

A Cardioplipina é o Alvo da Cardiotoxicidade dos Anestésicos Locais?

XiaoFeng Shen¹, FuZhou Wang, TSA², ShiQin Xu³, YanNing Qian, TSA⁴, YuSheng Liu⁵, HongMei Yuan⁶, QingSong Zhao⁶, ShanWu Feng⁵, XiRong Guo, TSA⁷, JianGuo Xu, TSA⁸, Jie Yang, TSA⁹

Resumo: Shen X, Wang F, Xu S, Qiang Y, Liu Y, Yuan H, Zhao Q, Feng S, Guo X, Xu J, Yang J – A Cardioplipina é o Alvo da Toxicidade dos Anestésicos Locais?

Justificativa e objetivos: Os anestésicos locais são amplamente utilizados na prevenção ou na reversão de dor aguda e no tratamento de dor crônica. A reação de cardiotoxicidade induzida pelos anestésicos locais é um evento acidental sem terapia farmacológica, exceto a infusão de intralípidos relatados recentemente cujo mecanismo de ação ainda não é bem compreendido.

Conteúdo: A cardioplipina, um fosfolípido aniônico, desempenha papel relevante na determinação de reação respiratória mitocondrial, metabolismo de ácidos graxos e apoptose celular. A disfunção do metabolismo energético mitocondrial é sugerida em associação com a cardiotoxicidade dos anestésicos locais, a partir de um estudo *in vitro* de que ela talvez se deva a fortes ligações eletrostáticas entre os anestésicos locais e a cardioplipina na membrana mitocondrial. Não há, contudo, evidência experimental. Portanto, levantamos a hipótese de que as interações anestésico-cardioplipina sejam o principal determinante associado à reação de cardiotoxicidade, o que pode ser estabelecido com a adoção de métodos teóricos e biológicos estruturais. Esse modelo de interação nos daria uma pista sobre o mecanismo da cardiotoxicidade dos anestésicos locais, visando a futuras pesquisas na área de desenvolvimento de fármacos de prevenção a esse evento na prática clínica.

Conclusões: A interação entre a cardioplipina mitocondrial e os anestésicos locais pode ser a principal fonte de sua cardiotoxicidade, em função de seus efeitos sobre o metabolismo energético e o estado eletrostático.

Unitermos: ANESTÉSICOS, Local; CARDIOLIPINA; COMPLICAÇÕES, Arritmias; cardíacas, parada cardíaca, induzida.

Suporte Financeiro: Este estudo foi parcialmente financiado pelo Science and Technology Development of Nanjing Medical University (07NMUM065, 08NMUZ033) e pelo National Natural Science Fund of China (NSFC, 30901397) to FW.

[Rev Bras Anesthesiol 2010;60(4): 445-454] ©Elsevier Editora Ltda.

Recebido do Department of Anesthesiology, Affiliated Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University e State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing, China.

1. Professor; Diretor do Departamento de Anestesiologia do Affiliated Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University.
2. Doutor; Palestrante Sênior, Consultor de Pesquisa; Affiliated Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University; State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University.
3. Professor Associado; Anestesiologista do Affiliated Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University.
4. Professor; Copresidente da Associação de Anestesiologia de Jiangsu; Departamento de Anestesiologia, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University.
5. Anestesiologista, Palestrante; Affiliated Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University.
6. Estudante do Affiliated Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University.
7. Professor; Presidente do Instituto de Pediatria; the Affiliated Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University.
8. Professor; Copresidente da Associação Chinesa de Anestesiologia; Departamento de Anestesiologia, Jingling Hospital, Medical School of Nanjing University.
9. Professor – Diretor do Departamento de Bioinformática; State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University.

Submetido em 1 de outubro de 2009.

Aprovado para publicação em 18 de março de 2010.

Endereço para correspondência:

Dr. FuZhou Wang
Department of Anesthesiology
Affiliated Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital
Nanjing Medical University, 123
Tianfei Xiang, Mochou Road
Nanjing 210004 – China
E-mail: zfwang50@njmu.edu.cn

INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais representam a maior contribuição da Anestesiologia moderna. Entretanto, a cardiotoxicidade associada aos anestésicos locais é uma grande preocupação, pois causa bloqueio atrioventricular e assistolia, com grande risco à vida do paciente. Enquanto diversos relatos têm proporcionado uma visão promissora em relação à reanimação pós-acidental da cardiotoxicidade com intralípidos¹⁻⁶, ainda existem debates a respeito desse assunto controverso⁷⁻¹². Tudo isso se deve, principalmente, à falta de conhecimento dos mecanismos dos anestésicos locais nos miócitos cardíacos.

A cadeia respiratória mitocondrial é o centro do metabolismo energético nas atividades celulares, por meio da síntese de trifosfato de adenosina (ATP) pela fosforilação oxidativa, o qual é alterado, bloqueado ou destruído em várias condições patológicas. As evidências revelam que os anestésicos locais apresentam diversos efeitos na fosforilação oxidativa mitocondrial, amplamente dependente de sua estrutura química. Embora se tenha encontrado essa associação entre os anestésicos locais, o papel exato dos anestésicos locais na fosforilação oxidativa mitocondrial cardíaca ainda é desconhecido. Já que a cardiotoxicidade dos anestésicos locais

é o ponto principal de sua toxicidade sistêmica, é necessário investigar os mecanismos potenciais dos anestésicos locais nas mitocôndrias dos miócitos cardíacos.

A cardiolipina, um fosfolípido treta-acil único, inicialmente isolado no coração bovino no início da década de 1940, encontra-se quase exclusivamente na membrana mitocondrial interna, onde é essencial para a função ótima de numerosas enzimas envolvidas no metabolismo energético mitocondrial²⁵. Alterações no conteúdo e/ou estrutura da cardiolipina têm sido reportadas em diversos tecidos, em vários estados patológicos, como síndrome de Barth, isquemia e reperfusão, envelhecimento, estado da tireoide, insuficiência cardíaca, doença neurodegenerativa, deficiência dietética 18:2, alcoolismo crônico e diabetes (para maiores detalhes, veja a Revisão nº 26 da bibliografia). Önyüksel e col. provaram que a bupivacaína, mas não a lidocaína, interage ávida e seletivamente com pequenos lipossomos unilamelares biomiméticos que contêm cardiolipina, o que altera sua integridade e sugere que essa interação é parcialmente responsável pela cardiotoxicidade da bupivacaína²⁷. Cardiolipina é o principal mediador do metabolismo mitocondrial²⁵. Considerando alguns relatos recentes da reanimação bem-sucedida após administração endovenosa inadvertida de anestésicos locais usando emulsão de intralípidos, propomos que a cardiolipina desempenha papel essencial na cardiotoxicidade dos anestésicos locais.

Assim, lançamos a hipótese de que a interação anestésico local-cardiolipina é o mecanismo fundamental responsável pela cardiotoxicidade considerando métodos computacionais.

Cardiotoxicidade dos anestésicos locais

As principais manifestações clínicas das reações de toxicidade sistêmica dos anestésicos locais seguem o aumento dos níveis sanguíneos desses fármacos²⁸⁻³⁰. Inicialmente, são descritos sintomas de excitação do sistema nervoso central (SNC), incluindo gosto metálico, zumbido nos ouvidos ou formigamento perioral. Aos poucos, surgem espasmos musculares periféricos, seguidos de convulsões, coma e insuficiência respiratória; e, finalmente, arritmias cardíacas, hipotensão arterial, colapso cardiovascular e sístole.

A cardiotoxicidade é o foco das reações sistêmicas associadas aos anestésicos locais notadamente devido aos insucessos de reanimação após tais eventos de intoxicação. Em virtude de limitações éticas, é praticamente impossível realizar estudos clínicos em grande escala para esclarecer a associação precisa entre cardiotoxicidade e anestésicos locais. Portanto, relatos de casos e séries de casos representam a principal fonte sobre o prognóstico e a frequência desses eventos. Houve diversos relatos de casos de parada cardíaca e assistolia ventricular após toxicidade sistêmica decorrente da administração de anestésicos locais, e um grande número estava relacionado com reanimação difícil, especialmente na população obstétrica^{31,32}. Nesses pacientes, usou-se até mesmo circulação extracorpórea³³. Recentemente, ocorreram diversos casos de reanimação bem-sucedida com a emulsão de lípidos^{1,4,5}, e seu real

papel na redução da mortalidade foi amplamente discutido⁷⁻¹². Até o momento, a utilização de anestésicos locais ainda não é um assunto otimista para pacientes e médicos, especialmente as amidas lipofílicas, em casos de injeção endovenosa acidental ou de uma dose elevada absorvida pelo sangue que atinge níveis tóxicos.

Na realidade, é difícil avaliar a frequência da cardiotoxicidade dos anestésicos locais devido à falta de estudos em grande escala bem como baseados em evidências. Um método teórico criado por Hanley e Lippman-Hand pode estimar o risco de um evento acidental, o que não foi feito em séries prospectivas³⁴. O limite superior da probabilidade prevista com um intervalo de confiança de 95% (IC95%) unilateral foi de três para n , em que n é o número de observações sem evento adverso. Por exemplo, se $n = 60$, o risco máximo de cardiotoxicidade após uma reação sistêmica tóxica seria de 5%.

Com relação ao prognóstico sombrio da toxicidade dos anestésicos locais, combinado com a dificuldade de prever a frequência do surgimento, é necessário realizar estudos sobre os mecanismos da interação dos anestésicos locais e reações de cardiotoxicidade. Além disso, métodos teóricos e computacionais podem ser a melhor alternativa quando há restrição dos estudos clínicos.

A cardiolipina e a mitocôndria

A cardiolipina desempenha importante papel na estabilização da membrana, formação de supercomplexos de proteína e funcionamento da cadeia respiratória. A cardiolipina é necessária para o processo de transferência de elétrons nos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial e para a organização estrutural dos complexos III e IV em um supercomplexo. Ela estabiliza os supercomplexos, assim como os complexos individuais, sendo necessária para prevenir a formação do estado de repouso de citocromo c oxidase na membrana. A cardiolipina funciona como um efector da atividade do citocromo p-450 mitocondrial³⁵ e pode contribuir para a eficiência da fosforilação oxidativa por meio da distância que o citocromo c deve percorrer entre os complexos III e IV, assim como colocar o carreador de ADP/ATP (AAC) em um ambiente que promove sua atividade ótima³⁶. Além disso, a nova via de sinalização mitocôndria-vacúolo é mediada pela síntese de cardiolipina³⁷. A creatina quinase mitocondrial, uma enzima hidrossolúvel octâmero-dímero ligada ao lado citoplasmático da membrana mitocondrial interna, exerce sua função por meio da ligação à cardiolipina³⁸. Considerando-se tudo isso, a cardiolipina tem sido considerada o centro do metabolismo mitocondrial, pela importância do conteúdo de cardiolipina e a presença em várias doenças, como o diabetes e a insuficiência cardíaca^{25,39,40}. Tal papel promove a necessidade de investigar detidamente a cardiolipina em caso de pacientes com doença mitocondrial de origem desconhecida, uma vez que anormalidades nessa substância podem representar a principal causa.

Anestésicos locais e a mitocôndria

Em mitocôndrias isoladas *in vitro* os anestésicos locais apresentam diversos efeitos na fosforilação oxidativa, dependendo de sua estrutura química, incluindo a inibição do transporte de elétrons^{13,14} e (F1) ATPase¹⁵⁻¹⁷, afetando o transporte de íons, como o Ca^{2+} ¹⁸⁻²¹, e causando desacoplamento^{22,23}. Terada e col. observaram que a ação da bupivacaína na mitocôndria se dá, principalmente, por meio da aceleração do estágio quatro da respiração, ativando a ATPase sem a dissipação do próton eletroquímico potencial onde há falta de ânions hidrofóbicos, ou seja, uma ação de desacoplamento mas sem desacoplamento²⁴. A lipossolubilidade⁴¹, mas não o efeito de estereoespecificidade⁴² dos anestésicos locais, determina seus efeitos na função bioenergética da mitocôndria. A ropivacaína tem menos potência do que a bupivacaína na função bioenergética da mitocôndria, devido à menor lipossolubilidade comparada à bupivacaína na mitocôndria isolada do coração do rato e em fibras ventriculares permeabilizadas por saponina e essa alteração do metabolismo energético da bupivacaína pode ser aumentada na existência de hipóxia crônica⁴³.

Em células em cultura, os anestésicos locais podem alcançar a mitocôndria e reduzir de forma reversível, ou até mesmo levar ao colapso, seu potencial transmembrana⁴⁴. A alteração da homeostasia do Ca^{2+} *in vivo* tem sido apontada como fator contribuinte para a toxicidade da bupivacaína^{45,46}. Além disso, a disfunção mitocondrial resulta na depleção de ATP⁴⁷ e, por sua vez, espera-se que tenha maior impacto na homeostasia intracelular de Ca^{2+} ⁴⁸. Além disso, o metabolismo oxidativo ativo é um determinante essencial na toxicidade da bupivacaína. A miotoxicidade da bupivacaína é modelo relevante para a disfunção mitocondrial envolvendo o poro de transição de permeabilidade (PTP), um canal da membrana interna sensível à ciclosporina A que desempenha papel relevante em muitos tipos de morte celular, e para a desregulação do Ca^{2+} . Isso representa um sistema promissor para testar novos inibidores do PTP que podem ser relevantes em miopatias espontâneas nas quais, há muito, se suspeita da importância da mitocôndria⁴⁹. Os anestésicos locais de longa duração induzem efeitos inotrópico e lusitrópico negativo nos miócitos cardíacos e esse efeito decorre, principalmente, da deficiência na manutenção do cálcio⁵⁰. Na homeostasia do Ca^{2+} , anestésicos locais diferentes apresentam níveis diferentes; a bupivacaína, a levobupivacaína e a ropivacaína podem induzir efeito deletério na energia mitocondrial, embora a levobupivacaína altere ao máximo a homeostasia do Ca^{2+} ⁵¹.

Além disso, a via apoptótica mitocondrial foi considerada parte essencial na cardiotoxicidade dos anestésicos locais. O edema mitocondrial e a oxidação do grupo tiol das proteínas da membrana estão associados à ativação do PTP, o qual é inibido pelos anestésicos locais⁵². A fragmentação do DNA e a formação em escada desses fragmentos – uma característica típica da apoptose – são induzidas pela dibucaina na metade da concentração de 100 μ M, e esses efeitos são completamente prevenidos pelo inibidor não específico da caspase z-Val-Ala-Asp-(OMe)-fluoroetil cetona, o que im-

plica a ativação da caspase nesse processo⁵³. A apoptose induzida pela lidocaína também está associada com as vias mitocondriais das caspases⁵⁴. A interação entre anestésicos locais, ativação da caspase, apoptose e reação cardíaca tóxica ainda precisa ser confirmada por estudos adicionais.

Relatos recentes^{1-6,55} da ressuscitação bem-sucedida do colapso cardíaco induzido por anestésicos locais com emulsão de lipídios propuseram que o metabolismo lipídico pode ter papel crucial, explicando, parcialmente, os mecanismos dessa reanimação. Demonstrou-se que o metabolismo dos ácidos graxos predispõe o coração isolado à toxicidade causada pela bupivacaína, confirmando que os anestésicos locais exercem efeitos específicos nos processos lipídicos em miócitos cardíacos⁵⁶. Como as mitocôndrias são o principal compartimento do metabolismo lipídico nas células vivas e a ativação dos ácidos graxos como etapa obrigatória do seu metabolismo ocorre parcialmente na membrana mitocondrial externa (para os ácidos graxos de cadeia longa) ou na matriz mitocondrial (para ácidos graxos de cadeia média), o metabolismo anormal dos ácidos graxos nas mitocôndrias cardíacas após super dosagem de anestésicos locais deve ser explorado em profundidade.

Anestésicos locais e cardiolipina

Como já descrito, tem-se reconhecido a cardiolipina como o principal mediador da fosforilação oxidativa mitocondrial³⁵⁻³⁸, do metabolismo dos fosfolipídios⁵⁷⁻⁵⁹ e da apoptose celular^{60,61}. O estudo *in vitro* observou que a bupivacaína interage seletivamente com pequenos lipossomos biomiméticos unilamelar contendo cardiolipina, destruindo sua integridade e sugerindo que a interação bupivacaína-cardiolipina pode ser o mecanismo responsável pela cardiotoxicidade desse fármaco²⁷. Além dessa implicação, outros estudos provaram, indiretamente, que (i) os lipossomos aniônicos peguados (minúsculas esferas de gordura revestidas por uma substância química denominada polietilenoglicol) exibem grande afinidade para a bupivacaína¹, (ii) lipossomos contendo cardiolipina têm propriedade de fluidez da membrana⁶², (iii) anestésicos locais aceleram a hidrossolubilidade ao desestabilizar a estrutura da membrana e esse efeito é governado pela hidrofobicidade desses fármacos⁶⁴ e (iv) uma concentração mínima da Ca^{2+} é necessária para a fusão de vesículas grandes (0,1 μ m) unilamelares cardiolipina-fosfatidilcolina (1:1) monitoradas pelo turbilhonamento do conteúdo aquoso⁶⁴. Atualmente, os anestésicos locais são utilizados como compostos modelo na investigação *in vitro* do mecanismo da liberação de fármacos de suspensões de óleo⁶⁵, enquanto a cardiotoxicidade desses fármacos evocada pela interação com a cardiolipina mitocondrial ainda é desconhecida. Além disso, ainda é necessário explorar mais a fundo, em estudos experimentais e modelos teóricos, para confirmar se essa interação em tese entre os anestésicos locais e a cardiolipina desempenha papel importante na cardiotoxicidade desses fármacos.

Hipótese – o modelo de interação entre cardioplipina e anestésicos locais

O modelo de interação estabelecido com a adoção de teorias computacionais tem-se tornado uma das ferramentas mais importantes na biologia teórica. Modelos relacionados à interação com a cardioplipina têm sido desenvolvidos de modo a investigar os efeitos dessa substância na estrutura de membranas lipídicas duplas com simulações computacionais dinâmicas ⁶⁶, na formação do complexo citocromo c-cardioplipina pela força iônica ⁶⁷, nos modelos matemáticos do padrão de formação molecular da cardioplipina mitocondrial ⁵⁸ e o papel da blindagem eletrostática na sequência Bax-alfa1 interage com as membranas mitocondriais ⁶⁸. Enquanto numerosos modelos de cardioplipina foram desenvolvidos, o modelo da interação dos anestésicos locais com a cardioplipina ainda não foi estabelecido, especialmente ao se discutirem os efeitos negativos desses fármacos na atividade cardíaca.

Muhonen e col. estudaram as interações entre os anestésicos locais e a dispersão de lipídios usando cromatografia eletrocinética capilar (MECC) de lipossomo e observaram que todos os anestésicos investigados (bupivacaína, lidocaína e prilocaína) que se ligavam a moléculas da cardioplipina com carga negativa nos lipossomos por meio de forças eletrostáticas não mais podiam ser liberados das partículas intralipídicas ⁶⁹. Todavia, ainda não se conhece a exata relação de interação entre os anestésicos locais e a cardioplipina. Métodos utilizados em biologia computacional, como atracamento e empacotamento molecular, relacionamentos quantitativo estrutura-atividade (QSAR), abordagem de *simulated annealing* de Monte Carlo, bioinformática estrutural, modelamento farmacóforo e predição de sinalização de peptídeo, entre outros, podem fornecer bioinformação sobre interações molécula-molécula correspondentes. Assim, formulamos a hipótese de que o modelo de interação entre os anestésicos locais e a cardioplipina apresenta papel relevante na determinação de sua cardiotoxicidade e que esse modelo pode ser desenvolvido com os métodos mencionados para prever a cardiotoxicidade dos anestésicos locais, se existirem.

CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

A cardiotoxicidade dos anestésicos não é causada apenas pela injeção intravascular acidental, mas também pela duração sustentada e prolongada da anestesia local ⁷⁰. A forma de reduzir ou prevenir essa cardiotoxicidade é assunto essencial para os profissionais que usam, rotineiramente, os anestésicos locais. No entanto, sob condições de estratégias preventivas eficazes em diretrizes estritas, a confiabilidade e segurança de fármacos utilizados na reanimação e reversão da cardiotoxicidade são muito importantes se houver um acidente. É preciso, ainda, ter um entendimento detalhado e claro dos mecanismos da cardiotoxicidade dos anestésicos locais.

Em virtude dos relatos recentes de ressuscitações bem-sucedidas com a administração de intralipídios ¹⁻⁶, associados a fatos importantes da disfunção mitocondrial na cardiotoxicidade

dos anestésicos locais ^{13-24,44-51} e ao papel fundamental da cardioplipina no funcionamento mitocondrial ³⁵⁻⁴⁰, propomos que a interação entre os anestésicos locais e a cardioplipina determina o efeito tóxico desses fármacos nos miócitos cardíacos, interferindo no metabolismo energético mitocondrial. Esse modelo de interação pode ser produzido com métodos de biologia teórica e estrutural, fornecendo pistas para o desenvolvimento de fármacos destinados ao tratamento desses eventos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à sra. Mrs. YuFeng Wang, MA, Bibliotecária Sênior e Arquivista Literária na Biblioteca da Southeast University Medical School, Nanjing, China, por sua ajuda na pesquisa de literatura.

REFERÊNCIAS / REFERENCES

- Howell BA, Chauhan A – Bupivacaine binding to pegylated liposomes. *Anesth Analg*, 2009;109:678-682.
- Clark MK – Lipid emulsion as rescue for local anesthetic-related cardiotoxicity. *J Perianesth Nurs* 2008; 23:111-117.
- Mazoit JX, Le Guen R, Beloeil H et al. – Binding of long-lasting local anesthetics to lipid emulsions. *Anesthesiology*, 2009;110:380-386.
- McCutchen T, Gerancher JC – Early intralipid therapy may have prevented bupivacaine-associated cardiac arrest. *Reg Anesth Pain Med*, 2008;33:178-180.
- Sirianni AJ, Osterhoudt KC, Calello DP et al. – Use of lipid emulsion in the resuscitation of a patient with prolonged cardiovascular collapse after overdose of bupropion and lamotrigine. *Ann Emerg Med* 2008; 51:412-415.
- Felice K, Schumann H – Intravenous lipid emulsion for local anesthetic toxicity: a review of the literature. *J Med Toxicol* 2008; 4:184-191.
- Leski U, Weinberg GL – Lipid resuscitation for local anesthetic toxicity: is it really lifesaving? *Curr Opin Anaesthesiol*, 2009; 22:667-671
- Marwick PC, Levin AI, Coetzee AR – Recurrence of cardiotoxicity after lipid rescue from bupivacaine-induced cardiac arrest. *Anesth Analg*, 2009;108:1344-1346.
- Weinberg GL – Limits to lipid in the literature and lab: what we know, what we don't know. *Anesth Analg*, 2009;108:1062-1064.
- Hicks SD, Salcido DD, Logue ES et al. – Lipid emulsion combined with epinephrine and vasopressin does not improve survival in a swine model of bupivacaine-induced cardiac arrest. *Anesthesiology*, 2009;111:138-146.
- de Jong RH – Lipid infusion for cardiotoxicity: promise? Yes-panacea? *Not. Anesthesiology*, 2007;106:635-636.
- Mather LE, Chang DH – Cardiotoxicity with modern local anaesthetics: is there a safer choice? *Drugs*, 2001;61:333-342.
- Vanderkooi G, Chazotte B, Biethman R – Temperature dependence of anesthetic effects on succinate oxidase activity in uncoupled submitochondrial particles. *FEBS Lett*, 1978;90:21-23.
- Chazotte B, Vanderkooi G – Multiple sites of inhibition of mitochondrial electron transport by local anesthetics. *Biochim Biophys Acta* 1981;636:153-161.
- Saeki H, Nozawa Y, Shimonaka H et al. – Effects of anesthetics, dibucaine and methoxyflurane on the ATPase activity and physical state of Tetrahymena surface membranes. *Biochem Pharmacol*, 1979;28:1095-1098.
- Vanderkooi G, Shaw J, Storms C et al. – On the mechanism of action of anesthetics. Direct inhibition of mitochondrial F1-ATPase by n-butanol and tetracaine. *Biochim Biophys Acta*, 1981; 636:200-203.

17. Adade AB, O'Brien KL, Vanderkooi G – Temperature dependence and mechanism of local anesthetic effects on mitochondrial adenosinetriphosphatase. *Biochemistry*, 1987;26:7297-7303.
18. Azzi A, Scarpa A – Inhibition of K⁺ transport in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1967; 135:1087-1088.
19. Selwyn MJ, Fulton DV, Dawson AP – Inhibition of mitochondrial anion permeability by local anaesthetics. *FEBS Lett*, 1978;96:148-151.
20. Barritt GJ – Inhibition by local anaesthetics of anion transport in isolated rat heart mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 1979;28:1017-1021.
21. Dawson AP, Selwyn MJ, Fulton DV – Inhibition of Ca²⁺ efflux from mitochondria by nupercaine and tetracaine. *Nature*, 1979; 277:484-486.
22. Garlid KD, Nakashima RA – Studies on the mechanism of uncoupling by amine local anesthetics. Evidence for mitochondrial proton transport mediated by lipophilic ion pairs. *J Biol Chem* 1983;258:7974-7980.
23. Dabadie P, Bendriss P, Erny P et al. – Uncoupling effects of local anesthetics on rat liver mitochondria. *FEBS Lett*, 1987;226:77-82.
24. Terada H, Shima O, Yoshida K et al. – Effects of the local anesthetic bupivacaine on oxidative phosphorylation in mitochondria. Change from decoupling to uncoupling by formation of a leakage type ion pathway specific for H⁺ in cooperation with hydrophobic anions. *J Biol Chem*, 1990; 265:7837-7842.
25. Houtkooper RH, Vaz FM – Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2493-2506.
26. Chicco AJ, Sparagna GC – Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007;292:C33-44.
27. Önyüksel H, Sethi V, Weinberg GL et al. – Bupivacaine, but not lidocaine, disrupts cardiolipin-containing small biomimetic unilamellar liposomes. *Chem Biol Interact*, 2007;169:154-159.
28. Mulroy MF – Systemic toxicity and cardiotoxicity from local anesthetics: incidence and preventive measures. *Reg Anesth Pain Med*, 2002;27:556-561.
29. Farid IS, Hernandez-Popp V, Youssef GN et al. – Bupivacaine induces transient neurological symptoms after subarachnoid block. *Pain Pract* 2002;2:53-55.
30. de La Coussaye JE, Aya AG, Eledjam JJ – Neurally-mediated cardiotoxicity of local anesthetics: direct effect of seizures or of local anesthetics? *Anesthesiology*, 2003;98:1295-1296.
31. Gould DB, Aldrete JA – Bupivacaine cardiotoxicity in a patient with renal failure. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1983;27:18-21.
32. Conklin KA, Ziadlou-Rad F – Bupivacaine cardiotoxicity in a pregnant patient with mitral valve prolapse. *Anesthesiology*, 1983;58:596.
33. Soltesz EG, van Pelt F, Byrne JG. – Emergent cardiopulmonary bypass for bupivacaine cardiotoxicity. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2003;17:357-358.
34. Ho AM, Dion PW, Karmakar MK et al. – Estimating with confidence the risk of rare adverse events, including those with observed rates of zero. *Reg Anesth Pain Med*, 2002;27:207-210.
35. Lambeth JD – Cytochrome P-450_{scc}. Cardiolipin as an effector of activity of a mitochondrial cytochrome P-450. *J Biol Chem* 1981; 256:4757-4762.
36. Claypool SM, Oktay Y, Boontheung P et al. – Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*, 2008;182:937-950.
37. Chen S, Tarsio M, Kane PM et al. – Cardiolipin mediates cross-talk between mitochondria and the vacuole. *Mol Biol Cell*, 2008;19:5047-5058.
38. Müller M, Moser R, Cheneval D et al. – Cardiolipin is the membrane receptor for mitochondrial creatine phosphokinase. *J Biol Chem* 1985;260:3839-3843.
39. Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I et al. – Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver: involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 2007;1767:1260-1267.
40. Sparagna GC, Chicco AJ, Murphy RC et al. – Loss of cardiac tetralinoleoyl cardiolipin in human and experimental heart failure. *J Lipid Res*, 2007;48:1559-1570.
41. Sztark F, Malgat M, Dabadie P et al. – Comparison of the effects of bupivacaine and ropivacaine on heart cell mitochondrial bioenergetics. *Anesthesiology*, 1998;88:1340-1349.
42. Sztark F, Nouette-Gaulain K, Malgat M et al. – Absence of stereospecific effects of bupivacaine isomers on heart mitochondrial bioenergetics. *Anesthesiology*, 2000;93:456-462.
43. Nouette-Gaulain K, Forestier F, Malgat M et al. – Effects of bupivacaine on mitochondrial energy metabolism in heart of rats following exposure to chronic hypoxia. *Anesthesiology*, 2002;97:1507-1511.
44. Grouselle M, Tueux O, Dabadie P et al. – Effect of local anaesthetics on mitochondrial membrane potential in living cells. *Biochem J*, 1990;271:269-272.
45. Porter JD, Edney DP, McMahon EJ et al. – Extraocular myotoxicity of the retrobulbar anesthetic bupivacaine hydrochloride. *Investig Ophthalmol Vis Sci*, 1988;29:163-174.
46. Steer JH, Mastaglia FL, Papadimitriou JM et al. – Bupivacaine-induced muscle injury. The role of extracellular calcium. *J Neurol Sci*, 1986;73:205-217.
47. Sztark F, Tueux O, Erny P et al. – Effects of bupivacaine on cellular oxygen consumption and adenine nucleotide metabolism. *Anesth Analg*, 1994;78:335-339.
48. Bernardi P – Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 1999;79:1127-1155.
49. Irwin W, Fontaine E, Agnolucci L et al. – Bupivacaine myotoxicity is mediated by mitochondria. *J Biol Chem* 2002; 277:12221-12227.
50. David JS, Ferreti C, Amour J et al. – Effects of bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine on myocardial relaxation. *Can J Anaesth*, 2007;54:208-217.
51. Nouette-Gaulain K, Sirvent P, Canal-Raffin M et al. – Effects of intermittent femoral nerve injections of bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine on mitochondrial energy metabolism and intracellular calcium homeostasis in rat psoas muscle. *Anesthesiology*, 2007;106:1026-1034.
52. Kowaltowski AJ, Naia-da-Silva ES, Castilho RF et al. – Ca²⁺-stimulated mitochondrial reactive oxygen species generation and permeability transition are inhibited by dibucaine or Mg²⁺. *Arch Biochem Biophys*, 1998;359:77-81.
53. Arita K, Utsumi T, Kato A et al. – Mechanism of dibucaine-induced apoptosis in promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Biochem Pharmacol*, 2000;60:905-915.
54. Werdehausen R, Braun S, Essmann F et al. – Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology*, 2007;107:136-143.
55. Corman SL, Skledar SJ – Use of lipid emulsion to reverse local anesthetic-induced toxicity. *Ann Pharmacother*, 2007;41:1873-1877.
56. Edelman LB, Ripper R, Kelly K et al. – Metabolic context affects hemodynamic response to bupivacaine in the isolated rat heart. *Chem Biol Interact*, 2008;172:48-53.
57. Malhotra A, Xu Y, Ren M et al. – Formation of molecular species of mitochondrial cardiolipin 1. A novel transacylation mechanism to shuttle fatty acids between sn-1 and sn-2 positions of multiple phospholipid species. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:314-320.
58. Schlame M – Formation of molecular species of mitochondrial cardiolipin 2. A mathematical model of pattern formation by phospholipid transacylation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:321-325.
59. Beranek A, Rechberger G, Knauer H et al. – Identification of a cardiolipin-specific phospholipase encoded by the gene CLD1 (YGR110W) in yeast. *J Biol Chem*, 2009;284:11572-11578.
60. Sorice M, Manganelli V, Matarrese P et al. – Cardiolipin-enriched raft-like microdomains are essential activating platforms for apoptotic signals on mitochondria. *FEBS Lett*, 2009;583:2447-2450.
61. Schug ZT, Gottlieb E – Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2009;1788:2022-2031.
62. Takashi T, Inoue K, Nojima S – Immune reactions of liposomes containing cardiolipin and their relation to membrane fluidity. *J Biochem (Tokyo)*, 1980;87:679-685.

63. Shimooka T, Seto S, Terada H – Increase in water permeability of negatively charged liposomal membrane by local anesthetics. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992;40:1880-1882.
64. Wilschut J, Holsappel M, Jansen R – Ca²⁺-induced fusion of cardiolipin/phosphatidylcholine vesicles monitored by mixing of aqueous contents. *Biochim Biophys Acta*, 1982;690:297-301.
65. Larsen SW, Frost AB, Østergaard J et al. – On the mechanism of drug release from oil suspensions in vitro using local anesthetics as model drug compounds. *Eur J Pharm Sci*, 2008;34:37-44.
66. Dahlberg M, Maliniak A – Molecular dynamics simulations of cardiolipin bilayers. *J Phys Chem B*, 2008;112:11655-11663.
67. Sinibaldi F, Fiorucci L, Patriarca A et al. – Insights into cytochrome c-cardiolipin interaction. Role played by ionic strength. *Biochemistry*, 2008;47:6928-6935.
68. Sani MA, Dufourc EJ, Gröbner G – How does the Bax-alpha1 targeting sequence interact with mitochondrial membranes? The role of cardiolipin. *Biochim Biophys Acta*, 2009;1788:623-631.
69. Muhonen J, Holopainen JM, Wiedmer SK – Interactions between local anesthetics and lipid dispersions studied with liposome electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr A*, 2009;1216:3392-3397.
70. Padera R, Bellas E, Tse JY et al. – Local myotoxicity from sustained release of bupivacaine from microparticles. *Anesthesiology*, 2008;108:921-928.