UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ARIEL RODRIGUES CARDOSO

Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) Mitocondriais: Papel das Acil-CoA Desidrogenases de Cadeia Muito Longa

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
23/05/2014

ARIEL RODRIGUES CARDOSO

Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) Mitocondriais: Papel das Acil-CoA Desidrogenases de Cadeia Muito Longa

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski

São Paulo
2014

Ariel Rodrigues Cardoso

Geração de Espécies Reativas de Oxigênio Mitocondriais: Papel das Acil-CoA Desidrogenases de Cadeia Muito Longa

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico esta tese à minha mãe,
Monica Ciari, Lara Ciari e
ao meu amor Fabiana Esquivel

AGRADECIMENTOS

A oportunidade de realizar um trabalho de pesquisa científica constitui uma experiência enriquecedora em quase todos os sentidos. Do meu ponto de vista, a parte mais aprazível talvez seja as interações com os colegas de laboratório. Isto porque dividimos todos os dias um espaço físico, por vezes reduzido, sendo possível neste ambiente coexistir, ou muitas vezes colidir, as mais diversas culturas, hábitos, comportamentos e atitutes. Destes encontros extraímos de nós uma melhor compreensão do mundo e nos melhoramos. Como diria Antonio Gramsci “Todos os homens do mundo na medida em que se unem entre si em sociedade, trabalham, lutam e melhoram a si mesmos”. Gramsci não cita as mulheres em sua frase, mas elas obviamente também fazem parte deste processo enriquecedor de organização social e aprendizado. Não fosse o trabalho em equipe, ou as relações humanas em geral, dificilmente seria factível a concretização da Ciência ou a construção do conhecimento advindo da pesquisa experimental. Após este pequeno preâmbulo inicio os agradecimentos desta tese:

Como não poderia ser ausente em nenhuma hipótese, agradeço a minha orientadora Alicia Juliana Kowaltowski, principalmente pela paciência e tolerância frente às nossas diferenças culturais e comportamentais. Não agradeço apenas pela paciência no trato, mas também pela oportunidade de trabalhar em um ambiente tão profícuo e agradável. Reservo este espaço para parabenizar a Alicia por visar sempre o bem de seus discípulos, encaminhando-os para os melhores destinos, levando-se em conta as idiossincrasias de cada aluno, funcionário ou post-doc com quem ela já trabalhou.

Agradeço aos docentes que ajudaram a elaborar hipóteses, discutir aspectos teóricos, pensar e/ou planejar experimentos durante este doutorado. São eles: Anibal Vercesi, Helena de Oliveira, Luciane Alberici, Nadja Souza Pinto, Ohara Augusto, Etelvino Bechara, Marisa Medeiros, Paulo Di Mascio, Bayardo Baptista, Fábio Forti, Shaker Chuck Farah, Pio Colepicolo, Francisco Laurindo, Júlio Ferreira, Marcus Oliveira, Rafael Radi, John J. Lemasters, Hernan Chaimovich, Sayuri Miyamoto, entre outros que eu possa ter esquecido.

Da mesma maneira, como não lembrar da funcionária Camille Caldeira? Camille é uma trabalhadora modelo do Instituto de Química, ela se divide em multi-tarefas para realizar funções que vão além de seu cargo. Que fique claro que a Camille salvou inúmeros alunos, funcionários e professores dos mais variados problemas, sempre reagindo com prontidão e bom humor às demandas de todo o sofredor ou pessoa em

apuros deste mundo, mais especificamente os que tem relação com o Instituto de Química da USP. Uma das múltiplas tarefas da Camille foi nos apoiar com trabalhos experimentais, participando de vários trabalhos científicos, inclusive como autora. É com enorme gratidão que deixo os meus agradecimentos por ter lhe conhecido neste período difícil da vida.

Na mesma linha segue o meu carinho e cordialidade pelos funcionários Edson Gomes e Dóris Dias Araújo que participaram avidamente na organização e limpeza do laboratório. Estes dois amigos, além de apresentarem enorme prontidão e virtude no tratamento com os colegas e alunos da USP, são pessoas de extrema vitalidade e bom humor o que torna nossos dias muito mais felizes.

Muitíssimo obrigado aos funcionários do biotério do IQ/Farmácia USP pelos bons serviços e abnegação. O trabalho com a experimentação animal é extremamente árduo e o convívio com as questões éticas é muito difícil. No entanto, o bom treinamento de todos do biotério possibilita a suplantação das dificuldades do cotidiano. Parabéns pelos serviços prestados.

Com relação ao trabalho no laboratório, a figura dos post-docs é de enorme valia, porque estas pessoas já passaram por inúmeros problemas e são muito boas para resolvê-los. Nosso laboratório contou com vários post-docs de grande importância para mim. São eles: Douglas Cancherini, Fernanda Cunha, Luis Alberto Luévano e Maria Fernanda Forni. Obrigado pela ajuda e amizade.

Agradeço enormemente aos doutores Erich B. Tahara, Fernanda Cerqueira, Heberty Facundo e Gracielle de Oliveira pelos calorosos e enriquecedores debates nos seminários de laboratório. As discussões sobre trabalhos científicos possibilitaram exercer o espírito crítico e trazer à tona questões práticas e resolução de problemas.

Agradeço aos atuais companheiros ou companheiros já formados da pós-graduação do IQ-USP por contribuirem com sugestões, ideias, discussões e/ou conselhos sobre as mais diversas etapas do desenvolvimento do trabalho, são eles: Bruno Queliconi, Mateus Mori, Carol Romagna, Felipe Godoy, Paulo Tonolli, Gustavo Carvalho, Phillipe Pessoa, Carolina Parga, Valquíria Santos, Luiza Marques, Eliézer Stefanello, Rafael Queiroz, Verônica Paviani, Douglas Ganini, Rita Tokikawa, Crislaine da Silva, Camila Mano, Tiago Jonas, Adriano Sartori e Arthur Nery. Provavelmente não citei muitos de vocês aqui, não cabia neste espaço reduzido. Sintetizando, gostaria de agradecer a todos os alunos e ex alunos da pós-graduação do IQ-USP.

Como não falar dos ex alunos ou alunos de iniciação científica que ajudaram a executar trabalhos e trazer questões à tona? São eles: Fabiana Esquivel, Thire Marazzi,

João Victor Cabral Costa, Pâmela Kakimoto, Felipe Navarete, entre outros. Deixo minhas palavras de afeto e mais alto prestígio para estes jovens que ajudam a trazer vida ao ambiente de trabalho, muito obrigado.

Agradeço também a todos os funcionários do IQ-USP pelos serviços prestados à sociedade. Em especial aos membros do setor de pós-graduação: Cibele Carlos, Milton Oliveira, Emiliano Gonçalves, Paulo Pacheco e Marcelo Costa.

Finalmente, gostaria de agradecer às agências financiadoras que propiciam a execução dos projetos por meio da liberação de recursos e outorgas de auxílios para desenvolvimento de projetos. Sem o suporte financeiro governamental não seria possível executar projetos de ciência básica. À FAPESP, CAPES e CNPq, muitíssimo obrigado.

“Privatizaram sua vida, seu trabalho, sua hora de amar e seu direito de pensar. É da empresa privada o seu passo em frente, seu pão e seu salário. E agora não contente querem privatizar o conhecimento, a sabedoria, o pensamento, que só à humanidade pertence.”

Bertolt Brecht

RESUMO

Cardoso, A.R. **Geração de Espécies Reativas de Oxigênio Mitocondriais (ERO): Papel das Acil-CoA Desidrogenases de Cadeia Muito Longa**. 2014. Número de páginas do trabalho (56 p.). Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Dietas hiperlipídicas e a esteatose hepática são condições extremamente prevalentes. Trabalhos anteriores mostraram que a esteatose está associada a um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), e que isso pode mediar danos no fígado. Neste trabalho nós investigamos os possíveis mecanismos que desencadeiam os aumentos nas taxas de geração de ERO por meio da administração de dietas hiperlipídicas. Nós descobrimos que mitocôndrias de animais sujeitos a dietas hiperlipídicas não apresentaram diferenças significativas quanto a capacidade respiratória máxima e acoplamento, mas eram capazes de gerar mais ERO especificamente quando usados substratos do metabolismo de ácidos graxos. Além disso, foi observado que muitas isoformas de acil-CoA desidrogenases estavam mais expressas nos fígados de animais alimentados pela dieta hiperlipídica. No entanto, quando realizados ensaios de atividade enzimática apenas a acil CoA desidrogenase de cadeia longa (VLCAD) foi mais ativa. Estudos conduzidos com mitocôndrias permeabilizadas e expostas a grupos acil-CoA de diferentes tamanhos sugerem que a VLCAD pode ser uma fonte da produção aumentada de ERO em animais submetidos a dietas hiperlipídicas. Esta produção foi estimulada pela ausência de NAD^+. Concluindo, nossos estudos descobriram uma nova fonte importante na geração de ERO estimulada por dietas hiperlipídicas, a VLCAD.

Palavras-chave: mitocôndria, dietas hiperlipídicas, acil-CoA desidrogenases, espécies reativas de oxigênio (ERO)

ABSTRACT

Cardoso, A.R. **Generation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): Role of Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenases.** 2014. Number of pages (56 p.). PhD Thesis - Graduate Program Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

High fat diets and accompanying hepatic steatosis are highly prevalent conditions. Previous work has shown that steatosis occurs concomitantly with enhanced reactive oxygen species (ROS) generation, which may mediate further liver damage. Here we investigated mechanisms leading to enhanced ROS generation following high fat diets (HFD). We found that mitochondria from HFD livers present no differences in maximal respiratory rates and coupling, but generate more ROS specifically when fatty acids are used as substrates. Indeed, many acyl-CoA dehydrogenase isoforms were found to be more highly expressed in HFD livers, although only the very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) was more functionally active. Studies conducted with permeabilized mitochondria and different chain length acyl-CoA derivatives suggest that VLCAD is a source of enhanced ROS production in mitochondria from HFD animals. This production is stimulated by the lack of NAD^+. Overall, our studies uncover VLCAD as a novel, diet-sensitive, source of mitochondrial ROS.

Keywords: mitochondria, high fat diet, acyl-CoA dehydrogenases, reactive oxygen species

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACADs: acil CoA desidrogenases

ADP: adenosina difosfato

ASH: esteato hepatite alcoólica

ATP: adenosina trifosfato

B-CoA: butiril coenzima A

CoA: coenzima A

ERO: espécies reativas de oxigênio

ETC: cadeia de transporte de elétrons

ETF: flavoproteína transferidora de elétrons

ETFDH ou ETFCoQ: flavoproteína transferidora de elétrons-ubiquinona oxidoredutase

HFD: dieta hiperlipídica

LCAD: acil-CoA desidrogenase de cadeia longa

MCAD: acil-CoA desidrogenase de cadeia média

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reduzida

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

NASH: esteato hepatite não alcoólica

NAFLD: doença de fígado gorduroso não alcoólica

O-CoA: octanoil coenzima A

P-CoA: palmitoil coenzima A

SCAD: acil coenzima A desidrogenase de cadeia curta

VLCAD: acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....1
1.1 Esteatose hepática.....1
1.2 Cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa.....2
1.3 Geração de ERO mitocondriais.....3
1.4 Metabolismo de lipídeos no hepatócito.....3
1.5 Acil-CoA desidrogenases.....6

2. OBJETIVOS 10

3. MATERIAL E MÉTODOS 13

3.1 Animais e dietas.....11
3.2 Histologia.....11
3.3 Isolamento de mitocôndrias.....11
3.4 Quantificação de proteínas.....12
3.5 Medidas da geração de H_2O_2.....12
3.6 Quantificação de proteínas carboniladas.....13
3.7 Atividade de aconitase.....13
3.8 Medidas de consumo de O_2 e atividade de catalase.....13
3.9 Medidas de potencial de membrana mitocondrial.....13
3.10 Western blotting.....14
3.11 Medidas de NAD(P)H.....14
3.12 Estatísticas e análise dados.....14

4. RESULTADOS 15

4.1 Histologia.....15
4.2 Marcadores redox e geração de H_2O_2 não mitocondrial.....16
4.3 Geração de peróxido de hidrogênio em frações mitocondriais.....17
4.4 Impactos bioenergéticos.....19
4.5 Expressão e atividade de enzimas da β-oxidação.....21
4.6 Balanço de NAD^+/ NADH e efeitos na geração de H_2O_2.....24
4.7 Geração de H_2O_2 em mitocôndrias permeabilizadas.....25

5. DISCUSSÂO.....27

6. CONCLUSÕES 32

7. REFERÊNCIAS.....33

ANEXOS.....43

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Esteatose hepática:*

A obesidade teve um crescimento proeminente, durante as últimas décadas, em vários países do mundo. O aumento da massa corpórea está frequentemente associado a uma condição patológica denominada esteatose hepática ou fígado gorduroso. Esta doença se caracteriza pelo acúmulo de triacilgliceróis nos hepatócitos que ocorre porque existe um desbalanço entre os processos de síntese/oxidação e absorção/exportação de lipídeos (Ludwig *et al.*, 1980; Begriche *et al.,* 2006). Apesar de benigna, a esteatose hepática está associada a outras consequências metabólicas adversas, tais como: resistência à insulina e dislipidemias. Dentre os fatores que podem causar o acúmulo de gordura nos hepatócitos estão: obesidade, resistência à insulina e consumo de álcool. Por uma convenção médica costuma-se usar o termo doença de fígado gorduroso não relacionada ao consumo de álcool (NAFLD), esteato-hepatite não alcoólica (NASH) ou esteato-hepatite alcoólica (ASH) (Cohen *et al.*, 2011). Na população em geral os casos mais comuns são de NAFLD, mas em alguns casos a doença pode agravar para um quadro inflamatório mais severo de NASH. O quadro inflamatório persistente pode agravar ainda mais a doença, causando fibrose, cirrose ou até hepatocarcinoma (Cohen *et al.*, 2011).

Apesar de não haver um consenso pleno na literatura acerca dos mecanismos bioquímicos que desencadeariam a transição do estado benigno da esteatose para o quadro inflamatório, a teoria mais bem aceita até o momento é a de *two hit* (Day e James, 1998). O primeiro *hit,* ou fenômeno, é consensualmente definido pelo acúmulo de triacilgliceróis no hepatócito, independente de sua causa. O segundo processo que levaria ao quadro mais severo de NASH é um mais controverso. A hipótese mais bem aceita até o momento para a explicar o segundo *hit* é o desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes. Este quadro poderia promover lesões ao DNA, a lipoperoxidação e morte celular (Begriche *et al.,* 2006; Cohen *et al.*, 2011; Rolo *et al.*, 2012), o que agrava a doença. A geração de ERO mitocondriais seria um dos primeiros eventos que desencadeariam este segundo *hit*, sendo um fenômeno central neste modelo hipotético (Rolo *et al.*, 2012).

1.2 Cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa

Os substratos são oxidados por vias metabólicas específicas e os elétrons provenientes dos diferentes metabólitos 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 aceptor final de elétrons (O_2). Tais carreadores constituem a cadeia de transporte de elétrons (ETC) que é uma série de complexos protéicos que contém afinidades progressivas por elétrons (rever em McGarry e Foster, 1980; McGarry e Foster, 1981; Pessayre e Fromenty, 2005; Begriche *et al.*, 2006). 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 CoQ através da atividade da glicerol 3 fostato desidrogenase. Uma quarta via de transferência de elétrons para a CoQ ocorre pela transferência de elétrons provenientes da β-oxidação; as atividades das acil-CoA desidrogenases (ACADs), *electron-transferring flavoprotein* (ETF) e da (ETF)-ubiquinona oxidoredutase (ETFDH) transferem 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. Finalmente, o citocromo c reduz o complexo IV que irá transferir elétrons para o oxigênio, 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. A cadeia de transporte de elétrons pode ser inibida por drogas como rotenona (complexo I), antimicina A e mixotiazol (complexo III; Begriche *et al.*, 2006; Tahara *et al.*, 2009; Kowaltowski *et al.*, 2009).

A fosforilação oxidativa está acoplada à ETC e ocorre através da ATP sintase (Karrasch e Walker, 1999). Esta enzima utiliza a energia próton-motriz, gerada pelo bombeamento de prótons pela ETC, para fosforilar ADP e produzir ATP. A regulação da ETC e da fosforilação oxidativa ocorre por meio das concentrações de ADP, ATP, P_i, NAD^+, NADH, O_2 e da regulação do potencial de membrana mitocondrial (Mitchell, 1961). O complexo IV pode ser inibido por óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) (Xu *et al.*, 2005). Além disso, a inibição alostérica do complexo IV por ATP pode ser alterada de uma maneira dependente de fosforilação (Bender e Kadenbach 2000; Ludwig *et al.*, 2001).

1.3 Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) mitocondriais

A principal fonte de ERO gerada nas mitocôndrias é o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), um subproduto da respiração (Boveris e Chance, 1973; Fridovich, 1978; Li *et* al., 1995; Turrens, 2003; Tahara *et al.*, 2009; Kowaltowski *et al.*, 2009). As superóxidos dismutases podem dismutar este radical a H_2O_2 (Boveris e Chance, 1973; Loschen et al., 1974; Fridovich, 1978; Li *et* al., 1995) que é uma molécula mais difusível e estável, e portanto pode ser detectada mais facilmente e atingir alvos celulares mais distantes (Turrens, 2003; Tahara *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2012).

A formação de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial é usualmente atribuída ao vazamento de elétrons pelos complexos I e III da cadeia respiratória (Liu, 1999; Turrens, 2003; Kowaltowski *et al.*, 2009). No entanto, é importante lembrar que mitocôndrias são extremamente ricas em reações redox e, portanto, apresentam muitas fontes em potencial de $O_2^{\cdot -}$ e outras espécies reativas. Com relação a isso, as flavoproteínas tem sido cada vez mais reconhecidas como fontes de oxidantes mitocondriais (Kowaltowski *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2012; Andreyev *et al.*, 2005; Starkov *et al.*, 2004; Tretter e Adam-Vizi, 2004; Adam-Vizi, 2005; Tahara *et al.*, 2007; Quinlan *et al.*, 2013). Um exemplo muito bem conhecido é o caso da dihidrolipoamida desidrogenase (ou dihidrolipoil desidrogenase), uma subunidade da piruvato e α-cetoglurato desidrogenase, que pode produzir quantidades significativas de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial (Starkov *et al.*, 2004; Tretter e Adam-Vizi, 2004; Adam-Vizi, 2005; Tahara *et al.*, 2007; Tretter *et al.*, 2007). Glicerol fosfato desidrogenase é também uma fonte de oxidantes bem estabelecida (Adam-Vizi, 2005). No entanto, outras fontes de ERO são ainda pouco exploradas, incluindo as acil-CoA desidrogenases, *electron transfer flavoproteins* (ETF) e *electron transfer flavoproteins Q oxidoreductases* (ETFDH) (Tahara *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2012; St-Pierre *et al.*, 2002; Brand, 2010). Todas estas fontes estão envolvidas no metabolismo de lipídeos e portanto são potencialmente fontes relevantes em condições patológicas, sobretudo na esteatose.

1.4 Regulação do metabolismo de lipídeos no hepatócito

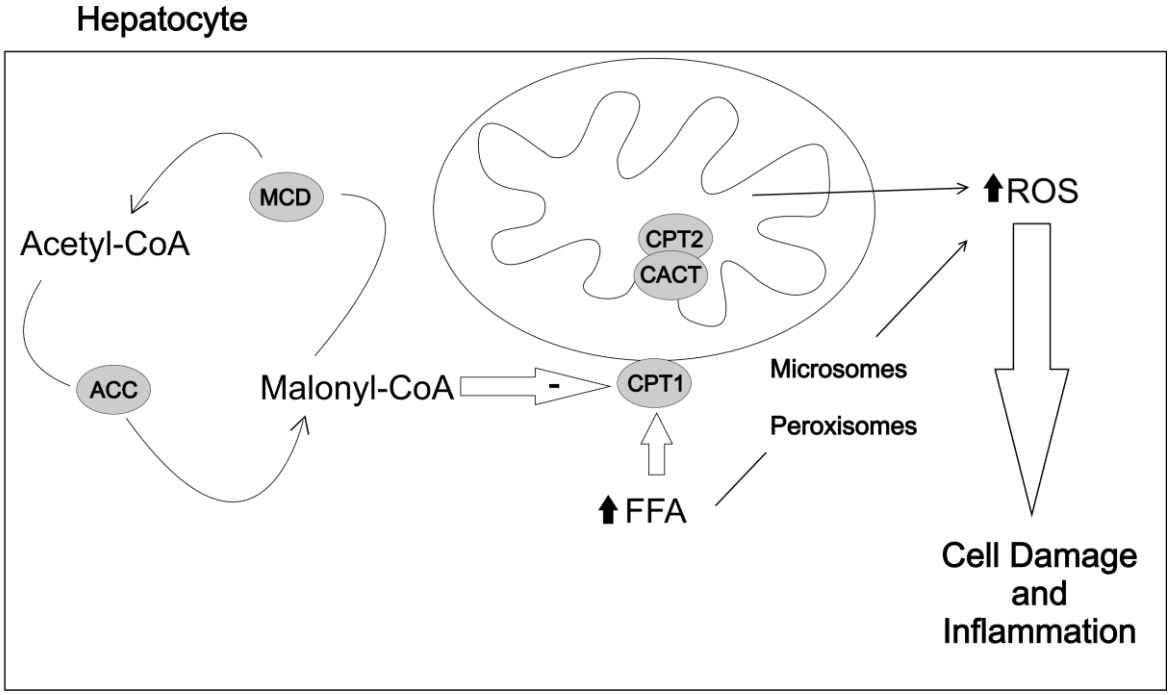
Os lipídeos podem acumular nos hepatócitos através da captação de quilomícrons provenientes do intestino, absorção de ácidos graxos advindos dos adipócitos ou síntese citossólica (Pessayre *et al.*, 2004). Em contrapartida, os ácidos graxos são consumidos

através da oxidação nas mitocôndrias e peroxissomos ou secreção, via VLDLs, no plasma (Begriche *et al.,* 2006). A secreção de lipídeos por meio de VLDLs é realizada pela ligação de ésteres de colesterol, triacilgliceróis e fosfolipídeos a lipoproteína (apoB) (Chao *et al.*, 1986; Heid *et al.,* 1998). Esta transferência de lipídeos para apoB ocorre no retículo endoplasmático através de proteínas como proteína transferidora de lipídeos microssomal (MTP), que transfere triacilgliceróis para a lipoproteína (Tran *et al.*, 2002). Se a captação ou síntese de ácidos graxos torna-se excedida em relação à secreção ou oxidação de lipídeos, existe acúmulo de triacilgliceróis em gotículas configurando a esteatose (Begriche *et al.,* 2006; Pessayre *et al.*, 2002; Pessayre *et al.*, 2004; Mantena *et al.*, 2009).

Para que os ácidos graxos de cadeia longa sejam oxidados pela maquinaria mitocondrial é preciso que eles sejam ativados na forma de ésteres de coenzima A (CoA). O transporte destes grupos acil-CoA se dá através da proteína carnitina acil-transferase I (CPT-I) (Cook e Gamble, 1987; Rolo *et al.*, 2012). A atividade desta proteína é regulada por malonil-CoA, seu inibidor. Este substrato aumenta com a atividade da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), que é um dos primeiros sítios da síntese de lipídeos (Fromenty e Pessayre, 1995; McGarry e Foster, 1980; McGarry e Foster, 1981). Desta maneira, quando existe síntese de ácidos graxos no citosol, sua oxidação nas mitocôndrias está impedida por meio da inibição do transporte dos ácidos graxos para a matriz (Esquema 1). Portanto, o que determina o destino de ácidos graxos no hepatócito é o estado metabólico da célula (Begriche *et al.*, 2006; Fromenty e Pessayre, 1995).

Na fase pós-prandial os estímulos da glicose e insulina favorecem a síntese de lipídeos no fígado. Isto ocorre porque existe estímulo da glicólise e do ciclo do ácido cítrico, fornecendo NADH e $FADH_2$ para a cadeia de transporte de elétrons (Fromenty e Pessayre 1995; Begriche *et al.* 2006; McGarry e Foster 1980; Pessayre *et al.*, 2004; Ramesh e Sanyal 2005). Quando o aporte de coenzimas reduzidas excede a capacidade de oxidação da cadeia de transporte de elétrons, a atividade da isocitrato desidrogenase e da citrato desidrogenase estão inibidas por acúmulo de NADH. Como conseqüência, há aumento da concentração de citrato na matriz mitocondrial. Assim, o citrato pode ser transportado para o citosol pelo carreador de tricarboxilatos. No citosol, o citrato causa geração de acetil-CoA, através da atividade da enzima citrato liase, inibição da glicólise e estímulo da ACC (Quistorff *et al.*, 1992). Em seguida, o malonil-CoA gerado pela atividade da ACC é utilizado pela enzima ácido graxo sintase (FAS) para gerar palmitoil-CoA. Os ácidos graxos gerados por esta via podem ser esterificados ao glicerol, produzindo

triacilglicerol, que pode ser adicionado às VLDLs (Begriche *et al.,* 2006; Fromenty e Pessayre, 1995). Em conjunto, a regulação da síntese de enzimas chave das vias sintéticas, glicoquinase, piruvato quinase, ACC e FAS, ocorre pela atividade de dois fatores de transcrição principais, ChREBP e SREBP-1c, que correspondem a proteínas que são ativadas por carboidratos e esteróides, respectivamente (Dentin *et al.*, 2004; Iizuka *et al.,* 2004). Desta forma, se a concentração de substratos precursores aumenta, existe estímulo da rota de síntese.



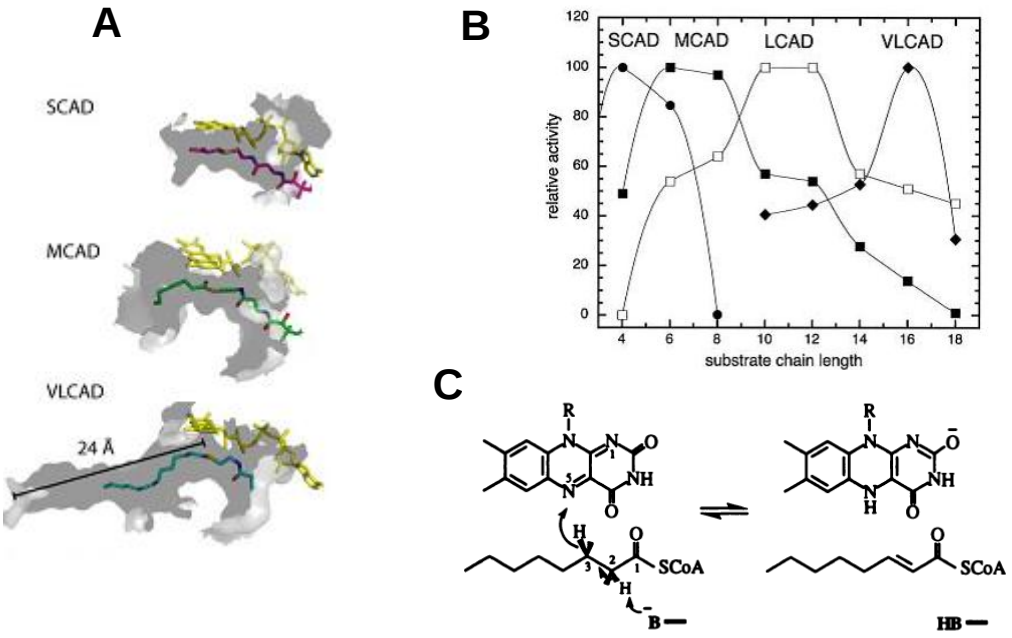
Esquema 1: Metabolismo de lipídeos no hepatócito na fase pós prandial. O transporte de ácidos graxos (FFA) ocorre por meio da carnitina acil-transferase I (CPTI). A inibição desta enzima ocorre por malonil-CoA, que é aumentado pela atividade de acetil-CoA carboxilase (ACC). As espécies reativas de oxigênio (ROS) oriundas das mitocôndrias ou de microssomos e peroxissomos podem levar a danos celulares e/ou causar inflamação. Malonil-CoA desidrogenase (MCD), carnitina acil-carnitina translocase (CACT), carnitina acil-transferase (CPT2).

Por outro lado, durante o jejum, baixos níveis de insulina induzem a liberação de ácidos graxos pelos adipócitos. Em seguida, os lipídeos são oxidados na matriz mitocondrial dos hepatócitos, gerando acetil-CoA. A concentração aumentada de acetil-CoA possibilita a formação de acetoacetato e β-hidroxibutirato (corpos cetônicos) (Fromenty e Pessayre 1995; McGarry e Foster 1980). Estes são liberados pelo fígado no plasma para serem oxidados por outros órgãos. A oxidação de ácidos graxos é possível no jejum porque a concentração de malonil-CoA está baixa e o transporte de ácidos

graxos para a mitocôndria não está inibido (rever Begriche *et al.*, 2006). De modo semelhante à fase pós-prandial, a regulação da síntese de enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos (como CPT-1, acil-CoA desidrogenase de cadeia média e HMG-CoA sintase) ocorre pela atividade de um fator de transcrição responsivo à concentração de substrato PPAR-α (Kersten *et al*., 1999; Schoonjans *et al.*, 1996). Quando as concentrações de ácidos graxos estão altas existe estímulo de vias degradativas. Além do efeito do PPAR-α, o glucagon apresenta um efeito sinérgico sobre a oxidação de ácidos graxos por meio da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A PKA fosforila PPAR-α aumentando a estabilidade da ligação deste ao DNA. Somado a isso, o AMPc pode ativar um fator de transcrição (CREB), que aumenta a expressão de CPT-1 em conjunto com outro fator de transcrição nuclear, HNF4α, e também o coativador de PPAR-γ (PGC-1) (Lazennec *et al.*, 2000; Louet *et al.*, 2002). Outro sítio de regulação importante do metabolismo de lipídeos no jejum é a ativação da quinase dependente de AMP (AMPK). Sua atividade inativa a enzima ACC, diminuindo a concentração de malonil-CoA, o que favorece o transporte de ácidos graxos para a matriz mitocondrial. A AMPK pode ainda diminuir a atividade dos fatores de transcrição envolvidos na lipogênese: ChREBP e SREBP-1c (Foretz *et al.*, 1998; You *et al.*, 2004).

1.5 Acil-CoA desidrogenases

VLCADs fazem parte da família das acil-CoA desidrogenases (ACADs) e catalisam a insaturação α-β dos grupos acil-CoA (Ghisla *et al.*, 2004). Este é o passo limitante da β-oxidação que conta com 5 tipos de acil-CoA desidrogenases: *short chain acyl-CoA dehydrogenase* (SCAD), *medium chain acyl-CoA dehydrogenase* (MCAD), *long chain acyl-CoA dehydrogenase* (LCAD), *very long chain acyl-CoA dehydrogenase 1* e *2* (VLCADs). Estas enzimas se diferenciam pelo tamanho do seu sítio ativo e por uma eficiência catalítica dependente do tamanho da cadeia carbônica do substrato (Esquema 2A,B). Desta maneira, dependendo do grupo acil-CoA é possível prever qual delas é capaz de oxidá-lo com maior eficiência, isto se deve ao tamanho do bolsão do sítio ativo da enzima. Enquanto as VLCADs são homodímeros de 73 kDa, as outras enzimas das ACADs são homotetrâmeros de 43 kDa (Esquema 3) (Wu, 1990; Kim *et al.*, 1993; Aoyama *et al.*, 1995; Kim e Battaile *et al.*, 2002; Kim e Miura, 2004). Todas apresentam um grupo prostético FAD por subunidade.

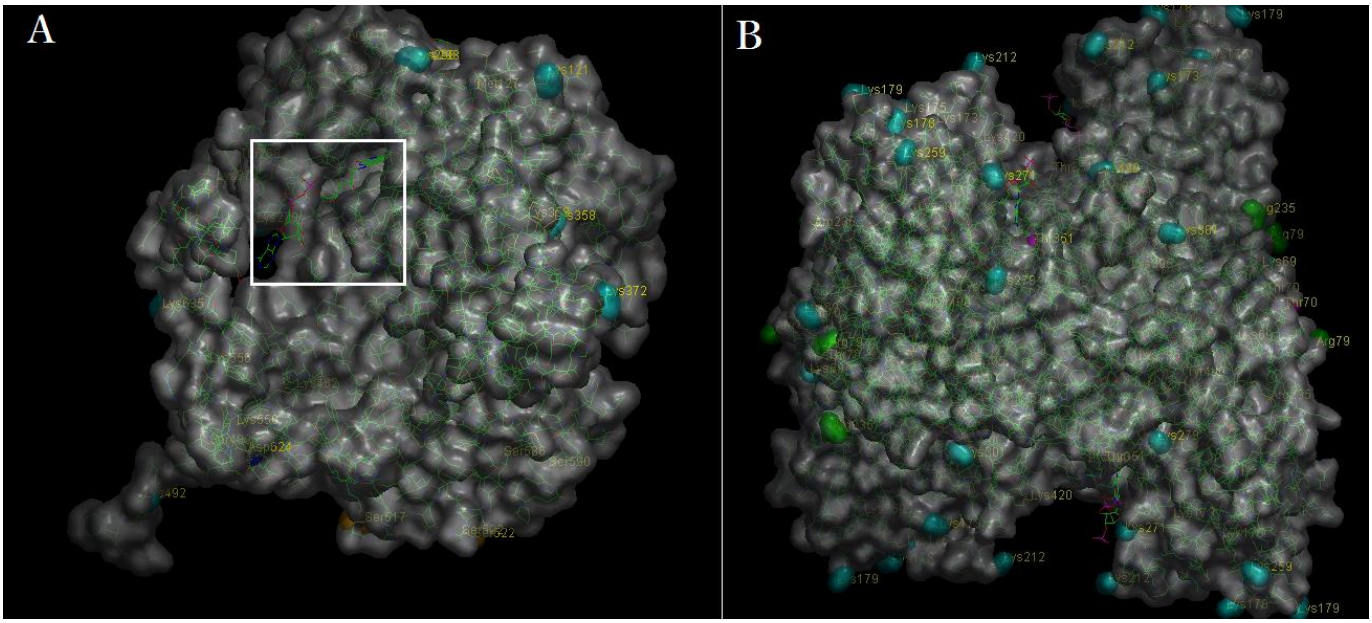


Esquema 2: Estrutura do sítio ativo de acil-CoAs desidrogenases, seu mecanismo de atividade e limitação pelo tamanho. (A) Comparação do tamanho dos sítios ativos das ACADs; em amarelo o grupo FAD. (B) Eficiência catalítica pelo substrato, SCADs oxidam principalmente butiril-CoA, MCAD octanoil-CoA, LCAD decanoil-CoA e dodecanoil-CoA e VLCAD palmitoil-CoA. (C) O mecanismo de transferência de elétrons depende de uma carboxila desprotonada B^- de um resíduo de glutamato conservado nas ACADs. Figura adaptada de McAndrew et al. (2008) e Ghisla *et al*. (2004).

Com relação ao mecanismo, as ACADs transferem os elétrons do substrato para seus grupos FAD oxidados. Não se sabe ao certo se os elétrons são transferidos como hidretos ou se existe a presença de intermediários radicalares (Esquema 2C). No entanto, sabe-se que as ACADs transferem seus elétrons para a ETF, e esta última transfere seus elétrons para a ETF:CoQ reductase. Finalmente, a ETF:CoQ reductase pode transferir os elétrons para a coenzima Q e assim os elétrons podem seguir pela ETC (Thorpe e Kim, 1995; Ghisla *et al.*, 2004).

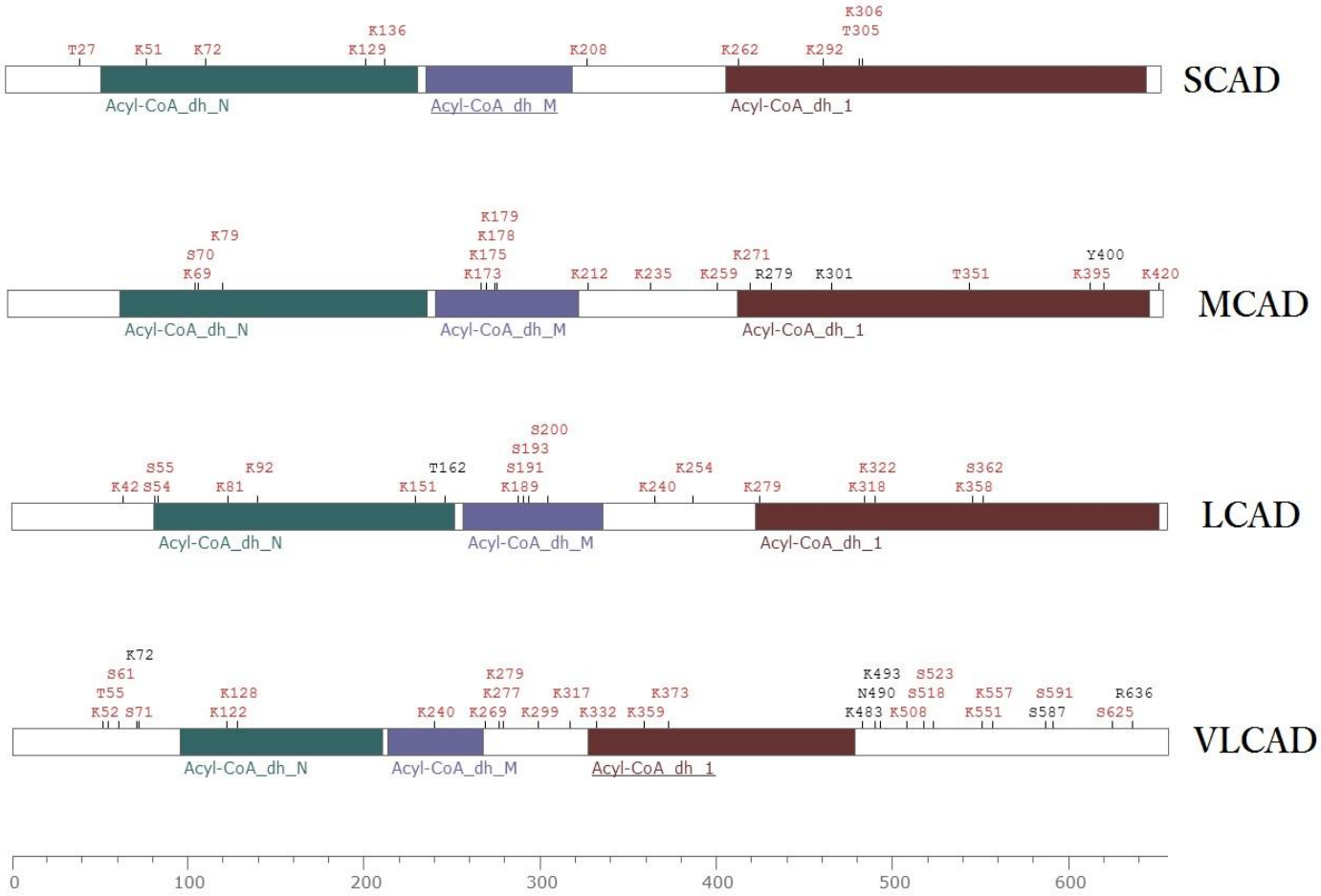
A regulação da atividade das ACADs ainda não foi totalmente elucidada, mas todas elas apresentam sítios de fosforilação (Esquema 4). Até o momento são conhecidos 2 sítios de fosforilação para SCAD, 3 para MCAD, 7 para LCAD e 9 para VLCAD. Além destes sítios de fosforilação, a VLCAD apresenta 12 sítios de acetilações/ deacetilações. Ainda não se sabe ao certo se todos estes sítios fazem parte do controle de sua atividade (<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=1171542&showAllSites=true> Acesso em: 18 abr. 2014; Hornbeck *et al.*, 2012). Acredita-se que a fosforilação em uma serina 587 (Kabuyama *et al.*, 2010) esteja relacionada com o aumento da geração de ERO em culturas celulares.

Nos peroxissomos, o catabolismo dos ácidos graxos é promovido pela superfamília das acil-CoA oxidases, que possuem um mecanismo catalítico muito similar às acil-CoA desidrogenases (Matsubara *et al.*, 1989; Kim e Miura, 2004; Ghisla *et al.*, 2004). A diferença principal consiste na transferência de elétrons: enquanto as ACADs transferem os elétrons para a ETF, as acil-CoA oxidases transferem elétrons para o oxigênio molecular, gerando H_2O_2 (Nakajima *et al.*, 2002; Kim e Miura, 2004; Ghisla *et al.*, 2004). O peróxido de hidrogênio é um produto fisiológico da oxidação de ácidos graxos em peroxissomos, particularmente no fígado (Osmundsen *et al.*, 1991). No entanto, é controverso se estas organelas poderiam contribuir para o vazamento de peróxido de hidrogênio para o citosol, devido a alta concentração de catalase e outros *scavengers* de H_2O_2 presentes nestas organelas (Schrader e Fahimi, 2004).



Esquema 3: Modelos estruturais de VLCAD e MCAD. (A) Modelo de estrutura resolvida por cristalografia de VLCAD de camundongo, uma proteína dimérica, o quadrado destaca o grupo prostético FAD (B) Modelo de estrutura de MCAD humana, uma proteína tetramérica. Em cores destacadas resíduos de aminoácidos passíveis de alteração pós traducional: lisina (azul), treonina (rosa), arginina (verde) e serina (laranja). As estruturas foram obtidas por <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=1171542&showAllSites=true>

Neste estudo foram avaliados os efeitos de uma dieta hiperlipídica na geração de ERO mitocondriais. Curiosamente, nossos resultados indicam que acil-CoA desidrogenases são uma fonte em potencial, sensível à dietas, de ERO mitocondrial.



Esquema 4: Mapa de sítios de modificações pós traducionais de ACADs. SCAD apresenta 10 sítios de modificação, MCAD 17, LCAD 18 e VLCAD 28 sítios de modificações pós traducionais. Em verde, domínio N terminal das ACADs, em lilás o domínio mediano e em vinho o domínio C-terminal. A barra indica a sequência de aminoácidos das subunidades catalíticas, as letras representam os aminoácidos e o número a posição na estrutura primária da proteína.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi identificar efeitos de dietas hiperlipídicas na fisiologia mitocondrial em fígados de camundongos. Para tanto, foi estabelecido um modelo de dietas hiperlipídicas de uma semana de duração. Tendo em vista que a dieta foi capaz de provocar o acúmulo de gotículas de triacilglicerol nos hepatócitos, testamos se este fenômeno poderia estar associado à indução de marcadores de desbalanço redox em nossas amostras. Como a geração de oxidantes celulares pode depender de compartimentalização, testamos se a fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) era primordialmente em frações celulares ou mitocondriais, e qual a fonte enzimática específica dessa geração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dietas:

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 oferecidos dietas comerciais da Rhoster® *ad libitum*. Já os animais da dieta hiperlipídica receberam suplementação com óleo de soja na única fonte de água, além da dieta Rhoster® *ad libitum*. O óleo vegetal (30% v/v) permaneceu em emulsão na água por meio de estearoil lactilato de sódio da Purac® (9 g/litro de solução; modificado de Warwick e Weingarten, 1994; Zou *et al.*, 2006). O consumo de gorduras totais dos animais foi de 55% das calorias da dieta, o que promove aumento de peso nos animais (Cardoso *et al.,* 2010). Os experimentos foram conduzidos seguindo normas de experimentação 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.

3.2 Histologia:

Fígados foram lavados em tampão de isolamento e fixados em solução de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967), desidratados com séries de etanol e embebidos em historesina da *Leica*®. Os cortes foram obtidos usando micrótomo *Leica*® RM 2145 e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) ou hematoxilina e oil red O para marcação de lipídeos neutros (Ge *et al.*, 2010). As imagens foram adquiridas usando microscópio Axioskop e câmera Axiocam da Carl Zeiss®.

3.3 Isolamento de mitocôndrias de fígado de camundongo:

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 600 g e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 7.000 g (as centrifugações foram feitas 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 3 horas após seu isolamento (Castilho *et al*., 1995; Cancherini *et al.*, 2003). As mitocôndrias foram incubadas em

tampão: KCl 150 mM, Hepes 10 mM, $MgCl_2$ 2 mM, KH_2PO_4 2 mM pH 7,4 a 37°C com agitação. Para separar as preparações mitocondriais de peroxissomos usamos um gradiente de concentração de percoll. Foram preparadas soluções de percoll 62%, 52%, 19% and 7%, ajustando o pH e a concentração de EGTA, sacarose e Hepes. Os tampões foram pipetados em ordem decrescente e as mitocôndrias foram colocadas no topo do tubo. Foi realizada a centrifugação a 4°C por 5 minutos a 7000 g com rotor de ângulo fixo. Os peroxissomos, presentes em frações acima de 19%, foram descartados. As mitocôndrias foram coletadas entre as frações 52 e 19% com pipeta pasteur, resuspendidas em tampão de isolamento e centrifugadas novamente a 4°C por 5 minutos a 7000 g para remoção do percoll. As mitocôndrias foram mantidas resfriadas sobre gelo (Leite *et al.*, 2010).

3.4 Quantificação de proteínas:

Os experimentos foram normalizados pelas concentrações de proteínas usando reagente de Bradford da Bio-Rad. As curvas de calibração foram preparadas com albumina sérica bovina (BSA) e a absorbância foi medida com leitor de placas SpectraMax M3 96 wells da Molecular Devices® .

3.5 Medida da geração de peróxido de hidrogênio:

Para determinar a cinética de geração de peróxido de hidrogênio, foi usado um fluorímetro Hitachi F-4500 com agitação magnética a ex = 563, em = 586, 37°C. Amostras foram adicionadas a cubetas contendo tampão experimental KCl 150 mM, Hepes 10 mM, $MgCl_2$ 2 mM, KH_2PO_4 2 mM BSA 0,1%, pH 7,4. A reação foi realizada pela oxidação de Amplex Red (5 µM, Molecular Probes), na presença de HRP (1 U/mL), ao composto fluorescente resorufina (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). Curvas de calibração foram estabelecidas adicionando concentrações conhecidas de H_2O_2. Mitocôndrias foram usadas a uma concentração de 0,05 mg proteína · mL^{-1}. A carnitina diminuiu a oxidação de Amplex Red sem amostra biológica em tampão experimental, o que subestimou a taxa de oxidação estimada pelo método. Portanto, não foi usada carnitina adicional em nosso tampão experimental, apenas a carnitina já presente em nossas amostras.

3.6 Proteínas carboniladas:

Para realizar esta medida as amostras de mitocôndrias foram incubadas com SDS 24% e 2,4-dinitrophenylhydrazine 40 µM por 30 minutos em temperatura ambiente evitando a exposição da luz. A reação foi bloqueada com Tris 2 M, glicerol 30% e β-mercaptoetanol 19%. As amostras foram fervidas e preparadas para western blotting usando 1:1000 de anti-dinitrophenylhydrazine (Cerqueira *et al.*, 2011).

3.7 Atividade de aconitase:

A atividade de aconitase foi medida usando espectrofotômetro Cary 50 da Varian® a 37ºC com agitação magnética. As medidas foram realizadas através da atividade reversa da enzima. Mitocôndrias foram incubadas em tampão fosfato 100 mM, pH 7.5 na presença de isocitrato 1 mM e foi acompanhada a formação de cis-aconitato (absorção a 240 nm) em cubetas de quartzo. A concentração molar foi calculada através do coeficiente de extinção molar da literatura (240 nm = 3.6 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$; modificado de Sarre *et al.*, 2012).

3.8 Medidas de consumo de O_2 e *e atividade de catalase:*

A respiração ou geração de oxigênio mitocondrial resultante da atividade da catalase foi acompanhada utilizando-se um oxígrafo Oroboros. Mitocôndrias foram incubadas em tampão de experimento KCl 150 mM, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 1 mM, KH_2PO_4 1 mM, Hepes 10 mM and 0,1% BSA, pH 7.4, a 37ºC, com agitação magnética. Foram adicionados substratos respiratórios para as medidas de respiração ou H_2O_2 0,1 mM para a medida de atividade de catalase (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1998).

3.9 Medidas de potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ):

Para realizar esta medida foi usado fluorímetro Hitachi F-4500 a ex = 495 e em = 587, 37°C, com agitação magnética. Mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram adicionadas a cubetas contendo o corante fluorescente safranina O 5 µM, sacarose 120 mM, KCl 65 mM, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 1 mM, KH_2PO_4 1 mM, Hepes 10 mM and 0,1% BSA, pH 7.4, a 37ºC, com agitação magnética. Após as leituras iniciais, foi adicionado ADP 1 mM. Após a estabilização foi adicionada oligomicina 1 µg/mL, em seguida, foi adicionado CCCP 1 µM. As curvas de calibração foram obtidas em meio livre de sais de potássio (substituídos por sais de sódio) na presença de 2 µM de valinomicina, sendo adicionadas concentrações conhecidas de potássio (Kowaltowski *et al.*, 2002; Tahara *et al.*, 2009).

3.10 Western blotting:

Amostras mitocondriais foram diluídas em tampão: glicerol 4%, dithiothreitol 10 mM, SDS 2%, bromophenol blue 0,05% e Tris-HCl pH 6,8. As proteínas das amostras foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF (Cerqueira *et al.*, 2011). Foram usados anticorpos primários 1:1000 em TTBS com BSA 1%; anticorpos secundários foram usados a 1:10000 em TTBS. As imagens dos filmes obtidos foram analisadas com software ImageJ e o controle de *loading* foi feito pela normalização com imagens das membranas coradas por Ponceau (Bio-Rad; Cerqueira *et al.*, 2011).

3.11 Quantificação de NAD(P)H:

NAD(P)H e $NAD(P)^+$ foram medidas usando fluorímetro F-4500 Hitachi®, ex = 332 e em = 464, a 37°C com agitação magnética. As mitocôndrias foram incubadas em tampão de experimento KCl 150 mM, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 1 mM, KH_2PO_4 1 mM, Hepes 10 mM e BSA 0,1%, pH 7.4. A concentração de NAD(P)H total foi medida na presença de rotenona 1 µM. A oxidação máxima do NAD(P) foi medida na presença de CCCP 1 µM. Para calcular o quanto NAD^+ as mitocôndrias conseguiam reduzir, utilizamos mitocôndrias permeabilizadas com alameticina 0.5 µg/mL, antimicina A 0,5 ng/mL, rotenona 1 µM e NAD^+ 50 µM. Usamos 50 µM de diferentes grupos acil-CoA para medir a atividade das ACADs. Construímos curvas de calibração com NADH comercial para relacionar unidades de fluorescência a concentração molar.

3.12 Estatística e análise de dados:

Para a realização deste trabalho foram estabelecidos grupos experimentais correspondentes à variável nominal “tipo de dieta consumida”, ou seja se dieta controle ou hiperlipídica (HFD). Antes dos dados serem obtidos foram criados experimentos piloto para assegurar que as distribuições de variáveis métricas eram normais, para tal foi usado o teste Kolmogorov-Smirnov. As variâncias entre os grupos foram testadas usando o teste de Bartlett. Ambas condições são pré-requisitos para realização dos testes escolhidos: *two tailed student t*, ANOVA *one-way* e ANOVA *two-way.* Quando o teste ANOVA foi utilizado o pós teste escolhido foi Bonferroni. Todos experimentos realizados neste trabalho foram conduzidos com pelo menos 6 repetições biológicas. A significância foi considerada existente quando $p < 0.05$. Os dados obtidos foram analisados usando testes estatíticos de *softwares* como GraphPad Prism, GraphPad™ e Origin 7.0.

4. RESULTADOS

4.1 Histologia

A dieta hiperlipídica utilizada em nosso modelo foi capaz de induzir o aumento de gotículas de lipídeos nos hepatócitos dos animais tratados. Isto pôde ser observado tanto em cortes corados por H&E (comparar as Figuras 3 A e 3 B) quanto pela coloração por *oil red O* (comparar as Figuras 3 C e 3 D). Esta última propiciou com maior clareza a detecção deste aumento, principalmente em regiões próximas aos endotélios hepáticos. Não houve indício de aumento de invasão de células de Kupffer, o que indicaria um quadro inflamatório nos animais.

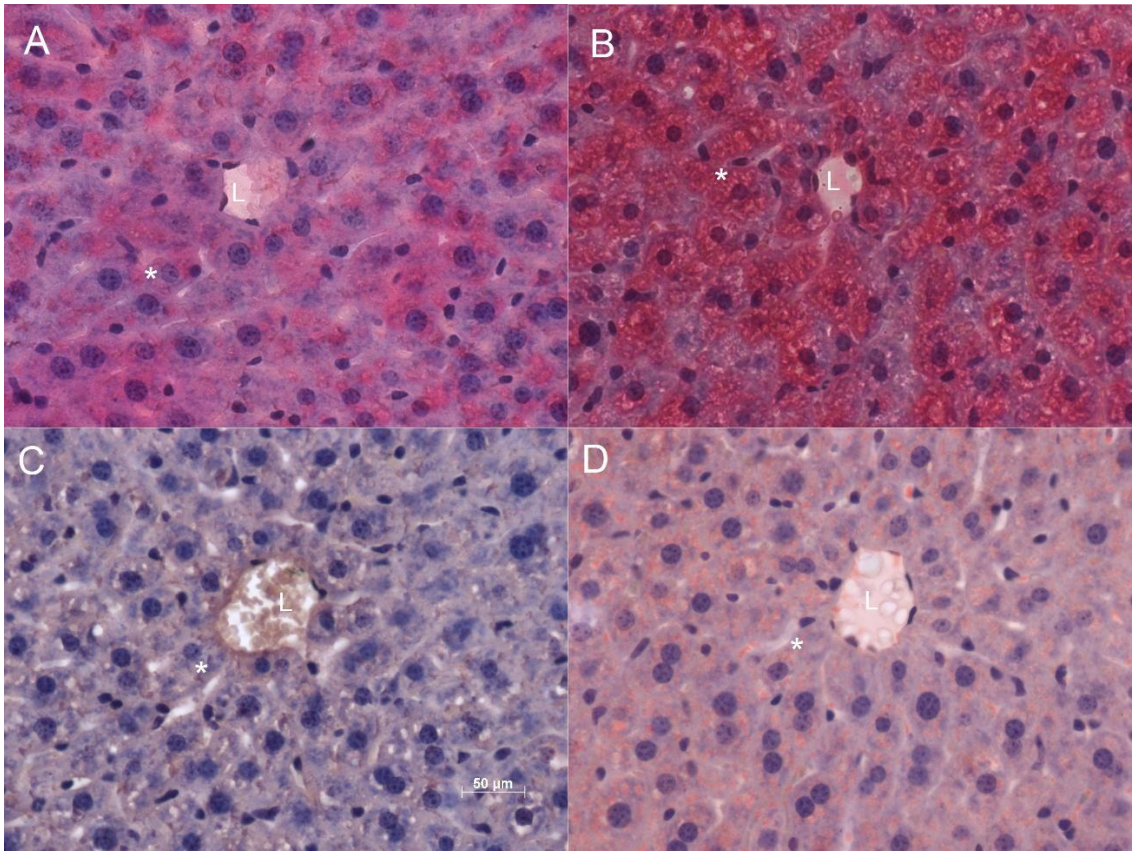


Figura 3: Dieta hiperlipídica induz aumento de microvesículas de lipídeos em hepatócitos de camundongos. Painéis A e B: cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). Os Painéis C and D mostram que a dieta hiperlipídica apresenta mais áreas marcadas com Oil red O em regiões próximas aos vasos. As imagens são representativas de 3 amostras biológicas por grupo. Barra 50 µm, (*) hepatócito, (L) luz do vaso.

4.2 Marcadores de estado redox e geração de H_2O_2 não mitocondrial

Além do aumento da concentração de lipídeos hepáticos, foi possível constatar um aumento de proteínas carboniladas (Figura 4 A), um marcador de danos moleculares (Cerqueira *et al.*, 2011). Isto sugere que a dieta hiperlipídica, de apenas uma semana, poderia causar lesões a biomoléculas em nossas amostras.

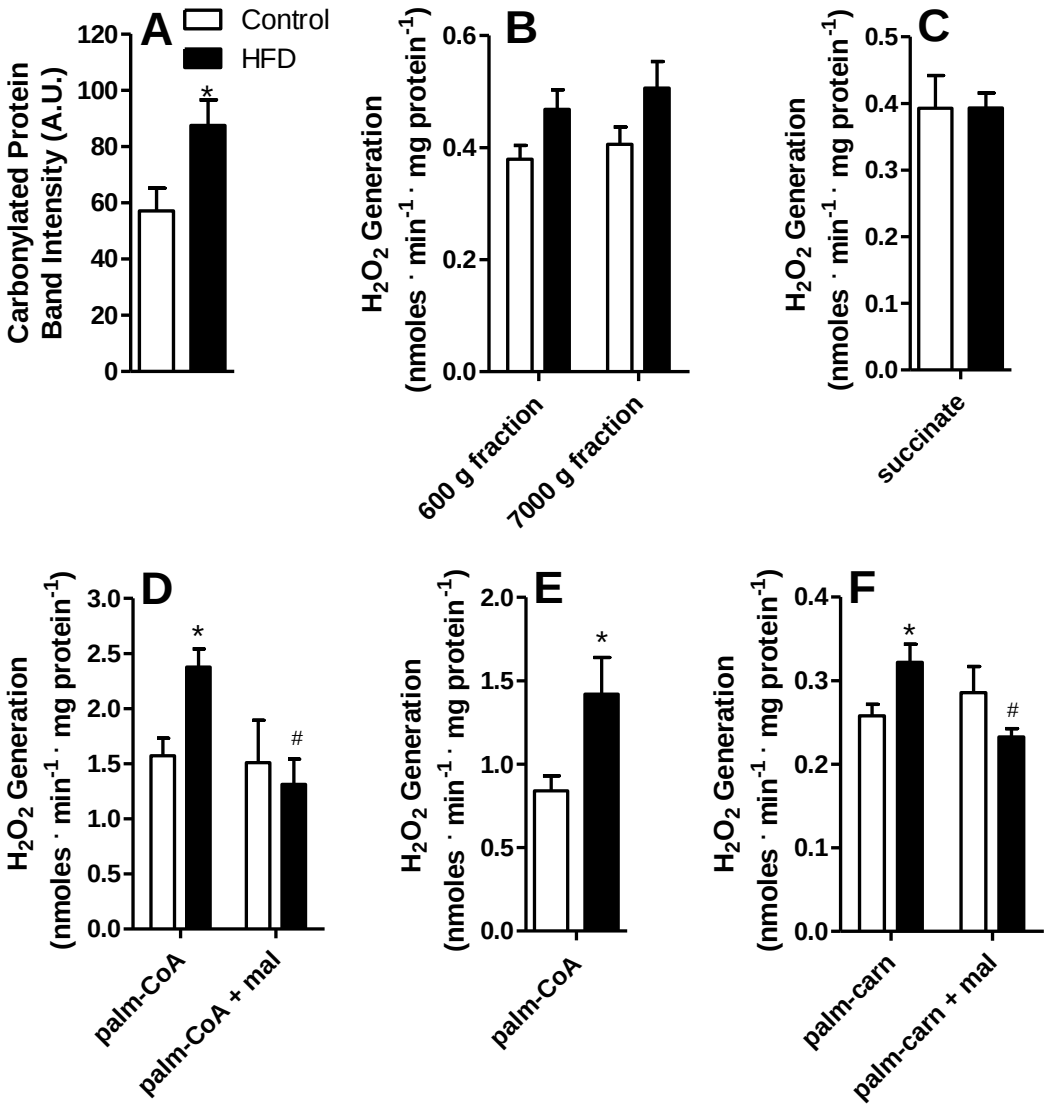


Figura 4: Liberação de H_2O_2 por frações de homogenatos de fígado. (A) Proteínas carboniladas foram detectadas como descrito em Material e Métodos em frações mitocondriais; (B) Homogenatos de fígados do controle e HFD foram preparados como descrito em Material e Métodos e incubados em tampão contendo KCl 150 mM, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 1 mM, KH_2PO_4 1 mM, Hepes 10 mM, BSA 0.1%, pH 7.4, a 37°C com agitação magnética na presença de 5 µM Amplex Red and 1 U/mL HRP; (B) Geração de H_2O_2 do homogenato total (600 g) e frações sem mitocôndrias (7000 g); (C) A fração mitocondrial foi incubada na presença de succinato 2 mM; (D) Mitocôndrias incubadas na presença de palmitoil-CoA 50 µM (palm-CoA) e malonil-CoA 50 µM (mal), onde indicado; (E) Mitocôndrias purificadas pelo método de percoll incubadas na presença de palmitoil-CoA 50 µM; (F) Mitocôndrias incubadas na presença de palmitoil-carnitina 50 µM (palm-carn) e malonil-CoA 50 µM (mal); *, $p < 0.05$ versus controle, #, $p < 0.05$ versus HFD na ausência de malonil CoA, n = 6 por grupo.

Com o objetivo de esclarecer quais seriam as fontes deste desbalanço redox, nós realizamos a homogeneização do tecido hepático e realizamos seu fracionamento, medindo a liberação de peróxido de hidrogênio na fração sem *debris* celulares e sangue (sobrenadante da centrifugação a 600 g), na fração citosólica sem mitocôndrias (sobrenadante da centrifugação a 7000 g) e em frações mitocondriais. Nós não encontramos diferenças significativas com relação a liberação de H_2O_2 nas frações de 600 g ou de 7000 g (Figura 4 B). Além disso, não foi possível observar diferenças entre os grupos acerca da atividade de aconitase mitocondrial (Sarre *et al.*, 2012), enzima inibida por radicais $O_2^{\bullet -}$ (Figura 5).

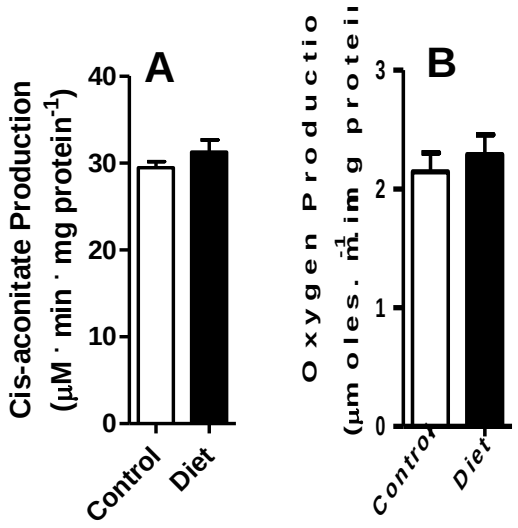


Figura 5: A dieta hiperlipídica não causa mudanças na atividade de aconitase ou catalase. (A) Atividade de aconitase, determinada como descrito em Material e Métodos. (B) Atividade de catalase determinada como descrito em Material e Métodos, n = 6 por grupo, p > 0,05.

4.3 Geração de peróxido de hidrogênio em frações mitocondriais

Tal como nas medições realizadas em homogenatos totais, não foi possível detectar alterações na liberação de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias respirando na presença de succinato (Figura 4 C), assim como não foram encontradas diferenças quanto a liberação de H_2O_2 em mitocôndrias incubadas na presença de α-cetoglutarato ou malato/glutamato (Figura 6). Contudo, ao utilizarmos palmitoil-CoA foi possível notar um aumento da liberação de peróxido de hidrogênio mitocondrial (Figura 4 D) (Tahara *et al.*, 2009; Vial *et al.*, 2011).

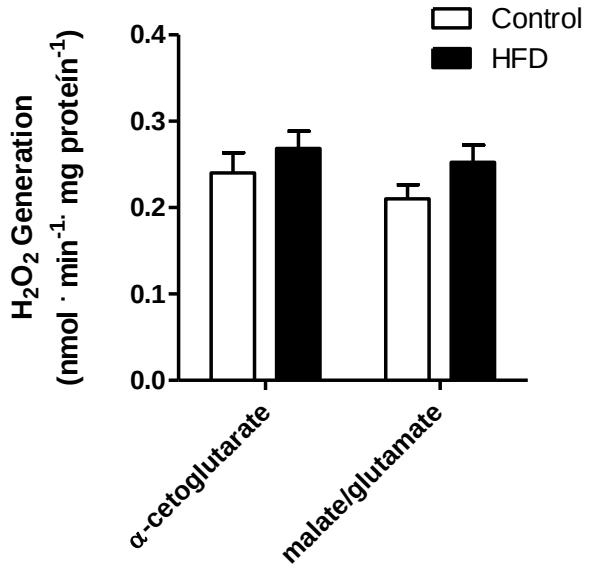


Figura 6: Geração de H_2O_2 em mitocôndrias na presença de α-cetoglutarato e malato/glutamato. Mitocôndrias foram incubadas na presença de KCl 150 mM, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 1 mM, KH_2PO_4 1 mM, Hepes 10 mM and BSA 0.1% Amplex Red 5 μM e HRP 1 U/mL, pH 7,4, a 37°C com agitação magnética (A) foi usado como substrato respiratório α-cetoglutarato 2 mM. (B) Foram realizadas medições nas mesmas condições de A substituindo o α-cetoglutarato por malato 1 mM e 1 mM de glutamato. n = 6 repetições por grupo, $p > 0,05$.

O aumento da liberação de ERO por ácidos graxos em frações mitocondriais de fígado tem sido atribuído à contaminação por peroxissomos (Schönfeld *et al.*, 2009). Para verificar se isto poderia ocorrer em nosso modelo, uma vez que peroxissomos poderiam ser mais expressos em resposta à dieta hiperlipídica, foram realizados outros testes. Primeiro, nós repetimos as medidas em mitocôndrias purificadas por método de percoll, que remove peroxissomos. Apesar dos níveis totais de liberação de H_2O_2 diminuirem em relação ao método convencional, as diferenças entre os grupos experimentais se mantiveram (Figura 4 E). Em seguida, a liberação de peróxido de hidrogênio foi medida na presença de palmitoil-carnitina (Figura 4 F), substrato específico para mitocôndrias, sendo possível observar aumento na liberação de ERO no grupo da dieta hiperlipídica HFD.

No geral, estes resultados indicam que mitocôndrias respirando na presença de ácidos graxos liberam mais peróxido de hidrogênio no grupo HFD em relação ao controle. Esta conclusão é corroborada pelo fato de que não houve mudanças na quantidade de catalase (medida por *western blot*) ou pela atividade desta enzima (Figura 7).

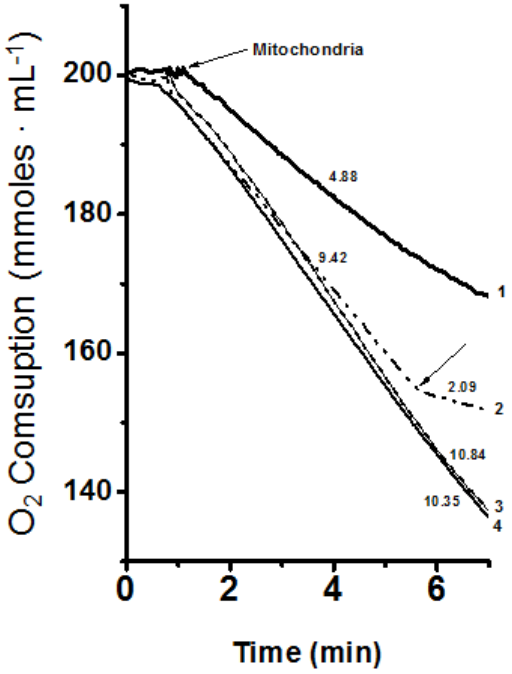


Figura 7: Traçado representativo da respiração mitocondrial com palmitoil-CoA. Mitocôndrias foram incubadas nas mesmas condições da figura 4, na presença de palmitoil-CoA 50 µM. [1] mitocôndrias respirando com substratos endógenos, [2] Palmitoil-CoA com adição de antimicina A 1 µM onde indicado pela seta, [3] Palmitoil-CoA, [4] Palmitoil-CoA + L-carnitina 2 mM. Os números sobre os traçados representam as médias do consumo de O_2. O traçado 1 e o segmento de reta após a adição de rotenona são significativamente menores que os outros traçados $p < 0,05$; $n = 6$.

4.4 Impactos bioenergéticos

Mudanças na produção de ERO são frequentemente secundárias em relação às alterações da cadeia de transporte de elétrons, síntese de ATP ou acoplamento mitocondrial (Tahara *et al.*, 2009; Kowaltowski *et al.*, 2009). Para esclarecer este fenômeno, foi medida a respiração mitocondrial na presença de succinato (Figura 8). Desta maneira, foi possível demonstrar que taxas respiratórias sob as condições de atividade máxima (na presença de CCCP), durante a fosforilação oxidativa (estimulada por ADP), ou na presença de oligomicina, condição em que não há geração de ATP, não foram significativamente diferentes entre os grupos experimentais (Figura 8 A). Além disso, a dieta hiperlipídica não mudou a taxa de controle respiratório ou a razão ADP/O que representa o acoplamento da respiração à síntese de ATP (Figura 8 B). Da mesma forma o potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ), um forte regulador da liberação de ERO, medido na presença de succinato não foi alterado pela dieta hiperlipídica (Figura 8 C). Este resultado também foi observado por (Tahara *et al.*, 2009; Turrens, 2003). Outros metabólitos ligados ao consumo de NADH, como α-cetoglutarato, malato e piruvato produziram uma taxa de respiração muito discreta em nossas amostras (dados não mostrados), sendo pouco adequados para acompanhamento e quantificação dos efeitos

bioenergéticos das dietas.

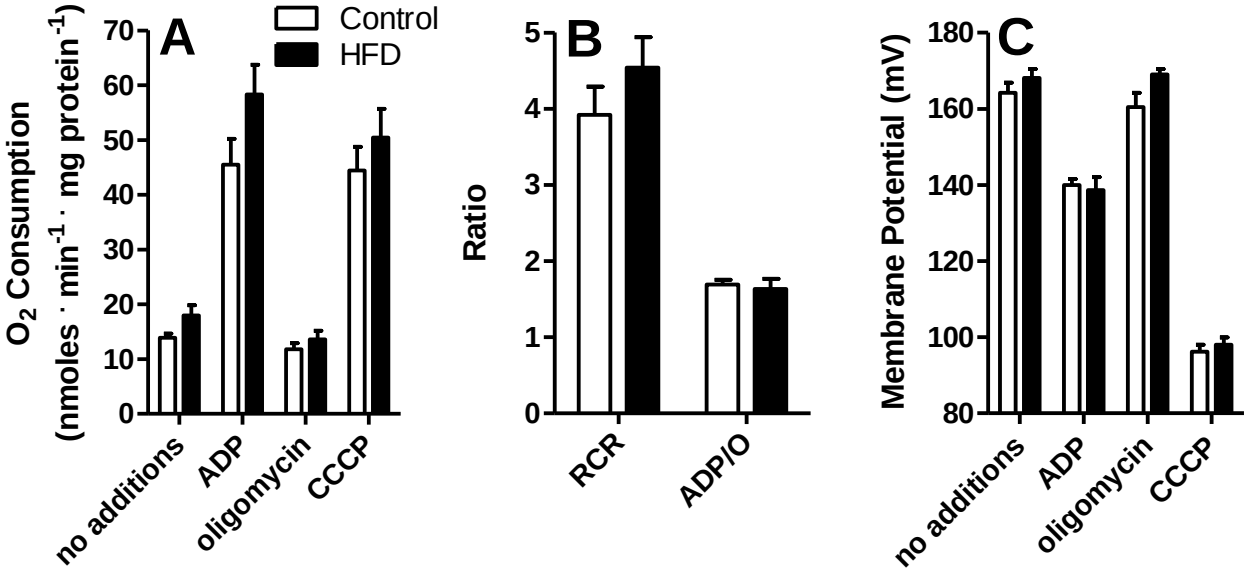


Figura 8: Respiração mitocondrial e potencial de membrana são inalterados pela dieta hiperlipídica. (A) Mitocôndrias (0,5 mg proteína · mL^{-1}) foram incubadas em tampão para medida do consumo de O_2 descrito em Material e Métodos na presença de ADP 1 mM ou CCCP 1 μM, onde indicado. (B) Razão do controle respiratório (RCR), calculado pela divisão da taxa respiratória em estado 3 (com ADP) pela taxa respiratória em estado 4 (com oligomicina) e razão ADP/O foram calculados nas mesmas condições do painel A. (C) Potenciais de membrana da membrana mitocondrial interna, determinados como descrito em Material e Métodos. n = 6 animais por grupo, $p > 0,05$.

No entanto, quando as taxas respiratórias foram medidas usando palmitoil-carnitina como substrato (Figura 6), efeitos significativos da dieta hiperlipídica foram observados. Como esperado, a velocidade respiratória na presença deste substrato é menor em relação ao succinato (comparar Figura 8 A com Figura 9), uma vez que o transporte de elétrons por esta via é limitado pelas baixas taxas de atividade da β-oxidação (Thorpe e Kim, 1995). No entanto, mitocôndrias do grupo HFD apresentaram um significativo aumento das taxas de consumo de oxigênio sob palmitoil-carnitina, particularmente quando a respiração foi estimulada por ADP ou pelo desacoplador CCCP (Figura 9). Este aumento da respiração foi prevenido por malonil-CoA, um efeito que não seria observado se malonil-CoA fosse um inibidor exclusivamente da atividade de substituição CoA para carnitina da carnitina-palmitoil transferase I. Contudo, estes dados sugerem que malonil-CoA também inibe o sistema carnitina/acil carnitina translocase I. As velocidades respiratórias obtidas pela oxidação de palmitoil-carnitina não foram limitadas pela cadeia de transporte de elétrons, uma vez que foram significativamente menores em relação as medidas usando succinato. Este resultado sugere que a capacidade respiratória máxima

para oxidação de ácidos graxos é maior em mitocôndrias do grupo HFD.

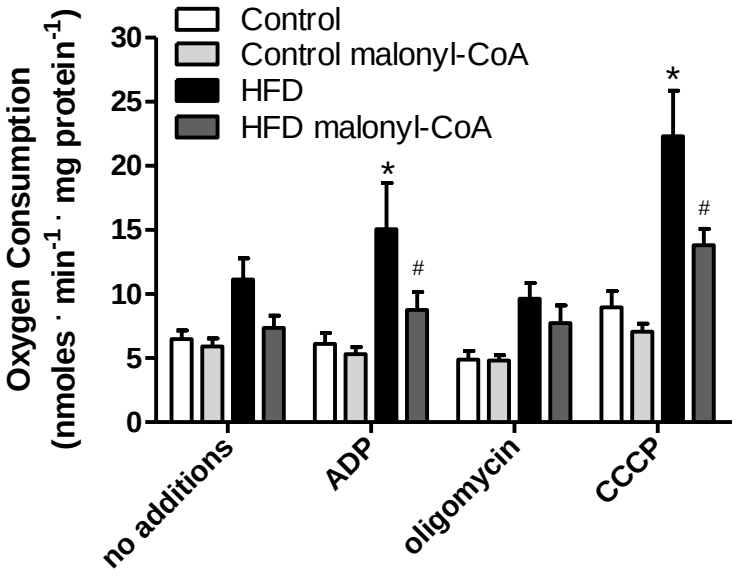


Figura 9: Respiração mitocondrial por palmitoil-carnitina. Mitocôndrias foram incubadas nas mesmas condições da Figura 4 C, na presença de palmitoil-carnitina 50 µM ao invés de succinato. Onde indicado ADP 1 mM, oligomicina 1 µM, CCCP 1 µM e malonil-CoA 50 µM forma adicionados. *, $p < 0.05$ versus controle ou # versus malonil-CoA.

4.5 Expressão e atividade de enzimas da β-oxidação

Com o objetivo de investigar se as mitocôndrias do grupo HFD apresentavam maior expressão de enzimas do catabolismo de ácidos graxos, foram quantificadas em nossas amostras as acil-CoAs desidrogenases: SCAD, MCAD, LCAD e VLCAD, além de subunidades da ETF (a Figura 10 A mostra *blots* representativos). Foi possível observar que as desidrogenases estão cerca de 2,5 vezes mais expressas em relação ao controle. As subunidades A e B da ETF também estão mais expressas nas mitocôndrias do grupo HFD (quantificado na Figura 10 B).

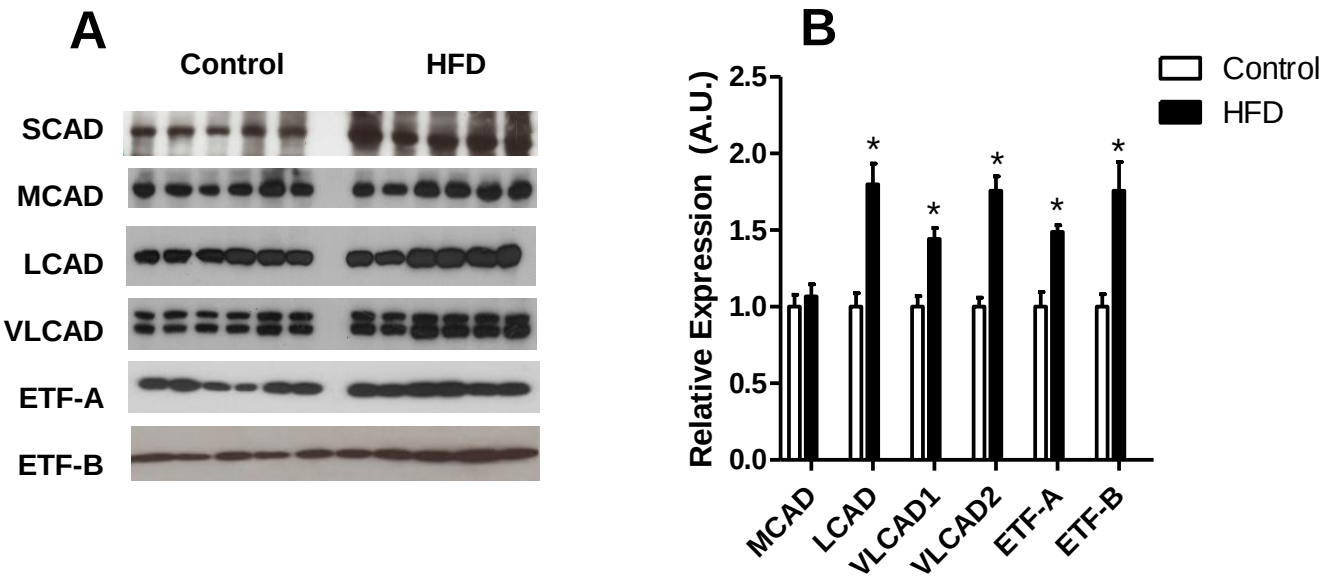


Figura 10: Dieta hiperlipídica aumenta a expressão das acil-CoA desidrogenases e de subunidades A e B da ETF. Acil-CoA desidrogenases e subunidades A e B da ETF (A-B), foram quantificadas por *western blot* como descrito em Materiais e Métodos. (A) Imagens representativas (notar que a VLCAD possui duas isoformas), (B) médias ± erro padrão médio das densitometrias. Onde indicado *, $p < 0,05$ em relação ao controle.

Uma vez que o nível de expressão de enzimas nem sempre reflete sua atividade, foi medida a oxidação de acil-CoAs de diferentes tamanhos de cadeia carbônica (Figura 11 A), substratos para essas enzimas. Para medir a atividade sem a influência de produtos secundários, mitocôndrias isoladas foram permeabilizadas com o composto formador de poros alameticina (Starkov *et al.*, 2004). O poro formado permite a livre difusão de produtos enzimáticos para a cubeta experimental (fora das mitocôndrias), levando à diluição e evitando acúmulo de intermediários para atuar como substrato de passos metabólicos subsequentes.

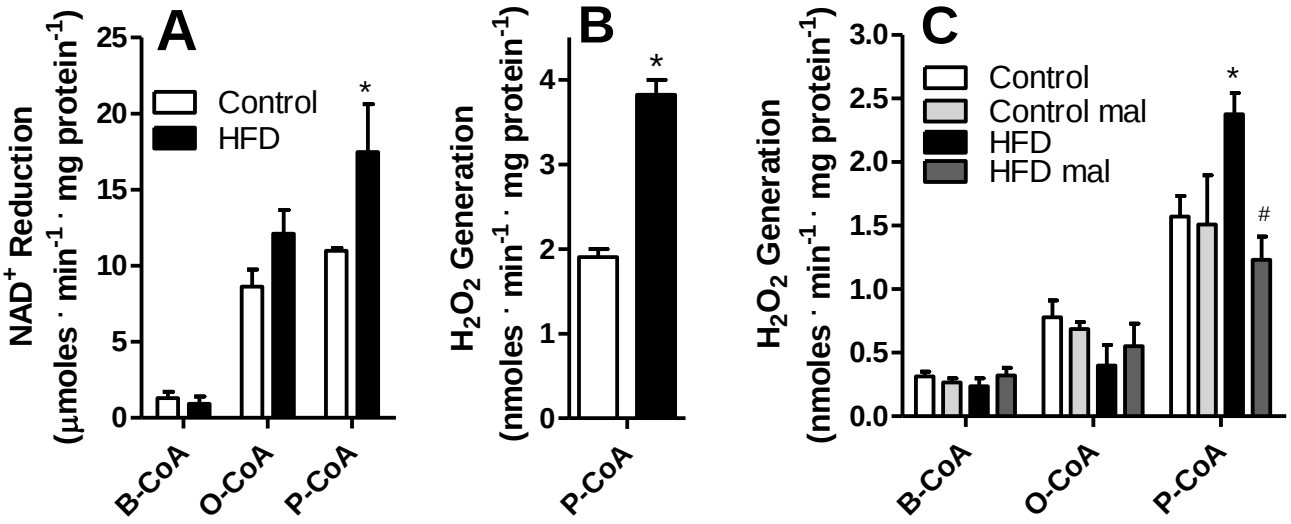


Figura 11: Dieta hiperlipídica induz aumento da liberação de ERO pela VLCAD. (A-C) mitocôndrias (0,5 mg proteína. mL^{-1}) foram incubadas em KCl 150 mM, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 1 mM, KH_2PO_4 1 mM, Hepes 10 mM, BSA 0.1%, pH 7.4 a 37°C com agitação magnética. (A) Alameticina (0,5 µg/mL), antimicina A (0,5 ng/mL), rotenona (1 µM) e 50 µM de NAD^+ foram adicionados ao meio de incubação e a fluorescência de NADH foi medida de acordo com Materiais e Métodos na presença de butiril-CoA 50 µM (B-CoA), octanoil-CoA 50 µM (O-CoA) ou palmitoil-CoA 50 µM (P-CoA), onde indicado. (B) Mitocôndrias foram incubadas na presença de alameticina 0,5 µg/mL, 5 µM de *Amplex Red* e 1 U/mL de HRP. (C) Mitocôndrias foram incubadas nas mesmas condições da Figura 4C, substituindo succinato por butiril-CoA 50 µM, octanoil-CoA 50 µM ou palmitoil-CoA 50 µM. Onde indicado foi adicionado malonil-CoA 50 µM (mal). *, $p < 0,05$ versus controle, #, $p < 0,05$ versus HFD na ausência de malonil-CoA, n = 6 por grupo.

Esta condição experimental também remove a participação de sistemas de transporte de substratos em membranas mitocondriais, incluindo a carnitina palmitoil transferase. Nestas condições foi medida a redução de NAD^+ como indicador da atividade de acil-CoA desidrogenases, que é estruturalmente e funcionalmente acoplada à oxidação subsequente de hidroxiacil-CoA e redução de NAD^+ pela 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase. Com este experimento foi possível observar que palmitoil-CoA, mas não octanoil-CoA ou butiril-CoA, induziu uma redução significativamente maior de NAD^+ em mitocôndrias do grupo HFD (Figura 11 A). Isto demonstra que, apesar da expressão de ACADs estarem aumentadas pela dieta hiperlipídica, apenas a atividade de VLCADs, que metabolizam o palmitoil-CoA, estão aumentadas.

4.6 Balanço de NAD^+/ NADH e efeitos na geração de H_2O_2

A VLCAD é uma flavoenzima, e como tal é uma fonte potencial de vazamento de elétrons para o oxigênio, levando à geração de ERO mitocondrial (Andreyev *et al.*, 2005; Adam-Vizi, 2005). A geração de ERO por flavoenzimas mitocondriais é frequentemente determinada pelas mudanças na concentração de nucleotídeos oxidados que fisiologicamente recebem os elétrons destas flavoenzimas. Portanto, foram medidas as quantidades de NAD(P)H (Figura 12). O ensaio foi realizado antes e depois da adição de rotenona, que promove a redução do NAD(P), e CCCP, que promove a sua oxidação. Sob estas condições, não houve diferenças significativas entre os grupos. Somado a isso, NAD(P)H apresentava-se altamente reduzido em ambos os grupos experimentais. Portanto, esta razão NAD(P)/NAD(P)H não poderia explicar os níveis aumentados na geração de H_2O_2 em mitocôndrias do grupo HFD.

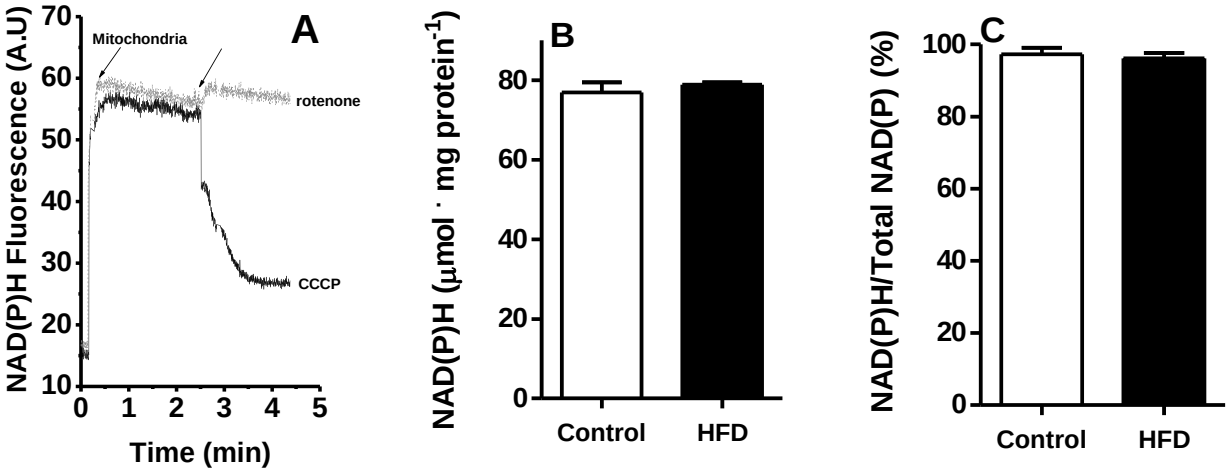


Figura 12: A dieta hiperlipídica não muda a concentração ou estado redox de NAD(P)H. Mitocôndrias (0,5 mg/mL) foram incubadas em KCl 150 mM, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 1 mM, KH_2PO_4 1 mM, Hepes 10 mM, BSA 0,1%, pH 7,4. a 37°C com agitação magnética. (A) NAD(P)H foi medido como descrito em Material e Métodos adicionando 1 µM de rotenona ou CCCP 1 µM, onde indicado. (B) As curvas de calibração para os valores de fluorescência foram calibradas adicionando quantidades conhecidas de NADH comercial em tampão sem amostra biológica. A média do NAD(P)H foi então calculada usando as curvas de calibração. (C) O estado de oxidação do NAD(P) antes da adição de rotenona or CCCP foram calculados a partir de traçados como os do painel A. n = 6 amostras biológicas por grupo, $p > 0,05$.

4.7 Geração de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias permeabilizadas

Com o intuito de verificar os mecanismos de geração de ERO independente de intermediários secundários do metabolismo de ácidos graxos, ou dos transportadores de substratos para a matriz mitocondrial, foram realizadas medidas da liberação de peróxido de hidrogênio por mitocôndrias permeabilizadas por alameticina. Com esta metodologia foi possível constatar que as mitocôndrias permeabilizadas do grupo HFD apresentam maior liberação de ERO em relação ao controle quando palmitoil-CoA foi utilizado como substrato (Figura 11 B). Este dado sugere que a liberação de ERO ocorre diretamente pela VLCAD (com a possível participação de outras enzimas que estão estrutural e funcionalmente ligadas à ela). Assim como as VLCADs, a ETF é uma flavoproteína reconhecida por ser uma potencial fonte de ERO e sua expressão foi aumentada pela dieta hiperlipídica. No entanto, em nosso modelo, não constatamos diferenças na geração de ERO na presença de grupos acil-CoA de cadeias carbônicas menores, como butiril-CoA ou octanoil-CoA. Isso indica que a fonte de vazamento de elétrons que explicaria a diferença entre os grupos controle e HFD está à montante da ETF.

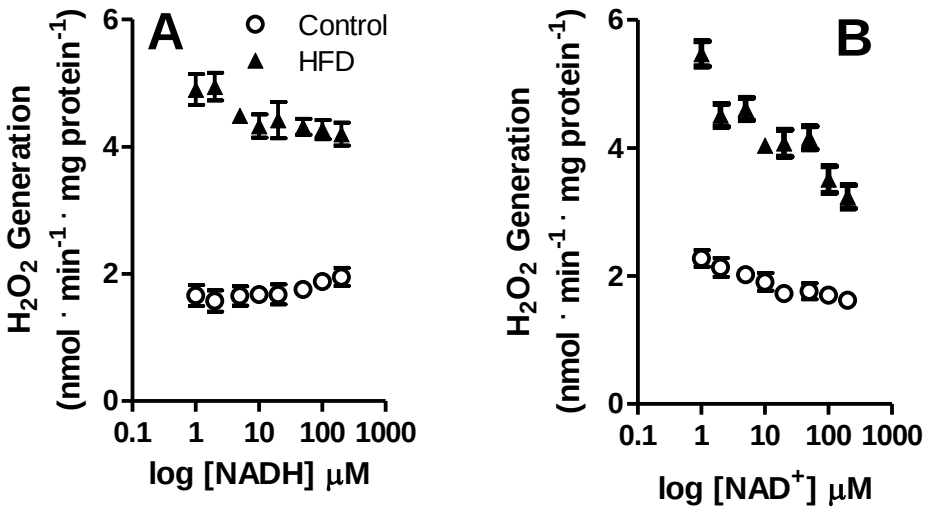


Figura 13: NAD$^+$ previne a liberação de H_2O_2 pela VLCAD. mitocôndrias (0,2 mg proteína · mL^{-1}) foram incubadas sob as mesmas condições da Figura 7 B, na presença de concentrações crescentes de NADH (A) ou NAD$^+$ (B). A liberação de H_2O_2 foi monitorada como descrito em Material e Métodos, n = 6 por grupo.

Na verdade, experimentos com mitocôndrias intactas (Figura 11 C) indicam que o aumento da liberação de H_2O_2 no grupo HFD ocorre na presença de palmitoil-CoA, de maneira sensível a malonil-CoA, enquanto que grupos acil-CoA de cadeia carbônica menor não levam a diferenças nas taxas de geração de H_2O_2. Se a ETF fosse a fonte de vazamentos de elétrons para o oxigênio, deveríamos notar diferenças entre os grupos controle e HFD, mesmo usando grupos acil-CoA de cadeia mais curta.

Nas flavoenzimas em que o grupo prostético $FADH_2$ reduz o NAD^+, como a α-cetoglutarato desidrogenase, a geração de ERO é estimulada pela ausência de NAD^+ (Starkov *et al.*, 2004; Tretter e Adam-Vizi, 2004; Adam-Vizi, 2005; Tahara *et al.*, 2007). Apesar da VLCAD não reduzir o NAD^+, a via metabólica à qual a VLCAD está inserida produz hidroxiacil-CoA, que é reduzido por hidroxiacil-CoAs desidrogenases, que reduzem NAD^+. Para determinar se o balanço do par NAD^+/NADH poderia interferir na geração de ERO em nossas condições experimentais, foram realizados experimentos com concentrações crescentes de NAD^+ ou NADH e avaliada a liberação de H_2O_2 mediada por palmitoil-CoA (Figura 13). Com este experimento foi possível constatar que concentrações acima de 500 μM de NADH não mudaram significativamente a geração de ERO (Figura 10 A). Por outro lado, o aumento da concentração de NAD^+ preveniu significativamente a liberação de H_2O_2 (Figura 13 B). O aumento da geração de ERO promovido pela ausência de um aceptor de elétrons indica que o vazamento de elétrons ocorre à montante da redução de NAD^+, provavelmente ao nível da semiquinona da flavina das acil-CoAs desidrogenases (Müller, 1978).

5. DISCUSSÃO

As dietas hiperlipídicas são fequentes em populações humanas e, como resultado, a esteatose hepática é altamente prevalente. Embora seja benigna, a esteatose não alcoólica pode progredir para condições mais sérias como a fibrose e o câncer hepático. Muitos estudos associaram a progressão da esteatose com a disfunção mitocondrial e a produção aumentada de ERO (Day e James, 1998; Anstee e Goldin, 2006; Begriche *et al.*, 2006; Hebbard e George, 2011; Rolo *et al.*, 2012). Apesar disso, até o momento, poucos estudos foram focados em mecanismos pelos quais a esteatose aumenta a liberação de EROs.

Neste trabalho nós mostramos que dietas hiperlipídicas de apenas 1 semana levam ao aumento de lipídeos na forma de gotículas de lipídeos (*lipid droplets*) nos hepatócitos (Figura 3). Curiosamente, um desbalanço redox foi detectado (Figura 4 A), mesmo não sendo evidenciada a presença de células de Kupffer, macrófagos que podem se infiltar no tecido durante a inflamação. Além disso, a dieta hiperlipídica empregada não promoveu mudanças na função respiratória e fosforilação oxidativa avaliada na presença de succinato (Figura 5) ou substratos dependentes de NADH. Este resultado foi consistente com resultados anteriores (Cardoso *et al.*, 2010) demonstrando que a mesma dieta, se administrada em longas fases de 1-9 meses, não é capaz e alterar a respiração mitocondrial ou o potencial de membrana mitocondrial. Por outro lado, Mantena *et al.* (2009) demonstraram que, durante 16 semanas, dietas hiperlipídicas mais concentradas podem promover uma inibição parcial da respiração e diminuição da síntese de ATP em camundongos, e Vial *et al.* (2011) descobriram que ratos tratados com dietas hiperlipídicas baseadas em gorduras saturadas podem ter inibição da capacidade respiratória máxima em apenas 8 semanas. A despeito da ausência de mudanças na cadeia de transporte de elétrons e acoplamento mitocondrial em nosso modelo, nós mostramos que a liberação de ERO em frações mitocondriais de animais que consumiram dietas hiperlipícas foi significativamente maior quando ácidos graxos foram usados como substratos (Figuras 4 D-F, 8 C). Além disso, os níveis de proteínas carboniladas são mais altos. Estas mudanças indicam que no estado pré-esteatótico, a produção de ERO precede mudanças bioenergéticas.

Após estas observações, o objetivo principal foi compreender como os aumentos nos níveis de geração de H_2O_2 ocorrem em frações mitocondriais de animais da dieta hiperlipídica. A primeira explicação possível para este fato seria a possível presença de

peroxissomos nas nossas amostras de mitocôndrias (Schönfeld *et al.*, 2009). Peroxissomos participam da oxidação de alguns lipídeos, gerando peróxido de hidrogênio como produto final de reação. Portanto, seria esperada uma presença maior de peroxissomos em homogenatos de fígado de animais submetidos à dietas. A despeito deste fato nós pudemos atribuir os aumentos na geração de ERO à atividade mitocondrial através de uma combinação de resultados experimentais: (i) a liberação de peróxido de hidrogênio foi igual em frações citosólicas nos grupos controle e HFD (Figura 4 B); (ii) frações mitocondriais purificadas com percoll (sem peroxissomos) ainda exibiram um alto valor na liberação de peróxido de hidrogênio em relação ao controle (Figura 4 E); (iii) não houve diferenças com relação à atividade de catalase ou de sua quantidade (Figura 7), o que representa um baixo ou igual nível de contaminação peroxissomal entre grupos dieta e controle; (iv) mesmo na presença de palmitoil-carnitina, um substrato lipídico específico de mitocôndrias, altos níveis de peróxido de hidrogênio foram detectados (Figura 4 F); (v) a diferença na liberação de EROs foi abolida na presença de malonil-CoA, que inibe a entrada de palmitoil-CoA na matriz mitocondrial (Figuras 4 D e F; 8 C). Poderiam argumentar que palmitoil-CoA não entra na matriz mitocondrial se não existe adição de carnitina à cubeta experimental. No entanto, foram realizadas medidas de consumo de oxigênio que mostram que palmitoil-CoA induz aumento da respiração mitocondrial se comparada à condição sem substrato respiratório. Esta indução foi proporcional a estímulo por palmitoil-carnitina. Além disso, este aumento da taxa respiratória foi inibido por antimicina A. Isto indica que o palmitoil-CoA está sendo consumido de maneira dependente de complexo 3, ou seja palmitoil-CoA não está sendo consumido por peroxissomos (Figura 7).

Após estas constatações, o mecanismo pelo qual palmitoil-CoA leva a um aumento na geração de ERO especificamente no grupo HFD foi investigado. Cocco *et al.* (1999) demonstraram que o aumento na liberação de peróxido de hidrogênio poderia ser devido a inibição da cadeia respiratória promovida pelos ácidos graxos (ácido araquidônico neste estudo). No entanto, nós observamos que a concentração de palmitoil-CoA utilizada não seria capaz de inibir a cadeia respiratória de mitocôndrias de fígado de camundongo. Isto porque a concentração empregada foi baixa e pela presença de 0.1% de BSA em nossos tampões. Além disso, nossos resultados indicam que as taxas respiratórias na presença de palmitoil carnitina são muito altas no grupo HFD (Figura 9), eliminando a possibilidade destes aumentos na taxa de liberação de EROs serem devido à inibição respiratória. Finalmente, nós descobrimos que a taxa de produção de ERO foi aumentada mesmo com as mitocôndrias sendo permeabilizadas pelo composto alameticina (Figuras 11 B).

Este composto adicionado ao meio de incubação eliminou o possível efeito de mudanças na ETC ou acoplamento mitocondrial na liberação de oxidantes nas amostras mitocondriais.

O aumento específico das taxas de liberação de H_2O_2 foi associado ao consumo de palmitoil-CoA. Este fato ocorreu na ausência de mudanças do acoplamento mitocondrial ou da ETC, sugerindo que a geração de oxidantes poderia ser anterior à entrada de elétrons na ETC. Não foi possível observar diferenças de fluxo reverso de elétrons entre os grupos experimentais.

Seifert e colaboradores (2010) também descobriram que mitocôndrias de fígado geram quantidades significativas de peróxido de hidrogênio quando respiram na presença de palmitoil-carnitina. Eles descobriram que as mitocôndrias geram radical ânion superóxido no espaço intermembranas quando existe estímulo à oxidação de ácidos graxos, o que poderia sugerir um papel da ETC nesta produção. No entanto, sob nossas condições experimentais, o peróxido de hidrogênio liberado não foi influenciado pelo potencial de membrana e, portanto, estes efeitos poderiam também ser atribuídos a fontes à montante em relação à ETC. De fato, mitocôndrias contém um grande número de enzimas que catalisam reações de transferências de apenas um elétron (a grande maioria flavoenzimas) e são capazes de promover a redução monoletrônica de oxigênio, gerando radical ânion superóxido e subprodutos ao qual denominamos ERO (Andreyev *et al.*, 2005; Adam-Vizi, 2005). Particularmente, glicerol e α-cetoglutarato desidrogenases tem sido mostradas na literatura como fontes significativas de ERO mitocondriais (Tretter e Adam-Vizi, 2004; Starkov *et al.*, 2004; Andreyev *et al.*, 2005; Adam-Vizi, 2005; Tretter *et al.*, 2007; Tahara *et al.*, 2007; Kowaltowski *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2012; Quinlan *et al.*, 2013)

Após realizar estas observações nós hipotetizamos que flavoenzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos (ETF, ETF-DH, ou acil CoA desidrogenases) poderiam ser a fonte de oxidantes responsável pelos aumentos na detecção de peróxido de hidrôgenio no grupo HFD. Não surpreendentemente, encontramos aumentos na expressão de várias acil-CoA desidrogenases em mitocôndrias HFD, além de subunidades de ETF (Figura 10). Quando testamos a atividade destas enzimas usando diferentes tamanhos de cadeias carbônicas de grupos acil-CoA (Thorpe e Kim, 1995; Ghisla *et al.*, 2004) apenas a VLCAD foi aumentada (Figura 11 A). De fato, nós conseguimos esclarecer que a VLCAD é a mais provável fonte de H_2O_2 induzida por dietas hiperlipídicas com a descoberta de que a liberação de ERO ocorreu adicionando palmitoil-CoA tanto às mitocôndrias permeabilizadas quanto intactas (Figuras 4 D, 11 B-

C). É importante salientar que isto não elimina a possibilidade de haver participação de outras fontes de ERO mitocondriais em nosso modelo, mas sugere que a VLCAD é a fonte que mais contribui para as diferenças entre os grupos controle e HFD. Curiosamente, os aumentos na atividade de VLCAD (Figura 11 A) e liberação de peróxido de hidrogênio (Figuras 11 B-C) são proporcionais. Além disso, NAD^+ inibiu a liberação de H_2O_2 proporcionalmente nos grupos experimentais (Figura 13). Com relação ao efeito de NAD^+ sobre a diminuição de ERO gerado pela β-oxidação, pode-se explicar este fenômeno pelo deslocamento do equilíbrio de 3-hidroxiacil-CoA no sentido do consumo. Isto porque a remoção de intermediários reduzidos possibilita uma oxidação mais eficiente de metabólitos e uma consequente menor probabilidade de vazamento de elétrons para o oxigênio. Hidroxiacil-CoA é um intermediário da β-oxidação, e é oxidado pela 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, reduzindo NAD^+. Desta forma, a adição de NAD^+ permite um maior consumo de hidroxiacil-CoA e uma menor liberação de ERO pelos passos metabólicos anteriores a esta reação (Müller, 1978).

Esta é a primeira descrição, de nosso conhecimento, de que a VLCAD poderia ser uma fonte geradora de ERO. Curiosamente, apesar de todas as acil-CoAs desidrogenases disporem dos mesmos mecanismos catalíticos (Ghisla *et al.*, 2004; Kim e Miura, 2004), a reatividade com o oxigênio não é necessariamente equivalente. SCAD e MCAD não apresentam afinidades significativas com o oxigênio (Kim e Miura, 2004). As estruturas cristalográficas da VLCAD foram determinadas por McAndrew (2008) e indicam que o bolsão catalítico é significativamente maior para as VLCADs em relação às outras enzimas da família das ACADs. Este fato poderia ser uma explicação para a ineficiência em prevenir a presença de oxigênio no sítio catalítico da enzima, o que permite o vazamento de elétrons da flavina reduzida para o oxigênio gerando ERO. Este mecanismo ocorre em outro membro da família das ACADs: Uma acil-CoA desidrogenase da bactéria *M. elsdenii* pode reagir diretamente com oxigênio (Thorpe e Kim, 1995; Kim e Miura, 2004). Esta reação ocorre mais proeminentemente porque esta isoforma apresenta uma mutação de resíduo de aminoácidos fenilalanina ao invés de triptofano na posição 166. O resíduo de triptofano 166 é extremamente conservado nas ACADs. Acredita-se que este resíduo proteja a porção contendo dimetilbenzeno do anel da flavina das moléculas de oxigênio (Williamson e Engel, 1984). Outros estudos são requeridos para determinar como a VLCAD poderia produzir ERO sob nossas condições experimentais.

Apesar do aumento da geração de ERO poder ser explicado somente pelo aumento da expressão de VLCADs em nosso modelo, não é possível descartar o papel

de modificações moleculares que possam interferir em sua atividade enzimática. Kabuyama e colaboradores (2010) demonstraram que a fosforilação de uma serina 586 diminui a atividade de VLCAD e está associada a um desbalanço do estado redox em células HEK293, sugerindo que esta mudança pós traducional pode alterar propriedades redox celulares da célula como um todo. Corroborando com este fato, um estudo recente (Rodrigues e Gomes, 2012) demonstrou que interações proteína-proteína entre a MCAD e ETF desestabilizam a a flavosemiquinona da ETF, diminuindo o vazamento de elétrons para o oxigênio. É possível que mecanismos similares ocorram entre a VLCAD e a ETF. Isto significa que dependendo da interação entre a acil-CoA desidrogenase e a ETF pode haver maior ou menor liberação de ERO dependendo de como é feita esta interação.

Resumidamente, este trabalho demonstrou a importância da participação da VLCAD na geração de EROs mitocondriais, fenômeno este induzido por dietas hiperlipídicas. Este trabalho constitui um conjunto de dados experimentais que apontam estas flavoenzimas como um fator importante na geração de ERO mitocondriais.

6. CONCLUSÕES

Foi demonstrado com este trabalho que dietas hiperlipídicas de curta duração levam a um aumento na produção de EROs através de uma fonte previamente não descrita, a acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (VLCAD). Este achado se adiciona a descobertas anteriores que destacam a importância de fontes mitocondriais de oxidantes distintas da cadeia de transporte de elétrons (Andreyev *et al.*, 2005; Adam-Vizi, 2005). A descoberta de que EROs gerados através de VLCAD são regulados por dietas hiperlipídicas sugere que este mecanismo pode ser central para a manutenção do estado redox celular, sob diferentes circunstâncias metabólicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam-Vizi V. (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. Antioxid Redox Signal 7: 1140-1149.

Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry 2: 200-214.

Anstee QM, Goldin RD. (2006) Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. Int J Exp Pathol 87: 1-16.

Aoyama T, Souri M, Ushikubo S, Kamijo T, Yamaguchi S, Kelley RI, Rhead WJ, Uetake K, Tanaka K, Hashimoto T. (1995) Purification of human very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase and characterization of its deficiency in seven patients. J Clin Invest 95: 2465-2473.

Battaile KP, Molin-Case J, Paschke R, Wang M, Bennett D, Vockley J, Kim JJ. (2002) Crystal structure of rat short chain acyl-CoA dehydrogenase complexed with acetoacetyl-CoA: comparison with other acyl-CoA dehydrogenases. J Biol Chem 277: 12200-12207.

Beck V, Jabůrek M, Demina T, Rupprecht A, Porter RK, Jezek, P. (2007) Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. The FASEB J 21:1137-1144.

Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. (2006) Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. Mitochondrion 6: 1-28.

Bender E, Kadenbach B. (2000) The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. FEBS Let 466: 130-134.

Boveris A, Chance B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J 134: 707-716.

Brand MD. (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. Exp Gerontol 45: 466-472.

Cancherini DV, Trabuco LG, Rebouças NA, Kowaltowski AJ. (2003) ATP-sensitive K^+ channels in renal mitochondria. Am J Physiol 285: 1291-1296.

Cardoso AR, Cabral-Costa JV, Kowaltowski AJ. (2010) Effects of a high fat diet on liver mitochondria: increased ATP-sensitive K^+ channel activity and reactive oxygen species generation. J Bioenerg Biomembr 3: 245-253.

Cardoso AR, Chausse B, da Cunha FM, Luévano-Martínez LA, Marazzi TB, Pessoa PS, Queliconi BB, Kowaltowski AJ. (2012) Mitochondrial compartmentalization of redox processes. Free Radic Biol Med 52: 2201-2208.

Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR., Bechara EJ, Vercesi AE. (1995) Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. Free Radic Biol Med 18: 479-86.

Cerqueira FM, da Cunha FM, Caldeira da Silva CC, Chausse B, Romano RL, Garcia CC, Colepicolo P, Medeiros MH, Kowaltowski AJ. (2011) Long-term intermittent feeding, but not caloric restriction, leads to redox imbalance, insulin receptor nitration, and glucose intolerance. Free Radic Biol Med 51: 1454-1460.

Chao FF, Stiers DL, Ontko, JA. (1986) Hepatocellular triglyceride synthesis and transfer to lipid droplets and nascent very low density lipoproteins. J Lipid Res 27: 1174-1181.

Cocco T, Di Paola M, Papa S, Lorusso M. (1999) Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. Free Radic Biol Med 27: 51-59.

Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. (2011) Human fatty liver disease: old questions and new insights. Science 6037: 1519-1523.

Cook GA, Gamble MS. (1987) Regulation of carnitine palmitoyltransferase by insulin results in decreased activity and decreased apparent Ki values for malonyl-CoA. J Biol Chem 262: 2050-2055.

Day CP, James OF. (1998) Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterol 114: 842-845.

Dentin R, Pégorier J, Benhamed F, Foufelle F, Ferré P, Fauveau V. (2004) Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. J Biol Chem 279: 20314-20326.

Ferranti R, da Silva MM, Kowaltowski AJ. (2003) Mitochondrial ATP-sensitive K+ channel opening decreases reactive oxygen species generation. FEBS Lett 536: 51-55.

Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferré P, Foufelle F. (1998) AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. J Biol Chem 273: 14767-14771.

Fridovich I. (1978) Superoxide dismutases: defense against endogenous superoxide radical. Ciba Found Symp 65: 77-93.

Fromenty B, Pessayre D. (1995) Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. Pharmacol Therapeut 67: 101-154.

Ge F, Lobdell H IV, IV, Zhou S, Hu C, Berk PD. (2010) Digital analysis of hepatic sections in mice accurately quantitates triglycerides and selected properties of lipid droplets. Exp Biol Med 235: 1282-1286.

Ghisla S, Thorpe C. (2004) Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview. Eur J Biochem 271: 494-508.

Hebbard L, George J. (2011) Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 8: 35-44.

Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan, TW. (1998) Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. Cell Tissue Res 294: 309-321.

Hornbeck PV, Kornhauser JM, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, Sullivan M. (2012) PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. Nucleic Acids Res 40: D261-270.

Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. (2004) Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. Proc Natl Acad Sci 101: 7281-7286.

Jarmuszkiewicz W, Almeida AM, Sluse-Goffart CM, Sluse FE, Vercesi AE. (1998) Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial protein in purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration. J Biol Chem 273: 34882-34886.

Jezek P, Zácková M, Růzicka M, Skobisová E, Jabůrek M. (2004) Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies. Physiol Bohemoslov 53: 199-211.

Kabuyama Y, Suzuki T, Nakazawa N, Yamaki J, Homma MK, Homma Y. (2010) Dysregulation of very long chain acyl-CoA dehydrogenase coupled with lipid peroxidation. Am J Physiol 298: 107-113.

Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. J Clin Invest 103: 1489-1498.

Kim JJ, Miura R. (2004) Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences. Eur J Biochem 271: 483-493.

Kim JJ, Wu J. (1990) Structural studies of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria. Prog Clin Biol Res 321: 569-576.

Kim JJP, Wang M, Paschke R. (1993) Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate. Proc Natl Acad Sci USA 90: 7523-7527.

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.

Kowaltowski A J, Costa AD, Vercesi AE. (1998) Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. FEBS Lett 425: 213-216.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med 47: 333-343.

Lazennec G, Canaple L, Saugy D, Wahli W. (2000) Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. Mol Endocrinol 14: 1962-1975.

Leite AC, Oliveira HC, Utino FL, Garcia R, Alberici LC, Fernandes MP, Castilho RF, Vercesi AE. (2010) Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. Biochim Biophys Acta 1797: 1210-1216.

Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. Nat Genet 11: 376-381.

Liu SS. (1999) Cooperation of a "reactive oxygen cycle" with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain-superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria. J Bioenerg Biomembr 31: 367-376.

Louet J, Hayhurst G, Gonzalez FJ, Girard J, Decaux J. (2002) The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). J Biol Chem 277: 37991-38000.

Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. FEBS Lett 42: 68-72.

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.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. (1980) Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc 55: 434-438.

Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-Usmar VM, Bailey SM. (2009) High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. Biochem J 1: 183-193.

Matsubara Y, Indo Y, Naito E, Ozasa H, Glassberg R, Vockley J, Ikeda Y, Kraus J, Tanaka K. (1989) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the precursors of rat long chain acyl-coenzyme A, short chain acylcoenzyme A, and isovaleryl-coenzyme A dehydrogenases. Sequence homology of four enzymes of the acyl-CoA dehydrogenase family. J Biol Chem 264: 16321-16331.

McAndrew RP, Wang Y, Mohsen AW, He M, Vockley J, Kim JJ. (2008) Structural basis for substrate fatty acyl chain specificity: crystal structure of human very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. J Biol Chem 283: 9435-9443.

McGarry JD, Foster DW. (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. Annu Rev Biochem 49: 395-420.

McGarry JD, Foster DW. (1981) Importance of experimental conditions in evaluating the malonyl-CoA sensitivity of liver carnitine acyltransferase. Studies with fed and starved rats. Biochem J 200: 217-223.

Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature 8: 144-1448.

Müller F. (1978) Flavin radicals: chemistry and biochemistry. Free Radic Biol Med 3: 215-230.

Murphy MP, Echtay KS, Blaikie FH, Asin-Cayuela J, Cocheme HM, Green K. (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-butylnitrone. J Biol Chem 278: 48534-48545.

Nakajima Y, Miyahara I, Hirotsu K, Nishina Y, Shiga K, Setoyama C, Tamaoki H, Miura R. (2002) Three-dimensional structure of the flavoenzyme acyl-CoA oxidase-II from rat

liver, the peroxisomal counterpart of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase. J Biochem 131: 365-374.

Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R. (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. FASEB J 11: 809-815.

Osmundsen H, Bremer J, Pedersen JI. (1991) Metabolic aspects of peroxisomal beta-oxidation. Biochim Biophys Acta 1085: 141-158.

Pessayre D, Fromenty B. (2005) NASH: a mitochondrial disease. J Hepatol 42: 928-940.

Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. (2004) Mitochondrial injury in steatohepatitis. Eur J Gastroen Hepat 16: 1095-1105.

Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. (2002) Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. Am J Physiol 282: 193-199.

PhosphoSitePlus® (PSP). Produced by 3rd Millennium | Design by Digizyme ©2003-2013 Sponsor: Cell Signaling Technology, Inc. <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=1171542&showAllSites=true> Acesso em: 18 abr. 2014

Quistorff B, Katz N, Witters LA. (1992) Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of fatty acids: discrepancies on zonation of acetyl-CoA carboxylase. Enzyme 46: 59-71.

Ramesh S, Sanyal A J. (2005) Evaluation and management of non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol 42: 2-12.

Rodrigues JV, Gomes CM. (2012) Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide generation by human electron-transfer flavoprotein and pathological variants. Free Radic Biol Med 53: 12-19.

Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. (2012) Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Free Radic Biol Med 1: 59-69.

Sarre A, Gabrielli J, Vial G, Leverve XM, Assimacopoulos-Jeannet F. (2012) Reactive oxygen species are produced at low glucose and contribute to the activation of AMPK in insulin-secreting cells. Free Radic Biol Med 52:142-150

Seifert EL, Estey C, Xuan JY, Harper ME. (2010) Electron transport chain-dependent and independent mechanisms of mitochondrial H_2O_2 emission during long-chain fatty acid oxidation. J Biol Chem 285: 5748-5758.

Schönfeld P, Dymkowska D, Wojtczak L. (2009) Acyl-CoA-induced generation of reactive oxygen species in mitochondrial preparations is due to the presence of peroxisomes. Free Radic Biol Med 5: 503-509.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. Biochim Biophys Acta 1302: 93-109.

Schrader M, Fahimi HD. (2004) Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. Histochem Cell Biol 122: 383-393.

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. J Biol Chem 277: 44784-44790.

Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. (2004) Mitochondrial a-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. J Neurosci 24: 7779-7788.

Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. Nature 216: 173-174.

Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. (2009) Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. Free Radic Biol Med 46: 1283-1297.

Tahara EB, Barros MH, Oliveira GA, Netto LE, Kowaltowski AJ. (2007) Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in Saccharomyces cerevisiae aging. FASEB J 21: 274-283.

Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. (2009) Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. Free Radic Biol Med 9: 1283-1297.

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: 111-115.

Thorpe C, Kim JJ. (1995) Structure and mechanism of action of the Acyl-CoA dehydrogenases. FASEB J 9: 718-725.

Turrens JF. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol 552: 335-344.

Tran K, Thorne-Tjomsland G, DeLong CJ, Cui Z, Shan J, Burton L. (2002) Intracellular assembly of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B100 in rat hepatoma McA-RH7777 cells. J Biol Chem 277: 31187-31200.

Tretter L, Adam-Vizi V. (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. J Neurosci 24: 7771-7778.

Tretter L, Takacs K, Hegedus V, Adam-Vizi VJ. (2007) Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H_2O_2 generation in brain mitochondria. Neurochem 100: 650-663.

Quinlan CL1, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD. (2013) Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. Redox Biol 1: 304-312.

Vial G, Dubouchaud H, Couturier K, Cottet-Rousselle C, Taleux N, Athias A, Galinier A, Casteilla L, Leverve XM. (2011) Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. J Hepatol 54: 348-356.

Warwick ZS, Weingarten HP. (1994) Dynamics of intake suppression after a preload: role of calories, volume, and macronutrients. Am J Physiol 266: 1314-1318.

Williamson G, Engel PC. (1984) Butyryl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. Specificity of the catalytic reaction. Biochem J 218: 521-529.

Xu W, Charles IG, Moncada S. (2005) Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. Cell Res 15: 63-65.

You M, Matsumoto Mu, Pacold CM, Cho WK, Crabb DW. (2004) The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. Gastroenterology 127: 1798-1808.

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.

Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. (2006) High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Life Sci 79: 1100-1107.

ANEXOS

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Ariel Rodrigues Cardoso
Local e data de nascimento: São Paulo, 29/11/1982

EDUCAÇÃO

Formado em 2000 no Colégio E.E.S.G Brasílio Machado, Vila Mariana, São Paulo, SP

Universidade, local, ano: Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2006.
Graduação (Modalidade): Ciências Biológicas, Bacharelado pelo Instituto de Biociências da USP

Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica) 2007-2009, orientadora Dra. Alicia Juliana Kowaltowski: Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, pelo Instituto de Química-USP.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado pela CAPES de maio de 2009 a maio de 2013

Bolsista da CAPES de doutorado sanduíche PDSE na Medical University of South Carolina de março a outubro de 2013

PUBLICAÇÕES

Cardoso, Ariel R.; Kowaltowski, Alicia J. Effects of a high fat diet on liver mitochondria: increased ATP-sensitive K^+ channel activity and reactive oxygen species generation. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 42, p. 245-253, 2010.

Cardoso, Ariel R.; Queliconi, Bruno B.; Kowaltowski, Alicia J. Mitochondrial ion transport pathways: Role in metabolic diseases. Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics, v. 1797, p. 832-838, 2010.

Cardoso, Ariel R.; Chausse, Bruno; da Cunha, Fernanda M.; Luévano-Martínez, Luis A.; Marazzi, Thire B.M.; Pessoa, Phillipe S.; Queliconi, Bruno B.; Kowaltowski, Alicia J. Mitochondrial compartmentalization of redox processes. Free Radical Biology & Medicine, v. 52, p. 2201-2208, 2012.

Cardoso, Ariel R.; Kakimoto, Pâmela A.; Kowaltowski, Alicia J. Diet-sensitive sources of reactive oxygen species in liver mitochondria: role of very long chain acyl-CoA dehydrogenases. PLoS One, 8: e77088, 2013.

Capítulo de Livro

Cardoso, Ariel R.; Queliconi, Bruno B.; Kowaltowski, Alicia J. Reactive oxygen species in myocardial pre and post-conditioning. In: Heinrich Sauer; Ajay Shah; Francisco R. M. Laurindo. (Org.). Studies on Cardiovascular Disorders. 1 ed. Humana Press, 2010, v. , p. 109-123.

Participações em congressos

Cardoso, A. R.; Kowaltowski, A. J. Effect of a high fat diet on mitochondrial ATP sensitive potassium channels (mitoKATP), a mild uncoupling pathway. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, XI Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology Congress, 2008, Água de Lindóia. Anais, 2008.

Cardoso, Ariel R.; Cabral-Costa, João Victor; Kowaltowski, A. J. Effects of a High Fat Diet on Liver Mitochondria: Increased ATP-Sensitive K^+ channel activity and ROS generation. In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 2010, Foz do Iguaçu. Livro de resumos, 2010.

Cardoso, A. R.; Kowaltowski, A.J. Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenases as a Diet Sensitive Source of ROS. In: Free Radicals in Biology and Medicine 2012, San Diego. Livro de resumos, 2012.

Cardoso, A. R.; Kowaltowski, A.J. Steatosis and Mitochondria: Impact of Lipid Oxidation on Bioenergetics and Reactive Oxygen Species Production. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012, Foz do Iguaçu. Livro de resumos, 2012.

Organização de eventos:

Terceiro Encontro da Pós-graduação IQ-USP. 2011. Atuei como organizador de palestras, calendário, fui autor do projeto aprovado pela Fapesp como patrocínio do evento.