

EFEITOS DA ANFOTERICINA B SOBRE A RESPIRAÇÃO E A GLICÓLISE ANAERÓBICA DO DIAFRAGMA ISOLADO DE CAMUNDONGO

Ulysses M. SANTOS (1)

RESUMO

O autor estudou a ação da anfotericina B (Fungizone Squibb) sobre a respiração e a glicólise anaeróbica do diafragma isolado de camundongo. A anfotericina B inibiu este fenômeno biológico na concentração de 100, 10 e 5 microgramas deste antibiótico por volume final do sistema usado. Sistema para a respiração: Diafragma colocado em frasco de Warburg com Ringer-fosfato, pH = 7,4, 2,5 ml contendo glicose na concentração final de 0,01 M; 0,2 ml de solução de anfotericina B (contendo ou 5, ou 10, ou 100 μ g de anfotericina B); 0,15 ml de solução a 20% de KOH; — T = 37°C. 90-100 agitações por minuto. Sistema para glicólise anaeróbica: Diafragma isolado de camundongo colocado em frasco de Warburg contendo Ringer-bicarbonato com glicose na concentração final de 0,01 M; 0,2 ml de anfotericina B em solução; 90-100 agitações por minuto. T = 37°C.

INTRODUÇÃO

O mecanismo de ação da anfotericina B em relação à sua atuação contra leishmanioses ainda não está bem esclarecido, apesar de se saber que ela atua inibindo a respiração e a glicólise anaeróbica da *Leishmania*, bem como do *Trypanosoma cruzi* (SANTOS⁵), além da inibição da desidrogenase succínica de fígado de rata e sua recuperação pelo glutatión (SANTOS⁴).

Neste trabalho propomo-nos a verificar a ação deste potente antibiótico sobre a respiração e a glicólise anaeróbica do diafragma isolado de camundongo, procurando seguir a orientação de MEDINA & col.³, quando trabalharam neste assunto em relação aos antimoniais.

MATERIAL E MÉTODOS

Os diafragmas eram obtidos de camundongos albinos segundo a técnica seguida por BACILA & BARRON. Durante a operação da obtenção destes diafragmas, os mesmos eram lavados continuamente com Ringer-fosfato, pH = 7,4, gelado (4°C). Logo após o término das experiências manométricas, os diafragmas eram lavados em água desmineralizada e o seu peso seco determinado em estufa a 110-120°C, em cápsulas de porcelana, durante 20 a 24 horas.

Ringer-fosfato foi preparado, segundo modificação de BARRON *et al.*¹, da solução original de KREBS-HELSELEIT², da maneira seguinte: Ringer, 876 ml de solução de NaCl 0,154 M; 26 ml de solução de KCl 0,154 M;

Trabalho iniciado no Instituto de Bioquímica da Universidade do Paraná (Diretor: Prof. Dr. Metry Bacila), e concluído no Laboratório de Bioquímica do Centro de Pesquisas de Belo Horizonte (Diretor: Dr. Marcelo V. Coelho) do Instituto Nacional de Endemias Rurais, em colaboração com a Cátedra de Química Orgânica e Biológica (Prof. Dr. Aluisio Pimenta) da Faculdade de Filosofia da Universidade de Minas Gerais.

(1) Assistente de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade de Minas Gerais e Chefe do Laboratório de Bioquímica do Centro de Pesquisas de Belo Horizonte, do Instituto Nacional de Endemias Rurais — Belo Horizonte, Minas Gerais.

10 ml de solução de CaCl_2 0,110 M; 5 ml de solução de MgSO_4 0,154 M. A 80 ml desta solução foram adicionados 20 ml de tampão fosfato 0,1 M, $\text{pH} = 7,48$.

Para respiração do diafragma isolado de camundongos usamos a solução de Ringer-fosfato, $\text{pH} = 7,4$. Porém, para a glicólise anaeróbica usamos Ringer-bicarbonato (80 ml de Ringer preparada anteriormente + 20 ml de solução de NaHCO_3 0,154 M), gaseificado com $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (95:5%), durante 10 minutos e contendo glicose na concentração final de 0,01 M.

Substâncias químicas pró análise foram usadas neste trabalho e a glicólise anaeróbica e a respiração do diafragma isolado de camundongo foram determinados pelas técnicas gasométricas da Respirometria Convencional de Warburg.

RESULTADOS

Os resultados abaixo inseridos em gráficos são a média de 5 (cinco) experiências realizadas.

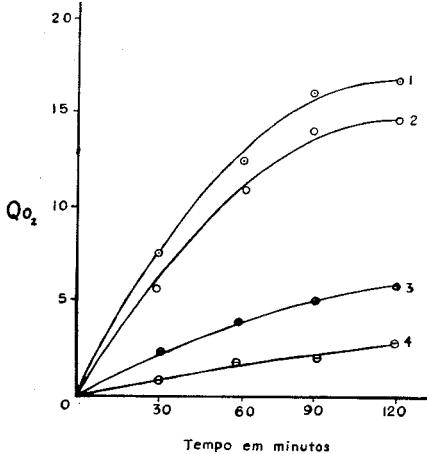


Fig. 1 — Efeitos da anfotericina B sobre a respiração do diafragma isolado de camundongo. Sistema: diafragma de camundongos colocados em frascos de Warburg contendo 2,5 ml de Ringer-fosfato ($\text{pH}=7,4$), contendo glicose dissolvida na concentração final de 0,01 M; 0,2 ml da solução do inibidor (contendo ou 5 ou 10 ou 100 μg de anfotericina B); 0,15 ml de solução de KOH a 20%. $T=37^\circ\text{C}$. 90-100 agitações por minuto. (1) controle; (2) 5 μg de anfotericina B; (3) 10 μg de anfotericina B e (4) 100 μg de anfotericina B.

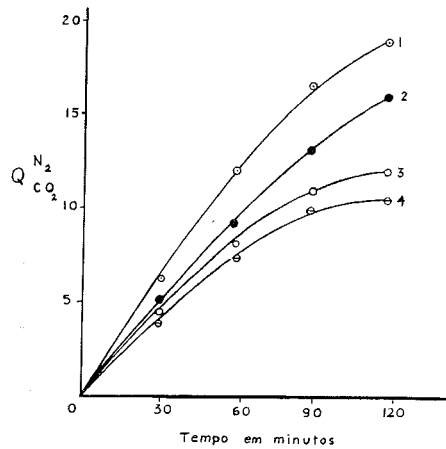


Fig. 2 — Efeito da anfotericina B sobre a glicólise anaeróbica do diafragma isolado de camundongo. Sistema: diafragmas isolados colocados em frascos de Warburg contendo 2,5 ml de Ringer-bicarbonato e tendo glicose dissolvida na concentração final de 0,01 M; 0,2 ml da solução do inibidor (contendo ou 5 ou 10 ou 100 μg de anfotericina B). 90-100 agitações por minuto. $T=37^\circ\text{C}$. (1) controle; (2) 5 μg de anfotericina B; (3) 10 μg de anfotericina B e (4) 100 μg de anfotericina B.

COMENTARIOS E CONCLUSÕES

Pelos resultados inscritos nos dois gráficos verificamos que realmente a anfotericina atua sobre a respiração e a glicólise anaeróbica do diafragma isolado de camundongos nas concentrações de 100, 10 e 5 μg no sistema usado. Foram inicialmente realizadas experiências usando-se até a concentração de 1.000 μg por volume final do sistema. Não as incluímos por julgarmos desnecessárias, neste trabalho.

Infelizmente, não foram realizadas outras experiências no sentido de verificar-se se doses mínimas do antibiótico ativam a respiração e a glicólise anaeróbica do diafragma isolado de camundongos. Mas, isto já está sendo feito no Laboratório de Bioquímica do Centro de Pesquisas de Belo Horizonte do Instituto Nacional de Endemias Rurais, em colaboração com a Cátedra de Química Orgânica da Faculdade de Filosofia da Universidade de Minas Gerais, bem como a verificação da penetração da anfotericina B nos tecidos.

Após a verificação da ação da anfotericina B sobre alguns tripanosomídeos dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, mostrando que ela atua sobre estes letalmente "in vitro" e "in vivo", inclusive que atua sobre a desidrogenase succínica do fígado de rata, inibindo-a e, também, sendo recuperada pelo glutatión, e tendo encontrado a confirmação da inibição do antibiótico sobre a respiração e glicólise anaeróbica do diafragma isolado de camundongo, tudo nos leva a afirmar a possibilidade de ser a anfotericina B um inibidor de enzimas de grupamentos -SH dependentes, por ser um agente mercaptídeo formador.

Em comparação com a inibição pelos antimoniais da respiração e glicólise anaeróbica do diafragma isolado de camundongo verificamos que a anfotericina B inibe estes processos bioquímicos em concentrações várias vezes menores. Isto na prática é de grande significação, principalmente em se tratando de substâncias tóxicas, quando estas são usadas na terapêutica em larga escala como sói acontecer com os antimoniais e agora com a anfotericina B nas leishmanioses tegumentar e visceral, além de seu largo emprêgo em micologia.

SUMMARY

Effects of amphotericin B upon respiration and anaerobic glycolysis of the diaphragms isolated from mice.

The author studied the action of amphotericin B (Fungizone Squibb) on the respiration and on the anaerobic glycolysis of isolated diaphragms of mice. The amphotericin B inhibited this biological phenomenon in the concentration of 100, 10 and 5 micrograms of this antibiotic in the con-

centration used in the system. System used for the respiration: Diaphragm placed in the Warburg flasks with Ringer-phosphate (pH=7.4) 2.5 ml with glucose in final concentrations of 0.01 M; 0.2 ml of amphotericin B solution (with either 5, or 10, or 100 micrograms of amphotericin B); 0.15 ml of KOH solution at 20%; temperature = 37°C; 90-100 shakings per minute. System used for the anaerobic glycolysis: isolated diaphragm of mouse placed in Warburg flasks with Ringer-bicarbonate containing glucose in final concentration of 0.01 M; amphotericin B solution 0.2 ml; temperature = 37°C; 90-100 shakings per minute.

REFERÊNCIAS

1. BARRON, E. S. G.; MEYER, J. & MILLER, Z. B. — Metabolism of skin: effect of vesicant agents. J. invest. Dermatol. 11:97-118, 1948.
2. KREBS, H. A. & HENSELEIT, K. — Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Ztschr. f. physiol. Chemie 210:33-66, 1932.
3. MEDINA, H.; SLOBODIAN, E.; AMARAL, D.; VOSS, D. O. & BACILA, M. — Efeitos dos antimoniais sobre a glicólise anaeróbica e a respiração da *Leishmania brasiliensis*, Vianna 1911, e do diafragma isolado de camundongo. Arq. Biol. & Tecnol. 10:121-132, 1955.
4. SANTOS, U. M. — Efeitos da anfotericina B sobre a desidrogenase succínica. Trabalho apresentado ao VII Congr. brasil. Farm., Recife, 1961.
5. SANTOS, U. M. — Efeitos da anfotericina B sobre tripanosomídeos. III. Inibição da respiração e glicólise anaeróbica. Trabalho apresentado ao VII Congr. brasil. Farm., Recife, 1961.

Recebido para publicação em 6 julho 1962.