

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
(Bioquímica)

**ARIEL RODRIGUES CARDOSO**

**Efeitos de Dietas Hiperlipídicas Sobre  
Mitocôndrias de Fígado de Camundongos:  
Bioenergética, Transporte de  $K^+$  e Estado Redox**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

09/03/2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

ARIEL RODRIGUES CARDOSO

**Efeitos de Dietas Hiperlipídicas Sobre Mitocôndrias de Fígado de Camundongos: Bioenergética, Transporte de K<sup>+</sup> e Estado Redox**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo para Obtenção do  
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alicia Juliana Kowaltowski

São Paulo

2009

ARIEL RODRIGUES CARDOSO

Efeitos de Dietas Hiperlipídicas Sobre Mitocôndrias de Fígado de  
Camundongos: Bioenergética, Transporte de K<sup>+</sup> e Estado Redox

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química  
da Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

***Dedico este trabalho às  
minhas queridas: mãe  
Maria Elizabeth  
Rodrigues Cardoso e  
avó Jandyra Rodrigues  
Cardoso***

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora que teve muita paciência com as minhas idiossincrasias e meus desatinos. Além disso, ela demonstrou uma grande preocupação e atenção com o desenrolar do projeto. A Dr<sup>a</sup> Alicia sempre procurou ressaltar aspectos positivos da experiência acadêmica, incentivando seus alunos de maneiras deveras originais.

Aos colegas de laboratório pela solidariedade e alegria no cotidiano, tornando o ambiente rico em discussões científicas:

Douglas, que de tanto mentalizar conseguiu o que queria.

Heberty, figura ilustre do nosso laboratório, irreverente e desenvolto.

Luciane, que iniciou o estudo em animais transgênicos proporcionando novas perguntas.

Maynara, ternura de azul bebê nas apresentações, agradável companhia em seminários e eventos soltos.

Erich, meu amigo heterônimo.

Bruno, sócia, junto com o último somos uma trindade.

Felipe, que não sabe se gosta de coisas grandes ou pequenas; foi olhar as estrelas.

João Victor, companheiro de ônibus futuro aluno (de fato).

Cleverson, que de tanto se enrolar no oxígrafo perdeu alguns fios de cabelo.

Graciele, com sua embolada de sotaques diferentes encanta as leveduras e seus colegas.

Fernandinha, pela sua constância de humor e agradável conversa, mesmo que seja sobre algo qualquer.

Fernandona, que me empresta a maçã verde por livre e espontânea vontade; pós doc dos sonhos.

Deise, ah se tivesse entrado na gaveta, já não estaria neste agradecimento.

Camille, que se não tivesse me ajudado, duas horas se passariam, e já não haveria dissertação alguma. Que Deus ilumine você e sua família.

(João) Edson, futuro famoso do IQ, grande companheiro e músico.

Ao biotério da FCF-IQ/USP que desempenha com excelência suas atividades em experimentação, seguindo à risca as determinações estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Sobretudo no que diz respeito a colocar os animais em jejum, quando necessário.

Aos professores Aníbal Vercesi, Helena Oliveira e Nadja Souza Pinto pelas discussões em nossos congressos de mitocôndriólogos em Campinas ou São Paulo.

Ao professor Mário Saad da Unicamp e Marília Seelander do ICB-USP, por ajudarem nas discussões sobre o emprego de dietas em animais.

Aos docentes do IQ-USP, por disponibilizarem com muita amabilidade as dependências e equipamentos de seus laboratórios.

Às fontes de financiamento que deram suporte aos estudos do nosso grupo, Fapesp, CNPq, Instituto Redoxoma e Guggenheim Foundation.



***“Vivendo, se aprende; mas o que se aprende,  
mais, é só a fazer outras maiores perguntas.”***

Riobaldo em *Grande Sertão:*  
Veredas de João Guimarães Rosa

## RESUMO

Cardoso, A.R. **Efeitos de Dietas Hiperlipídicas Sobre Mitocôndrias de Fígado de Camundongos: Bioenergética, Transporte de  $K^+$  e Estado Redox**. 2009. 45 p. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A obesidade está relacionada com uma grande variedade de disfunções, tais como as dislipidemias, resistência à insulina e diabetes tipo II. Estas patologias estão relacionadas com alterações da fisiologia mitocondrial. As mitocôndrias são o principal sítio do metabolismo oxidativo e são importantes fontes de espécies reativas de oxigênio. Alberici *et al.* (2006) mostraram que a atividade de canais de potássio sensíveis a ATP mitocondriais (mitoK<sub>ATP</sub>), via dissipativa branda, estava aumentada em fígados de animais hipertrigliceridêmicos transgênicos. Este dado sugere um papel adaptativo importante para o mitoK<sub>ATP</sub> como regulador do metabolismo e da massa corpórea. O principal objetivo deste trabalho foi investigar o papel deste canal em fígados de camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica, obtida por meio de suplementação de óleo de soja à única fonte de água dos animais. Foram estabelecidas correlações entre a atividade do canal e parâmetros da fisiologia mitocondrial ou parâmetros sorológicos clássicos como colesterolemia e trigliceridemia. Sendo realizados experimentos de espalhamento de luz, quantificação de peróxido de hidrogênio, potencial de membrana e consumo de oxigênio em mitocôndrias. Nossos resultados mostram aumento de massa corpórea sem dislipidemias e aumento da atividade do mitoK<sub>ATP</sub>, dependente do tempo da suplementação, diretamente correlacionada com a colesterolemia. Nossos resultados apontam aumento da geração de EROs e diminuição da eficiência de conversão energética no grupo suplementado. Como conclusão: manipulações de dieta são eficazes para a indução da atividade do mitoK<sub>ATP</sub>, sendo este um novo e interessante sítio de regulação do metabolismo oxidativo e da massa corpórea.

**Palavras-chave:** mitocôndrias, mitoK<sub>ATP</sub>, EROs, potencial de membrana, conversão energética.

## Abstract

Cardoso, A.R. **Effect of a High Fat Diet on Mitochondria: Bioenergetics, K<sup>+</sup> Transport and Redox State**. 2009. 45 p. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Obesity is associated with multiple dysfunctions including dyslipidemia, insulin resistance and diabetes. These malfunctions are associated with modifications in mitochondrial physiology. Furthermore, mitochondria are the most important site of energy metabolism and reactive oxygen species production. Alberici *et al.* (2006) demonstrated that hypertriglyceridemic transgenic mice display increased expression and activity of mitochondrial ATP sensitive potassium channels (mitoK<sub>ATP</sub>), a mild uncoupling pathway, in liver. This suggests that mitoK<sub>ATP</sub> is an important adaptation to regulate body mass and metabolism. The aim of this work is to investigate the role of mitoK<sub>ATP</sub> in a high fat diet induced by soy oil supplementation, correlating changes in channel activity with metabolic and mitochondrial parameters. Mitochondria were isolated from mouse livers and serological parameters were measured for each animal. Light scattering (to estimate mitoK<sub>ATP</sub> activity), hydrogen peroxide generation, membrane potentials and oxygen consumption were measured in the mitochondrial suspensions. Our results indicate an increase in body mass, without dyslipidemia; and increases in mitoK<sub>ATP</sub> activity, in time-dependent manner, directly correlated to cholesterol levels. In addition, we found increases in ROS generation and decreased capacity of energy conversion (ADP/O) in the high fat diet group. In conclusion, our results indicate that the activity of mitoK<sub>ATP</sub> could be induced by high fat diets and that this is a novel site for metabolic and body mass control.

**Key-words:** mitochondria, mitoK<sub>ATP</sub>, ROS, membrane potential, energy conversion.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ADP = Adenosina difosfato

ADP/O = Razão que expressa quantidade de ADP fosforilado por oxigênio

ATP = Adenosina trifosfato

BSA = Albumina sérica bovina

Carb = Carboxiatractilosídeo

DMSO = Dimetilsulfóxido

DZX = Diazóxido

EGTA = Ácido etilenoglicoltetracético

EROs = Espécies reativas de oxigênio

GDP = Guanosina difosfato

GTP = Guanosina trifosfato

Hepes = 4-(2-hidroxietil)-1ácido piperazinoetanosulfônico

HRP = Peroxidase de raiz forte

5-HD = 5-hidroxidecanoato

Lin = Ácido linoléico

mitoK<sub>ATP</sub> = Canais de potássio sensíveis a ATP mitocondriais

P<sub>i</sub> = Fosfato inorgânico

TPM = Transição de permeabilidade mitocondrial

U.A. = Unidades Arbitrárias

UCP = Proteína desacopladora

V<sub>resp</sub> = Velocidade respiratória

## **SUMÁRIO**

### **1. Introdução**

1.1 Mitocôndrias: Aspectos Gerais.....	03
1.2 Transporte de Moléculas Para a Matriz Mitocondrial.....	04
1.3 Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa.....	06
1.4 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	09
1.5 Vias Dissipativas Mitocondriais.....	10
1.6 Canais de Potássio Sensíveis a ATP (mitoK <sub>ATP</sub> ).....	12

### **2. Objetivos..... 14**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS..... 15**

3.1 Reagentes e Soluções.....	15
3.2 Animais, Dietas, Efeitos Metabólicos.....	15
3.3 Sorologia.....	15
3.4 Isolamento de Mitocôndrias.....	15
3.5 Medida do Transporte de K <sup>+</sup> Mitocondrial.....	16
3.6 Medida da Respiração Mitocondrial.....	16
3.7 Medida da Geração de EROs Mitocondriais.....	17
3.8 Potencial de Membrana Mitocondrial.....	17
3.9 Análise dos Dados e Estatística.....	18

### **4. RESULTADOS..... 19**

### **5. DISCUSSÃO..... 30**

### **6. CONCLUSÕES..... 36**

**7. REFERÊNCIAS..... 37**

**8. LISTA DE ANEXOS..... 44**

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é crescente em muitas regiões do mundo, principalmente em países desenvolvidos, atingindo níveis epidêmicos (Nicolson, 2007; Nisoli *et al.*, 2007). Indivíduos obesos podem apresentar diminuição do tempo de vida relacionado a aumento de riscos para diversas doenças (Halliwell & Gutteridge, 2007). O aumento da massa corpórea pode estar associado a um aumento de lipoproteínas circulantes no plasma, estas podem desencadear aterosclerose e doenças cardiovasculares (Nicolson, 2007).

Além da hiperlipidemia existem outros fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes tipo II, tais como: aumento de gordura visceral, resistência à insulina, pressão alta, hiperglicemia e estado pró-trombótico e pró-inflamatório (Nicolson, 2007). Muitos destes fatores de risco ocorrem de modo concomitante. Este quadro é denominado síndrome metabólica (Nicolson, 2007). A síndrome metabólica, ou síndrome X, pode ser diagnosticada clinicamente. No entanto, ainda existe discussão sobre esta prática; por se tratar de uma doença com múltiplas causas, incluindo fatores genéticos, alimentares e comportamentais. Alguns autores estimam que 22% da população dos Estados Unidos apresentam esta síndrome, sendo evidente sua importância do ponto de vista da saúde pública (Nicolson, 2007; Nisoli *et al.*, 2007).

Dentre as causas da síndrome metabólica pode ser destacada a dieta. O aumento de gordura da dieta está associado a acúmulo de dano oxidativo em modelos animais; geralmente medido pelo acúmulo de isoprostanos (F<sub>2</sub>-IP) no plasma ou na urina (Halliwell & Gutteridge, 2007; Milne *et al.*, 2007). Em humanos, dietas hiperlipídicas agravam os efeitos deletérios do consumo do etanol e do tabagismo (Morrow, 2005). Além disso, a perda de massa corpórea coincide com a queda de isoprostanos na urina e no plasma. Estes dados sugerem uma relação entre estresse oxidativo e o desenvolvimento de doenças relacionadas à obesidade (Halliwell & Gutteridge, 2007; Zhu *et al.*, 2008).

A origem do estresse oxidativo na obesidade e na síndrome metabólica é controversa, uma vez que não se sabe qual é o seu principal componente (Herlein *et al.*, 2009; Browlee, 2005; Halliwell & Gutteridge, 2007). O acúmulo

de lipídeos circulantes pode se depositar em células não especializadas em armazenar gordura; como o hepatócito, por exemplo. O excedente de triacilglicerol no citosol leva a um aumento da oxidação de lipídeos de cadeia longa em peroxissomos, gerando  $H_2O_2$  (Halliwell & Gutteridge, 2007; Voet & Voet 2000), que pode representar um componente importante do estresse. No entanto, muitos trabalhos apontam a hiperglicemia como principal fator do estresse oxidativo. Isto porque diversos tipos celulares cultivados em meio com glicose excedente geram mais espécies oxidantes. O mecanismo para esta geração aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) é dependente de uma disfunção mitocondrial (Halliwell & Gutteridge, 2007; Mantena *et al.*, 2008). Espécies oxidantes não são exclusivamente moléculas lesivas em sistemas biológicos, mas sim sinalizadores e reguladores da expressão gênica (Halliwell & Gutteridge, 2007; Spiegelman, 2007), sendo difícil saber se estas espécies são uma causa ou um efeito para o desenvolvimento da obesidade e da síndrome metabólica.

Os múltiplos aspectos da síndrome metabólica sugerem complexos processos patofisiológicos, com o desenvolvimento de doenças específicas para cada órgão, gerando diferentes manifestações clínicas. Além destes distúrbios, alterações do metabolismo oxidativo são consideradas um processo chave neste quadro, porque parecem estar envolvidas no ganho de gordura visceral e desenvolvimento de resistência à insulina tanto em adipócitos quanto na musculatura esquelética (Nicolson, 2007; Nisoli *et al.*, 2007).

Dada a importância das mitocôndrias no metabolismo oxidativo e na geração de EROs, é possível vislumbrar o seu papel na síndrome metabólica. De fato, algumas funções mitocondriais estão alteradas nesta síndrome. Na obesidade e no diabetes tipo II ocorre uma redução da atividade do ciclo do ácido cítrico, da  $\beta$ -oxidação e de enzimas da cadeia de transporte de elétrons, especificamente o complexo I (Fromenty *et al.*, 2004). Além disso, em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos ocorre uma redução significativa da expressão de genes envolvidos na fosforilação oxidativa (Crunkhorn *et al.*, 2007). Tal redução está relacionada com uma diminuição de PGC-1 $\alpha$  que é um importante coativador da expressão gênica, envolvido na biogênese mitocondrial. Isso sugere que a redução de PGC-1 $\alpha$  pode contribuir para a

ocorrência de distúrbios característicos da resistência à insulina, diabetes tipo II e, talvez, obesidade (Nisoli *et al.*, 2007).

### **1.1 Mitocôndrias: Aspectos Gerais**

As mitocôndrias são importantes organelas celulares que representam o principal sítio do metabolismo oxidativo dos eucariontes. Nelas estão presentes enzimas do ácido cítrico, enzimas da oxidação dos ácidos graxos ( $\beta$ -oxidação) e elementos da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa (Voet & Voet, 2000; Nicholls & Ferguson, 2002). Na matriz também se encontra uma maquinaria genética (DNA, RNA e ribossomos), que produz alguns componentes da cadeia respiratória (Voet & Voet, 2000; Nicholls & Ferguson, 2002). As mitocôndrias também participam de vias apoptóticas, sendo que a liberação de citocromo c ativa caspases citosólicas (Nicholls & Ferguson, 2002; Liu *et al.*, 1996; Desagher & Martinou, 2000).

A morfologia das mitocôndrias é variável, dependendo do seu estado metabólico e de sua origem celular. Estas organelas estão envolvidas por duas membranas lipídicas: uma externa lisa que contém um número menor de proteínas e uma membrana interna que apresenta um número muito maior de proteínas (Nicholls & Ferguson, 2002). Estas são responsáveis pela cadeia de transporte de elétrons, pela fosforilação oxidativa e pelo transporte de íons e metabólitos. Como esta membrana é a principal responsável pela respiração, a sua superfície, estimada pelo número de cristas mitocondriais, representa um indicador da taxa respiratória (Voet & Voet 2000; Nicholls & Ferguson, 2002).

Nas células, as mitocôndrias podem apresentar arquiteturas diferentes, variando desde filamentos alongados a retículos ramificados (Bach *et al.*, 2003; Nicholls & Ferguson, 2002). Recentemente, uma proteína da membrana mitocondrial, a mitofusina 2 (Mfn2), responsável pela fusão mitocondrial, foi correlacionada com o estado metabólico de células musculares. Assim, a repressão da Mfn2 diminuiu a velocidade respiratória, o potencial de membrana e a oxidação de glicose. As mitocôndrias fissionadas pela inibição da Mfn2 apresentavam um estado metabólico menos ativo. Desta maneira a morfologia

mitocondrial é um possível sítio de regulação do metabolismo (Bach *et al.*, 2003). Além da morfologia, a síntese de genes mitocondriais, biogênese mitocondrial, representa um importante papel para a regulação metabólica e o desenvolvimento da obesidade (Nisoli *et al.*, 2007; Nicolson, 2007).

## 1.2 Transporte de Moléculas Para a Matriz Mitocondrial

O espaço intermembranas é aproximadamente equivalente ao citosol no que se refere às concentrações de metabólitos e de íons, porque a membrana externa apresenta um canal denominado VDAC (*voltage-dependent anion channel*), que permite a passagem de solutos de até 5000 Da (Colombini, 1987). Já a membrana interna é livremente permeável a O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (Voet & Voet, 2000; Nicholls e Ferguson, 2002).

O transporte de moléculas para a matriz é mediado por proteínas transportadoras que controlam a passagem de metabólitos como: ATP, ADP, piruvato, citrato e grupos acil-CoA. Também são transportados íons como: Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> e Pi. Assim, na matriz mitocondrial estão presentes altas concentrações de enzimas do metabolismo oxidativo, de co-fatores, substratos, nucleotídeos e íons inorgânicos. Portanto, a permeabilidade controlada para a maioria dos metabólitos e íons na membrana mitocondrial interna permite um gradiente de íons, resultando uma compartimentalização das funções metabólicas entre o citosol e a mitocôndria (Voet & Voet, 2000; Nicholls & Ferguson, 2002).

As mitocôndrias operam em elevados potenciais de membrana, sendo a face da bicamada voltada para a matriz mitocondrial predominantemente negativa. Assim, a entrada de cátions na matriz mitocondrial estimulada pelo potencial de membrana poderia levar a uma ruptura osmótica das organelas. No entanto, como previsto por Mitchell & Moyle (1969) as mitocôndrias são providas de trocadores de cátions como K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> por prótons. A atividade destes trocadores permite um controle do volume da organela, utilizando o ΔpH entre o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial, impedindo sua ruptura. Além de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>, a entrada de Ca<sup>2+</sup> também é regulada pelas mitocôndrias; existem trocadores como Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> que minimizam o acúmulo de

Ca<sup>2+</sup> na matriz mitocondrial (Zoccarato & Nicholls, 1982; Sparagna *et al.*, 1995; Nicholls & Ferguson, 2002).

O acúmulo de Ca<sup>2+</sup> pode desencadear a perda total do potencial de membrana que leva à ruptura da membrana externa e perda de solutos da matriz. Esta é a transição de permeabilidade de membrana (TPM) que leva à abertura de poros não seletivos na membrana interna da mitocôndria. A estrutura molecular do poro ainda é desconhecida, mas acredita-se que existe uma associação de proteínas erroneamente dobradas como o VDAC, ANT e CyP-D. Além disso, um aumento da geração de EROs pode estimular o surgimento do poro (Crompton 1999; Bernardi *et al.*, 1998; Halestrap *et al.*, 1998; Kowaltowski & Vercesi, 1999).

Como grande parte dos metabólitos mitocondriais apresenta carga ou é constituída por ácidos fracos, seu transporte pode explorar o potencial de membrana e/ou a variação de pH entre o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial (Nicholls & Ferguson, 2002). Assim, a grande maioria dos transportadores mitocondriais é específica para ânions, destacando-se os carreadores: dicarboxilato e tricarboxilato que transportam aminoácidos e intermediários do ciclo do ácido cítrico (Palmieri *et al.*, 1996). Os transportadores são expressos de maneira diferente dependendo do tecido e das vias metabólicas predominantes em seus tipos celulares (Johnson *et al.*, 2007). O fígado, por apresentar uma enorme gama de vias metabólicas, expressa uma grande quantidade de carreadores de metabólitos (Johnson *et al.*, 2007).

Além disso, o transporte de ácidos graxos para a  $\beta$ -oxidação é um importante processo metabólico. No espaço intermembranas os grupos acil-CoA são transformados em grupos acilcarnitina pela atividade da enzima N-aciltransferase I. Os grupos acilcarnitina são transferidos para a matriz mitocondrial pela atividade da proteína antiporte acilcarnitina/carnitina. Na matriz a enzima N-aciltransferase II restaura o grupo acil-CoA que pode ser oxidado pela  $\beta$ -oxidação (Voet & Voet 2000; Nicholls & Ferguson, 2002).

A maior parte do ATP produzido na matriz mitocondrial é consumida no citosol. Este transporte é realizado pelo translocador ADP/ATP (adenina-nucleotídeo-translocase). Este translocador é um dímero de subunidades

idênticas que apresenta duas conformações possíveis: uma para o lado de dentro e outra para o lado de fora da matriz mitocondrial. A mudança de conformação ocorre na presença de substrato. O ATP produzido na matriz se liga ao translocador, sendo transportado para o citosol. O consumo do ATP aumenta a concentração de ADP no citosol havendo seu transporte para a matriz mitocondrial (Halestrap & Brennerb, 2003; Nicholls & Ferguson, 2002; Aliev & Saks, 2003). Já o transporte de fosfato inorgânico para a matriz ocorre por meio de um sistema de simporte  $P_i-H^+$  (Nicholls & Ferguson, 2002). Assim, os substratos ADP e  $P_i$  podem ser utilizados para a produção de ATP pelo complexo V (ATP sintase).

### 1.3 Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

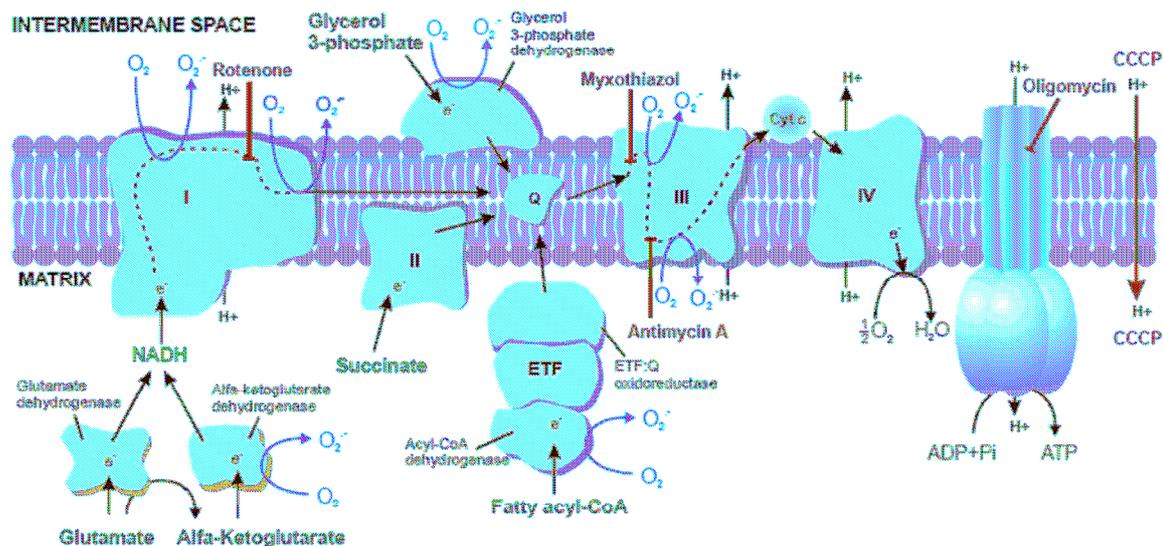
A síntese de ATP na matriz mitocondrial é obtida devido ao acoplamento da fosforilação oxidativa com a cadeia de transporte de elétrons. Os elétrons provenientes de diferentes substratos são doados para  $NAD^+$  e FAD, formando NADH e  $FADH_2$ , respectivamente. Na membrana mitocondrial interna estão associados os carreadores que transportam os elétrons de NADH e  $FADH_2$  para o  $O_2$ .

Tais carreadores constituem a cadeia de transporte de elétrons (figura 1) que é uma série de complexos protéicos. Estes contêm centros redox com afinidades progressivas por elétrons. Os elétrons provenientes de NADH são transferidos para o complexo I. Em seguida, o complexo I é oxidado, reduzindo a coenzima Q (CoQ). Já os elétrons de  $FADH_2$ , provenientes de succinato, são transferidos via complexo II para a CoQ. O glicerol 3 fosfato também pode reduzir a coenzima Q através da atividade da flavoenzima glicerol 3 fosfato desidrogenase. Uma quarta via de transferência de elétrons para a CoQ ocorre pela transferência de elétrons provenientes da  $\beta$ -oxidação; a atividade da *electron-transferring flavoprotein* (ETF)-ubiquinona oxidoreductase transfere elétrons provenientes de grupos acil-CoA diretamente para a CoQ.

Em seguida, os elétrons da coenzima Q são transferidos para o complexo III que reduz o citocromo c. Este último é uma proteína periférica de membrana, e se localiza no espaço intermembranas (figura 1). Finalmente, o citocromo c reduz o complexo IV que irá transferir elétrons para o oxigênio que é o aceptor final da cadeia de transporte de elétrons. A passagem de elétrons por estes carreadores acompanha uma liberação de prótons pelos complexos I, III e IV para o espaço intermembranas, gerando um gradiente de prótons (Nicholls & Ferguson, 2002). A cadeia de transporte de elétrons pode ser inibida por drogas como rotenona (inibidor de complexo I), antimicina A e mixotiazol (inibidores de complexo III) (Nicholls & Ferguson, 2002).

A fosforilação oxidativa ocorre através da ATP sintase. Esta enzima utiliza a energia próton-motriz, gerada pelo bombeamento de prótons pela cadeia de transporte de elétrons, para fosforilar ADP, gerando ATP. Ao contrário da grande variedade de mecanismos utilizados por diferentes organismos para gerar a força próton-motriz, a ATP sintase é altamente conservada e está presente em mitocôndrias, cloroplastos e bactérias aeróbias ou fotossintetizantes (Nicholls & Ferguson, 2002).

A ATP sintase foi estudada inicialmente pelo uso de partículas sub-mitocondriais. Sua estrutura pôde ser inferida através do uso de microscopia eletrônica destas partículas (Karrasch & Walker, 1999). A proteína, de maneira geral, apresenta duas subunidades  $F_1$  e  $F_0$ , sendo a primeira ligante de nucleotídeos e a segunda responsável pela passagem dos prótons e passível de inibição por oligomicina (Stock *et al.*, 1999; Gibbons *et al.*, 2000). Uma propriedade interessante da ATP sintase é a sua atividade de ATPase, bombeando prótons para o espaço intermembranas às custas de ATP (Capaldi & Aggeler, 2002). Esta atividade não ocorre em mitocôndrias que respiram, por limitações termodinâmicas (Perez & Ferguson, 1990; Tsunoda *et al.*, 2001). O elevado potencial de membrana impede a atividade ATPásica da ATP sintase (Tsunoda *et al.*, 2001).



**Figura 1: Esquema representativo da cadeia de transporte de elétrons.** Em verde estão presentes doadores de elétrons, em vermelho os sítios de inibição ou desacoplamento (CCCP) e em azul sítios de geração de radical ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$  (Tahara *et al.*, 2009).

A regulação da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa ocorre por meio das concentrações de ADP, ATP,  $P_i$ ,  $NAD^+$ , NADH, oxigênio e da regulação do potencial de membrana mitocondrial (Voet & Voet 2000; Nicholls & Ferguson 2002). A citocromo c oxidase pode ser ainda inibida por óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), isto modula a velocidade respiratória em uma condição denominada hipóxia metabólica (Xu *et al.*, 2005). Além disso, a inibição alostérica da citocromo c oxidase por ATP pode ser alterada de uma maneira dependente de fosforilação (Ludwig *et al.*, 2001; Bender & Kadenbach 2000).

Alguns tecidos apresentam reguladores específicos da fosforilação oxidativa. Mamíferos apresentam uma subunidade inibitória (Campanella *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2007) que impede a degradação do ATP pela subunidade  $F_1$  da ATP sintase quando a força próton-motriz é baixa. Quando esta força se restabelece a proteína inibitória se dissocia. Muitas vias de regulação da cadeia de transporte de elétrons são vias dissipativas que desacoplam a força próton-motriz gerada pela oxidação de substratos da síntese de ATP. As proteínas desacopladoras são um exemplo, porque facilitam a entrada de prótons na matriz mitocondrial e estão relacionadas com a termogênese e o controle da massa corporal dos mamíferos (Garlid *et al.*, 2000; Dullo *et al.*, 2004; Rodríguez & Palou, 2004).

#### 1.4 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A geração de EROs nas mitocôndrias é muito importante em sistemas biológicos. Isto ocorre porque existe um contínuo e pequeno vazamento de elétrons pela cadeia respiratória reduzindo o oxigênio molecular com um elétron (Kowaltowski & Vercesi, 2001). Principalmente, os complexos I e III podem realizar a redução monoelétrica do  $O_2$ , o convertendo a radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Boveris & Chance, 1973; Kowaltowski & Vercesi, 2001; Turrens 2003). Além disso, os radicais ânion superóxido podem ser formados por pelo menos duas enzimas da matriz mitocondrial (figura 1): piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (Starkov *et al.*, 2004; Tretter & Adam-Vizi, 2004).

A geração de  $O_2^{\cdot-}$  pela cadeia respiratória pode depender do potencial de membrana mitocondrial (Skulachev, 1996; Korshunov *et al.*, 1997). O acúmulo de coenzimas reduzidas gera um maior potencial de membrana, aumentando a meia vida de intermediários reduzidos da cadeia de transporte de elétrons. Este estado facilita o vazamento de elétrons e a redução monoelétrica do oxigênio. Por outro lado, a diminuição da geração de EROs em mitocôndrias ligeiramente desacopladas está relacionada com o aumento das taxas de respiração. Como consequência, diminui o tempo de vida de intermediários reduzidos que doam elétrons para o  $O_2$  e também a tensão de oxigênio no micro-ambiente mitocondrial, isto previne a formação de  $O_2^{\cdot-}$  (Skulachev, 1996; Korshunov *et al.*, 1997). Em algumas situações específicas este padrão geral não é observado. Isto porque Tahara *et al.* (2009), demonstraram que a geração de  $H_2O_2$  pode ser independente do potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.

De maneira geral, a regulação da geração de EROs e a sua detoxificação são fundamentais para a manutenção do funcionamento das mitocôndrias. Na matriz mitocondrial e no espaço intermembranas, os radicais  $O_2^{\cdot-}$  são transformados em  $H_2O_2$  pela atividade das superóxido dismutases (SODs). Em seguida, o  $H_2O_2$  pode ser eliminado por catalases e peroxidases diversas, incluindo a glutatona peroxidase, ao custo de glutatona reduzida (GSH) ou tioredoxina peroxidase que utiliza tioredoxina como cofator

(Kowaltowski & Vercesi, 1999; Spyrou *et al.*, 1997; Rhee *et al.*, 1999). O peróxido de hidrogênio, por ser mais difusível e estável, é frequentemente utilizado como indicador da geração de EROs mitocondrial por ser mais facilmente identificado (Kowaltowski & Vercesi, 1999).

A não remoção de  $H_2O_2$  pode resultar na reação de Fenton, catalisada por metais de transição. Esta reação gera radicais hidroxil que são muito reativos e podem iniciar reações de lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 2007). Estas são muito lesivas para membranas biológicas e podem representar um quadro de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é definido pelo aumento de espécies oxidantes em relação aos seus mecanismos de detoxificação (Nicholls & Ferguson, 2002; Halliwell & Gutteridge, 2007).

### 1.5 Vias Dissipativas Mitocondriais

Como visto acima, o desacoplamento entre a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa pode ser promovido pela ativação de proteínas desacopladoras mitocondriais (Nègre-Salvayre *et al.*, 1997; Kowaltowski *et al.*, 1998), cuja atividade pode ser estimulada por aumentos dos níveis mitocondriais de  $O_2^{\cdot-}$  ou hidroxinonenal HNE-A ou ácidos graxos livres (Murphy *et al.*, 2003; Talbot *et al.*, 2004; Beck *et al.*, 2007).

As proteínas desacopladoras apresentam estruturas similares aos transportadores de ânions, sendo que a porção C-terminal compartilha nove nucleotídeos com a ANT, deste modo este sítio é responsável pela ligação de nucleotídeos (Nicolls & Ferguson 2002). O mecanismo de ação mais aceito para a atividade de UCPs consiste em um transporte de ácidos graxos desprotonados para o espaço intermembranas. Por se tratar de um ácido fraco, o ácido graxo se protona no espaço intermembranas e se desprotona na matriz mitocondrial gerando um ciclo que dissipa a força próton-motriz. Este mecanismo é observado em outros transportadores de ânions e depende da presença de ácidos graxos livres no meio; a própria ANT é capaz de participar de uma via dissipativa semelhante (Garlid *et al.*, 2000). O GDP é um inibidor inespecífico das UCPs, diminuindo sua atividade de transporte de ácidos graxos.

A primeira UCP descoberta está presente em mitocôndrias de tecido adiposo marrom e é caracterizada pela sua atividade termogênica, sendo que animais que não expressam esta proteína têm dificuldade para se adaptar a baixas temperaturas (Nicholls & Ferguson, 2002; Silva & Rabelo, 1997; Golozoubova *et al.*, 2006). Em seguida, em 1996 outros genes com cerca de 70% de identidade em relação à UCP1 foram caracterizados (Fumeron *et al.*, 1996). A UCP2 está presente em uma grande variedade de tecidos e pode ser induzida em diferentes situações de estresse (Pecqueur *et al.*, 2001). Enquanto que a UCP3 está presente em músculo esquelético (Bouillaud *et al.*, 2001). Foram descobertas outras duas UCPs 4 e 5 presentes em tecido nervoso (Bouillaud *et al.*, 2001; Ricquier & Bouillaud, 2000). A importância dessas proteínas para a geração de calor não é igual a UCP1, isto porque a expressão destas proteínas é cerca de 1% da expressão da UCP1 em gordura marrom (Nedergaard *et al.*, 2001; Skulachev, 2001; Cannon *et al.*, 2006). Desta maneira, a atividade destas proteínas promove apenas um desacoplamento brando. Sendo interessante pensar no seu papel na regulação do metabolismo energético e da massa corpórea, porque estas vias diminuem a eficiência da fosforilação oxidativa (Nedergaard & Cannon, 2003; Cannon *et al.*, 2006; Skulachev, 2001).

Animais que não expressam UCP2 ou 3 não são sensíveis a temperaturas baixas e tampouco desenvolvem obesidade (Enerback *et al.*, 1997; Arsenijevic *et al.*, 2000). No entanto, estes animais apresentam resistência a doenças infecciosas, o que pode representar um aumento de espécies oxidantes em macrófagos (Arsenijevic *et al.*, 2000). Acredita-se que as UCPs sejam responsáveis pela regulação da geração de superóxido, uma vez que pequenas diminuições do potencial de membrana diminuem muito a geração deste radical (Echtay *et al.*, 2002). As UCPs podem ser ativadas por espécies oxidantes. Deste modo, sua atividade poderia representar um modelo de *feed back* negativo crucial para a regulação da geração de EROs (Nègre-Salvayre *et al.*, 1997; Echtay *et al.*, 2002; Talbot *et al.*, 2004).

## 1.6 Canais de Potássio Sensíveis a ATP (mitoK<sub>ATP</sub>)

O desacoplamento brando também pode ser obtido pela atividade de canais de K<sup>+</sup> sensíveis a ATP. Inoue *et al.* (1991) demonstraram que mitocôndrias isoladas de mamíferos possuem um canal que transporta K<sup>+</sup> para a matriz de maneira sensível a ATP (mitoK<sub>ATP</sub>). A entrada de K<sup>+</sup> é acompanhada pela entrada eletroneutra de íons fosfato pelo trocador P<sub>i</sub>/OH<sup>-</sup> (Wohlrab, 1980). Este processo é contínuo e o acúmulo de potássio, ao longo do tempo, gera um aumento do volume da matriz mitocondrial. Para compensar este aumento de volume, a mitocôndria possui trocadores K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que removem K<sup>+</sup> da matriz (Garlid, 1980; Kakar *et al.*, 1989). Desta maneira, a entrada de H<sup>+</sup> pela atividade do trocador K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> diminui a eficiência da fosforilação oxidativa.

Assim, esta via dissipativa é dependente da atividade do mitoK<sub>ATP</sub> que é relativamente limitada (30-170 nmoles · min<sup>-1</sup> · mg de proteína<sup>-1</sup>, dependendo do tecido estudado), causando um leve desacoplamento (Kowaltowski *et al.*, 2001). De acordo com a literatura, os principais efeitos da atividade do mitoK<sub>ATP</sub> são: a regulação de volume da matriz (Kowaltowski *et al.*, 2001) e o controle da geração de EROs (Ferranti *et al.*, 2003; Facundo *et al.*, 2006).

A regulação farmacológica do mitoK<sub>ATP</sub> é realizada, principalmente, por diazóxido e 5-hidroxidecanoato, respectivamente o ativador e o inibidor do canal (Garlid *et al.*, 1996; Jaburek *et al.*, 1998; Bajgar *et al.* 2001). A abertura de canais de K<sup>+</sup> mitocondriais (mitoK<sub>ATP</sub>) confere uma forte proteção isquêmica cardíaca (Garlid *et al.*, 1997). Foi comprovado recentemente que a geração mitocondrial de EROs estimula a atividade de canais mitoK<sub>ATP</sub> de coração (Zhang *et al.*, 2001 Facundo *et al.*, 2007) e cérebro (Fornazari *et al.*, 2008) de ratos. Este estímulo também foi verificado com adição de oxidantes exógenos ao ensaio e foi inibido por redutores tiólicos (Facundo *et al.*, 2007). A partir destes dados e sabendo que a atividade de mitoK<sub>ATP</sub> previne a geração de EROs mitocondriais (Ferranti *et al.*, 2003), foi proposto que estes canais poderiam agir como sensores redox intracelulares, controlando o balanço entre a produção e o acúmulo de oxidantes (Facundo *et al.*, 2007). Alguns autores acreditam que a atividade do canal causa um aumento de superóxido (Andrukhiv *et al.*, 2006). No entanto, este resultado é controverso, porque a

metodologia empregada utilizava como *probe* de Eros diclorofluoresceína (DCFH). Este *probe* é bastante inespecífico e pode haver um efeito de pH em sua oxidação (Wrona & Wardman, 2006).

Recentemente, Alberici *et al.* (2006) demonstraram que a atividade e a quantidade de canais mitoK<sub>ATP</sub> são aumentadas em camundongos transgênicos que superexpressam apolipoproteína (apo) CIII. Estes animais desenvolvem severa hipertrigliceridemia e altos níveis plasmáticos de ácidos graxos, mas mantêm os níveis glicêmicos. Além disso, estes camundongos são hiperfágicos (sem ganho de massa corporal) e apresentam temperatura corpórea mais alta. Em mitocôndrias isoladas houve aumento do consumo de O<sub>2</sub> na condição de repouso (sem a ocorrência de fosforilação oxidativa), devido ao desacoplamento brando. Estas características não estão associadas à atividade de proteínas desacopladoras (UCPs), porque o consumo de O<sub>2</sub> não foi revertido pelo GDP, que é um inibidor das UCPs, e porque o meio continha albumina sérica bovina (BSA), um quelante de ácidos graxos que estão envolvidos na entrada dos prótons. Alberici *et al.* (2006) concluíram que a hiperlipidemia aumenta a atividade e a expressão de canais mitoK<sub>ATP</sub> e que isso poderia ser uma adaptação destes animais para oxidar o excesso de ácidos graxos intracelulares, sugerindo que o mitoK<sub>ATP</sub> poderia estar envolvido no controle do metabolismo energético e da massa corporal.

As razões que levam à ativação do mitoK<sub>ATP</sub> nas hiperlipidemias ainda não estão determinadas. No entanto, Vercesi *et al.* (2007) levantaram a hipótese de que os aumentos da atividade e expressão destes canais poderiam estar relacionados com o aumento de EROs na hiperlipidemia. Esta nova abordagem de estudo de canais de potássio sensíveis a ATP como uma via dissipativa branda possivelmente reguladora do metabolismo energético pode abrir uma nova perspectiva de controle metabólico de vertebrados.

## 2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi investigar a participação de vias dissipativas, como a dos canais mitoK<sub>ATP</sub>, na regulação do metabolismo de animais submetidos a dietas hiperlipídicas, relacionando com efeitos bioenergéticos e redox em mitocôndrias de fígado de camundongo.

Sabendo que a atividade do canal era aumentada em animais transgênicos hipertrigliceridêmicos; nosso objetivo inicial era saber se intervenções de dieta poderiam alterar a atividade destes canais. Além disso, procuramos investigar se a atividade do canal era alterada por parâmetros metabólicos simples, tais como glicemia, trigliceridemia ou colesterolemia.

Em seguida, procuramos compreender os mecanismos pelos quais a dieta rica em ácidos graxos modula a atividade de vias dissipativas. Isto é importante, porque o papel destas vias apresenta significado tanto para a regulação de espécies oxidantes quanto para o metabolismo oxidativo.

Saber se a suplementação da dieta poderia alterar a geração de EROs em mitocôndrias de fígado de camundongo.

Finalmente, compreender a magnitude da importância do mitoK<sub>ATP</sub> em relação às diferentes vias dissipativas com a progressão da obesidade. Esta pergunta é relevante porque o desenvolvimento da obesidade altera a biogênese mitocondrial e seu estado metabólico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

**3.1 Reagentes e soluções:** Os reagentes empregados tinham elevado grau de pureza e as soluções foram preparadas com água deionizada. Os reagentes lipofílicos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), tais como: diazóxido, Amplex Red e ácido linoléico. Os reagentes hidrofílicos foram diluídos em alíquotas, sendo estas descongeladas no momento da realização dos experimentos, tais como: HRP, safranina O, succinato, ATP e GDP; sendo que os três últimos tiveram seus pHs acertados entre 7,0 e 7,4 com NaOH.

**3.2 Animais, dietas, efeitos metabólicos:** Camundongos da linhagem Swiss foram obtidos e alojados no biotério do Conjunto das Químicas, USP, em condições padronizadas de temperatura, umidade e luz. Os animais controle foram submetidos a dietas padronizadas comerciais. Já os animais da dieta hiperlipídica receberam suplementação com óleo de soja na única fonte de água. O óleo vegetal (30% v/v) permaneceu em emulsão na água por meio de estearoil lactilato de sódio da Purac<sup>®</sup> (9 g/litro de solução) (Warwick e Weingarten, 1994). A solução foi trocada semanalmente para que o material não se deteriorasse. Os experimentos foram conduzidos seguindo normas de experimentação animal estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal do Instituto de Química da USP.

**3.3 Sorologia:** As amostras de sangue dos animais foram coletadas após o sacrifício, e recolhidas em tubos da eppendorf. Foi realizada, em seguida, a centrifugação das amostras (10.000 g durante 10 minutos) para que somente o soro fosse recolhido. Em seguida, foram medidos colesterol, glicose e triglicérides das amostras através de quites comerciais da Doles<sup>®</sup>, método colorimétrico enzimático.

**3.4 Isolamento de mitocôndrias:** Os animais foram sacrificados e o fígado foi isolado e picotado com tesoura em tampão de isolamento contendo: sacarose 300 mM, Hepes 10 mM, EGTA 2 mM e BSA 1 mg/L, pH 7,2 mantido a aproximadamente 4°C. Em seguida, o material foi transferido para um potter e

foi homogeneizado. A solução foi centrifugada a 800 g para retirada de sangue e restos celulares e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 12.000 g. O procedimento foi repetido para retirada de mais restos celulares. As centrifugações foram feitas sempre a 4°C. Em seguida, o precipitado foi resuspendido em tampão de isolamento. Para a realização de todos os experimentos as mitocôndrias foram usadas no máximo 2 horas após seu isolamento (Cancherini *et al.*, 2003; Castilho *et al.*, 1994; Castilho *et al.*, 1995).

**3.5 Medida do transporte de K<sup>+</sup> mitocondrial:** O transporte de K<sup>+</sup> para a matriz das organelas foi acompanhado através de alterações de volume mitocondrial quantificados por espalhamento de luz da suspensão a 520 nm durante 60 segundos, como descrito por Garlid e Beavis (1985). O equipamento utilizado para a realização dos experimentos foi um fluorímetro 4500 da Hitachi. A atividade do canal foi estimada através da diferença entre o valor de unidades arbitrárias de espalhamento de luz final sobre o valor inicial dividida pelo valor inicial. Para tanto, as mitocôndrias foram incubadas em tampão contendo: KCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 a 37°C com agitação constante, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1 µg/mL na ausência ou presença de ATP 1 mM, diazóxido 30 µM (DZX) e 5-hidroxicanoato 60 µM (5-HD). Os dados foram analisados em relação aos traçados contendo ATP, ATP + diazóxido e ATP + diazóxido + 5-hidroxicanoato. O diazóxido é um ativador do mitoK<sub>ATP</sub>, o ATP e o 5-HD são inibidores do canal (Kowaltowski *et al.*, 2001).

**3.6 Medida da respiração mitocondrial:** A respiração mitocondrial em suspensões isoladas foi acompanhada utilizando-se um eletrodo de Clark, conectado a um oxígrafo Hansatech, em câmara de acrílico fechada e com regulação de temperatura (da Silva *et al.*, 2003). O eletrodo é composto por um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos em solução eletrolítica de KCl. A reação se processa pela corrente gerada entre os eletrodos e é relacionada à concentração de oxigênio na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo, onde é realizada a leitura. Os experimentos foram realizados em diferentes condições; sendo que as mitocôndrias foram incubadas em tampão contendo: KCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 a 37°C

com agitação constante,  $\text{MgCl}_2$  2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  na ausência ou presença de ATP 1 mM, diazóxido 30  $\mu\text{M}$  (DZX) e 5-hidroidecanoato 60  $\mu\text{M}$  (5-HD). Para estudo de outras vias dissipativas dependentes de ácidos graxos livres foram usados ácido linoléico ou carboxiatractilosídeo na concentração de 1  $\mu\text{M}$ .

**3.7 Medida da geração de EROs mitocondriais:** foi realizada pela oxidação de Amplex Red (50  $\mu\text{M}$ , Molecular Probes), na presença de HRP (1 U/mL), ao composto fluorescente resorufina. A fluorescência deste último foi monitorada em fluorímetro Hitachi 2500 a 37°C, sendo a excitação igual a 563 nm e a emissão igual a 587 nm (Ferranti *et al.*, 2003). A estequiometria da reação de oxidação de Amplex Red é de 1:1 para peróxido de hidrogênio (Zhou *et al.*, 1997). As mitocôndrias foram incubadas em tampão contendo: KCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 a 37°C com agitação constante,  $\text{MgCl}_2$  2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  na ausência ou presença de ATP 1 mM, diazóxido 30  $\mu\text{M}$  (DZX) e 5-hidroidecanoato 60  $\mu\text{M}$  (5-HD). Carboxiatractilosídeo e ácido linoléico quando adicionados estavam na concentração de 1  $\mu\text{M}$ .

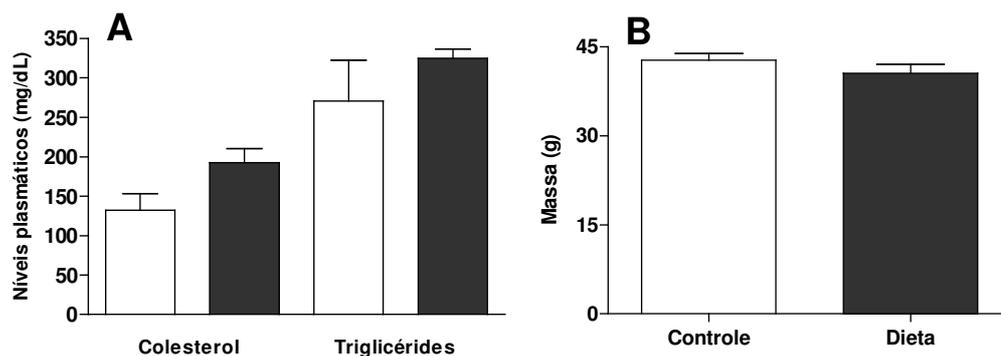
**3.8 Potencial de membrana mitocondrial:** Para estimar o potencial de membrana mitocondrial foi usado o método de fluorescência extramitocondrial de safranina O (Akerman & Wikstrom, 1976; Kowaltowski *et al.*, 2002). A fluorescência do composto (5  $\mu\text{M}$ ) foi monitorada usando fluorímetro Hitachi 2500 a 37°C com excitação de 495 nm e emissão de 586 nm (Kowaltowski *et al.*, 2002). A safranina O é um cátion lipofílico que se acumula em membranas mitocondriais de maneira proporcional ao potencial de membrana. Este acúmulo diminui a fluorescência da suspensão, sendo possível realizar o cálculo estimado do potencial de membrana. Para a realização dos experimentos as mitocôndrias foram incubadas em tampão contendo: KCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 a 37°C com agitação constante,  $\text{MgCl}_2$  2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**3.9 Análise dos dados e estatística:** Os dados obtidos foram analisados usando testes estatísticos, Anova (*one-way*) ou teste t de *student*, de *softwares* como GraphPad Prism, GraphPad<sup>TM</sup> e Origin 7.0. As análises com o teste t de *student* foram realizadas para testar se havia diferenças entre as médias de variáveis mensuráveis dos grupos controle versus suplementado com a dieta, por exemplo: colesterol, triglicérides, massa corpórea e glicemia. O teste assume que existe uma variação normal entre os grupos e que as variâncias são iguais. A hipótese nula significa que as médias são iguais; portanto, a suplementação da dieta não tem efeito. O teste Anova (*one-way*) foi realizado quando existia mais de uma categoria no experimento (exemplo: potássio, ATP, Dzx, 5-HD). O teste *one-way* anova é matematicamente idêntico ao teste *student*, mas apresenta a vantagem de usar mais de uma categoria por análise. Os dados foram mostrados como experimentos representativos de ao menos três repetições. O número amostral de cada figura está indicado como valor n. Os resultados considerados significativos, hipótese nula não aceita, apresentaram valor de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

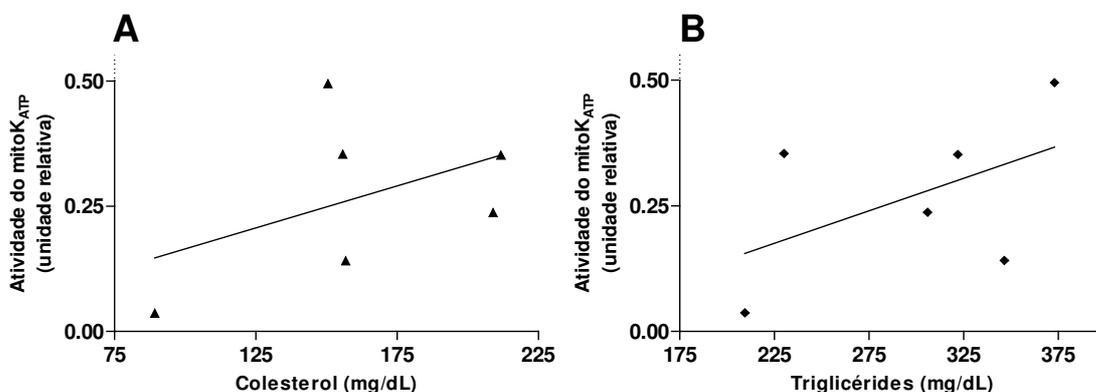
Com o objetivo de estudar alterações mitocondriais na obesidade e síndrome metabólica sobre transporte de potássio, bioenergética e estado redox foi necessário estabelecer um modelo experimental que representasse quadros comumente vistos em clínica. Sendo assim, a principal dificuldade para a realização deste trabalho foi encontrar um modelo responsivo a alterações da fisiologia mitocondrial. Para tanto, foram realizadas manipulações da dieta de camundongos, aumentando a proporção de gordura oferecida aos animais. Inicialmente, foi testada a dieta de cafeteria (Conolly *et al.*, 1982), que consiste em ofertar uma variedade de alimentos aos camundongos; tais como: queijo, bolachas e ovos. No entanto, esta dieta causou uma perda de peso nos animais, provavelmente devido à desnutrição protéica. Outra desvantagem deste protocolo era quantificar a ingestão dos diferentes alimentos pelos camundongos. Desta maneira, a manipulação de dieta escolhida foi a adição de óleo de soja à única fonte de água dos animais. Isto foi obtido com a utilização do emulsificante estearoil lactilato de sódio (ver Material e Métodos). Este protocolo de dieta teve a vantagem de ser mais facilmente manipulável. Além disso, não causou perda de peso, sugerindo desnutrição, e proporcionou resultados interessantes acerca da fisiologia mitocondrial.

Os animais escolhidos para este estudo foram camundongos da linhagem Swiss, posto que estes possuem propensão à obesidade e também por serem usados em nosso laboratório em um estudo de longevidade, sendo possível estabelecer uma ligação entre as linhas de pesquisa do nosso grupo de trabalho. De início, foram utilizados camundongos machos de seis semanas de idade submetidos à suplementação com óleo de soja durante 1-2 meses. Foram realizados experimentos de inchamento mitocondrial, com o intuito de verificar a atividade dos canais de  $K^+$  sensíveis a ATP e testar se esta atividade correlacionaria com níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides. Mesmo com a suplementação da dieta não houve aumento significativo em relação aos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides ou massa corpórea nos animais tratados se comparados ao grupo controle (figura 2).



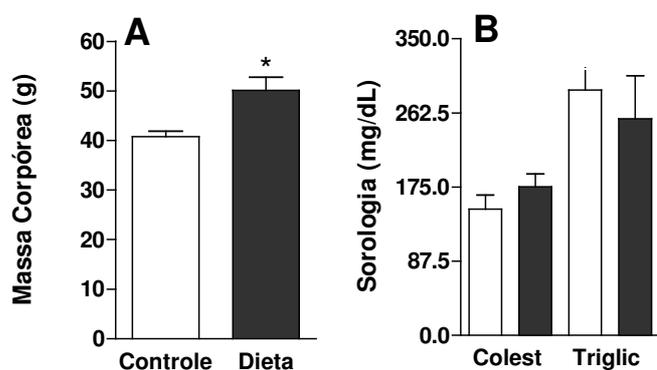
**Figura 2: Óleo de soja em emulsão não aumentou os níveis de lipídeos plasmáticos e a massa corpórea dos animais.** (A) As barras representam as médias dos níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos nos grupos controle (colunas brancas) ou submetidos à suplementação com óleo de (colunas pretas),  $n = 3$  camundongos por grupo ( $p > 0,05$ ). (B) A suplementação com óleo vegetal não alterou a massa corpórea de camundongos machos Swiss.  $n = 3$  animais por grupo,  $p > 0,05$ .

Apesar da ineficiência do tratamento de suplementação com óleo de soja em alterar os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides ou a massa corpórea, houve uma tendência de correlação entre os níveis de colesterol ou triglicérides e a atividade do mitoK<sub>ATP</sub> (figura 3). No entanto, não houve um aumento da atividade do canal no grupo da dieta.



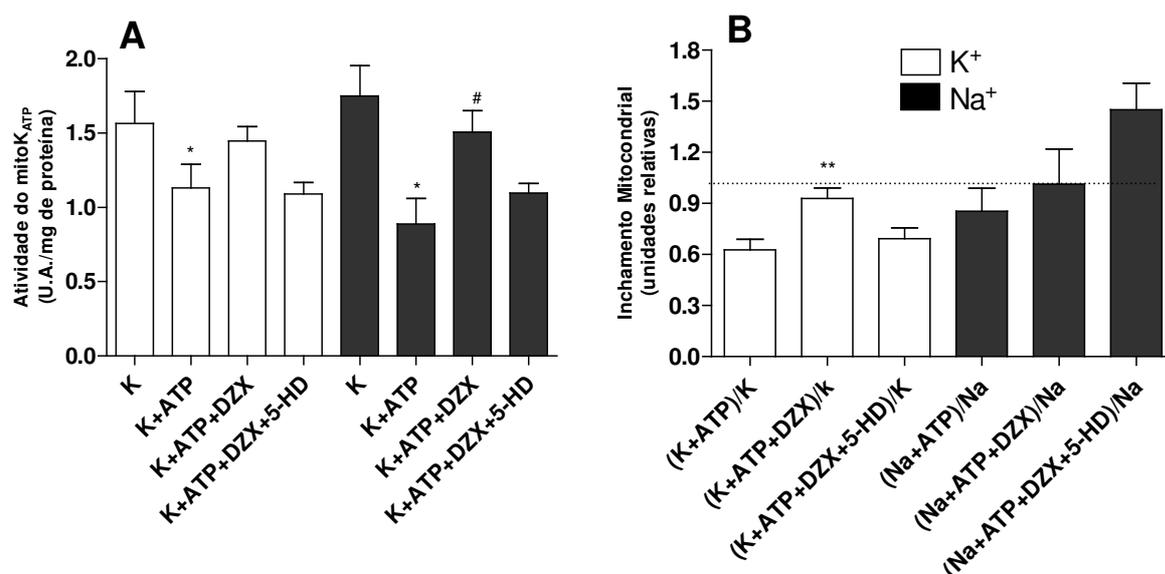
**Figura 3: Correlação entre níveis plasmáticos de lipídeos e a atividade do mitoK<sub>ATP</sub>.** Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foram incubadas em KCl 150 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2 a 37°C, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1 µg/mL na ausência de ATP ou com ATP 1 mM. A atividade do canal foi estimada pela diferença entre o espalhamento de luz na condição controle e o espalhamento de luz com ATP sobre o espalhamento de luz controle. Foi estabelecida a correlação entre o nível de colesterol (A) e triglicérides (B) e a atividade do mitoK<sub>ATP</sub>. Para construção da correlação foram usados 10 camundongos, tanto do grupo controle quanto da dieta. Em (A) e (B) as correlações não são significativamente diferentes de zero.

Após a observação desta tendência de aumento de atividade do canal seguindo o aumento dos níveis plasmáticos de lipídeos em machos, foram realizados experimentos com fêmeas da mesma linhagem. As fêmeas foram tratadas durante 2-3 meses com a suplementação de óleo vegetal e apresentaram ganho de massa corpórea sem aumento significativo de níveis de colesterol e triglicérides no plasma (figura 4).



**Figura 4: Massa corpórea e lípidos plasmáticos em camundongos fêmeas Swiss.** (A) As barras representam a massa corpórea dos camundongos.  $n = 6$  animais por grupo, \*, ( $p < 0.05$ ). (B) As barras representam as médias dos níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos nos grupos controle (colunas brancas) ou submetidos à dieta com suplementação lipídica (colunas pretas),  $n = 6$  animais por grupo,  $p > 0,05$ .

Mesmo com um tempo maior de dieta os animais não apresentaram mudanças nos níveis de colesterol e triglicérides. No entanto, a atividade do canal foi claramente aumentada no grupo da suplementação lipídica (figura 5A). Sendo que, no grupo tratado, o inchamento mitocondrial foi mais inibido por ATP, houve uma reversão maior do inchamento pelo diazóxido (agonista do canal) e a inibição do inchamento por 5-hidrodecanoato (5-HD) foi igual entre os dois grupos. Estes resultados não foram observados em meio contendo  $\text{Na}^+$  como cátion substituindo o  $\text{K}^+$ ; sem atividade do canal que é específico para potássio (figura 5B). Estes resultados sugerem que o tratamento com a suplementação de óleo vegetal à dieta dos animais foi capaz de induzir um aumento de atividade do canal de potássio sensível a ATP ( $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ ) em mitocôndrias de fígado de camundongos fêmeas da linhagem Swiss.

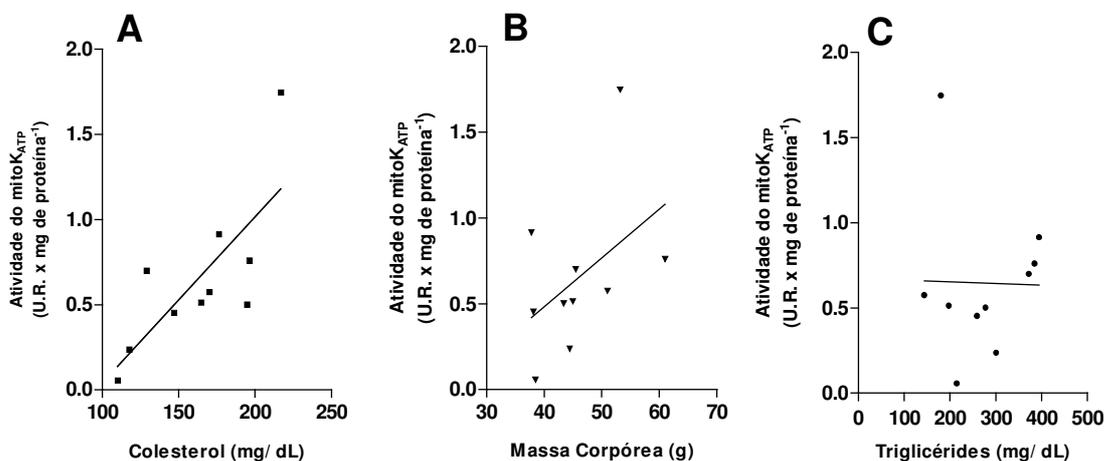


**Figura 5: Inchamento mitocondrial em animais da dieta e controle.** (A) Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foram incubadas em KCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 a 37°C, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1 µg/mL na ausência ou presença de ATP 1 mM, diazóxido 30 µM (DZX) e 5-hidroxicanoato 60 µM (5-HD). As barras brancas representam o grupo controle e as barras negras representam o grupo da suplementação, n = 6 experimentos por grupo. #, \*, p < 0,05. (B) Mitocôndrias foram incubadas em meio de potássio, como acima, ou substituídos por sais de sódio com a mesma concentração, NaCl 150 mM e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM. As barras representam o inchamento mitocondrial contendo ATP, ATP + DZX e ATP + DZX + 5-HD sobre o inchamento sem nenhum destes compostos. \*\*, p < 0,05, n = 12 experimentos por grupo.

Além disso, houve uma correlação significativa entre a atividade do canal e a concentração plasmática de colesterol (figura 6), mas não significativa entre triglicérides ou massa corpórea. Esta significância não havia sido obtida anteriormente em machos da mesma linhagem.

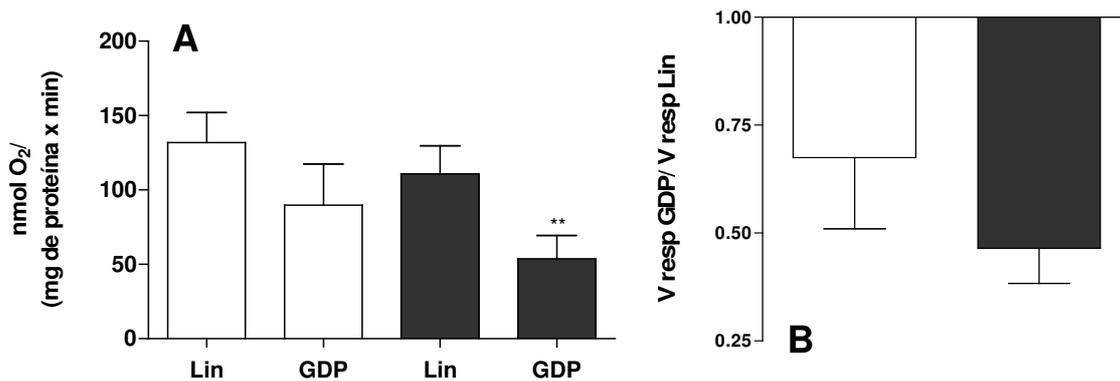
Além dos experimentos envolvendo os canais de potássio sensíveis a ATP mitocondriais, também foram realizados ensaios com o intuito de investigar outras vias dissipativas como as proteínas desacopladoras (UCPs). A ativação de UCPs depende de ácidos graxos livres no meio e sua inibição é promovida por GDP ou GTP. O grupo da dieta apresentou uma inibição da velocidade respiratória significativa por GDP. O mesmo não ocorreu no grupo controle (figura 7A). A inibição por GDP da velocidade respiratória não foi significativamente maior no grupo da dieta (figura 7B) em relação à velocidade respiratória na presença de ácido linoléico. O número amostral para realização destes experimentos foi pequeno (n = 4), mas a tendência de uma maior inibição da velocidade respiratória por GDP no grupo da dieta sugere uma

expressão maior de UCPs nos animais da suplementação com óleo vegetal. No entanto, a presença de ácidos graxos livres no meio não pode ser descartada na condição sem ácido linoléico, já que não havia BSA para quelá-los no tampão experimental.

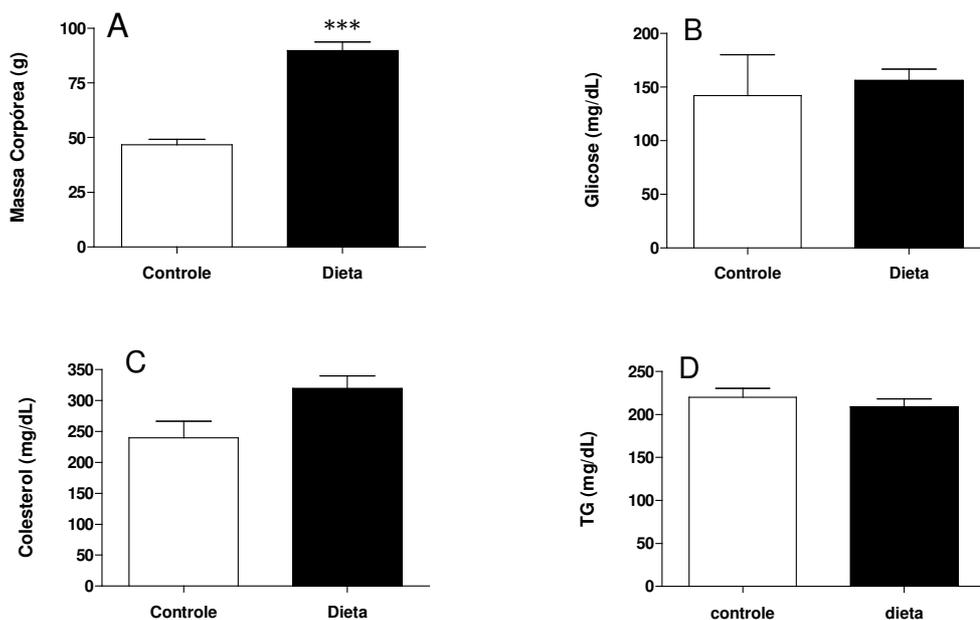


**Figura 6: Correlação entre níveis plasmáticos de lipídeos e a atividade do mitoK<sub>ATP</sub>.** Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foram incubadas em KCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 a 37°C, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1 µg/mL na ausência de ATP ou com ATP 1 mM. A atividade do canal foi estimada pela diferença entre o espalhamento de luz na condição controle e o espalhamento de luz com ATP sobre o espalhamento de luz controle. Foi estabelecida a correlação entre o nível de colesterol (A), triglicérides (B), massa corpórea (C) e a atividade do mitoK<sub>ATP</sub>. A correlação foi feita com 12 camundongos, tanto do grupo controle quanto da dieta. Em (A)  $p < 0,05$ ,  $r^2 = 0.5794$ .

Com o intuito de investigar se haveria uma maior alteração da fisiologia mitocondrial com uma maior duração da suplementação da dieta aumentamos o tratamento para 10 meses nas fêmeas. Mesmo com 10 meses de dieta hiperlipídica não foi observada uma alteração significativa dos níveis de colesterol, triglicérides ou glicose plasmáticos nos animais. No entanto, foi observado um grande aumento na massa corpórea dos camundongos fêmeas (figura 8).

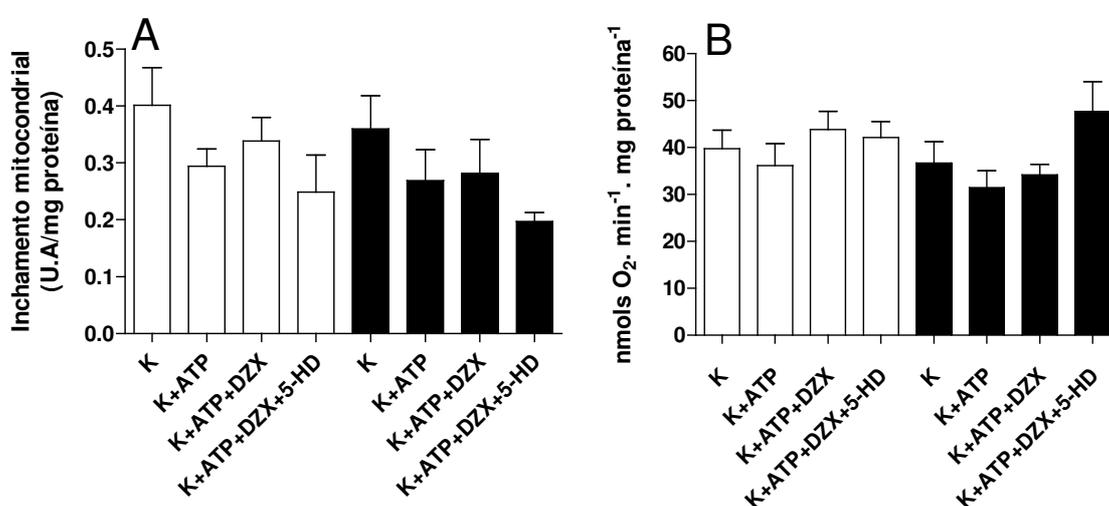


**Figura 7: A inibição de UCPs por GDP é maior no grupo da dieta.** Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foram incubadas em meio com KCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 a 37°C, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, succinato 2 mM, ácido linoléico 1 μM e oligomicina 1 μg/mL. O consumo de O<sub>2</sub> é dado por nmoles por mg de proteína por minuto. A adição de GDP foi de 1 mM (concentração final no meio). O GDP inibiu o consumo de O<sub>2</sub> em relação ao ácido linoléico (Lin), \*\*, p < 0,05. (B) As colunas representam a razão do consumo de O<sub>2</sub> com adição de GDP em relação ao estado inicial, sem GDP. Houve uma tendência de inibição maior do GDP no grupo da dieta, sem significância estatística p > 0,05. As barras representam as médias ± erro padrão de 4 experimentos para cada grupo.



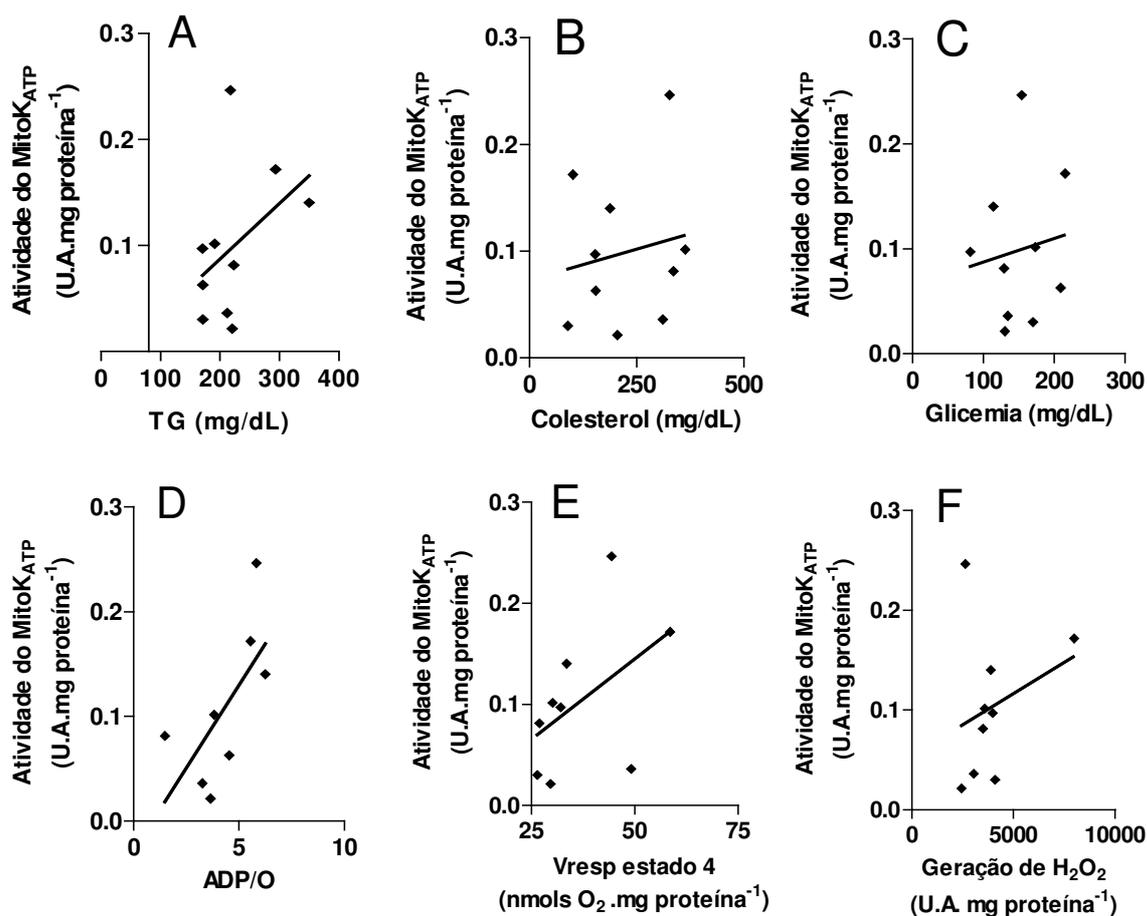
**Figura 8: Massa corpórea, glicemia, colesterolemia e trigliceridemia em fêmeas Swiss com 10 meses de dieta.** (A) O grupo da dieta apresentou uma maior massa corpórea em relação ao grupo controle. A suplementação da dieta com óleo vegetal alterou a massa corpórea de camundongos fêmeas Swiss. n = 6 animais por grupo, \*\*\*, (p < 0,001). (B) As barras representam as médias da glicemia dos animais no instante do sacrifício, n = 6 animais por grupo, p > 0,05. (C-D) As barras representam as médias dos níveis de colesterol (C) e triglicérides (D) plasmáticos nos grupos controle ou submetidos à dieta com suplementação lipídica, n = 6 animais por grupo, p > 0,05.

Era esperado que a atividade do mitoK<sub>ATP</sub> se mantivesse elevada no grupo da suplementação, mesmo com uma duração mais elevada do tratamento. No entanto, isto não foi observado em camundongos fêmeas do grupo da suplementação de 10 meses (figura 9A). O diazóxido também perdeu o efeito de reversão da inibição do inchamento pelo ATP. Além disso, os agonistas e antagonistas do canal não apresentaram efeito sobre o consumo de oxigênio mitocondrial em estado 4 (figura 9B).



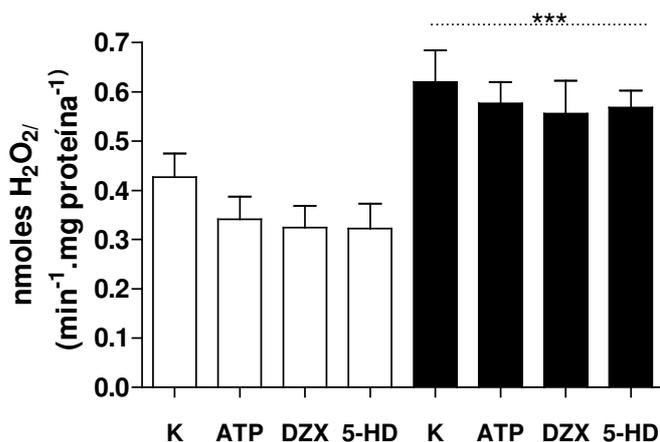
**Figura 9: Inchaumento mitocondrial e consumo de O<sub>2</sub> em animais da dieta e controle.** Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foram incubadas em KCl 150 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2 a 37°C, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1 µg/mL na ausência ou presença de ATP 1 mM, diazóxido 30 µM (DZX) e 5-hidroxi-decanoato 60 µM (5-HD). (A) Inchaumento mitocondrial, n = 5 experimentos por grupo, p > 0,05. e (B) Consumo de O<sub>2</sub>, n = 6 camundongos por grupo, p > 0,05.

Quanto às correlações encontradas anteriormente, não foi possível correlacionar a atividade do canal com os níveis de colesterol, triglicérides e glicose plasmáticos. A atividade do canal também não apresentou correlação significativa com o consumo de oxigênio em estado 4, ADP/O, potencial de membrana ou com a geração de EROs (figura 10).

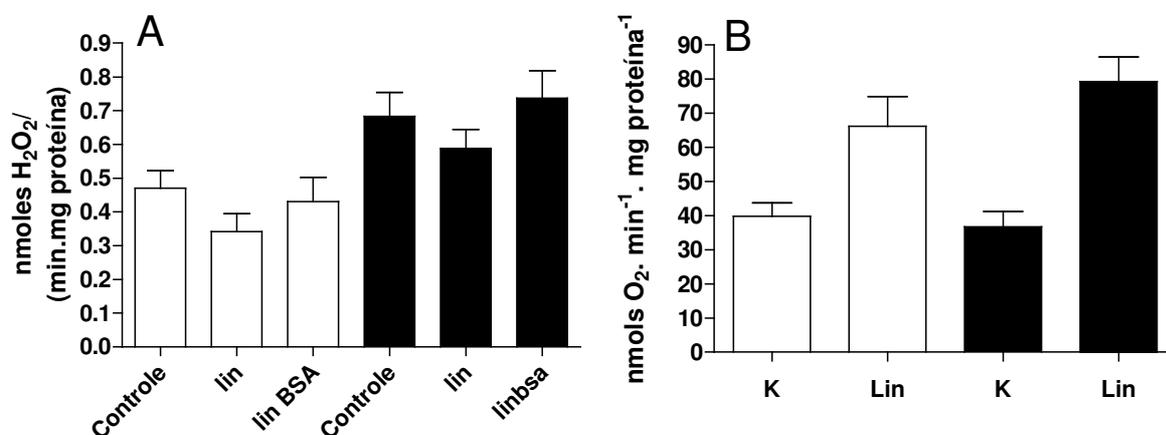


**Figura 10: Correlação da atividade do mitoK<sub>ATP</sub> com a sorologia e parâmetros da fisiologia mitocondrial.** Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foram incubadas em KCl 150 mM, Hesper 10 mM, pH 7,2 a 37°C, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1 µg/mL na ausência de ATP ou com ATP 1 mM. A atividade do canal foi estimada pela diferença entre o espalhamento de luz na condição controle e o espalhamento de luz com ATP sendo os resultados normalizados pela concentração de proteínas da preparação. Foi estabelecida a correlação entre o nível de triglicérides (A), colesterol (B), glicemia (C), ADP/O (D), Velocidade respiratória em estado 4 (E), Velocidade da geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (F) e a atividade do mitoK<sub>ATP</sub>. A correlação foi feita utilizando 10 camundongos, tanto do grupo controle quanto da dieta,  $p > 0,05$ , em todos os painéis.

Os moduladores do canal não apresentaram efeito sobre a geração de EROs (figura 11). Além disso, a geração de EROs do grupo tratado foi praticamente o dobro da geração do grupo controle. A diminuição da geração de EROs foi obtida apenas com a adição de ácido linoléico 1 µM no tampão experimental (figura 12A), apesar de não haver significância estatística. O ácido linoléico também aumentou significativamente o consumo de oxigênio em mitocôndrias em estado 4 (figura 12B), de uma maneira reversível por BSA, um quelante de ácidos graxos.

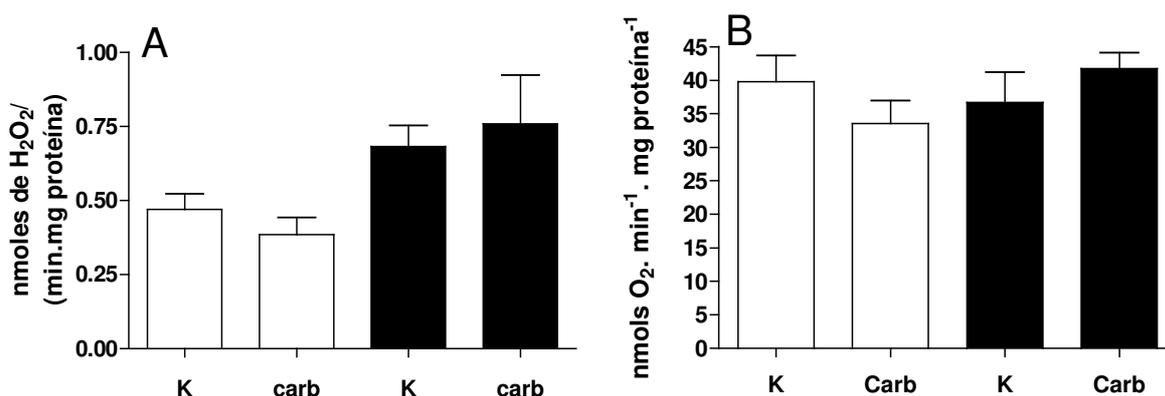


**Figura 11: Velocidade da geração de EROs nos grupos da dieta e controle.** Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foram incubadas em KCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 a 37°C, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1 µg/mL na ausência ou presença de ATP 1 mM, diazóxido 30 µM (DZX) e 5-hidroxicanoato 60 µM (5-HD). Na presença de Amplex Red (5 µM) e HRP (1 U/mL). Os resultados obtidos são expressos em unidades de fluorescência por minuto por mg de proteína mitocondrial. n = 6 animais por grupo. A geração de EROs é significativamente maior em relação ao controle, \*\*\*, p < 0,001.



**Figura 12: Velocidade da geração de EROs e consumo de O<sub>2</sub> em estado 4.** Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foram incubadas em meio de K<sup>+</sup> com KCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 a 37°C, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, succinato 2 mM, ácido linoléico 1 µM e oligomicina 1 µg/mL. (A) Geração de EROs na presença de Amplex Red (5 µM) e HRP (1 U/mL), os dados são expressos como unidades de fluorescência por segundo, sendo normalizada a concentração de proteína mitocondrial, n = 6 camundongos por grupo, p > 0,05. (B) O consumo de O<sub>2</sub> é dado por nmoles por mg de proteína por minuto, na ausência K ou presença de ácido linoléico 1 µM, n = 6 animais por grupo, p > 0,05.

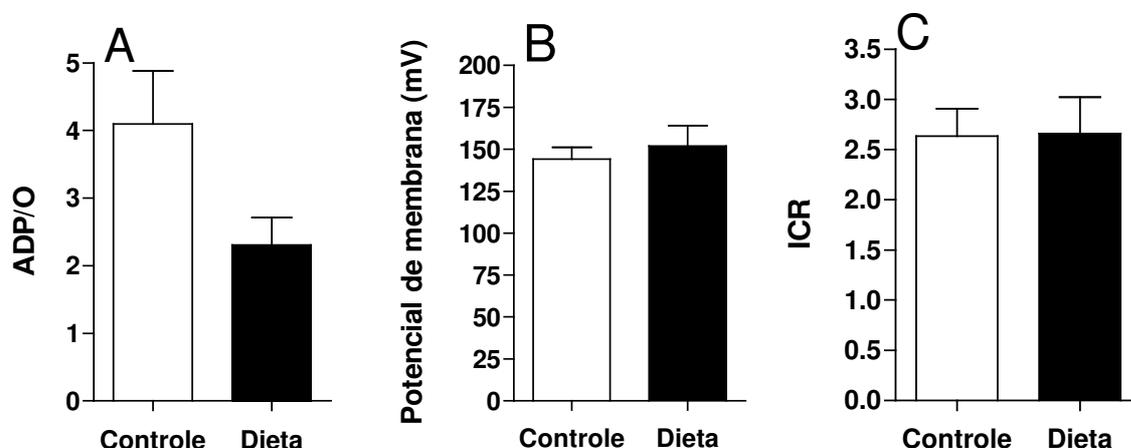
Outra via de desacoplamento importante é constituída pelo translocador de nucleotídeos de adenina, responsável pelo translocamento de nucleotídeos de adenina. O desacoplamento se deve ao transporte de ácidos graxos carregados negativamente (Klingenberg *et al.*, 1989). Com o objetivo de estudar a possibilidade desta via estar aumentada no grupo da dieta utilizamos o inibidor carboxiatractilosídeo aos experimentos, mas não houve alterações significativas tanto no consumo de  $O_2$  quanto na geração de EROs (figura 13).



**Figura 13: Efeito do carboxiatractilosídeo sobre a geração de EROs e sobre o consumo de  $O_2$  mitocondrial.** Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foram incubadas em meio de  $K^+$  com KCl 150 mM, Hepes 10 mM , pH 7,2 a 37°C,  $MgCl_2$  2 mM,  $KH_2PO_4$  2 mM, succinato 2 mM, carboxiatractilosídeo 1  $\mu$ M e oligomicina 1  $\mu$ g/mL. (A) Geração de EROs na presença de Amplex Red (5  $\mu$ M) e HRP (1 U/mL), na ausência K ou presença de carboxiatractilosídeo (Carb). Os dados são expressos como unidades de fluorescência por segundo, sendo normalizada a concentração de proteína mitocondrial, n = 6 camundongos por grupo, p > 0,05. (B) O consumo de  $O_2$  é dado por nmoles por mg de proteína por minuto na ausência K ou presença de carboxiatractilosídeo. n = 6 animais por grupo, p > 0,05.

Finalmente, outros parâmetros da fisiologia mitocondrial foram analisados (figura 14), tais como o ADP/O, ICR e o potencial de membrana. O ADP/O expressa a eficiência de fosforilação oxidativa, porque é a medida de quantos nmoles de  $O_2$  as mitocôndrias utilizam para fosforilar uma concentração conhecida de ADP. Este parâmetro apresentou uma tendência de diminuição no grupo da dieta, representando uma menor eficiência de conversão energética. O ICR, divisão do estado 3 pelo estado 4, é um parâmetro que representa a qualidade da preparação mitocondrial. Desta forma

a qualidade das preparações foi muito semelhante entre os dois grupos de camundongos.



**Figura 14: Razão ADP/O, potencial de membrana e índice de controle respiratório.** Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foram incubadas em KCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7,2 a 37°C, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, succinato 2 mM e oligomicina 1 µg/mL (exceto em A). (A) Razão ADP/O realizada na presença de 100 nmoles de ADP, os dados são calculados a partir do ponto de inflexão da curva onde as mitocôndrias passam de estado 3 para estado 4, daí calcula-se o número de nmoles necessários para fosforilar o ADP e estabelece-se a razão. n = 6 animais por grupo, p > 0,05. (B) Potencial de membrana máximo em estado 4, obtido pela diferença de fluorescência da safranina O (5 µM), n = 6 animais por grupo, p > 0,05. (C) Índice de controle respiratório, obtido pela divisão do consumo de oxigênio em estado 3 pelo consumo em estado 4. n = 6 experimentos por grupo, p > 0,05.

Já o potencial de membrana em estado 4 supostamente estaria alterado no grupo da dieta, por se tratar de mitocôndrias mais desacopladas; como pode ser visto pela razão ADP/O. No entanto, isto não foi observado. O que se constatou foi uma tendência maior das mitocôndrias do grupo tratado a perderem seu potencial de membrana com cerca de 1 minuto após a transferência para o tampão de experimento. Estes resultados serão investigados com maior rigor futuramente, já que podem representar uma propensão maior para a TPM no grupo da dieta. Os agonistas e antagonistas do canal também não alteraram o potencial de membrana das mitocôndrias analisadas. Este resultado já era esperado, já que a ativação do canal contribuiu para um desacoplamento mitocondrial brando apenas (figura 14).

## 5. DISCUSSÃO

Como Alberici *et al.* (2006) verificaram aumento da atividade e expressão de canais mitoK<sub>ATP</sub> em fígado de camundongos dislipidêmicos transgênicos, o objetivo inicial deste trabalho foi investigar o efeito da dieta suplementada sobre a atividade do mitoK<sub>ATP</sub> em mitocôndrias isoladas a partir de tecido hepático. Em seguida, o objetivo foi correlacionar a atividade do canal com parâmetros bioenergéticos e redox. Como mencionado anteriormente, a principal dificuldade para estudar a participação do mitoK<sub>ATP</sub> no metabolismo oxidativo foi encontrar um modelo apropriado para a realização dos experimentos. O modelo animal transgênico (linhagem C57BL6) usado por Alberici *et al.* (2006) apresentava particularidades interessantes, como por exemplo: os animais eram hiperfágicos, sem aumento de massa corpórea e manutenção da homeostase de glicose apesar de níveis plasmáticos muito elevados de triglicérides (em média 500 mg/dL). Esta condição é muito difícil de ser observada em modelos animais sem intervenções genéticas. Deste modo, a participação do mitoK<sub>ATP</sub> no metabolismo oxidativo poderia ocorrer somente em condições restritas. Desta forma, o nosso modelo representa condições mais próximas do que se observa em clínica se comparado ao modelo de animal transgênico.

No entanto, os nossos dados mostram que é possível induzir o aumento da atividade destes canais por meio de dietas hiperlipídicas, de uma maneira dependente do tempo da dieta, usando modelo animal não modificado geneticamente. Além disso, a atividade do canal pode ser correlacionada com os níveis plasmáticos de colesterol no grupo de animais suplementados de 2-3 meses. Este resultado sugere que o mitoK<sub>ATP</sub> tem um papel interessante na obesidade. Isto trás questões importantes acerca de suas vias de ativação e de sua regulação e expressão. Por outro lado, esta correlação não se mantém com a progressão da obesidade, resultante de um tempo mais elevado da suplementação. Nos animais expostos a 10 meses de dieta suplementada há uma perda da resposta do inchamento pelos agonistas e antagonistas do mitoK<sub>ATP</sub>. Este dado pode ser resultado de uma diminuição da biogênese

mitocondrial que ocorre em estágios mais avançados da obesidade; associado à provável deterioração de membranas mitocondriais causadas pela maior geração de EROs (Nisoli *et al.*, 2007; Nicolson 2007).

No trabalho de Alberici *et al.* (2006) foi sugerido que o mitoK<sub>ATP</sub> poderia ser uma adaptação mitocondrial para oxidar lipídeos excedentes. Este canal é inibido por grupos acil-CoA de cadeia longa em concentrações da ordem de nM, sendo difícil imaginar um papel na oxidação de lipídeos *per se* observando este único dado. No entanto, a regulação do canal *in vivo* não é trivial; posto que não depende unicamente da concentração de inibidores, mas sim de um balanço entre as concentrações de seus ativadores como GDP e GTP e seus inibidores como o ATP e os grupos acil-CoA de cadeia longa (Paucek *et al.*, 1996). Além disso, a abertura do canal depende de seu estado redox. Sabe-se que espécies como o radical ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são ativadores do mitoK<sub>ATP</sub> (Zhang *et al.*, 2001; Facundo *et al.*, 2007; Fornazari *et al.*, 2008). Na obesidade, existe um estresse oxidativo associado à patologia (Nicolson, 2007; Nisoli *et al.*, 2007), e a prevalência de espécies oxidantes (como pode ser observado na figura 10) poderia alterar o estado redox do canal e resultar na sua abertura. Portanto, é difícil saber ao certo o que causaria este aumento de atividade do mitoK<sub>ATP</sub>, sendo necessária a realização de novos experimentos.

Quanto aos estudos de correlação da atividade do canal com os parâmetros metabólicos escolhidos, é impossível dizer que o aumento da atividade do canal é causado diretamente por alterações plasmáticas de lipídeos. Ao invés disso, a correlação mostra que o excedente de lipídeos, evidenciado pelo seu acúmulo no plasma, está associado a um aumento da atividade do canal e, mais importante, de um estado metabólico sistêmico do animal. Portanto, há uma relação de causa indireta entre as variáveis. Antes da realização do experimento, era esperado que os níveis de triglicérides estivessem mais associados à atividade do canal, já que o modelo empregado por Alberici *et al.* (2006) apresentava a hipertrigliceridemia como principal característica. No entanto, os níveis de triglicérides plasmáticos dos animais transgênicos eram muito elevados (500 mg/dL em média) se comparados aos animais submetidos à suplementação da dieta com óleo vegetal. A correlação

poderia existir somente em níveis mais elevados de triglicérides plasmáticos, não obtidos por meio de manipulação da dieta. Outra explicação possível para este fenômeno poderia residir na síntese de colesterol, já que esta via consome um elevado nível de coenzimas reduzidas (NADPH) que são fundamentais para a manutenção de vias antioxidantes (Voet & Voet 2000; Vercesi *et al.*, 2007). Assim, a suplementação da dieta dos animais com óleo de soja poderia alterar a síntese de colesterol endógena e prejudicar as defesas antioxidantes das mitocôndrias do fígado, levando a uma maior ativação do canal (Vercesi *et al.*, 2007; van den Bosch 2008). Isto ocorreria porque o óleo vegetal não apresenta colesterol em sua composição e diminui o apetite dos animais; como resultado os animais ingerem menos colesterol. Para testar esta hipótese seria necessário realizar outros experimentos. Além disso, estes resultados sugerem um papel mais geral do mitoK<sub>ATP</sub> no metabolismo, sendo este induzível em condições metabólicas mais freqüentes.

Sobre o estado redox das mitocôndrias é interessante notar que a geração de EROs nos camundongos da dieta suplementada durante 10 meses foi praticamente o dobro da geração dos animais controle (figura 10). Este resultado sugere que estes animais podem estar sob uma condição de estresse. Para afirmar categoricamente que a dieta promove estresse oxidativo seria necessário avaliar as defesas antioxidantes presentes nas células desses animais e quantificar as lesões oxidativas. Contudo, dada a magnitude da geração de EROs é muito provável que os complexos respiratórios dessas mitocôndrias estejam danificados, promovendo o aumento da geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> constatada pelo método de Amplex Red. Sabidamente o acúmulo de gordura no fígado pode levar a uma diminuição da atividade dos complexos respiratórios, diminuição do DNA mitocondrial e diminuição da atividade do ciclo do ácido cítrico. Esta condição associada ao acúmulo de coenzimas reduzidas pode causar um vazamento de elétrons excedente nos complexos I e III da cadeia respiratória (Fromentry *et al.*, 2004).

Dado que o mitoK<sub>ATP</sub> é ativado por EROs poderia ser esperado que sua atividade fosse linearmente correlacionada com a geração de EROs. No entanto, o canal além de ser ativado por EROs também pode promover a inibição de sua geração (Facundo *et al.*, 2007; Fornazari *et al.*, 2008), desta

maneira a sua correlação não é linear. As vias de desacoplamento brando controlam a geração de EROs de maneira preventiva; já que diminuem a probabilidade de vazamento de elétrons pelos complexos I e III da cadeia respiratória, acelerando sua velocidade. Em uma condição de intenso estresse oxidativo, onde a geração de espécies oxidantes sobrepuja as defesas antioxidantes, existe uma depleção da biogênese mitocondrial associada a um dano das membranas mitocondriais. Talvez o papel das vias de desacoplamento brando seja muito pouco eficaz para a diminuição da geração de EROs em uma condição de estresse intenso, o que poderia responder a perda da importância dos canais de potássio no modelo experimental empregado. Outra explicação para este dado poderia residir no fato de que o estresse oxidativo altera a composição das membranas mitocondriais, o que poderia alterar a difusibilidade do potássio nas mitocôndrias. Se o potássio passasse a ser mais difusível em membranas lipoperoxidadas, o papel do mitoK<sub>ATP</sub> se tornaria obsoleto.

Quanto às proteínas desacopladoras, pode-se observar em muitos artigos da literatura um aumento da expressão das UCPs em modelos genéticos de obesidade (de Souza *et al.*, 2007; McQuaid *et al.*, 2006; Carley *et al.*, 2005). Esta expressão aumentada é muitas vezes demonstrada por *Real-time PCR* em amostras de tecido ou pela marcação da proteína por *western blot*, mas poucos trabalhos demonstram um aumento da atividade da proteína deflagrada por alterações de velocidade respiratória. Neste trabalho, os estudos sobre as UCPs foram realizados medindo-se o consumo de oxigênio por eletrodo de Clark, sendo possível inferir que os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram uma resposta maior ao GDP sobre a velocidade respiratória em estado 4, o que sugere uma participação maior das UCPs no desacoplamento mitocondrial dos animais da dieta. Além disso, a diminuição da geração de EROs foi maior na presença de ácido linoléico se comparada às condições experimentais em que o mitoK<sub>ATP</sub> estava aberto. Isto pode sugerir uma maior eficiência de vias dissipativas envolvendo transporte de ácidos graxos livres, entre elas as UCPs, na prevenção da geração de EROS.

A participação do desacoplamento causado pela ANT-translocase neste trabalho não apresentou resultados conclusivos. Isto porque apesar de não

haver diferenças significativas com a utilização do inibidor específico carboxiatractilosídeo não foram acrescentados ácidos graxos livres ao meio. Isto é importante porque estes fazem parte do mecanismo de ação da ANT-translocase. O tampão experimental não apresentava BSA, que é um quelante de ácidos graxos livres. Como não foi medida a concentração de ácidos graxos livres na preparação, não é possível descartar o papel desta via dissipativa.

Outro aspecto interessante deste trabalho foi constatar que os potenciais de membrana, estimados pelo método de safranina O, não foram significativamente diferentes entre os dois grupos em estado 4. No entanto, a razão ADP/O indica uma menor eficiência das mitocôndrias dos animais da dieta para a fosforilação oxidativa. Isto pode ser explicado pela perda de potencial de membrana das mitocôndrias da dieta. A perda ocorreu alguns segundos após a obtenção de seu potencial máximo. Esta perda de potencial poderia representar uma menor eficácia na fosforilação oxidativa. Além disso, poderia representar uma maior tendência a desenvolver TPM. A TPM é marcante para determinar a morte celular apoptótica e necrótica, sendo este indicativo um ponto interessante para realizar novos experimentos. O índice de controle respiratório (ICR) indica que a perda de potencial não se deve a um problema de preparação das mitocôndrias, sendo muito semelhante entre os dois grupos. Além disso, existe uma maior atividade de vias dissipativas brandas nos animais da dieta. Sendo que o método de safranina O não apresenta sensibilidade suficiente para detectar alterações de poucos mV. Deste modo, poderia haver uma diferença discreta entre os grupos não evidenciada pelo método empregado.

A participação de vias dissipativas mitocondriais na obesidade está relacionada com um aumento da velocidade respiratória que facilita a oxidação de lipídeos excedentes (Nègre-Salvayre *et al.*, 1997; Jezek *et al.*, 2004; Nicolson, 2007). A participação destas vias é importante para prevenir a geração de EROs e também para auxiliar a remoção de lipídeos que podem ser sujeitos a lipoperoxidação (Goglia & Skulachev, 2003), sendo este processo muito deletério para a fisiologia mitocondrial (Jezek *et al.*, 2004). Quando o estado de lesão mitocondrial se perpetua existe cada vez menos capacidade de remoção de lipídeos e diminuição da biogênese mitocondrial, isto agrava os

problemas trazidos pela obesidade (Nisoli *et al.*, 2007). Desta maneira, o papel de vias dissipativas mitocondriais é central na obesidade e na síndrome metabólica. Nossos resultados sugerem um papel importante do mitoK<sub>ATP</sub> no metabolismo energético, sendo este um conceito muito novo do ponto de vista de estudos mitocondriais e do estudo da obesidade. Contudo, existe a possibilidade da geração de espécies oxidantes sobrepujar as defesas antioxidantes configurando um estresse. Nesta condição as vias dissipativas passam a ser ineficazes para a prevenção da geração de EROs.

## 6. CONCLUSÕES

O modelo experimental utilizado de dieta hiperlipídica não foi eficaz para alterar significativamente parâmetros sorológicos dos animais, tais como colesterolemia, trigliceridemia e glicemia.

No entanto, foi capaz de induzir plenamente obesidade e esteatose hepática nos camundongos.

Com o emprego da suplementação da dieta foi possível alterar parâmetros da fisiologia mitocondrial.

A dieta induziu um aumento da atividade de canais de potássio sensíveis a ATP mitocondriais ( $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ ) de uma maneira dependente do tempo da suplementação.

A dieta suplementada foi capaz de induzir uma maior geração de EROs se comparada ao grupo controle.

O tratamento diminuiu a eficiência energética das mitocôndrias de fígado.

A dieta induziu uma maior tendência à perda do potencial de membrana mitocondrial. Este achado pode representar uma maior propensão à TPM nos animais da dieta.

## 7. Referências Bibliográficas

- Akerman KE, Wikstrom MK (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68:191-197.
- Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD (2006) Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291:2067-74.
- Alberici LC, Oliveira HC, Patricio PR, Kowaltowski AJ, Vercesi AE (2006) Hyperlipidemic Mice Present Enhanced Catabolism and Higher Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel Activity. *Gastroenterology.* 131:1228-34.
- Aliev MK, Saks VA (2003) Analysis of mechanism of work of mitochondrial adenine nucleotide translocase using mathematical models. *Biofizika.* 48:1075-85.
- Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Goubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nature Genet.* 26: 435-439.
- Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacín M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A. (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem.* 278: 190-7.
- Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, Paucek P (2001) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem.* 276:33369-74.
- Beck V, Jabůrek M, Demina T, Rupprecht A, Porter RK, Jezek P, Pohl EE (2007) Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. *FASEB J.* 21:1137-44.
- Bernardi P, Basso E, Colonna R, Costantini P, Di Lisa F, Eriksson O, Fontaine E, Forte M, Ichas F, Massari S, Nicolli A, Petronilli V, Scorrano L (1998) Perspectives on the mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 200-206.
- Bender E, Kadenbach B (2000) The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS Lett.* 466:130-4.

- Bouillaud F, Couplan E, Pecqueur C, Ricquier D (2001) Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochim Biophys Acta*. 1504:107-119.
- Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J*. 134:707-716.
- Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes*: 54:1615-25.
- Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, Abramov AY, Tinker A, Duchon MR (2008) Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab*. 8:13-25.
- Cancherini DV, Trabuco LG, Reboucas NA, Kowaltowski AJ (2003) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in renal mitochondria. *Am J Physiol Renal Physiol*. 285:1291-6.
- Cannon B, Shabalina IG, Kramarova TV, Petrovic N, Nedergaard J (2006) Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species--or not? *Biochim Biophys Acta*. 449-58.
- Capaldi RA & Aggeler R (2002) Mechanism of the F1 Fo-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci*. 27:154-160.
- Carley AN, Severson DL (2005) Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *Biochim Biophys Acta*. 1734:112-26.
- Castilho RF, Meinicke AR, Almeida AM, Hermes-Lima M, Vercesi AE (1994) Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate is potentiated by Ca<sup>2+</sup> and includes lipid peroxidation and alterations in membrane proteins. *Arch Biochem Biophys*. 308:158-63.
- Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE (1995) Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca<sup>2+</sup> ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 18:479-86.
- Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J*. 341:233-249.
- Crunkhorn S, Dearie F, Mantzoros C, Gami H, da Silva WS, Espinoza D, Faucette R, Barry K, Bianco AC, Patti ME (2007) Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*. 21:15439-50.

- Colombini M (1987) Regulation of the mitochondrial outer membrane channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr.* 19:309-20.
- Conolly E, Carnie JA (1982) Responses to cafeteria feeding in mice after the removal of interscapular brown adipose tissue. *Biosci Rep.* 11:877-82.
- da Silva MM, Sartori A, Belisle E, Kowaltowski AJ (2003) Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release and enhances K<sup>+</sup> transport. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H154-H162.
- de Souza CT, Araújo EP, Stoppiglia LF, Pauli JR, Ropelle E, Rocco SA, Marin RM, Franchini KG, Carneiro EM, Velloso LA (2007) Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *FASEB J.* 4:1153-63.
- Desagher S & Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10: 369:377.
- Dulloo AG, Seydoux J, Jacquet J (2004) Adaptive thermogenesis and uncoupling proteins: a reappraisal of their roles in fat metabolism and energy balance. *Physiol Behav.* 83:587-602.
- Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature.* 415:96-99.
- Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper, ME, Kozak LP (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature.* 387: 90-94.
- Facundo HT, Carreira RS, de Paula JG, Santos CC, Ferranti R, Laurindo FR, Kowaltowski AJ (2006) Ischemic preconditioning requires increases in reactive oxygen release independent of mitochondrial K<sup>+</sup> channel activity. *Free Radic Biol Med.* 40:469-79.
- Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ (2007) Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med.* 42:1039-48.
- Ferranti R, da Silva MM, Kowaltowski AJ (2003) Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening decreases reactive oxygen species generation. *FEBS Lett.* 536:51-5.
- Fornazari M, de Paula JG, Castilho RF, Kowaltowski AJ (2008) Redox properties of the adenosine triphosphate-sensitive K(+) channel in brain mitochondria. *J Neurosci Res.* 86:1548-56.

- Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D (2004) The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab.* 2:121-38.
- Fumeron F, Durack-Bown I, Betoulle D, Cassard-Doulcier AM, Tuzet S, Bouillaud F, Melchior JC, Ricquier D, Apfelbaum M (1996) Polymorphisms of uncoupling protein (UCP) and beta 3 adrenoreceptor genes in obese people submitted to a low calorie diet. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 20:1051-4.
- Garlid KD (1980) On the mechanism of regulation of the mitochondrial K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Biol Chem.* 255:11273-9.
- Garlid KD, Beavis AD (1985) Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. II. Quantitative application of the light scattering technique to solute transport across the inner membrane. *J Biol Chem.* 260:13434-41.
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA (1996) The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem.* 271:8796-9.
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 81:1072-82.
- Garlid KD, Jaburek M, Jezek P, Varecha M (2000) How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim Biophys Acta.* 1459: 383-389.
- Gibbons C, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE (2000) The structure of the central stalk in bovine F1-ATPase at Å resolution. *Nature Struct. Biol.* 7:1055-1061.
- Goglia F, Skulachev VP (2003) A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J.* 12:1585-91.
- Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J (2006) UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291:350-7.
- Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY (1998) Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1366:79-84.
- Halestrap AP, Brennerb C (2003) The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem.* 10:1507-25.

- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radicals in biology and medicine. New York, NY, USA. Oxford University Press.
- Herlein JA, Fink BD, O'Malley Y, Sivitz WI (2009) Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology*.1:46-55.
- Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*. 352:244-7.
- Jaburek M, Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Garlid KD (1998) State-dependent inhibition of the mitochondrial KATP channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *J Biol Chem*. 273:13578-82.
- Jezek P, Záčková M, Růžicka M, Skobisová E, Jabůrek M (2004) Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies. *Physiol Res*. 53:199-211.
- Johnson DT, Harris RA, French S, Blair PV, You J, Bemis KG, Wang M, Balaban RS (2007) Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2:689-97.
- Kakar SS, Mahdi F, Li XQ, Garlid KD (1989) Reconstitution of the mitochondrial non-selective Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) antiporter into proteoliposomes. *J Biol Chem*. 264:5846-51.
- Karrasch S, Walker JE. (1999) Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J Mol Biol*. 290:379-84.
- Klingenberg M (1989) Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 270:1-14.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 416:14-18.
- Kowaltowski AJ, Costa ADT, Vercesi AE (1998) Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett*. 425:213-6.
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 26:463-71.
- Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280:H649-57.
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE (2001) em: Mitochondria in pathogenesis (Lemasters, JJ & Nieminem, AL Eds) pp.281-300, plenum Publishing Corporation, New York.

- Kowaltowski AJ, Cosso RG, Campos CB, Fiskum G (2002) Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. *J. Biol. Chem.* 277:42802-42807.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson, R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86:147-157.
- Ludwig B, Bender E, Arnold S, Hüttemann M, Lee I, Kadenbach B (2001) Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *Chembiochem.* 2:392-403.
- Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB, Bailey SM (2008) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radic Biol Med.* 44:1259-72.
- McQuaid TS, Saleh MC, Joseph JW, Gyulkhandanyan A, Manning-Fox JE, MacLellan JD, Wheeler MB, Chan CB (2006) cAMP-mediated signaling normalizes glucose-stimulated insulin secretion in uncoupling protein-2 overexpressing beta-cells. *J Endocrinol.* 190:669-80.
- Meyer B, Wittig I, Trifilieff E, Karas M, Schägger H (2007) Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. *Mol. Cell Proteomics.* 6:1690-9.
- Milne GL, Yin H, Brooks JD, Sanchez S, Jackson Roberts L 2nd, Morrow JD (2007) Quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. *Methods Enzymol.* 433:113-26.
- Mitchel P & Moyle J (1969) Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 9:149-155.
- Morrow JD (2005) Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2:279-86.
- Murphy MP, Echtay KS, Blaikie FH, Asin-Cayuela J, Cocheme HM, Green K, Buckingham JA, Taylor ER, Hurrell F, Hughes G, Miwa S, Cooper CE, Svistunenko DA, Smith RA, Brand MD (2003) Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *J Biol Chem.* 278:48534-45.
- Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B (2001) UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta.* 1504:82-106.
- Nedergaard J, Cannon B (2003) The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp Physiol.* 88:65-84.

- Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Pénicaud L, Casteilla L (1997) A role for the uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 11:809-15.
- Nicholls DG, Ferguson SJ (2002) *Bioenergetics 3*, San Diego, Ca, USA: Academic Press.
- Nicolson GL (2007) Metabolic syndrome and mitochondrial function: molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function. *J Cell Biochem.* 100:1352-69.
- Nisoli E, Clementi E, Carruba MO, Moncada S (2007) Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? *Circ Res.* 6:795-806.
- Palmieri F, Bisaccia F, Capobianco L, Dolce V, Fiermonte G, Iacobazzi V, Indiveri C, Palmieri L (1996) Mitochondrial metabolite transporters. *Biochim Biophys Acta.* 1275:127-132.
- Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Garlid KD (1996) Inhibition of the mitochondrial KATP channel by long-chain acyl-CoA esters and activation by guanine nucleotides. *J Biol Chem.* 50:32084-8.
- Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Lévi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B (2001) Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J. Biol. Chem.* 276:8705-8712.
- Perez JA, Ferguson SJ (1990) Kinetics of oxidative phosphorylation in *Paracoccus denitrificans*. 1. Mechanism of ATP synthesis at the active sites of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase. *Biochemistry.* 29:10503-10518.
- Rhee SG, Kang SW, Netto LE, Seo MS, Stadtman ER (1999) A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors.* 10:207-209.
- Ricquier D, Bouillaud F (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J.* 345:161-79.
- Rodríguez AM, Palou A. (2004) Uncoupling proteins: gender dependence and their relation to body weight control. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 28:500-2.
- Silva JE, Rabelo R (1997) Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol.* 136:251-64.

- Skulachev VP (1996) Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quart. Rev. Biophys.* 29:169-202.
- Skulachev VP (2001) Barbara Cannon's data on the UCP1-ablated mice: "non-cannonical" point of view. *Biosci Rep.* 2:189-94.
- Sparagna GC, Gunter KK, Sheu SS, Gunter TE (1995) Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J. Biol. Chem.* 270:27510-27515.
- Spiegelman BM (2007) Transcriptional control of mitochondrial energy metabolism through the PGC1 coactivators. *Novartis Found Symp.* 287:60-3
- Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizuete A, Gustafsson J (1997) Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 272:2936-2941.
- Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci.* 36:7779-88.
- Stock D, Leslie AG, Walker JE (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science.* 286:1700-1705.
- Tahara EB Navarete, FDT, Kowaltowski, AJ (2009) Tissue, substrate and site specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol.* No prelo.
- Talbot DA, Lambert AJ, Brand MD (2004) Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett.* 556:111-5.
- Tretter L, Adam-Vizi V (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci.* 36:7771-8.
- Tsunoda SP, Aggeler R, Yoshida M, Capaldi RA (2001) Rotation of the subunit oligomer in fully functional F1Fo ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:898-902.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552:335-344.
- van den Bosch HM, De Wit NJ, Hooiveld GJ, Vermeulen H, van der Veen JN, Houten SM, Kuipers F, Muller M, van der Meer R (2008) A cholesterol free, high-fat diet suppresses gene expression of cholesterol transporters in murine small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* No prelo.

- Vercesi AE, Castilho RF, Kowaltowski AJ, Oliveira HC (2007) Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. *IUBMB Life*. 4:263-8.
- Voet D & Voet JG (2000) Biochemistry. New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Warwick ZS, Weingarten HP (1994) Dynamics of intake suppression after a preload: role of calories, volume, and macronutrients. *Am J Physiol*. 266:R1314-8.
- Wrona M, Wardman P (2006) Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 41: 657-667.
- Wohlrab H (1980), Purification and reconstitution of the mitochondrial phosphate transporter. *Ann N Y Acad Sci*. 358:364-7.
- Xu W, Charles IG, Moncada S (2005) Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. *Cell Res*. 15:63-5.
- Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL (2001) Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*. 89:1177-83.
- Zhang Z, Berry EA, Huang LS, Kim SH (2000) Mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Subcell. Biochem*. 35:541-580.
- Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem*. 253:162-168.
- Zhu MJ, Sun LJ, Liu YQ, Feng YL, Tong HT, Hu YH, Zhao Z (2008) Blood F2-isoprostanes are significantly associated with abnormalities of lipid status in rats with steatosis. *World J Gastroenterol*. 29:4677-83.
- Zoccarato F, Nicholls DG (1982) The role of phosphate in the regulation of the Ca efflux pathway of liver mitochondria. *Eur. J. Biochem*. 127:333-338.

## **SÚMULA CURRICULAR**

### **DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Ariel Rodrigues Cardoso

**Local e data de nascimento:** São Paulo, SP. Brasil. 29/11/1982

### **EDUCAÇÃO**

**Colégio, local, ano:** Escola Estadual de Segundo Grau Brasília Machado, São Paulo, SP. Colégio realizado nos anos de 1998-2000.

**Universidade, local, ano:** Graduado como Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo em 2006.

**Iniciação científica:** Estudo morfológico da glândula Salivar de *P. americana* (Dictyoptera, Blattidea). Trabalho desenvolvido no laboratório de Microscopia Eletrônica do departamento de Biologia do Instituto de Biociências, sob orientação do professor Dr. Alberto Ribeiro.

### **OCUPAÇÃO:**

Bolsista de Mestrado financiado pelo CNPq de março de 2007 até março de 2009.

### **RESUMO EM CONGRESSOS**

**Cardoso, A.R.** & Kowaltowski, A.J. (2008) Effect of a High Fat Diet on Mitochondrial ATP Sensitive Potassium Channels (mitoK<sub>ATP</sub>), a Mild Uncoupling Pathway. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Águas de Lindóia, SP, Brasil. Resumo A-15.

**CAPÍTULO DE LIVRO**

**Cardoso, AR,** Queliconi, BB, Kowaltowski AJ (2008) Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Myocardial Pre- and Post-Conditioning in *Studies on Cardiovascular Disorders*, Springer/Human Press, London UK.

# **Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Myocardial Pre- and Post- Conditioning**

Ariel R. Cardoso\*, Bruno B. Queliconi\* and Alicia J. Kowaltowski

\*In alphabetical order, authors contributed equally

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São  
Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Address correspondence to: Alicia J. Kowaltowski, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Cidade Universitária, São Paulo, SP, 05508-900, Brasil. Phone: + 55 11 30913810; fax: +55 11 38155579; e-mail: [alicia@iq.usp.br](mailto:alicia@iq.usp.br)

## Introduction

Myocardial ischemia followed by reperfusion is a well established condition of medical importance in which reactive oxygen species (ROS) are determinant for the pathological outcome. Indeed, oxidative damage during reperfusion is causative of many of the complications found after ischemia. ROS leading to post-ischemic myocardial damage come from many sources, including mitochondria, NADPH oxidase, xanthine oxidase and infiltrated phagocytes (1). ROS also can act as signaling molecules in the cardiovascular system, including protecting the heart against myocardial ischemic damage, secondarily to ischemic pre- and post-conditioning. In this case, there is ample evidence that the source of signaling ROS is mitochondrial (2-7). This chapter will briefly review aspects of mitochondrial ROS signaling relevant to myocardial ischemic protection by pre- and post-conditioning.

## Mitochondrial ROS generation in the heart

Mitochondrial ROS generation differs from that in other cellular compartments because it occurs mainly as a byproduct of energy metabolism, and not by enzymes specifically controlled by signaling pathways to produce these species. As a result, it occurs at high rates relative to other cardiovascular sources of ROS such as NADPH oxidases (1, 8-10).

In heart mitochondria, the best documented sources of mitochondrial ROS are electron transport chain complexes I and III. One-electron redox transfers occur continuously within these complexes, and, in the event of  $O_2$  access to the electron transferring components, a one-electron reduction of  $O_2$  may occur, producing superoxide radical anions ( $O_2^{\cdot-}$ ). The source of electrons promoting  $O_2^{\cdot-}$  formation varies according to the substrate provided. In heart, which relies heavily on fatty acids and ketone bodies as energy sources, electrons are provided

mainly from citric acid cycle-generated NADH and flavoenzymes such as acyl CoA and succinate dehydrogenase. Succinate is a particularly important ROS source in heart mitochondria, leading to  $O_2\cdot^-$  formation due to reverse electron transfer from succinate to complex I, where electron leakage occurs (10, 11). Due to differences in redox potentials between mitochondrial respiratory complexes, reverse electron transfer is only thermodynamically possible if the mitochondrial inner membrane potential is high. Thus, conditions such as enhanced oxidative phosphorylation, which decrease the mitochondrial inner membrane potential, are efficient manners to prevent the generation of mitochondrial ROS in heart. Conversely, the inhibition of the mitochondrial respiratory chain can lead to electron accumulation at points in which  $O_2\cdot^-$  is formed, thus increasing mitochondrial ROS release. As a result, in a generalized manner, the faster mitochondrial respiratory rates are, the lower ROS production by this organelle tends to be (12-14).

Unfortunately, few studies quantify ROS production in heart mitochondria, due to methodological difficulties. At least *in vitro*, heart mitochondrial  $O_2\cdot^-$  production can account for almost 2% of oxygen consumed when respiratory rates are low and succinate is used as a substrate. However, under physiologically relevant conditions such as when oxidative phosphorylation occurs, this production falls under 0.1% when succinate is present, and even lower in its absence (Tahara, Navarete and Kowaltowski, unpublished observations). From this simple example, it is clear that the quantities of ROS produced and, consequently, the results of this release, are strongly determined by metabolic conditions, and can vary very intensely with changes in energy metabolism.

## Regulation of mitochondrial ROS generation by mild uncoupling pathways

Although a large amount of focus is placed on antioxidants in cardioprotection, it has increasingly become clear that the regulation of the *generation* of mitochondrial ROS, rather than their removal after they are already formed, is a crucial process for maintaining cellular redox balance. A highly effective manner to decrease mitochondrial ROS formation in heart is to increase O<sub>2</sub> consumption rates by uncoupling respiration from oxidative phosphorylation (15). Uncoupling decreases the reduction of complexes I and III, decreases O<sub>2</sub> concentrations in the mitochondrial microenvironment and prohibits reverse electron transfer, due to the low inner membrane potentials, strongly preventing mitochondrial ROS generation in heart (12, 14). If the uncoupling promoted is mild, ROS release can be substantially prevented without seriously hampering oxidative phosphorylation. Indeed, in recent years transport pathways in the inner mitochondrial membrane which lead to mild uncoupling have been identified as important regulators of ROS generation. We will discuss three of these transporters here (summarized in Scheme 1): uncoupling proteins, the adenine nucleotide translocator and ATP sensitive potassium channels (mitoK<sub>ATP</sub>).

The first mitochondrial inner membrane transporter described to promote uncoupling was uncoupling protein 1 (UCP1), which is found in brown adipose tissue and dissipates the membrane potential significantly and can affect ATP synthesis (16-19). UCP1 has been assigned an important role as a thermogenic protein and as a mechanism to control energy metabolism (20, 21). Heart mitochondria don't express UCP1, but may present low quantities of UCP2 and UCP3, which are much less active than UCP1 and promote mild uncoupling (22). Some conditions such as exercise training and diet can alter the expression of heart UCP2, which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), suggesting an important metabolic role for these proteins (23, 24). Unfortunately, it is difficult to determine the activity of UCPs *in vivo*, and the majority of papers published demonstrate only differences in mRNA or protein levels, but not UCP activity. As a result, little is known to date about the functional consequences of

changes in UCP expression. Although their metabolic effects remain to be directly demonstrated, these proteins have been strongly related to the control of redox state, due to the prevention of ROS release promoted by uncoupling (12, 14, 25).

The most accepted hypothesis regarding the function of UCPs as uncouplers is that they are anion carriers, using fatty acids as physiological substrates. UCPs transport fatty acid anions from the mitochondrial matrix into the intermembrane space, where these are readily protonated. The protonated fatty acid then diffuses across the lipid bilayer and is dissociated into the fatty acid anion plus a proton in the matrix, generating fatty acid cycling that promotes proton leakage across the inner mitochondrial membrane (26) (see Scheme 1).

Another protein that can uncouple respiration is the adenine nucleotide translocator (ANT). The mechanism by which this protein decreases the inner membrane potential is similar to UCPs, because it can also translocate fatty acids and promote proton leakage (27-29). The treatment of isolated mitochondria with carboxyatractyloside, an ANT inhibitor, increases the generation of reactive species in state 4 mitochondria (without oxidative phosphorylation) and decreases oxygen consumption in the presence of free fatty acids, suggesting that uncoupling through ANT could be an important step to down-regulate ROS production (30). Furthermore, experiments with Ant1 null mice show that manganese SOD and glutathione peroxidase are augmented in heart and muscle to compensate the increases of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in mitochondria (31).

A third, regulated, mild uncoupling pathway in mitochondria involves potassium cycling. Mitochondrial inner membrane ATP-sensitive potassium channels (mitoK<sub>ATP</sub>) allow for K<sup>+</sup> uptake into the matrix due to the electrochemical gradient, while the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger promotes electroneutral K<sup>+</sup> extrusion at the expense of the proton gradient (see Scheme 1). The activity of mitoK<sub>ATP</sub> thus determines uncoupling, which is mild in most tissues due to limited K<sup>+</sup> transport (32-35). Indeed, we have found that mitoK<sub>ATP</sub> is an important regulator of ROS generation in infarction and ischemic preconditioning, as will be discussed below.

## **Mitochondrial permeability transition: a cell-death inducing consequence of mitochondrial oxidative stress**

Under physiological conditions, mitochondrially-generated ROS are in balance with antioxidant systems. However, when ROS generation increases or ROS removal is impaired, these species can lead to substantial alterations of mitochondrial biomolecules. The mitochondrial inner membrane is a specifically vulnerable target to oxidative damage both because of its role in the generation of respiratory-chain derived ROS and because of the importance in maintaining its impermeability in order to sustain oxidative phosphorylation. Interestingly, the inner mitochondrial membrane is unusual in the sense that it contains more protein than lipids in its composition (9, 36), and, thus, protein oxidative alterations of the inner mitochondrial membrane are an expected result of excessive mitochondrially-generated ROS.

Mitochondrial permeability transition (MPT) is a consequence of inner mitochondrial membrane protein oxidation and excessive  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by this organelle which leads to a non-selective permeabilization of the inner membrane and loss of phosphorylating ability (37-40). The permeabilization promoted by MPT involves alterations in specific membrane proteins, as indicated by the ability to regulate this process. Cyclophilins, for example, are of known importance due to the ability of ligands such as cyclosporin A to inhibit MPT. However, the specific composition for the MPT pore is not conserved and specific. Instead, this process seems to be the result of different subsets of oxidized, missfolded and aggregated membrane proteins, leading to changes in membrane permeability (38, 41). The differing compositions of MPT pores explain changes in conductance and pore sizes in distinct experimental settings and over time (38, 42, 43).

The result of a loss in oxidative phosphorylation capacity in a large subset of mitochondria within a cell is the failure to maintain ATP levels and necrotic cell death. Indeed, myocardial reperfusion, a condition in which mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and excessive ROS formation occur, has been extensively demonstrated to be accompanied by MPT (2, 4, 37, 39). MPT is a causal event in myocardial post-ischemic damage, as indicated by the extensive cardioprotective effects of MPT inhibitors (44, 45).

MPT can also lead to apoptotic cell death, since it promotes the release of mitochondrial pro-apoptotic proteins. Although MPT is not the canonic pathway through which these proteins are released, it is widely believed to participate in "accidental apoptosis", or apoptosis resulting from less extensive damaging stimuli, such as that which is observed in border infarct areas (37, 46). Clearly, for apoptosis to occur as a result of MPT in a subset of mitochondria, sufficient organelles within that cell must be preserved functionally in order to maintain the high energy phosphate levels necessary to organize apoptotic cell death (37, 39).

## **Preconditioning and mitochondrial redox signaling**

Myocardial preconditioning was first described in 1986, when Murray and co-authors noted that small ischemic periods preceding experimental index myocardial infarction significantly improved the outcome of the tissue (47). Later, seminal work by Schumacker's group (6) determined that preconditioning depended on moderate increases in ROS generated by mitochondria during the brief ischemic episodes. These signaling increments in ROS levels protected against oxidative stress observed during reperfusion after the index ischemia (48). Interestingly, ischemic preconditioning is also dependent on the

activation of PKC $\epsilon$  (49-56), which is regulated by ROS (57). This indicates that ischemic preconditioning involves a signaling sequence that includes enhancement of mitochondrial ROS release and PKC $\epsilon$  activation (58), followed by a prevention of mitochondrial ROS release at reperfusion (3, 48) (see Scheme 2).

In parallel, many groups were studying pharmacological mechanisms to protect the ischemic heart, and identified K<sup>+</sup> channel openers as highly efficient cardioprotective drugs (59-62). Initially, the effect was attributed to plasma membrane K<sup>+</sup> channel activation, but the work of Garlid and Grover demonstrated that the main target for these drugs were mitoK<sub>ATP</sub> channels (59). The finding that mitochondrial ROS were involved in the signaling pathway of preconditioning (3, 6), associated with the recognition of the cardioprotective properties of mitoK<sub>ATP</sub> activation, brought a strong focus on this organelle within studies of myocardial preservation. Indeed, the activation of mitoK<sub>ATP</sub>, in a process that involves upstream activation of PKC $\epsilon$ , is widely recognized as a seminal event in ischemic preconditioning today.

However, the relationship between mitochondrial ROS release and mitoK<sub>ATP</sub> activation during ischemic preconditioning remains controversial. Some groups support the concept that mitochondrial ROS production occurs downstream of mitoK<sub>ATP</sub> activation in preconditioning (63, 64), while others, including ourselves, have demonstrated that ROS increments in preconditioning occur upstream of mitoK<sub>ATP</sub> activation, and that the activation of these channels involves redox signaling (3, 51, 65-67). The proposed sequence of events in either case is outlined in Scheme 2.

The idea that mitoK<sub>ATP</sub> activation could lead to increased ROS release by mitochondria was constructed upon the finding that cardioprotection by the mitoK<sub>ATP</sub> agonist diazoxide was reversed by the concomitant presence of antioxidants such as N-acetylcystein and 2-

mercaptoproionyl glycine (64, 68, 69). Unfortunately, these antioxidants, the only ones that to our knowledge were capable of reversing the beneficial effects of diazoxide, are thiol reagents that can interfere directly with the activity of the mitoK<sub>ATP</sub> channel, inhibiting its activation (3, 66, 67, 70). The idea that mitoK<sub>ATP</sub> promoted mitochondrial ROS release was further supported by measurements of mitochondrial ROS using a new alleged mitochondrial ROS probe, MitoTracker, which was more fluorescent upon the addition of diazoxide (64, 71). Regrettably, MitoTracker probes turned out to be an unreliable tool (72, 73), and present no response to additions of respiratory inhibitors or uncouplers, classic regulators of mitochondrial ROS release (9, 10), under the same experimental conditions as those in which the effects of mitoK<sub>ATP</sub> agonists were studied (71). Two groups also reported an increase in the fluorescence of dichlorofluorescein (DCF), a classic, albeit controversial, ROS probe upon treatment with diazoxide in cells (68) and isolated mitochondria (63). Unfortunately the results in cells could not be reproduced in many distinct groups (3, 74, 75), and may be attributable to an artifactual increase in DCF fluorescence promoted by diazoxide (3, 74). In isolated mitochondria, we have been unable to see an increase in DCF fluorescence upon mitoK<sub>ATP</sub> activation and, in fact, see a small decrease (76). Indeed, the results in which increases in DCF fluorescence were measured are questionable since the probe, which is quite sensitive to changes in pH (77) was loaded into the mitochondrial matrix, which may suffer significant pH changes when mitoK<sub>ATP</sub> is activated (78).

Perhaps the most significant problem with the hypothesis that mitoK<sub>ATP</sub> increases ROS release is the complicated sequence of events necessary to explain experimental results related to cardioprotective effects of preconditioning within this standpoint (summarized in Scheme 2, upper sequence): The signaling pathway proposed includes an early increase in ROS and nitric oxide levels within the cardiomyocyte, resulting in increased cGMP levels and PKG activation and translocation to

mitochondria (49). Mitochondrial PKC $\epsilon$  is then activated, and induces the opening of mitoK<sub>ATP</sub> channels. As a result of the alleged increase in ROS resulting from channel activation, a second, functionally distinct pool of PKC $\epsilon$  (dubbed PKC $\epsilon$ 2 by the authors) is activated, and this activation promotes the inhibition of MPT in a manner determined by changes in phosphorylation (79). In addition to the complexity created by this pathway, which requires the existence of two functionally distinct yet structurally indistinguishable PKC $\epsilon$  pools in mitochondria, as well as two distinct ROS-mediated signaling events, several points remain inconsistent: First, no explanation is offered as to why effects downstream of the alleged increase in ROS release promoted by mitoK<sub>ATP</sub> opening, including MPT inhibition, are observed in mitochondria treated with rotenone, which functionally dissociates complex I from coenzyme Q, impeding ROS formation through the mechanism the group has described mitoK<sub>ATP</sub> to act through (79). Second, PKC $\epsilon$ 2 would have to be insensitive or inaccessible to the activator  $\psi\epsilon$ RACK, since the inhibitory effects of this peptide on MPT are fully reversed by mitoK<sub>ATP</sub> antagonists (79). The hypothesis is also inconsistent with careful studies that demonstrate that MPT inhibition in the preconditioned heart is not related to changes in mitochondrial phosphorylation levels, but instead to an improvement in redox state (80). Furthermore, it is widely accepted that MPT is inhibited by thiol reduction, and activated by oxidants (7, 9, 38, 39), the exact opposite of the proposal described above. Finally, independent studies have measured increases in ROS release during preconditioning, and demonstrate that they are not inhibited by mitoK<sub>ATP</sub> antagonists, which are, nonetheless, efficient inhibitors of the beneficial effects of preconditioning (3, 6). This last result clearly demonstrates that ROS release occurs upstream of mitoK<sub>ATP</sub> activation in ischemic preconditioning.

Indeed, many groups have demonstrated that, in addition to being activated by phosphorylation, mitoK<sub>ATP</sub> channels are also

triggered by different kinds of ROS (66, 67, 70, 81) and also by nitric oxide (81, 82). This finding is in line with our idea that mitochondrially-generated ROS occur upstream of mitoK<sub>ATP</sub> activation during preconditioning (3). There are many reasons why preconditioning can increase ROS release by mitochondria, including changes in oxygen tensions, respiratory inhibition, signaling by NO· (which can promote respiratory inhibition, among other effects), depletion of mitochondrial redox sources such as NADPH and increased intracellular Ca<sup>2+</sup> levels (7, 33, 83). A result of enhanced ROS formation in the mitochondrial microenvironment during preconditioning is the activation of mild mitochondrial uncoupling pathways, including mitoK<sub>ATP</sub>, as discussed above. MitoK<sub>ATP</sub> opening has many consequences which decrease the probability of MPT occurrence during reperfusion: We have consistently found, using different techniques, substrates and tissues, that mitoK<sub>ATP</sub> activation prevents mitochondrial ROS formation, a result compatible with its mild uncoupling effects (33, 66, 70, 76). Indeed, other groups have associated opening of mitochondrial K<sup>+</sup> channels with decreases in ROS formation *in vivo* (48, 84). Furthermore, mitoK<sub>ATP</sub> opening during ischemia prevents the loss of intracellular ATP, a MPT inhibitor (40, 65). MitoK<sub>ATP</sub> opening may also prevent mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during ischemia (65, 85), a necessary stimulus for MPT.

In addition to activating mitoK<sub>ATP</sub>, increases in ROS levels and PKCε activation have other important mitochondrial effects which are involved in cardioprotection. A new study suggests PKCε activates mitochondrial aldehyde dehydrogenase, which is important in removing toxic aldehydes which accumulate during ischemia (86). Although the activation of this enzyme is not surprising in a study that induced protection through treatment with ethanol, the authors were able to show that small molecule activators of this enzyme were sufficient to induce cardioprotection, a highly interesting finding, which opens the possibility of a novel mitochondrial cardioprotective target. Other studies

have shown that other mild uncoupling pathways distinct from mitoK<sub>ATP</sub> in mitochondria are activated by ischemic preconditioning, including the adenine nucleotide translocator activity of transporting fatty acids and, possibly, uncoupling proteins (87, 88).

Indeed, many studies demonstrate that promoting mitochondrial uncoupling is in itself cardioprotective. Both treatment with uncouplers and expression of uncoupling proteins have been found to be protective to the ischemic heart and brain (89, 90). Altogether, these studies indicate that decreasing the efficiency of mitochondrial energy metabolism and, hence, the generation of ROS is a highly interesting target for cardioprotective interventions.

## **Postconditioning and mitochondrial redox signaling**

While ischemic preconditioning attracted a lot of attention because a comprehension of the mechanisms underlying this process could uncover interesting cardioprotective targets, a new form of cardioprotection, postconditioning, may present immediate clinical applicability. Postconditioning consists in promoting 2-3 discontinued reperfusion periods after the index ischemic event, and provides significant protection against reperfusion injury. It was first described in 1996 (91), but only gained significant attention in the last few years.

Since this is a relatively new finding, the mechanisms involved are still poorly understood, but there is evidence that many pathways involved in preconditioning also participate in postconditioning. Postconditioning is inhibited by mitoK<sub>ATP</sub> and PKC antagonists, suggesting it involves activation of these proteins (92, 93). The process also prevents mitochondrial oxidative stress associated with reperfusion (5, 94, 95). Furthermore, postconditioning has been suggested to prevent MPT (96-

98), although some experimental approaches used in these studies are questionable, and direct, *in situ* measurements have not yet been conducted (65). One study suggests postconditioning is also dependent on increments in ROS levels based on effects of antioxidants (99). Unfortunately this study used only thiol antioxidants, and the effects can therefore be ascribed to mitoK<sub>ATP</sub> inhibition [and possibly PKC $\epsilon$ , which is also regulated by thiol redox state (100), inhibition]. Indeed, the effects of thiol antioxidants in postconditioning further confirm these compounds have cellular effects unrelated to ROS, since reperfusion is widely associated with largely enhanced ROS release rates, and postconditioning prevents oxidative myocardial damage (94, 95).

Altogether, it is inviting to speculate that postconditioning may reduce oxidative stress at reperfusion due to its intermittent nature and, perhaps, by allowing for the activation of mitochondrial uncoupling pathways. As a result, consequences of mitochondrial oxidative stress such as MPT would decrease in the tissue.

## **Concluding remarks**

A large collection of data shows that oxidative damage during reperfusion is related to changes in mitochondrial ROS release. It is thus not surprising that mitochondrially-generated ROS also are being uncovered as signaling molecules within cardioprotective settings such as ischemic pre- and post-conditioning. Altogether, these data demonstrate that the regulation of mitochondrial redox metabolism is an important target for therapeutic strategies in cardioprotection. Importantly, these data demonstrate that, because ROS can be both protective and damaging molecules, there is no simple one-for-all solution, and antioxidant therapies must be cautiously evaluated.

## References

1. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82:47-95.
2. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc. Res.* 2006; 70:191-199.
3. Facundo HTF, Carreira RS, de Paula JG, Santos CCX, Ferranti R, Laurindo FRM, Kowaltowski AJ. Ischemic preconditioning requires increases in reactive oxygen release independent of mitochondrial K<sup>+</sup> channel activity. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40:469-479.
4. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 2004; 61:372-385.
5. Sun H, Wang N, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao Z. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> overload. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 288:H1900-8.
6. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:18092-18098.
7. da Silva MM, Sartori A, Belisle E, Kowaltowski AJ. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release, and enhances K<sup>+</sup> transport. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 285:H154-62.

8. Brookes PS, Levonen A, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33:755-764.
9. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26:463-471.
10. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol. (Lond.)* 2003; 552:335-344.
11. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 2002; 80:780-787.
12. Brookes PS. Mitochondrial H<sup>+</sup> leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38:12-23.
13. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997; 416:15-18.
14. Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1363:100-124.
15. Caldeira da Silva CC, Cerqueira FM, Barbosa LF, Medeiros MHG, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell* 2008; 7:552-560.
16. Huang SG, Klingenberg M. Chloride channel properties of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria: a patch-clamp study. *Biochemistry* 1996; 35:16806-16814.

17. Jacobsson A, Stadler U, Glotzer MA, Kozak LP. Mitochondrial uncoupling protein from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression. *J. Biol. Chem.* 1985; 260:16250-16254.
18. Klingenberg M. Nucleotide binding to uncoupling protein. Mechanism of control by protonation. *Biochemistry* 1988; 27:781-791.
19. Saito S, Saito CT, Shingai R. Adaptive evolution of the uncoupling protein 1 gene contributed to the acquisition of novel nonshivering thermogenesis in ancestral eutherian mammals. *Gene* 2008; 408:37-44.
20. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 2004; 84:277-359.
21. Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 2000; 345 Pt 2:161-179.
22. Murray AJ, Anderson RE, Watson GC, Radda GK, Clarke K. Uncoupling proteins in human heart. *Lancet* 2004; 364:1786-1788.
23. Bo H, Jiang N, Ma G, Qu J, Zhang G, Cao D, Wen L, Liu S, Ji LL, Zhang Y. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 44:1373-1381.
24. Villarroya F, Iglesias R, Giralt M. PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Res* 2007; 2007:74364.
25. Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Pénicaud L, Casteilla L. A role for uncoupling protein-2 as a

- regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 1997; 11:809-815.
26. Garlid KD, Jabůrek M, Jezek P, Varecha M. How do uncoupling proteins uncouple?. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1459:383-389.
27. Arvier M, Lagoutte L, Johnson G, Dumas J, Sion B, Grizard G, Malthiery Y, Simard G, Ritz P. Adenine nucleotide translocator promotes oxidative phosphorylation and mild uncoupling in mitochondria after dexamethasone treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007; 293:E1320-4.
28. Schönfeld P. Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria?. *FEBS Lett.* 1990; 264:246-248.
29. Tikhonova IM, Andreyev AYu, Antonenko YuN, Kaulen AD, Komrakov AYu, Skulachev VP. Ion permeability induced in artificial membranes by the ATP/ADP antiporter. *FEBS Lett.* 1994; 337:231-234.
30. Shabalina IG, Kramarova TV, Nedergaard J, Cannon B. Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively. *Biochem. J.* 2006; 399:405-414.
31. Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96:4820-4825.
32. Garlid KD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K<sup>+</sup> cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1606:23-41.

33. Facundo HTF, Fornazari M, Kowaltowski AJ. Tissue protection mediated by mitochondrial K<sup>+</sup> channels. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1762:202-212.
34. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 280:H649-57.
35. Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, Paucek P. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:33369-33374.
36. Daum G. Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 822:1-42.
37. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 1999; 341:233-249.
38. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 2001; 495:12-15.
39. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1366:177-196.
40. Zoratti M, Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1241:139-176.
41. Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36:2463-2472.

42. Castilho RF, Kowaltowski AJ, Vercesi AE. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by  $\text{Ca}^{2+}$  plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1996; 28:523-529.
43. Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1366:33-50.
44. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic  $\text{NAD}^+$  and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:2571-2575.
45. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* 1995; 307 ( Pt 1):93-98.
46. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 1994; 94:1621-1628.
47. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124-1136.
48. Vanden Hoek T, Becker LB, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ. Res.* 2000; 86:541-548.

49. Costa ADT, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, Critz SD. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ. Res.* 2005; 97:329-336.
50. Dorn GW2, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, Csukai M, Wu G, Lorenz JN, Mochly-Rosen D. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96:12798-12803.
51. Lebuffe G, Schumacker PT, Shao Z, Anderson T, Iwase H, Vanden Hoek TL. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial  $K_{ATP}$  channel. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 284:H299-308.
52. Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ. Res.* 1995; 76:73-81.
53. Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang XL, Manchikalapudi S, Cao X, Bolli R. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ. Res.* 1997; 81:404-414.
54. Ping P, Takano H, Zhang J, Tang XL, Qiu Y, Li RC, Banerjee S, Dawn B, Balafonova Z, Bolli R. Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning. *Circ. Res.* 1999; 84:587-604.
55. Sato T, O'Rourke B, Marbán E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent  $K^+$  channels by protein kinase C. *Circ. Res.* 1998; 83:110-114.

56. Saurin AT, Pennington DJ, Raat NJH, Latchman DS, Owen MJ, Marber MS. Targeted disruption of the protein kinase C epsilon gene abolishes the infarct size reduction that follows ischaemic preconditioning of isolated buffer-perfused mouse hearts. *Cardiovasc. Res.* 2002; 55:672-680.
57. Klann E, Roberson ED, Knapp LT, Sweatt JD. A role for superoxide in protein kinase C activation and induction of long-term potentiation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:4516-4522.
58. Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C, Violante A, Esposito A, Chiariello M, Ambrosio G. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ. Res.* 1997; 80:743-748.
59. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 1997; 81:1072-1082.
60. Grover GJ. Protective effects of ATP-sensitive potassium-channel openers in experimental myocardial ischemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1994; 24:S18-27.
61. Richer C, Pratz J, Mulder P, Mondot S, Giudicelli JF, Cavero I. Cardiovascular and biological effects of K<sup>+</sup> channel openers, a class of drugs with vasorelaxant and cardioprotective properties. *Life Sci.* 1990; 47:1693-1705.
62. Yao Z, Gross GJ. Effects of the K<sub>ATP</sub> channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation* 1994; 89:1769-1775.

63. Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD. Opening mitoK<sub>ATP</sub> increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291:H2067-74.
64. Carroll R, Gant VA, Yellon DM. Mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel opening protects a human atrial-derived cell line by a mechanism involving free radical generation. *Cardiovasc. Res.* 2001; 51:691-700.
65. Facundo HTF, Kowaltowski AJ. Letter regarding article by Argaud et al, "postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition". *Circulation* 2005; 111:e442; author reply e442.
66. Facundo HTF, de Paula JG, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 42:1039-1048.
67. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ. Res.* 2001; 89:1177-1183.
68. Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ. Res.* 2001; 88:802-809.
69. Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. Opening of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ. Res.* 2000; 87:460-466.

70. Fornazari M, de Paula JG, Castilho RF, Kowaltowski AJ. Redox properties of the adenoside triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channel in brain mitochondria. *J. Neurosci. Res.* 2008; 86:1548-1556.
71. Krenz M, Oldenburg O, Wimpee H, Cohen MV, Garlid KD, Critz SD, Downey JM, Benoit JN. Opening of ATP-sensitive potassium channels causes generation of free radicals in vascular smooth muscle cells. *Basic Res. Cardiol.* 2002; 97:365-373.
72. Scorrano L, Petronilli V, Colonna R, Di Lisa F, Bernardi P. Interactions of chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker Orange) with isolated mitochondria and intact cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999; 893:391-395.
73. Scorrano L, Petronilli V, Colonna R, Di Lisa F, Bernardi P. Chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker Orange) induces the mitochondrial permeability transition and inhibits respiratory complex I. Implications for the mechanism of cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:24657-24663.
74. Dröse S, Brandt U, Hanley PJ. K<sup>+</sup>-independent actions of diazoxide question the role of inner membrane K<sub>ATP</sub> channels in mitochondrial cytoprotective signaling. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:23733-23739.
75. Oldenburg O, Cohen MV, Yellon DM, Downey JM. Mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 2002; 55:429-437.
76. Ferranti R, da Silva MM, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening decreases reactive oxygen species generation. *FEBS Lett.* 2003; 536:51-55.

77. Wrona M, Wardman P. Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 41:657-667.
78. Costa ADT, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jabůrek M, Garlid KD. The direct physiological effects of mitoK<sub>ATP</sub> opening on heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 290:H406-15.
79. Costa ADT, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:20801-20808.
80. Clarke SJ, Khaliulin I, Das M, Parker JE, Heesom KJ, Halestrap AP. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circ. Res.* 2008; 102:1082-1090.
81. Costa ADT, Garlid KD. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoK<sub>ATP</sub>, PKCepsilon, ROS, and MPT. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008; 295:H874-82.
82. Ljubkovic M, Shi Y, Cheng Q, Bosnjak Z, Jiang MT. Cardiac mitochondrial ATP-sensitive potassium channel is activated by nitric oxide in vitro. *FEBS Lett.* 2007; 581:4255-4259.
83. Burwell LS, Nadtochiy SM, Tompkins AJ, Young S, Brookes PS. Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochem. J.* 2006; 394:627-634.
84. Heinen A, Aldakkak M, Stowe DF, Rhodes SS, Riess ML, Varadarajan SG, Camara AKS. Reverse electron flow-induced ROS production is

- attenuated by activation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$  channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293:H1400-7.
85. Wang Y, Ashraf M. Role of protein kinase C in mitochondrial  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel-mediated protection against  $\text{Ca}^{2+}$  overload injury in rat myocardium. *Circ. Res.* 1999; 84:1156-1165.
86. Chen C, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 2008; 321:1493-1495.
87. Carreira RS, Miyamoto S, Di Mascio P, Gonçalves LM, Monteiro P, Providência LA, Kowaltowski AJ. Ischemic preconditioning enhances fatty acid-dependent mitochondrial uncoupling. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007; 39:313-320.
88. Nadtochiy SM, Tompkins AJ, Brookes PS. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection. *Biochem. J.* 2006; 395:611-618.
89. Korde AS, Pettigrew LC, Craddock SD, Maragos WF. The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 2005; 94:1676-1684.
90. Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, Warden CH, Castilho RF, Melcher T, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K, Wieloch T. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat. Med.* 2003; 9:1062-1068.

91. Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, Hong SK. Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. *Am. Heart J.* 1996; 132:78-83.
92. Philipp S, Yang X, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc. Res.* 2006; 70:308-314.
93. Yang X, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 44:1103-1110.
94. Kin H, Zhao Z, Sun H, Wang N, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 2004; 62:74-85.
95. Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, D'Agostino D, Rollo T, Prigigallo F, Altomare E, Fiore T, Vendemiale G. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion. *FASEB J.* 2005; 19:354-361.
96. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005; 111:194-197.
97. Bopassa JC, Vandroux D, Ovize M, Ferrera R. Controlled reperfusion after hypothermic heart preservation inhibits mitochondrial

permeability transition-pore opening and enhances functional recovery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291:H2265-71.

98. Cohen MV, Yang X, Downey JM. Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic Res. Cardiol.* 2008; 103:464-471.
99. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel and protein kinase C activation. *Basic Res. Cardiol.* 2006; 101:180-189.
100. Chu F, Ward NE, O'Brian CA. PKC isozyme S-cysteinylation by cystine stimulates the pro-apoptotic isozyme PKC delta and inactivates the oncogenic isozyme PKC epsilon. *Carcinogenesis* 2003; 24:317-325.

## Legends

**Scheme 1: Mild uncoupling pathways in mitochondria.** Uncoupling proteins (UCP) and the adenine nucleotide translocator (ANT) transport fatty acid anions from the mitochondrial matrix into the intermembrane space, where the proton gradient stimulates fatty acid protonation. The protonated fatty acid flip-flops through the lipid bilayer, releasing H<sup>+</sup> in the matrix. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels (mitoK<sub>ATP</sub>) transport K<sup>+</sup> into the matrix, which is exchanged for H<sup>+</sup> by the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger.

**Scheme 2: Two proposals for the sequence of events relating PKC $\epsilon$ , mitoK<sub>ATP</sub>, ROS and ischemic cardioprotection:** The upper sequence of events indicates the signaling pathway proposed by Garlid and co-workers, in which ROS release increases upon activation of mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels (mitoK<sub>ATP</sub>) channels, and two distinct mitochondrial PKC $\epsilon$  pools are present. The lower sequence of events depicts the pathway proposed by our group, in which mitoK<sub>ATP</sub> activation prevents mitochondrial ROS release. PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate (a PKC $\epsilon$  activator); DZX, diazoxide (a mitoK<sub>ATP</sub> agonist); 5-HD, 5-hydroxydecanoate; Gly, glyburide/glibenclamide; ROS, reactive oxygen species, NAC, N-acetylcystein; MPG, 2-mercapto-propionyl-glycine; UCP, uncoupling protein; MPT, mitochondrial permeability transition; CsA, cyclosporin A (a MPT inhibitor).

# 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](#)