecimento de suas propriedades farmacológicas no tratamento da obesidade, nem todas as ações biológicas da sibutramina são conhecidas. Os relatos de alterações no metabolismo basal de animais sugerem que o fármaco possa atuar de forma direta ou indireta no metabolismo energético celular.

A princípio um aumento no consumo de oxigênio do animal pode estar associado a um estado de hipercatabolismo, o que poderia também contribuir para a perda de peso corpóreo. As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela respiração celular, um processo acoplado à fosforilação do ADP e que requer a oxidação dos nutrientes celulares, como a glicose, os ácidos graxos e os aminoácidos. A possibilidade da sibutramina exercer uma ação direta sobre o metabolismo energético pode ser investigada experimentalmente em mitocôndrias isoladas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos diretos da sibutramina sobre várias funções mitocondriais, incluindo parâmetros de atividade respiratória e fosforilação oxidativa, a atividade de complexos enzimáticos da cadeia respiratória e atividade do complexo ATPásico. As mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos, órgão responsável pela metabolização da sibutramina.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

A Sibutramina foi adquirida em farmácia de manipulação local, com receituário médico. As coenzimas NADH, ADP e ATP foram de procedência da Sigma Chemical. Os demais reagentes, sais, tampões e substratos, foram os de melhor grau de pureza.

Os animais utilizados nos experimentos com mitocôndrias isoladas foram ratos albinos da linhagem Wistar, machos, pesando entre 220 a 250g, alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. As mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas de acordo com o método descrito por (BRACHT; ISHII-IWAMOTO; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, 2003).

Mitocôndrias intactas, obtidas pelo método descrito acima foram rompidas para avaliar a ação da droga sobre pontos específicos da cadeia transportadora de elétrons. Sendo utilizadas para medidas das atividades da NADH-oxidase, succinato-oxidase, TMPD-ascorbato e ATPase.

O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas e rompidas foi determinado segundo método descrito por Voss et al. (1961). O consumo de oxigênio foi registrado por meio de um registrador acoplado a um polarógrafo. Os seguintes substratos foram adicionados ao meio de reação quando requeridos nos experimentos com mitocôndrias

intactas:  $\alpha$ -cetogluturato 10 mM, succinato 10 mM e ADP 0,125 mM. Para atividades da NADH-oxidase, succinato-oxidase e TMPD-ascorbato foram utilizadas como fontes de enzimas, mitocôndrias rompidas por congelamento. A atividade ATPásica em mitocôndrias intactas, acopladas e desacopladas, ou rompidas por congelamento, foi determinada dosando-se o fosfato liberado no meio de reação, segundo o método descrito por (PULLMAN et al., 1960).

O conteúdo protéico das suspensões mitocondriais utilizadas em todos os experimentos foi determinado, por meio do método de dosagem segundo Lowry et al (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão (20 mg%), sendo as leituras de absorvância feitas em espectrofotômetro a 700 nm.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1A mostra o efeito da sibutramina sobre a velocidade respiratória, medida durante a oxidação do  $\alpha$ -cetogluturato. Concentrações crescentes da droga (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M) inibiram progressivamente a velocidade da respiração no estado 3. Observou-se neste experimento que houve diminuição na razão de RC e na razão ADP/O, mostrados na tabela 1. No estado 4, houve estímulo nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu$ M e, na concentração de 200  $\mu$ M, ocorreu inibição. Quando o succinato foi utilizado como substrato alimentador da cadeia respiratória (figura 1B), verificou-se um efeito inibitório no estado 3 com todas as concentrações da droga e, no estado 4, um leve estímulo. Houve diminuição na razão de RC e na razão ADP/O (tabela 1).

A figura 2 mostra os efeitos da sibutramina sobre as atividades da NADH-oxidase (complexo I), succinato-oxidase (complexo III) e TMPD-ascorbato (complexo IV). Observou-se que houve inibição do complexo I, nas diferentes concentrações da droga. No complexo III, não exerceu efeito significativo, exceto na concentração de 200  $\mu$ M de sibutramina e, no complexo IV, não houve inibição nem estimulação sobre as atividades destas enzimas.

A figura 3 mostra os efeitos da sibutramina sobre a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas, desacopladas com 2,4 DNP ou rompidas por congelamento. Em mitocôndrias intactas, a sibutramina causou estimulação da enzima e uma leve inibição com a concentração maior. Em mitocôndrias desacopladas com 2,4 DNP, concentrações crescentes de sibutramina (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M) causaram crescentes efeitos inibidores sobre a velocidade de hidrólise do ATP. Em mitocôndrias rompidas por congelamento, a sibutramina produziu um leve efeito inibitório sobre a atividade enzimática, sendo significativo na concentração maior.

Tabela 1. Efeitos da sibutramina sobre a razão ADP/O e o coeficiente de controle respiratório (RC) em mitocôndrias intactas de fígado de rato, na presença dos substratos  $\alpha$ -cetogluturato (10 mM) e succinato (10 mM).

Concentração da sibutramina ( $\mu$ M)	$\alpha$ -cetogluturato (n=3)		Succinato (n=4)	
	RC	ADP/O	RC	ADP/O
0	3,13 $\pm$ 0,43	2,76 $\pm$ 0,46	3,72 $\pm$ 0,29	1,60 $\pm$ 0,18
25	2,20 $\pm$ 0,20*	2,29 $\pm$ 0,31	2,61 $\pm$ 0,08*	1,36 $\pm$ 0,13
50	1,81 $\pm$ 0,20*	2,09 $\pm$ 0,28	2,11 $\pm$ 0,15*	1,13 $\pm$ 0,06*
100	1,11 $\pm$ 0,11*	0,76 $\pm$ 0,00*	1,00 $\pm$ 0,00*	0,00 $\pm$ 0,00*
200	0,00 $\pm$ 0,00*	0,00 $\pm$ 0,00*	1,00 $\pm$ 0,00*	0,00 $\pm$ 0,00*

Os dados são as médias  $\pm$  erro padrão de 3 ( $\alpha$ -cetogluturato) ou 4 (succinato) preparações mitocondriais independentes. (\*) valores que diferem estatisticamente dos valores dos controles, identificados mediante análise de variância com teste Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

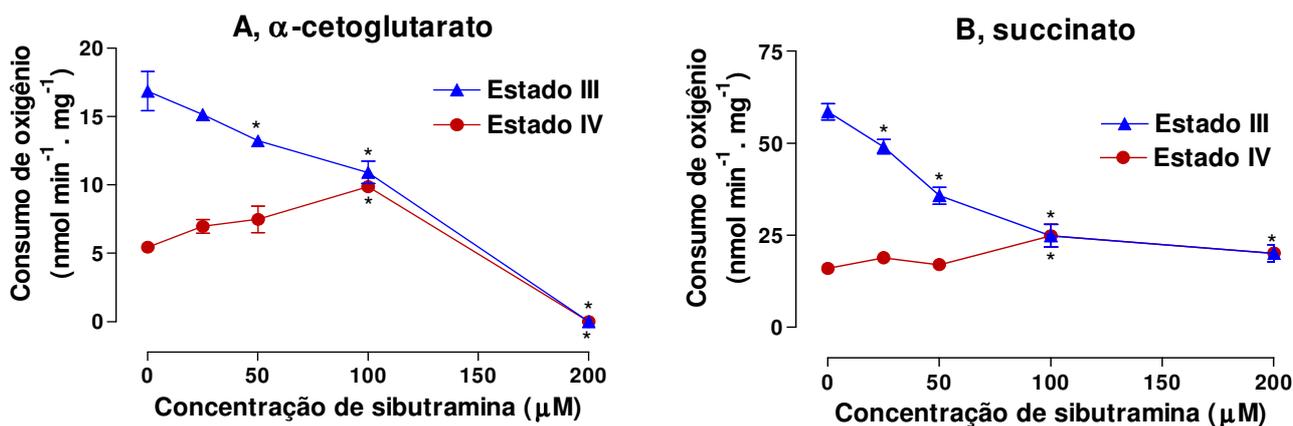


Figura 1. Efeitos da sibutramina sobre a velocidade do consumo de oxigênio em mitocôndrias intactas isoladas de fígado de rato, durante a oxidação do  $\alpha$ -cetoglutarato (A) e succinato (B). Os dados são as médias  $\pm$  erro padrão de 3 ( $\alpha$ -cetoglutarato) ou 4 (succinato) preparações mitocondriais independentes. (\*) valores que diferem estatisticamente dos valores dos controles, identificados por meio de análise de variância com teste Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

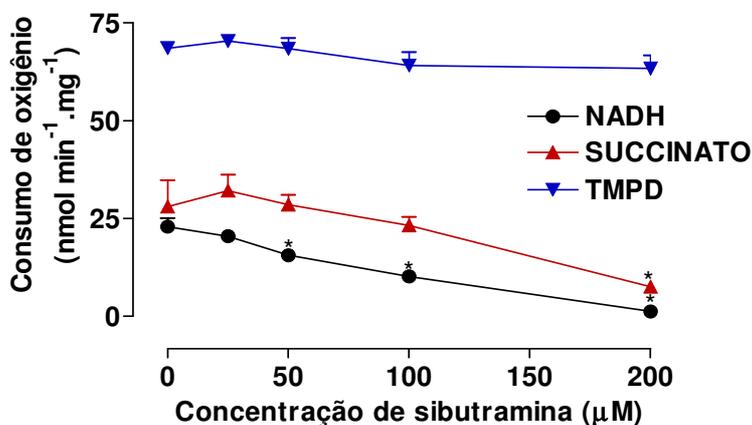


Figura 2. Efeitos da sibutramina sobre as atividades da NADH-oxidase, succinato-oxidase e TMPD-ascorbato, utilizando mitocôndrias de fígado de rato rompidas por congelamento e descongelamento. Os dados são as médias  $\pm$  erro padrão de 3 preparações mitocondriais independentes. (\*) valores que diferem estatisticamente dos valores dos controles, identificados mediante de análise de variância com teste Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

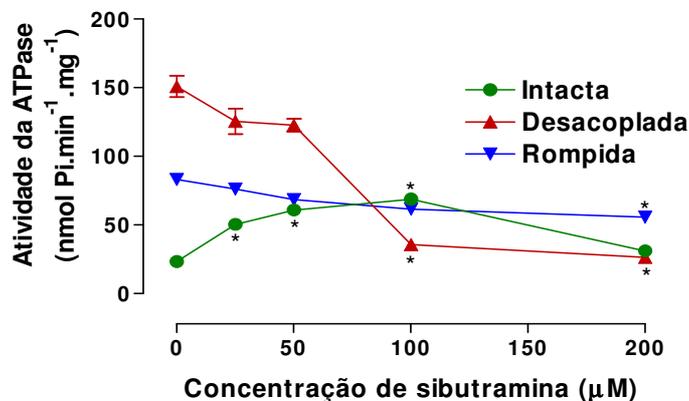


Figura 3. Efeitos da sibutramina sobre a atividade ATPase de mitocôndrias intactas, desacopladas com 2,4-DNP e rompidas por congelamento. Os dados são as médias  $\pm$  erro padrão de (3-4) preparações mitocondriais independentes. (\*) valores que diferem estatisticamente dos valores dos controles, identificados por meio de análise de variância com teste Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho permitem concluir que a sibutramina reduz a eficiência da transdução de energia na mitocôndria mediante uma atividade desacopladora. Em doses terapêuticas, a sibutramina não apresentou até o presente, efeitos pronunciados como desacoplador, entretanto, em casos de overdose, a toxicidade desta droga poderia ser explicada, pelo menos em parte, pelo seu efeito sobre o metabolismo energético mitocondrial.

## REFERÊNCIAS

- BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. São Paulo: Manole, p. 227-247, 2003.
- CONNOLLEY, I. P. Thermogenic effects of sibutramina and its metabolites. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 1487-1495, 1999.
- CRONFLI, R. T. Obesidade. In: BENSEÑOR, I. M.; ATTA, J. A.; MARTINS, M. de A. **Semiologia clínica**. São Paulo: Savier, p. 291-302, 2002.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUQUE, C. A.; REY, J. A. The discovery and status of sibutramine as an anti-obesity drug. **European Journal of Pharmacology**, v. 440, p. 119-128, 2002.
- PULLMAN, M. E. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphate. **J Biol Chem**, v. 235 p. 3322-3329, 1960.
- SILVA, P. Obesidade. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 1248-1251, 2006.
- VOSS, D. O.; CAMPELLO, A. P.; BACILA, M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brains mitochondria. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 4, n. 1, p. 48-51, 1961.