

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Bioquímica Médica

Reinaldo Sousa dos Santos

Efeito da aclimação ao frio sobre o metabolismo mitocondrial e glicolítico do músculo branco de peixes dourados, *Carassius auratus*.

Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de Mestre em Química Biológica

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Reinaldo Sousa dos Santos

Efeito da aclimação ao frio sobre o metabolismo mitocondrial e glicolítico do músculo branco de peixes dourados, *Carassius auratus*.

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química Biológica.

Orientador:
Wagner Seixas da Silva
Professor Adjunto

Co-orientador:
Antonio Galina Filho
Professor Adjunto

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Dos Santos, Reinaldo S.

Efeito da aclimação ao frio sobre o metabolismo mitocondrial e glicolítico do músculo branco de peixes dourados, *Carassius auratus*/Reinaldo Sousa dos Santos – Rio de Janeiro: UFRJ/IBqM, 2009.

Nº páginas: 124

Dissertação – Mestrado em Ciências Biológicas (Química Biológica)

Orientador: Wagner Seixas da Silva Co-orientador: Antonio Galina Filho

1. Metabolismo energético 2. Mitocôndria 3. Hexocinase 4. Aclimação ao frio. I. da Silva, Wagner Seixas; Galina, Antonio. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III. Efeito da aclimação ao frio sobre o metabolismo mitocondrial e glicolítico do músculo branco de peixes dourados, *Carassius auratus*.

Efeito da aclimação ao frio sobre o metabolismo mitocondrial e glicolítico do músculo branco de peixes dourados, *Carassius auratus*.

Reinaldo Sousa dos Santos

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química Biológica.

Banca Examinadora

Dra. Ana Paula Valente
Professor Adjunto/IBqM/UFRJ

Dr. Marcus Fernandes de Oliveira
Professor Adjunto/IBqM/UFRJ

Dra. Denise Pires de Carvalho
Professor Associado/IBCCF/UFRJ

Suplente Interno/Revisor

Dra. Andrea Thompson Da Poian
Professor Associado/IBqM/UFRJ

Suplente Externo

Dr. Marcelo Einicker Lamas
Professor Adjunto/IBCCF/UFRJ

Orientador

Dr. Wagner Seixas da Silva
Professor Adjunto/IBqM/UFRJ

Co-orientador

Dr. Antonio Galina Filho
Professor Adjunto/IBqM/UFRJ

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Bioenergética em conjunto com o Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do professor Wagner Seixas da Silva e co-orientação do professor Antonio Galina Filho, com os auxílios financeiros concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq Edital Universal 15/2007 Processo n.º 485372/2007-0), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ - Auxílio à Pesquisa - E26/170.615/2007).

Resumo

Os peixes são organismos ectotérmicos, cuja temperatura corporal varia de acordo com a do ambiente. A fim de superar os desafios impostos pela exposição a baixas temperaturas, diversas modificações metabólicas acontecem, sobretudo na musculatura esquelética desses animais, durante este processo. O objetivo desta dissertação foi avaliar quais mudanças ocorrem nos metabolismos glicolítico e mitocondrial de músculo branco de peixes dourados aclimatados ao frio (5°C) durante um mês. Enquanto a temperatura do ambiente era diminuída, houve uma queda gradativa na taxa de ventilação dos peixes, que teve um ligeiro aumento durante o restante do período de aclimação. Após a aclimação, a atividade de enzimas mitocondriais (F_0F_1 -ATPase e citrato sintase) foi aumentada em peixes aclimatados ao frio, enquanto enzimas glicolíticas (fosfoglicomutase, piruvato cinase e lactato desidrogenase) não tiveram suas atividades modificadas. Curiosamente, a atividade da enzima hexocinase, uma enzima glicolítica, estava predominantemente localizada nas frações mitocondrial e microssomal, estava aumentada após a aclimação ao frio.

A caracterização da atividade de hexocinase mostrou que esta enzima está localizada principalmente nas frações mitocondrial e microssomal e apresenta parâmetros cinéticos semelhantes à isoenzima tipo II de mamíferos. Ademais, a exposição ao frio promoveu um aumento nas atividades total e específica nas frações particuladas, mas não na citosólica.

O estudo da fisiologia mitocondrial, através da análise dos estados respiratórios, mostrou que a aclimação ao frio causou um aumento no consumo de oxigênio no estado basal e estado 4o (associado ao vazamento de prótons) medidos

com substratos dos complexos I (piruvato e malato) e complexo II (succinato) em mitocôndrias isoladas. Quando medidos em fibras permeabilizadas, o consumo de oxigênio em todos os estados respiratórios estava aumentado nos peixes aclimatados ao frio. Porém, a normalização deste consumo pela atividade da citrato sintase mostrou que apenas o estado basal com succinato e o estado 4o (independentemente do substrato utilizado) foram aumentados pela exposição ao frio, sugerindo um aumento do desacoplamento mitocondrial. A presença de uma proteína desacopladora foi investigada e os resultados preliminares sugerem que o vazamento de H^+ observado é estimulado por ácidos graxos e inibido por BSA_{FFA} e GDP, que são reguladores destas proteínas desacopladoras.

Abstract

Fish are ectothermic organisms, whose body temperature varies according to environmental temperatures. In order to overcome challenges imposed by low temperature exposure, several metabolic changes occur mainly in their skeletal muscles during process. The aim of this work was to evaluate what modifications occur in the goldfish white muscle glycolytic and mitochondrial metabolisms after one month of cold acclimation (5°C). While environmental temperatures was being decreased, there was a gradual falling in the fish ventilation rate, which slightly raised during the remaining acclimation period. After acclimation, mitochondrial enzymes activities (F_0F_1 -ATPase and citrate synthase) were higher in cold acclimated goldfish, whereas glycolytic enzymes (phosphoglucosmutase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase) were unchanged. Curiously, hexokinase activity, a glycolytic enzyme, was increased after cold acclimation.

Characterization of hexokinase activity showed that this enzyme is mainly located in the mitochondrial and microsomal fractions and presents kinetic parameters similar to mammals type II hexokinase. In addition, cold exposure promoted an increase in both total and specific activities in particulate, but not cytosolic fractions.

Mitochondrial physiology study, through respiratory states analysis showed that cold acclimation promoted an increment in the oxygen consumption in basal state and state 4o (proton leak associated) measured with complex I (pyruvate and malate) or complex II (succinate) substrates in isolated mitochondria. When measured in permeabilized fibers, oxygen consumptions in all respiratory states were higher in cold acclimated fish. However, normalization of these oxygen consumption

by the citrate synthase activity indicates that only basal state measured with succinate and state 4_o, independently of substrate used, were raised by cold acclimation, suggesting an increased mitochondrial uncoupling. The presence of an uncoupling protein was investigated and the preliminary results suggest that the H⁺ leak observed is stimulated by fatty acid and inhibited by BSA, ffa and GDP, that are regulators of these uncoupling proteins.

À minha família, sobretudo minha avó, *Dona Rita*, por sempre estar ao meu lado, incentivando-me e fazendo com que eu busque sempre ser uma pessoa melhor!

Aos meus orientadores, que sempre me ensinaram (e ensinam!) muito desde o início desta longa jornada.

Agradecimentos

Agradecer é um momento complicado, pois são tantas pessoas e não quero ser injusto com nenhuma delas. Porém, algumas sempre se fazem mais importante que outras... e é dessas que falo aqui. Mas, é claro que as que não estão também significam muito pra mim! Sendo assim, agradeço:

Primeiramente a Deus pelo Dom da Vida e por estar sempre ao meu lado, guiando-me pelos caminhos mais difíceis e me ajudando a superar todas as barreiras da melhor forma possível.

“Segundamente” à minha família, sem a qual eu nada seria. Principalmente aos meus maiores exemplos de vida e dedicação: meu pai, que já intercede por mim junto ao Papai do céu; minha avó, Dona Rita, por sempre brigar comigo dizendo que é para o meu próprio bem e que um dia vou compreender. Acho que nem sei como agradecer por tudo que você fez e faz por mim; e meu avô, Seu Inácio, pelos muitos “10 centavos” na época da escola e por ainda assistir *Chaves* comigo.

Aos meus irmãos, Jane, Rosa e Adriano, por me fazerem acreditar que unidos somos invencíveis... e somos mesmos!!! Sabemos o quanto é importante essa nossa união.

Aos meus lindos afilhados, Arthur e Luana, por serem a alegria do Dindinho. Ah, e aos afilhados mais “velhinhos”, Carlos Alberto e Karol, por também terem que aturar meus “conselhos”.

Ao meu grande orientador-amigo-incentivador Wagner Seixas da Silva, que há 10 anos tenta me “colocar na linha”. Tudo bem, é mais que isso. Com ele aprendi não apenas Ciência, mas a acreditar no meu potencial e a pensar criticamente. Obrigado pelas broncas (ao estilo *Dona Rita*), dizendo que era para meu próprio bem, e também por ser como um “Pai” para mim. Ah, claro! Valeu mesmo pela oportunidade dada a um “moleque” de 14 anos que acabara de entrar no Ensino Médio. E mais ainda por acreditar em mim em todos os momentos!!! Sem palavras para descrever o quanto você é especial!

Ao meu outro grande orientador, Antonio Galina Filho, vulgo Tonhão, por sempre me ajudar e apoiar nas mais complexas ocasiões. Além, claro, de sempre pedir para adicionar algo mais no experimento. E o melhor é que muitas vezes dá certo!!!

Ao professor Leopoldo de Meis, por ter me dado a chance de saber o que de fato é “Fazer Ciência”, através dos Cursos de Férias, e por sempre acreditar em mim, mesmo quando pareço mais artista que cientista. Seu exemplo é, sem dúvidas, fundamental para o meu crescimento como pessoa e cientista! Obrigado por ter aberto as portas de seu laboratório pra mim.

Aos meus amigos de sempre: Glauce, Emerson, Sthefanie, Arthur, Igor, Bruna, Otacília (Giganta!), Maluquinho, entre outros (tomaria uma página inteira!). Como diz em nossa comunidade do Orkut: Nossa Amizade é para sempre!!!

À Leila, por todo amor, carinho e atenção dispensados durante todo esse tempo que estamos juntos. Obrigado por aturar minhas crises de mau-humor e por me fazer tão feliz!

À Cristiane Monteiro da Cruz, por ser uma amiga tão especial, seja aqui no Rio de Janeiro ou em Estrasburgo (FRA). Nossas longas conversas são sempre muito divertidas. O “Esquilinho” te amadora muito!

À Nádia, Iane, Verônica, Hanninha, Raquelzinha, Priscila, Vanessa, Pedro, Nina (amiga-dentista) e Marianinha, por terem entrado em minha vida e não mais saído dela. Vocês são muito especiais para mim... mesmo que quase não nos vejamos.

Aos amigos de faculdade e, agora, de vida: Fernando, Ana C., Carol, Felipe, Fabiana, Alexandre (Xandoca) e Juliana (Jujuba). Não sei como, mas vocês conseguiram me aturar todos os dias por 4 anos; e ainda conseguem fazê-lo em nossos encontros. Não há prova maior de amizade do que essa! Adoro todos vocês!

A todos os amigos do laboratório de Bioenergética: Paulinho, Elisangela, Luisa, Anderson, José Henrique, Pedro, Diu, Luís Dourado, Alexandre “CB”, Bruno, Rafael e Marco Aurélio. O convívio diário com vocês é muito interessante e me faz aprender muito! Dentro desse grupo também entram “tio Carlinhos” e “Seu Vavá”, que me ensinaram muito do que sei, principalmente sobre cuidar do laboratório. Mariana, você merece uma frase só para você, pois te adoro muito!!!

A todos os amigos que já passaram pelo lab. de Bioenergética: Gustavo, Nattascha, Nayra, Gaya, Joyce, Vaneza, Ana Paula, Marcelão, Marcelinho, Hosana, Laudiene, Lília, profs. Bianconi, Jacqueline, Cláudio Masuda, Ana Maria e Monica, entre muitos outros que vi passar e que me ajudaram a crescer neste laboratório.

Aos meus alunos Luan e Flavia, por terem me aturado durante o período em que estamos no laboratório, e fora dele também. Vocês sempre me ensinam muito!!!

A todos os professores que tive ao longo da minha vida. Em especial: Arinda (Tio Patinhas) por me ensinar as primeiras letras e palavras; Leila (E.M. Carlos Chagas), pelas broncas e oportunidade dadas; “tia” Deise (E.T.E. Juscelino Kubitschek), por ser um exemplo de dedicação e amor aos alunos e ao ensino; e Rita (Farmácia Universitária/UFRJ), por sempre nos ajudar e incentivar a seguir nossos caminhos. Obrigado por todo apoio e exemplo dados! Amo todas vocês!

A todos do Instituto de Bioquímica Médica, do qual faço parte desde os 14 anos, quando ainda era Depto. de Bioquímica Médica! Foram muitas pessoas que me ajudaram, incentivaram e apoiaram durante esta caminhada.

À professora Andréa T. Da Poian, por ter revisado de forma crítica minha dissertação e por ter me ajudado (e muito!) durante o crédito didático.

A todos os membros da banca por terem aceitado o meu convite e por terem tido muita paciência para ler esta dissertação.

Abreviações

ADP – Adenosina 5'-difosfato

AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato, forma cíclica

AMPK – Proteína cinase ativada por AMP

ANT – Trocador de nucleotídeo de adenina

ATP – Adenosina 5'-trifosfato

BSA – Albumina sérica bovina

BSA_{FFA} – Albumina sérica bovina, essencialmente livre de ácidos graxos

CREB – Proteína ligadora ao elemento de resposta ao AMPc

CS – Citrato sintase

D2 – Desiodase tipo 2

DNP – 2,4-dinitrofenol

EDTA – Ácido dietileno diamino tetracético

EGTA – Ácido etilenoglicol bis(β-etil éter) tetracético

ERO – Espécie reativa de oxigênio

FAD⁺ – Flavina adenina dinucleotídeo

FADH₂ – Flavina adenina dinucleotídeo, forma reduzida

FCCP – Cianeto de Carbonila de p-Trifluorometoxifenilidrazona

G-6-P – Glicose-6-fosfato

G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase

GDP – Guanosina 5'-difosfato

GTP – Guanosina 5'-trifosfato

H⁺ – Próton

HK – Hexocinase

LDH – Lactato desidrogenase

β -NAD⁺ – β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

β -NADH – β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NAG – N-acetilglicosamina

NRF-1 – Fator 1 Nuclear Respiratório

MHP – Manoheptulose

MME – Membrana mitocondrial externa

MMI – Membrana Mitocondrial Interna

NC-HK – Hexocinase Não-citosólica

PK – Piruvato cinase

PGC-1 – Coativador 1 do PPAR γ

PGM – Fosfoglicomutase

P_i – Fosfato inorgânico

PMSF – Fluoreto fenilmetanosulfônico

PPAR – Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo

Q₁₀ – Efeito da variação (diminuição ou elevação) da temperatura em 10°C

RNA_m – Ácido ribonucléico mensageiro

TFAM – Fator de Transcrição Mitocondrial A

UCP – Proteína desacopladora

VDAC – Canal de ânion voltagem-dependente

Índice

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Temperatura e os animais	1
1.2 O Metabolismo Energético	4
1.2.1 O metabolismo e os mecanismos de transformação de energia	5
1.2.2.1 A mitocôndria e a fosforilação oxidativa	7
1.2.2.2.1 Os estados respiratórios	12
1.2.2.2.2 Desacoplamento natural: as proteínas desacopladoras	13
1.3 As Hexocinases	19
1.3.1 Isoenzimas	20
1.3.2 Propriedades cinéticas e regulatórias	23
1.3.3 Associação à mitocôndria e a outras membranas celulares	25
1.3.4 Hexocinase em ciprinídeos	30
1.4 Efeito da aclimação sobre os peixes	32
1.4.1 Visão geral	32
1.4.2 Mudanças glicolíticas e mitocondriais associadas à adaptação ao frio	35
1.5 O peixe dourado <i>Carassius auratus</i>	43
2 JUSTIFICATIVA	45
2 JUSTIFICATIVA	46
2.1 Objetivos	47
3 METODOLOGIA	49
3.1 Reagentes	49
3.2 Animais	49
3.3 Procedimento de Aclimação	49

3.4 Taxa de ventilação	50
3.5 Características físicas dos peixes	50
3.6 Isolamento das frações subcelulares de músculo esquelético	51
3.7 Isolamento de mitocôndria de músculo branco	52
3.8 Determinação da concentração de proteína	53
3.9 Preparação de fibras permeabilizadas de músculo branco	53
3.10 Consumo de O ₂ em mitocôndrias isoladas	54
3.11 Consumo de O ₂ em fibras permeabilizadas	55
3.12 Determinação das Atividades enzimáticas	55
3.12 Análise estatística	57
4 RESULTADOS	59
4.1 Taxa de ventilação	59
4.2 Fator de condicionamento	59
4.3 Atividades específicas de enzimas glicolíticas e mitocondriais em frações mitocondriais e citosólicas	60
4.4 Parte 1	63
4.4.1 Distribuição subcelular da atividade de hexocinase de músculo branco de peixe dourado	63
4.4.2 Propriedades cinéticas da NC-HK de peixes dourados	64
4.4.3 Efeito do ADP, AMP e P _i sobre a atividade da NC-HK	66
4.4.4 Efeito da G-6-P sobre a atividade da NC-HK	67
4.4.5 Efeito de análogos de glicose, NAG e MHP, sobre a atividade da NC-HK	69
4.4.6 Efeito da aclimação ao frio sobre a atividade de hexocinase de músculo branco de peixe dourado	69
4.5 Parte 2	71

4.5.1 Análise do metabolismo mitocondrial dos peixes controle e aclimatados ao frio: abordagens utilizadas	71
4.5.2 Efeito da aclimação ao frio sobre a respiração em mitocôndrias isoladas	72
4.5.3 Efeito da aclimação ao frio sobre a respiração em fibras permeabilizadas	75
4.5.4 Normalização das taxas respiratórias	75
4.5.5 Consumo de O ₂ associado ao vazamento de prótons em fibras permeabilizadas de músculo de peixes aclimatados a 5° e 25°C: ativação por palmitato e inibição por GDP e BSA	77
5 DISCUSSÃO	82
5.1 Parte 1	86
5.2 Parte 2	92
6 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	102

Índice de Figuras, quadros e tabelas

Figura 1: A cadeia transportadora de elétrons (CTE) e a síntese de ATP mitocondrial

Figura 2: Acomplante entre a transferência de elétrons, consumo de O₂ e síntese de ATP

Figura 3: Modelo de UCP como mecanismo de desacoplamento mitocondrial

Figura 4: Reação da Hexocinase e vias posteriores à geração de G-6-P

Figura 5: Associação da Hexocinase à mitocôndria e sua participação na interface entre os metabolismos glicolítico e mitocondrial

Figura 6: Conseqüências das mudanças metabólicas que ocorrem em músculo esquelético de peixes aclimatados ao frio

Figura 7: O peixe dourado (*Carassius auratus*)

Figura 8: Distribuição nativa do peixe dourado ao redor do mundo

Figura 9: Medida do comprimento utilizado para o cálculo do Fator de condicionamento

Figura 10: Etapas de obtenção das frações subcelulares de músculo branco de peixes dourados

Figura 11: Efeito da temperatura sobre a taxa de ventilação de peixes dourados

Figura 12: Distribuição subcelular da atividade HK em músculo branco de peixes

Figura 13: Parâmetros cinéticos da atividade NC-HK em fração mitocondrial

Figura 14: Efeito da glicose-6-fosfato e análogos de glicose sobre a atividade da NC-HK em fração mitocondrial

Figura 15: Distribuição subcelular da atividade HK em músculo branco de peixes: efeito da aclimação ao frio

Figura 16: Efeito da aclimação ao frio sobre os estados respiratórios de músculo branco de peixes dourados

Figura 17: Efeito do Palmitato sobre o consumo de O_2 em Estado 4o de fibras permeabilizadas de peixes dourados mantidos a $25^\circ C$: inibição parcial por GDP

Figura 18: Efeito do GDP e BSA_{FFA} sobre o consumo de O_2 associado ao vazamento de H^+ leak em fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 5° e $25^\circ C$

Figura 19: Efeito do GDP e BSA_{FFA} sobre o consumo de O_2 associado ao vazamento de H^+ em fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 5° e $25^\circ C$

Figura 20: Conseqüências da aclimação ao frio sobre o metabolismo energético do músculo esquelético branco de peixes dourados

Quadro 1: Comparação entre o uso de mitocôndrias isoladas e fibras permeabilizadas para investigar as funções mitocondriais

Tabela 1: Propriedades cinéticas das quatro isoenzimas de rato

Tabela 2: Características físicas dos peixes dourados utilizados nos experimentos

Tabela 3: Atividades específicas de enzimas citosólicas e mitocondriais em peixes dourados aclimatados a 5° e $25^\circ C$

Tabela 4: Constantes cinéticas da atividade NC-HK de peixe dourado

Tabela 5: Perfil inibitório da atividade NC-HK de peixe dourado

Tabela 6: Efeito do GDP e BSA_{FFA} sobre o consumo de O_2 associado ao vazamento de H^+ em fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 5° e $25^\circ C$

1 INTRODUÇÃO

1.1 Temperatura e os animais

A temperatura é um dos principais fatores ambientais capazes de afetar a fisiologia dos animais.

Os organismos multicelulares, ao contrário dos unicelulares, estão limitados a viver em uma faixa menor de temperatura e, mesmo que a maioria dos multicelulares esteja adaptada a uma faixa ainda menor, eles podem passar por flutuações diárias ou sazonais na temperatura de seus habitats. Estas flutuações térmicas têm conseqüências funcionais em muitos níveis da estrutura biológica. Os animais endotérmicos, por terem a capacidade de conservar muito do calor gerado durante o metabolismo através dos mecanismos de termogênese, conseguem manter uma diferença de temperatura em relação ao seu habitat, enquanto os animais ectotérmicos têm a temperatura de seus corpos determinada por fontes externas de calor, o que faz com que tenham temperaturas idênticas ou muito próximas da temperatura ambiente.

Como dito acima, a temperatura afeta de muitas maneiras a fisiologia dos organismos, desde taxas de difusão molecular e reações bioquímicas até a permeabilidade de membranas e funcionamento de células, tecidos e órgãos; de taxas de expressão gênica a mudanças comportamentais dos animais. Evolutivamente, as compensações bioquímicas para os efeitos térmicos podem ser vistas pela manutenção da afinidade de substratos por enzimas metabólicas, como, por exemplo, a lactato desidrogenase e a malato desidrogenase isoladas de

organismos que vivem em diferentes temperaturas (para revisão, Hochachka e Somero 2002).

As mudanças na temperatura podem alterar o equilíbrio entre reações de degradação e síntese de estruturas biológicas, mudar as necessidades metabólicas, favorecer determinadas funções em detrimento de outras e alterar interações tróficas. Conhecendo, então, estes efeitos da temperatura, não é estranho pensar que os seres vivos tenham desenvolvido estratégias, sejam bioquímicas ou comportamentais, para lidar com estas mudanças térmicas. Sendo assim, torna-se interessante entender os efeitos da temperatura sobre o metabolismo dos organismos, a fim de compreender que estratégias bioquímicas são adotadas para superar o desafio térmico.

As respostas biológicas à temperatura são descritas por diversos termos. Quando a temperatura corpórea de um organismo varia de acordo com a do ambiente, ele é considerado um *ectotérmico*. Ao contrário, a geração endógena de calor pelos *endotérmicos*, juntamente com mecanismos eficientes para o controle da troca de calor com o ambiente, permite que estes animais mantenham uma temperatura corpórea diferente da temperatura ambiente. Os animais *homeotérmicos* mantêm temperaturas corpóreas estáveis, mas é importante ressaltar que nem todo homeotérmico é endotérmico. Como exemplo desta disparidade, podemos citar os peixes da Antártica, que possuem temperaturas corpóreas constantes devido à falta de variação térmica do ambiente em que vivem. Os organismos *pecilotérmicos* sofrem consideráveis flutuações da temperatura corpórea, tipicamente em conjunto com flutuações na temperatura ambiente, mas podem controlar essa variação por métodos comportamentais. Os *heterotérmicos* permitem que suas temperaturas corpóreas mudem de acordo com condições

energéticas ou ambientais, mantendo um controle pouco restrito da temperatura do corpo. Muitos organismos possuem um grau de heterotermia regional, na qual certas regiões do corpo são mantidas a diferentes temperaturas em relação ao restante do organismo. Geralmente, estas características térmicas dos organismos são fixadas ao longo da evolução.

A biologia dos peixes é tão diversa que, de acordo com a nomenclatura acima, eles podem ser enquadrados desde pecilotérmicos a homeotérmicos, incluindo também alguns heterotérmicos (alguns atuns e espécies de peixe-espada). Os peixes são modelos convenientes para o estudo de respostas metabólicas à temperatura, visto que o uso de guelras para a respiração força a temperatura corpórea a seguir a do ambiente. Isto ocorre porque, a fim de assegurar a eficiência da troca gasosa, é necessário que o peixe diminua a barreira da difusão. Além disso, o tempo necessário para a completa oxigenação do sangue nas guelras é longo demais para que um gradiente térmico seja mantido entre o sangue e a água.

Estes animais podem variar suas temperaturas de acordo com a temperatura absoluta do ambiente, sejam quentes ou frias, dentro de numa faixa que eles podem suportar. Esta tolerância também muda durante o desenvolvimento, no qual os estágios de larva e jovem freqüentemente suportam um limite menor de temperatura que os adultos. Tais tolerâncias térmicas são descritas pelos termos *estenotérmicos* (toleram uma pequena faixa de temperatura) e *euritérmicos* (toleram uma faixa maior de temperatura).

Quando as flutuações sazonais da temperatura ambiente podem ser previstas, muitos peixes euritérmicos modificam sua fisiologia térmica de acordo com esta variação. A *aclimação* térmica realizada em laboratório (feita quando se coloca um peixe em diferentes temperaturas, por um determinado período de tempo, enquanto

outros parâmetros são mantidos constantes) modifica as capacidades metabólicas da espécie em estudo. Entretanto, as respostas metabólicas à aclimação térmica podem variar daquelas obtidas quando os peixes são *aclimatizados* a mudanças naturais no fotoperíodo e na temperatura, ou mantidos em seus habitats a determinadas temperaturas. Admite-se que a compensação térmica ocorre quando a aclimação de organismos ectotérmicos modifica a taxa de determinadas funções de modo que esta taxa, a uma nova temperatura, não é simplesmente ditada pelo Q_{10} (fator de aumento da taxa de um processo quando a temperatura é aumentada em 10°C). De acordo com Precht (1958), as respostas à aclimação térmica ou à aclimatização podem ser: supercompensação, compensação perfeita, compensação parcial, sem compensação ou compensação inversa. Estas categorias ilustram as diferentes estratégias adotadas durante a mudança térmica. Por exemplo, quando os peixes são submetidos ao resfriamento sazonal, eles podem (i) reduzir o ritmo de seus processos fisiológicos pela submissão aos efeitos do Q_{10} , (ii) deprimir as funções metabólicas, aumentando os efeitos térmicos (hibernação, torpor) ou (iii) compensar os efeitos do Q_{10} através da compensação perfeita ou parcial. Por fim, está implícito na análise das respostas metabólicas à temperatura que, quando uma espécie está exposta a mudanças térmicas recorrentes em seu habitat, ela, provavelmente, adaptou-se a estes ciclos de modo a maximizar sua forma física ou o sucesso do tempo de vida reprodutivo.

1.2 O Metabolismo Energético

1.2.1 O metabolismo e os mecanismos de transformação de energia

Os organismos, ao longo da evolução, desenvolveram diversos mecanismos para a obtenção de energia a partir de diferentes fontes. O aparecimento dos seres eucarióticos aeróbicos contribuiu muito para estes mecanismos. Antes deles, os seres procarióticos e os ancestrais eucarióticos (células com organização do material genético) não possuíam uma organização celular que lhes permitisse oxidar completamente a fonte energética, o que os forçava a fazer uso do metabolismo anaeróbico, cujo saldo energético era muito baixo. Entretanto, como proposto na teoria endossimbiótica de Lynn Margulis, o surgimento dos seres eucarióticos aeróbicos a partir da simbiose de bactérias aeróbicas com as células eucarióticas ancestrais, permitiu o uso do metabolismo aeróbico. A completa oxidação dos substratos energéticos era favorecida graças à compartimentalização das enzimas oxidativas em uma única organela: a mitocôndria, o que permitiu uma maior unificação dos padrões metabólicos oxidativos, situação que não acontecia com os procarióticos.

Esse avanço evolutivo se mostra de grande importância para a vida, visto que a produção constante de energia é necessária para a manutenção das atividades fisiológicas. Esta energia, armazenada principalmente sob forma de compostos fosforilados, é obtida através de um conjunto de reações realizadas por sistemas multienzimáticos chamado *Metabolismo*. Dentro das células, estas reações químicas catalisadas por enzimas estão organizadas em diversas seqüências de reações, conhecidas como *vias*, nas quais o produto de uma reação é o reagente da reação seguinte. Algumas destas vias degradam nutrientes orgânicos (carboidratos, lipídios e proteínas) provenientes da alimentação ou das reservas do organismo (glicogênio, lipídios), gerando produtos finais mais simples. Estas vias, que constituem o

catabolismo, liberam energia que pode ser armazenada quimicamente ou dissipada em forma de calor. Em contrapartida, há um conjunto de vias que faz uso da energia conservada quimicamente para realizar a biossíntese de moléculas maiores e mais complexas a partir de precursores mais simples. Ao conjunto destas vias biossintéticas, que necessitam de energia para ocorrer, dá-se o nome de *anabolismo*. Além das reações anabólicas, a energia química gerada durante o catabolismo também pode ser usada para transportar íons, contrair os músculos e regular a termogênese. É o balanço entre estas vias que constitui o metabolismo celular, o qual possui a molécula de adenosina 5'-trifosfato (ATP) como principal carreador da energia celular.

Dentre as vias catabólicas, talvez a mais importante seja a via de degradação de glicose, cuja importância é vista em praticamente todos os organismos, desde bactérias a animais superiores. Assim que entra na célula, a glicose é fosforilada pela enzima hexocinase formando glicose 6-fosfato, a qual pode seguir diversas vias metabólicas, dependendo do estado metabólico da célula. Se a demanda energética for alta ou a carga energética celular estiver baixa, a glicose 6-fosfato segue, preferencialmente, pelas vias de síntese de energia. A primeira destas vias a ser completamente elucidada foi a glicólise, na qual a glicose percorre uma série de reações que culminam com a geração de ATP, NADH e piruvato (duas moléculas de cada um). Este último segue para a mitocôndria, onde é convertido em acetil-CoA pelo complexo da piruvato desidrogenase na matriz mitocondrial. É com este acetil-CoA que tem início a segunda etapa do catabolismo aeróbio de glicose: o ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Neste ciclo de reações, que inclui duas descarboxilações oxidativas com subsequente liberação de CO₂, a energia liberada é conservada na redução de três moléculas de NAD⁺ e uma de FAD⁺ e a produção

de um ATP ou GTP. Embora estas reações gerem, por ciclo, apenas um ATP de forma direta, os quatro passos oxidativos provêm um amplo fluxo de elétrons que serão utilizados na cadeia respiratória, via NADH e FADH₂ gerados, levando, assim, à formação de muitas outras moléculas de ATP. Por fim, as moléculas de NADH e FADH₂ provenientes da glicólise e do ciclo de Krebs são utilizadas na fosforilação oxidativa para a posterior síntese de ATP pela F₀F₁-ATPase.

Em contrapartida, a via aeróbica, em sua fase mitocondrial, pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), que, em elevadas concentrações, são prejudiciais à célula. Já é bem estabelecido que cerca de 1-2% do O₂ consumido pela mitocôndria gera estas espécies reativas. Os EROs são formados naturalmente durante a fosforilação oxidativa e após a fosforilação de todo o ADP, alcançando sua maior produção quando aumenta a concentração de oxigênio e o potencial de membrana mitocondrial é máximo, isto é, no repouso e no estado pós-fosforilativo (Korshunov *et al.*, 1997; Skulachev, 1998, Cadenas e Davies, 2000). Normalmente, há defesas antioxidantes na própria mitocôndria para prevenir os danos causados pelas EROs, como as enzimas superóxido dismutase e glutathiona peroxidase. Entretanto, quando há um desbalanço entre a produção mitocondrial de EROs e as defesas antioxidantes, a célula sofre de estresse oxidativo, que pode causar danos a enzimas, membranas lipídicas e ácidos nucléicos.

1.2.2.1 A mitocôndria e a fosforilação oxidativa

Nos organismos aeróbicos, a respiração celular é o cume do metabolismo energético. Todos os passos oxidativos das vias de degradação de carboidratos, lipídios e proteínas convergem para a fosforilação oxidativa, na qual a energia derivada da oxidação direciona a síntese de ATP. Em 1948, Eugene Kennedy e

Albert Lehninger descobriram que a fosforilação oxidativa, em eucariontes, ocorre na mitocôndria. Esta organela, tida como a principal fonte transformadora de energia em células eucarióticas, é caracterizada pela presença de duas membranas, uma interna (MMI, Membrana Mitocondrial Interna) e outra externa (MME, Membrana Mitocondrial Externa), que formam dois compartimentos separados: o espaço intermembranar, entre as duas membranas; e a matriz, delimitada pela MMI e que possui invaginações desta membrana, às quais se dá o nome de cristas.

A fosforilação oxidativa é iniciada com a entrada de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, que é composta por quatro complexos enzimáticos multipolipeptídicos: Complexo I (NADH-ubiquinona oxidorreductase), Complexo II (succinato-ubiquinona oxidorreductase), Complexo III (ubiquinol-citocromo *c* reductase) e Complexo IV (citocromo *c* oxidase), e dois carreadores de elétrons (ubiquinona e citocromo *c*). Esta série de carreadores e complexos enzimáticos está localizada na MMI, sendo que os complexos são proteínas integrais de membrana.

Estes carreadores podem mover os elétrons do NADH, succinato ou outras fontes doadoras de elétrons através de flavoproteínas, ubiquinona, proteínas ferro-enxofre e citocromos, até chegar ao O_2 . Os Complexos I e II realizam a transferência de elétrons a partir do NADH e succinato, respectivamente, para a ubiquinona, reduzindo-a; o Complexo III carrega os elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo *c* e o Complexo IV completa a seqüência de transferência conduzindo os elétrons do citocromo *c* para o O_2 , formando H_2O (Figura 1).

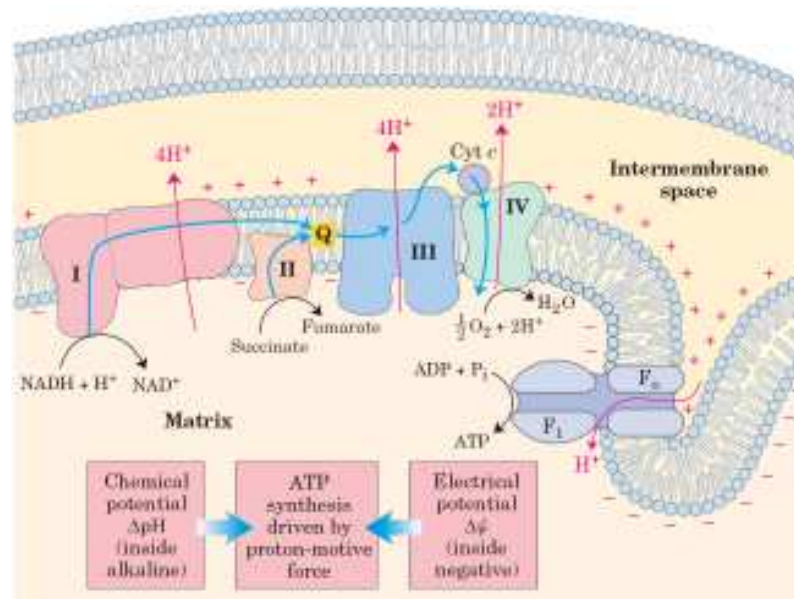


Figura 1: A cadeia transportadora de elétrons (CTE) e a síntese de ATP mitocondrial. A formação da força próton-motriz, gerada pelo transporte de elétrons na CTE, direciona a síntese de ATP na matriz mitocondrial (Figura retirada de Nelson e Cox, 2005).

Grande parte da energia proveniente da transferência de elétrons ao longo da cadeia é utilizada para bombear H⁺ da matriz para o espaço intermembranar, formando, assim, um gradiente de H⁺, uma vez que a membrana interna mitocondrial é impermeável a prótons. A energia armazenada neste gradiente protônico, chamada de *força próton-motriz*, possui dois componentes principais: (i) um componente elétrico, denominado potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), que resulta da diferença de cargas que ocorre quando os H⁺ atravessam a membrana sem que uma carga elétrica atravesse no sentido oposto, e (ii) um componente químico de pH que se estabelece devido à diferença de concentração de H⁺ entre a matriz e o espaço intermembranar (ΔpH). De acordo com o modelo quimiosmótico, proposto por Mitchell (1961), é esta energia eletroquímica que direciona a síntese de ATP pela F₀F₁-ATPase, também chamada de ATP sintase ou Complexo V (Figura 1).

O termo “quimiosmótico”, utilizado por Mitchell, servia para descrever as reações enzimáticas que envolvem, simultaneamente, uma reação química e um processo de transporte. À associação entre as reações químicas e o transporte que ocorre durante o processo de fosforilação oxidativa dá-se o nome de *acoplamento mitocondrial*, isto é, o transporte de elétrons pelos complexos (com subsequente consumo de O_2) está associado à síntese de ATP pela F_0F_1 -ATPase. A Figura 2 mostra um exemplo de acoplamento mitocondrial, que pode ser medido em mitocôndrias isoladas e incubadas em tampão contendo substrato oxidável (ex: succinato), ADP e P_i . Neste caso, três etapas ocorrem: (i) o substrato é oxidado (succinato gera fumarato e $FADH_2$), fornecendo, conseqüentemente, elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, (ii) o O_2 é consumido e (iii) o ATP é sintetizado. Visto que é a energia da oxidação do substrato que direciona a síntese de ATP, seria razoável pensar que a inibição da passagem de elétrons (exemplo de inibidores: cianeto, monóxido de carbono, antimicina A) para o O_2 bloquearia a síntese de ATP. De fato, isto não só é verdade como o inverso também é verdadeiro, ou seja, a inibição da síntese de ATP, com oligomicina ou venturicidina, é capaz de bloquear o consumo de O_2 em mitocôndrias intactas. Um acoplamento obrigatório pode ser observado em mitocôndrias isoladas incubadas apenas com substrato, mas não ADP. Neste caso, não há síntese de ATP e nem a transferência de elétrons para o O_2 .

A teoria quimiosmótica mostra a dependência da transferência de elétrons para a síntese de ATP na mitocôndria. Ao se bloquear a passagem dos H^+ pela ATP sintase, há um grande aumento no potencial de membrana, visto que a cadeia transportadora de elétrons continua a bombear H^+ para o espaço intermembranar. Entretanto, em determinado momento, a força próton-motriz é tão alta que o custo

energético para o bombeamento de H^+ torna-se desfavorável. Neste ponto, o fluxo de elétrons tende a parar e o sistema entra em equilíbrio.

Porém, alguns compostos químicos são capazes de promover o desacoplamento mitocondrial, resultando na transferência de elétrons e consumo de O_2 sem a síntese de ATP (Figura 2). Estes desacopladores químicos, tais como o 2,4-dinitrofenol (DNP) e o Cianeto de Carbonila de p-Trifluorometoxifenilidrazona (FCCP), são ácidos fracos com propriedades hidrofóbicas, que os permite se difundir através das membranas mitocondriais. Após entrar na matriz, carreando o próton que antes estava no espaço intermembranar, eles podem liberá-lo, dissipando, assim, o gradiente protônico.

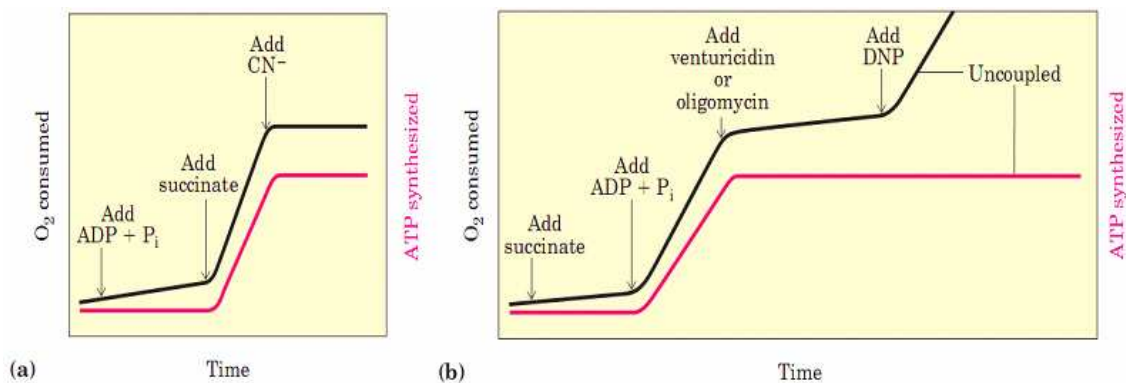


Figura 2: Acoplamento entre a transferência de elétrons, consumo de O_2 e síntese de ATP. Exemplo de um experimento que demonstra o acoplamento mitocondrial. Em (a), a adição de apenas ADP e P_i resulta em pequeno (ou nenhum) aumento na respiração (O_2 consumido, linha preta) ou síntese de ATP (linha vermelha). A adição de substrato oxidável, neste caso o succinato, inicia a respiração e a síntese de ATP rapidamente. A adição de inibidores que bloqueiam a transferência de elétrons inibe tanto a respiração quanto a síntese de ATP . (b) Apenas quando ADP e P_i são adicionados é que a mitocôndria já incubada com succinato é capaz de aumentar a respiração e a síntese de ATP . A adição de oligomicina (ou venturicidina) bloqueia a respiração e a síntese de ATP . A adição de desacopladores (ex: DNP) aumentam a respiração, mas sem a síntese de ATP .

A regulação da respiração mitocondrial, apesar de aparentemente simples, é bastante eficiente. Geralmente, a disponibilidade de ADP como substrato para fosforilação compõe um fator regulatório, visto que, em alguns tecidos animais, a

relação de controle respiratório (razão entre a taxa máxima de consumo de O_2 induzido por ADP e a taxa respiratória basal na ausência de ADP) é no mínimo dez.

As concentrações intracelulares de ADP são uma medida do estado energético da célula, assim como a relação ATP/ADP, ($[ATP]/[ADP] [P_i]$). Esta razão é normalmente alta devido à manutenção dos elevados níveis de ATP em relação aos níveis de ADP e P_i . Porém, quando um processo anabólico (síntese protéica, por exemplo) tem sua velocidade aumentada, há um aumento na taxa de hidrólise de ATP em ADP e P_i , diminuição, assim, a relação ATP/ADP. Com o aumento na concentração de ADP, a fosforilação oxidativa aumenta, levando à regeneração de ATP. Esse processo continua até que haja um novo equilíbrio na relação ATP/ADP, o que faz com que a taxa respiratória volte ao estado basal. A oxidação de combustíveis celulares é tão precisamente controlada e sensível, que a razão $[ATP]/([ADP] [P_i])$ permanece praticamente constante na maioria dos tecidos, mesmo durante variações extremas na demanda energética.

1.2.2.2.1 Os estados respiratórios

As etapas da fosforilação podem ser separadas e classificadas de acordo a presença de substratos oxidáveis, adenilatos e velocidade do fluxo de consumo de O_2 . A primeira definição dos conceitos operacionais dos estados metabólicos e do controle respiratório mitocondrial foi dada por Chance e Williams (1956). Posteriormente, Estabrook (1967) sugeriu uma outra classificação alternativa que diverge um pouco daquela descrita por Chance e Williams. Segundo Estabrook, os estados respiratórios são definidos da seguinte forma: (i) *Estado 1*: taxa respiratória lenta; há presença de substratos endógenos, mas não de adenilatos (há P_i no meio de respiração mitocondrial); (ii) *Estado 2*: respiração lenta devido à presença apenas

de substratos oxidáveis, mas não de adenilatos (ex: ADP). Chamado também de Estado Basal; (iii) *Estado 3*: alta taxa respiratória; a presença de ADP e substratos oxidáveis promovem um aumento do consumo de O₂ acoplado à síntese de ATP (também chamado de Respiração ativa ou Estado fosforilativo); (iv) *Estado 4*: há presença de substratos, mas, uma vez que não há ADP, pois este foi fosforilado a ATP, a respiração torna-se mais lenta (descrito também como Respiração controlada ou em Repouso); e, por fim, (v) *Estado 5*, no qual a respiração se torna limitante após a transição de aerobiose para anóxia. Neste caso, o substrato limitante é o próprio O₂. Funcionalmente, os Estados 2 e 4 são estados de respiração associada ao vazamento espontâneo de prótons, resultando em diferentes cinéticas de consumo de O₂ em mitocôndrias isoladas.

Para fins didáticos, os estados respiratórios descritos nesta dissertação seguirão os moldes definidos por Estabrook.

1.2.2.2 Desacoplamento natural: as proteínas desacopladoras

Fisiologicamente, o desacoplamento mitocondrial pode ser realizado por proteínas chamadas proteínas desacopladoras (UCP; do inglês *Uncoupling protein*), que pertencem à família dos carreadores aniônicos mitocondriais.

A primeira UCP descrita foi a UCP1, também conhecida, inicialmente, como termogenina ou proteína de ligação ao GDP (Nicholls, 1976; para revisão, Nicholls, 2001). Porém, após a sua devida descoberta e caracterização em tecido adiposo marrom de camundongos (Ricquier e Kader, 1976), o termo proteína desacopladora passou a ser empregado. Estas proteínas são expressas especificamente nas mitocôndrias dos adipócitos marrons, onde desempenham uma importante função termogênica, através do aumento da condutância a H⁺ da MMI e

conversão da força próton-motriz em calor (para revisão, Nicholls, 1984; Cannon e Nedergaard, 2004). Esta conversão se dá através do aumento no vazamento de H^+ mitocondrial, resultado da maior condutância da MMI, que, em vez de voltarem do espaço intermembranar para a matriz pela ATP sintase, passam pela UCP1. Neste caso, há um aumento no consumo de O_2 e a energia disponível, que seria utilizada para a síntese de ATP, pode ser liberada em forma de calor (Cannon e Nedergaard, 2004). Daí a importância da UCP1 no processo de termogênese independente de tremor (termogênese adaptativa) do tecido adiposo marrom (Figura 3).

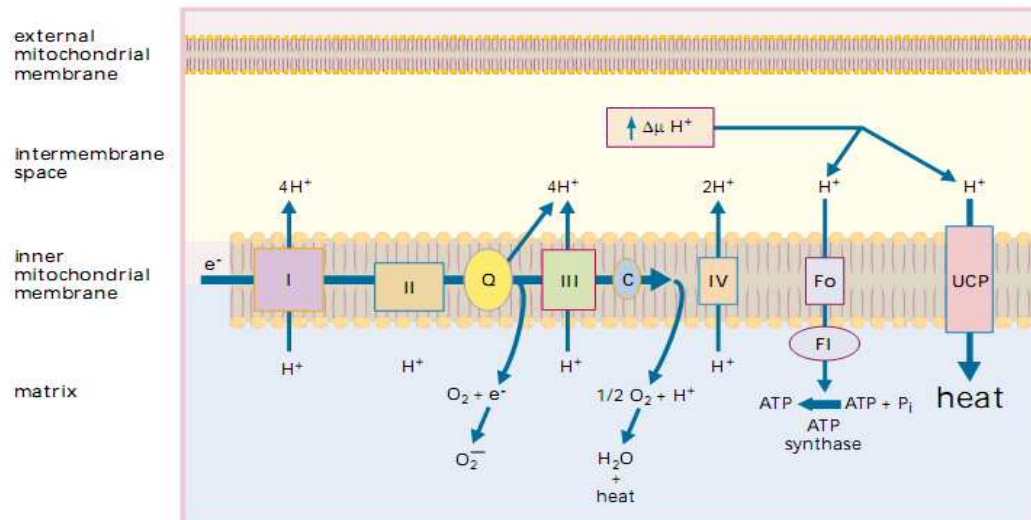


Figura 3: Modelo de UCP como mecanismo de desacoplamento mitocondrial. A UCP provê uma rota alternativa para os H^+ poderem voltar do espaço intermembranar para a matriz. Assim, aumentam o consumo de substrato e O_2 sem que haja síntese de ATP. A energia da força próton-motriz é, então direcionada para a geração de calor. (Figura retirada de Vidal-Puig, 2000).

O aumento no vazamento de H^+ promovido pela UCP1 pode ser inibido por nucleotídeos purínicos (principalmente GDP) e ativado por ácidos graxos livres, os quais podem agir diminuindo a sensibilidade a ATP e GTP (Klingenberg e Huang, 1999; Shabalina *et al.*, 2004). Fisiologicamente, após a estimulação simpática β -adrenérgica da lipólise do tecido adiposo marrom, o aumento dos ácidos graxos livres ativa o vazamento de H^+ catalisado pela UCP1. Este aumento no vazamento

de H^+ mediado pela UCP1 serve para ativar a termogênese adaptativa, seja para manter a temperatura corporal durante a exposição ao frio ou para gastar o excesso energético em resposta à alimentação (Lowell e Spiegelman, 2000).

Proteínas homólogas à UCP1 de mamíferos já foram identificadas em diversos organismos, como pássaros, vertebrados ectotérmicos, plantas, organismos unicelulares (para revisão, Ledesma *et al.*, 2002), sugerindo que estas proteínas foram bem conservadas ao longo da evolução.

Em 1997, duas outras proteínas desacopladoras foram descobertas e chamadas de UCP2 e UCP3, baseado em suas altas similaridades com a UCP1. Ao contrário da UCP1, cuja regulação e função fisiológica já são bem conhecidas, ainda se sabe pouco sobre as UCP2 e UCP3, além do fato de que elas também são capazes de mediar o vazamento de H^+ mitocondrial e que sua distribuição tecidual é bem mais extensa que a da UCP1. A UCP2 é expressa em diversos tecidos e tipos celulares e a UCP3 é expressa, majoritariamente, no músculo esquelético (para revisão, Rousset *et al.*, 2004; Krauss *et al.*, 2005).

O papel fisiológico das UCP2 e UCP3 tem sido assunto de muito debate e diversas funções fisiológicas têm sido atribuídas a estas proteínas (para revisão, Cannon e Nedergaard, 2003; Brand e Esteves, 2005). Parece claro que estas proteínas aumentam a condutância a H^+ da MMI, mas apenas quando estão ativadas por produtos do metabolismo de EROs e, talvez, ácidos graxos. Além disso, elas não afetam a condutância a H^+ basal na ausência destes ativadores.

Embora não participem ativamente do processo de termogênese adaptativa, as UCP2 e UCP3 podem ser significativamente termogênicas quando completamente ativadas por efetores endógenos ou exógenos. Estas UCPs também

podem estar envolvidas na diminuição da secreção de insulina (UCP2) e no controle da ingestão de alimentos (UCP1 e UCP3).

Porém, talvez a função mais importante atribuída a estas proteínas é a proteção contra o estresse oxidativo causado por EROs. Há fortes evidências de que o leve desacoplamento causado pelas UCP2 e UCP3 seja capaz de atenuar a produção de EROs e proteger contra o dano celular induzido por estas moléculas altamente reativas. Visto que a geração de EROs mitocondrial é muito sensível a mudanças no gradiente eletroquímico, o menor que seja o desacoplamento causado pelas UCP2 e UCP3 poderia diminuir levemente o gradiente, atenuando, assim, a geração de EROs. Este leve desacoplamento implica num limitado aumento na condutância a H^+ , de tal forma que a força próton-motriz é diminuída, a taxa respiratória é levemente aumentada, mas a síntese de ATP permanece. Isto é diferente do desacoplamento total, no qual a força próton-motriz e a síntese de ATP são abolidas, enquanto a respiração é máxima. Visto que o dano oxidativo causado por EROs está envolvido em diversas patologias, tais como diabetes e doenças neurodegenerativas, as UCP2 e UCP3 funcionam como importantes mecanismos de prevenção contra estas doenças.

A identificação de homólogos de UCPs em vertebrados ectotérmicos abriu uma discussão sobre o processo evolutivo de aquisição da termogênese mediado pela UCP1 em mamíferos. Nos últimos 10 anos, diversos homólogos de UCP foram identificados em peixes, anfíbios e répteis (Stuart *et al.*, 1999; Jastroch *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2008), mas, aparentemente, nenhum deles possui função termogênica.

Em peixes, os três homólogos de UCP foram encontrados em diversas espécies: carpas e peixe-zebra (UCP1-3: Stuart *et al.*, 1999; Jastroch *et al.*, 2005;

Liao *et al.*, 2006), perga japonesa (Liang *et al.*, 2003), baiacu (UCP1-3: Jastroch *et al.*, 2005), enguias (UCP2: Mark *et al.*, 2006) e truta arco-íris (UCP2: Coulibaly *et al.*, 2006). Entretanto, pouco se sabe as funções e mecanismos de regulação fisiológica.

Dentre as espécies estudadas, a carpa comum parece ter sido escolhida para representar as demais, uma vez que este peixe serviu de modelo para a maioria dos estudos de caracterização funcional e mecanismos adaptativos (Stuart *et al.*, 1999; Jastroch *et al.*, 2005, 2007). Em 2005, Jastroch e colaboradores demonstraram a presença de UCP1-3 em carpas por meio de genômica comparativa, inferência filogenética e análise da expressão gênica. O estudo da distribuição tecidual por meio da quantificação de RNAm mostrou que a UCP1 foi expressa, preferencialmente, em tecidos metabolicamente ativos, com predominância no fígado, níveis moderados no cérebro e rins (meso- e metanéfrons), e os menores níveis foram encontrados no intestino. O RNAm de UCP2 foi encontrado em todos os tecidos analisados, sendo sua maior expressão vista em células sanguíneas, intestino e guelras. A UCP3 foi expressa exclusivamente no músculo esquelético, com níveis maiores no músculo vermelho (oxidativo) em relação ao branco (glicolítico).

Sabe-se que em mamíferos endotérmicos, a expressão de UCP1 no tecido adiposo marrom é estimulada pela exposição ao frio e os níveis de RNAm de UCP3 são aumentados no músculo esquelético e coração durante o jejum (Samec *et al.*, 1998; Cannon e Nedergaard, 2004). Assim, a resposta das UCP1 e UCP3 a estes dois estímulos fisiológicos (aclimação ao frio e jejum) foi investigada em carpas. Curiosamente, ao contrário do que é observado em mamíferos, os níveis de UCP1 foram drasticamente reduzidos no fígado de animais expostos ao frio. Por outro lado,

os níveis de UCP3 de músculo esquelético branco foram aumentados em resposta ao jejum, de forma semelhante ao que ocorre em mamíferos.

Um estudo posterior do mesmo grupo (Jastroch *et al.*, 2007) realizou a caracterização funcional da UCP1 encontrada em fígado de carpas comuns. Foi observado que as mitocôndrias de peixes aclimatados a 25°C (alta expressão de UCP1), mas não as de peixes aclimatados a 5°C (baixa expressão de UCP1), exibiram um aumento do vazamento de H⁺ induzido por palmitato e inibido por GDP. Estes achados sugerem que as propriedades bioquímicas da UCP1 assemelham-se as de mamíferos, com as mesmas características (ácidos graxos - palmitato) de ativação e inibição (nucleotídeos purínicos - GDP). Neste mesmo estudo, foi observado um aumento na expressão de UCP1 no cérebro de animais expostos ao frio, sugerindo um papel da UCP1 na aclimação térmica do metabolismo cerebral. Um resultado semelhante já havia sido observado para os genes das UCP2 e UCP3 (Gracey *et al.*, 2004; Cossins *et al.*, 2006).

As poucas evidências existentes ainda não são suficientes para esclarecer o papel fisiológico das UCPs em peixes. Entretanto, visto que os peixes ectotérmicos, como a carpa comum, não são capazes de manter a temperatura corporal, é pouco provável que as UCPs – principalmente a UCP1 – desempenhem um papel importante na ativação da termogênese adaptativa, tal qual a UCP1 em mamíferos endotérmicos. Há uma certa especulação sobre a possibilidade de a UCP1 ser capaz de catalisar uma espécie de termogênese local em alguns tecidos, através do aumento no vazamento de H⁺ mitocondrial. Todavia, o que parece mais provável, é que os homólogos de UCP encontrados em animais ectotérmicos tenham uma função relacionada às funções das UCP2 e UCP3 de mamíferos, na proteção contra a geração de ROS e estresse oxidativo (Klingenspor *et al.*, 2008).

Além das UCPs, outras proteínas são capazes de modular o potencial de membrana mitocondrial, tais como proteínas da família Bcl-2, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e hexocinase, principalmente através da associação destas com as porinas (Harris e Thompson, 2000; da-Silva *et al.*, 2004; Tarze *et al.*, 2006). Das citadas acima, nesta dissertação, procuramos investigar a hexocinase.

1.3 As Hexocinases

A Hexocinase (ATP: D-hexose 6-fosfotransferase, HK, EC 2.7.1.1) exerce um importante papel no metabolismo celular de glicose, sendo sua presença de fundamental importância para todas as células. Ela catalisa a transferência do fosfato do ATP para o carbono 6 da glicose, formando glicose-6-fosfato (G-6-P), de modo a sustentar o gradiente de concentração que permite o transporte facilitado de glicose nas células. A glicose-6-fosfato gerada pode seguir diferentes caminhos dentro da célula, tanto em vias catabólicas quanto anabólicas. A via mais conhecida é a glicólise, que, além de gerar ATP, também fornece intermediários importantes para a oxidação completa da glicose: piruvato e NADH. Através da Via das Pentoses Fosfato, a G-6-P participa da geração de potencial redutor em forma de NADPH e precursores necessários para uma variedade de vias anabólicas (ex: Ribose-5-fosfato, para a biossíntese de ácidos nucleicos). Além das citadas acima, a G-6-P pode também seguir por vias de polimerização de glicose, como as biossínteses de glicogênio e amido, importantes para a estocagem deste carboidrato (Figura 4). Nos mamíferos, a importância destas e outras vias depende do tecido e do tipo celular.

As HKs estão estrategicamente posicionadas para influenciar não apenas a magnitude, mas também a direção do fluxo de glicose dentro da célula. Visto que o metabolismo indiscriminado de G-6-P pelas diversas vias não seria de interesse para

a célula, a expressão seletiva de isoformas de HK parece desempenhar um importante papel neste direcionamento do fluxo metabólico de glicose nos tecidos e células de plantas e animais.

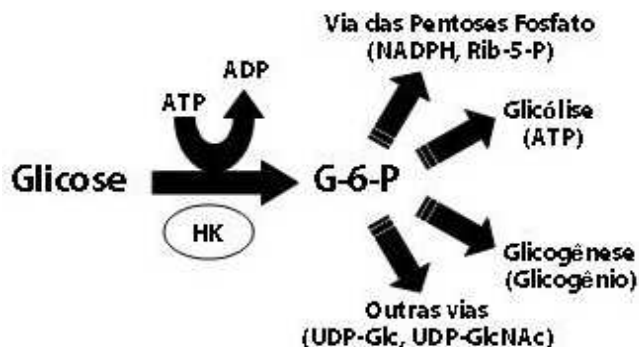


Figura 4: Reação da Hexocinase e vias posteriores à geração de G-6-P. Assim que formada pela hexocinase (HK), a glicose-6-fosfato gerada pode seguir diferentes vias metabólicas, dependendo do tipo celular e da necessidade metabólica. (Figura adaptada de Robey e Hay, 2006).

1.3.1 Isoenzimas

A existência de múltiplas HKs foi demonstrada pela primeira vez em leveduras (Trayser e Colowick, 1961). Em animais, as isoenzimas de HK foram descritas primeiramente em fígado de roedores (Walker, 1963; Viñuela *et al.*, 1963; Sharma *et al.*, 1963; González *et al.*, 1964), mas parece ser uma característica comum a todos os animais, inclusive os humanos (Brown *et al.*, 1967; Rogers *et al.*, 1975). Além disso, também já foram descritas isoenzimas de HK em vegetais fotossintetizantes (Claeyssen e Rivoal, 2007) e em diversas, mas não todas, as espécies de invertebrados analisadas (Ureta *et al.*, 1987). Os tecidos dos vertebrados contêm até quatro isoenzimas, designadas como A, B, C e D, de acordo a ordem de eluição da coluna da cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (González *et al.*, 1964); ou referidas como tipos I, II, III e IV, de acordo com a ordem de aumento da mobilidade eletroforética (Katzen e Schimke, 1965). Como esta nomenclatura é a

mais comum na literatura, para melhor compreensão, será esta a utilizada nesta dissertação.

As HKs I-III são moléculas de 100 kDa que, aparentemente, evoluíram por duplicação e fusão de um gene que codifica uma HK ancestral de 50 kDa. Assim, estas isoenzimas exibem repetição na seqüência interna e as metades N- e C-terminal possuem uma extensiva similaridade na seqüência, ambas entre si e para outros membros da família da HK, que inclui a HK de 50 kDa de mamíferos (HK-IV) e outras HKs de 50 kDa encontradas em outros organismos (Bork *et al.*, 1993; Wilson, 1995; Cárdenas *et al.*, 1998).

A suscetibilidade à potente inibição pelo produto G-6-P (inibição por retroalimentação) é considerada uma importante característica regulatória das HKs I-III de mamíferos, além de também ser observada em HKs de organismos inferiores, tais como peixe-estrela e *Schistosoma mansoni* (White e Wilson, 1989, Tielens *et al.*, 1994). É provável que a sensibilidade à inibição por G-6-P tenha evoluído antes da duplicação e fusão do gene, evento que deu origem às isoenzimas de 100 kDa presentes em mamíferos. A duplicação e fusão de um gene que codifica uma HK de 50 kDa sensível à G-6-P deve ter originado um gene que codifica uma HK de 100 kDa com as metades N- e C-terminal, ambas com atividade catalítica suscetível à inibição pelo produto. A HK-II possui tais características (Ardehali *et al.*, 1996; Tsai e Wilson, 1996) e parece ser a que mais se aproxima ao ancestral da HK de 100 kDa gerado pelo evento de duplicação e fusão do gene. Diferentemente da HK-II, as HK-I e HK-III possuem função catalítica apenas na metade C-terminal (White e Wilson, 1989; Baijal e Wilson, 1992; Tsai e Wilson, 1995, 1997). Assim, especula-se que as HK-I e HK-III resultaram, provavelmente, de uma modificação posterior do gene que codifica o ancestral da HK de 100 kDa, com subseqüentes mutações que levaram à

diferenciação funcional das metades N-terminal para servir com funções não-catalíticas (regulatórias).

Uma questão importante é o motivo pelo qual até mesmo organismos simples, como leveduras, possuem isoenzimas de HK (Rodrigues *et al.*, 2001). Afinal, se a única função da HK fosse simplesmente fosforilar a glicose para gerar G-6-P, apenas uma isoenzima de HK seria suficiente. Logo, há mais na função das diferentes HK que apenas gerar G-6-P. Wilson (2003) postulou que há pelo menos três bons motivos para a existência de isoenzimas: (i) elas podem diferir em suas propriedades catalíticas e/ ou regulatórias, o que as tornaria adaptadas para funções metabólicas específicas; (ii) diferenças na regulação da transcrição das isoenzimas podem permitir sua expressão seletiva em determinados tecidos, com diferentes respostas a alterações no estado metabólico, como efeitos de hormônios ou mudanças crônicas na atividade fisiológica (Hofmann e Pette, 1994); (iii) diferenças na localização subcelular das enzimas pode resultar em compartimentalização do metabolismo da glicose, com “canalização” da G-6-P para vias metabólicas específicas (Ureta, 1978; Ovádi e Srere, 2000). Entretanto, ainda não está muito claro o porquê da existência de diversas isoenzimas de HK.

Como já dito, as isoenzimas de HK estão distribuídas em diferentes tecidos e órgãos, provavelmente, com o objetivo de desempenhar funções celulares distintas. A HK-I é encontrada em virtualmente todos os tecidos de mamíferos, mas, em alguns, possui níveis mais elevados, como cérebro (tecido conhecido por sua alta dependência do metabolismo glicolítico para sustentar sua alta taxa metabólica) e rim. A HK-II é muito mais limitada em sua expressão, sendo primariamente encontrada em tecidos sensíveis à ação da insulina para captação de glicose, tais como músculo esquelético e tecido adiposo, além de glândulas mamárias; já a HK-

III, principalmente expressa no pâncreas e fígado, é também encontrada nos rins, pulmões e cérebro. A HK-IV é principalmente encontrada no parênquima hepático e nas células das ilhotas pancreáticas, onde desempenha uma importante função na homeostase de glicose, regulando a síntese de glicogênio e a secreção de insulina, respectivamente (Wilson, 2003).

1.3.2 Propriedades cinéticas e regulatórias

As propriedades cinéticas e regulatórias das HK I-IV estão comparadas na Tabela 1. As isoenzimas HK I-II apresentam alta afinidade por glicose, com valores de K_m na faixa micromolar e são caracterizadas pela sensibilidade à inibição pelo produto da reação (G-6-P). Em contrapartida, a HK-IV exibe baixa afinidade por glicose e é a única isoenzima de mamífero que não é finamente regulada por G-6-P (Iynedjian, 1993; Wilson, 1995; Postic *et al.*, 2001).

Tabela 1: Propriedades cinéticas das quatro isoenzimas de rato. ^aInibição pelo próprio substrato é vista em concentrações de aproximadamente 1 mM de glicose. (Tabela adaptada de Urich, 1994; Cárdenas, 1998; Wilson, 2003).

Isoenzimas	K_m (mM)			V_{max} (Fru)/	K_i (mM) G-6-P
	Glicose	Frutose	ATP	V_{max} (Glc)	
Tipo I	0,03	3,1	0,5	1,1	0,02
Tipo II	0,3	3,0	0,7	1,2	0,02
Tipo III	0,003 ^a	1,3	1,0	1,3	0,1
Tipo IV	5,0	420	0,6	2,4	60

Radojković e Ureta (1987) observaram que a HK-III é distinguível das demais por ter a maior afinidade por glicose e a menor afinidade por ATP, por ser a menos sensível à retroinibição e por ser a única a mostrar inibição por altas concentrações

de glicose (aproximadamente 1 mM), sendo esta inibição antagonizada pelo ATP. Porém, como este efeito é antagonizado pelo ATP em concentrações estimadas em células intactas, especula-se que o efeito inibitório da glicose sobre a HK-III pode ser menor numa situação *in vivo* (Wilson, 2003).

Acredita-se que a resposta distinta das isoenzimas ao fosfato inorgânico (P_i) provê uma informação útil sobre suas funções fisiológicas (Wilson, 1985, 1995). Especificamente, apenas a isoenzima HK-I apresenta inibição por G-6-P que é antagonizada por P_i . Com as HK-II e HK-III, o P_i por si só é inibitório e não antagoniza o efeito inibitório da G-6-P, mas, pelo contrário, adiciona-se a ele. Além do P_i , o ADP também é capaz de inibir as isoenzimas HK I-III (Grossbard e Schimke, 1966), assim como o AMP e outros nucleotídeos (para revisão, Wilson 1995).

As isoenzimas de HK também podem ser inibidas por diferentes açúcares ou derivados de açúcar (Sols e Crane, 1954; Grossbard e Schimke, 1966), dentre eles a D-manose, 2-deoxi-D-glicose, D-glicosamina e D-frutose. Além disso, inibidores competitivos também são conhecidos já há muito tempo (Sols e Crane, 1954; Grossbard e Schimke, 1966), tais como D-xilose, N-acetil-D-glicosamina, D-lixose e manohéptulose.

As propriedades cinéticas das HK I-III estão bem adaptadas às prováveis funções da fosforilação de glicose em diferentes locais do organismo. Embora com afinidades semelhantes, a pequena diferença existente nos valores de K_m entre as HK-I e HK-II pode ser primordial em situações nas quais a disponibilidade de glicose é muito baixa. Sendo assim, é mais importante que essa glicose seja utilizada pelo cérebro do que por outros órgãos. Por essa razão, é importante que a HK-I possua uma afinidade que a permita ter mais que 70% de sua atividade em concentrações de glicose de até 0,1 mM. Já o comportamento cinético da HK-IV é muito diferente,

mas está de acordo com a resposta do fígado e do pâncreas às variações de glicose plasmática (Cárdenas *et al.*, 1998). Desta forma, a HK-I é capaz de apresentar atividade mesmo em condições de hipoglicemia, enquanto que a HK-IV tem sua atividade aumentada apenas quando a glicemia estiver elevada.

1.3.3 Associação à mitocôndria e a outras membranas celulares

Uma característica importante das isoenzimas HK-I e HK-II de mamíferos é a capacidade única de interagir diretamente com a mitocôndria, tanto física quanto funcionalmente. Esta propriedade pode ser vista também em hexocinases de plantas (Miernyk e Dennis, 1983; Galina *et al.*, 1995; da-Silva *et al.*, 2001), mas não está presente nas isoenzimas HK-III e HK-IV ou nas isoenzimas de levedura. Assim, as HK-I e HK-II são freqüentemente citadas como hexocinases mitocondriais. Em extratos de tecidos de mamíferos, a separação da atividade hexocinásica em frações solúvel e particulada já é conhecida há muitos anos (Crane e Sols, 1953; Katzen *et al.*, 1970). Sabe-se que a fração particulada pode ser praticamente explicada pela ligação específica das HK-I e HK-II à membrana externa da mitocôndria. Tal ligação é dinâmica e regulada (Wilson, 1978) e envolve uma interação específica entre o canal de ânion dependente de voltagem (VDAC; do inglês *Voltage-dependent anion channel*) – também denominado Porina –, localizado na membrana externa da mitocôndria, e domínios hidrofóbicos de ligação à mitocôndria, encontrados na porção N-terminal das HK-I e HK-II, mas não das HK-III e HK-IV (Polakis e Wilson, 1985; Nakashima *et al.*, 1986; Gelb *et al.*, 1992; Pastorino *et al.*, 2002; Majewski *et al.*, 2004). O VDAC, por sua vez, encontra-se associado ao trocador de nucleotídeo de adenina – ou carreador de ADP/ ATP (ANT; do inglês *Adenine nucleotide*

translocase), responsável por promover a troca de ADP por ATP através da membrana mitocondrial interna (Figura 5).

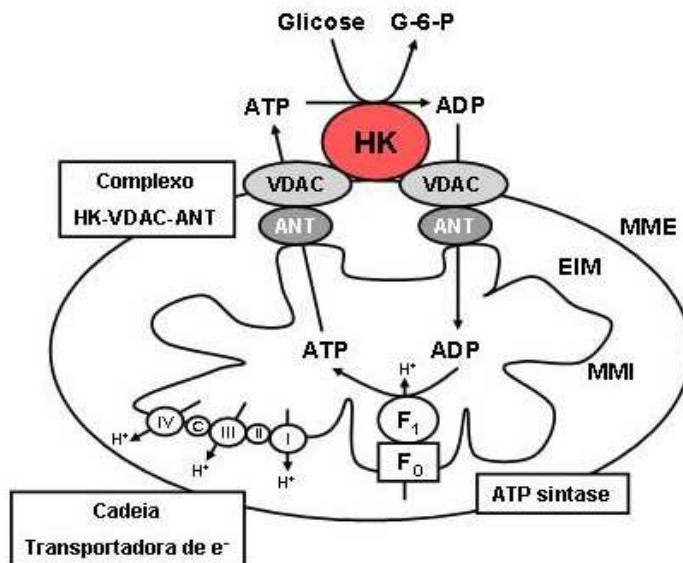


Figura 5: Associação da Hexocinase à mitocôndria e sua participação na interface entre os metabolismos glicolítico e mitocondrial. A HK associa-se ao VDAC por meio de domínios hidrofóbicos de ligação à mitocôndria, encontrados na porção N-terminal. Esta associação parece ser muito importante para as células que possuem HK-I e II. MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna; EIM: espaço intermembranar. (Figura adaptada de Robey e Hay 2006).

Especula-se que essa ligação tenha um papel importante na regulação e função da HK, tanto em mamíferos como em plantas (Anderson *et al.*, 1971; Wilson, 1978; Wilson, 1995; da-Silva *et al.*, 2001; Rolland *et al.*, 2006). Há uma considerável variação na proporção da atividade hexocinásica associada à mitocôndria em diferentes tipos celulares e tecidos, sendo a maior parte da forma ligada encontrada em alguns tecidos, tais como cérebro e rins (Crane e Sols, 1953; Parry e Pedersen, 1984). Muitos tumores também têm uma alta atividade hexocinásica associada à mitocôndria, a qual pode estar relacionada à taxa de crescimento do tumor *in vivo* (Bustamante e Pedersen, 1977; Bustamante *et al.*, 1981; Parry e Pedersen, 1983). A isoenzima encontrada nos tumores é a HK-II, que, quando associada à mitocôndria,

parece desempenhar um papel chave no crescimento e desenvolvimento de tumores altamente malignos, tanto na promoção do efeito Warburg quanto na supressão da morte celular (para revisão, Mathupala e Pedersen, 2006). O efeito Warburg refere-se ao aumento da utilização da via glicolítica para a produção de energia (e, provavelmente, outras moléculas para biossíntese) mesmo na presença de oxigênio para suportar a função mitocondrial. Assim, a associação da HK-II à mitocôndria é capaz de acelerar enormemente a via glicolítica.

Vários fatores intracelulares podem influenciar a compartimentalização da HK, tais como concentrações fisiológicas de G-6-P, ATP, P_i , cátions divalentes e pH (Rose e Warms, 1967; Wilson, 1978; Miccoli *et al.*, 1996, 1998). Além destes fatores, algumas drogas também são capazes de interferir com a associação da HK com a mitocôndria, tais como tiopental, drogas antifúngicas (clotrimazol e bifonazol), lítio e jasmonatos (Krieglstein *et al.*, 1981; Penso e Beitner, 1998, 2003; Goldin *et al.*, 2008). Estes fatores são capazes de “desfazer” a interação entre a HK e o VDAC, deslocando, assim, a HK da mitocôndria. Geralmente, este deslocamento é promovido pela ligação da molécula na enzima, como é o caso da G-6-P, cuja ligação na porção N-terminal da enzima induz diversas modificações conformacionais, promovendo, desta forma, alterações no sítio de contato da HK no VDAC (Wilson, 1995; Hashimoto e Wilson, 2000). Entretanto, este efeito não é observado nas isoenzimas de plantas. Em um estudo realizado por Rezende e colaboradores (2006) foi observado que, ao contrário das isoenzimas de mamíferos, as HK de arroz e milho não eram dissociadas da mitocôndria após o tratamento com G-6-P, clotrimazol ou tiopental. Estes dados sugerem que a associação entre a HK e o VDAC em plantas difere da existente em mamíferos.

Devido à localização mitocondrial, as HK-I e HK-II parecem ter vantagens funcionais, visto que a associação à mitocôndria lhes confere um “acesso privilegiado” ao ATP intramitocondrial. Assim, elas exibem maior atividade específica e menor inibição por G-6-P que as HKs solúveis (Wilson, 1995). As HK mitocondriais também acoplam o primeiro passo do metabolismo de glicose à fosforilação oxidativa, e, durante a respiração acoplada, utiliza seletivamente o ATP intramitocondrial para a fosforilação de glicose, mesmo que o ATP extramitocondrial esteja disponível (Arora e Pedersen, 1988; BeltrandelRio e Wilson, 1991, 1992a,b). O ADP gerado através desta reação pode ser redirecionado para o interior da mitocôndria através do ANT, favorecendo, assim, a continuidade da fosforilação oxidativa (Gumaa e McLean, 1969) (Figura 10). Especula-se que a regulação deste acoplamento ocorre ao nível da associação da HK à mitocôndria através do mecanismo de retroalimentação que envolve a G-6-P, a qual pode induzir mudanças conformacionais que promovem a dissociação da HK do VDAC e, conseqüentemente, da membrana externa da mitocôndria (Wilson, 1973).

Recentemente, outras funções têm sido propostas para a associação da HK à mitocôndria. Estudos mostraram que a HK mitocondrial inibe a liberação de citocromo c e a apoptose em células HeLa, bem como a ativação de proteínas cinases (Akt/PKB) que participam em processos apoptóticos (Gottlob *et al.*, 2001). Em recente revisão, Robey e Hay (2006) propuseram um mecanismo baseado no fato de que a interação física e funcional da HK com a membrana mitocondrial externa mantém a integridade mitocondrial e previne a liberação de proteínas pró-apoptóticas que estão no espaço intermembranar e que este mecanismo parece ser mediado por fatores de crescimento e Akt, que regulam a interação HK-mitocôndria. Outra função proposta é participação da HK mitocondrial como defesa antioxidante

preventiva (da-Silva *et al.*, 2004). Neste caso, o complexo HK-VDAC-ANT, juntamente com a F_0F_1 -ATPase, mimetizaria um sistema regenerador de ADP, que usa glicose e ATP como combustíveis e cuja função é manter o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) baixo a fim de prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio. Logo, esse sistema regenerador de ADP pode servir como complemento de outros mecanismos protetores, como as enzimas antioxidantes clássicas (superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase) e compostos não-enzimáticos, como a glutathiona reduzida, contra o estresse oxidativo. Em plantas, a associação entre HK e mitocôndria parece ser muito importante para um fenômeno conhecido como sensibilidade ao açúcar (no inglês, *sugar sensing*), no qual a HK age como um sensor de açúcar, regulando processos metabólicos e de crescimento/ desenvolvimento de vegetais (Jang *et al.*, 1997; Rolland *et al.*, 2006).

Embora ambas HK-I e HK-II liguem-se à mitocôndria, quantidades significantes destas enzimas já foram encontradas em outras frações obtidas por técnicas de centrifugação diferencial (Katzen *et al.*, 1970). É provável que isto ocorra devido apenas à contaminação das frações particuladas com mitocôndrias e/ ou fragmentos de membrana mitocondrial externa que contenham HK associada. Todavia, a possibilidade de que a HK esteja associada com outras membranas celulares deve ser considerada. Como notado por Thinnes (1992), o VDAC mitocondrial ou membros relacionados desta família de proteínas podem estar localizados em outras membranas celulares. Porém, ainda não se sabe se esta associação é preservada e funcional na ligação da HK.

1.3.4 Hexocinase em ciprinídeos

Apesar de sua função primordial no metabolismo da glicose, pouco se sabe sobre as HK em ciprinídeos. Isto ocorre porque a maioria dos estudos apenas relata a presença de HK como parâmetro analisado, associada a algum outro fenômeno que esteja sendo estudado. Desta forma, a atividade da HK já foi medida em neurônios motores e medula espinhal de peixe-zebra (De Graaf *et al.*, 1991; van Raamsdonk *et al.*, 1996), néfron e coração de carpa comum e peixe dourado (Bass *et al.*, 1973; Endo e Kimura, 1982; Duncan e Storey, 1991), dentre outros tecidos.

Recentemente, foi descrita a identificação de membros da família da HK em peixes (Blin *et al.*, 1999). Neste estudo, a dedução da seqüência de aminoácidos de clones de cDNAs mostrou o alinhamento com HK de baixo K_m (I/II) e HK-IV em carpa comum. A partir da clonagem dos cDNAs de HK-I e HK-IV, foi mostrado que, assim como em mamíferos, o gene da HK-I é expresso praticamente de forma ubíqua (cérebro, fígado, coração, rins e músculo), enquanto o gene da HK-IV é expresso especificamente no hepatopâncreas de carpa comum. Além disso, a atividade e os níveis de RNAm da HK-IV em carpas jovens foram aumentados por dieta rica em carboidratos, enquanto as atividades das HKs de baixo K_m não foram modificadas pelo estado nutricional (Blin *et al.*, 2000; Panserat *et al.*, 2000a, 2000b). Logo após, em 2001, Panserat e colaboradores demonstraram que as carpas comuns expressavam HK-I e HK-IV já nos primeiros estágios de desenvolvimento. Eles observaram também que a HK-IV era induzida apenas após a primeira alimentação com altos níveis de dextrina (fonte de carboidrato), enquanto a HK-I era expressa em todos os estágios do período de desenvolvimento do peixe. Este estudo serviu para confirmar que carpa comum pode utilizar glicose mesmo em estágios muito iniciais do desenvolvimento (Panserat *et al.*, 2001). Esta capacidade de utilização eficaz de

carboidratos da dieta foi confirmada também em animais adultos, em um estudo que demonstrou que, algumas horas após a alimentação rica em carboidratos, tanto a HK-IV quanto a HK de baixo K_m tiveram suas atividades aumentadas (Capilla *et al.*, 2004).

Num estudo recém-publicado, González-Alvarez *et al.* (2009) confirmaram que o genoma de peixe-zebra possui seis genes que codificam hexocinases – *DrGLK*, *DrADPGK1*, *DrADPGK2*, *DrHXK1*, *DrHXK2* e *DrSHXK1* – cujas seqüências são similares às hexocinases de outros peixes (carpa comum, truta arco-íris e dourada) e as de rato e humanos (homologias entre 50-85%). Curiosamente, as HK de peixe-zebra possuem uma distribuição tecidual similar a de mamíferos, além de serem filogeneticamente relacionados. Assim, a *DrGLK* e *DrSHXK1* são principalmente expressas no fígado, a *DrHXK1* em cérebro e coração, e a *DrHXK2* em músculo. A ortologia entre as HK de peixe-zebra e mamíferos (ratos e humanos) seria: *DrGLK* está para GK (HK-IV), *DrHXK1* está para HXK1 e *DrHXK2* está para HXK2. Além disso, também foi observado neste trabalho que, dentre as HK encontradas, apenas a *DrGLK* era capaz de responder ao jejum (diminuição de 85% de expressão) e à injeção de glicose (aumento de 3 vezes uma hora após a injeção de glicose), assim como a HK-IV em mamíferos.

A presença de HK no músculo esquelético de ciprinídeos já foi observada em diversos estudos e, geralmente, os estudos relatam apenas os valores das atividades enzimáticas (Johnston *et al.*, 1977; Johnston, 1977; Johnston e Moon, 1981; van den Thillart, 1984; Johnston *et al.*, 1985). Esses estudos mostram que a atividade de HK no músculo vermelho é cerca de 4-18 vezes maior que no músculo branco. Estes achados estão de acordo com a literatura, visto que, em vertebrados, a HK parece ser a única enzima glicolítica que tem atividade maior no músculo

vermelho – 2-10 vezes em relação ao branco (Burleigh e Schimke, 1969; Crabtree e Newsholme, 1972).

Entretanto, as propriedades cinéticas e a localização subcelular da HK muscular de peixes dourados ainda são desconhecidas, uma vez que a maioria dos trabalhos mede as atividades enzimáticas em frações obtidas de homogenatos totais ou frações solúveis provenientes de centrifugações de baixa velocidade, nas quais há pouca ou nenhuma separação de organelas.

1.4 Efeito da aclimação sobre os peixes

1.4.1 Visão geral

Como dito anteriormente, tanto para os peixes quanto para outros animais ectotérmicos aquáticos, a temperatura do ambiente influencia drasticamente as taxas dos processos fisiológicos. Por esta razão, ao longo da evolução, diversas adaptações fisiometabólicas foram selecionadas a fim de permitir que estes organismos sobrevivessem aos períodos de mudanças térmicas no ambiente, além de oferecer, em alguns casos, vantagens sobre outras espécies. Estas adaptações não são apenas específicas para determinadas famílias, mas dependem, também, do ambiente no qual elas vivem.

Devido às baixíssimas temperaturas do ambiente, os peixes Nototenióides, habitantes da Antártica, e diversas espécies de bacalhau da família Gadidae, que vivem no nordeste do Atlântico, expressam determinadas glicoproteínas, chamadas de *glicoproteínas anticongelamento*. Estes compostos atuam através da diminuição cinética da temperatura na qual o gelo cresce de maneira não coligativa, inibindo, assim, a formação de cristais de gelo. Esta propriedade permite que estes peixes

possam viver em águas com temperatura abaixo de 0°C (temperatura menor que o ponto de equilíbrio de congelamento do sangue e outros fluidos internos) sem que haja congelamento de seus fluidos corporais ou danos às membranas celulares (para revisão, Harding *et al.*, 2003).

Outras famílias de peixes possuem a capacidade de gerar calor e, mais que isso, mantê-lo e o distribuir pelo corpo ou determinadas regiões. Estes peixes podem ser classificados em dois grupos: endotérmicos e heterotérmicos. O primeiro, composto por peixes da família Scombridae (ex: atuns e cavala) e tubarões da família Lamnidae (ex: tubarão branco, mako e tubarão salmão), são capazes de nadar em altas velocidades (até 70 km/h). Eles mantêm seu corpo aquecido através do aumento da taxa metabólica e da retenção do calor produzido por meio de mecanismos de contra-corrente localizados na circulação dos músculos, cérebro e vísceras. O segundo grupo, formado por peixes de bico (ex: marlin azul e peixe-espada), possuem uma forma mais limitada de endotermia, sendo capazes de manter apenas o cérebro e os olhos aquecidos. Isto é possível porque estes animais possuem um tecido especializado na produção de calor, chamado *órgão do calor*, situado estrategicamente abaixo do cérebro. Este tecido evoluiu dos músculos extraoculares, diferenciando-se em um “músculo” sem proteínas contráteis, mas com um elevado conteúdo de mitocôndrias e proteínas envolvidas na ciclagem de Ca^{2+} (Ca^{2+} -ATPase e receptores de rianodina). Acredita-se que a termogênese neste tecido esteja associada à liberação e recaptção de Ca^{2+} (para revisão, Block, 1994).

Entretanto, embora essas características tenham sido evolutivamente “adquiridas” e geneticamente transmitidas às populações subseqüentes, não podemos confundi-las com as modificações provenientes de mecanismos de

aclimação. Estas respostas fenotípicas temporárias às mudanças térmicas do ambiente são diferentes entre as espécies e podem ocorrer em diversos níveis no organismo (ex: celular e tecidual). Por exemplo, os peixes da Antártica são ultra-estruturalmente e metabolicamente adaptados ao frio. Quando comparados ecotipicamente a peixes similares da zona temperada marinha, pode-se ver que eles apresentam características semelhantes às observadas no segundo grupo de peixes quando aclimatados ao frio: a atividade máxima de enzimas envolvidas nas vias centrais do metabolismo aeróbico são maiores no músculo oxidativo de peixes polares que nos da zona temperada (quando medidas em um ambiente frio), enquanto que os metabolismos aeróbico e anaeróbico de carboidratos são geralmente menores nos tecidos de peixes polares. Além disso, os peixes da Antártica possuem uma densidade de volume mitocondrial muscular cerca de 60% maior que peixes da zona temperada (Crockett e Sidell, 1990, Johnston *et al.*, 1988).

Diversos peixes da zona temperada desenvolvem respostas fenotípicas que servem para melhorar a atividade locomotora durante o período de aclimação ao frio. Estas mudanças podem ocorrer tanto em nível ultra-estrutural da musculatura esquelética – gerando mudanças nos mecanismos de contração e recrutamento das fibras – quanto metabólico, promovendo alterações nas vias de síntese de ATP ou na própria mitocôndria (para revisão, Johnston *et al.*, 1993; Johnston e Temple, 2002; Guderley, 2004a,b). Dependendo da espécie em questão, as modificações em nível mitocondrial variam bastante, principalmente em relação ao estilo de vida e ao habitat do peixe (Johnston, 1980; Johnston *et al.*, 1998). Sabe-se que a densidade de volume mitocondrial aumenta em músculo oxidativo de algumas espécies (robalo-muge, *Morone saxatilis*, e carpa cruciana, *Carassius carassius*), mas permanece estável em outras (truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*). No primeiro caso, a função

do retículo mitocondrial como fonte distribuidora de oxigênio através das fibras musculares esqueléticas poderia explicar a proliferação mitocondrial. No caso da truta arco-íris, o aumento compensatório nas taxas de oxidação de substratos mitocondriais associado a mudanças nas propriedades mitocondriais (ex: aumento das cristas mitocondriais) pode melhorar a capacidade oxidativa do músculo na ausência de mudanças na densidade de volume mitocondrial (para revisão, Guderley, 2004a,b).

Sendo assim, a fim de facilitar o entendimento desta dissertação, serão abordadas apenas as modificações musculares que ocorrem nos peixes da família dos Ciprinídeos, da qual fazem parte, por exemplo, o peixe dourado (*Carassius auratus*), as carpas comum (*Cyprinus carpio*) e cruciana (*Carassius carassius*) e o peixe-zebra (*Danio rerio*).

1.4.2 Mudanças glicolíticas e mitocondriais associadas à adaptação ao frio

Um dos principais problemas enfrentados pelos peixes submetidos a baixas temperaturas é a manutenção da síntese de ATP para suprir as necessidades fisiológicas e as demais respostas fenotípicas que acompanham a aclimação, tais como alterações no mecanismo de contração muscular. A temperatura afeta a energia cinética de moléculas, modificando taxas de difusão, interações moleculares e estabilidade macromolecular e propriedades de membrana. Assim, pode haver alterações na eficácia da regulação das vias metabólicas, fazendo com que a geração de ATP seja um processo limitante para a aclimação térmica. A fim de contornar esta situação, diversas mudanças metabólicas aparecem durante a exposição ao frio e estão, principalmente, relacionadas ao aumento da capacidade oxidativa do músculo esquelético.

Embora não se saiba muito sobre as alterações no metabolismo glicolítico, é bem aceito na literatura que a aclimação a baixas temperaturas não promove alterações na via glicolítica, mas, pelo contrário, pode até mesmo causar uma leve diminuição da mesma. Aparentemente, a única exceção é a hexocinase, cuja atividade aumenta em resposta à aclimação. Curiosamente, esta afirmação é baseada apenas em poucos estudos que associam mudanças nas atividades de algumas enzimas glicolíticas (ex: lactato desidrogenase e piruvato cinase) e aclimação ao frio, mas não na medida do fluxo glicolítico como um todo (Sidell, 1980; Van den Thillart e Smit, 1984; Johnston *et al.*, 1985; Egginton e Sidell, 1989). Recentemente, Gracey e colaboradores (2004), através de uma varredura fenotípica com a técnica de microensaio, realizaram uma extensa pesquisa para identificar respostas transcricionais de carpas comuns submetidas à aclimação térmica. Neste estudo, eles observaram que, ao contrário do cérebro, guelras e rins, o músculo esquelético mostrou uma diminuição na expressão de genes glicolíticos, sugerindo que a glicólise, de fato, parece estar reprimida durante o processo de aclimação a baixas temperaturas. Entretanto, neste mesmo estudo, foi observado que 6 dos 7 tecidos estudados, incluindo o músculo, tinham um aumento expressivo de genes relacionados à cadeia transportadora de elétrons e ao metabolismo aeróbico mitocondrial, sugerindo que uma característica fundamental da aclimação ao frio é o aumento da capacidade para fosforilação oxidativa (Gracey *et al.*, 2004).

De fato, como já comentado anteriormente, a principal alteração metabólica decorrente da aclimação ao frio é o aumento do metabolismo oxidativo mitocondrial.

Em músculos oxidativos, a função primária da mitocôndria é a geração de ATP para a contração muscular. Desta forma, é essencial para os peixes que se

mantêm ativos mesmo em baixas temperaturas que seu metabolismo mitocondrial seja melhorado nestas condições, visto que sua maquinaria contrátil permanece ativa.

As baixas temperaturas podem limitar a atividade mitocondrial, basicamente, de 3 maneiras: (i) reduzindo a capacidade oxidativa, (ii) limitando a difusão entre o citoplasma e a mitocôndria ou (iii) modificando a sensibilidade da mitocôndria a moléculas reguladoras, tais como o ADP e substratos mitocondriais. A fim de superar estes desafios, o organismo é capaz de “reagir” a estas situações através do aumento da biogênese mitocondrial (aumento do número de mitocôndrias), elevação da capacidade oxidativa e, por fim, ajuste das propriedades regulatórias. Tais ajustes metabólicos ocorrem tanto em músculo branco (glicolítico) quanto vermelho (oxidativo) de espécies ativas e inativas no frio, sugerindo que a aclimação ao frio promove alterações até mesmo em sistemas que, aparentemente, não precisam de alta atividade mitocondrial, tais como o músculo glicolítico e as espécies inativas no frio (Guderley e St-Pierre, 2002).

Das estratégias citadas acima para o aumento da capacidade oxidativa, os ciprinídeos respondem, principalmente, através do aumento da densidade de volume mitocondrial e da atividade de enzimas mitocondriais. Além disso, como ocorre em praticamente todos os animais que são expostos ao frio, há alterações importantes na composição lipídica das membranas celulares, incluindo a mitocondrial (para revisão, Sängler, 1993, Guderley, 2004a,b) (Figura 6).

Quando aclimatados a 5°C, ambos os tipos de músculo de peixes dourados, oxidativo e glicolítico, têm um aumento de cerca de duas vezes na atividade da succinato desidrogenase em relação ao músculo de peixes a 25°C (Hazel, 1972a,b; Sidell, 1980). Um perfil semelhante também é encontrado para a citocromo c oxidase

de músculos de carpa comum e peixes dourados aclimatados a baixas temperaturas (Van den Thillart e Modderkolk, 1978; Sidell, 1980; Wodtke, 1981a,b; Johnston *et al.*, 1985). O aumento na atividade destas enzimas pode estar associado, principalmente, a mudanças na composição fosfolipídica das membranas mitocondriais. Também foi observado que a aclimação térmica modifica a energia de ativação de Arrhenius e aumenta o conteúdo de fosfolipídios poliinsaturados na composição das membranas mitocondriais de músculos de peixes dourados e carpa comum (Van den Thillart e Modderkolk, 1978; Wodtke, 1981a,b). Assim, como sugerido por Hazel (1972b) e Wodtke (1981a,b), as mudanças que ocorrem nos grupos-cabeça e na cadeia hidrofóbica dos fosfolipídios da membrana mitocondrial são, provavelmente, para modificar a atividade de componentes da cadeia respiratória. Estes resultados sugerem que o aumento da atividade enzimática mitocondrial em resposta à exposição ao frio não está associado apenas ao aumento do conteúdo mitocondrial, mas também às modificações nos fosfolipídios de membrana, que são capazes de manter a fluidez e a natureza dinâmica da membrana (Figura 6). Além disso, o aumento da poliinsaturação lipídica em baixas temperaturas facilita o movimento do oxigênio dentro do núcleo hidrofóbico das membranas (Sidell, 1998).

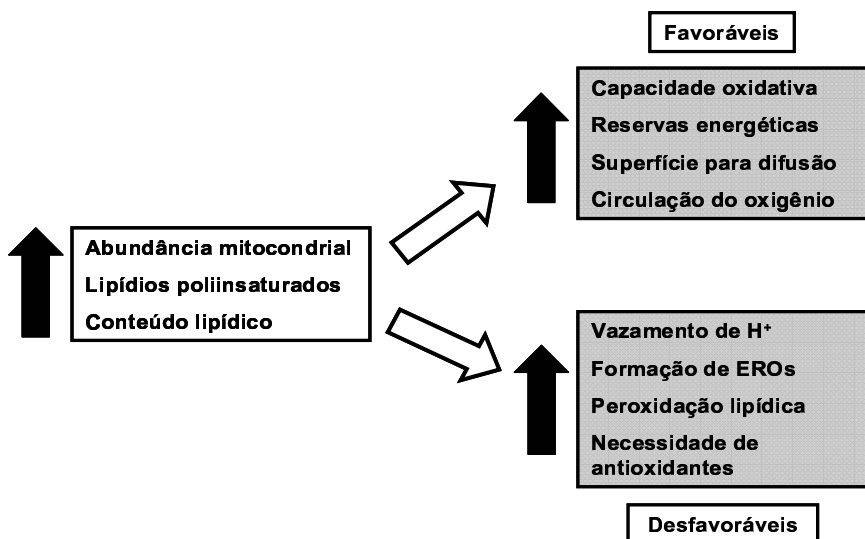


Figura 6: Conseqüências das mudanças metabólicas que ocorrem em músculo esquelético de peixes aclimatados ao frio. Durante a aclimação ao frio, as mudanças fenotípicas que ocorrem no metabolismo muscular de algumas espécies de peixe podem ter conseqüências favoráveis ou desfavoráveis. (Figura modificada de Guderley, 2004).

Entretanto, há outras mudanças em atividades enzimáticas que não estão necessariamente relacionadas a mudanças na fluidez de membrana. As enzimas β -hidroxiacil-Coa desidrogenase (metabolismo de ácidos graxos), F_0F_1 -ATPase (ou ATP sintase, Complexo V mitocondrial) e citrato sintase (Ciclo de Krebs) em músculos de peixes dourados (LeMoine *et al.*, 2008), carpa comum (Johnston *et al.*, 1985; Itoi *et al.*, 2003) e peixe-zebra (McClelland, *et al.*, 2006) tiveram suas atividades aumentadas após a aclimação ao frio. Curiosamente, destas enzimas, apenas a atividade da F_0F_1 -ATPase foi acompanhada de um aumento no RNAm de suas subunidades. Ainda assim, este aumento foi diferente entre as subunidades que eram codificadas pelo ADN nuclear (aumento de 2 vezes) e mitocondrial (aumento de 6 vezes), sugerindo que a aclimação ao frio promove diferentes padrões de expressão entre genes nucleares e mitocondriais (Itoi *et al.*, 2003).

Este aumento na atividade de enzimas mitocondriais e na expressão de seus genes pode ser explicado pelo aumento da biogênese mitocondrial que acompanha

o processo de aclimação térmica. A própria atividade da enzima citrato sintase é tida como um ótimo marcador do conteúdo mitocondrial (Holloszy *et al.*, 1970; Williams *et al.*, 1986; Leek *et al.*, 2001). Assim, mudanças na sua atividade, indiretamente, sugerem modificações no número de mitocôndrias.

A mudança na densidade de volume mitocondrial é uma das principais respostas à exposição ao frio. Johnston e Maitland (1980) observaram que carpas crucianas aclimatadas a 2°C durante dois meses tiveram um aumento significativo no conteúdo mitocondrial em relação aos animais mantidos a 28°C. A porcentagem do volume ocupado por mitocôndrias em fibras vermelhas e brancas de peixes aclimatados ao frio foi 25% e 4%, respectivamente. Em contrapartida, estes números foram de 14% e 1% para músculos vermelho e branco, respectivamente, de carpas controle (28°C). Ademais, a proporção de mitocôndrias subsarcolemais foi maior em peixes aclimatados ao frio. Mais tarde, Johnston observou que o aumento na porcentagem de mitocôndrias que ocupavam fibras brancas e vermelhas após a aclimação ao frio era acompanhado por um aumento na capilarização de ambos os tipos de fibra. Assim, as taxas de difusão hipotéticas eram diminuídas cerca de 20-30% em músculos de carpas crucianas aclimatadas ao frio (Johnston, 1982).

Em 1984, Tyler e Sidell aclimataram peixes dourados a 5°C por cinco semanas e realizaram análises quantitativas de parâmetros estereológicos, como densidade de volume, densidade de superfície, superfície específica (razão entre superfície e volume). Através destes parâmetros, eles também calcularam as distâncias de difusão entre as mitocôndrias. Assim como observado por Johnston e Maitland em carpas crucianas, os músculos de peixes dourados aclimatados a baixas temperaturas tiveram um aumento na densidade de volume mitocondrial. A densidade de superfície também aumentou em músculo vermelho de peixes

aclimatados ao frio, enquanto as distâncias de difusão tiveram uma diminuição. Com este estudo, Tyler e Sidell propuseram, então, que o aumento no conteúdo mitocondrial do músculo esquelético de peixes aclimatados ao frio, associado ao aumento na concentração de enzimas, poderia refletir em mudanças na densidade das organelas de tal forma que pudesse melhorar o efeito da temperatura sobre a difusão de moléculas. Isto é, o aumento da densidade de volume mitocondrial não servia apenas para superar uma limitação metabólica na produção de energia, mas, também, para melhorar a troca de metabólitos entre as mitocôndrias e o citoplasma (Figura 6). Um ponto importante a ser ressaltado é que, ao contrário do que Johnston e Maitland pensavam, não havia uma modificação na relação superfície-volume (superfície específica), ou seja, as mitocôndrias de peixes aclimatados ao frio não aumentavam em tamanho (ou pelo menos no diâmetro), mas, sim, em número. Claro que isso não exclui o fato de que uma ou outra mitocôndria, de fato, aumente seu tamanho. Anos mais tarde, Kilarski *et al.* (1996) reproduziram os dados obtidos por Johnston e Maitland (1980), e também observaram que a densidade de cristas mitocondriais era maior em carpas acimatadas a 5°C (Kilarski *et al.*, 1996).

Conforme mencionado acima, este aumento no conteúdo mitocondrial está associado a um processo chamado de *biogênese mitocondrial*, que controla finamente a proliferação mitocondrial, de forma tecido-específica. Este processo é bastante complexo e pode ser regulado por diferentes processos fisiológicos ou fatores ambientais/estressores, tais como diferenciação celular, exercício e exposição ao frio (Holloszy e Coyle, 1984; Puigserver *et al.*, 1998; Klingenspor, 2003; Weitzel *et al.*, 2003; Kraft *et al.*, 2006; Hood *et al.*, 2006). A coordenação da expressão destes genes depende de proteínas ligadoras de DNA e coativadores (para revisão, Goffart e Wiesner, 2003; Scarpulla, 2006). Dentre as proteínas

ligadoras de DNA, as principais são o Fator 1 Nuclear Respiratório (NRF-1; do inglês *Nuclear respiratory factor-1*) e os Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo (PPAR; do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptors*). O NRF-1 regula a expressão de diversas subunidades da cadeia transportadora de elétrons e do Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM; do inglês *Mitochondrial transcription factor A*. Também pode conhecido como mTFA), enquanto os PPARs formam heterodímeros que regulam genes envolvidos em diversos processos fisiológicos, tais como diferenciação de adipócitos e metabolismo de lipídios (Virbasius e Scarpulla, 1994; Barger e Kelly, 2000; Berger e Moller, 2002; Van Bilsen *et al.*, 2002). Estes fatores transcricionais interagem com proteínas da família dos Coativadores 1 do PPAR γ (PGC-1; do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptors coactivator 1*) (Puigserver *et al.*, 1998; Handschin e Spiegelman, 2006; Scarpulla, 2006).

As respostas à aclimação térmica são muito importantes para os peixes que experimentam variações na temperatura ambiente ao longo de suas vidas. Porém, estas modificações metabólicas têm um custo, por vezes elevado, para estes animais. A mudança na composição lipídica das membranas e o aumento da capacidade oxidativa também podem representar complicações para as mitocôndrias de músculos aclimatados ao frio (Figura 6).

O aumento do número de fosfolipídios poliinsaturados pode elevar o vazamento de prótons durante a oxidação de substratos mitocondriais. O motivo pelo qual os animais endotérmicos têm um maior vazamento de prótons que os ectotérmicos está relacionado, exatamente, a diferenças na poliinsaturação lipídica (Brand *et al.*, 1991). Este vazamento de prótons refere-se à passagem inespecífica de prótons pela membrana interna mitocondrial, que não pela F₀F₁-ATPase, de

modo que há diminuição do potencial de membrana. Neste processo, há consumo de oxigênio, mas sem síntese de ATP, diminuindo, assim, a reserva energética sem benefícios aparentes.

Outro impacto negativo do aumento da atividade mitocondrial é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar danos às estruturas celulares. Os EROs são formados naturalmente durante a fosforilação oxidativa e, por serem moléculas muito reativas, são capazes de “atacar” diversas estruturas celulares. Desta forma, além do vazamento de prótons, o aumento da insaturação dos lipídios também torna as membranas mais sensíveis à peroxidação mediada pelos EROs (Porter, 1984; Pamplona *et al.*, 1999), aumentando a necessidade de mecanismos antioxidantes.

Especula-se que, se o aumento da proliferação mitocondrial serve, primariamente, para facilitar a distribuição intracelular de oxigênio e metabólitos, então a falta de compensação térmica da capacidade oxidativa de proteínas específicas seria uma forma de limitar os impactos negativos da alta atividade mitocondrial (Guderley, 2004b).

1.5 O peixe dourado *Carassius auratus*

Os peixes de aquários vulgarmente conhecidos como Japonês ou Peixinho-dourado são os *Carassius auratus*. Estes peixes pertencem à família dos Ciprinídeos (Cyprinidae), a mesma das carpas e do peixe-zebra, e foi uma das primeiras espécies de peixes domesticadas, sendo um dos peixes de aquário mais comuns no mundo inteiro (Figura 7).



Figura 7: O peixe dourado (*Carassius auratus*). Esta é uma de suas formas mais comumente encontrada em aquários domésticos.

Os peixes dourados exibem uma ampla faixa de tamanhos, formas, cores do corpo e barbatanas. A maior parte das variações é resultado do cruzamento artificial, enquanto que algumas ocorrem por causas naturais associadas com idade ou mudanças do crescimento. A seleção artificial durante a história também intensificou a variabilidade na forma do corpo e nas cores. Geralmente, estes peixes alcançam de 15 a 20 cm e pesam de 100 a 300 g, podendo viver entre 6 e 8 anos, apesar de já ter sido reportado peixes que viveram durante cerca de 30 anos.

Seu habitat típico inclui águas paradas de rios, lagos e lagoas, especialmente aquelas com vegetação aquática submersa, com profundidade de até 20 metros. O peixe dourado é tolerante a altos níveis de turbidez, flutuações de temperatura e baixos níveis de oxigênio dissolvidos na água. Resultados de estudos em laboratório mostraram tolerância a pH numa faixa entre 4,5 e 10,5 e uma preferência por pH entre 5,5 e 7,0. Embora os testes laboratoriais sugiram que os ovos e os filhotes não são tolerantes à salinidade, já foi visto que o peixe dourado é capaz de viver em lagos salgados na costa do mar Negro e de habitar as planícies alagadas do rio Ob

na Rússia. Os peixes dourados já foram capturados em águas com salinidade de cerca de 17 partes por mil (ppm), embora alguns estudos mostrem que eles não são capazes de permanecer por muito tempo em salinidades de 15 ppm. Os peixes adultos vivem bem em salinidade entre 0-6 ppm, além de sobreviverem em águas com temperatura entre 0-41°C e com dureza de 5 a 19 dGH (do inglês, *Degrees of General Hardness*). Outro dado curioso é que esta espécie é mais tolerante à poluição da água que outras espécies de peixes da América do Norte (<http://www.fishbase.org>; Schofield *et. al.*, 2005).

Os peixes dourados são nativos da Ásia central e oriental, incluindo China, Rússia, Coreia e, possivelmente, Japão e Taiwan. Também pode ser nativo de partes da Europa oriental; entretanto, sua transferência expandida por diversos séculos obscurece sua distribuição natural (Figura 8).



Figura 8: Distribuição nativa do peixe dourado ao redor do mundo. Os pontos vermelhos referem-se aos locais onde se pode encontrar o peixe dourado. (Mapa retirado de Point Map for *Carassius auratus auratus* – Disponível em <http://www.obis.org.au/cgi-bin/cs_map.pl>. Acesso em 24/01/2009).

2 JUSTIFICATIVA

O metabolismo energético é de fundamental importância para a homeostase nos seres vivos, por gerar a energia necessária para que estes possam realizar suas funções. Além disso, o metabolismo é capaz de responder, diferencialmente, a diversas condições fisiológicas e estímulos do ambiente, mostrando uma eficiente plasticidade que converge para a manutenção da carga energética celular. Essas situações podem ser causadas, por exemplo, por patologias, atividade física, jejum e exposição ao frio.

Os peixes dourados são animais ectotérmicos e euritérmicos, o que significa que, embora não tenham um controle sobre a temperatura de seus corpos, eles são capazes de suportar uma extensa faixa de temperatura (entre 0-41°C). Ademais, quando em baixas temperaturas, estes peixes são capazes de manter uma atividade natatória, ao contrário de outras espécies de peixes, que permanecem inativas.

Sendo assim, o objetivo central desta dissertação foi avaliar os efeitos da aclimação ao frio sobre o metabolismo energético do músculo branco de peixes dourados. Para isso, peixes foram aclimatados a 5°C e 25°C durante um mês e, ao final deste período, o músculo branco foi retirado para estudo.

A fim de facilitar a compreensão dos resultados obtidos, esta dissertação será dividida em duas partes. A primeira trata da caracterização de uma hexocinase não-citosólica presente em músculo branco de peixes dourados e o efeito da aclimação ao frio sobre a distribuição subcelular da mesma, enquanto que a segunda trata da avaliação do metabolismo mitocondrial de músculo branco de peixes dourados aclimatados a 5°C e 25°C, no qual investigamos as alterações nos parâmetros da

respiração mitocondrial e a possível participação de uma UCP no processo de aclimação ao frio.

2.1 Objetivos

Parte 1: Caracterização da atividade de Hexocinase de músculo branco de peixes dourados: efeito da aclimação ao frio.

A hexocinase é uma enzima de fundamental importância para o metabolismo energético e está presente em todos os organismos. Entretanto, pouco se sabe sobre esta enzima em peixes dourados. Tendo em vista o panorama descrito anteriormente, este primeiro capítulo visa:

- 1) Investigar a distribuição subcelular da HK em frações de músculo branco de peixes dourados.
- 2) Caracterizar cineticamente a atividade HK em frações mitocondriais, denominada aqui de NC-HK
- 3) Avaliar o efeito da aclimação ao frio sobre a distribuição subcelular da HK

Parte 2: Efeito da aclimação ao frio sobre o metabolismo mitocondrial de músculo branco de peixes dourados.

O impacto da aclimação ao frio sobre a atividade de enzimas mitocondriais, a densidade do volume mitocondrial e a composição fosfolipídica de mitocôndrias isoladas é bem conhecido para diversas espécies de peixes (para revisão, Sãnger, 1993; Guderley e St-Pierre, 2002; Guderley, 2004a,b). Ademais, a grande parte destes estudos foca sobre o músculo vermelho. Por outro lado, pouco se sabe sobre o impacto da aclimação ao frio sobre as propriedades funcionais das mitocôndrias

de músculo esquelético branco em ciprinídeos, mais especificamente o peixe dourado. Assim, este segundo capítulo tem como objetivos:

- 1) Avaliar os parâmetros mitocondriais (Estados respiratórios) em peixes aclimatados a 5° e 25°C, utilizando mitocôndrias isoladas e fibras permeabilizadas de músculo branco.
- 2) Avaliar a provável presença de UCPs na respiração mitocondrial de peixes aclimatados

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

A maior parte dos reagentes foi obtida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Reagentes também foram obtidos da Vetec química fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil), Nuclear Casa da química fina Ind. e Com. Ltda. (Diadema, SP, Brasil) e Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, RU).

3.2 Animais

Peixes dourados (*Carassius auratus* L.) foram obtidos de um vendedor local (Duque de Caxias, RJ) e mantidos a temperatura ambiente em aquários de vidro com água desclorada e constantemente aerada e filtrada, com fotoperíodo de 12 h/12 h. Todos os peixes foram alimentados 2-3 vezes por dia com comida comercial apropriada. Os peixes permaneceram nestas condições durante três dias antes do período de aclimação.

3.3 Procedimento de Aclimação

Após o terceiro dia, os peixes foram separados em dois grupos. Um grupo permaneceu a 25°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) e o outro foi transferido para outro aquário e submetido a um procedimento de aclimação, com o uso de uma unidade refrigerada (347 CDG - FANEM[®], São Paulo, Brasil). A temperatura da unidade refrigerada foi gradualmente reduzida (3°C por dia) durante uma semana até chegar a 5°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$). Os animais deste grupo foram mantidos nesta condição por mais

quatro semanas antes de realizar os experimentos. Após este período de aclimação, os peixes de ambos os grupos foram sacrificados e o músculo branco axial foi retirado imediatamente.

3.4 Taxa de ventilação

A taxa de ventilação foi medida através da observação e contagem de movimentos respiratórios externos, como abertura de boca e/ ou opérculo. A frequência destes movimentos durante um período de tempo provê uma medida da taxa de ventilação do peixe. Este parâmetro foi avaliado durante o processo de aclimação em ambos os grupos. Primeiramente, durante todos os dias enquanto a temperatura da unidade refrigerada era diminuída. Após chegar a 5°C, as medidas foram realizadas a cada três dias.

3.5 Características físicas dos peixes

Ao final do período de aclimação, as características físicas (peso e comprimento) dos dois grupos foram medidas a fim de calcular o Fator de condicionamento (F_c), usado como indicativo da condição física do peixe. Visto que o crescimento em peso é proporcional ao crescimento em volume (Fulton, 1902), este fator leva em consideração o peso e o comprimento dos peixes. Valores de k menores que 1,0 indicam que os peixes estão em condições ruins, enquanto que valores de k maiores que 1,4 indicam que os peixes estão em ótimas condições físicas. Este fator é calculado através da equação: $F_c = M \times C^{-3} \times 100$, onde M é a massa do peixe (g) e C é o comprimento padrão (cm) medido da ponta do focinho até o pedúnculo caudal (Figura 9).

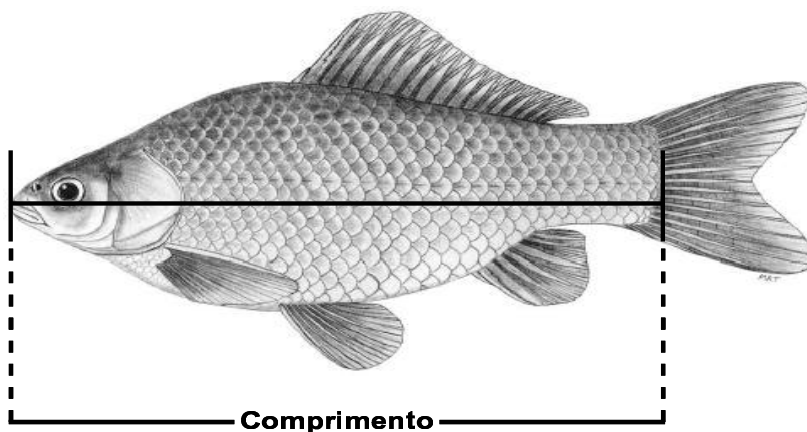


Figura 9: Medida do comprimento utilizado para o cálculo do Fator de condicionamento. Para o cálculo do Fator de condicionamento, descrito no texto, utiliza-se a medida do comprimento entre o focinho e o pedúnculo caudal dos peixes, como mostra a figura.

3.6 Isolamento das frações subcelulares de músculo esquelético

Após o período de aclimação, os animais foram sacrificados por decapitação e o músculo esquelético axial foi removido (2-4 g) e colocado em um tampão gelado - proporção de 1:10 (p/v) - contendo 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 250 mM sacarose, 1 mM EDTA, 4 mM β -mercaptoetanol, 1,5 mM KCl e 0,5 mM PMSF. O tecido foi picotado, triturado quatro vezes (10-15 segundos cada rodada) com auxílio de um IKA-Ultra Turrax T25 Homogenizer (IKA-Works, Wilmington, NC, EUA) e homogeneizado em Potter-Elvehjem. A centrifugação diferencial foi realizada de acordo com o seguinte protocolo (Figura 10): o homogenato total (HT) foi filtrado e centrifugado a 1.000 g por 15 minutos. O precipitado (P1.000) foi ressuspenso no mesmo tampão e o sobrenadante (S1.000) foi filtrado em gaze e centrifugado a 10.000 g por 15 minutos. O precipitado resultante (P10.000) foi ressuspenso no tampão inicial e o sobrenadante (S10.000) foi centrifugado a 100.000 g por 30 minutos. O precipitado (P100.000) foi ressuspenso e o sobrenadante resultante (S100.000) foi coletado. Alíquotas de todos os passos foram coletadas e estocadas a -80°C para posterior dosagem de atividades enzimáticas. O mesmo procedimento

descrito acima foi realizado para o isolamento de frações mitocondriais (P10.000) de cérebro de ratos. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C.

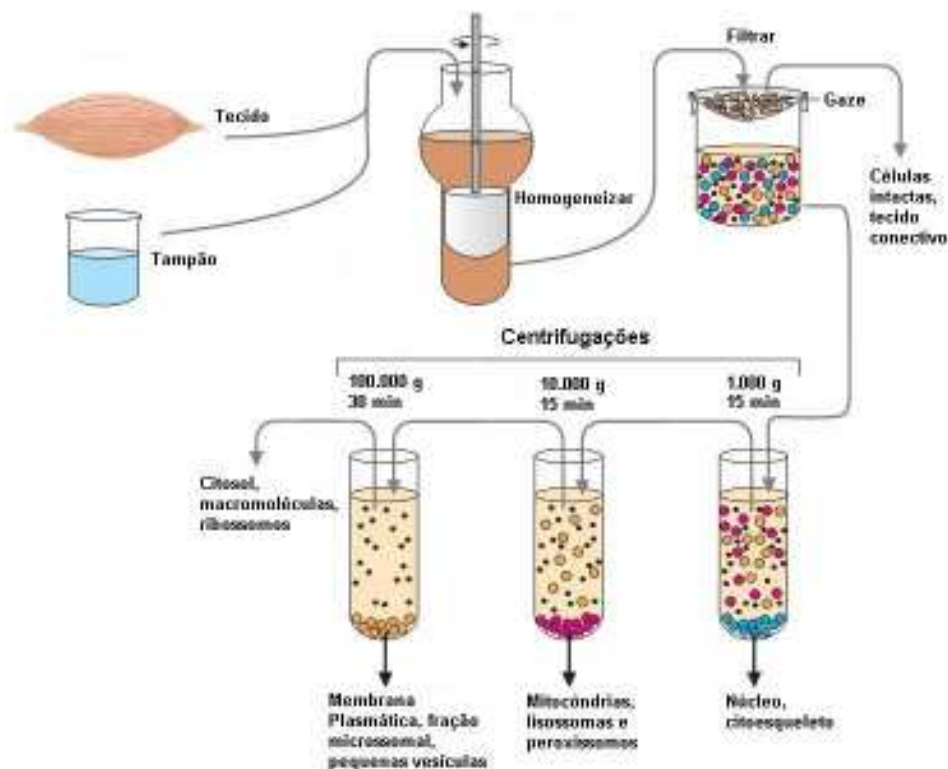


Figura 10: Etapas de obtenção das frações subcelulares de músculo branco de peixes dourados. A obtenção das diferentes frações subcelulares foi realizada de acordo com os passos mostrados. (Figura adaptada de Koolman e Roehm, 2005).

3.7 Isolamento de mitocôndria de músculo branco

Para isolamento das mitocôndrias provenientes dos animais dos diferentes grupos, foi utilizado um protocolo adaptado dos trabalhos de Chappell (1954) e Makinen (1968). Após o período de aclimação, os animais foram sacrificados por decapitação e o músculo branco foi retirado e lavado em tampão básico (TB) contendo 140 mM KCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂ e 1 mM EGTA, pH 7,0. Os contaminantes foram retirados e o tecido foi picotado no mesmo tampão (1 mL/g de tecido) e, posteriormente, acrescido de tampão de homogeneização – TH – (4 mL/g de tecido) contendo 140 mM KCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 1 mM

ATP, 10 mg/mL albumina sérica bovina (BSA; do inglês *Bovine serum albumin*) e 0,25 mg/g de tecido de tripsina, pH 7,0. A homogeneização foi feita em Potter-Elvehjem e o homogenato centrifugado a 500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, filtrado e recentrifugado a 500 g por 10 minutos. O novo sobrenadante coletado diluído duas vezes com TH e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensão em TB e incubado no gelo por 3 minutos. Terminada a incubação, a amostra foi centrifugada a 500 g por 10 minutos e o sobrenadante resultante centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. Ao final desta centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em TB e mantido no gelo para posterior análise dos parâmetros mitocondriais.

3.8 Determinação da concentração de proteína

A concentração das proteínas das frações subcelulares e da mitocôndria isolada foram determinadas de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores (1951) utilizando BSA como padrão.

3.9 Preparação de fibras permeabilizadas de músculo branco

Parte do músculo obtido foi separado e congelado a -80°C para posterior análise das atividades enzimáticas, enquanto que cerca de 100 mg foram utilizados para experimentos de respirometria. A permeabilização foi feita de acordo com o protocolo utilizado por Kuznetsov e colaboradores (Kuznetsov, 2004). Resumidamente, as amostras foram separadas em pequenas fibras e colocadas em placas de Petri contendo solução de relaxamento composta de 2,77 mM CaK₂EGTA, 7,23 mM K₂EGTA ($[Ca^{2+}]_{livre} = 0,1 \mu M$), 20 mM imidazol, 20 mM taurina, 6,56 mM

MgCl₂, 5,77 mM ATP, 15 mM fosfocreatina, 0,5 mM ditioneitol e 50 mM K-MES, pH 7,1. As fibras foram permeabilizadas sob agitação suave durante 30 minutos a 4°C em solução de relaxamento contendo 50 µg/mL de saponina. Após esse período, as fibras foram lavadas em meio de respiração (composição abaixo), sob agitação, durante 10-15 minutos e mantidas neste meio até o ensaio.

3.10 Consumo de O₂ em mitocôndrias isoladas

As medidas de consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas foram realizadas em um oxígrafo acoplado a um eletrodo do tipo Clark (Hansatech Instruments, Ltd., usando o *software* OXYGRAPH V1.01, Norfolk, Inglaterra). Mitocôndrias isoladas (0,2 mg/mL) foram incubadas em 0,5 mL de meio de respiração (60 mM Tris-HCl, pH 7,4, 60 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂ e 0,5 mM EDTA e 0,2 mg/mL de albumina sérica bovina isenta de ácidos graxos - BSA_{FFA}) a 25°C. A cubeta foi fechada imediatamente antes de iniciar o experimento. Os substratos utilizados foram: 5 mM piruvato + 5 mM malato para o complexo I e 10 mM succinato acrescido de 1 µM de rotenona para o complexo II. O estado 3 (estado fosforilativo) foi obtido com a adição de 0,15 mM de ADP. O estado 4o (inibido por oligomicina) foi obtido através da adição de 1 µg/mL de oligomicina, enquanto que o estado 3u (estado desacoplado) foi obtido com a adição de 0,1-0,5 µM de FCCP. As taxas respiratórias estão representadas como nmol O₂ mg⁻¹ proteína mitocondrial min⁻¹.

3.11 Consumo de O₂ em fibras permeabilizadas

O consumo de oxigênio em fibras permeabilizadas foi medido a 25°C em respirômetros de alta resolução (Oroboros, Oxygraph; Innsbruck, Áustria) (Gnaiger, 2001). O meio de respiração era composto de 110 mM sacarose, 60 mM K-MES, 0,5 mM EGTA, 1 mg/mL BSA_{FFA}, 3 mM MgCl₂, 20 mM taurina, 10 mM KH₂PO₄ e 20 mM K-HEPES, pH 7,1 (Gnaiger et al, 2000). O *software* DatLab (Oroboros, Oxygraph; Innsbruck, Áustria) foi utilizado para aquisição dos dados e análise dos mesmos. Os substratos (e suas concentrações) utilizados nos experimento de respirometria com fibras permeabilizadas foram os mesmos utilizados para a respirometria com mitocôndrias isoladas, com exceção do ADP e FCCP, cujas concentrações foram 2 mM e 0,5 µM, respectivamente. As taxas respiratórias estão representadas como pmol O₂ mg⁻¹ de tecido s⁻¹.

Para os experimentos de verificação da presença de proteínas desacopladoras, foi utilizado o mesmo meio de respiração descrito acima, porém sem 1 mg/mL de BSA_{FFA}. Além disso, onde indicado, palmitato, GDP e BSA_{FFA} foram adicionados.

3.12 Determinação das Atividades enzimáticas

Todas as atividades enzimáticas foram determinadas a 25°C, com exceção das atividades da HK de cérebro de rato, que foram realizadas a 37°C. As leituras espectrofotométricas foram feitas em um espectrofotômetro (Hitachi U-2000, Hitachi High Technologies America, Inc., California, EUA) e as radiométricas, em um cintilador (Beckman LS 6000SC, Beckman Coulter UK Ltd., High Wycombe, RU).

A atividade da HK foi determinada pela formação de NADH a 340 nm de acordo com Crabtree e Newsholme (1972), com algumas modificações. O meio de

reação continha 75 mM Tris-HCl pH 7,5, 7,5 mM MgCl₂, 0,8 mM EDTA, 1,5 mM KCl, 2,5 mM ATP, 4 mM β-mercaptoetanol, 0,1 % triton X-100, 0,5mM β-NAD⁺, 5 mM glicose e 0,5 U/mL glicose-6 fosfato desidrogenase (*Leuconostoc mesenteroides*). A lactato desidrogenase, a fosfoglicomutase e a piruvato cinase foram determinadas de acordo com método descrito por Lushchak e colaboradores (2001); a citrato sintase foi medida de acordo com Suarez e colaboradores (1986); a atividade ATPásica mitocondrial foi determinada através da liberação de Pi proveniente da hidrólise de ATP na ausência e na presença de 5 mM NaN₃ num meio de reação contendo 50 mM MOPS-Tris pH 7,0, 4 mM MgCl₂ e 1 mM ATP. A diferença entre estas atividades é referida como atividade ATPásica sensível a NaN₃ e está relacionada ao complexo da F₀F₁-ATPase. O fosfato inorgânico (P_i) liberado foi medido através de um método colorimétrico (Fiske e Subbarow, 1925).

Para as medidas dos parâmetros cinéticos da mt-HK, as concentrações de glicose, frutose e manose variaram entre 0 e 100 mM; para ATP, GTP e ITP, as concentrações variaram entre 0 e 3 mM. As cinéticas com inibidores foram realizados variando-se as concentrações de ADP e AMP (0–3 mM), Pi (0–10 mM), N-acetilglicosamina (NAG; 0–100 mM) e manoheptulose (MHP; 0–100 mM). Quando frutose foi usada como substrato da HK, 1 U/mL de fosfoglicose isomerase foi adicionada ao meio de reação e, para ensaios com manose como substrato, 2 U/mL de fosfomanose isomerase e 1 U/mL de fosfoglicose isomerase foram adicionadas ao meio de reação. Para medidas cinéticas dos nucleotídeos-5'-trifosfato, 10 mM de fosfocreatina e 1 U/mL de creatina cinase foram acrescentadas ao meio de reação como sistema regenerador de NTP, a fim de manter constantes as concentrações dos substratos usados.

O efeito da G-6-P foi medido por um ensaio radiométrico utilizando [$^{14}\text{C}_1$]-manose como substrato e ensaiado como previamente descrito por Stanley e colaboradores (1984), mas com leves modificações. O meio de reação utilizado foi composto de 75 mM Tris-HCl pH 7.5, 7,5 mM MgCl_2 , 0,8 mM EDTA, 1,5 mM KCl, 2,5 mM ATP, 4 mM β -mercaptoetanol, 0,1% triton X-100 (v/v), 5 mM NaF, 5 mM NaN_3 e 2 mM [$^{14}\text{C}_1$]-manose 18,5 Bq nM (Amersham Pharmacia Biotech). A reação foi iniciada com a adição da amostra e incubada por 30 min em um volume final de 30 μl . A reação foi parada com a adição de 30 μl de etanol absoluto gelado. Alíquotas de 25 μl da amostra final foram colocadas no centro de discos de troca iônica Whatman DE 81 (Whatman, Maidstone, Kent, RU). Os discos foram secos e depois colocados em um sistema de filtração a vácuo, no qual eles foram lavados 8 vezes com 15 ml de água deionizada. A quantidade de produto fosforilado adsorvido nos discos foi determinada em um cintilador. Um ensaio com fração mitocondrial de cérebro de rato foi realizado em paralelo e utilizado como controle positivo da medição da inibição por G-6-P.

As constantes cinéticas foram calculadas por análise de regressão não-linear aplicada à equação de Michaelis-Menten usando o *software* PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). De acordo com Van den Thillart e Smit (1984), a HK de peixes dourados é muito sensível e sua atividade é perdida após cerca de 24 h de estocagem. Assim, todos os ensaios de HK foram realizados no máximo 12 h após a preparação das frações.

3.12 Análise estatística

Todos os dados foram analisados com o uso do *software* PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) e expressos como média \pm erro padrão. O teste

de *Student* foi usado para comparar as diferenças entre dois grupos, enquanto que o teste ANOVA, seguido pelo teste *Student-Newman-Keuls* (para detectar diferenças entre os grupos) foi utilizado para comparar mais de dois grupos. $P < 0,05$ foi usado para rejeitar a hipótese nula.

4 RESULTADOS

4.1 Taxa de ventilação

Embora indireto, a taxa de ventilação é um importante parâmetro para a avaliação da capacidade respiratória do peixe. Visto que a respiração dos peixes é branquial, a abertura do opérculo está intimamente ligada à respiração do animal. De acordo com a Figura 11, observamos que os animais mantidos a 25°C apresentaram uma taxa de ventilação relativamente estável durante o período de aclimação ($119,5 \pm 0,7$ aberturas de opérculo/ min), com pequenas flutuações que não foram significativas (Figura 11, círculos fechados). Em contrapartida, os animais submetidos à aclimação à baixa temperatura apresentaram uma redução na sua atividade respiratória. Esta redução foi gradativa de acordo com a diminuição da temperatura da água (Figura 11, círculos abertos) e alcança seu valor mais baixo ($32,3 \pm 0,9$ aberturas de opérculo/ min) quando a temperatura da água atinge 5°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$), uma semana após o início do período de aclimação. A partir do 10º dia de aclimação, pudemos observar que esta atividade respiratória apresenta uma pequena elevação, alcançando um platô por volta de 46 aberturas de opérculo/ min. Este platô sugere uma compensação parcial para a aclimação à baixa temperatura.

4.2 Fator de condicionamento

Ao final da aclimação, analisamos as características físicas (peso e comprimento) dos animais e calculamos o fator de condicionamento. Visto que a massa corpórea pode afetar o metabolismo (Hochachka, 1987), uma mudança

significativa poderia estar relacionada a um efeito do processo de aclimação. A análise deste fator indicou que nenhuma mudança física aparente ocorreu durante o processo de aclimação (Tabela 2). Assim, todos os peixes aclimatados foram utilizados para os experimentos posteriores de análise da capacidade oxidativa mitocondrial e atividades enzimáticas.

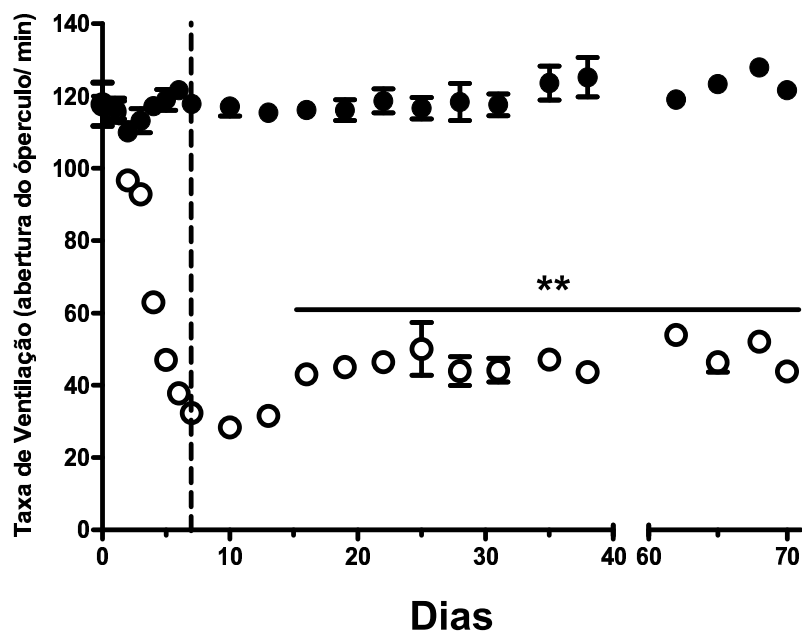


Figura 11: Efeito da temperatura sobre a taxa de ventilação de peixes dourados. A taxa de ventilação foi medida como descrito na metodologia. O grupo controle (●) foi avaliado apenas a 25°C durante todo o período de aclimação e o grupo submetido à aclimação ao frio (○) foi avaliado em diferentes temperaturas (25°, 22°, 19°, 16°, 13°, 10°, 7° e 5°C) durante a primeira semana. Após esse período, a temperatura de medida foi fixada em 5°C e as medidas foram realizadas a cada 3 dias. Valores são médias \pm s.e.m de 12 peixes por grupo experimental. ** $P < 0,001$ em relação aos dias anteriores de aclimação ao frio.

4.3 Atividades específicas de enzimas glicolíticas e mitocondriais em frações mitocondriais e citosólicas

Como descrito acima, a aclimação ao frio é capaz de promover mudanças em diversas enzimas envolvidas no metabolismo muscular do peixe dourado, sendo que estes efeitos estão principalmente associados ao metabolismo oxidativo mitocondrial, enquanto que a via glicolítica permanece inalterada ou levemente

diminuída (Sidell, 1980, Van den Thillart e Smit, 1984, Johnston *et al.*, 1985). A fim de investigar o efeito da aclimação ao frio sobre os metabolismos glicolítico e mitocondrial, nós medimos as atividades das enzimas Hexocinase (HK), Fosfoglicomutase (FGM), Lactato desidrogenase (LDH), Piruvato cinase (PK), F₀F₁-ATPase e Citrato sintase (CS) em duas frações subcelulares distintas: mitocondrial e citosólica.

Tabela 2: Características físicas dos peixes dourados utilizados nos experimentos. O fator de condicionamento foi calculado como descrito na metodologia. Valores são médias \pm s.e.m (número de peixes).

Grupo	Peso, g	Comprimento, cm	Fator de Condicionamento
Aclimatado a 25°C	22,41 \pm 1.26 (16)	6,24 \pm 0.13 (16)	9,15 \pm 0.24 (16)
Aclimatado a 5°C	24,79 \pm 1.04 (20)	6,29 \pm 0.11 (20)	9,76 \pm 0.25 (20)

Como visto na Tabela 3, as enzimas citosólicas tiveram baixa atividade específica na fração mitocondrial, o que indica um baixo nível de contaminação. Da mesma forma, a atividade específica das enzimas mitocondriais foi baixa na fração citosólica, sugerindo uma baixa contaminação. Esse baixo teor de contaminação das frações é importante, pois sugere que o protocolo adotado é funcional.

As enzimas CS (ciclo de Krebs) e F₀F₁-ATPase (Complexo V mitocondrial) tiveram um aumento de 2,4 e 3 vezes, respectivamente, em suas atividades específicas na fração mitocondrial de músculo branco de peixes aclimatados a 5°C quando comparados aos peixes aclimatados a 25°C. Em contrapartida, nenhuma alteração significativa foi observada nas atividades das enzimas glicolíticas (FGM, LDH e PK) tanto na fração mitocondrial quanto na fração citosólica (Tabela 3). Curiosamente, a atividade da HK foi cerca de 20 vezes maior na fração mitocondrial do que na fração citosólica, sugerindo uma localização subcelular diferente da

esperada. Além disso, esta atividade localizada na fração enriquecida de mitocôndria foi 2 vezes maior em peixes aclimatados a 5°C.

Tabela 3: Atividades específicas de enzimas citosólicas e mitocondriais em peixes dourados aclimatados a 5° e 25°C. As atividades específicas foram medidas como descrito na *Metodologia* e estão expressas como nmol de produto $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. As frações Citosólica e Mitocondrial correspondem às etapas de centrifugação P10.000 e S100.000, respectivamente. Valores são médias \pm s.e.m de 1-3 peixes por grupo (número entre parênteses), sendo que as medidas para cada peixe são resultados de uma triplicata. [#]P<0.05, ^{*}P<0.01 comparados ao aclimatados a 25°C. ^aNA = Nenhuma Atividade detectada

Enzimas	Condições	Frações subcelulares	
		Fração	Fração
		Mitocondrial	Citosólica
Hexocinase	25°C	41 \pm 10	2 \pm 1
	5°C	83 \pm 6 [*]	3 \pm 1
Fosfoglicomutase	25°C	58 \pm 29	1.030 \pm 70
	5°C	100 \pm 39	1.100 \pm 70
Lactato Desidrogenase	25°C	289 \pm 80	4.652 \pm 404
	5°C	390 \pm 80	4.773 \pm 345
Piruvato Cinase	25°C	319 \pm 55	2.328 \pm 88
	5°C	410 \pm 111	2.422 \pm 316
F ₀ F ₁ -ATPase	25°C	148 \pm 23	33 \pm 14
	5°C	365 \pm 54 [#]	21 \pm 14
Citrato Sintase	25°C	22 \pm 6	NA ^a
	5°C	55 \pm 5 [#]	NA ^a

Estes resultados sugerem que o músculo branco de peixes dourados aumentou sua capacidade oxidativa em resposta à aclimação ao frio, mas a via glicolítica permaneceu praticamente inalterada. Ademais, a atividade hexocinásica parece ter um papel durante a aclimação ao frio, visto que sua atividade aumentou de forma proporcional às enzimas mitocondriais.

Devido a estes achados com relação à atividade hexocinásica, esta dissertação será, a partir de agora, dividida em duas partes: (i) Caracterização da atividade de Hexocinase de músculo branco de peixes dourados: efeito da aclimação ao frio; e (ii) Efeito da aclimação ao frio sobre o metabolismo mitocondrial de músculo branco de peixes dourados.

4.4 Parte 1

4.4.1 Distribuição subcelular da atividade de hexocinase de músculo branco de peixe dourado

Para investigar a distribuição subcelular da atividade de HK em músculo branco de peixes dourados, fizemos uma centrifugação diferencial a fim de separar as diferentes frações subcelulares. Como observado na Figura 10, diferentes organelas celulares são obtidas nos precipitados a cada passo de centrifugação. Além disso, é importante ressaltar que o sobrenadante seguinte contém menos contaminantes das organelas do precipitado anterior.

A análise da atividade da HK nestas frações mostrou que a atividade total da HK de músculo branco de peixe se encontrava igualmente distribuída entre as frações citosólica e mitocondrial, com uma menor contribuição da fração microsomal (Figura 12A). Embora a atividade total da HK tenha sido basicamente a mesma nas frações subcelulares, as maiores atividades específicas foram encontradas nas frações enriquecidas em mitocôndria e microsoma, respectivamente (Figura 12B). Estes dados sugerem que, ao contrário do esperado,

a atividade específica da HK está principalmente associada a frações particuladas em músculo branco de peixes dourados.

Por outro lado, a atividade HK em frações enriquecidas de mitocôndria, além de ser bem conhecida em animais e plantas, parece estar associada a diversos eventos metabólicos importantes, tanto em células normais quanto tumorais (Wilson, 1995, 2003; Mathupala *et al.*, 2006; Claeysen e Rivoal, 2007). Esta importância crescente que tem sido dada à relação entre HK e mitocôndria, associada ao fato de que, em músculo branco de peixes dourados, a maior atividade específica está na fração mitocondrial, levou-nos a caracterizar as propriedades cinéticas apenas desta atividade não-citosólica de HK (NC-HK) em frações enriquecidas de mitocôndrias.

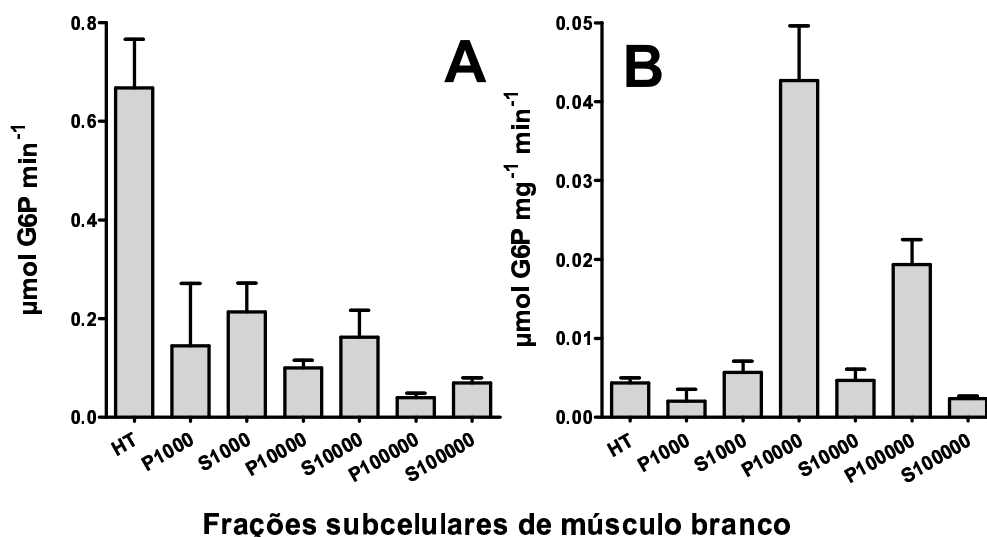


Figure 12: Distribuição subcelular da atividade HK em músculo branco de peixes. Atividade total (A) e específica (B) em diferentes frações subcelulares de músculo branco de peixes dourados. As frações são: homogenato total (HT); precipitado (P1000) e sobrenadante (S1000) de 1000 g; precipitado (P10,000) e sobrenadante (S10,000) de 10000 g; precipitado (P100,000) e sobrenadante (S100,000) de 100000 g. Valores são médias \pm s.e.m de 9 medidas (3 preparações diferentes). Para detalhes sobre o fracionamento subcelular, ver item 3.6 e Figura 10.

4.4.2 Propriedades cinéticas da NC-HK de peixes dourados

Primeiramente, medimos as constantes cinéticas para hexoses e nucleotídeos-5'-trifosfatos (NTPs) em NC-HK de músculo branco de peixes dourados

(Figura 13 e Tabela 4). Um maior valor de V_{\max} foi encontrado para NC-HK quando glicose foi utilizada como substrato, enquanto que manose mostrou uma menor V_{\max} que a glicose (glicose: $0,034 \pm 0,001 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$; manose: $0,022 \pm 0,001 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, $P = 0,0001$). Curiosamente, a frutose não foi um substrato eficiente para NC-HK até 50 mM (Figura 13A), o que está em contraste com a atividade de HK de músculo de mamíferos (Sols and Krane, 1954; Katzen e Schimke, 1965; Grossbard e Schimke, 1968). A análise dos parâmetros cinéticos para NTP's mostrou que, para ATP, a V_{\max} obtida foi similar a encontrada para glicose como substrato ($0,034 \pm 0,001 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, Figura 13B e Tabela 4), mas nenhuma atividade de HK foi detectada quando GTP e ITP foram testados como doadores de fosfato. Logo, parece que a NC-HK utiliza apenas o ATP como nucleotídeo doador de fosfato (Figura 13B).

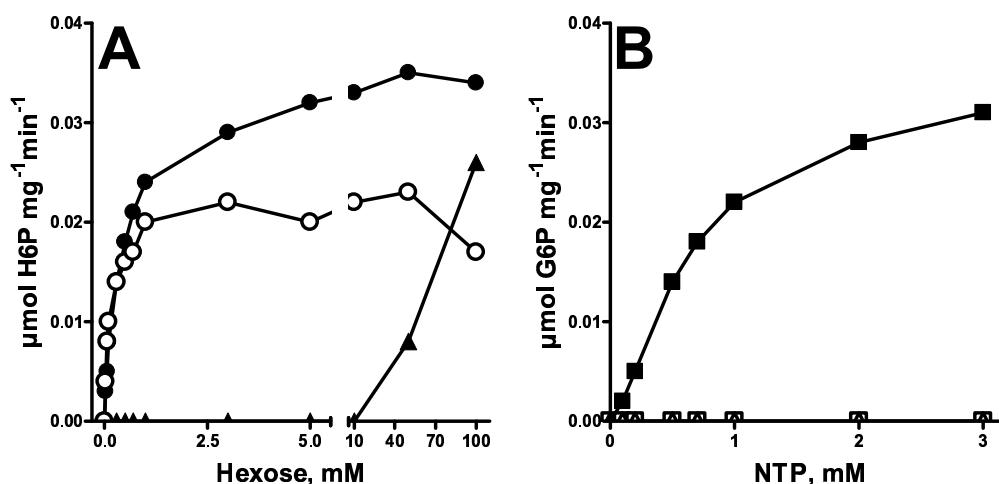


Figura 13: Parâmetros cinéticos da atividade NC-HK em fração mitocondrial. (A) hexoses utilizadas como substratos: glicose (●), manose (○) e frutose (▲). (B) nucleotídeos-5' trifosfato: ATP (■), GTP (□) e ITP (△). Valores são médias \pm s.e.m de 4-5 medidas (4 preparações diferentes). As figuras A e B mostram apenas a média dos experimentos.

As afinidades aparentes (K_m) para glicose, manose e ATP foram calculadas e estão descritas na Tabela 4. Visto que a NC-HK não alcançou uma atividade máxima com frutose e não teve atividade com GTP e ITP como doadores de fosfato, não foi

possível calcular o K_m aparente para estes substratos. Como visto na Tabela 1, a NC-HK de músculo branco de peixes dourados tem uma afinidade maior por manose que por glicose (glicose: $0,43 \pm 0,03$ mM; e manose: $0,14 \pm 0,02$ mM, $P < 0,001$), indicando que esta isoenzima fosforila preferencialmente manose. Isto também pode ser observado através da razão V_{max}/K_m , a qual indica a eficiência catalítica da enzima. Assim, foi visto que a NC-HK exibiu uma eficiência catalítica 2 vezes maior para manose que para glicose (Tabela 4). Para o ATP, que foi a única molécula doadora de fosfato utilizada pela NC-K, o K_m foi similar ao encontrado para a HK II de mamíferos (NC-HK músculo branco de peixe dourado: $0,88 \pm 0,05$ mM; HK II de mamífero: 0,7 mM, Wilson, 2003).

Tabela 4: Constantes cinéticas da atividade NC-HK de peixe dourado. Os valores de K_m para hexoses foram medidos com 2,5 mM ATP, enquanto que os valores de K_m para NTPs foram medidos com 5 mM glicose. Valores são médias \pm s.e.m de 4-5 medições (4 preparações diferentes). *** $P < 0,001$ comparado à glicose. ^a V_{max} = nmol hexose 6-P $mg^{-1} min^{-1}$; ^b K_m = mmol l^{-1} ; ^cND = Não Determinado; ^dNA = Nenhuma Atividade detectada

Substratos	V_{max}^a	K_m^b	V_{max}/K_m
Glicose	34 ± 1	$0,43 \pm 0,03$	79
Frutose	ND ^c	ND	ND
Manose	$22 \pm 1^{***}$	$0,14 \pm 0,02$	157
ATP	39 ± 3	$0,88 \pm 0,05$	44
GTP	NA ^d	NA	NA
ITP	NA	NA	NA

4.4.3 Efeito do ADP, AMP e P_i sobre a atividade da NC-HK

Posteriormente, testamos os efeitos do ADP, AMP e P_i sobre a atividade da NC-HK. Estas moléculas são conhecidas por terem atividades inibitórias sobre as isoenzimas de mamíferos (Hanson e Fromm, 1967; Lueck e Fromm, 1974; Ganson e

Fromm, 1985; Wilson, e 2003). Entretanto, o efeito destes inibidores foi menos pronunciado sobre a atividade de NC-HK de peixes dourados (Tabela 5). Observamos que o ADP e o AMP (ambos a 3 mM) inibiram, respectivamente, 23% e 41% da atividade da NC-HK. Além disso, a maior concentração utilizada de P_i (10 mM) foi capaz de inibir apenas 12% da atividade da NC-HK. Estes resultados sugerem que a NC-HK de músculo branco de peixes dourados é menos sensível à possível inibição alostérica promovida pelo ADP, AMP e P_i .

Tabela 5: Perfil inibitório da atividade NC-HK de peixe dourado. Para ADP, AMP e P_i , o efeito inibitório foi medido de 4-9 vezes (3-4 preparações diferentes); para G-6-P, 4 vezes (3 preparações) e, para NAG e MHP, 3 vezes (1 preparação). [#] $P < 0,05$ comparado a 100% de atividade (nmol G-6-P $mg^{-1} min^{-1}$ medida na ausência do inibidor). As médias \pm s.e.m (ou s.d. para NAG e MHP) do valor de 100% da atividade para todas as condições foram 33 ± 1 . ^aEfeito inibitório máximo observado.

Inibidores	% inibição ^a
ADP	23%
AMP	41% [#]
P_i	12%
MHP	100% [#]
NAG	88% [#]
G-6-P	86% [#]

4.4.4 Efeito da G-6-P sobre a atividade da NC-HK

Visto que uma das propriedades mais marcantes das isoenzimas HK I e II de mamíferos é a forte inibição pelo próprio produto, G-6-P ($K_i = 0,02$ mM, Wilson, 2003), nós nos perguntamos se a G-6-P seria capaz de inibir também a NC-HK de peixe dourado. Normalmente, a atividade da HK é medida pelo ensaio acoplado, que detecta a G-6-P formada. Entretanto, a adição de G-6-P exógena neste caso impossibilita o uso do ensaio acoplado para a determinação do efeito inibitório da G-

6-P. Assim, a fim de investigar este efeito, utilizamos uma metodologia alternativa, através de um ensaio radiométrico, utilizando $[^{14}\text{C}]$ -manose como substrato. Isto foi possibilitado pela capacidade que a NC-HK de peixe dourado tem de fosforilar manose, com uma eficiência catalítica maior para esta hexose em relação à glicose (Tabela 4).

De forma semelhante à HK de mamíferos, a NC-HK de músculo branco de peixes dourados foi fortemente inibida por G-6-P (Figura 14A, círculos abertos) e o K_i estimado está numa concentração similar à observada em HK-I e II de mamíferos (K_i NC-HK = 0,038 mM). A fim de validar o resultado obtido por meio da análise radiométrica, realizamos um ensaio paralelo com fração mitocondrial de cérebro de rato, que expressa, predominantemente, HK-I, a qual é conhecidamente inibida por G-6-P (Wilson, 2003). O resultado observado com HK de cérebro de rato foi semelhante ao já descrito na literatura (Figura 14A, círculos abertos).

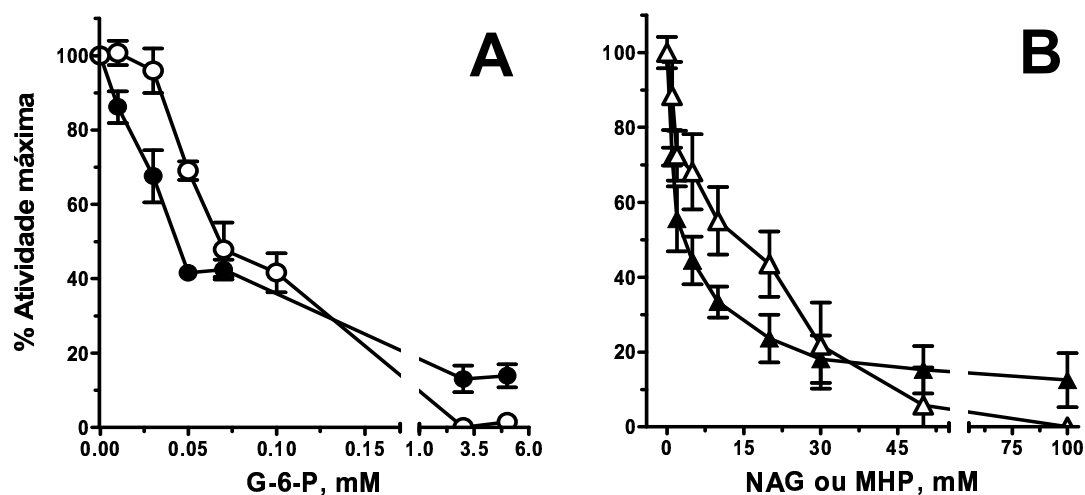


Figura 14: Efeito da glicose-6-fosfato (A) e análogos de glicose (B) sobre a atividade da NC-HK em fração mitocondrial. (A) efeito da G-6-P sobre a atividade de HK de músculo branco de peixes dourados (●) e cérebro de rato (○). (B) Análogos de glicose em peixes dourados: NAG (▲) e MHP (△). Valores são médias \pm s.e.m para G-6-P em peixes dourados: 4 medidas (3 preparações diferentes); e médias \pm s.d. para G-6-P em ratos (4 medidas de 1 preparação) e para NAG e MHP em peixes dourados (3 medidas de 1 preparação).

4.4.5 Efeito de análogos de glicose, NAG e MHP, sobre a atividade da NC-HK

Em mamíferos já é bem caracterizado que análogos de glicose inibem a atividade da HK de maneira competitiva com relação à glicose (Sols e Crane, 1954; Grossbard e Schimke, 1966). Testamos o efeito de dois destes análogos, NAG e MHP, sobre a atividade da NC-HK. Para uma concentração fixa de glicose (5 mM), NAG e MHP inibiram a atividade da NC-HK de forma dose dependente (Figura 14B). A 100 mM, a atividade da NC-HK foi inibida por NAG e MHP em 88% e 100%, respectivamente (Tabela 5). Logo, assim como a HK de mamíferos, a NC-HK de peixe dourado também é inibida por análogos de glicose, tais como NAG e MHP.

4.4.6 Efeito da aclimação ao frio sobre a atividade de hexocinase de músculo branco de peixe dourado

A aclimação ao frio promove diversas adaptações no metabolismo do músculo branco de peixes dourados. Já foi mostrado previamente que a atividade da HK aumenta após a aclimação térmica (Van den Thillar e Smit, 1984; Johnston *et al.*, 1985), mas estas atividades foram analisadas em sobrenadante de 1.000 g, o qual contém as frações solúveis e particuladas juntas. Sendo assim, não se sabe se a aclimação ao frio promove um efeito específico em uma fração ou um efeito generalizado. A fim de investigar esta questão, analisamos se a distribuição subcelular da atividade de HK após um mês de aclimação a 5°C ocorria em frações subcelulares específicas, uma vez que nossos achados sugerem que a maior atividade específica está localizada na fração particulada, isto é, mitocôndria e microssoma.

Após o período de aclimação, preparamos as frações subcelulares de músculo branco de peixes aclimatados a 5° e 25°C e medimos a atividade de HK

nestas frações (Figura 15). Os peixes aclimatados a 5°C apresentaram um perfil de localização subcelular das atividades total e específica da HK semelhante ao encontrado para os peixes aclimatados a 25°C. Contudo, como previamente descrito por Van den Thillart e Smit (1984) e Johnston *et al.* (1985), a aclimação ao frio promoveu um aumento na atividade da HK tanto no homogenato total (2,6 vezes) quanto no sobrenadante de 1000 g (3,8 vezes). Além disso, observamos que este aumento na atividade da HK ocorreu apenas na fração particulada, isto é, mitocôndrias e microsoma, enquanto que nenhuma mudança foi observada na fração citosólica (Figura 15A). Curiosamente, o maior aumento de atividade foi observado na fração microsossomal (7,6 vezes), enquanto que a fração mitocondrial teve um aumento de 2,8 vezes em peixes aclimatados a 5°C comparados aos peixes aclimatados a 25°C. Da mesma forma, as atividades específicas foram maiores nos peixes aclimatados ao frio, seguindo o mesmo perfil exibido pela atividade total (Figura 15B). As frações mitocondrial e microsossomal tiveram um aumento de 2 e 3,8 vezes, respectivamente. Mais uma vez, a atividade específica da HK na fração citosólica não foi alterada em resposta à aclimação ao frio.

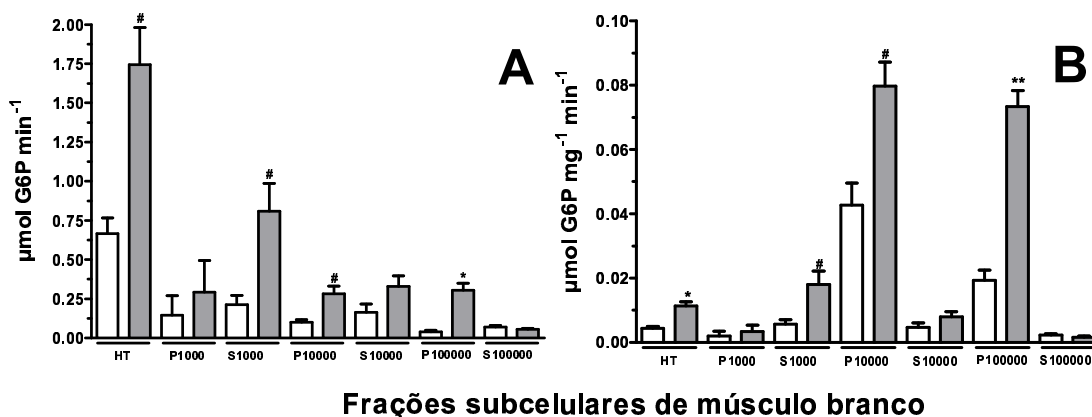


Figura 15: Distribuição subcelular da atividade HK em músculo branco de peixes: efeito da aclimação ao frio. Atividade total (A) e específica (B) em diferentes frações subcelulares de músculo branco de peixes dourados. As frações são as mesmas da Figura 10. As barras brancas representam os peixes mantidos a 25°C e as barras cinzas, os peixes aclimatados a 5°C. Valores são médias \pm s.e.m de 9 medidas (3 preparações diferentes por grupo). [#]P<0,05, ^{*}P< 0,01, ^{**}P< 0,001 comparado com o grupo aclimatado a 25°C. Para detalhes sobre o fracionamento subcelular, ver item 3.6 e Figura 10.

4.5 Parte 2

4.5.1 Análise do metabolismo mitocondrial dos peixes controle e aclimatados ao frio: abordagens utilizadas

Paralelamente ao estudo e caracterização da HK, nós também avaliamos possíveis efeitos da aclimação no metabolismo mitocondrial de músculo branco de peixes aclimatados a 5°C.

Em diversas espécies de peixes, tais como truta arco-íris, carpas e robalo-muge, a aclimação a baixas temperaturas promove diversas mudanças metabólicas, principalmente no que diz respeito ao metabolismo muscular mitocondrial (para revisão, Sanger, 1993; Guderley, 2004). A fim de verificar os efeitos da aclimação ao frio sobre o metabolismo mitocondrial de músculo branco de peixes dourados, realizamos medidas de consumo de oxigênio em peixes aclimatados a 5° e 25°C por um mês. Para isso, duas abordagens distintas foram utilizadas: mitocôndrias isoladas e fibras permeabilizadas. Estas abordagens foram utilizadas a fim de evitar os possíveis problemas decorrentes do uso de apenas uma delas na investigação das funções mitocondriais, visto que ambas as técnicas possuem vantagens e desvantagens. O Quadro 1 mostra um comparativo entre as duas maneiras utilizadas nesta dissertação. O isolamento de mitocôndrias é o modelo mais utilizado para o estudo das funções mitocondriais. Entretanto, o baixo rendimento e a relativa instabilidade da mitocôndria nesta condição são desvantagens importantes deste método. Além disso, este procedimento exige grande quantidade de material, tornando-se inviável em algumas situações. As fibras

permeabilizadas provêm um ambiente mais próximo do fisiológico para a mitocôndria e quase não há perda desta organela durante o procedimento.

Ao contrário das suspensões de mitocôndrias isoladas, que permitem investigar quantidades reproduzíveis deste material, é preciso considerar a compartimentalização intercelular para as fibras permeabilizadas. Ou seja, o conteúdo mitocondrial de fibras com o mesmo peso podem variar, resultando em diferentes respostas respiratórias.

	Mitocôndria isolada	Fibra permeabilizada
Quantidade de tecido utilizada	100-250 mg	10-50 mg
Tempo de preparação	Cerca de 100 minutos	45 minutos
Rendimento de mitocôndria	10-40%	> 90%
Estabilidade das funções	4-5 h	> 20 h
Estado morfológico	Inchadas, espaço intermembranar aumentado	Não inchada
Homogeneidade da amostra	Suspensão homogênea	Fibras individuais, compartimentalização intercelular
ATPases extramitocondriais	Baixa	Alta
Funções do complexo celular	Não preservadas	Parcialmente preservadas

Quadro 1: Comparação entre o uso de mitocôndrias isoladas e fibras permeabilizadas para investigar as funções mitocondriais. Ambas as abordagens possuem peculiaridades, que podem ser vantajosas ou não, dependendo da situação. (Quadro modificado de Sperl *et al.* 1997).

4.5.2 Efeito da aclimação ao frio sobre a respiração em mitocôndrias isoladas

As taxas de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de músculo branco de peixes aclimatados a 5° e 25°C estão mostradas na Figura 16 (A e B).

As mitocôndrias isoladas de peixes aclimatados a 5°C apresentaram um consumo basal de O₂ (Estado 2) maior na presença de substratos tanto do Complexo I, piruvato e malato (Figura 16A), quanto do Complexo II, succinato

(Figura 16B). Para a análise do Complexo II, utilizamos rotenona, que é um inibidor da respiração associada ao consumo de NADH (no Complexo I, por exemplo). A análise do consumo de O₂ associado ao complexo I mostrou que as mitocôndrias de peixes aclimatados a 5°C tiveram um aumento de cerca de 4 vezes ($3,33 \pm 0,60$ vs $13,85 \pm 1,34$; $p < 0,001$) na taxa respiratória, enquanto que a análise da respiração associada ao complexo II mostrou um aumento de apenas 1,8 vezes ($7,98 \pm 1,22$ vs $14,46 \pm 1,17$; $p < 0,05$). Independentemente do substrato utilizado, as taxas de respiração no estado fosforilativo induzido por ADP (Estado 3) foram ligeiramente maiores nas mitocôndrias isoladas de peixes aclimatados a 5°C, porém este aumento não foi significativo. A medida da taxa respiratória inibida por oligomicina (Estado 4o) mostrou que a aclimação ao frio promoveu um grande aumento (13 e 25 vezes, dependendo do substrato utilizado) no consumo de oxigênio não acoplado à síntese de ATP, conhecido como respiração associada ao vazamento de prótons. Como visto para o Estado 3, a respiração desacoplada induzida por FCCP (Estado 3u) não mudou após a aclimação ao frio.

Estes resultados sugerem que a aclimação ao frio pode ter promovido um aumento da atividade dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons, além de promover um aumento da respiração mitocondrial desacoplada da síntese de ATP, a qual pode estar relacionada à possível presença de uma proteína desacopladora nas mitocôndrias de músculo branco de peixes dourados.

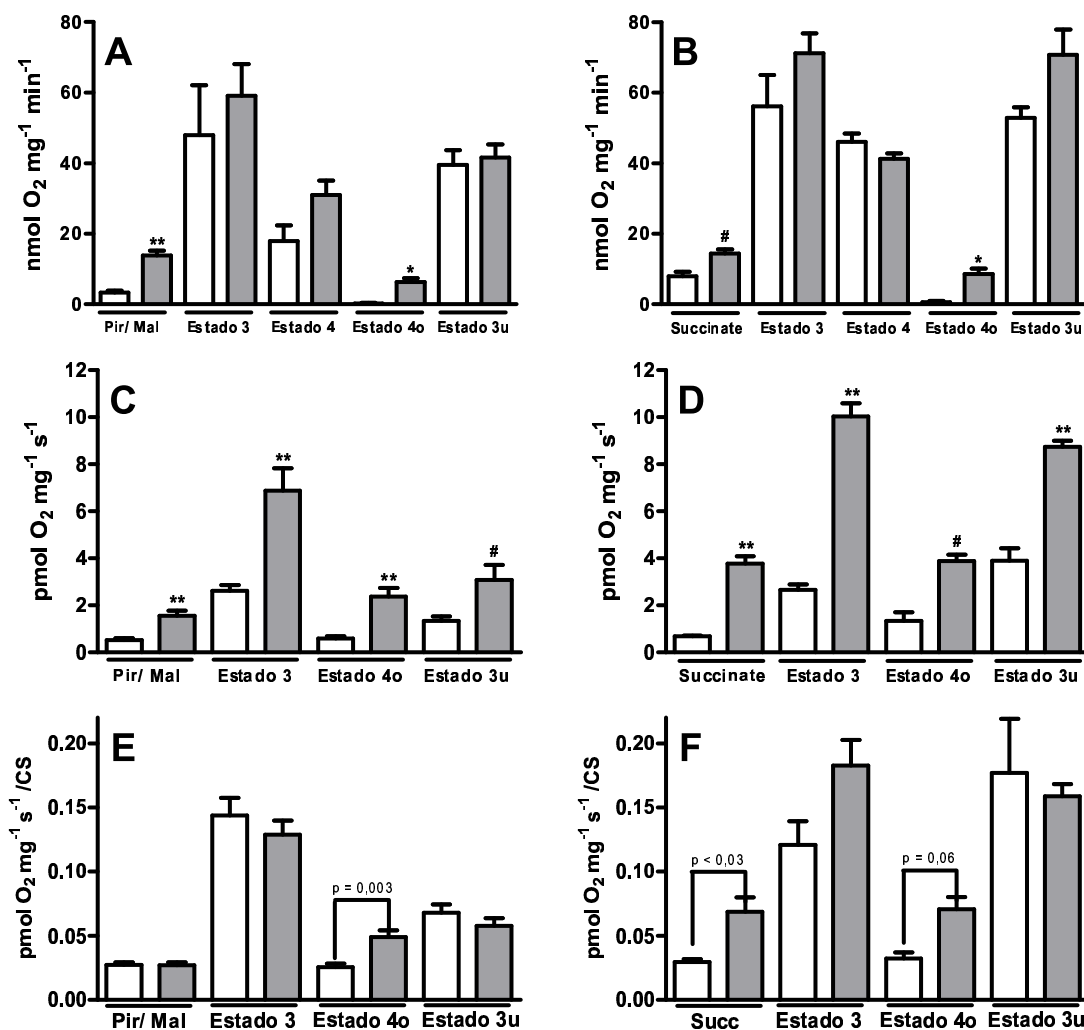


Figura 16: Efeito da aclimação ao frio sobre os estados respiratórios de músculo branco de peixes dourados. As taxas de consumo de O₂ foram medidos a 25°C em mitocôndrias isoladas (A e B) e fibras permeabilizadas (C e D) utilizando-se diferentes substratos. Em mitocôndrias isoladas, (A) 5 mM Piruvato + 5mM Malato (Pir/Mal) e (B) 10 mM Succinato foram utilizados como substratos. *Estado 3* foi obtido com após a adição de 0,15 mM ADP; *Estado 4o* com a adição de 1 µg/ml de Oligomicina e *Estado 3u* com 0,1-0,5 µM FCCP. Valores são médias ± s.e.m de 4-26 medidas (5 peixes por grupo). Em fibras permeabilizadas, (C) 5 mM Piruvato + 5mM Malato (Pir/Mal) e (D) 10 mM Succinato foram utilizados como substratos. *Estado 3* foi obtido com após a adição de 2 mM ADP; *Estado 4o* com a adição de 1 µg/ml de Oligomicina e *Estado 3u* com 0,5 µM FCCP. Valores são médias ± s.e.m de 11-20 medidas (5 peixes por grupo). Para a normalização das taxas respiratórias das fibras permeabilizadas, as taxas de consumo de O₂ foram divididas pela atividade da enzima citrato sintase (Tabela 3) de cada grupo. (E) 5 mM Piruvato + 5mM Malato (Pir/Mal) e (F) 10 mM Succinato. Em todos os gráficos: barras brancas representam animais aclimatados a 25°C e barras cinzas animais aclimatados a 5°C. #P<0,05, *P<0,01 e **P<0,001 comparados com o grupo aclimatado a 25°C.

4.5.3 Efeito da aclimação ao frio sobre a respiração em fibras permeabilizadas

Embora menos usual, o uso de fibras permeabilizadas também pode ser uma grande ferramenta para o estudo das funções mitocondriais. Para isso, nós utilizamos fibras permeabilizadas com saponina dos dois grupos de peixes.

À primeira vista, os efeitos da aclimação ao frio foram mais pronunciados nas fibras permeabilizadas que nas mitocôndrias isoladas, exceto para o Estado 4o. Como observado em mitocôndrias isoladas (Figura 16 A e B), a aclimação ao frio promoveu um aumento no consumo basal de O_2 quando substratos dos Complexos I ou II foram adicionados (Figura 16 C e D). Entretanto, estes aumentos foram maiores que os medidos com mitocôndria isolada: 3 vezes no Complexo I (Figura 15 C) e 5,6 vezes no Complexo II (Figura 16D). Além disso, dependendo do substrato, as taxas de respiração no Estado 3 (induzido por ADP) foram 2,6 e 3,8 vezes maiores nos peixes aclimatados a 5°C, resultado que difere do observado em mitocôndrias isoladas, onde nenhum aumento significativo foi observado. Embora em menor escala que as mitocôndrias isoladas, as taxas de respiração associada ao vazamento de prótons também foram aumentadas pela aclimação ao frio (2,9 e 4 vezes). De forma semelhante ao Estado 3, o qual não apresentou aumento significativo quando medido em mitocôndrias isoladas, a respiração no Estado 3u foi quase duas vezes maior nas fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 5°C.

4.5.4 Normalização das taxas respiratórias

As medidas das taxas respiratórias em fibras permeabilizadas estão expressas pela massa, em miligramas, de fibra adicionada, considerando, assim, o número total de mitocôndrias existentes em cada fibra. Desta forma, o aumento do

consumo de O_2 em fibras permeabilizadas observado após o período de aclimação ao frio pode ser também um reflexo do aumento no número de mitocôndrias e não apenas do aumento na atividade dos complexos.

Uma maneira de entender melhor esta questão é através da normalização das taxas respiratórias pelo conteúdo de mitocôndrias dos músculos. Para isso, nós dividimos as taxas de consumo de O_2 pela atividade da enzima citrato sintase (Tabela 3), tida na literatura como uma enzima marcadora do conteúdo mitocondrial. Assim, quando normalizamos as taxas respiratórias pelo conteúdo mitocondrial das fibras, observamos que, quando adicionamos substratos do Complexo I, não havia mais diferenças no consumo de O_2 entre animais aclimatados a 5° e 25°C nos estados Basal, Estado 3 e Estado 3u, enquanto que apenas o Estado 4o permaneceu aumentado nos peixes aclimatados a 5°C (Figura 16E). Entretanto, quando substratos do Complexo II foram adicionados, os estados Basal, Estado 3 e Estado 4o permaneceram aumentados em peixes aclimatados a 5°C, enquanto que apenas o Estado 3u manteve-se o mesmo em fibras de peixes aclimatados a 5° e 25°C (Figura 16F).

Mais uma vez, estes dados sugerem que a aclimação ao frio promoveu um aumento no metabolismo mitocondrial do músculo branco de peixes dourados. Ademais, a análise da respirometria em fibras permeabilizadas nos possibilitou observar que este aumento no metabolismo oxidativo parece acontecer em dois sentidos: (i) aumento da atividade dos complexos e (ii) aumento do conteúdo mitocondrial muscular. Associado a isto, o aumento da respiração no Estado 4o sugere, novamente, que pode haver a participação de uma proteína desacopladora no processo de aclimação ao frio.

4.5.5 Consumo de O₂ associado ao vazamento de prótons em fibras permeabilizadas de músculo de peixes aclimatados a 5° e 25°C: ativação por palmitato e inibição por GDP e BSA

Os dados acima sugerem que a aclimação ao frio promoveu um grande aumento no Estado 4o tanto em mitocôndrias isoladas quanto em fibras permeabilizadas de músculo branco de peixes dourados (Figura 16 A-D). Como o vazamento de prótons, que desacopla parcialmente a fosforilação oxidativa, pode estar associada à presença de UCPs (para revisão, Rousset *et al.*, 2004; Krauss *et al.*, 2005; Brand e Esteves, 2005; Nicholls, 2006), nós procuramos saber se o vazamento de prótons induzido pela aclimação ao frio poderia estar associado a esta proteína. Isto é suportado pelo fato de já terem sido identificadas proteínas desacopladoras em carpa comum e peixe-zebra (Stuart *et al.*, 1999; Jastroch *et al.*, 2005 e 2007). A fim de investigar esta questão, nós medimos o efeito de ativadores (palmitato) e inibidores (GDP e BSA_{FFA}) de UCPs sobre a taxa respiratória inibida por oligomicina em fibras permeabilizadas, visto que estas se mostraram um bom modelo para o estudo dos efeitos da aclimação ao frio (Figuras 17-19).

Porém, antes de realizar o estudo em peixes aclimatados, realizamos um experimento piloto a fim de identificar a concentração ótima de palmitato, um ácido graxo capaz de ativar as UCPs, para ativar ao máximo a respiração no Estado 4o em fibras permeabilizadas. Conforme observado na Figura 17, a adição crescente de palmitato foi capaz de estimular o consumo de O_2 associado ao vazamento de H^+ . Seu efeito máximo foi alcançado com concentrações na faixa de 0,1 mM. Além disso, a adição de GDP foi capaz de inibir parcialmente o efeito do palmitato. A ativação da respiração mitocondrial após a adição de FCCP sugere que o resultado observado com palmitato não foi um artefato causado por efeito inespecífico deste ácido graxo.

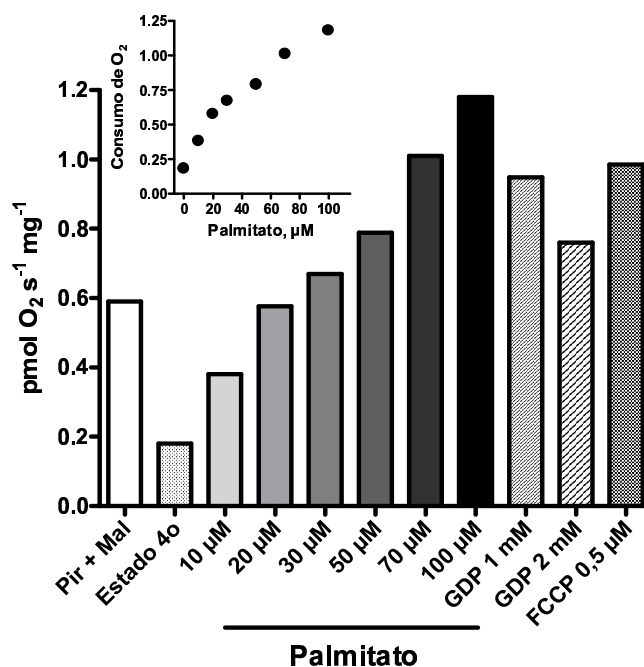


Figura 17: Efeito do Palmitato sobre o consumo de O_2 em Estado 4o de fibras permeabilizadas de peixes dourados mantidos a 25°C: inibição parcial por GDP. As taxas de consumo de O_2 foram medidas com 5 mM piruvato + 5 mM malato; o Estado 4o foi obtido com a adição de 1 $\mu g/ml$ Oligomicina. O gráfico mostra a adição de crescentes concentrações de palmitato (10-100 μM); 1 e 2 mM GDP e 0,5 μM FCCP. O gráfico interno mostra apenas as concentrações de palmitato. Valores de um experimento.

Conforme observado anteriormente, quando acrescidos de substratos do Complexo I (piruvato e malato), a taxa de consumo de O_2 no Estado 4o foi cerca de

2 vezes maior nos peixes aclimatados a 5°C. A adição do inibidor de proteínas desacopladoras, GDP, diminuiu parcialmente o Estado 4o em fibras de peixes aclimatados a 5°C, mas não teve nenhum efeito sobre as fibras de peixes aclimatados a 25°C. Entretanto, a adição de BSA_{FFA} em conjunto com GDP foi capaz de diminuir significativamente (cerca de 40%) o Estado 4o em peixes aclimatados a 5°C, porém, mais uma vez, nenhum efeito foi observado nos peixes aclimatados a 25°C (Figura 18A e Tabela 6).

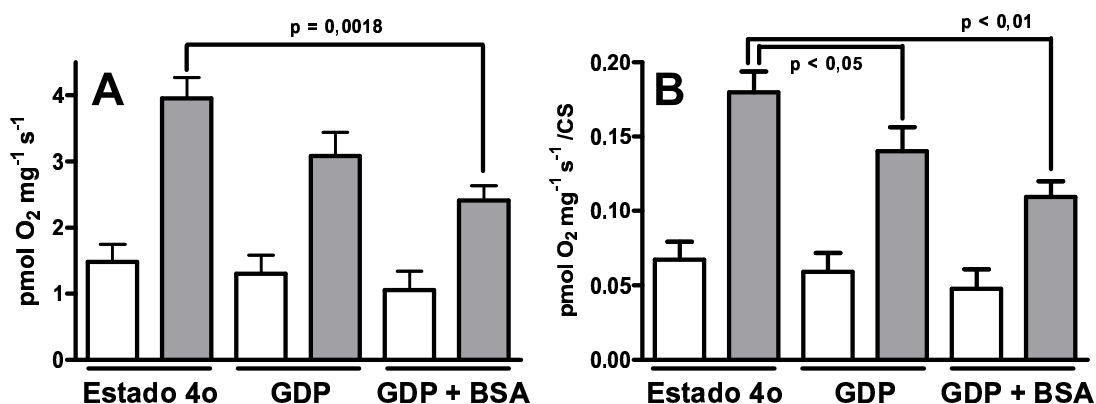


Figura 18: Efeito do GDP e BSA_{FFA} sobre o consumo de O₂ associado ao vazamento de H⁺ leak em fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 5° e 25°C. Taxas respiratórias por (A) massa de tecido e (B) normalizadas pela atividade de CS. As taxas respiratórias foram medidas com 5 mM piruvato + 5 mM malato e 2 mM ADP. O Estado 4o foi obtido com a adição de 1 µg/ml oligomicina. Os gráficos mostram a adição de 2 mM GDP e 2 mM GDP + 2 mg/ml BSA_{FFA}. Valores são médias ± s.e.m de 5-7 medidas (3-4 peixes por grupo). Barras brancas representam animais aclimatados a 25°C e barras cinzas animais aclimatados a 5°C.

Todavia, ao normalizarmos as taxas respiratórias pela atividade da citrato sintase, pudemos observar que, em fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 5°C, a adição apenas de GDP já foi capaz de promover uma diminuição significativa (cerca de 20%) no Estado 4o e que esta queda era ainda mais pronunciada após a adição de BSA_{FFA}. Contudo, a adição destes dois agentes inibidores da atividade de UCP não foi capaz de diminuir o Estado 4o de fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 25°C (Figura 18B).

Curiosamente, a adição de palmitato não foi capaz de estimular o consumo de O₂ no Estado 4o em fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 5°C. Porém, ao ser adicionado em fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 25°C, este ácido graxo foi capaz de estimular, aproximadamente, 4 vezes o Estado 4o. A adição posterior de GDP, porém, não diminuiu significativamente o consumo de O₂ associado ao estímulo de palmitato (Figura 19).

Tabela 6: Efeito do GDP e BSA_{FFA} sobre o consumo de O₂ associado ao vazamento de H⁺ em fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 5° e 25°C. As taxas de consumo de O₂ (pmol O₂ s⁻¹ mg⁻¹) foram medidas como na Figura 18 (5 mM piruvato + 5 mM malato e 2 mM ADP). Valores são médias ± s.e.m de 5-7 medidas (3-4 peixes por grupo). Barras brancas representam animais aclimatados a 25°C e barras pretas animais aclimatados a 5°C. *P<0,001 comparado com grupo aclimatado a 25°C.

Condições	Aclimatado a 25°C	Aclimatado a 5°C	P
Estado 4o	1.478 ± 0.266 (6)	3.953 ± 0.315 (7)	<0,001
GDP	1.300 ± 0.280 (5)	3.084 ± 0.356 (7)	0,004
GDP + BSA	1.052 ± 0.283 (5)	2.410 ± 0.226 (7)*	0,004

Em conjunto, estes resultados mostram que, provavelmente, a aclimação ao frio promove um aumento no consumo de O₂ associado ao vazamento de H⁺ que é estimulado por palmitato e inibido por GDP e BSA_{FFA}. Isto descartaria um efeito apenas da baixa temperatura sobre as insaturações dos fosfolipídios. Sendo assim, parece razoável pensar que há a participação de uma UCP, provavelmente a UCP3, no processo de aclimação ao frio em músculo branco de peixes dourados. Esta provisão é suportada pelo fato de já terem sido identificadas UCPs em carpas e que sua expressão pode ser modulada pelo frio (Jastroch *et al.*, 2005, 2007). Além disso, a ausência do efeito inibitório tanto de GDP quanto da adição de GDP e BSA_{FFA} sobre os peixes aclimatados a 25°C associada à não estimulação pelo palmitato em

peixes aclimatados a 5°C sugerem que esta provável UCP seria ativada “apenas” após a exposição ao frio.

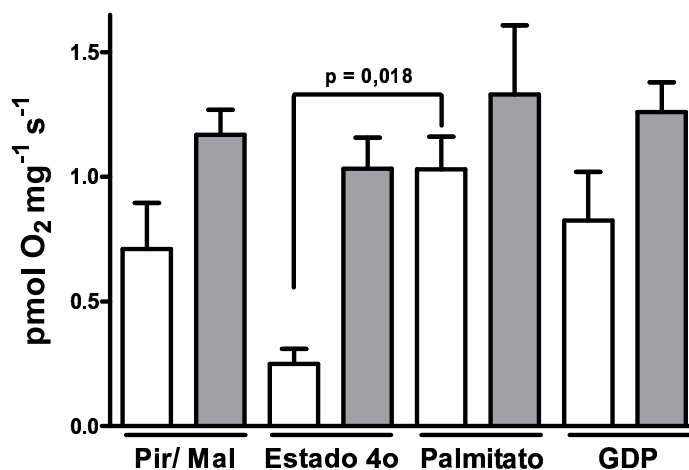


Figura 19: Efeito do GDP e BSA_{FFA} sobre o consumo de O₂ associado ao vazamento de H⁺ em fibras permeabilizadas de peixes aclimatados a 5° e 25°C. As taxas respiratórias foram medidas com 5 mM piruvato + 5 mM malato. O Estado 4o foi obtido com a adição de 1 µg/ml oligomicina. Os gráficos mostram a adição de 0,1 mM palmitato e 2 mM GDP. Valores são médias ± s.d. de 3-4 medidas (1 peixe por grupo). Barras brancas representam animais aclimatados a 25°C e barras cinzas animais aclimatados a 5°C.

5 DISCUSSÃO

Os peixes constituem o maior e mais diverso grupo de vertebrados, com mais de 29.000 espécies, capazes de explorar os mais variados ambientes e de sobreviver a diversas condições ambientais, tais como salinidade, pressão, pH e temperatura.

A influência da temperatura é um dos principais fatores ambientais enfrentados por estes animais. Como a temperatura do ambiente aquático flutua tanto diariamente quanto sazonalmente, os peixes, que são, em sua maioria, organismos ectotérmicos, cuja temperatura corporal varia de acordo com a do ambiente, se vêem “obrigados” a tolerar tais variações. Para isso, diversas estratégias são adotadas. Alguns peixes, ao longo do curso evolutivo, desenvolveram mecanismos de adaptação a baixas temperaturas como, por exemplo, as glicoproteínas anticongelamento e o órgão do calor. Entretanto, como nem todos os peixes são dotados de tais mecanismos específicos de adaptação ao frio, a maioria das espécies, e até mesmo as que possuem tais mecanismos, recorre a mudanças para um fenótipo mais adequado, a fim de superar o desafio térmico. Estas respostas fenotípicas, chamadas de compensação térmica, podem ocorrer dentro de poucas horas ou semanas após a mudança na temperatura, num processo chamado de aclimação (no laboratório) ou aclimatização (na natureza). Os mecanismos por trás destas compensações envolvem mudanças no sistema nervoso central e periférico, músculos e outros tecidos (Hazel e Prosser, 1974; Johnston e Dunn, 1987).

Os ciprinídeos são peixes euritérmicos, que toleram uma ampla faixa de temperatura ambiente e, geralmente, mantêm sua atividade locomotora mesmo no

frio. Esta tolerância térmica é obtida através de modificações fisiometabólicas em diversos órgãos, como cérebro, guelras, fígado, intestino e músculo esquelético (Gracey *et al.*, 2004; Cossins *et al.*, 2006). Este último passa por mudanças fenotípicas que são de fundamental importância para a manutenção da atividade locomotora dos ciprinídeos durante o período em que se encontram em baixas temperaturas (Johnston e Temple, 2002; Watabe, 2002). Para suprir as necessidades energéticas musculares durante esse período, esta família de peixes é capaz de aumentar seu metabolismo oxidativo de dois modos principais: aumento da densidade de volume mitocondrial e da atividade de enzimas mitocondriais. Além disso, há uma modificação nos fosfolipídios das membranas, como as mitocondriais (para revisão, Guderley 2002, 2004a,b).

O peixe dourado (*Carassius auratus*) é um dos mais conhecidos peixes ornamentais do mundo. Típico de regiões temperadas, é um peixe capaz de suportar amplas variações de temperatura ao longo de sua vida, mantendo sua atividade locomotora. Isto é possível graças às mudanças musculares que ocorrem durante a aclimação ao frio, como aumento do aparato contrátil, mudanças no recrutamento das fibras, e elevação da proporção de fibras vermelhas e intermediárias juntamente com um aumento no conteúdo de mioglobina e glicogênio. Estas mudanças musculares são acompanhadas de um aumento no conteúdo mitocondrial e na atividade enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo mitocondrial, assim como a manutenção da glicólise e mudanças nas insaturações lipídicas.

Embora sejam bem conhecidos estes efeitos da aclimação ao frio sobre o metabolismo energético, pouco se sabe sobre as propriedades respiratórias mitocondriais dos músculos esqueléticos destes peixes. Além disso, a maioria dos estudos envolvendo metabolismo mitocondrial de peixes visa estudar os efeitos

térmicos sobre a musculatura vermelha, que é oxidativa e possui um maior número de mitocôndrias. Porém, uma característica interessante é que o músculo branco (conhecido por apresentar um menor conteúdo mitocondrial em relação ao vermelho) é recrutado durante a aclimatação ao frio, passando a ter um fenótipo mais próximo do músculo vermelho, tal qual ocorre em mamíferos (Arruda *et al.*, 2008). Em peixes dourados, há apenas um estudo que relaciona o metabolismo mitocondrial de músculos brancos à aclimatação ao frio, mas não possui dados sobre os estados respiratórios mitocondriais (Van den Thillart e Modderkolk, 1978).

Ao longo do período de aclimatação, observamos que a taxa respiratória dos peixes foi diminuindo conforme diminuíamos a temperatura da câmara (Figura 8). Estes resultados estão de acordo com outros encontrados na literatura, que também sugerem que a diminuição da temperatura ambiente leva a uma diminuição da taxa de ventilação, inclusive em peixes dourados (Freeman, 1950; Pörtner, 2001; Pörtner *et al.*, 2004).

Esta diminuição pode estar relacionada a dois fatores: (i) aumento na concentração de O₂ dissolvido na água, em virtude da diminuição da temperatura; ou (ii) aumento na capacidade oxidativa (atividades enzimáticas, conteúdo e estrutura mitocondrial) e redução da distância de difusão para o O₂ (aumento de capilares e mitocôndrias). Alguns estudos sugerem que, nos peixes, as tensões arteriais de O₂ não são alteradas pela temperatura, enquanto as tensões venosas exibem uma temperatura ótima (Pörtner *et al.*, 2004). Além disso, o aumento na densidade de volume mitocondrial pode ter um papel importante no processo de difusão intracelular de O₂, assim como o aumento de lipídios e na afinidade do oxigênio pela mioglobina que ocorrem no frio (Tyler e Sidell, 1984; Sidell, 1998). Como já é conhecido que uma das principais respostas à aclimatação ao frio em peixes

dourados é o aumento da densidade de volume mitocondrial e de mioglobina, acreditamos que esta diminuição na taxa de ventilação seja fruto das mudanças mitocondriais que acontecem durante o frio. Ademais, observamos que, após um período crítico por volta do 10º dia, no qual a temperatura acabara de alcançar o mínimo – 5°C, a taxa de ventilação teve um pequeno aumento e depois se manteve estável, sugerindo uma compensação parcial para a aclimação à baixa temperatura. Porém, não se pode descartar um efeito do aumento da tensão de O₂ na água, uma vez que a diminuição da taxa de ventilação pode estar relacionada a uma menor necessidade de captação de O₂ por parte do peixe.

Durante o período de aclimação ao frio, foi observado que os peixes expostos à baixa temperatura tinham uma menor locomoção em relação ao grupo controle. Porém, esta diminuição da locomoção não interferiu nas características físicas dos peixes, uma vez que, ao final do período de aclimação ao frio, ambos os grupos de peixes permaneceram sem mudanças drásticas em suas características físicas e no fator de condicionamento. Desta maneira, pudemos utilizar todos os peixes para o estudo das atividades enzimáticas e parâmetros mitocondriais. Embora não tenha sido medido quantitativamente, os peixes aclimatados a 5°C possuíam um maior conteúdo lipídico que os mantidos a 25°C.

O aumento das atividades específicas de enzimas mitocondriais encontrado nas frações mitocondriais após a aclimação ao frio está de acordo com a literatura para ciprinídeos (Johnston *et al.*, 1985; Itoi *et al.*, 2003; McClelland, *et al.*, 2006; LeMoine *et al.*, 2008), assim como a ausência de alterações das atividades das enzimas associadas ao metabolismo glicolítico (Sidell, 1980; Van den Thillart e Smit, 1984; Johnston *et al.*, 1985). A maior atividade HK na fração mitocondrial, associada

à sua resposta ao frio nos chamou a atenção, uma vez que esta enzima é conhecida classicamente como citosólica.

A partir de então, dividimos esta dissertação em duas partes, que serão discutidas separadamente.

5.1 Parte 1

Nesta primeira parte, investigamos a distribuição subcelular e as propriedades cinéticas da HK de músculo branco de peixes dourados. Além disso, observamos que a aclimação ao frio promove diferenças no perfil de distribuição subcelular desta enzima.

A hexocinase é uma enzima essencial para o metabolismo de glicose em praticamente todos os seres vivos, porém, sabe-se muito pouco sobre esta enzima em ciprinídeos. Sua atividade é cerca de 4-18 vezes maior no músculo vermelho que no músculo branco, e que isto pode estar relacionado à preferência pela produção de energia via glicose hepática em relação ao metabolismo de glicogênio, durante a atividade locomotora normal.

Entretanto, as propriedades cinéticas e a localização subcelular da HK muscular de peixes dourados ainda são desconhecidas, uma vez que a maioria dos trabalhos mede as atividades enzimáticas em frações obtidas de homogenatos totais ou frações solúveis provenientes de centrifugações de baixa velocidade, nas quais não há pouca ou nenhuma separação de organelas.

Assim, ao realizarmos a distribuição subcelular da HK, observamos que, embora sua atividade total estivesse bem distribuída, sua maior atividade específica estava localizada nas frações particuladas. Assim, devido à importância dada à

associação entre HK e mitocôndria, decidimos caracterizar as propriedades cinéticas da HK nesta fração (NC-HK).

As propriedades cinéticas investigadas (Figura 13 e Tabela 4) sugerem que esta isoforma encontrada na fração mitocondrial de músculo branco de peixes dourados é semelhante à isoenzima HK-II de mamíferos (Tabela 1). As afinidades para glicose e ATP são similares às descritas previamente para a HK-II de mamíferos. Entretanto, a baixa afinidade por glicose sugere que a NC-HK de peixes dourados não utiliza bem esta hexose, tal qual a HK-IV de mamíferos. Outro resultado que contrasta com a HK-II é o perfil inibitório da NC-HK (Tabela 5). Enquanto o ADP, AMP e P_i são conhecidos inibidores de HK-I e II (Grossbard e Schimke, 1966), estas moléculas parecem não ter um efeito tão pronunciado na NC-HK; por outro lado, assim como em mamíferos, G-6-P, NAG e MHP foram capazes de inibir quase completamente a atividade de NC-HK (Figura 14 e Tabela 5). No caso da G-6-P, o K_i calculado aproxima-se daquele reportado para HK-II de rato (Wilson, 2003) e medido por nós (Figura 14A, círculos abertos).

Tendo em vista os dados obtidos por González-Alvarez e colaboradores (2009) com peixe-zebra, nossos resultados sugerem que a isoforma presente no músculo branco de peixes dourados é homóloga àquela encontrada em músculo esquelético de mamíferos, HK-II, mas com algumas peculiaridades, principalmente no que diz respeito à regulação alostérica. Além disso, não sabemos se a associação desta isoenzima com a mitocôndria pode ser regulada por G-6-P, clotrimazol ou tiopental, tal qual ocorre em mamíferos, mas não em plantas (Rose e Warms, 1967; Krieglstein *et al.*, 1981; Penso e Beitner, 1998; Rezende *et al.*, 2006); ou se pode estar acoplada à fosforilação oxidativa, tal qual ocorre em tumores (Arora e Pedersen, 1988). Para isso, mais estudos precisam ser realizados.

Como observado previamente por Van den Thillar e Smit (1984) e Johnston *et al.* (1985), nós observamos que a atividade da HK aumenta em músculo branco de ciprinídeos após a aclimação térmica e este aumento também já foi visto em outras espécies de peixes, como robalo-muge e linguado e (Johnston e Wokoma, 1986; Rodnick e Sidell, 1997). Semelhante aos peixes, drosófilas, ratos e camundongos também mostram um aumento na atividade HK em resposta ao estresse térmico. Entretanto, em drosófila, um outro ectotérmico, a atividade HK aumentou apenas 30% após a aclimação ao frio (Burnell *et al.*, 1991), enquanto ratos e camundongos exibiram uma resposta tecido-específica. Em músculo cardíaco e gastrocnêmio, a atividade da HK foi 15% e 17% maiores em ratos expostos a baixas temperaturas (Harri and Valtola, 1975). A exceção em mamíferos foi observada no tecido adiposo marrom de camundongos, no qual o aumento na atividade HK foi entre 1,9 e 2,5 vezes (Watanabe *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1990).

Aqui, nós demonstramos pela primeira vez, que, em músculo branco de peixes dourados, este aumento é específico para as frações particuladas, mitocôndria e microssoma, enquanto a fração citosólica permanece inalterada (Figura 14). Estes dados sugerem que a HK pode ter um papel importante durante o processo de aclimação ao frio em peixes dourados.

Como visto na Figura 6, o aumento na insaturação de lipídios que acompanha a aclimação térmica em algumas espécies de peixes, dentre elas o peixe dourado, faz com que as membranas mitocondriais sejam mais susceptíveis à peroxidação pelos EROs. Além disso, a maior capacidade oxidativa em peixes aclimatados ao frio (vide tópico 5.2) pode aumentar a formação de EROs na matriz mitocondrial, uma vez que a geração de EROs aumenta de acordo com a magnitude do $\Delta\psi_m$ (Korshunov *et al.*, 1997). Assim, é provável que a produção de EROs esteja

aumentada em ciprinídeos aclimatados ao frio, uma vez que eles associam uma alta capacidade oxidativa a mudanças na poliinsaturação fosfolipídica após a exposição ao frio (Hazel, 1972b; Van den Thillart e Modderkolk, 1978).

Em 2004, Da-Silva e colaboradores propuseram um mecanismo para a redução da formação de EROs mitocondrial baseado na associação entre a HK-I e mitocôndria: o complexo HK-VDAC-ANT, juntamente com a F_0F_1 -ATPase, poderia representar o centro de um sistema de ciclagem de ADP, que utiliza glicose e ATP como combustíveis e cuja função é manter o $\Delta\psi_m$ baixo, prevenindo, assim, a formação de EROs. Logo, seria razoável pensar que a HK poderia desempenhar um papel na prevenção de EROs mitocondrial durante a aclimação de peixes dourados ao frio. Isto é suportado pelo fato de que a atividade da HK, após a aclimação ao frio, foi aumentada na fração mitocondrial, mas não na fração citosólica. Além disso, como dito anteriormente, é provável que a aclimação ao frio aumente a geração de EROs em mitocôndrias de músculo de peixes dourados.

Outra hipótese para o aumento da HK em mitocôndrias está relacionada ao aumento da capacidade oxidativa e do gasto energético. Embora ainda não tenhamos evidências diretas de que a associação entre HK e mitocôndria promove um aumento da fosforilação oxidativa, tal qual em tumores, acreditamos que a presença da HK na mitocôndria poderia estar associada a um aumento no metabolismo mitocondrial e, talvez, na produção de calor por esta organela.

Durante a aclimação, observamos que a via glicolítica permanece praticamente inalterada (Tabela 3). Porém, o aumento específico da HK na mitocôndria poderia aumentar a oxidação de ácidos graxos, que parece ser o combustível para muitos peixes aclimatados ao frio, tais como peixe-escorpião (*Myoxocephalus scorpius*) e truta arco-íris (Guderley e Johnston, 1996; Guderley *et*

al., 1997). Assim, a maior ciclagem de substratos aumentaria a velocidade da cadeia respiratória e, conseqüentemente, da produção de calor mitocondrial.

Entretanto, até o momento, não sabemos como acontece a regulação em nível molecular deste aumento de HK associada à mitocôndria, isto é, se o que ocorre é um aumento da expressão ou da atividade da HK; ou se há um aumento de sua ligação ao VDAC, uma vez que o aumento no conteúdo mitocondrial após a aclimatação poderia “disponibilizar” novos sítios de associação com a HK.

Sendo assim, outros estudos são necessários, até mesmo para investigar se há um mecanismo hormonal que coordena estas respostas. Neste sentido, podemos colocar os hormônios tireoidianos como fortes candidatos ao posto de reguladores hormonais do aumento do HK após o período de aclimatação térmica.

Harri e Voltola especularam que o aumento observado tanto na atividade de enzimas mitocondriais (succinato desidrogenase, malato desidrogenase e citrato sintase) quanto da HK, em músculos cardíaco e gastrocnêmio de ratos expostos ao frio resultaria numa melhor tolerância à baixa temperatura (Harri e Voltola, 1975). Esta tolerância à temperatura pode estar relacionada ao mecanismo termogênico dos hormônios tireoidianos, cujas concentrações intracelulares aumentam durante a exposição ao frio (melhor discutido no tópico 5.2; para revisão, Bianco *et al.*, 2005). O efeito desses hormônios sobre a atividade da HK já foi avaliado em diversos tecidos, principalmente cérebro (Gutekunst e Wilson, 1981; Sabell *et al.*, 1985, 1987; Klandorf *et al.*, 1986; Kaur *et al.*, 1987). Como regra geral, os animais tireoidectomizados, isto é, que tiveram sua tireóide retirada cirurgicamente, possuem uma diminuição na atividade da HK, que pode ser revertida pela administração de hormônio T4, enquanto os animais hipertireoideos geralmente têm um aumento da atividade HK. Além disso, estes efeitos também podem ser específicos para as

frações particuladas e solúveis (Klandorf *et al.*, 1986; Kaur *et al.*, 1987). Recentemente, Al Jamal observou que a síntese de VDAC e a atividade da HK em cérebros de coelhos estão sob o controle do estado tireóideo durante o período fetal e pós-natal (Al Jamal, 2004). Neste estudo, a síntese de porina estava comprometida em cérebro de coelhos hipotireóides, o que diminuía a capacidade de ligação de HK em mitocôndrias provenientes do cérebro destes animais. Ademais, a atividade da HK também estava diminuía. Porém, como observado em outros estudos, a administração de T4 revertia estes efeitos.

Em 2008, Branvold e colaboradores mostraram que o efeito dos hormônios tireoidianos sobre a expressão da HK poderia estar relacionado com a ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK; do inglês *AMP-activated protein kinase*), que, uma vez ativada, resulta no aumento da fosforilação da proteína ligadora ao elemento de resposta ao AMPc (CREB, do inglês *cAMP response element binding protein*). Assim, como a HK possui um elemento responsivo a CREB na região promotora de seu gene, ela seria alvo desta regulação promovida pelos hormônios tireoidianos. De fato, eles observaram que o músculo solear de animais hipertireóides aumentaram a expressão de HK, enquanto animais hipotireóides tinham uma diminuição de sua expressão (Branvold *et al.*, 2008).

Tendo em vista os dados acima, podemos sugerir que o aumento promovido pela aclimação ao frio sobre a atividade da HK associada à fração mitocondrial de músculo esquelético branco de peixes dourados poderia estar correlacionada com o metabolismo de hormônios tireoidianos. Se estes hormônios forem aumentados também em peixes aclimatados a baixas temperaturas, um estado de “hipertireoidismo” local poderia ser criado. Assim, a maior concentração desses

hormônios poderia suscitar as alterações descritas anteriormente, como aumento na síntese de VDAC ou regulação da expressão de HK via AMPK/CREB.

Além dos hormônios tireoidianos, outros hormônios que podem estar envolvidos com a regulação da HK nesta situação são as catecolaminas. Sabe-se que estes hormônios têm uma importante participação na termogênese adaptativa, atuando, dentre diversos processos, na ativação dos hormônios tireoidianos, principalmente no tecido adiposo marrom (Hsieh e Carlson, 1957; Bianco *et al.*, 2005). Além disso, sabe-se que eles são capazes de aumentar a expressão de HK-II em músculo esquelético de roedores após exercício (O'Doherty *et al.*, 1996) ou administração direta (Jones e Dohm, 1997). O mecanismo proposto para a ação das catecolaminas, tanto na ativação dos hormônios tireoidianos quanto no efeito direto sobre a expressão de HK-II, é baseado no aumento intracelular de AMPc que ocorre logo após a ativação dos receptores adrenérgicos.

5.2 Parte 2

A segunda parte desta dissertação buscou avaliar os parâmetros respiratórios mitocondriais em músculo branco de peixes dourados aclimatados a 5° e 25°C. Este músculo foi utilizado, primeiramente, por se tratar de um músculo pouco estudado e, segundo, por se tratar de um tecido que sofre alterações fenotípicas importantes durante o processo de aclimação ao frio.

Como observado na Tabela 3, a aclimação ao frio promoveu um aumento da atividade de enzimas mitocondriais (CS e F₀F₁-ATPase) na fração mitocondrial, mas não na fração citosólica. Este aumento pode ser resultado do aumento na biogênese mitocondrial, que ocorre no músculo de peixes dourados aclimatados a baixas temperaturas (Johnston e Maitland, 1980; Tyler e Sidell, 1984; LeMoine *et al.*,

2008). Em ciprinídeos, este aumento na biogênese mitocondrial parece ser resultado do aumento de NRF-1 e PGC-1 β , conhecidos por ativar a transcrição de vários genes mitocondriais e nucleares responsáveis pela “montagem” da mitocôndria (LeMoine *et al.*, 2008). Sendo assim, uma vez que o conteúdo mitocondrial aumenta durante a exposição ao frio, bem como a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo mitocondrial, investigamos se os estados respiratórios estariam alterados em músculo branco de peixes dourados aclimatados ao frio.

A Figura 16 (A-D) mostra a análise do estados respiratórios (Basal ou Estado 2, Estado 3, Estado 4, Estado 4o, Estado 3u) em mitocôndrias isoladas e fibras permeabilizadas de ambos os grupos de peixes dourados.

Em mitocôndrias isoladas (Figura 16 A e B), apenas os Estados 2 e 4o foram alterados após a aclimação ao frio, tanto na presença de substratos do Complexo I (piruvato + malato) quanto do Complexo II (succinato e o inibidor rotenona). Este aumento Estado 4o, que está associado ao vazamento de H⁺ pela membrana mitocondrial interna, poderia estar relacionado à presença de UCPs, como investigado posteriormente. Quando medimos as taxas de consumo de O₂ em fibras permeabilizadas (Figura 16 C e D), observamos que os peixes aclimatados ao frio tinham todos os estados respiratórios analisados aumentados. Porém, como as medidas em fibras permeabilizadas levam em consideração o conteúdo mitocondrial total das fibras, este aumento poderia ser apenas consequência do maior número de mitocôndrias no músculo branco dos peixes aclimatados a 5°C, já reportado previamente. Normalizamos, então, as taxas respiratórias das fibras permeabilizadas pela atividade da enzima citrato sintase, que é tida como um bom marcador do conteúdo mitocondrial (Figura 16 E e F). Assim, encontramos que, mesmo após a normalização pela CS, o consumo basal de O₂ com substrato do Complexo II e o

Estado 4o (independentemente do substrato utilizado) permaneciam aumentados nos peixes aclimatados a 5°C.

Estes resultados mostraram que a aclimação térmica ao frio parece promover não apenas um aumento na densidade de volume mitocondrial, mas também um aumento na atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons. No caso do aumento associado ao Complexo II, este pode ser explicado pelo aumento da atividade da succinato desidrogenase devido a mudanças no perfil lipídico da membrana interna mitocondrial, como descrito previamente por Hazel (1972b).

Além disso, um aumento no consumo de O₂ associado ao vazamento de H⁺ foi observado tanto em mitocôndrias quanto em fibras permeabilizadas de músculo branco de peixes aclimatados ao frio. Este aumento poderia estar relacionado a dois eventos: (i) aumento no conteúdo de fosfolípidios poliinsaturados nas membranas mitocondriais; e (ii) presença de UCPs e uma possível regulação da atividade/expressão das mesmas durante a aclimação ao frio.

No primeiro caso, como já reportado previamente (Van den Thillart e Modderkolk, 1978; Wodtke, 1981a,b) a modificação dos lipídios que ocorre no frio é essencial para manter o ambiente propício para a atividade de diversas proteínas de membrana. Porém, ao aumentar a fluidez da membrana, haveria um maior vazamento de H⁺ do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial.

Já no segundo caso, a presença de UCPs, responsáveis por desacoplar total ou parcialmente a fosforilação oxidativa (para revisão, Krauss *et al.*, 2005), também seria um mecanismo pelo qual os H⁺ poderiam voltar para a matriz sem que ocorresse a síntese de ATP. Uma vez que estas proteínas já foram encontradas em ciprinídeos e parecem ser reguladas pela exposição ao frio (Stuart *et al.*, 1999;

Jastroch *et al.*, 2005 e 2007), nós nos perguntamos se não seria também esse o motivo de um maior Estado 4o encontrado em peixes aclimatados a 5°C. Assim, direcionamos nosso estudo para a regulação mitocondrial de uma UCP, provavelmente a UCP3, em músculo branco de peixes dourados.

Para esta análise, utilizamos conhecidos inibidores, GDP e BSA_{FFA}, e um ativador de UCPs. Os nucleotídeos purínicos, como GDP, GTP, ADP e ATP são capazes de inibir as UCPs através da ligação com alta afinidade em um sítio de ligação de nucleotídeo e o BSA_{FFA} é capaz de quelar os ácidos graxos; estes, por sua vez, são potentes ativadores das UCPs, mas ainda não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual eles ativam estas proteínas. Em carpas comuns, foi previamente demonstrado que palmitato e GDP são capazes de ativar e inibir, respectivamente, a UCP1 de fígado (Jastroch *et al.*, 2007).

A Figura 17 mostra que o palmitato também é capaz de induzir o consumo de O₂ em fibras permeabilizadas durante o Estado 4o de maneira dose-dependente, com uma concentração próxima da máxima de 0,1 mM. Além disso, o GDP foi capaz de inibir parcialmente esta ativação.

Como observado anteriormente (Figura 16C), quando analisamos a taxa de consumo de O₂ no Estado 4o em fibras permeabilizadas com substratos do Complexo I, observamos que os peixes aclimatados a 5°C tinham um aumento de 2,5 vezes em relação aos peixes mantidos a 25°C (Tabela 6). Curiosamente, as adições de GDP e BSA_{FFA} foram efetivas apenas em fibras de peixes aclimatados ao frio. Num outro momento, adicionamos palmitato a fim de estimular o consumo de O₂ promovido por esta UCP. Novamente, um fato interessante ocorreu: apenas as fibras de peixes aclimatados a 25°C tiveram um aumento no consumo de O₂ dependente de palmitato no Estado 4o, sendo este consumo igual ao dos peixes aclimatados a

5°C. Entretanto, em ambos os grupos, o GDP não teve nenhum efeito sobre a taxa de consumo de O₂. Porém, é importante lembrar que este é um resultado preliminar obtido de apenas um peixe de cada grupo.

Estes resultados sugerem que a aclimação ao frio promove o aumento do consumo de O₂ desacoplado da síntese de ATP que pode estar associado à presença elevada de uma UCP3 nas mitocôndrias de músculo branco de peixes dourados. Além disso, aparentemente, esta UCP já estaria no máximo de sua atividade em peixes aclimatados ao frio, uma vez que a adição de palmitato não aumentou o consumo de O₂ em Estado 4o em fibras permeabilizadas dos mesmos. Estes dados estão de acordo com aqueles observados em cérebro, rins, intestino e músculo de carpa comum (Jastroch *et al.*, 2007; Gracey *et al.*, 2004; Cossins *et al.*, 2006). Entretanto, estes estudos realizaram análises apenas da expressão gênica (RNAm), mas não da funcionalidade desta proteína. O único estudo acerca da funcionalidade de UCPs em peixes (Jastroch *et al.*, 2007) mostra que a UCP1 de fígado de carpas comuns é ativada por palmitato e inibida por GDP em concentrações similares às utilizadas em nosso estudo.

Então, qual seria o significado fisiológico para o aumento da expressão ou ativação de uma UCP em músculo branco de peixes dourados aclimatados ao frio? Provavelmente, a função fisiológica desta UCP presente no músculo de peixes dourados deve ser semelhante àquela proposta para mamíferos, ou seja, mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo causado por EROs. Conforme proposto por Brand e Esteves (2005), a UCP3 poderia promover um leve desacoplamento mitocondrial, diminuindo, assim, o gradiente eletroquímico e, conseqüentemente, a geração de EROs (vide tópico 1.2.2.2.2). Evidências de que a UCP pode estar relacionada à diminuição da geração de EROs também já foram

observadas em répteis. Rey e colaboradores (2008) observaram que lagartos comuns (*Lacerta vivipara*) tinham um aumento da expressão de um homólogo de UCP quando expostos ao congelamento. Além disso, eles também observaram que a inibição desta UCP por GDP levava a um aumento na geração de EROs.

Desta forma, como vimos anteriormente, o aumento da capacidade oxidativa mitocondrial, juntamente com a poliinsaturação lipídica, nos músculos esqueléticos de peixes dourados aclimatados ao frio poderiam gerar uma grande quantidade de EROs, que prejudicariam diversas estruturas celulares, incluindo as próprias membranas mitocondriais. Sendo assim, como uma forma de diminuir este estresse oxidativo, os peixes expostos ao frio seriam capazes de promover um aumento da expressão de UCP3, a fim de evitar este aumento exagerado na produção de EROs.

Este controle da biogênese mitocondrial e de proteínas relacionadas, como a UCP, pode ser realizado por ação hormonal. Mais uma vez, os hormônios tireoideanos são candidatos a efetores desta regulação.

Embora não haja evidências claras sobre a participação destes hormônios no processo de aclimação de peixes ao frio, sua função em mamíferos é bem conhecida e é bem estabelecido que estes hormônios estão fortemente relacionados ao aumento da termogênese adaptativa em resposta à exposição de animais ao frio (para revisão, Bianco *et al.*, 2005). Esta resposta ocorre por meio de um aumento da desiodação intracelular do hormônio T4 (forma inativa) em T3 (forma ativa) catalisada por uma enzima chamada Desiodase tipo 2 (D2). Assim, há um aumento local do hormônio ativo, T3, que, quando ligado aos receptores nucleares de hormônios tireoidianos, aumenta a expressão de diversos genes envolvidos na termogênese. Em tecido adiposo marrom, esta indução da termogênese é dependente de AMPc, que aumenta a expressão do gene da D2 e,

conseqüentemente, a produção de T3 catalisada por esta enzima. Além destes efeitos no tecido adiposo marrom, os hormônios tireoidianos também medeiam mecanismos termogênicos no músculo esquelético, baseado no aumento de reações enzimáticas que fazem a ciclagem de ATP, criando ciclos fúteis, como a Na^+/K^+ -ATPase e a Ca^{2+} -ATPase. Esta última parece ter um papel importante na termogênese muscular, principalmente em animais que não possuem o tecido adiposo marrom (Arruda *et al.*, 2008).

Os hormônios tireoidianos também são capazes de aumentar a biogênese mitocondrial. A ligação de T3 em seus receptores nucleares modulam a expressão de diversos genes mitocondriais e nucleares, dentre os quais se encontram o NRF-1 e o PGC-1 α (para revisão, Weitzel *et al.*, 2003). Estes fatores transcricionais são responsáveis pela regulação da expressão de diversos outros genes mitocondriais e nucleares, que culminam com a expressão de proteínas que constituem a organela. Dentre elas, estão as subunidades da citocromo *c* oxidase, citrato sintase, entre outras. Em peixes, é o PGC-1 β que parece regular o processo de biogênese mitocondrial, juntamente com o NRF-1, enquanto o PGC-1 α está associado ao aumento da oxidação de ácidos graxos por meio do PPAR- α (LeMoine *et al.*, 2008).

Dentre estes genes regulados pelos hormônios tireoidianos, encontram-se os da família das UCPs (UCP1-3). Já foi observado que a manipulação dos estados tireoidianos (hipo-, eu- e hipertireoideo) era capaz de modular a expressão de UCP3 no músculo esquelético de forma hormônio-dependente (Larkin *et al.*, 1997; Jekabsons *et al.*, 1999; Sprague *et al.*, 2007). Ou seja, animais hipotireoideos tinham uma diminuição da expressão de UCP3, enquanto animais tratados com hormônios aumentavam a expressão desta proteína no músculo.

Sendo assim, as modificações no metabolismo oxidativo mitocondrial são fundamentais durante a aclimatação ao frio. O aumento da biogênese mitocondrial é muito importante não apenas para manter a taxa de síntese de ATP para a contração muscular e outras funções importantes, mas também para facilitar a difusão de moléculas, como o O_2 , dentro da célula. Além disso, a ativação de uma proteína desacopladora pode levar a um leve desacoplamento que diminui a geração de EROs sem prejudicar substancialmente a síntese de ATP mitocondrial.

6 CONCLUSÕES

Nesta dissertação, pudemos verificar que o músculo branco de peixes dourados possui uma atividade de HK semelhante à isoenzima HK-II de mamíferos. Ademais, observamos que a atividade total da HK é bem distribuída entre as frações subcelulares, mas a atividade específica dessa enzima é maior na fração particulada (mitocôndria e microssoma). Quando caracterizada cineticamente, a HK associada à fração mitocondrial se comporta de forma semelhante à HK-II de mamíferos, com algumas disparidades no perfil inibitório e afinidade por frutose. Como dito acima, a aclimação ao frio promove um aumento na atividade da HK nas frações particuladas, mas não na fração citosólica.

O aumento na atividade HK na fração mitocondrial foi acompanhado do aumento de mesma magnitude das enzimas mitocondriais citrato sintase e F_0F_1 -ATPase. Estes dados sugeriram um aumento na capacidade oxidativa, decorrente da elevação da densidade de volume mitocondrial que é importante tanto para a manutenção da síntese de ATP para suprir as funções fisiológicas (ex: manter os mecanismos de contração muscular durante a locomoção), quanto para diminuir a distância de difusão entre a mitocôndria e o citoplasma, o que permite o melhor fluxo de O_2 e metabólitos. Como este aumento no metabolismo oxidativo pode gerar danos à mitocôndria e às demais estruturas celulares, por conta da geração exacerbada de espécies reativas de oxigênios, parece que as mitocôndrias do músculo branco dos peixes dourados passam a expressar mecanismos de defesa antioxidante, tais como o aumento da associação entre HK e mitocôndria e a ativação/ aumento da expressão de proteínas desacopladoras. Estes mecanismos visam, em última análise, diminuir o gradiente eletroquímico de tal maneira que a

síntese de ATP não seja prejudicada, mas haja uma diminuição na formação de EROs, que é dependente do potencial de membrana mitocondrial.

Como conclusão geral, observamos que a aclimação de peixes dourados a 5°C promoveu um aumento na biogênese mitocondrial, bem como do consumo de O₂ desacoplado da síntese de ATP, provavelmente induzido por uma UCP. Aliado a isso, enquanto nenhuma modificação nas enzimas relacionadas à via glicolítica foi observada, houve um aumento na atividade da HK associada à mitocôndria. Essas modificações levariam a um aumento da capacidade oxidativa e do vazamento de H⁺, que poderia funcionar como um mecanismo de defesa antioxidante preventiva, tal qual a associação entre HK e mitocôndria, levando à diminuição da produção de EROs, que pode estar aumentada durante a exposição ao frio, e, conseqüentemente, reduzindo a o dano oxidativo (Figura 20).

A continuação deste trabalho e a utilização de novas abordagens técnicas serão de grande importância para a compreensão dos eventos aqui mencionados.

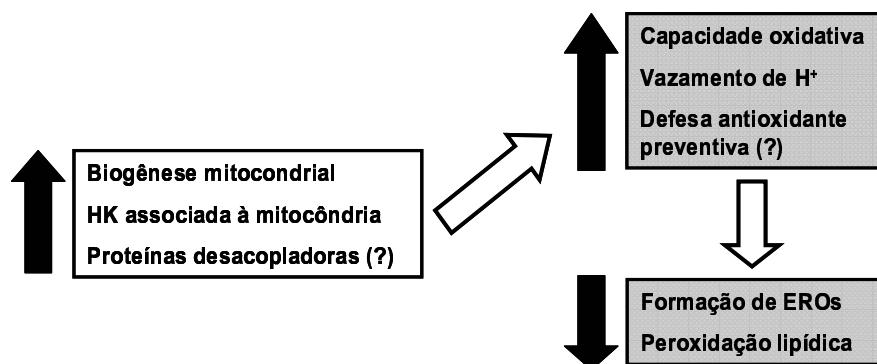


Figura 20: Conseqüências da aclimação ao frio sobre o metabolismo energético do músculo esquelético branco de peixes dourados. Hipótese criada de acordo com os dados obtidos nesta dissertação sobre os efeitos da aclimação ao frio sobre o metabolismo muscular de peixes dourados.

REFERÊNCIAS

Al jamal, J. A. (2004). Effect of different thyroid states on mitochondrial porin synthesis and hexokinase activity in developing rabbit brain. *J. Biochem.* **135**, 253-258.

Anderson, J. W., Herman, R. H., Tyrrell, J. B., Cohn, R. M. (1971). Hexokinase: a compartmented enzyme. *Am. J. Clin. Nutr.* **24**, 642–650.

Andersson, U., Scarpulla, R. C. (2001). PGC-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3738-3749.

Ardehali, H., Yano, Y., Printz, R. L., Koch, S., Whitesell, R. R., May, J. M., Granner, D. K. (1996). Functional organization of mammalian hexokinase II. Retention of catalytic and regulatory functions in both the NH₂ and COOH-terminal halves. *J. Biol. Chem.* **271**, 1849–1852.

Arora, K. K., Pedersen, P. L. (1988). Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J. Biol. Chem.* **263**, 17422–17428.

Arruda, A. P., Ketzer, L. A., Nigro, M., Galina, A., Carvalho, D. P., de Meis, L. (2008). Cold tolerance in hypothyroid rabbits: role of skeletal muscle mitochondria and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoform 1 heat production. *Endocrinology.* **149**, 6262-6271.

Baar, K., Wende, A. R., Jones, T. E., Marison, M., Nolte, L. A., Chen, M., Kelly, D. P., Holloszy, J. O. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* **16**, 1879-1886.

Baijal, M., Wilson, J. E. (1992). Functional consequences of mutation of highly conserved serine residues, found at equivalent positions in the N- and C-terminal domains of mammalian hexokinases. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 271–278.

Barger, P. M., Kelly, D. P. (2000). PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 238-245.

Bass, A., Ostádal, B., Pelouch, V., Vítek, V. (1973) Differences in weight parameters, myosin-ATPase activity and the enzyme pattern of energy supplying metabolism between the compact and spongy cardiac musculature of carp (*Cyprinus carpio*) and turtle (*Testudo Horsfieldi*). *Pflugers Arch.* **343**, 65-77.

BeltrandelRio, H., Wilson, J. E. (1991). Hexokinase of rat brain mitochondria: relative importance of adenylate kinase and oxidative phosphorylation as sources of substrate ATP, and interaction with intramitochondrial compartments of ATP and ADP. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 183–194.

BeltrandelRio, H., Wilson, J. E. (1992a). Coordinated regulation of cerebral glycolysis and oxidative metabolism, mediated by mitochondrially bound hexokinase dependent on intramitochondrially generated ATP. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 667–677.

BeltrandelRio, H., Wilson, J. E. (1992b). Interaction of mitochondrially bound rat brain hexokinase with intramitochondrial compartments of ATP generated by oxidative phosphorylation and creatine kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **299**, 116–124.

Bennett, A. F. (1990) Thermal dependence of locomotor capacity. *Am. J. Physiol.* **259**, R253–R258.

Berger, J., Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* **53**, 409-435.

Bianco, A. C., Maia, A. L., da-Silva, W. S., Christoffolete, M. A. (2005). Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci. Rep.* **25**, 191-208.

Blin, C., Panserat, S., Médale, F., Gomes, E., Breque, J., Kaushik, S., Krishnamoorthy, R. (1999). Teleost liver hexokinase- and glucokinase-like enzymes: partial cDNA cloning and phylogenetic studies in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* **21**, 93-102.

Blin, C., Panserat, S., Kaushik, S., Krishnamoorthy, R. (2000). Partial molecular cloning and tissue distribution of hexokinase I cDNA in common carp. *J. Fish Biol.* **56**, 1558-1561.

Block, B. A. (1994). Thermogenesis in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 535 -577.

Bork, P., Sander, C., Valencia, A. (1993). Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Prot. Sci.* **2**, 31–40.

Boyer, P. D. (1998). ATP synthase—past and future. *Biochim. Biophys. Acta.* **1365**, 3–9.

Brand, M. D., Esteves, T. C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* **2**, 85–93.

Brand, M. D., Couture, P., Else, P. L., Withers, K. W., Hulbert, A. J. (1991). Evolution of energy metabolism: proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile. *Biochem. J.* **275**, 81–86.

Branvold, D. J., Allred, D. R., Beckstead, D. J., Kim, H. J., Fillmore, N., Condon, B. M., Brown, J. D., Sudweeks, S. N., Thomson, D. M., Winder, W. W. (2008). Thyroid hormone effects on LKB1, MO25, phospho-AMPK, phospho-CREB, and PGC-1alpha in rat muscle. *J. Appl. Physiol.* **105**, 1218–1227.

Brown, J., Miller, D. M., Holloway, M. T., Leve, G. D. (1967). Hexokinase isoenzymes in liver and adipose tissue of man and dog. *Science* **155**, 205–207.

Burleigh, I. G., Schimke, R. T. (1969). The activities of some enzymes concerned with energy metabolism in mammalian muscles of differing pigmentation. *Biochem. J.* **113**, 157–66.

Bustamante, E., Morris, H. P., Pedersen, P. L. (1981). Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J. Biol. Chem.* **256**, 8699–8704.

Bustamante, E., Pedersen, P. L. (1977). High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3735–3739.

Cadenas, E., Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222–30.

Cannon, B., Nedergaard, J. (2003). The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp. Physiol.* **88**, 65-84.

Cannon, B., Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359.

Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A., Ureta, T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1401**, 242–264.

Capilla, E., Médale, F., Panserat, S., Vachot, C., Rema, P., Gomes, E., Kaushik, S., Navarro, I., Gutiérrez, J. (2004). Response of hexokinase enzymes and the insulin system to dietary carbohydrates in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Reprod. Nutr. Dev.* **44**, 233-242.

Chance, B., Williams, G. R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* **17**, 65-134.

Chappell, J. B., Perry, S. V. (1954). Biochemical and osmotic properties of skeletal muscle mitochondria. *Nature* **173**, 1094–1095.

Claeyssen, E., Rivoal, J. (2007). Isozymes of plant hexokinase: occurrence, properties and functions. *Phytochemistry* **68**, 709-731.

Cossins, A., Fraser, J., Hughes, M., Gracey, A. (2006). Post-genomic approaches to understanding the mechanisms of environmentally induced phenotypic plasticity. *J. Exp. Biol.* **209**, 2328-2336.

Coulibaly, I., Gahr, S. A., Palti, Y., Yao, J., Rexroad, C. E. 3rd. (2006). Genomic structure and expression of uncoupling protein 2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics.* **7**, 203.

Crabtree, B., Newsholme, E. A. (1972). The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* **126**, 49–58.

Crane, R. K., Sols, A. (1953). The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenates. *J. Biol. Chem.* **203**, 273–292.

Crockett, E. L., Sidell, B. D. (1990) Some pathways of energy metabolism are cold adapted in Antarctic fishes. *Physiol. Zool.* **63**, 472-88.

da-Silva, W. S., Rezende, G. L., Galina, A. (2001). Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *J. Exp. Bot.* **52**, 1191-1201.

da-Silva, W. S., Gómez-Puyou, A., de Gómez-Puyou, M. T., Moreno-Sanchez, R., De Felice, F. G., de Meis, L., Oliveira, M. F., Galina, A. (2004). Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 39846–39855.

De Graaf, F., Van Raamsdonk, W., Van Asselt, E., Diegenbach, P. C. (1991). Histochemical profiles of motoneurons innervating muscle fibres with different activity patterns in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Histochem. J.* **23**, 273-280.

Dudley, G. A., Tullson, P. C., Terjung, R. L. (1987). Influence of mitochondrial content on the sensitivity of respiratory control. *J. Biol. Chem.* **262**, 9109–9114.

Egginton, S., Sidell, B. D. (1989). Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **256**, R1–R9.

Endo, M., Kimura, M. (1982). Histological and enzyme histochemical studies on the nephrons of the freshwater fishes, *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*. *J. Morphol.* **173**, 29-33.

Estabrook, R. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol.* **10**, 41-47.

Fiske, C. H., Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375–400.

Freeman, J. A. (1950). Oxygen consumption, brain metabolism and respiratory movements of goldfish during temperature acclimatization, with special reference to lowered temperatures. *Biol. Bull.* **99**, 416-424.

Fulton, T. (1902). Rate of growth of seas fishes. *Sci. Invest. Fish Division Scot. Rept.* **20**, 1035–1039.

Galina, A., Reis, M., Albuquerque, M. C., Puyou, A. G., Puyou, M. T., de Meis, L. (1995). Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *Biochem. J.* **309**, 105-112.

Gelb, B. D., Adams, V., Jones, S. N., Griffin, L. D., MacGregor, G. R., McCabe, E. R. B. (1992). Targeting of hexokinase 1 to liver and hepatoma mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 202–206.

Gerlach, G. E Turay, L., Malik, K. T. A., Lida, J., Scutt, A., Goldspink, G. (1990). Mechanisms of temperature acclimation in the carp: a molecular biological approach. *Am. J. Physiol.* **259**, R237–R244.

Gnaiger, E. (2001). Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir. Physiol.* **128**, 277–297.

Gnaiger, E., Kuznetsov, A. V., Schneeberger, S., Seiler, R., Brandacher, G., Steurer, W., Margreiter, R. (2000). Mitochondria in the cold. In: *Life in the Cold*, edited by Heldmaier G and Klingenspor M. Berlin: Springer, 2000, p. 431–442.

Goffart, S., Wiesner, R. J. (2003). Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp. Physiol.* **88**, 33-40.

Goldin, N., Arzoine, L., Heyfets, A., Israelson, A., Zaslavsky, Z., Bravman, T., Bronner, V., Notcovich, A., Shoshan-Barmatz, V., Flescher, E. (2008). Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase. *Oncogene* **27**, 4636-4643.

González, C., Ureta, T., Sanchez, R., Niemeyer, H. (1964). Multiple molecular forms of ATP:hexose 6-phosphotransferase from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**, 347–352.

González-Alvarez, R., Ortega-Cuellar, D., Hernández-Mendoza, A., Moreno-Arriola, E., Villaseñor-Mendoza, K., Gálvez-Mariscal, A., Pérez-Cruz, M. E., Morales-Salas, I., Velázquez-Arellano, A. (2009). The hexokinase gene family in the zebrafish: structure, expression, functional and phylogenetic analysis. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **152**, 189-195.

Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R. B., Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* **15**, 1406–1418.

Gracey, A. Y., Fraser, E. J., Li, W., Fang, Y., Taylor, R. R., Rogers, J., Brass, A., Cossins, A. R. (2004). Coping with cold: an integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16970-16975.

Grossbard, L., Schimke, R. T. (1966). Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms. *J. Biol. Chem.* **241**, 3546–3560.

Guderley, H. (2004a). Locomotor performance and muscle metabolic capacities: impact of temperature and energetic status. *Comp. Biochem. Physiol. B* **139**, 371-382.

Guderley, H. (2004b). Metabolic responses to low temperatures in fish muscle. *Biol. Rev.* **79**, 409–427.

Guderley, H., Blier, P. U. (1988). Thermal acclimation in fish: conservative and labile properties of swimming muscle. *Can. J. Zool.* **66**, 1105–1115.

Guderley, H., Johnston, I. A. (1996). Plasticity of fish muscle mitochondria with thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* **199**, 1311–1317.

Guderley, H., St-Pierre, J. (2002). Going with the flow or life in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change. *J. Exp. Biol.* **205**, 2237–2249.

Guderley, H., St-Pierre, J., Couture, P., Hulbert, A. J. (1997). Plasticity of the properties of mitochondria from rainbow trout red muscle with seasonal acclimatization. *Fish Physiol. Biochem.* **16**, 531–541.

Gumaa, K. A., McLean, P. (1969). A possible interrelationship between binding of hexokinase and the site of ATP formation in Krebs ascites cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 771–779.

Gutekunst, D. I., Wilson, J. E. (1981). Effect of hypo- and hyperthyroidism on hexokinase in the developing cerebellum of the rat. *J. Neurochem.* **36**, 1781-1785

Handschin, C., Spiegelman, B. M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.* **27**, 728-735.

Harding, M. M., Anderberg, P. I., Haymet, A. D. (2003). 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1381-1392.

Harris, M.H., Thompson, C.B. (2000). The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death. Differ.* **7**, 1182-1191.

Hashimoto, M., Wilson, J. E. (2000). Membrane potential-dependent conformational changes in mitochondrially bound hexokinase of brain. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**, 163-173.

Hazel, J. R. (1972a). The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the epaxial muscle of the common goldfish (*Carassius auratus* L.). I. Properties of the enzyme and the effect of lipid extraction. *Comp. Biochem. Physiol.* **43B**, 837-861.

Hazel, J. R. (1972b). The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the epaxial muscle of the common goldfish (*Carassius auratus* L.). II. Lipid reactivation of the soluble enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.* **43B**, 863-882.

Hazel, J. R., Prosser, C. L. (1974). Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.* **54**, 620-677.

Hazel, J. R., Williams, E. E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* **29**, 167-227.

Hsieh, A. C. L., Carlson, L. D. (1957). Role of Adrenaline and Noradrenaline in Chemical Regulation of Heat Production. *Am. J. Physiol.* **190**, 243-246.

Hochachka, P. W., Somero, G. N. (2002). Cellular metabolism, regulation, and homeostasis. In: *Biochemical Adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press, New York, USA., p. 26-38

Hofmann, S., Pette, D. (1994). Low-frequency stimulation of rat fast-twitch muscle enhances the expression of hexokinase II and both the translocation and expression of glucose transporter 4 (GLUT-4). *Eur. J. Biochem.* **219**, 307–315.

Holloszy, J. O., Coyle, E. F. (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.* **56**, 831–838.

Holloszy, JO, Oscai LB, Don IJ, and Mole PA. (1970). Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 1368-1373.

Hood, D. A., Irrcher, I., Ljubicic, V., Joseph, A. M. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* **209**, 2265-2275.

Itoi, S., Kinoshita, S., Kikuchi, K., Watabe, S. (2003). Changes of carp F_0F_1 -ATPase in association with temperature acclimation *Am. J. Physiol.* **284**, R153–R163.

Iynedjian P. B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem. J.* **293**, 1–13.

Jang, J. -C., León, P., Zhou, L., Sheen, J. (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**, 5–19.

Jastroch, M., Wuertz, S., Kloas, W., Klingenspor, M. (2005). Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol. Genomics* **22**, 150-156.

Jastroch, M., Buckingham, J. A., Helwig, M., Klingenspor, M., Brand, M. D. (2007). Functional characterisation of UCP1 in the common carp: uncoupling activity in liver mitochondria and cold-induced expression in the brain. *J. Comp. Physiol. B* **177**, 743-752.

Jekabsons, M. B., Gregoire, F.M., Schonfeld-Warden, N. A., Warden, C. H., Horwitz, B. A. (1999). T(3) stimulates resting metabolism and UCP-2 and UCP-3 mRNA but not nonphosphorylating mitochondrial respiration in mice. *Am. J. Physiol.* **277**, E380-389.

Johnston, I. A. (1977). Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp. Physiol.* **114**, 203–216.

Johnston, I. A. (1980). Specializations of fish muscle. In *Development and Specialization of muscle* (Soc. exp. Biology Seminar Series 7). (ed. D. F. Goldspink), pp. 123–148. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.

Johnston, I. A. (1980). Capillarisation, oxygen diffusion distances and mitochondrial content of carp muscles following acclimation from summer to winter temperatures. *Cell Tiss. Res.* **222**, 325-337.

Johnston, I. A., Maitland, B. (1980). Temperature acclimation in crucian carp (*Carassius carassius* L.); morphometric analyses of muscle fibre ultrastructure. *J. Fish. Biol.* **17**, 113–125.

Johnston, I. A., Moon, T. W. (1981). Fine structure and metabolism of multiply innervated fast muscle fibres in teleost fish. *Cell Tissue Res.* **219**, 93–109.

Johnston, I. A., Wokoma, A. (1986). Effects of temperature and thermal acclimation on contractile properties and metabolism of skeletal muscle in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *J. Exp. Biol.* **120**, 119-130.

Johnston, I. A., Dunn, J. (1987). Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. In "*Temperature and animal cells*". (ed. K. Bowler). pp. 67-93. Society for Experimental Biology Symposium XXXXI: Cambridge University Press.

Johnston, I. A., Kemple, G. K. (2002). Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour. *J. Exp. Biol.* **205**, 2305–2322.

Johnston, I. A., Sidell, B. D., Driedzic, W. R. (1985). Force-velocity characteristics and metabolism of carp muscle fibres following temperature acclimation. *J. Exp. Biol.* **119**, 239–249.

Johnston, I. A., Camm, J. -P., White, M. (1988). Specialisations of swimming muscles in the pelagic Antarctic fish *Pleuragramma antarcticum*. *Mar. Biol.* **100**, 3– 12.

Johnston, I. A., Fleming, J. D., Crockford, T. (1990). Thermal acclimation and muscle contractile properties in cyprinid fish. *Am. J. Physiol.* **259**, 231–236.

Johnston, I. A., Calvo, J., Guderley, H., Fernandez, D., Palmer, L. (1998). Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. *J. Exp. Biol.* **201**, 1–12.

Jones, J. P., Dohm, G. L. (1997). Regulation of glucose transporter GLUT-4 and hexokinase II gene transcription by insulin and epinephrine. *Am. J. Physiol.* **273**, E682-687.

Jones, P. L., Sidell, B. D. (1982). Metabolic responses of striped bass (*Morone saxatilis*) to temperature acclimation. II. Alterations in metabolic carbon sources and distributions of fiber types in locomotory muscle. *J. Exp. Zool.* **219**, 163–171.

Katzen, H. M., Schimke, R. T. (1965). Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 1218–1225.

Katzen, H. M., Soderman, D. D., Wiley, C. E. (1970). Multiple forms of hexokinase. Activities associated with subcellular particulate and soluble fractions of normal and streptozotocin diabetic rat tissues. *J. Biol. Chem.* **245**, 4081–4096.

Kaur, G., Baquer, N. Z., Singh, R. (1987). Changes in hexokinase isoenzymes in regions of rat brain during thyroid deficiency. *Biochem. Int.* **14**, 939-947.

Keller, P. A., Lehr, L., Giacobino, J. P., Charnay, Y., Assimacopoulos-Jeannet, F., Giovannini, N. (2005). Cloning, ontogenesis, and localization of an atypical uncoupling protein 4 in *Xenopus laevis*. *Physiol. Genomics* **22**, 339-345.

Kilarski, M. W., Romek, M., Kozlowaska, M., Görlich, A. (1996). Short-term thermal acclimation induces adaptive changes in the inner mitochondrial membranes of fish skeletal muscle. *J. Fish Biol.* **49**, 1280–1290.

Klandorf, H., Clarke, B. L., Scheck, A. C., Brown, J. (1986). Regulation of glucokinase activity in the domestic fowl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1086-1093.

Klingenberg, M., Huang S. -G. (1999). Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue *Biochim. Biophys. Acta* **1415**, 271–296.

Klingenspor, M. (2003). Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp. Physiol.* **88**, 141-8.

Klingenspor, M., Fromme, T., Hughes, D. A. Jr., Manzke, L., Polymeropoulos, E., Riemann, T., Trzcionka, M., Hirschberg, V., Jastroch, M. (2008). An ancient look at UCP1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1777**, 637-41.

Kondo, H., Misaki, R., Gelman, L., Watabe, S. (2007). Ligand-dependent transcriptional activities of four torafugu pufferfish *Takifugu rubripes* peroxisome proliferator-activated receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* **154**, 120-127.

Koolman, J., Roehm, K. H. (2005). Organelles. In: *Color atlas of biochemistry*. 2. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 467p.

Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., Starkov, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**, 15-8.

Kraft, C. S., LeMoine, C. M., Lyons, C. N., Michaud, D., Mueller, C. R., Moyes, C. D. (2006). Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Am. J. Physiol.* **290**, C1119-C1127.

Krey, G., Keller, H., Mahfoudi, A., Medin, J., Ozato, K., Dreyer, C., Wahli, W. (1993). Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **47**, 65-73.

Krieglstein, J., Schachtschabel, D. O., Wever, K., Wickop, G. (1981). Influence of thiopental on intracellular distribution of hexokinase activity in various tumor cells. *Arzneimittelforschung* **31**, 121-123.

Krauss, S., Zhang, C. Y., Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 248-261.

Kuznetsov, A. V., Schneeberger, S., Seiler, R., Brandacher, G., Mark, W., Steurer, W., Saks, V., Usson, Y., Margreiter, R., Gnaiger, E. (2004). Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**, H1633–H1641.

Langfeld, K. S., Crockford, T., Johnston, I. A. (1991). Temperature acclimation in the common carp: force–velocity characteristics and myosin subunit composition of slow muscle fibres. *J. Exp. Biol.* **155**, 291–304.

Larkin, S., Mull, E., Miao, W., Pittner, R., Albrandt, K., Moore, C., Young, A., Denaro, M., Beaumont, K. (1997). Regulation of the third member of the uncoupling protein family, UCP3, by cold and thyroid hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 222-227.

Leaver, M. J., Ezaz, M. T., Fontagne, S., Tocher, D. R., Boukouvala, E., Krey, G. (2007). Multiple peroxisome proliferator-activated receptor beta subtypes from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Mol. Endocrinol.* **38**, 391-400.

Ledesma A, de Lacoba MG, Rial E. (2002). The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol.* **3**, REVIEWS3015.1–3015.9.

Leek, B. T., Mudaliar, S. R., Henry, R., Mathieu-Costello, O., Richardson, R. S. (2001). Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**, R441-447.

Lehman, J. J., Barger, P. M., Kovacs, A., Saffitz, J. E., Medeiros, D. M., Kelly, D. P. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest.* **106**, 847-856.

LeMoine, C. M. R., Genge, C. E., Moyes, C. D. (2008). Role of the PGC-1 family in the metabolic adaptation of goldfish to diet and temperature. *J. Exp. Biol.* **211**, 1448-1455.

Liang, H., Ward, W. F. (2006). PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ.* **30**, 145-151.

Liang, X. F., Ogata, H. Y., Oku, H., Chen, J., Hwang, F. (2003). Abundant and constant expression of uncoupling protein 2 in the liver of red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **136**, 655–661.

Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., Spiegelman, B. M. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* **277**, 1645-1648.

Lowell, B. B., Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652–660.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–75.

Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Storey, J. M., Storey, K. B. (2001). Influence of exercise on the activity and the distribution between free and bound forms of glycolytic and associated enzymes in tissues of horse mackerel. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 1055–1064

Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P. E., Skeen, J. E., Gottlob, K., Chandel, N. S., Thompson, C. B., Robey, R. B., Hay, N. (2004). Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* **16**: 819–830.

Makinen, M. W., Lee, C. P. (1968). Biochemical studies of skeletal muscle mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 75–82.

Mark, F. C., Lucassen, M., Pörtner, H. O. (2006). Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **1D**, 365-374.

Mathupala, S. P., Ko, Y. H., Pedersen, P. L. (2006). Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* **25**, 4777-4786.

McClelland, G. B., Craig, P. M., Dhekney, K., Dipardo, S. (2006). Temperature and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *J. Physiol.* **577**, 739-751.

Miccoli, L., Oudard, S., Sureau, F., Poirson, F., Dutrillaux, B., Poupon, M. -F. (1996). Intracellular pH governs the subcellular distribution of hexokinase in a glioma cell line. *Biochem. J.* **313**, 957–962.

Miccoli, L., Beurdeley-Thomas, A., De Pinieux, G., Sureau, F., Oudard, S., Dutrillaux, B., Poupon, M. -F. (1998). Light-induced photoactivation of hypericin affects the energy metabolism of human glioma cells by inhibiting hexokinase bound to mitochondria. *Cancer Res.* **58**, 5777–5786.

Miernyk, J. A., Dennis, D. T. (1983). Mitochondrial, plastid, and cytosolic isozymes of hexokinase from developing endosperm of *Ricinus communis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **226**, 458–468.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* **191**, 144-148.

Moon, T. W., Hochachka, P. W. (1971). Temperature and enzyme activity in poikilotherms: Isocitrate dehydrogenase in rainbow trout liver. *Biochem. J.* **123**, 695–705.

Mortensen, O. H., Frandsen, L., Schjerling, P., Nishimura, E., Grunnet, N. (2006). PGC-1alpha and PGC-1beta have both similar and distinct effects on myofiber switching toward an oxidative phenotype. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**, E807-E816.

Nakashima, R. A., Mangan, P. S., Colombini, M., Pedersen, P. L. (1986). Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. *Biochemistry* **25**, 1015–1021.

Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005). Fosforilação oxidativa e fotofosforilação. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4^o ed, Wiley-Liss Inc., New York, USA, 1119 p.

Nicholls, D. G. (1976). The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* **61**, 103-110.

Nicholls, D. G. (2001). A history of UCP1. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 751-755.

Nicholls, D. G. (2006). The physiological regulation of uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1757**, 459-466.

Nicholls, D. G., Locke, R. M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.* **64**, 1–64.

O'Doherty, R. M., Bracy, D. P., Granner, D. K., Wasserman, D. H. (1996). Transcription of the rat skeletal muscle hexokinase II gene is increased by acute exercise. *J. Appl. Physiol.* **81**, 789-793.

Ovádi, J., Srere, P. A. (2000). Macromolecular compartmentation and channeling. *Intl. Rev. Cytol.* **192**, 255–280.

Pamplona, R., Portero-Otin, M., Requena, J. R., Thorpe, S. R., Herrero, A., Barja, G. (1999). A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech. Ageing Dev.* **106**, 283–296.

Panserat, S., Blin, C., Médale, F., Plagnes-Juan, E., Brèque, J., Krishnamoorthy, J., Kaushik, S. (2000a). Molecular cloning, tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNAs from gilthead seabream (*Sparus aurata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim. Biophys. Acta.* **1474**, 61-69.

Panserat, S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S. (2000b). Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **278**, R1164-1170.

Panserat, S., Fontagné, S., Bergot, P., Kaushik, S. (2001). Ontogenesis of hexokinase I and hexokinase IV (glucokinase) gene expressions in common carp (*Cyprinus carpio*) related to diet. *Br. J. Nutr.* **85**, 649-651.

Parry, D. M., Pedersen, P. L. (1983). Intracellular localization and properties of particulate hexokinase in the Novikoff ascites tumor. Evidence for an outer mitochondrial membrane location. *J. Biol. Chem.* **258**, 10904–10912.

Parry, D. M., Pedersen, P. L. (1984). Intracellular localization of rat kidney hexokinase. Evidence for an association with low density mitochondria. *J. Biol. Chem.* **259**, 8917–8923.

Pastorino, J. G., Shulga, N., Hoek, J. B. (2002). Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 7610–7618.

Penso, J., Beitner, R. (1998). Clotrimazole and bifonazole detach hexokinase from mitochondria of melanoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **342**, 113–117.

Penso, J., Beitner, R. (1998). Lithium detaches hexokinase from mitochondria and

inhibits proliferation of B16 melanoma cells. *Mol. Genet. Metab.* **78**, 74–78.

Porter, N. A. (1984). Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **105**, 273–282.

Pörtner, H. O. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* **88**, 137–146.

Pörtner, H. O., Mark, F. C., Bock, C. (2004). Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **141**, 243-260.

Postic, C., Shiota, M., Magnuson, M. A. (2001). Cell-specific roles of glucokinase in glucose metabolism. *Recent Prog. Horm. Res.* **56**, 195–217.

Polakis, P. G., Wilson, J. E. (1985). An intact hydrophobic N-terminal sequence is critical for binding of rat brain hexokinase to mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **236**, 328–337.

Precht, H. (1958). Concepts of the temperature adaptation of unchanging reaction systems of cold-blooded animals. In: *Physiological Adaptations* (ed. C. L. Prosser), *Symposium General Physiology*, American Physiology Society, Washington D.C., USA. p. 50–78.

Puigserver, P., Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* **24**, 78-90.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.

Radojković, J., Ureta, T. (1987). Hexokinase isozymes from the Novikoff hepatoma. Purification, kinetic and structural characterization, with emphasis on hexokinase C. *Biochem. J.* **242**, 895–903.

Rey, B., Sibille, B., Romestaing, C., Belouze, M., Letexier, D., Servais, S., Barré, H., Duchamp, C., Voituron, Y. (2008). Reptilian uncoupling protein:

functionality and expression in sub-zero temperatures. *J. Exp. Biol.* 211, 1456-1462.

Rezende, G. L., Logullo, C., Meyer, L., Machado, L. B, Oliveira-Carvalho, A. L., Zingali, R. B., Cifuentes, D., Galina, A. (2006). Partial purification of tightly bound mitochondrial hexokinase from maize (*Zea mays* L.) root membranes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **39**, 1159-1169.

Ricquier, D., Kader, J. C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium-dodecyl sulfate-polyarylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 577–83.

Robey, R. B., Hay, N. (2006). Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* **25**, 4683–4696.

Rodnick, K. J., Sidell B. D. (1997). Structural and biochemical analyses of cardiac ventricular enlargement in cold-acclimated striped bass. *Am. J. Physiol.* **273**, R252-258.

Rodríguez, A., de la Cera, T., Herrero, P., Moreno, F. (2001). The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **355**, 625–631.

Rogers, P. A., Fisher, R. A., Harris, H. (1975). An electrophoretic study of the distribution and properties of human hexokinases. *Biochem. Genet.* **13**, 857–866.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 675-709.

Rose, I. A., Warms, J. V. B. (1967). Mitochondrial hexokinase. Release, rebinding, and location. *J. Biol. Chem.* **242**, 1635–1645.

Rousset, S., Alves-Guerra, M. C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulicier, A. M., Bouillaud, F., Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* **53 Suppl 1**, S130-135.

Sabell, I., Morata, P., Quesada, J., Morell, M. (1985). Effect of thyroid hormones on the glycolytic enzyme activity in brain areas of the rat. *Enzyme.* **34**, 27-32.

Sabell, I., Morata, P., Quesada, J., Morell, M. (1987). Activities of glycolytic enzymes in some brain areas of thyroidectomized rats and their response to replacement therapy. *Enzyme*. **37**, 169-173.

Samec, S., Seydoux, J., Dulloo, A. G. (1998). Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? *FASEB J.* **12**, 715–724.

Sänger, A. M. (1993). Limits to the acclimation of fish muscle. *Rev. Fish Biol. Fish.* **3**, 1–15.

Scarpulla, R. C. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* **97**, 673-683.

Shabalina, I. G., Jacobsson, A., Cannon B., Nedergaard, J. (2004). Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids, *J. Biol. Chem.* **279**, 38236–38248.

Sharma, C., Manjeshwar, R., Weinhouse, S. (1963). Effects of diet and insulin on glucose-adenosine triphosphate phosphotransferases of rat liver. *J. Biol. Chem.* **238**, 3840–3845

Schofield, P. J., Williams, J. D., Nico, L. G., Fuller, P., Thomas, M. R. (2005). Foreign Nonindigenous Carps and Minnows (Cyprinidae) in the United States - A guide to their Identification, Distribution, and Biology: *U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2005-5041*, 1-103.

Sidell, B. D. (1980). Responses of goldfish (*Ciarassius auratus* L.) muscle to acclimation temperature: alterations in biochemistry and proportions of different fiber types. *Physiol. Zool.* **53**, 98–107.

Sidell, B. D. (1998) Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. *J. Exp. Biol.* **201**, 1119–1128.

Sisson, J. E., Sidell, B. D. (1987). Effect of thermal acclimation on muscle fibre recruitment of swimming striped bass (*Morone saxatilis*). *Physiol. Zool.* **60**, 310–320.

Skulachev, V. P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 100–124.

Sols, A., Crane, R. K. (1954). Substrate specificity of brain hexokinase. *J. Biol. Chem.*, **210**, 581–595.

Sprague, J. E., Yang, X., Sommers, J., Gilman, T. L., Mills, E. M. (2007). Roles of norepinephrine, free Fatty acids, thyroid status, and skeletal muscle uncoupling protein 3 expression in sympathomimetic-induced thermogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 274-280.

Stuart, J. A., Harper, J. A., Brindle, K. M., Brand, M. D. (1999). Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta.* **1413**, 50-54.

Suarez, R. K., Brown, G. S., Hochachka, P. W. (1986). Metabolic sources of energy for hummingbird flight. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **251**, 537–542.

Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., Zamzami, N., Jan, G., Kroemer, G., Brenner, C. (2006). GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene.* **26**, 2606-2620.

Thinnes, F. P. (1992). Evidence for extra-mitochondrial localization of the VDAC/porin channel in eukaryotic cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 71–75.

Tielens, A. G. M., van den Heuvel, J. M., van Mazijk, H. J., Wilson, J. E., Shoemaker, C. B. (1994). The 50-kDa glucose 6-phosphate-sensitive hexokinase of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **269**, 24736–24741.

Trayser, K. A., Colowick, S. P. (1961). Properties of crystalline hexokinase from yeast. IV. Multiple forms of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 177–181.

Tsai, H. J., Wilson, J. E. (1995). Functional organization of mammalian hexokinases: Characterization of chimeric hexokinases constructed from the N- and C-terminal halves of the rat Type I and Type II isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 206–214.

Tsai, H. J., Wilson, J. E. (1996). Functional organization of mammalian hexokinases. Both N- and C-terminal halves of the rat Type II isozyme possess catalytic sites. *Arch. Biochem. Biophys.* **329**, 17–23.

- Tsai, H. J., Wilson, J. E.** (1997). Functional organization of mammalian hexokinases. Characterization of the rat Type III isozyme and its chimeric forms, constructed with the N- and C-terminal halves of the Type I and Type II isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **338**, 183–192.
- Tyler, S., Sidell, B. D.** (1984). Changes in mitochondrial distribution and diffusion distances in muscle of goldfish upon acclimation to warm and cold temperatures. *J. Exp. Zool.* **232**, 1–9.
- Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., Spiegelman, B. M.** (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* **3**, 333-341.
- Ureta, T.** (1978). The role of isozymes in metabolism: A model of metabolic pathways as the basis for the biological role of isozymes. *Curr. Top. Cell. Regul.* **13**, 233–258.
- Ureta, T., Medina, C., Preller, A.** (1987). The evolution of hexokinases. *Arch. Biol. Med. Exp.* **20**, 343–357.
- Urich, K.** (1994). Glycolysis. In: *Comparative animal biochemistry*. 1^o ed, Springer-Verlag, New York, USA, p. 522-525.
- Van Bilsen, M., van der Vusse, G. J., Gilde, A. J., Lindhout, M., van der Lee, K. A.** (2002). Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding proteins controlling gene expression. *Mol. Cell Biochem.* **239**, 131-138.
- Van den Thillart, G., Modderkolk, J.** (1978). The effect of acclimation temperature on the activation energy of state III respiration and on the unsaturation of membrane lipids of goldfish mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **510**, 38–51.
- Van den Thillart, G., Smit, H.** (1984). Carbohydrate metabolism of goldfish (*Carassius auratus* L.). Effects of long term hypoxia-acclimation on enzyme patterns of red muscle, white muscle and liver. *J. Comp. Physiol. B* **154**, 477–486.
- van Raamsdonk, W., Smit-Onel, M. J., Diegenbach, P. C.** (1996). Quantitative enzyme- and immunohistochemistry of hexokinase and cytochrome c oxidase of spinal neurons in the zebrafish. *Acta Histochem.* **98**, 143-155.

Vidal-Puig, A. J. (2000). Uncoupling expectations. *Nat. Genet.* **26**, 387-388.

Viñuela, E., Salas, M., Sols, A. (1963). Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* **238**, 1175–1177.

Virbasius, J. V., Scarpulla, R. C. (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1309-1313.

Walker, D. G. (1963). On the presence of two soluble glucose-phosphorylating enzymes in adult liver and the development of one of these after birth. *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 209–226.

Watabe, S. (2002). Temperature plasticity of contractile proteins in fish muscle. *J. Exp. Biol.* **205**, 2231–2236.

Weitzel, J. M., Iwen, K. A., Seitz, H. J. (2003). Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp. Physiol.* **88**, 121-8.

White, T. K., Wilson, J. E. (1989). Isolation and characterization of the discrete N- and C-terminal halves of rat brain hexokinase: Retention of full catalytic activity in the isolated C-terminal half. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 373–393.

Williams, R. S., Salmons, S., Newsholme, E., Kaufman, R. E., Mellor J. (1986). Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **261**, 376-380.

Wilson, J. E. (1973). Ligand-induced conformations of rat brain hexokinase: effects of glucose-6-phosphate and inorganic phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 543–549.

Wilson, J. E. (1978). Ambiquitous enzymes: variation in intracellular distribution as a regulatory mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 124–125.

Wilson, J. E. (1985). Regulation of mammalian hexokinase activity. In: *Regulation of Carbohydrate Metabolism*, Vol. I (ed. R. Beitner), Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. p. 45–85.

Wilson, J. E. (1995). Hexokinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **126**, 65–198.

Wilson, J. E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* **206**, 2049–2057.

Wodtke, E. (1981a). Temperature adaptation of biological membranes. The effects of acclimation temperature on the unsaturation of the main neutral and charged phospholipids in mitochondrial membranes of the carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim. Biophys. Acta* **640**, 698–709.

Wodtke, E. (1981b). Temperature adaptation of biological membranes. Compensation of the molar activity of cytochrome c oxidase in the mitochondrial energy-transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Biochim. Biophys. Acta* **640**, 710–720.

Yoon, J. C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C. R., Granner, D. K., Newgard, C. B., Spiegelman, B. M. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131-138.

Sites consultados:

Fishbase *Carassius auratus auratus* - Goldfish. Disponível em <<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=271&genusname=Carassius&speciesname=auratus+auratus>>. Acesso em 07/01/2009.

Curriculum Vitae

Nome: Reinaldo Sousa dos Santos

Nascimento: 13/01/1985

Naturalidade: Rio de Janeiro

➤ **Formação Acadêmica**

Faculdade de Farmácia – Habilitação Farmacêutico pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), agosto de 2006.

➤ **Orientação de alunos**

1) Luan Pereira Diniz - Iniciação científica (Ciências Biológicas) de janeiro 2005 até janeiro 2009

2) Flavia Letícia Martins Peçanha - Iniciação científica (Ciências Biológicas Modalidade Médica) desde agosto 2008

➤ **Comunicação em congressos**

- 8 comunicações em congressos nacionais
- 11 comunicações em jornadas científicas
- 4 comunicações orais em jornadas/simpósios

➤ **Publicações**

1) Pereira Da Silva, A. P., El-Bacha, T., Kiaw, N., **Dos Santos, R. S.**, Da-Silva, W. S., Almeida, F. C., Da Poian, A. T., Galina, A. Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. *Biochemical Journal (London)*. **417**, 717-726, 2009.

2) Meis, L., Oliveira, G. M., Arruda, A. P., **Santos, R.**, Costa, R. M., Benchimol, M. The Thermogenic Activity of Rat Brown Adipose Tissue and Rabbit White Muscle Ca^{2+} -ATPase. *IUBMB Life (London)*. **57**, 337-345, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)