UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

HEBERTY DI TARSO FERNANDES FACUNDO

**Efeitos Redox e Protetores do Pré-Condicionamento
Isquêmico e da Abertura do Canal Mitocondrial de
Potássio Sensível a ATP Contra Morte Celular por
Isquemia e Reperfusão Cardíaca**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
06/02/2007

HEBERTY DI TARSO FERNANDES FACUNDO

**Efeitos Redox e Protetores do Pré-Condicionamento
Isquêmico e da Abertura do Canal Mitocondrial de
Potássio Sensível a ATP Contra Morte Celular por
Isquemia e Reperfusão Cardíaca**

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

Orientadora: Profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski

São Paulo
2007

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Alicia Juliana Kowaltowski pela sua presteza, atenção, incentivo, amizade e, acima de tudo, pela sua orientação durante a construção dos experimentos e execução dos trabalhos.

Aos meus companheiros de laboratório Erich Tahara, Maynara Fornazari, Douglas Cancherini, Graciele Oliveira e Bruno Queliconi pela amizade e apoio na execução deste trabalho.

Aos meus primos Franciulo Bezerra e Cícero Roberto Bezerra por terem sempre me apoiado, principalmente quando cheguei na cidade de São Paulo.

Ao meu Tio Paulo Bezerra pela ajuda prestada.

Aos meus familiares, meu pai, minha mãe e meus irmãos que sempre me apoiaram e me ensinaram que a educação talvez não seja a solução para todos os problemas, mas que é um grande passo nessa direção.

Ao Professor Robert Balaban que me acolheu em seu laboratório e pelos ensinamentos sempre bem vindos.

Ao apoio técnico e à amizade dos profissionais Camille Caldeira Ortiz e Edson de Souza, que com os seus trabalhos viabilizaram a execução dos experimentos.

Ao Professor Etelvino Bechara da pós-graduação do Instituto de Química da USP pelas discussões sobre os assuntos deste trabalho.

À Juliana de Paula, pela contribuição durante seu estágio de iniciação científica no qual conduzimos experimentos essenciais para publicações relacionadas a esta tese.

A minha esposa Camila Flávia Facundo pelo apoio e companheirismo, mas, acima de tudo, pela paciência e compreensão dos momentos bioquímicos.

Ao Professor Chico Laurindo e a Raquel Carrera pela colaboração nos trabalhos.

A minha amiga Ana Catarina pelo incentivo e amizade.

Finalmente à FAPESP, CNPq, NIH, Guggenheim Foundation e Instituto do Milênio Redoxoma pelo apoio financeiro.

RESUMO

Facundo, H.T.F **Efeitos Redox e Protetores do Pré-Condicionamento Isquêmico e da Abertura do Canal Mitocondrial de Potássio Sensível a ATP Contra Morte Celular por Isquemia e Reperfusão Cardíaca**. 2007. 94 páginas. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Eventos isquêmicos seguidos por reperfusão levam ao dano celular e mitocondrial devido à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). Todavia, o pré-condicionamento evita o dano celular por isquemia e reperfusão. Esse efeito protetor é semelhante ao obtido pela abertura do canal mitocondrial de potássio sensível a ATP (mitoK_{ATP}). Aqui, nós mostramos o mecanismo de sinalização que ativa o mitoK_{ATP} durante o pré-condicionamento, o papel redox deste canal e seu conseqüente mecanismo protetor. Usando células cardíacas HL-1, nós demonstramos que aumentos em espécies reativas de oxigênio (EROs) observadas durante o pré-condicionamento não foram revertidos por antagonistas do mitoK_{ATP}, que significativamente evitaram a proteção pelo pré-condicionamento. Isso sugere que essas espécies são formadas anteriormente à abertura do canal. Consistente com essa hipótese, a adição de catalase a corações perfundidos de rato e a células HL-1 promove reversão dos efeitos benéficos do pré-condicionamento, mas não do diazóxido (um agonista do mitoK_{ATP}). Por outro lado, 2-mercaptopropionil glicina preveniu a cardioproteção em ambos os casos, sugerindo que este composto deve apresentar outros efeitos além de antioxidante. De fato, verificamos que agentes redutores tiólicos interferem na ativação do mitoK_{ATP} mediada pelo diazóxido em mitocôndrias isoladas de coração de rato. Examinando como o mitoK_{ATP} pode ser ativado durante o pré-condicionamento, constatamos que EROs endógenas e exógenas fortemente ativaram o mitoK_{ATP}, sugerindo que o moderado aumento nas EROs durante o pré-condicionamento pode ativar esse canal. Uma vez ativado, o canal preveniu as condições (captação de Ca²⁺ e formação de EROs) que favorecem a ocorrência de TPM em situação de isquemia. A atividade deste canal também leva à diminuição de EROs gerados fisiologicamente ou durante períodos de isquemia e reperfusão, evitando o dano celular conseqüente. Este fato não envolveu nenhum aumento nos sistemas de remoção de oxidantes. Por outro lado, a inibição da TPM, usando ciclosporina A, preveniu o estresse oxidativo somente durante a reperfusão, mas protegeu as células de maneira indistinguível da abertura do mitoK_{ATP}. Juntos, nossos resultados sugerem que o mitoK_{ATP} age como um sensor para as EROs que diminui a sua geração em resposta a níveis aumentados de oxidantes. Em conseqüência, estes canais regulam o balanço redox em condições fisiológicas e previnem o estresse oxidativo em condições patológicas, inibindo com isso a ocorrência de TPM e morte celular isquêmica.

Palavras-chave: pré-condicionamento isquêmico, espécies reativas de oxigênio, canal mitocondrial de potássio, isquemia/reperfusão.

ABSTRACT

Facundo, H.T.F **Redox and Protective Effects of Ischemic Preconditioning and Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels Against Cardiac Cell Death Promoted by Ischemia and Reperfusion**. 2007. 94 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ischemia followed by reperfusion results in impairment of cellular and mitochondrial functionality due to opening of mitochondrial permeability transition (MPT) pores. Nevertheless, preconditioning rescues cells from ischemic damage. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel (mitoK_{ATP}) opening also prevents cardiac ischemic cell death. Here we show the signaling mechanisms that activate mitoK_{ATP} during preconditioning, the redox role of these channels and consequent protective mechanisms. Using cardiac HL-1 cells, we found that increases in reactive oxygen species (ROS) observed during preconditioning were not inhibited by mitoK_{ATP} antagonists, although these drugs significantly avoided the protection afforded by preconditioning, suggesting their activation occurs upstream of channel activity. Consistent with this, catalase addition to perfused rat hearts and HL-1 cells reversed the beneficial effects of preconditioning, but not of diazoxide (a mitoK_{ATP} agonist). On the other hand, 2-mercaptopropionylglycine prevented cardioprotection in both cases, suggesting this compound may present effects other than scavenging ROS. Indeed, thiol reducing agents impaired diazoxide-mediated activation of mitoK_{ATP} in isolated rat heart mitochondria. We found that endogenous or exogenous ROS strongly enhanced mitoK_{ATP} activity, suggesting that moderate increments in ROS release during preconditioning may activate mitoK_{ATP}. Furthermore, mitoK_{ATP} prevented conditions (Ca²⁺ uptake and ROS formation) that favor the opening of MPT pores under ischemic conditions. MitoK_{ATP} opening decreased ROS generation physiologically and during both ischemia and reperfusion, consequently avoiding cellular damage. This prevention does not involve an increase in oxidant removal systems. On the other hand, the inhibition of MPT, using cyclosporin A, prevented oxidative stress only during simulated reperfusion, but protected cells in a manner indistinguishable from mitoK_{ATP} opening. Collectively, our results suggest that mitoK_{ATP} acts as a ROS sensor that decreases mitochondrial ROS generation in response to enhanced local levels of oxidants. As a result, these channels regulate mitochondrial redox state under physiological conditions and prevent oxidative stress under pathological conditions, inhibiting MPT opening and ischemic cardiac damage.

Keywords: ischemic preconditioning, reactive oxygen species, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels, ischemia/reperfusion.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA = Antimicina A
ATP = Adenosina trifosfato
CsA = Ciclosporina A
CCCP = Carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona
Cat = Catalase
DCF = Diclorofluoresceína
DMSO = Dimetilsulfóxido
DTT = Ditionitrito
DZX = Diazóxido
EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético
FAD = Flavina adenina dinucleotídeo
EGTA = Ácido etilenglicoltetracético
EROs = Espécies reativas de oxigênio
GLY = Glibenclamida
GTP = Guanosina trifosfato
Glut = Glutamato
Hepes = 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinoetanosulfônico
HRP = Peroxidase de raiz forte
5-HD = 5-hidroxidecanoato
H₂DCF-DA = 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato
IR = Isquemia/reperfusão
LDH = Lactato desidrogenase
Mal = Malato
MPG = 2-Mercaptopropionil glicina
mitoK_{ATP} = Canal mitocondrial de K⁺ sensível a ATP
mitoSUR = Receptor de sulfoniluréia mitocondrial
mitoKIR = *Mitochondrial K⁺ inner rectifier* (transportador de K⁺ da membrana interna mitocondrial)
NAC = N-acetilcisteína
Pi = Fosfato inorgânico
PI = Pré-condicionamento isquêmico
S.E. = Erro padrão
SDS-PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TPM = Transição de permeabilidade mitocondrial
Tris = Trihidroximetilaminometano
U.A. = Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1. O Canal de K ⁺ Sensível a ATP.....	10
1.2. Pré-Condicionamento Isquêmico.....	15
1.3. Espécies Reativas de Oxigênio.....	17
1.4. Transição de Permeabilidade Mitocondrial.....	21
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Materiais.....	26
3.2. Animais.....	26
3.3. Cultura das Células HL-1.....	26
3.4. Pré-condicionamento e Isquemia/reperfusão em Células.....	27
3.5. Avaliação da Vitalidade Celular.....	28
3.6. Medida Intracelular da Geração de EROs.....	28
3.7. Remoção de H ₂ O ₂	29
3.8. Efeitos do Diazóxido sobre a Fluorescência do DCF.....	29
3.9. Isolamento de Mitocôndrias.....	30
3.10. Inchamento Mitocondrial.....	30
3.11. Medida da Captação Mitocondrial de Ca ²⁺	30
3.12. Medida da Geração Mitocondrial de EROs.....	31
3.13. Potencial de Membrana Mitocondrial.....	31
3.14. Microscopia Eletrônica.....	31
3.15. Fluorescência de NAD(P)H em Células.....	32
3.16. Perfusão de Coração de Rato.....	32
3.17. Atividade da Lactato Desidrogenase.....	33
3.18. Medida do Consumo de O ₂ Celular.....	33
3.19. Análise de Dados e Estatística.....	34
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS.....	70
LISTA DE ANEXOS.....	84
A. Anexo A.....	84
Título: Mitochondrial ATP-Sensitive K ⁺ Channels Prevent Oxidative Stress, Permeability Transition and Cell Death.	
B. Anexo B.....	85
Título: Mitochondrial K ⁺ Transporte and Cardiac Protection During Ischemia/Reperfusion.	

C. Anexo C.....	86
Título: Letter regarding article by Argaud <i>et al.</i> , "postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition".	
D. Anexo D.....	87
Título: Tissue Protection Mediated by Mitochondrial K ⁺ Channels.	
E. Anexo E.....	88
Título: Ischemic Preconditioning Requires Increases In Reactive Oxygen Release Independent Of Mitochondrial K ⁺ Channel Activity.	
F. Anexo F.....	89
Título: Mitochondrial ATP-Sensitive K ⁺ Channels are Redox-Sensitive Pathways that Control Reactive Oxygen Species.	
SÚMULA CURRICULAR.....	90

1. INTRODUÇÃO

O pré-condicionamento cardíaco, descrito por Murry *et al.* (1986), é um mecanismo protetor endógeno no qual breves períodos de isquemia e reperfusão levam à resistência do miocárdio a posteriores períodos mais longos de isquemia. Primeiramente descrito em corações isolados, esse evento também está presente em muitas espécies animais, incluindo em cardiomiócitos humanos isolados (Tomai *et al.*, 1999). Entretanto, a cadeia de eventos que confere resistência à isquemia é pouco entendida. Vários estudos sugeriram diversos mecanismos distintos, porém, não é claro como esses mecanismos estão inter-relacionados.

Na morte celular isquêmica, drogas de ação mitocondrial podem prevenir os danos celulares, de modo semelhante ao pré-condicionamento cardíaco (Garlid *et al.*, 1997, Halestrap *et al.*, 1998), sugerindo a participação mitocondrial neste processo. Realmente, sabe-se que o pré-condicionamento leva a uma melhora das funções mitocondriais após o período isquêmico, incluindo a prevenção da perda de citocromo *c*, a manutenção da integridade da membrana mitocondrial interna, a preservação da função respiratória e a manutenção da capacidade adequada de fosforilar ADP e creatina (dos Santos *et al.*, 2002). Estes achados estão de acordo com as funções conhecidas da mitocôndria, que além de produzir a maior parte dos compostos fosfatados ricos em energia, participa do processo de morte celular apoptótica (para revisão ver Mignotti e Vayssiere, 1998, Kroemer e Reed, 2000, Newmeyer e Ferguson-Miller, 2003), da manutenção da homeostase intracelular do cálcio (Gunter *et al.*, 1998), termogênese (Kowaltowski, 2000) e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs - Kowaltowski e Vercesi, 1999, 2001b, Turrens, 2003).

Um mecanismo pelo qual o pré-condicionamento cardíaco pode promover a manutenção de funções mitocondriais é através da regulação da liberação de EROs pela cadeia de transporte de elétrons. Em condições normais, uma pequena porção do oxigênio reduzido pela cadeia respiratória mitocondrial é convertida ao radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Kowaltowski e Vercesi, 2001, St-Pierre *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2002). Um aumento moderado

de EROs mitocondriais, de acordo com o estudo conduzido por Vanden Hoek *et al.* (1998), está envolvido na sinalização que ativa os processos protetores durante o pré-condicionamento cardíaco. Deste modo, a proteção contra a isquemia promovida pelo pré-condicionamento é abolida por antioxidantes (Chen *et al.*, 1995). Sabe-se também que o pré-condicionamento de corações intactos aumenta a geração mitocondrial de EROs (da Silva *et al.*, 2003; Facundo *et al.*, 2006).

Outro mecanismo pelo qual o pré-condicionamento pode prevenir o dano isquêmico é pela regulação do transporte de Ca^{2+} e K^{+} mitocondriais. Enquanto um aumento de transporte de Ca^{2+} mitocondrial pode ser lesivo durante a reperfusão (Halestrap *et al.*, 1998), a ativação do canal mitocondrial de K^{+} sensível a ATP (mitoK_{ATP}) protege contra danos isquêmicos (Garlid *et al.*, 1997).

1.1. O Canal de K^{+} Sensível a ATP

A primeira evidência que canais mediavam o fluxo K^{+} em células foi dada por experimentos conduzidos por Hodgkin and Keynes em 1955. Usando axônios, eles mostraram o fluxo do isótopo $^{42}\text{K}^{+}$ através das membranas dessas células. Após duas décadas, foi demonstrado através de métodos eletrofisiológicos que íons cruzam as membranas celulares através de poros proteicos específicos para cada tipo de íon (Hille, 1973).

A primeira evidência da existência de um canal de K^{+} que introduzisse este íon na matriz mitocondrial foi difícil de ser estabelecida devido à existência de um constante influxo deste íon em direção à matriz favorecido pela diferença de potencial entre o lado interno (negativo) e o lado externo (positivo) da membrana mitocondrial interna (para revisão ver Garlid e Paucek, 2001). Os primeiros a demonstrarem esse evento o fizeram isolando a proteína do canal e reconstituindo-a em lipossomos (Mironova *et al.*, 1981; Diwan *et al.*, 1988). Todavia, a regulação deste canal foi pobremente descrita nesses experimentos preliminares. Posteriormente, a técnica de *Patch Clamp*,

desenvolvida por Neher e Sakman em 1976, foi usada por Inoue *et al.* (1991), para demonstrar que mitocôndrias de mamíferos possuem um canal que transporta K^+ de maneira sensível a ATP (mitoK_{ATP}) na membrana interna. Esse canal foi posteriormente isolado e reconstituído em lipossomos por Paucek *et al.* (1992), e pôde-se comprovar que possui grande semelhança funcional com o canal de K^+ sensível a ATP da membrana plasmática. Apesar da semelhança estrutural, o canal mitocondrial apresenta uma resposta diferenciada à ativação por drogas. Como exemplo, o mitoK_{ATP} é cerca de 2000 vezes mais sensível à abertura por diazóxido (DZX), e é inibido especificamente por 5-hidrodecanoato (5-HD - Garlid *et al.*, 1996; Jaburek *et al.*, 1998).

Devido ao seu alto potencial de membrana, a mitocôndria apresenta um constante vazamento de cátions, em especial o K^+ , pela sua membrana interna. Para compensar esse vazamento de K^+ , a mitocôndria possui um trocador de K^+/H^+ , cuja principal função é evitar o acúmulo excessivo de K^+ na matriz, que resultaria em inchamento e ruptura da organela (veja Garlid e Paucek, 2001) – ver esquema demonstrativo na Fig. 1. Recentemente, o nosso grupo demonstrou que o mitoK_{ATP} poderia agir como um canal regulado para a entrada de K^+ , permitindo o controle do volume mitocondrial independentemente de pequenas mudanças no potencial de membrana (Kowaltowski *et al.*, 2001a). A manutenção do volume determina uma baixa permeabilidade da membrana plasmática a ATP, diminuindo a hidrólise de ATP durante a isquemia e preservando energeticamente o tecido isquêmico (Belisle e Kowaltowski, 2002, dos Santos *et al.*, 2002)

Figura 1: Transporte de K^+ através das membranas mitocondriais. A membrana mitocondrial interna apresenta um escape de K^+ para o seu interior que depende do potencial de membrana gerado pelo bombeamento de H^+ pela cadeia transportadora de elétrons. A abertura do mitoK_{ATP} permite a entrada de K^+ na matriz causando um aumento no volume. O excesso de K^+ pode ser removido pelo trocador K^+/H^+ . A membrana mitocondrial externa, por sua vez, é livremente permeável a íons. mitoK_{ATP} = canal mitocondrial de K^+ sensível a ATP.

O íon potássio é o cátion mais abundante no citosol celular, estando presente também na matriz mitocondrial em concentrações (~150 mM, Kowaltowski *et al.*, 2002) similares às aquelas do citosol. A entrada de K^+ na matriz mitocondrial é acompanhada da difusão de água na matriz e da entrada do íon fosfato (P_i), resultando em um volume aumentado da matriz (para revisão ver Garlid e Paucek 2003). Desse modo, uma forma interessante e fácil de identificar o fluxo de potássio usando uma preparação de mitocôndrias é seguindo as mudanças no espalhamento de luz promovidas por inchamento ou contração mitocondrial.

Já em células, a avaliação da atividade deste canal é estudada pela avaliação da fluorescência do FAD (Liu *et al.* 1998). Neste aspecto, pode-se fazer um controle manipulando o estado redox mitocondrial com um desacoplador ou um inibidor da cadeia transportadora de elétrons, para verificar o máximo e o mínimo de flavoproteínas oxidadas. Essa é a única metodologia aplicada em células para se estudar a atividade deste canal. Entretanto, as condições ótimas para se conseguir uma resposta mensurável da abertura do mitoK_{ATP} sobre a oxidação de flavoproteínas só podem ser obtidas submetendo as células a longos períodos em ausência de glicose (Liu *et al.* 1998).

Mesmo com identificação do canal por métodos eletrofisiológicos (Inoue *et al.*, 1991) e por isolamento e reconstituição (Paucek *et al.*, 1992), a identidade molecular do canal é ainda controversa. O grupo do Professor Keith D. Garlid mostrou que uma fração purificada com coluna de DEAE-celulose foi ativa após reconstituição e foram separadas como duas bandas de 63 kDa e 55 kDa por gel de SDS-PAGE (Paucek *et al.*, 1992). O grupo da Professora Galina Mironova isolou, usando extração com etanol, uma proteína de 55 kDa com propriedades de transporte de K^+ similares ao mitoK_{ATP} (Mironova *et al.*, 1981). Esta proteína foi identificada posteriormente como a parte do complexo proteico por onde o íon passa (mitoKIR, Mironova *et al.*, 2004). A proteína de 55 kDa isolada não responde a sulfoniluréias, mas responde quando em conjunto com a proteína de 63 kDa, levando à suposição que a proteína de 63 kDa seja o receptor de sulfoniluréia (mitoSUR). De fato, esta fração liga

glibenclamida (uma sulfoniluréia) fluorescente (Bajgar *et al.*, 2001). Juntos, estes estudos sugerem que o canal mitoK_{ATP} é formado por estas duas proteínas, um achado que é consistente com a estrutura dos canais de K⁺ sensíveis a ATP da membrana plasmática. Por outro lado, o grupo do Marban (Ardehali *et al.*, 2004) propôs recentemente que o mitoK_{ATP} consiste de um complexo contendo ao menos 5 proteínas, que inclui a succinato desidrogenase, que agiria como um regulador deste canal. Este modelo estaria baseado na ação inibitória do DZX sobre a atividade da succinato desidrogenase (Dzeja *et al.*, 2003). Entretanto, os efeitos farmacológicos desta droga sobre o mitoK_{ATP} são observados em concentrações menores que as necessárias para inibir a enzima (Kowaltowski *et al.*, 2001a), sugerindo que a inibição da succinato desidrogenase seja, dessa forma, um efeito tóxico da droga. Em adição, o complexo descrito nesta hipótese não envolve qualquer proteína com propriedades de transporte transmembranar de K⁺.

Os agonistas e antagonistas do mitoK_{ATP} apresentam características indesejáveis que afetam a função celular e mitocondrial, particularmente quando usados em altas concentrações. O DZX é o agonista do mitoK_{ATP} mais amplamente usado por causa de sua seletividade para os canais de potássio mitocondriais (Garlid *et al.*, 1997) em relação aos de membrana plasmática. Porém, como já foi dito, é um potente inibidor da succinato desidrogenase quando usado em concentrações $\geq 100 \mu\text{M}$, não muito maiores do que a necessária para ativar completamente o mitoK_{ATP} em mitocôndrias isoladas (30 μM , Kowaltowski *et al.*, 2001a). Já o 5-HD, freqüentemente usado como inibidor do mitoK_{ATP} (Jaburek *et al.*, 1998), pode ser convertido para 5-hidroxidecanoato-coenzima A na mitocôndria, afetando a respiração (Hanley *et al.*, 2003) e interferindo na oxidação de ácidos graxos (Hanley *et al.*, 2005). Já a glibenclamida, outro antagonista do mitoK_{ATP}, não é seletiva para este canal, inibindo também canais de K⁺ de membrana plasmática, além de ser um forte inibidor respiratório (Jaburek *et al.*, 1998). Baseados nesses achados e nas dificuldades que muitos têm de medir mudanças de volume mitocondrial secundário à entrada de K⁺, alguns autores questionam se esses efeitos protetores de agonistas de mitoK_{ATP} podem ser atribuídos realmente ao canal (Das *et al.*, 2003). Entretanto, o grande número de dados suportando a

existência desses canais bem como a variedade de agonistas e antagonistas efetivos (cada um com seu efeito tóxico) é fortemente indicativa de seu efeito protetor e da sua presença na membrana mitocondrial interna (ver Garlid e Paucek, 2003; Facundo *et al.*, 2006b para revisões).

Graças às diferentes sensibilidades a drogas, é possível atribuir ao mitoK_{ATP} efeitos *in vivo* de medicamentos que abrem ou fecham canais de K⁺ na membrana plasmática ou mitocondrial. Através do uso de DZX e 5-HD, verificou-se que a proteção cardíaca à isquemia promovida por drogas que abrem canais de K⁺ se deve à abertura do canal mitocondrial (Garlid *et al.*, 1997). Recentemente, nosso grupo pôde demonstrar os mecanismos prováveis pelos quais essa proteção ocorre. Esses mecanismos envolvem regulação do volume mitocondrial (Kowaltowski *et al.*, 2001a), levando à melhora da fosforilação oxidativa pós-isquêmica (dos Santos *et al.*, 2002) e preservação energética do tecido durante a isquemia (Belisle e Kowaltowski, 2002). Também demonstramos aqui que esses canais também são protetores por diminuir a captação de Ca²⁺ durante períodos isquêmicos (Murata *et al.*, 2001; Facundo *et al.*, 2005), que, associada a uma menor geração de EROs na mitocôndria (Facundo *et al.*, 2005; Facundo *et al.*, 2006; Vanden Hoek *et al.*, 2000), leva ao efeito protetor por inibir a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM).

Um ponto bastante controverso na literatura é a relação entre a abertura do mitoK_{ATP} e a geração de EROs. Neste contexto, Vanden Hoek *et al.* (1998) demonstraram que a geração de EROs pela mitocôndria durante o pré-condicionamento isquêmico é necessária para ativar a proteção contra o estresse oxidativo gerado durante a reperfusão (Vanden Hoek *et al.*, 2000). De fato, adições exógenas de EROs podem promover proteção similar ao pré-condicionamento (Yaguchi *et al.*, 2003) e antioxidantes evitam os efeitos protetores (Vanden Hoek *et al.*, 1998). A questão que surge é qual é a inter-relação entre EROs e mitoK_{ATP} durante o período de pré-condicionamento isquêmico. Um modelo em que a abertura do mitoK_{ATP} aumenta a liberação de EROs (Carroll *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2001; Krenz *et al.*, 2002), iniciando o pré-condicionamento, tem sido sugerido. A hipótese levantada é que a geração

de EROs pela mitocôndria é estimulada pela alcalinização da matriz mitocondrial devido à entrada de K^+ , tendo como consequência o estímulo à fosforilação de mensageiros e à transcrição gênica (Andruxhiv *et al.*, 2006). A evidência chave que leva alguns a apoiarem este modelo está no fato que o DZX aumenta a fluorescência de sondas sensíveis a EROs como, por exemplo, a diclorofluoresceína (DCF) e MitoTracker (Forbes *et al.*, 2001; Carroll *et al.*, 2001; Andriukiv *et al.*, 2006). Neste contexto, a reversão dos efeitos protetores de agonistas do mitoK_{ATP} com antioxidantes (Forbes *et al.*, 2001; Pain *et al.*, 2000), também apóia esta idéia.

Nós favorecemos a hipótese onde a formação de EROs durante o pré-condicionamento é anterior a ativação pelo mitoK_{ATP} (Facundo *et al.*, 2006). Essas EROs devem ativar esse canal durante esse processo, diminuindo a geração destas espécies posteriormente (Facundo *et al.*, 2007). Uma série de observações apóia a nossa hipótese. Primeiro, nós questionamos se o DZX leva de fato ao aumento de EROs intracelular. Trabalhando com mitocôndrias isoladas, nosso grupo encontrou que a ativação do mitoK_{ATP} diminui a geração de EROs (Ferranti *et al.*, 2003). Como relatado por alguns (Krenz *et al.*, 2002), o MitoTracker, que é uma sonda usada para medir a formação de EROs em células intactas, não responde a condições clássicas que regulam a formação de EROs pela mitocôndria tais como o tratamento com desacopladores ou com inibidores da cadeia respiratória mitocondrial. O acúmulo destes indicadores na mitocôndria pode também levar à inibição respiratória e à abertura do poro de TPM (Scorrano *et al.*, 1999). Este fato faz-nos acreditar que o uso deste probe para medir EROs geradas na mitocôndria seja desaconselhado.

1.2. Pré-Condicionamento Isquêmico

Um breve período de isquemia confere proteção ao coração para um subsequente episódio de isquemia. Esse fenômeno, primeiramente descrito por Murry *et al.* (1986), foi chamado de pré-condicionamento isquêmico. Os mecanismos cardioprotetores endógenos do pré-condicionamento isquêmico podem ser confirmados em quase todas as espécies incluindo camundongo, rato, porco, coelho e cachorro (Yellon *et al.*, 1998). Em muitas condições

experimentais, o pré-condicionamento isquêmico restringe o tamanho do infarto, melhora a função contrátil pós-isquêmica e reduz arritmias. O pré-condicionamento não somente oferece proteção contra perda de função e necrose, mas também contra apoptose (Piot *et al.*, 1997). Sinais de pré-condicionamento isquêmico em pacientes com doença arterial coronária têm sido apontados devido a observações que angina pré-infarto reduz a área de infarto, melhora a função cardíaca e reduz arritmias (Hirai *et al.*, 1992).

Segundo Baines *et al.* (1997), EROs gerados após períodos de isquemia e reperfusão são possíveis sinalizadores do pré-condicionamento. Essa sugestão foi confirmada pelo grupo do Professor Paul Schumacker, que também demonstrou que a principal fonte de EROs durante o pré-condicionamento é a cadeia respiratória mitocondrial (Vanden Hoek *et al.*, 1998). Levando em conta o dano contra o qual o pré-condicionamento protege, estudos têm relacionado o dano de isquemia/reperfusão com a geração de EROs, especialmente dentro dos primeiros minutos de reoxigenação (Zweier *et al.*, 1987). Neste ponto de vista, no estudo conduzido por Vanden Hoek *et al.* (2000), antioxidantes administrados durante o período de reperfusão foram tão efetivos quanto o pré-condicionamento em proteger as células do miocárdio (Lebuffe *et al.*, 2003). Isto confirma que a geração de EROs durante a reperfusão é responsável pelo dano celular e sugere que o pré-condicionamento protege pela diminuição do estresse oxidativo durante o período de reperfusão.

Agentes farmacológicos que ativam o mitoK_{ATP} promovem efeitos protetores iguais aos do pré-condicionamento cardíaco (Liu *et al.*, 1998; Facundo *et al.*, 2006a). Da mesma forma, outros estudos mostraram que o pré-condicionamento e ativação de transporte de K⁺ mitocondrial pode ser induzido por acetilcolina (Yao *et al.*, 1999) e por hipóxia (Vanden Hoek *et al.*, 1998). A primeira evidência de um papel protetor do mitoK_{ATP} foi produzida na década de 1980 quando o nicorandil apresentou efeito protetor contra o dano cardíaco isquêmico (Lamping *et al.*, 1984; Shimshak *et al.*, 1986), embora seu mecanismo de ação ainda não tivesse sido compreendido naquela época. Grover e colaboradores mais tarde encontraram que outros agonistas de

canais de potássio eram protetores contra isquemia cardíaca (Grover *et al.*, 1989), explicando o possível modo de ação do nicorandil. Somente em 1997, usando o DZX, foi possível estabelecer que os efeitos protetores destes agonistas se deviam a ativação do canal mitocondrial e não do sarcoplasmático (Garlid *et al.*, 1997). Este estudo colocou definitivamente a abertura do mitoK_{ATP} como um componente da rota protetora do pré-condicionamento cardíaco. Este resultado foi confirmado por um grande número de grupos que mostraram que a ativação do mitoK_{ATP} tem um efeito protetor potente contra dano isquêmico em coração (Facundo *et al.*, 2005; Facundo *et al.*, 2006a; Vanden Hoek *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2002; Kicinska *et al.*, 2003; Forbes *et al.*, 2001). Neste mesmo contexto, os agonistas do mitoK_{ATP} também são efetivos em proteger contra danos isquêmicos em cérebro e músculo esquelético (Domoki *et al.*, 1999; Pang *et al.*, 1997). Uma forte indicação de que o mitoK_{ATP} participa do processo de sinalização celular do pré-condicionamento é a observação que antagonistas do mitoK_{ATP} são capazes de inibir os efeitos benéficos do pré-condicionamento quando administrados durante os períodos de isquemia curtos (Auchampach *et al.*, 1992; Facundo *et al.*, 2006a). Isto sugere que a abertura deste canal é uma etapa essencial neste processo. Por outro lado, o mecanismo pelo qual o mitoK_{ATP} é aberto durante o pré-condicionamento isquêmico ainda não está claro. Alguns apontam que esta ativação deve ocorrer por aumento na fosforilação das proteínas do canal (Costa *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 1998) ou por oxidação de grupos tiólicos na proteína (Zhang *et al.*, 2001). Claramente, a ativação do mitoK_{ATP} durante períodos de pré-condicionamento envolve alguma forma estável de modificação proteica, pois uma aumentada atividade de mitoK_{ATP} pode ser detectada em mitocôndrias isoladas após períodos de pré-condicionamento (da Silva *et al.*, 2003).

1.3. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Em muitas células aeróbicas, a mais importante fonte de radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é a cadeia transportadora de elétrons (Halliwell e Gutteridge, 1999). As EROs geradas na mitocôndria têm sido implicados no dano celular que ocorre em uma grande variedade de patologias incluindo

isquemia/reperfusão, doença de Parkinson, doença de Huntington e envelhecimento (para revisão, veja Kowaltowski e Vercesi, 2001). Isto pode ser explicado pelo fato de existir um pequeno, porém contínuo, "escape de elétrons" da cadeia respiratória mitocondrial, o que resulta, em etapas intermediárias, na geração de $O_2^{\bullet-}$ através da redução de oxigênio molecular (Kowaltowski, *et al.*, 2000; Turrens, 2003). A geração mitocondrial de EROs ocorre, principalmente, nos complexos I e III da cadeia respiratória (Boveris e Chance, 1973; Kowaltowski e Vercesi, 2001; Turrens, 2003) e em algumas desidrogenases da matriz da organela (Starkov *et al.*, 2004). Nestes, o $O_2^{\bullet-}$ é formado, respectivamente, ao nível do átomo central de ferro da NADH desidrogenase e pelo vazamento de elétrons da semiquinona (que é um radical livre) para o oxigênio molecular. A geração de $O_2^{\bullet-}$ pela NADH desidrogenase é estimulada pela presença de substratos respiratórios que geram NADH, como o malato, glutamato e piruvato (Turrens, 1997), além da inibição da enzima por rotenona (da Silva *et al.*, 2003). Por outro lado o succinato, cianeto e antimicina A estimulam o vazamento de elétrons ao nível da coenzima Q (Kowaltowski *et al.*, 1995). Na mitocôndria em pleno funcionamento, a liberação de intermediários de oxigênio parcialmente reduzidos pela citocromo c oxidase (complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial) é praticamente inexistente (Kowaltowski e Vercesi, 1999; Turrens, 2003). É também interessante notar que um baixo potencial da membrana interna mitocondrial associado à aumentada taxa respiratória previne a liberação mitocondrial de EROs, enquanto baixas taxas respiratórias aumentam fortemente a geração de EROs (Skulachev, 1996; Korshunov *et al.*, 1997). Isso ocorre devido à manutenção de maior fluxo de elétrons na cadeia respiratória, diminuindo a probabilidade de redução monoelétrica do oxigênio. A mitocôndria também pode gerar EROs, por transporte reverso, quando se energiza a suspensão mitocondrial com succinato sem presença de inibidores de complexo I (transporte reverso de elétrons, Liu *et al.*, 2002). Essa forma de geração de EROs é também sensível ao potencial de membrana mitocondrial, que necessita ser alto para permitir termodinamicamente a transferência de elétrons do complexo II para o complexo I (Turrens, 2003). Por fim, o potencial de membrana mitocondrial, por interferir nos níveis de NAD^+ e NADH, irá regular a geração de EROs em desidrogenases localizadas na matriz da organela (Starkov *et al.*, 2004).

A mitocôndria possui um sistema eficiente de antioxidantes composto por superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione, NADPH e vitaminas C e E. Este sistema permite que exista uma contínua regulação entre a geração de EROs a partir da cadeia respiratória mitocondrial e a sua detoxificação (Kowaltowski e Vercesi, 1999). Assim, $O_2^{\bullet-}$ formado a partir do escape de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, em uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase mitocondrial (que tem como cofator o manganês), é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , Fridovich, 1995). Este, por ser mais estável e difusível que o $O_2^{\bullet-}$, pode ser detectado com maior facilidade em suspensões mitocondriais (Kowaltowski e Vercesi, 1999). Devido a essa propriedade, H_2O_2 é frequentemente usado como indicador de estresse oxidativo mitocondrial. O H_2O_2 mitocondrial é comumente removido pelas enzimas antioxidantes catalase (Radi *et al.*, 1991) ou pelo sistema redox que contém glutathione como cofator, glutathione peroxidase e glutathione reductase (Simmons *et al.*, 1989). Outra enzima que remove H_2O_2 na matriz mitocondrial, mas que usa a tioredoxina como cofator da reação, é a tioredoxina peroxidase (Spyrou *et al.*, 1997; Rhee *et al.*, 1999). Estas enzimas servem para diminuir o acúmulo do ânion superóxido e do H_2O_2 , que na presença de metais de transição pode dar origem ao radical hidroxila, para o qual nenhum sistema antioxidante enzimático existe. Já o reparo de grupos sulfidrilas em proteínas é feito pelo sistema da tioredoxina (Starke *et al.*, 1997). Em situações de isquemia, as defesas antioxidantes são diminuídas (Shlafer *et al.*, 1987), o que pode aumentar o dano oxidativo na situação de grande formação das EROs durante a reperfusão (Vanden Hoek *et al.*, 2000). Uma enzima que fica com a atividade diminuída é a glutathione peroxidase mitocondrial. A isoforma citosólica também permanece com sua atividade diminuída pela isquemia (Starke *et al.*, 1997). Neste mesmo contexto, a atividade da superóxido dismutase também é diminuída na fração mitocondrial em situações isquêmicas (Shlafer *et al.*, 1987). Um esquema ilustrativo da formação e remoção de EROs é mostrado na Fig. 02.

Figura 2: Formação e remoção de EROs na matriz mitocondrial. A cadeia respiratória transporta elétrons dos substratos de complexo I (Mal = malato) ou complexo II (Succ = succinato) para o complexo IV, onde o oxigênio molecular é reduzido a H₂O. Nesse processo, elétrons podem vaziar para o O₂, formando ânion superóxido (O₂^{•-}). Este por ação da superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD), que tem como cofator o Manganês (Mn), é transformado em H₂O₂. O H₂O₂ pode difundir pela membrana ou se acumular na mitocôndria, onde pode ser transformado em H₂O e O₂ pela ação da catalase (CAT) ou pela ação de glutatona peroxidase/tioredoxina peroxidase (GPx/TPx) que transforma essa ERO em H₂O com uma reação acoplada à oxidação da glutatona/tioredoxina (GSH/TSH). Glutatona oxidada ou tioredoxina oxidada (GSSG/TSST) podem ser reconvertidas a GSH/TSH pela glutatona redutase (GR) ou tioredoxina redutase (TR), respectivamente. Essas enzimas usam os estoques de NAD(P)H como fonte de elétrons. Se esse sistema descrito não for eficaz e o H₂O₂ se acumular, pode ser gerado o radical hidroxila (OH[•]), pela reação de Fenton, envolvendo Fe²⁺.

A geração de EROs pela mitocôndria e sua relação com os processos que levam à sinalização celular têm ganhado muito interesse em anos recentes (para revisão ver Thannickal e Fanburg, 2000). Neste contexto, muitas proteínas podem se tornar ativas por mecanismos de oxidação. Um exemplo são as proteínas desacopladoras (Echtay *et al.*, 2002; Brand *et al.*, 2004), que também são protetoras contra dano celular isquêmico (Hoerter *et al.*, 2004). Também já foi mostrado que proteínas relacionadas a transcrição gênica, tal como o PGC-1, que é um coativador do fator de transcrição PPAR γ , podem se tornar mais ativos em situações de estresse oxidativo (St-Pierre *et al.*, 2006), sendo este fator fortemente co-induzido com enzimas antioxidantes após situações de estresse oxidativo.

1.4. Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM)

Em 1979, Hunter e Haworth demonstraram que mitocôndrias isoladas tratadas com quantidades excessivas de Ca^{2+} sofriam uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna. Essa permeabilização resultava na perda do potencial de membrana, liberação do cálcio acumulado e inchamento coloidosmótico da organela. Como podia ser parcialmente revertido através da remoção do cálcio, esse fenômeno foi denominado transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). Mais tarde, Crompton e colaboradores (1988) descobriram que a TPM podia ser inibida por quantidades submicromolares de ciclosporina A (CsA), um imunossupressor comumente usado para combater a rejeição a transplantes. Devido a essa regulação pela CsA, cuja ação inibitória depende de sua ligação com ciclofilinas (Basso *et al.*, 2005) componentes da membrana mitocondrial interna e é independente do efeito imunossupressor, não dependendo da inibição de calcineurina (Nicolli *et al.*, 1996), a TPM foi atribuída à abertura de um grande poro na membrana mitocondrial interna. Porém, apesar da evidência de que a TPM pode se tratar de um fenômeno regulável, até o presente momento o poro da TPM não foi isolado ou caracterizado molecularmente. Através do uso de ligantes, foi possível evidenciar que o translocador de nucleotídeos de adenina participa da regulação da TPM, mas existe controvérsia se essa proteína consiste no poro de TPM, faz parte da composição do poro, ou apenas

participa de sua regulação (veja revisão em Kowaltowski e Vercesi, 1999, Kim *et al.*, 2003; Tsujimoto *et al.*, 2006; Zorati e Szabo, 1995).

Independentemente da composição do poro, sabe-se que a ocorrência de TPM é estimulada pela oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial interna, e prevenida ou até revertida por redutores ditiólicos (Kowaltowski e Vercesi, 1999; 2001; Petronilli *et al.*, 1994). A TPM induzida isoladamente por Ca^{2+} também pode ser aumentada pela presença concomitante de pró-oxidantes que oxidam nucleotídeos de piridina mitocondriais. Esses pró-oxidantes levam a mitocôndria a uma condição de estresse oxidativo, devido à depleção do poder redutor mitocondrial na forma de NAD(P)H e, conseqüentemente, glutathione reduzida (ver Fig. 2). Baseados nesses achados nosso grupo propôs (Kowaltowski e Vercesi, 1999, Kowaltowski *et al.*, 2001) que a TPM ocorreria secundariamente à oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial interna, promovidas por EROs geradas pela própria mitocôndria. Realmente, foi evidenciado que o acúmulo de Ca^{2+} leva a um aumento da geração mitocondrial de EROs que precede a TPM (Kowaltowski *et al.*, 1995; Kowaltowski *et al.*, 1998). A remoção dessas EROs por antioxidantes previne a oxidação de proteínas da membrana mitocondrial e a permeabilização da organela (Kowaltowski *et al.*, 1998). Assim, comprovamos que a TPM é uma conseqüência funcional do estresse oxidativo mitocondrial.

Em 1995, Griffiths e Halestrap comprovaram que a TPM era um fator desencadeante da morte celular de tecidos cardíacos submetidos a um período de anóxia seguido de reoxigenação. Foi possível observar que a presença de CsA previne a morte celular nessas condições, e que ocorre uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna logo após a reoxigenação do tecido (Friberg *et al.*, 1998; Griffiths e Halestrap, 1995; Halestrap *et al.*, 1998). Deste modo, foi comprovado que a TPM pode desencadear a morte celular necrótica. Realmente, seria esperado que uma disfunção mitocondrial tão grave quanto a TPM resultaria na depleção de ATP seguida de morte celular.

Surpreendentemente, foi descoberto que a TPM pode também levar à morte celular apoptótica, que ocorre de maneira regulada e dependente de energia. A apoptose ocorre quando a mitocôndria libera proteínas pró-apoptóticas (como o citocromo *c*, o fator indutor de apoptose e caspase 9, entre outras) para o citoplasma (Green e Reed, 1998; Susin *et al.*, 1998). Uma vez no citoplasma, essas proteínas ativam caspases citosólicas, culminando na quebra do DNA nuclear. A ocorrência de TPM no interior da célula pode levar à liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais, devido ao inchamento da organela, com ruptura da membrana mitocondrial externa (Green e Reed, 1998). Além de ser liberado após a ruptura da membrana externa devido à TPM, o citocromo *c* apresenta mecanismos de liberação específicos, regulados pelas proteínas da família do Bcl-2 (Green e Reed, 1998).

Devido ao grande número de publicações comprovando a participação mitocondrial na morte celular necrótica e apoptótica, parece claro que a TPM possui um papel regulador sobre a viabilidade celular. Baseados em estudos prévios, nosso grupo propôs que o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial conseqüente levem à TPM, que pode então comprometer a viabilidade da célula através da depleção de ATP ou da liberação de fatores celulares pró-apoptóticos (Kowaltowski e Vercesi, 1999; Kowaltowski e Vercesi, 2001; Kowaltowski *et al.*, 2001b).

2. OBJETIVOS

A proposta central desta Tese é compreender os efeitos redox do canal mitoK_{ATP}, correlacionando-os com a cardioproteção isquêmica. Iremos abordar os seguintes aspectos específicos:

2.1. Baseado na literatura mostrando que o canal mitoK_{ATP} em membranas reconstituídas (Zhang *et al.*, 2001) pode ser ativado por ânion superóxido, avaliamos o envolvimento de EROs formadas em mitocôndrias como ativadores do mitoK_{ATP}. Também tivemos como objetivo mostrar que as EROs formadas na mitocôndria durante os períodos de pré-condicionamento (Vanden Hoek *et al.*, 1998; Facundo *et al.*, 2006) são responsáveis pela ativação do mitoK_{ATP} durante esse processo.

2.2. Estudamos a abertura do mitoK_{ATP} em mitocôndrias isoladas em presença de antioxidantes redutores tiólicos e não tiólicos. Alguns autores mostraram que a proteção promovida por agonistas do mitoK_{ATP} é revertida por antioxidantes tiólicos (Forbes *et al.*, 2001; Pain *et al.*, 2000) e leva a aumentos na fluorescência de indicadores para EROs (Forbes *et al.*, 2001; Carroll *et al.*, 2001; Andriukiv *et al.*, 2006). Essa afirmativa levou esses autores a propor que a proteção conferida pela abertura deste canal se deve à formação de EROs. Por outro lado, nós avaliamos a possibilidade destes redutores interferirem diretamente com a atividade do canal, comprovando a regulação redox do mitoK_{ATP}.

2.3. Avaliamos qual o mecanismo pelo qual a abertura do mitoK_{ATP} protege contra morte celular isquêmica. Já foi mostrado por nosso grupo que a ativação do mitoK_{ATP} em mitocôndrias isoladas causa diminuição da formação de EROs (Ferranti *et al.*, 2003). Portanto, avaliamos se a abertura desse canal estaria inibindo a morte celular por isquemia e reperfusão por inibir condições que favorecessem a TPM. A TPM mitocondrial é classicamente ativada por oxidação de tióis proteicos (Kowaltowski e Vercesi, 1999; 2001; Kowaltowski *et al.*, 2001b) e por Ca²⁺ (Hunter e Haworth, 1979). Dessa forma, avaliamos a liberação das EROs durante

isquemia e reperfusão e a captação de Ca^{2+} com o canal fechado e aberto farmacologicamente.

2.4. Investigar se o pré-condicionamento ou a abertura do mitoK_{ATP} podem induzir sistemas antioxidantes celulares. Este teste nos diz se as EROs formadas durante o pré-condicionamento (Vanden Hoek *et al.*, 1998; Facundo *et al.*, 2006a) seriam eficazes em induzir os sistemas de remoção dos EROs. Essa indução poderia explicar a melhora do balanço redox durante a reperfusão.

2.5. Pesquisar os efeitos de antioxidantes tiólicos e não tiólicos sobre a proteção cardíaca promovida pelo pré-condicionamento ou pela abertura do mitoK_{ATP}. Dessa forma é possível mostrar se as EROs são necessárias ou não para cada uma das formas de proteção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais - Todos os reagentes usados foram de alto grau de pureza e todas as soluções aquosas foram preparadas em água desionizada. As drogas mais lipofílicas como DZX, CsA, antimicina A (AA), diclorofluoresceína diacetato ($H_2DCF-DA$), Amplex Red, rotenona e carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP) foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). Já a 2-mercaptopropionil glicina (MPG), catalase de fígado bovino (Cat), ditioneítrito (DTT), *N*-acetilcisteína (NAC), GTP e H_2O_2 foram preparados em água em soluções estoque preparadas logo antes de cada experimento. HRP, safranina O, ATP e succinato foram preparados em alíquotas aquosas, mantidos congelados. ATP, GTP, succinato e MPG tiveram o pH corrigido para um valor entre 7,0 e 7,4 com NaOH. As soluções de H_2O_2 foram calibradas pela medida da absorbância em 240 nm e a concentração calculada usando coeficiente de extinção molar de $43,6 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.2. Animais – Ratos Sprague-Dawley pesando entre 250 e 300 gramas foram mantidos em condições de temperatura constante ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) com 12 horas de ciclo luz/escuro (12h/12h), com livre acesso à água e ração da marca Nuvlab (Navital, Paraná, Brasil) no Biotério do Conjunto das Químicas, USP. As condições sanitárias do ambiente obedeceram ao padrão sanitário livre de patógenos específicos com umidade adequada de $55 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$. Os ratos foram nutridos com ração comercial irradiada. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com cobertura de metal e serragem de madeira, no máximo 5 animais por gaiola. Todos os estudos foram conduzidos de acordo com as normas para estudos com animais, estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal do Instituto de Química, USP.

3.3. Cultura de células cardíacas HL-1 - As células HL-1 foram doadas pelo Prof. William C. Claycomb. Estas células, originárias de átrios murinos, mantêm características morfológicas e propriedades bioquímicas e eletrofisiológicas de cardiomiócitos (Claycomb *et al.*, 1998), enquanto o isolamento de cardiomiócitos produz uma população celular heterogênea que inclui fibroblastos, células endoteliais e leucócitos (Vanden Hoek *et al.*, 1996). Além disso, o isolamento de cardiomiócitos pode promover seu pré-condicionamento, e produz preparações que perdem viabilidade com o passar do tempo. Como vantagens adicionais, as células HL-1 apresentam mecanismos de pré-condicionamento conservados dependentes de proteína quinase C e ativação do canal de K⁺ (Seymour *et al.*, 2003). Para rotina de passagem e crescimento, as células HL-1 foram mantidas em frascos T-75 a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ em meio Claycomb (JRH Biosciences) suplementado com norepinefrina 0,1 mM (Sigma-Aldrich), penicilina/estreptomicina 100 U/mL/100 µg/mL, glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich) e 10% de soro bovino fetal. Os experimentos foram iniciados em 100% de confluência a 37°C. Para todos os experimentos, as células foram recolocadas em tampão padrão (pH = 7,4) contendo em mmol/L: NaCl, 137; Hepes, 5; glicose, 22; taurina, 20; creatina, 5; KCl, 5,4; MgCl₂ 1; piruvato 5 e CaCl₂, 1.

3.4. Pré-condicionamento e Isquemia/reperfusão em Células - As células HL-1 foram pré-condicionadas por inibição metabólica usando KCN (2 mM) adicionado ao tampão padrão sem glicose e piruvato (Irie *et al.*, 2003, Fig. 3). Cardiomiócitos HL-1 (~ 1,5 x 10⁵ células/mL) foram submetidos a dois ciclos de KCN 2 mM durante 5 minutos intercalados por 5 minutos de centrifugação e 5 minutos de perfusão com tampão controle (Fig. 3, caixas pretas). Quando usados, antagonistas do mitoK_{ATP} 5-hidroxicanoato (5-HD, 150 µM) ou glibenclâmida (GLY, 2 µM) ou a enzima antioxidante catalase (2 µM) foram administrados como indicado pelas barras horizontais na Fig. 3. A proteção cardíaca usando diazóxido (DZX, 30 µM) ou ciclosporina A (CsA, 1 µM) foi conseguida pela pré-incubação das células HL-1 com as drogas por 20 minutos antes do período de isquemia longa (Facundo *et al.*, 2005), como mostrado na Fig. 3. A isquemia e reperfusão foram simuladas pela inibição metabólica e limitação de substrato usando KCN (500 µM) e 2 mM de deoxiglicose

adicionadas ao tampão padrão sem glicose e piruvato durante 60 minutos (Fig. 3, caixas cinzas), seguida por 5 minutos de centrifugação e re-suspensão do pellet celular em tampão controle para a reperusão simulada. Cardiomiócitos HL-1 controles foram incubados com solução tampão padrão durante todo o período experimental e submetidos somente às centrifugações e lavagens.

Figura 3: Protocolos Experimentais de Pré-condicionamento em Células HL-1. Células controles foram submetidas a centrifugações (U) para promover o mesmo dano mecânico. O pré-condicionamento (PI) foi conseguido com dois ciclos de 2 mM de KCN durante 5 minutos (■) em meio sem glicose e piruvato seguido por 5 minutos de perfusão com tampão controle. Cada ciclo foi interrompido por 5 minutos de centrifugação (U). 5-HD (150 µM), GLY (2 µM) e catalase (Cat, 2 µM) estavam presentes onde indicado pelas linhas horizontais. DZX (30 µM), ou CsA (1 µM) estavam presentes onde indicado (||). CN-/aglicemia (KCN 500 µM e deoxiglicose 2 mM, ■) foi conduzida durante 60 minutos seguida pela reperusão em tampão controle.

3.5. Avaliação da Vitalidade Celular - A vitalidade celular foi avaliada através da medida da fluorescência relativa de brometo de etídio (50 µM) usando espectrofluorímetro Hitachi F4500 (Ex = 365, Em = 580 nm; Karsten, 1980; Facundo *et al.*, 2005) antes e após a permeabilização da membrana plasmática por digitonina (0.005%). Dados são expressos como a porcentagem de células vivas.

3.6. Medida intracelular da geração de EROs - A produção de EROs pelas células HL-1 foi monitorada usando 2',7'-carboxidiclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA, Sigma-Aldrich), um indicador da produção de EROs intracelular (Bass *et al.*, 1983; Forbes *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 1999). Células foram previamente incubadas com H₂DCF-DA 10 µmol/L por 1 hora em temperatura ambiente e na ausência de luz. Este composto, após entrar na célula, é clivado por esterases celulares formando um composto pouco fluorescente (DCFH, Bass *et al.*, 1983), que é convertido a DCF, altamente fluorescente, pela reação com diversas EROs. A fluorescência do DCF foi acompanhada em meio suplementado com 10 µmol/L H₂DCF-DA usando um espectrofluorímetro Hitachi F4500 em excitação e emissão de 488 e 530 nm, respectivamente, e *slit width* de 5,0 nm a 37°C. Dados são expressos relativos à porcentagem do controle em cada ponto, para eliminar o efeito da lavagem sobre a fluorescência total (Figs. 8, 9, 10) ou através da fluorescência absoluta do DCF em unidades arbitrárias (Fig. 5, 7, 11).

3.7. Remoção de H₂O₂ - A remoção de H₂O₂ foi determinada como descrito previamente em Barros *et al.* (2003). 0,5 mg de proteínas foram incubadas em 2 mL de meio de reação (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7.5) suplementado com H₂O₂ 460 µM por 2 minutos. 1 µL desta solução foi adicionada ao meio de reação (1,5 mL) contendo Amplex Red (50 µM) e peroxidase de raiz forte (HRP, 0,5 U/mL). A fluorescência foi acompanhada em emissão de 563 nm e excitação de 587 nm. 100% de H₂O₂ foi determinado na ausência de mitocôndria ou homogenato. A fluorescência do Amplex Red nas amostras não tratadas com H₂O₂ foi subtraída de todas as leituras. Os resultados são expressos como porcentagem do H₂O₂ remanescente.

3.8. Efeitos do DZX sobre a fluorescência do DCF - O homogenato de células HL-1 foi incubado com H₂DCF-DA (10 µM) por 1 hora para sofrer hidrólise pelas esterases citosólicas. O homogenato foi utilizado sem substrato mitocondrial ou com malato/glutamato (2 mM) na presença de HRP (1 U/mL), conforme indicado. DZX foi acrescentado ao meio na tentativa de avaliar seus efeitos sobre a fluorescência total da suspensão. Os efeitos de diminuição da formação de EROs pela mitocôndria foram avaliados com o uso do carbonil

cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP) enquanto a antimicina A, que inibe o complexo III mitocondrial, foi utilizada para promover uma situação de extrema produção de EROs mitocondriais. A fluorescência do DCF foi acompanhada usando um espectrofluorímetro Hitachi F4500 em excitação e emissão de 488 e 530 nm, respectivamente, e *slit width* de 5,0 nm a 37°C. Dados são expressos relativos à porcentagem do controle sem substrato.

3.9. Isolamento de Mitocôndrias - Mitocôndrias de coração de rato foram isoladas como descrito por Kowaltowski *et al.* (2001a). Os corações de ratos Sprague-Dawley machos foram finamente picotados, incubados por 10 min com protease tipo I de pâncreas bovino (1 mg/mL) e submetidos à disrupção física com homogenizador tipo potter para provocar lise celular. A precipitação do núcleo e resíduos celulares foi promovida através de uma centrifugação com baixa rotação ($\cong$ 600 g). As mitocôndrias foram então separadas do sobrenadante através de centrifugações com maior rotação ($\cong$ 10.000 g), lavadas até a obtenção de uma suspensão homogênea e mantidas em gelo até o início dos experimentos que foram conduzidos a 37°C e realizados não excedendo 1 hora após o isolamento.

3.10. Inchamento mitocondrial – Mudanças no espalhamento de luz de uma suspensão mitocondrial devido à entrada de K^+ e o conseqüente inchamento das mitocôndrias foram acompanhados por 60 segundos em um fluorímetro Hitachi 4500 com temperatura controlada de 37°C em comprimentos de onda de excitação e emissão de 520 nm, com agitação contínua. Esse tipo de experimento foi executado dentro de 1 hora do isolamento das mitocôndrias devido à aparente labilidade do efeito do canal em suspensões mitocondriais. Para o estudo da hipótese da abertura do mitoK_{ATP} pelas EROs formadas endogenamente pela cadeia de transporte de elétrons, incubamos a suspensão mitocondrial com substrato de complexo II (succinato) com ou sem inibidor do complexo I (rotenona), produzindo EROs endógenos em quantidade mínima e máxima, respectivamente (Liu et al., 2002). H₂O₂ exógeno (1 μ M) foi adicionada à suspensão mitocondrial para comprovar os efeitos das EROs sobre a atividade do canal, neste caso revertidos pela enzima catalase (que remove H₂O₂).

3.11. Medida da Captação Mitocondrial de Ca^{2+} - A captação de Ca^{2+} por mitocôndrias de coração de rato foi monitorada através da fluorescência de 0,1 μM Ca^{2+} green 5N (Molecular Probes) em um espectrofluorímetro Hitachi F4500 usando excitação e emissão de 506 nm e 531 nm, respectivamente, e *slit width* de 5,0 nm a 37°C (Murphy *et al.*, 1996). Pulsos de cálcio foram adicionados até não haver mais evidência de captação do íon pelas mitocôndrias. A captação total de cálcio foi calculada somando-se todas as adições em cada traçado. A ligação de Ca^{2+} ao indicador extramitocondrial é reversível, resultando numa diminuição da fluorescência da suspensão quando há captação deste íon pelas mitocôndrias.

3.12. Medida da Geração Mitocondrial de EROs - A geração mitocondrial de EROs em mitocôndrias isoladas foi monitorada através da conversão de Amplex Red (50 μM , Molecular Probes) na presença de HRP (1 U/mL) em um composto fluorescente chamado resorufina, em uma estequiometria 1:1 para H_2O_2 (Zhou *et al.*, 1997). A fluorescência desse composto foi monitorada em fluorímetro Hitachi 4500 com temperatura controlada de 37°C em $\text{Ex} = 563$ nm e $\text{Em} = 587$ nm (Ferranti *et al.*, 2003) com agitação contínua. A geração de EROs por mitocôndrias isoladas também foi medida com o uso do indicador fluorescente $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (10 $\mu\text{mol/L}$) em situação de isquemia simulada pela adição de cianeto.

3.13. Potencial de Membrana Mitocondrial – A fluorescência da safranina O (5 μM) no meio extramitocondrial foi usada para estimar o potencial de membrana mitocondrial (Akerman e Wikstrom, 1976; Kowaltowski *et al.*, 2002). Dessa forma, a fluorescência desse composto foi monitorada em fluorímetro Hitachi 4500 a temperatura controlada de 37°C em $\text{Ex} = 495$ nm e $\text{Em} = 586$ nm (Ferranti *et al.*, 2003), com agitação contínua, sob as condições descritas na legenda da figura. A safranina O é um cátion lipofílico que se acumula em membranas mitocondriais em quantidades proporcionais ao potencial de membrana. O acúmulo da safranina no microambiente mitocondrial promove uma diminuição da fluorescência global da suspensão.

3.14. Microscopia Eletrônica - As mitocôndrias foram incubadas com solução contendo Hepes 10 mM, $MgCl_2$ 2mM, KH_2PO_4 2 mM, KCl 150 mM, succinato 4 mM e com ATP 1 mM (para fechar o $mitoK_{ATP}$), ou com ATP 1 mM e DZX 30 μM (para abrir o $mitoK_{ATP}$). Após 2 minutos de reação, a suspensão foi fixada para microscopia eletrônica de transmissão com fixador contendo 2,0% de glutaraldeído em 100 mmol/L de tampão cacodilato com tetróxido de ósmio em sacarose 10,56%. Após isso, a amostra foi desidratada e embebida em resina. A preparação foi corada com acetato de uranila e nitrato de chumbo e examinada em microscópio eletrônico de transmissão em 40,000x, pelo serviço de microscopia eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.15. Fluorescência de NAD(P)H em células - A fluorescência de NAD(P)H foi monitorada através da fluorescência da forma reduzida de NAD(P)H em células HL-1 em cultura (Facundo *et al.*, 2005; Facundo *et al.*, 2006a) de acordo com Carroll *et al.* (1995). O experimento foi realizado com as células ainda aderidas às placas em tampão Krebs-Henseleit contendo em mmol/L: NaCl 118, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1,2, KCl 4.7, $MgSO_4$ 1,2, $CaCl_2$ 1,25, glicose 10, e HEPES 10, pH 7,4, a 37°C. O NAD(P)H foi observado em microscópio confocal Zeiss 510 LSM em 351 nm de excitação e emissão em 430 nm. A medida foi executada com o canal farmacologicamente aberto por DZX ou fechado com o uso do antagonista do $mitoK_{ATP}$ 5-HD. Este experimento foi executado no laboratório do Professor Robert Balaban no *National Institutes of Health*, Bethesda, MD, USA.

3.16. Perfusão de coração de rato - A perfusão dos corações de rato foi conduzida como descrito em Belisle e Kowaltowski (2002). Ratos Sprague-Dawley foram sacrificados e seus corações removidos. A aorta foi rapidamente canulada e foi iniciada a perfusão em aparelho de Langerdorff com tampão hepes 100% oxigenado contendo (em mM): NaCl 118, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1,2, KCl 4,7, $MgSO_4$ 1,2, $CaCl_2$ 1,25, glicose 10, and HEPES 10, pH 7,4, a 37°C. A fim de monitorar a função hemodinâmica dos corações de rato, um balão construído com membranas de látex em uma canula de 18 Gauge foi usado. O balão conectado a um transdutor de pressão foi inserido no ventrículo esquerdo através da remoção do átrio esquerdo e inflado com água destilada. Durante

toda a perfusão, o fluxo foi mantido constante em 8 mL min^{-1} . Os primeiros 15 minutos de perfusão foram usados para adaptação do coração ao sistema e para eliminar o sangue contaminante. Após esse tempo, os corações foram submetidos aos tratamentos como mostrado na Fig. 4. Corações isquêmicos foram submetidos a 35 minutos de perfusão antes da isquemia longa de 40 minutos, enquanto corações preconditionados foram submetidos a 15 minutos de perfusão e dois ciclos de 5 minutos de global isquemia separados cada um por 5 minutos de reperfusão. Durante a reperfusão, o perfusato foi coletado e a atividade da lactato desidrogenase avaliada. Corações foram eliminados do estudo se o tempo entre a remoção e o começo da perfusão foi maior que 3 minutos ou se esses apresentassem um número excessivo de extra-sístoles antes do tratamento.

3.17. Atividade da Lactato Desidrogenase - A atividade da enzima lactato desidrogenase foi determinada em alíquotas de perfusato refrigeradas exatamente como descrito no Kit comercial Doles[®]. Este teste se baseia na reação da lactato desidrogenase transformando lactato em piruvato. O NADH formado durante a reação sofre reação com a fenazina monossulfato que através de subseqüentes reações com o alúmen férrico e fenantrolina forma um composto corado. As absorbâncias finais foram determinadas em 510 nm em um espectrofotômetro Ultrospec 1000. As alíquotas foram coletadas em perfusatos liberados do coração durante a reperfusão nos minutos 5 para 10, 20 para 30 e 50 para 60. Os valores de absorbância foram transformados em atividade da lactato desidrogenase usando uma curva de calibração construída com concentrações crescentes de enzima.

3.18. Medida do consumo de O_2 celular – O consumo de O_2 em células foi acompanhada utilizando-se um eletrodo de Clark, sobre constante agitação, conectado a um oxígrafo Hansatech, em câmara de acrílico fechada e termostatizada (da Silva *et al.*, 2003). O eletrodo de Clark é composto por um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos numa solução eletrolítica (KCl). A reação se processa pela corrente gerada entre os eletrodos e é relacionada estequiometricamente à concentração de O_2 na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo, onde foi realizada a leitura.

Figura 4: Protocolos da perfusão de coração de rato. A isquemia global foi executada com parada no fluxo por 40 minutos. O preconditionamento (PI) foi iniciado com 2 ciclos de 5 minutos de isquemia (■), intercalados por 5 minutos de reperfusão. Catalase (cat, 1 μ M) ou 2-mercaptopropionil glicina (MPG, 500 μ M) estavam presentes onde indicado pelas linhas horizontais. Diazóxido (DZX, 30 μ M) estava presente onde indicado (||).

3.19. Análise de dados e estatística: Os dados nas Figs. 6 e 8 foram analisados usando o programa Sigmastat®. As diferenças entre os grupos foram analisadas usando Análise de variância one-way (Anova) com Tukey test para análise *post hoc*. As diferenças entre os grupos da Fig. 7 foram analisadas com teste “t” de *student* usando o programa Sigmastat®. Já os grupos das Figs. 5, 13 e 14 foram analisados pelo mesmo teste, entretanto, usando os softwares GraphPad Prism, GraphPad™ or Origin 7.0. Os resultados das Figs. 19, 20 e 21 foram comparados usando Anova com o software Origin 7.0. Alguns dados são mostrados como experimentos representativos de ao menos 3 repetições similares. Os gráficos de barras ou os símbolos representam média $\pm$ S.E. Para todas as análises, $p < 0.05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

O primeiro desafio do nosso estudo foi estabelecer um protocolo confiável e reprodutível de pré-condicionamento e isquemia reperusão em células. Essa condição foi conseguida com o uso de células cardíacas HL-1. Essa linhagem celular foi desenvolvida por Claycomb *et al.*, 1998, a partir de uma linhagem celular primária de tumor de átrio murino. Essas células em cultura obviamente possuem uma série de vantagens sobre cardiomiócitos isolados ou em cultura primária sendo a mais notável delas o fato que o isolamento de cardiomiócitos produz uma população celular heterogênea que inclui fibroblastos, células endoteliais e leucócitos (Vanden Hoek *et al.*, 1996). O isolamento de cardiomiócitos frescos depende também do procedimento de isolamento, da espécie e da idade do animal utilizado, o que pode aumentar a variabilidade dos testes. Os miócitos HL-1 podem ser prontamente usados para este estudo, pois mantêm características morfológicas e propriedades bioquímicas e eletrofisiológicas de cardiomiócitos (Claycomb *et al.*, 1998). Além disso, recentemente se comprovou que estas células apresentam mecanismos de pré-condicionamento conservados (Chaudary *et al.*, 2004; Seymour *et al.*, 2003).

Como pode ser visto na Fig. 5A, as células pré-condicionadas (Painel A, ■) foram fortemente protegidas da morte celular por isquemia simulada por CN/aglicemia seguida de lavagem, e se comportaram de forma semelhante às células controles (♦), que não sofreram nenhum dano isquêmico. Por outro lado, células que não sofreram o pré-condicionamento mas sofreram CN/aglicemia (●) seguida de uma lavagem (simulando reperusão) morreram em taxas bastante significativas quando comparadas às células pré-condicionadas e controles. Para comprovar que o mitoK_{ATP} teve participação essencial na proteção, conduzimos experimentos em que bloqueadores do mitoK_{ATP} estavam presentes durante o período de pré-condicionamento (de acordo com a Fig. 3). Com isso, pode-se visualizar uma forte reversão dos efeitos benéficos vistos com o pré-condicionamento isquêmico tanto pelo 5-HD (▲) quanto pela GLY (▼), dois antagonistas do mitoK_{ATP}.

Neste mesmo contexto, foi descrito por Vanden Hoek *et al.*, 1996, que a maior lesão na membrana de cardiomiócitos submetidos à isquemia e reperfusão ocorre durante a reperfusão devido à maior produção de EROs mitocondriais. Dessa forma, medimos na Fig. 5B a fluorescência do DCF como um indicador da liberação de EROs por células HL-1 seguindo à isquemia/reperfusão simulada. Verificamos que células que não sofreram pré-condicionamento geraram maior quantidade de EROs durante a reperfusão, de maneira prevenida pelo pré-condicionamento isquêmico e revertida pelo 5-HD ou GLY. A geração de EROs durante a isquemia foi similar em todas as amostras (não mostrado). Estes resultados estão de acordo com os resultados mostrados em outros modelos celulares por Vanden Hoek *et al.*, 2000, que mostraram que o pré-condicionamento protege células por diminuir a sua geração durante a reperfusão. Mais do que isso, esse resultado valida o uso deste sistema para estudar o papel dos EROs e $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ no evento protetor do pré-condicionamento isquêmico.

Figura 5: A morte celular de células HL-1 (Painel A) e geração de EROs (Painel B) promovida pela CN/aglicemia é prevenida pelo pré-condicionamento (PI) de maneira dependente do $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. Células cardíacas HL-1 foram pré-condicionadas (Painel A, ■) na presença de 5-HD (▲) ou GLY (▼) e depois submetidas à CN/aglicemia no tempo mostrado pela barra. Um grupo de células sofreu somente tratamento com CN/aglicemia (●), sem pré-condicionamento. Todas as amostras, incluindo a controle (♦), foram centrifugadas e ressuspensas em meio fresco onde indicado pela seta. Em B, a fluorescência do DCF foi medida aos 125 minutos em células incubadas em $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ e submetidas aos tratamentos indicados. Dados são mostrados como média $\pm$ SE. No Painel A, 125 minutos, $p < 0,05$ para o controle versus CN/aglicemia, PI versus CN/aglicemia, PI versus PI + 5-HD e PI versus PI + GLY. No Painel B, $p < 0,05$ para CN/aglicemia versus controle, PI versus CN/aglicemia, PI versus PI + GLY.

A Fig. 5 confirma resultados de outros estudos mostrando que antagonistas do mitoK_{ATP} reverterem os efeitos protetores do pré-condicionamento. Dessa forma, analisamos qual o mecanismo protetor pelo qual a abertura deste canal levaria à inibição da morte celular após isquemia e reperfusão. É sabido que tecidos cardíacos submetidos à isquemia e reoxigenação sofrem lesões que levam à morte celular de maneira desencadeada por TPM (Griffiths e Halestrap, 1995), uma consequência comum do estresse oxidativo mitocondrial. Também foi observado que em ratos previamente tratados com CsA, seus tecidos apresentaram menor área de infarto do miocárdio quando submetidos à isquemia e reperfusão (Niemann *et al.*, 2002). Nessas condições é possível observar que a presença de CsA (Friberg *et al.*, 1998; Griffiths e Halestrap, 1995; Halestrap *et al.*, 1998) ou sanglifehrin A, outro imunossupressor e inibidor da TPM, (Hausenloy *et al.*, 2003) previnem a morte celular por prevenir a permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna logo após a reoxigenação do tecido, característica da TPM.

Embora tanto a abertura do mitoK_{ATP} quanto a prevenção da ocorrência de TPM sejam cardioprotetoras durante isquemia (Garlid *et al.*, 1997; Halestrap *et al.*, 1997; Halestrap *et al.*, 1998; Hausenloy *et al.*, 2003; Hausenloy *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2001; Vanden Hoek 2000), ainda não está claro se os efeitos dessas intervenções são aditivas ou complementares. A Fig. 6 ilustra os efeitos da abertura do mitoK_{ATP} e da inibição da TPM sobre a viabilidade das células HL-1 durante a isquemia simulada pela presença de cianeto seguida pelo reestabelecimento da fosforilação oxidativa (Murata *et al.*, 2001). Uma variedade de protocolos com diferentes concentrações de cianeto e tempos de incubação foi testada até que uma condição em que ocorresse uma leve perda da viabilidade fosse encontrada. Nesta condição, como mostrado na Fig. 6, o pré-tratamento com o agonista do mitoK_{ATP} DZX (30 μ M, ■) apresentou efeito protetor máximo versus células que não sofreram qualquer pré-tratamento, ● (p = 0.019 aos 10 minutos de reperfusão). O efeito protetor do DZX foi completamente revertido pela adição de 5-HD (150 μ M) em 102 $\pm$ 24% ou 2 μ M de GLY (94 $\pm$ 10%). Essas drogas são antagonistas da atividade do mitoK_{ATP} (esses resultados foram excluídos da Fig. 6, por motivo de clareza).

Uma proteção efetiva das células contra morte celular por isquemia/reperfusão também foi conseguida com a inibição da abertura da TPM com CsA ($1 \mu\text{M}$, $\blacktriangle$), $p = 0.014$ aos 10 minutos de reperfusão versus células que não sofreram qualquer pré-tratamento, $\bullet$. Ambos DZX e CsA levaram a níveis de viabilidade final indistinguíveis das células controles ($\blacklozenge$), que foram submetidas somente a centrifugações. Desse modo, podemos afirmar claramente que os efeitos do DZX e CsA não são aditivos.

Figura 6: Prevenção da morte celular durante reperfusão pela ativação do mitoK_{ATP} e inibição da TPM. Células HL-1 foram incubadas em meio padrão por 20 minutos na presença de $30 \mu\text{M}$ de diazóxido (DZX) ou $1 \mu\text{M}$ de ciclosporina A (CsA), onde mostrado. A isquemia foi induzida pela incubação das células em meio contendo KCN e 2-deoxiglicose durante o período de tempo indicado. Dados são mostrados como média $\pm$ SE de ao menos 4 repetições. A comparação estatística foi executada por Student's t Test. * $p < 0,05$ comparados com isquêmico não tratado.

A constatação de que a inibição do mitoK_{ATP} ou da ocorrência de TPM em células HL-1 protegem essas células contra morte celular isquêmica e resultados da literatura, que indicam que a abertura do mitoK_{ATP} previne muitas condições que iniciam a TPM tais como depleção de ATP, captação de Ca^{2+} e estresse oxidativo (Belisle and Kowaltowski, 2002; Ferranti *et al.*, 2003), nos levou a hipótese que a abertura do mitoK_{ATP} poderia prevenir as condições que favoreceriam a abertura da TPM mitocondrial em condições isquêmicas. A fim de testar esta possibilidade, nós conduzimos experimentos usando mitocôndrias isoladas de coração de rato em ausência de respiração pelo uso concomitante de cianeto. Como a abertura da TPM é causada por excessivo

acúmulo de Ca^{2+} associado ao estresse oxidativo (Kowaltowski *et al.*, 2001b), tanto a captação de cálcio quanto a produção de EROs foram medidas.

A abertura do mitoK_{ATP} em mitocôndrias não altera a captação de Ca^{2+} em mitocôndrias não tratadas com cianeto (Kowaltowski *et al.*, 2001a). Todavia, resultados do nosso laboratório e de outros (Belisle and Kowaltowski, 2002; Murata *et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 2001) sugerem que a abertura deste canal pode prevenir a captação de Ca^{2+} em condições isquêmicas. Desse modo, na Fig. 7A nós medimos diretamente a captação máxima de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas em ausência de respiração devido à presença de cianeto. O potencial de membrana nestas condições foi suportado pela presença do ATP, pela atividade de ATPase da ATP sintase (Rego *et al.*, 2001). Nestas condições, a captação de Ca^{2+} foi levemente diminuída pela presença do DZX (Fig. 7A). Entretanto, esta diferença em média foi pequena. Portanto, a captação total de Ca^{2+} , que é determinante para a ocorrência de TPM mitocondrial, foi somente levemente diminuída pelo DZX (Fig. 7B). Deste modo, parece pouco provável que esta diferença tão pequena na captação de cálcio seja, sozinha, reponsável pela prevenção da TPM mitocondrial pela abertura do mitoK_{ATP} em ausência de respiração.

Na Fig. 7C, D e E, nós também analisamos a produção de EROs a fim de estabelecer se seria um parâmetro importante para a inibição da TPM mitocondrial após abertura do mitoK_{ATP} em situação isquêmica. Neste sentido, resultados prévios do nosso laboratório mostraram que a abertura deste canal pode prevenir a produção de EROs em um mecanismo relacionado a um desacoplamento leve promovido pela atividade deste canal e pela atividade do trocador K^+/H^+ (Ferranti *et al.*, 2003). Os experimentos mostrados na Fig. 7C, D e E foram conduzidos para verificar se o mitoK_{ATP} poderia também prevenir a liberação de EROs em ausência de respiração na presença e ausência de Ca^{2+} . Este íon estimula a produção de EROs em mitocôndrias isoladas (Grijalba *et al.*, 1999; Kowaltowski *et al.*, 1999; Kowaltowski *et al.*, 2001b). Nós usamos o H_2DCF como indicador da produção de EROs já que este pode funcionar na presença de cianeto, que interfere em outros métodos mais sensíveis baseados na reação da HRP. Embora este método seja menos sensível,

verificamos que o DZX reprodutivelmente diminuiu a fluorescência do DCF na presença de cianeto, de maneira sensível ao antagonista do mitoK_{ATP} 5-HD (Fig. 7C). Curiosamente, a ação preventiva do DZX sobre a produção de EROs foi ainda mais evidente quando o Ca²⁺ estava presente (Fig. 7, Painéis D e E).

Figura 7: Efeitos da abertura do mitoK_{ATP} sobre a captação de Ca²⁺ e produção de EROs em ausência de respiração. A suspensão mitocondrial (~0.8 mg/mL) foi incubada em Hepes 10 mM, piruvato 2 mM, malato 2 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 150 mM, KH₂PO₄ 2 mM, ATP 1 mM e KCN 500 μM, pH 7,2 (KOH), a 37°C. Nos Painéis A e B, Ca²⁺ Green 0,1 μM estava presente para medir o Ca²⁺ extramitocondrial. Ca²⁺ (suficiente para aumentar os níveis de cálcio livre em 60 μM) foi adicionado onde indicado pela seta. Painel A – traçado típico da captação de Ca²⁺, na presença (azul) ou ausência (vermelho) de 40 μM de DZX. Painel B – média total da captação de Ca²⁺ (n = 6). Os Painéis C, D e E mostram experimentos realizados na presença de H₂DCF 10 μM para medir as EROs mitocondriais sem adições (linha a), com 30 μM de DZX (linha b) ou 30 μM de DZX e 150 μM de 5-HD (linha c). No Painel D, Ca²⁺ (suficiente pra aumentar os níveis de cálcio livre para 200 μM) foi adicionado onde indicado. O Painel E representa a média de 3-6 experimentos como aqueles nos Painéis C e D. *, p < 0,05 relativo ao DZX; **, p < 0,05 relativo ao DZX mais Ca²⁺.

Esses resultados indicam que a abertura do mitoK_{ATP} é um mecanismo eficiente para prevenir a liberação de EROs em mitocôndrias na ausência de respiração, com um efeito aumentado quando Ca²⁺ está presente. Há assim um mecanismo de ação sinérgica do mitoK_{ATP} sobre a captação Ca²⁺ e liberação de EROs por mitocôndrias isoladas, já que, como mencionado

previamente, este íon leva ao estresse oxidativo mitocondrial (Grijalba *et al.*, 1999; Kowaltowski *et al.*, 1999; Kowaltowski *et al.*, 2001b) e mesmo pequenas diminuições na captação de Ca^{2+} (Fig. 7, A e B) observadas após a abertura do mitoK_{ATP} seriam suficientes para prevenir a liberação de EROs.

Medimos então a geração de EROs usando H₂DCF nas células HL-1 nas mesmas condições e tratamentos a que estas foram submetidas no estudo de viabilidade na Fig. 6. Com isso pudemos estabelecer com melhor precisão a inter-relação entre estresse oxidativo, mitoK_{ATP}, TPM e cardioproteção isquêmica. A fluorescência do DCF foi representada como níveis relativos ao controle (sem pré- tratamento) em cada ponto do tempo para compensar as mudanças de fluorescência promovidas pelas lavagens. Foi encontrado que células submetidas à isquemia e reperfusão sem tratamento prévio apresentam dois picos de formação de EROs (Fig. 8). O primeiro logo após o início da isquemia e outro ainda maior após o início da reperfusão, quando o cianeto foi retirado (●). A prevenção da TPM mitocondrial pela CsA (▲), no entanto, diminuiu somente o segundo aumento na fluorescência do DCF, que deve ocorrer em resposta à TPM ou ser consequência da degradação celular. A CsA não teve qualquer efeito no aumento da fluorescência observado logo após o início da isquemia. Por outro lado, o DZX (■) preveniu eficientemente os dois picos de formação de EROs.

Este achado é compatível com a idéia que a abertura do mitoK_{ATP} evita o estresse oxidativo mitocondrial, resultando em inibição da ocorrência de TPM e protegendo as células contra morte celular isquêmica. Portanto, confirmamos a participação da TPM como indutora de morte celular durante, principalmente, a reoxigenação e adicionamos que a abertura do mitoK_{ATP} permite ao tecido uma proteção adicional por diminuir a produção de EROs, prevenindo dessa forma a indução de TPM.

Figura 8: Abertura do mitoK_{ATP} inibe a produção de EROs durante isquemia e reperfusão. Células HL-1 pré-tratadas com DCF foram submetidas a isquemia simulada nas mesmas condições descritas na Fig. 6. Dados são mostrados como média $\pm$ SE de ao menos 4 repetições. O teste estatístico foi executado por *one-way Anova* seguido por *Tukey test*. * $p < 0,05$ comparado com isquêmicos não tratados. O Painel à direita representa os primeiros minutos do experimento (conforme indicado pela caixa pontilhada) ampliados.

Durante os períodos de isquemia curta, existe uma geração de EROs que levam ao pré-condicionamento. Muitos autores sustentam a hipótese de que a abertura do mitoK_{ATP} precede essa geração (Forbes *et al.*, 2001; Lebuffe *et al.*, 2003; Pain *et al.*, 2000). Isto é apoiado por modelos em que a abertura do mitoK_{ATP} por DZX leva a geração de EROs, que agiriam como sinalizadores, melhorando a capacidade antioxidante e a proteção cardíaca (Forbes *et al.*, 2001; Pain *et al.*, 2000). Estas conclusões foram conseguidas a partir de experimentos onde o DZX aumenta a fluorescência do DCF (Forbes *et al.*, 2001) e MitoTracker (Carroll *et al.*, 2001; Krenz *et al.*, 2002). Por outro lado, o nosso grupo encontrou que em mitocôndrias isoladas a adição de DZX diminui a fluorescência do DCF ou Amplex Red (Ferranti *et al.*, 2003). Portanto, esse efeito contrasta com a medida de DCF em células intactas.

A fim de melhor entender a relação entre EROs e mitoK_{ATP}, nós decidimos estudar os efeitos ou as interações do DZX com o DCF em mais detalhe, no intuito de esclarecer se o DZX tem efeitos distintos em células

versus em mitocôndrias isoladas. Nós verificamos que a adição de DZX em células HL-1 carregadas com DCF aumentou a fluorescência do indicador (Fig. 8, painel à direita), um resultado similar ao relatado por outros autores (Cone *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2001; Oldenburg *et al.*, 2002; Oldenburg *et al.*, 2003). Do mesmo modo, usando homogenatos de coração de rato (Fig. 9A, linha a) e de células HL-1 (Fig. 9C, linha a), o DZX promoveu um aumento pequeno, porém reproduzível, da fluorescência do DCF. A adição de antimicina A (AA), que bloqueia o complexo respiratório III e maximiza o escape de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial e, conseqüentemente, a formação de EROs (Kowaltowski e Vercesi, 1999; Turrens *et al.*, 2003), aumentou a fluorescência do DCF em nosso modelo (Figs. 9A e 9C, linhas b). No entanto, uma adição de DZX após a antimicina A novamente aumentou a fluorescência do DCF. A adição do desacoplador CCCP (Figs 9A e 9C, linhas c), que minimiza a formação de EROs mitocondrial (Brand *et al.*, 2004; Brookes, 2005; Kowaltowski e Vercesi, 1999; Starkov, 1997; Turrens, 2003), também não preveniu o incremento na fluorescência do DCF promovido pela adição do DZX. Ainda mais curiosamente, incrementos na fluorescência do DCF foram visualizados mesmo quando as mitocôndrias não estavam respirando por ausência de substratos respiratórios (Fig. 9A, linha d). Surpreendentemente, o aumento de fluorescência continuou quando o homogenato celular foi depletado de mitocôndrias através de centrifugações (linha e). Incrementos médios de fluorescência são mostrados nas Figs. 9B e 9D, e indicam que o DZX aumenta a fluorescência de DCF mesmo em condições em que as mitocôndrias não estavam funcionais. Esta série de resultados, que foram recentemente confirmados por outros (Drose *et al.*, 2006), levou-nos a propor que DZX tem uma indesejável interação com DCF que não é relacionada à atividade do mitoK_{ATP}. De fato, a fluorescência do Amplex Red, um indicador da produção ROS mais sensível (Ferranti *et al.*, 2003), não aumentou quando o DZX foi adicionado ao homogenato de coração. Ao contrário, uma pequena diminuição foi visualizada quando o DZX foi adicionado (Fig. 10). Ao mesmo tempo, não foi visualizado nenhum aumento de fluorescência quando a cadeia respiratória estava inibida com AA ou com o agente desacoplador CCCP após adição de DZX (resultados não mostrados). Adicionalmente, este composto não teve efeito quando adicionado na ausência de substrato respiratório (Fig.

10B).

Figura 9: DZX aumenta a fluorescência do DCF de maneira independente da função mitocondrial. Homogenatos de coração de rato (Painéis A e B) ou de células HL-1 (painéis C e D) foram pré-incubadas por 1 hora com 10 μ M H_2DCF -DA em 300 mM de sacarose, Hepes 10 mM (pH 7,2), EGTA 2 mM e BSA 1 mg/mL a 37°C. HRP (1 U/mL) foi adicionada antes de cada traçado. Onde indicado, 2 mM de malato e 2 mM de glutamato (mal/glut), DZX 30 μ M, antimicina A (AA) 1 μ M e CCCP 1 μ M foram adicionados. Os Painéis A e C representam traçados típicos da fluorescência do DCF no tempo. Os números sob cada traçado indicam incrementos relativos na fluorescência do DCF (U.A./s). Os Painéis B e D mostram a média $\pm$ S.E. dos incrementos de fluorescência relativos para o controle sem substrato.

Portanto, os resultados mostrados na Fig. 9 nos revelam o contrário do que já foi pensado e sugerido por outros (Forbes *et al.*, 2001; Carroll *et al.*, 2001; Krenz *et al.*, 2002) e, ainda mais, nos fazem propor que existe uma interação inespecífica (não relacionada à atividade do mitoK_{ATP}) artefactual quando se observa um aumento de fluorescência do DCF após adição do DZX.

Figura 10: Efeito do DZX sobre a fluorescência do Amplex Red em homogenatos de coração. Os homogenatos foram colocados em contato com o Amplex Red logo antes do início de cada experimento. Os homogenatos foram preparados em 300 mM de sacarose, Hepes 10 mM (pH 7,2), EGTA 2 mM e BSA 1 mg/mL a 37°C. HRP (1 U/mL) foi adicionada antes de cada traçado. Onde indicado, 2 mM de malato e 2 mM de glutamato (mal/glut), DZX 30 μ M e CCCP 1 μ M foram adicionados. O Painei A representa um traçado típico da fluorescência do Amplex Red no tempo. Os números sob cada traçado indicam incrementos relativos na fluorescência (U.A./s). O Painei B mostra a média $\pm$ S.E. dos incrementos de fluorescência relativos para o controle sem substrato.

Como já foi dito anteriormente, durante o período de isquemia curta do pré-condicionamento há um evidente aumento na geração de EROs (Facundo *et al.*, 2006a; Forbes *et al.*, 2001; Lebuffe *et al.*, 2003; Pain *et al.*, 2000; Vanden Hoek *et al.*, 2000). Uma indicação adicional de que a ativação do mitoK_{ATP} não aumenta a liberação de EROs durante o pré-condicionamento isquêmico é mostrada na Fig. 11. Neste protocolo, nós analisamos a formação de EROs usando DCF somente durante o período de isquemia e perfusão curtas, ou seja no período de pré-condicionamento antes do período de CN⁻/aglicemia letal. Células pré-condicionadas (caixa pontilhada) apresentam um aumento de EROs significativo, de maneira insensível ao 5-HD ou GLY. Como ambas as drogas são efetivas em prevenir os efeitos benéficos do pré-condicionamento (Fig. 5), este resultado sugere que a ativação do mitoK_{ATP} é posterior à geração de EROs no pré-condicionamento isquêmico. Portanto, baseado nos resultados do nosso laboratório usando mitocôndrias isoladas (Ferranti *et al.*, 2003) e o achado que diferentes agonistas do mitoK_{ATP} previnem estresse oxidativo durante isquemia e reperfusão e CN⁻/aglicemia (Facundo *et al.*, 2005; Facundo *et al.*, 2006a; Vanden Hoek *et al.*, 2000;), nós

sugerimos que a atividade deste canal diminui a liberação de EROs. Esta sugestão é compatível com os efeitos de desacoplamento leve do mitoK_{ATP} (Kowaltowski *et al.*, 2001a; Ferranti *et al.*, 2003). Discretas diminuições no potencial de membrana são muito eficientes em prevenir geração de EROs mitocondrial devido ao aumento nas taxas respiratórias (Brand *et al.*, 2004). A idéia que o mitoK_{ATP} é ativado por EROs (Zhang *et al.*, 2001, veja resultados adiante) e promove leve desacoplamento, resultando em diminuição da formação de EROs (Ferranti *et al.*, 2003), sugere um elegante mecanismo de feedback que regula o estado redox mitocondrial. De fato, um mecanismo similar regula a atividade de proteínas desacopladoras mitocondriais (Brand *et al.*, 2004). Em adição, proteínas desacopladoras também são protetoras contra dano isquêmico (Hoerter *et al.*, 2004).

Figura 11: A inibição da abertura do mitoK_{ATP} não previne a geração de EROs durante o pré-condicionamento isquêmico (PI). Células HL-1 pré-incubadas com H₂DCF foram submetidas à PI (■, ▲ e ▼) na presença de 5-HD (▲) ou GLY (▼), nas condições descritas na Fig. 3. Células HL-1 controle (♦) foram submetidas somente às centrifugações. A fluorescência do DCF foi medida nos pontos de tempo indicados. As caixas pontilhadas representam períodos de PI. Os dados são expressos como média ± S.E. de ao menos 4 repetições. Durante os períodos de pré-condicionamento, $p < 0,05$ para PI versus o controle, 5-HD versus o controle e GLY versus controle.

Como já descrito anteriormente neste trabalho, nossa proposta em relação à produção EROs e ativação do mitoK_{ATP} durante o pré-condicionamento (Facundo *et al.*, 2005; Facundo *et al.*, 2006a) é discrepante

da proposta de outros da literatura (Andrukhiv *et al.*, 2006; Carroll *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2001; Krenz *et al.*, 2002). Estes grupos com idéias contrárias as nossas apóiam a idéia onde a ativação do canal promoveria a geração de EROs, portanto, melhorando a capacidade antioxidante do sistema e, com isso, a cardioproteção (Fig. 12, proposta I, Forbes *et al.*, 2001; Lebuffe *et al.*, 2003; Pain *et al.*, 2000). Baseado em nossos achados que a ativação do mitoK_{ATP} significativamente diminui a geração de EROs (Ferranti *et al.*, 2003; Facundo *et al.*, 2005), nós propomos que a atividade deste canal é cardioprotetora por gerar um desacoplamento leve do potencial de membrana mitocondrial que fortemente previne gerações danosas de EROs (para revisão ver Starkov, 1997; Brookes, 2005). Portanto, uma nova hipótese pode ser apresentada em que a liberação de EROs durante o período de pré-condicionamento precede a ativação do mitoK_{ATP}, dessa forma resultando em menor geração de EROs pela mitocôndria, principalmente, durante a reperfusão (Fig. 12, proposta II, Facundo *et al.*, 2005; Facundo *et al.*, 2006a).

Figura 12: Duas propostas de seqüências levando à proteção contra isquemia após pré-condicionamento. Relações propostas entre a ativação do mitoK_{ATP}, geração de EROs, mudanças na capacidade antioxidante, ativação de proteínas kinases e alterações no metabolismo energético e homeostase de Ca²⁺.

Entretanto, a proposta II (Fig. 12) não é consistente com achados da literatura onde a cardioproteção promovida pelo DZX é inibida pela presença de antioxidantes (Forbes *et al.*, 2001; Lebuffe *et al.*, 2003; Pain *et al.*,

2000). Analisando mais cuidadosamente os achados de outros na literatura, nós verificamos que os antioxidantes usados nestes estudos eram todos redutores tiólicos tais como NAC e MPG. Partindo-se do princípio que a atividade deste canal é inibida por redução tiólica e aumentada por oxidação de tióis (Szewczyk *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001), é possível que estes compostos diretamente desensibilizem o mitoK_{ATP} contra a abertura pelo DZX. Para testar esta hipótese, usamos mitocôndrias isoladas de coração de rato e seguimos a diminuição no espalhamento de luz promovida pelo inchamento mitocondrial secundária à captação de K⁺ através do mitoK_{ATP} (Kowaltowski *et al.*, 2001a). Como observado previamente (Kowaltowski *et al.*, 2001a), o ATP inibiu o inchamento secundário à entrada de K⁺ de uma maneira revertida pelo DZX (Fig. 13). Por outro lado, apesar de NAC, MPG ou ditiotreitól (DTT) não inibirem o inchamento em condições controles ou não interferirem no teste quando na presença de ATP, reverteram o inchamento por DZX (Fig. 13). Isto sugere que a ativação do mitoK_{ATP} mediada pelo DZX é dependente do estados redox de grupos tiólicos na proteína do canal e, portanto, a sua atividade é inibida quando redutores tiólicos estão presentes. Esses resultados, muito convincentes pois foram conseguidos com três diferentes redutores tiólicos, foram confirmados em mitocôndrias de cérebro em nosso laboratório (Fornazari e Kowaltowski, dados não publicados).

Para mostrar que esse efeito era característico de redutores tiólicos, conduzimos o mesmo experimento na presença de ascorbato (100 µM), que remove EROs mas não reduz diretamente grupos tiólicos. Esse experimento nos revelou que as taxas de inchamento promovidas na presença de DZX e ascorbato ($90.49 \pm 9.73\%$ do inchamento controle) foram iguais às taxas na presença do DZX sozinho ($94.61 \pm 8.55\%$ do inchamento do controle neste experimento).

No nosso modelo em mitocôndrias isoladas, os redutores tiólicos interferiram diretamente na abertura do canal pelo DZX. A fim de evitar interferência do conteúdo redox de tióis, nós testamos os efeitos da catalase, uma enzima antioxidante que não apresenta atividade tiólica. Testamos o efeito da enzima diretamente em células HL-1 e corações submetidos ao pré-

condicionamento isquêmico ou com DZX (de acordo com Fig. 3 e 4). Neste sentido, a catalase é uma excelente escolha, pois remove H_2O_2 , uma ERO que não é muito reativa, é permeável às membranas e está envolvida na rota de sinalização do pré-condicionamento isquêmico (Vanden Hoek *et al.*, 1998; Yaguchi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002).

Figura 13: Antioxidantes tiólicos desensibilizam a ativação do mitoK_{ATP} pelo DZX. Mitocôndrias isoladas de coração de rato (0.25 mg de proteína/mL) foram incubadas em KCl 100 mM, K-Hepes 10 mM (pH 7,2), MgCl₂ 2 mM, KH₂PO₄ 2 mM, K-succinato 2 mM e oligomicina 1 µg/mL, na ausência de ATP (controle), com ATP 1 mM, DZX 10 µM e/ou NAC 4 mM (Painéis A e B), 200 µM de MPG (Painel C) ou 100 µM de DTT (Painel D). O Painel A mostra experimentos representativos, enquanto os Painéis B, C e D representam as médias ± erros padrões das taxas de inchamento relativas ao controle, calculadas pela diminuição do espalhamento de luz após 20 segundos de corrida. *, p < 0,05 versus controle; **, p < 0,05 versus ATP; ***, p < 0,05 versus ATP + DZX.

De fato, a catalase adicionada às células somente durante o período de pré-condicionamento (Fig. 14A, ▲) completamente reverteu seu efeito benéfico (◆). Entretanto, a presença da mesma concentração de catalase durante o tratamento com DZX (Fig 14B, ▼) não preveniu os efeitos benéficos do tratamento com DZX (■) no dano celular causado por isquemia e reperfusão simulada por cianeto em ausência de glicose (●). Por outro lado, o pré-condicionamento que nós usamos neste trabalho foi com isquemia simulada usando concentrações milimolares de cianeto seguindo protocolo já mostrado na literatura (Irie *et al.*, 2003). Uma questão que poderia surgir era se o cianeto adicionado não estivesse impedindo o efeito da catalase (Wolfe *et al.*, 1957) ou se o efeito poderia ser perdido apenas porque o cianeto estaria ligando no heme da catalase e não seria disponibilizado para agir e iniciar o pré-condicionamento. Para tentar responder essas perguntas, conduzimos um experimento em oxígrafo com eletrodo sensível a oxigênio e verificamos como estava a respiração celular e concentrações de O_2 nas condições descritas em Materiais e Métodos. Se o cianeto realmente inibisse a catalase, nós não veríamos um aumento na concentração de O_2 após se adicionar H_2O_2 . Como mostrado na Fig. 14A (inserto), a respiração das células HL-1 não foi afetada pela adição de catalase, mas foi completamente inibida pelo cianeto (2 mM). Porém, mesmo na presença do cianeto, foi verificado um aumento na concentração de O_2 após adição de H_2O_2 , provando que a catalase não estava inibida no nosso sistema e que estava removendo o H_2O_2 . A formação de O_2 após adição de H_2O_2 também foi verificado na ausência de cianeto (resultado não mostrado).

A verificação dos efeitos da catalase foi também executada em corações isolados de coração de rato perfundidos em sistema de Langendorff. Adicionalmente, foi testado o efeito do MPG, que nós mostramos anteriormente que interfere diretamente na ação do DZX na ativação do mitoK_{ATP}. De fato, o antioxidante com propriedade de redutor tiólico (MPG) adicionado somente durante o período de pré-condicionamento, como no protocolo descrito na Fig. 4, preveniu os efeitos benéficos deste procedimento, como visto através da liberação de lactato desidrogenase (LDH) dos corações perfundidos (Fig. 14C).

Interessantemente, o MPG também reverteu fortemente a cardioproteção promovida pelo DZX (Fig. 14C) (Forbes *et al.*, 2001; Pain *et al.*, 2000).

Figura 14: A catalase inibe as ações protetoras do pré-condicionamento isquêmico mas não de DZX. Nos Painéis A e B, células HL-1 foram expostas a CN⁻/aglicemia (●) após o PI (painel A, ■) ou tratamento com DZX (painel B, ■) na presença de 2 μM de catalase (▲), como descrito na Fig. 3. Todas as amostras foram centrifugadas e re-suspendidas em tampão controle onde indicado pela seta. Os dados são mostrados como média ± S.E. de 3 repetições. $p < 0,05$ aos 125 min para PI versus CN⁻/aglicemia (Painel A), PI versus PI + catalase (Painel A), e em 105 min para DZX versus CN⁻/aglicemia (Painel B) e CN⁻/aglicemia versus DZX + catalase (Painel B). O gráfico inserido no painel A mostra os efeitos do cianeto sobre a atividade da catalase. Em A e B onde indicado, catalase (Cat 2 μM), KCN 2 mM e H₂O₂ 200 μM foram adicionados. O Painel C representa a atividade da LDH liberada por corações perfundidos em 5-10 min de reperfusão e produtos da taxa pela pressão em 60 min de reperfusão. Os dados representam média ± erro padrão de 3 repetições. IR = isquemia/reperfusão; PI = pré-condicionamento isquêmico. Cat 1 μM; DZX 30 μM e MPG 500 μM foram adicionados como sumarizado na Fig. 4. Corações não isquêmicos foram perfundidos continuamente por 135 min. *, $p < 0,05$ versus IR; **, $p < 0,05$ versus IP; ***, $p < 0,05$ versus DZX.

Portanto, enquanto o MPG previne tanto cardioproteção pelo DZX quanto pelo pré-condicionamento com cianeto (Figura 14C e D), a catalase, completamente previne somente os efeitos benéficos do pré-condicionamento (Figura 14B, D). Este resultado claramente indica que EROs necessárias a cardioproteção promovida pelo pré-condicionamento isquêmico ocorrem anteriormente à ativação do mitoK_{ATP}, já que a ativação direta do mitoK_{ATP} usando DZX não requer EROs para que tenha efeito protetor.

Juntos, nossos dados apontam para a proposta II da Fig. 12. A proposta I da Fig. 12 se baseia na ideia que EROs geradas pelo mitoK_{ATP} levariam a um aumento de capacidade antioxidante celular, que ajudaria na remoção das EROs tardiamente na reperfusão (Facundo *et al.*, 2005; Facundo *et al.*, 2006a; Vanden Hoek *et al.*, 2000). Neste contexto, resolvemos testar na Fig. 15 se homogenatos de células HL-1 submetidos ao pré-condicionamento ou tratadas com DZX aumentariam o poder antioxidante para remoção de H₂O₂ adicionado ao homogenato celular. O gráfico mostra claramente que não existe indução do poder antioxidante já que tanto as células pré-condicionadas quanto células submetidas ao tratamento prévio com DZX não apresentaram diferença em relação às controles. Esse mesmo resultado foi conseguido no nosso laboratório em homogenato de coração de rato (Facundo *et al.*, 2006a). A atividade de catalase e os níveis de GSH/GSSG também permaneceram inalterados. Portanto, é mais provável que a diminuição na fluorescência do DCF observado nas Figs. 5 e 8 seja devido a menores níveis de geração do que maior grau de remoção de EROs.

Figura 15: Pré-condicionamento isquêmico (PI) e DZX não aumentam a capacidade redox de células HL-1. Homogenato de células HL-1 previamente submetido ao pré-condicionamento isquêmico ou tratamento com DZX. A medida de remoção de H₂O₂ foi executada como descrito em Materiais e Métodos. Dados são média $\pm$ S.E. de ao menos 3 repetições usando diferentes preparações.

Outro mecanismo apontado como protetor do mitoK_{ATP} seria a regulação do volume mitocondrial, um evento que ajudaria a preservar os níveis energéticos celular durante os períodos de isquemia (dos Santos *et al.*, 2002; Kowaltowski *et al.*, 2001a). A fim de melhor entender estas mudanças na morfologia mitocondrial, nós tratamos mitocôndrias com DZX na presença de ATP no intuito de visualizar as mudanças na estrutura das cristas mitocondriais com e sem o mitoK_{ATP} aberto. Podemos ver na Fig. 16 que fotos de microscopia eletrônica revelam diferenças de morfologia entre mitocôndrias com canal fechado por ATP (Fig. 16A) e aberto com DZX na presença de ATP (Fig. 16 B e C). Podemos observar que a quantidade de cristas mitocondriais é menor em situações em que o canal está aberto com espaços entre as cristas que não se verificam quando o canal está fechado com ATP. Isto comprova a teoria de que o mitoK_{ATP} regula o volume mitocondrial (Kowaltowski *et al.*, 2001a).

Figura 16: Efeitos morfológicos da abertura do mitoK_{ATP} em mitocôndrias isoladas de coração de rato. As mitocôndrias foram incubadas em solução contendo Hepes 10 mM, MgCl₂ 2 mM, KH₂PO₄ 2 mM, KCl 150 mM, succinato 4 mM e ATP 1 mM (Painel A), ou com 30 μ M de DZX (Painéis B e C). Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (40000 x).

Apesar dos efeitos do mitoK_{ATP} serem facilmente monitorados em mitocôndrias isoladas através das mudanças que promovem na morfologia mitocondrial, a avaliação da abertura deste canal em células ainda é muito difícil. A fluorescência de FAD tem sido usada com este propósito, pois os níveis deste são correlacionados ao estado metabólico mitocondrial em células como indicador da atividade do mitoK_{ATP} (Liu *et al.*, 1998). Neste aspecto, usa-se um desacoplador ou um inibidor da cadeia transportadora de elétrons como controle do estado redox mitocondrial, identificando-se o máximo e o mínimo de flavoproteínas oxidadas, respectivamente. No entanto, para se ter uma boa resposta da fluorescência de FAD, as células devem ser submetidas a longos períodos em ausência de substrato, um tratamento que interfere fortemente na homeostase celular. Como resultado, os achados não podem ser diretamente extrapolados para condições fisiológicas de uma célula *in vivo*.

Nós fizemos então a hipótese que níveis de NAD(P)H que, assim como os de FAD, refletem a atividade de transporte de elétrons mitocondrial, seriam alterados pela atividade do mitoK_{ATP} e poderiam servir como indicador intracelular desta atividade. Dessa forma, analisamos a fluorescência de NAD(P)H por microscopia confocal em células HL-1 de acordo com Carroll *et al.*, 1995, com o canal farmacologicamente aberto ou fechado. Estes experimentos foram conduzidos no laboratório do Professor Robert Balaban no *National Institutes of Health* – Estados Unidos.

A primeira questão que surge é qual a fonte da fluorescência do NAD(P)H nessas células HL-1 em cultura, e se essa fluorescência é suficiente para ser visualizada por microscopia confocal. Vemos que a fluorescência vermelha do MitoTracker (Fig. 17A), um marcador mitocondrial, se sobrepõe exatamente (Fig. 17C) à fluorescência do NAD(P)H (Fig. 17B), que quando excitado na região do UV emite fluorescência azul na região de 440 nm (Chance e Baltscheffsky, 1958). Este experimento comprova que a fluorescência do NAD(P)H é um bom marcador endógeno para estudos do estado metabólico celular (Chance *et al.*, 1962). Também fica bem claro através deste resultado que a mitocôndria é a maior fonte de geração de NAD(P)H em células HL-1 e que pode ser detectada por fluorescência (Eng *et al.*, 1989). De fato, a adição de CCCP (um desacoplador mitocondrial) diminuiu drasticamente a fluorescência de ambos NAD(P)H e MitoTracker, enquanto a adição de cianeto (que bloqueia o fluxo de elétrons) aumentou a fluorescência do NAD(P)H (dados não mostrados). Desde modo, este é um bom modelo para se estudar o efeito da abertura do mitoK_{ATP} sobre a fluorescência do NAD(P)H.

A entrada de K⁺ na mitocôndria via mitoK_{ATP} juntamente com a atividade do translocador de K⁺/H⁺ poderia ter efeitos desacopladores, no entanto, medidas em mitocôndrias isoladas mostraram somente uma diminuição leve do potencial de membrana da ordem de 1 a 2 mV (Kowaltowski *et al.*, 2001a). Desta forma, principalmente em células, esse efeito não pode ser usado como indicador da abertura do mitoK_{ATP}. Entretanto, a fluorescência de NAD(P)H, que reflete a atividade de transporte de elétrons mitocondrial, pode ser usada em células para se avaliar a abertura deste canal. Assim, como pode ser visto na Fig. 17E, a fluorescência do NAD(P)H foi diminuída após 5 minutos da adição de DZX sobre as células. Para adicionalmente comprovar que essa diminuição se deve ao mitoK_{ATP}, adicionamos a mesma preparação um antagonista específico do mitoK_{ATP} (5-HD). Como pode ser visto na Fig. 17F, a fluorescência foi parcialmente revertida pela presença deste antagonista, sugerindo que esta diminuição na fluorescência deve ocorrer devido ao leve desacoplamento verificado após a abertura do mitoK_{ATP}.

Figura 17: Efeito da abertura do mitoK_{ATP} sobre a fluorescência do NAD(P)H em células HL-1. No Painei A, as células HL-1 foram expostas ao MitoTracker (1 μ M). O Painei B mostra a fluorescência do NAD(P)H. No Painei C é mostrada a sobreposição das fluorescências do MitoTracker e do NAD(P)H. O Painei E mostra o efeito do tratamento por 5 minutos com DZX (30 μ M). O Painei F mostra o efeito do 5-HD (150 μ M) por 20 minutos, adicionado logo após o DZX.

Até agora foi mostrado por nós que a atividade do mitoK_{ATP} é determinada pelo padrão redox de tióis do canal. Todavia, uma pergunta que surge é como esse canal pode ser ativado durante os períodos isquêmicos. Neste contexto, já é conhecido que o mitoK_{ATP} pode ser ativado pela oxidação de tióis promovido por EROs exógenos (Zhang *et al.*, 2001; Facundo *et al.*, 2007). Na nossa proposta, representada na proposta II da Fig. 12, especulamos que o mitoK_{ATP} é ativado por EROs. Desse modo, a fim de provar essa hipótese conduzimos vários experimentos em mitocôndrias isoladas.

Primeiramente, estabelecemos condições em que mitocôndrias geravam altos e baixos níveis de EROs endógenos, sem mudanças no potencial de membrana mitocondrial (que influencia a captação de K⁺). A Fig. 18A mostra que mitocôndrias energizadas com substratos de complexo II (succinato) geram quantidades significativas de H₂O₂, de modo bloqueado pela rotenona (que inibe o complexo I). Isto indica que a maioria das EROs formadas na presença de succinato se deve ao transporte reverso de elétrons

do Complexo II para o Complexo I (Liu *et al.*, 2002). Importaneamente, as taxas respiratórias (resultado não mostrado) e o potencial de membrana mitocondrial (Fig. 18B) não mudaram na presença de succinato sozinho comparado com succinato mais rotenona. Portanto, nestas condições a força que direciona o K^+ para a mitocôndria não muda, entretanto, a liberação de EROs endógeno é significativamente alterada, um modelo experimental adequado para determinar a regulação do mitoK_{ATP} por EROs endógenas mitocondriais.

Figura 18: Geração de EROs e potencial de membrana em mitocôndrias incubadas em presença de succinato. Mitocôndrias (~0.25 mg de proteína/mL) foram incubadas em KCl 150 mM, Hepes 10 mM, MgCl₂ 2 mM, KH₂PO₄ 2 mM, oligomicina 1 µg/mL, pH 7,2 (KOH) a 37°C. O Painel A mostra um traçado típico da geração de EROs medido na presença de 50 µM de Amplex red e 1 U/mL de HRP como descrito em Materiais e Métodos. Onde indicado, succinato 2 mM ou rotenona 2 µM foram adicionados. O Painel B mostra traçados de potencial de membrana típicos em 2 mM de succinato e 2 mM de succinato + 2 µM de rotenona (os traçados estão sobrepostos). A medida foi conduzida pela mudança de fluorescência de 5 µM safranina O. CCCP (1 µM) foi adicionado onde indicado.

A Fig. 19 (ver traçados representativos no Painel A e média $\pm$ desvio padrão no painel B, barras preenchidas) mostra a medida de captação de K^+ pelas mitocôndrias monitorada através do inchamento na presença de succinato sozinho ou succinato mais rotenona. Interessantemente, as taxas de inchamento foram significativamente maiores quando a geração de EROs endógenas foi estimulada pela presença de succinato sozinho relativo ao

inchamento produzido na presença de succinato mais rotenona. O menor inchamento observado na presença de rotenona foi aumentado pela adição de H_2O_2 exógeno, de maneira prevenida pela catalase, sugerindo que os canais mito K_{ATP} são sensíveis à oxidação/redução. Por outro lado, o H_2O_2 não apresentou nenhum efeito quando o succinato sozinho estava presente (da Silva, M. M. E Kowaltowski, A. J., resultados não publicados). Dessa forma, parece claro que EROs endógenas ativam o transporte de K^+ . Um controle realizado por nós foi feito na ausência de K^+ , onde este íon foi trocado por Na^+ (Figura 19B, barras vazias). Como pode ser visto, nenhuma das adições afetou o inchamento nestas condições, confirmando que os efeitos de EROs endógenos e exógenos são relacionados somente ao transporte de K^+ , e eliminando a possibilidade que alguma permeabilização não seletiva da membrana interna mitocondrial ocorreu nestas condições devido à oxidação de lipídeos ou proteínas (Kowaltowski e Vercesi, 1999).

Figura 19: EROs endógenas e exógenas ativam mito K_{ATP} . Mitocôndrias (~0.25 mg de proteína/mL) foram incubadas em KCl 100 mM, succinato 2 mM, Hepes 10 mM MgCl_2 , 2 mM, KH_2PO_4 2 mM e oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$, pH 7,2 (KOH) a 37°C. O Painel A mostra um traçado representativo. O Painel B representa médias relativas ao controle de ao menos 4 repetições como as do Painel A. Barras cheias são experimentos em K^+ , enquanto as barras vazias são experimentos em meio com Na^+ . Onde indicado, rotenona 2 μM , ATP 1 mM, H_2O_2 1 μM e catalase 2 μM (CAT) estavam presentes. *, p < 0,05 versus succinato; **, p < 0,05 versus succinato + rotenona; ***, p < 0,05 versus succinato + rotenona + H_2O_2 .

Embora possamos afirmar que a entrada de potássio na mitocôndria foi ativada por H_2O_2 exógeno, isto não foi verificado na presença do ATP (1 mM, Fig. 19). Baseado no resultado de que a mitoSUR, a subunidade regulatória do mitoK_{ATP}, é regulada por oxidação e redução de tióis (Szewczyk *et al.*, 1999) e nosso achado que os redutores tiólicos afetam a ativação desta pelo DZX (Fig. 13, Facundo *et al.*, 2006a), hipotetizamos que o estado redox dos tióis na proteína do canal deve determinar a atividade deste canal por afetar esta mitoSUR. A concentração de ATP adotada nos experimentos da Fig. 19 (1 mM) é suficiente para inibir ambas as subunidades deste canal, mitoSUR e mitoKIR (esta última é a subunidade que transporta o K^+ e liga o ATP com baixa atividade, Mironova *et al.*, 2004).

A fim de verificar se a oxidação poderia sobrepujar a ação inibitória do ATP sobre o mitoSUR, nós comparamos os efeitos do H_2O_2 na presença de alta (que inibe ambas as subunidades) e baixa concentrações de ATP (que inibem somente a mitoSUR). Nós encontramos (Fig. 20A) que o H_2O_2 não aumentava o inchamento na presença de altas concentrações de ATP (0.5 mM), mas pôde reverter a inibição do inchamento promovido por concentrações de ATP que somente afetam a mitoSUR (0,1 mM, Mironova *et al.*, 2004). A ativação da entrada de K^+ promovida pelo H_2O_2 nestas condições foi revertida pelos antagonistas do mitoK_{ATP} 5-HD e Gly, sugerindo que a regulação redox deste canal deve ocorrer no mitoSUR. Portanto, nós concluímos que a mitoSUR é a provável subunidade do mitoK_{ATP} sensível à EROs. Adicionalmente, nós determinamos a concentração de H_2O_2 necessárias para ativar o mitoK_{ATP} (Fig. 20B): O $K_{1/2}$ foi de 418 ± 61 nM de H_2O_2 .

A partir destes resultados fica bastante claro pra nós que a formação de EROs no pré-condicionamento não é devida à atividade do mitoK_{ATP} e parece, por outro lado, ativar a entrada de potássio na matriz mitocondrial, iniciando os efeitos protetores do pré-condicionamento. Um destes efeitos é provavelmente a diminuição da geração de EROs (Ferranti *et al.*, 2003, Fig. 12, proposta II). Assim, seria interessante expandir o entendimento da atividade do canal neste sentido.

Figura 20: Ativação dose-dependente do mitoK_{ATP} por H₂O₂. Mitocôndrias (~0.25 mg de proteína/mL) foram incubadas em KCl 100 mM, succinato 2 mM, Hepes 10 mM, MgCl₂ 2 mM, KH₂PO₄ 2 mM, oligomicina 1 µg/mL, pH 7,2 (KOH) a 37°C. No Painél A, as taxas de inchamento foram calculadas como descrito na Fig. 13, na presença de concentrações de ATP mostradas e (onde indicado) H₂O₂ 1 µM, 5HD 150 µM e Gly 2 µM. No Painel B, as taxas de inchamento foram medidas na presença de 0,1 mM de ATP, com diferentes concentrações de H₂O₂. Esse resultado foi representado com as porcentagens da resposta máxima. *, p < 0,05 versus Controle; **, p < 0,05 versus ATP.

Esta é a primeira descrição que mitoK_{ATP} é sensível à oxidação por EROs geradas na própria mitocôndria (Figs. 18 e 19). De fato, a captação máxima de K⁺ em mitocôndrias isoladas foi observada somente quando a liberação endógena de EROs foi estimulada pelo transporte reverso de elétrons, que é aumentada quando estão presentes alto potencial de membrana e succinato (sem rotenona, Liu *et al.*, 2002). Alguns acreditam que o transporte reverso de elétrons do complexo II mitocondrial para o complexo I pode ser o maior evento gerador de EROs *in vivo* (Turrens *et al.*, 2003).

A geração de EROs em mitocôndrias após a abertura do mitoK_{ATP} infelizmente tem apresentado discrepâncias entre os grupos que tentaram estabelecer alguma relação. Tanto aumentos quanto diminuições já foram observados (Andrukhiv *et al.*, 2006; Dzeja *et al.*, 2003; Ferranti *et al.*, 2003). Como citado anteriormente, um dos motivos dessa discrepância é o fato do DZX aumentar a fluorescência de probes sensíveis a EROs (Andrukhiv *et al.*, 2006; Cone *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2001; Oldenburg *et al.*, 2002; Oldenburg *et al.*, 2003). Este aumento, no entanto, foi mostrado por nós e por outros ser independente da atividade do mitoK_{ATP} (Facundo *et al.*, 2005; Facundo *et al.*,

2006a; Drose *et al.*, 2006). Adicionalmente, o DZX inibe a succinato desidrogenase, e deve afetar a liberação de EROs mitocondrial de maneira independente da atividade do mitoK_{ATP} (Dzeja *et al.*, 2003). Portanto, a fim de evitar esse efeito adverso do DZX sobre a succinato desidrogenase, nós reexaminamos a liberação de EROs usando somente os reguladores fisiológicos do canal: ATP (que inibe o transporte de K⁺) e GTP (um ativador do mitoK_{ATP} – Facundo *et al.*, 2006b; Garlid e Paucek, 2003; Paucek *et al.*, 1996), comparando os efeitos em meio com K⁺ ou com Na⁺. A Fig. 21A demonstra que a captação de K⁺, medida como inchamento mitocondrial, é inibida pelo ATP de maneira revertida pelo GTP. Interessantemente, o ATP presente desde o início aumentou a formação de H₂O₂ mitocondrial de maneira revertida pelo GTP (traçados representativos na Fig. 21B e média $\pm$ erro padrão na Fig. 21C). Na presença de GTP, as taxas de H₂O₂ liberadas alcançaram níveis similares àsquelas observadas na ausência de ATP. Por outro lado, o GTP não apresentou nenhum efeito quando o ATP não estava presente (quando este canal já está ativo, Fig. 21C) ou quando os sais de K⁺ foram substituídos por Na⁺ (Figs. 21B, figura inserida e 21C, barras vazias). Estes experimentos eliminam a possibilidade que o efeito do GTP ocorreria através de mecanismos distintos do mitoK_{ATP} e indicam que a ativação deste canal previne a geração de EROs mitocondrial.

Figura 21: Ativação do mitoK_{ATP} pelo GTP previne a formação de H₂O₂ mitocondrial. Mitocôndrias (~0.25 mg de proteína/mL) foram incubadas em KCl 100 mM, succinato 2 mM, Hepes 10 mM, MgCl₂ 2 mM, KH₂PO₄ 2 mM, oligomicina 1 µg/mL, pH 7,2 (KOH) a 37°C. No painel A, traçados típicos de inchamento são mostrados sem adições (controle) ou com 1 mM de ATP e 100 µM de GTP, como indicado. Nos Paineis B e C, a geração de H₂O₂ foi medida usando 50 µM de Amplex red e 1 U/mL de HRP na presença de 1 mM de ATP e/ou 100 µM de GTP como indicado. A Figura inserida no Painel B e colunas finais (como indicado) no Painel C representam experimentos conduzidos em meio em que todos os sais de K⁺ foram substituídos pelo Na⁺. *, p < 0,05 versus ATP.

5. DISCUSSÃO

As EROs são apontadas por muitos como participantes essenciais na rota de sinalização que inicia o pré-condicionamento (Carroll *et al.*, 2001; Facundo *et al.*, 2005; Facundo *et al.*, 2006a; Forbes *et al.*, 2001; Pain *et al.*, 2000; Krenz *et al.*, 2002; Lebuffe *et al.*, 2003; Vanden Hoek *et al.*, 1998). Desta forma, este estudo examinou a relação entre o pré-condicionamento isquêmico, a formação de EROs e a ativação do mitoK_{ATP} e os seus efeitos na viabilidade celular. Nós usamos mitocôndrias isoladas para demonstrar que os mitoK_{ATPS} são ativados por H₂O₂ exógenos e endógenos. Com esse mesmo modelo, mostramos que esse canal ativado age como um mecanismo de controle de EROs e da captação de Ca²⁺, principalmente durante eventos isquêmicos. A medida da formação das EROs em células cardíacas HL-1 nessas condições indica que estes dois eventos são na verdade inibidos pela atividade do mitoK_{ATP} e que essa abertura ocorre antes da inibição da ocorrência de TPM, prevenindo lesões mitocondriais e a morte celular por isquemia e reperfusão. Nós também encontramos que o pré-condicionamento não melhora ou aumenta a capacidade celular de remoção de H₂O₂ (Fig. 15). Interessantemente, nós também falhamos em encontrar qualquer evidência que a ativação do mitoK_{ATP} (que é parte da rota do pré-condicionamento, Fig. 12) é necessária para o aumento de EROs durante o pré-condicionamento (Fig. 11), o que discorda de outros na literatura (Carroll *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2001; Krenz *et al.*, 2002) que afirmam que a formação de EROs vista durante os períodos de isquemia curta do pré-condicionamento é devida a atividade do mitoK_{ATP}. Por outro lado, encontramos que a formação dessas EROs durante o pré-condicionamento ocorre antes da ativação do mitoK_{ATP}, sugerindo que o mitoK_{ATP} age como um sensor capaz de regular a liberação de EROs em resposta a formação das EROs durante o pré-condicionamento.

Muitos autores têm sugerido e apoiado diferentes seqüências de eventos levando ao pré-condicionamento, em que a ativação do mitoK_{ATP} precede e causa os aumentos de EROs (Carroll *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2001; Krenz *et al.*, 2002, Fig. 12, Proposta I). Esta proposta é baseada em dois achados: (1) o aparente incremento na geração de EROs observado após o

tratamento com DZX e (2) a inibição dos efeitos cardioprotetores do DZX pela incubação com antioxidantes.

Infelizmente, muitos estudos que sugerem que agonistas do mitoK_{ATP} aumentam a geração de EROs são conduzidos usando MitoTracker como um indicador dessas espécies (Carroll *et al.*, 2001; Krenz *et al.*, 2002; Oldenburg *et al.*, 2003). Este grupo de indicadores (Poot *et al.*, 1996), é oxidado por EROs, formando compostos fluorescentes carregados positivamente, mas também lipofílicos, que podem acumular no citosol e na mitocôndria devido aos potenciais de membrana plasmática e mitocondrial, respectivamente. Só esta característica já faria desses marcadores indesejáveis para indicar a formação de EROs, pois o seu sinal dependerá não somente da sua oxidação por EROs mas também do seu acúmulo na célula e mitocôndria devido aos potenciais de membrana. Adicionalmente, Scorrano *et al.* (1999) demonstraram que esses probes apresentam efeitos tóxicos em células incluindo inibição respiratória e indução de permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial. A inadequação de indicadores reduzidos para medir EROs mitocondriais formados em células cardíacas é reforçada pelo achado que sua fluorescência parece ser insensível a inibidores respiratórios (Krenz *et al.*, 2002), um estímulo clássico para o aumento da formação de EROs.

Aumentos na fluorescência do indicador DCF também foram relatadas ocorrer após tratamento com DZX (Forbes *et al.*, 2001), embora esse efeito seja discreto e o resultado não tenha sido efetivamente reproduzido por outros (Oldenburg *et al.*, 2002; Cone *et al.*, 2001). A fluorescência do DCF é amplamente usada como um indicador de EROs. Na forma negativamente carregada, este indicador é carregado em células e oxidado para uma forma não carregada e altamente fluorescente (Bass *et al.*, 1983). Portanto, a fluorescência de DCF é independente de potenciais de membrana. Embora este *probe* não seja seletivo para uma ERO em particular e não responda linearmente aos níveis de EROs gerados, ele pode ser usado como indicador qualitativo para comparar a liberação dessas espécies com o tempo (LeBel *et al.*, 1992). No nosso caso, infelizmente, nós encontramos uma pequena

interferência no método do DCF quando o DZX foi adicionado as células pré-tratadas com DCF (Fig. 9). Este resultado foi recentemente confirmado por outros (Drose *et al.*, 2006) e sugere que a causa do aumento na fluorescência de células intactas relatado por outros (Forbes *et al.*, 2001) deve ser este artefato de interação inespecífica entre DZX e DCF. Nos nossos resultados (Fig. 9) este aumento de fluorescência foi observado mesmo na presença de inibidores e desacopladores, que eliminariam a captação de K^+ pelo mitoK_{ATP}. Portanto, o aumento não deve ser devido à atividade do mitoK_{ATP}. É possível que o DZX levemente aumente a fluorescência do DCF (Rota *et al.*, 1999) por alguma interação artefactual. De fato, este aumento de fluorescência foi observado mesmo na ausência de mitocôndrias (Fig. 9) e não foi detectado usando Amplex Red, que é outro indicador da produção de EROs (Fig. 10). Portanto, nós não achamos qualquer evidência convincente que o mitoK_{ATP}, após sua abertura pelo DZX, promoveria o aumento de EROs. Estes achados estão em concordância com resultados prévios de outros mostrando que o pinacidil, outro agonista do mitoK_{ATP}, não aumentou a formação de EROs medidos como DCF (Vanden Hoek *et al.*, 2000).

A idéia que o mitoK_{ATP} precede a geração de EROs na rota do pré-condicionamento é apoiada também pelo achado onde os efeitos protetores do mitoK_{ATP} podem ser prevenidos por antioxidantes. Nós verificamos que todos os antioxidantes usados nestes experimentos executados por outros (Forbes *et al.*, 2001; Lebuffe *et al.*, 2003; Pain *et al.*, 2000) eram antioxidantes tais como N-acetil cisteína ou mercapto proprionil glicina, que são capazes de reduzir tióis em proteínas. Em virtude disso, comparamos os efeitos de antioxidantes com propriedades de redutores tiólicos com a ação de antioxidantes não redutores tiólicos. Nós encontramos que esses antioxidantes, e ainda outro, o DTT, interferem diretamente com a capacidade do agonista DZX em induzir o inchamento mitocondrial secundário à entrada de K^+ (Fig. 13), confirmando que antioxidantes redutores tiólicos não somente agem como antioxidantes mas também agem interferindo na propriedade do agonista DZX em ativar a corrente de K^+ pelo mitoK_{ATP}. Este achado concorda com observações que sugerem que o mitoK_{ATP} é fortemente

reprimido por redução e ativado por oxidação de tióis em prováveis cisteínas em sua estrutura (Szewczyk *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001).

A fim de evitar a interferência prejudicial dos redutores tiólicos sobre a atividade do mitoK_{ATP}, nós testamos os efeitos da enzima antioxidante catalase que remove H₂O₂ mas que não apresenta atividade redutora de tióis. A catalase foi muito efetiva em inibir os efeitos protetores do pré-condicionamento e não interferiu na proteção mediada pelo DZX (Fig. 14). Este resultado foi confirmado tanto em células HL-1 quanto em corações perfundidos de coração de rato. Neste último modelo, mostramos novamente com o MPG que esse tipo de redutores interferem em ambos os modos de proteção. Este resultado claramente indica que o tratamento com um antioxidante que não apresenta atividade de redutor tiólico não previne a cardioproteção mediada pelo DZX e que as EROs não são necessárias para que essa proteção ocorra, como indicado por nós na proposta II (Fig. 12).

O mitoK_{ATP} purificado e reconstituído é ativado por radicais superóxido (Zhang *et al.*, 2001). No nosso trabalho evoluímos ainda mais nesse conceito ao mostrar que em mitocôndrias isoladas o mitoK_{ATP} pode ser ativado por EROs exógenas e endógenas. Este resultado sugere que as EROs formadas durante os períodos de pré-condicionamento devem ser responsáveis pela ativação destes canais durante o procedimento do pré-condicionamento e que, após a abertura deste canal, induzem as células à proteção contra isquemia e reperfusão. De fato, antagonistas do mitoK_{ATP} fortemente previnem os efeitos benéficos do pré-condicionamento, mas não previnem aumentos na liberação de EROs durante este procedimento, (Vanden Hoek *et al.*, 2000; Facundo *et al.*, 2006a) Além disso, a adição de agonistas do mitoK_{ATP} somente durante o período de reperfusão previne a geração de EROs em cardiomiócitos (Vanden Hoek *et al.*, 2000). Similarmente, a atividade do mitoK_{ATP} em mitocôndrias isoladas diminui a geração de EROs (Ferranti *et al.*, 2003; Facundo *et al.*, 2005). Esta sugestão é compatível com os efeitos desacopladores do mitoK_{ATP} (Kowaltowski *et al.*, 2001a). Diminuições discretas no potencial de membrana mitocondrial são muito efetivas em prevenir a geração de EROs (Brand *et al.*, 2004; Brookes *et al.*, 2005; Turrens, 2003). A

idéia que o $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ é ativado por EROs (Figs. 19 e 20) e promove desacoplamento leve resultando na diminuição de EROs (Ferranti *et al.*, 2003) sugere um mecanismo elegante de auto-regulação do estado redox mitocondrial (Fig. 22). De fato, um mecanismo similar foi demonstrado regular a atividade de proteínas desacopladoras (Brand *et al.*, 2004). Adicionalmente, as proteínas desacopladoras são também protetoras contra danos isquêmicos (Hoerter *et al.*, 2004).

Figura 22: Representação esquemática dos efeitos propostos do pré-condicionamento, EROs, antioxidantes, agonistas e antagonistas do $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. O pré-condicionamento aumenta a geração de EROs pela cadeia respiratória. O acúmulo de EROs pode ser prevenido pela presença de catalase. EROs acumuladas podem oxidar tióis no $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ de uma maneira prevenida ou revertida por N-acetilcisteína (NAC). A redução destes grupos prejudica a ativação farmacológica destes canais pelo DZX e imita os efeitos dos antagonistas 5-hidroxidecanoato (5-HD) e glibenclamida (GLY). Quando ativado, o $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ transporta K^+ para dentro da matriz mitocondrial, estimulando a troca deste íon pelo H^+ (K^+/H^+) resultando em leve desacoplamento e diminuindo a geração de EROs.

Nós mostramos que a atividade do mitoK_{ATP} diminui a captação de Ca²⁺ e a liberação de EROs durante eventos isquêmicos, um mecanismo chave na prevenção da morte celular. Esses dados concordam exatamente com resultados prévios da literatura demonstrando que a abertura deste canal inibe a captação de cálcio mitocondrial durante períodos isquêmicos (Belisle e Kowaltowski, 2002; Ishida *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2001). Eles também são compatíveis com resultados do nosso grupo indicando que o agonista farmacológico DZX (Ferranti *et al.*, 2003) ou o ativador fisiológico GTP (Facundo *et al.*, 2007, Fig. 21) previnem a geração de EROs em mitocôndrias com atividade respiratória. Porém, é surpreendente que a abertura do mitoK_{ATP} possa prevenir a geração de EROs mesmo em mitocôndrias em contato com cianeto que inibe a respiração pois, dessa forma, nenhum efeito desacoplador poderia ocorrer. Este efeito foi muito mais pronunciado na presença de Ca²⁺ (Fig. 7), sugerindo que isto envolve um mecanismo sinérgico do mitoK_{ATP} em prevenir a captação de Ca²⁺ e a geração de EROs (Ver Fig. 23 para ilustração do efeito do mitoK_{ATP} sobre a abertura da TPM em condições isquêmicas). De fato, Ca²⁺ foi previamente mostrado como um indutor do estresse oxidativo mitocondrial (Grijalba *et al.*, 1999; Kowaltowski *et al.*, 1999; 2001b) e mesmo as pequenas diminuições na captação de Ca²⁺ (Fig. 7) como as vistas após abertura do mitoK_{ATP} devem ser suficientes para significativamente prevenir a liberação de EROs.

Evidências recentes indicam que o DZX regula o transporte de K⁺ por inibir o complexo II mitocondrial (succinato desidrogenase) um componente proposto do complexo do mitoK_{ATP} (Ardehali *et al.*, 2004). É possível que esta regulação também envolva o fornecimento de menos elétrons para os complexos mitocondriais. A sugestão que os agonistas do mitoK_{ATP} podem prevenir a morte celular por diminuir a liberação de EROs através de ambos desacoplamento e inibindo succinato desidrogenase é apoiada pelo achado que tanto o desacoplamento quanto inibidores da succinato desidrogenase podem, por si mesmos, prevenir a morte celular isquêmica (Holmuhamedov *et al.*, 2004; Ockaili *et al.*, 2001; Rodrigo *et al.*, 2002).

Figura 23: Conseqüências da abertura do mitoK_{ATP} e prevenção da TPM durante a isquemia. A inibição da cadeia respiratória mitocondrial (Cadeia Resp.) pelo cianeto (CN⁻) leva à diminuição dos estoques intracelulares de ATP devido à ausência de atividade da ATP sintase. A diminuição do ATP e aumento da captação de Ca²⁺ e de fosfato inorgânico (Pi) levam a um aumento da produção de EROs e, conseqüentemente, a ocorrência de TPM. A abertura do mitoK_{ATP} pelo DZX inibe a ocorrência de TPM por diminuição da hidrólise de ATP, da captação de Ca²⁺ e da produção de EROs. A ocorrência de TPM pode ser inibida diretamente pela ciclosporina A (CsA), favorecendo a sobrevivência celular.

Embora nós não acreditamos que aumentos em EROs mitocondriais estejam envolvidos na cardioproteção promovida pelos agonistas do mitoK_{ATP}, existe uma grande evidência apoiando um papel sinalizador para o moderado aumento nas EROs durante eventos do pré-condicionamento (Vanden Hoek *et al.*, 1998; Lebuffe *et al.*, 2003). Durante o pré-condicionamento, mudanças nos níveis locais de oxigênio e a atividade de complexos respiratórios resultam no aumento nos níveis do radical superóxido (Vanden Hoek *et al.*, 1998; da Silva *et al.*, 2003), levando a um leve estresse oxidativo mitocondrial e à ativação de rotas protetoras. Uma dessas rotas é o mitoK_{ATP}, que é ativado por oxidação (Zhang *et al.*, 2001; Facundo *et al.*, 2007).

6. CONCLUSÃO:

Nessa tese, abordamos diversos aspectos dos efeitos redox dos canais mitoK_{ATP}, e buscamos entender a relação entre esses efeitos e a propriedade cardioprotetora da abertura destes canais. A partir dos nossos resultados, podemos concluir que o mitoK_{ATP} age como um sensor para estresse oxidativo, sendo ativado por EROs formadas na mitocôndria durante os períodos de pré-condicionamento, e que deve diminuir a produção destas espécies, servindo como um mecanismo de auto-controle para o balanço redox mitocondrial em situações fisiológicas.

Além disso, demonstramos que entre os múltiplos papéis protetores que o mitoK_{ATP} apresenta durante eventos isquêmicos, uma função chave é a prevenção do estresse oxidativo promovido por Ca²⁺, mantendo a integridade da membrana mitocondrial por prevenir a ocorrência de TPM, e a morte celular (ver Fig. 23 para uma Ilustração esquemática).

Esperamos que nossos resultados contribuam para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos em esquemas de cardioproteção isquêmica, melhorando atuais protocolos terapêuticos.

7. REFERÊNCIAS

- Akerman, KE, Wikstrom, MK (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68:191–197.
- Andrukhiv, A, Costa, AD, West, IC, Garlid, KD (2006) Opening mitoK_{ATP} increases superoxide generation from Complex I of the electron transport chain. *Am. J. Physiol.* 291:H2067–H2074.
- Ardehali, H, Chen, Z, Ko, Y, Mejia-Alvarez, R, Marban, E (2004) Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:11880–11885.
- Auchampach, JA, Grover, GJ, Gross, GJ (1992) Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc. Res.* 26:1054–1062.
- Baines, CP, Goto, M, Downey, JM (1997) Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29: 207-216.
- Bajgar, R, Seetharaman, S, Kowaltowski, AJ, Garlid, KD, Paucek, P (2001) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J. Biol. Chem.* 276:33369-33374.
- Barros, MH, Netto, LES, Kowaltowski, AJ (2003) H₂O₂ generation in *Saccharomyces cerevisiae* respiratory pet mutants: effect of cytochrome c. *Free Radic. Biol. Med.* 35:179-188.
- Bass, DA, Parce, JW, Dechatelet, LR, Szejda, P, Seeds, MC, Thomas, M (1983) Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130:1910-1917.
- Basso, E, Fante, L, Fowlkes, J, Petronilli, V, Forte, MA, Bernardi, P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J. Biol. Chem.* 280:18558-18561.
- Belisle, E, Kowaltowski, AJ (2002) Opening of mitochondrial K⁺ channels increases ischemic ATP levels by preventing hydrolysis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34:285-298.

- 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, Buckingham, JA, Esteves, TC, Green, K, Lambert, AJ, Miwa, S, Murphy, MP, Pakay, JL, Talbot, DA, Echtay, KS (2004) Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochem. Soc. Symp.* 2004:203-213.
- Brookes, PS (2005) Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic. Biol. Med.* 38:12-23.
- Carroll, SL, Klein, MG, Schneider, MF (1995) Calcium transients in intact rat skeletal muscle fibers in agarose gel. *Am. J. Physiol.* 269:C28–C34.
- Carroll, R, Gant, VA, Yellon, DM (2001) Mitochondrial K_{ATP} channel opening protects a human atrial-derived cell line by a mechanism involving free radical generation. *Cardiovasc. Res.* 51:691-700.
- Chance, B, Baltscheffsky, H (1958) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VII. Binding of intramitochondrial reduced pyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* 233:736-739.
- Chance, BP, Jobsis, CF, Schoener, B (1962) Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* 137:499-508.
- Chaudary, N, Naydenova, Z, Shuralyova, I, Coe, IR. (2004) The adenosine transporter, mENT1, is a target for adenosine receptor signaling and PKC{epsilon} in hypoxic and pharmacological preconditioning in the mouse cardiomyocyte cell line, HL-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310:1190-1198.
- Chen, W, Gabel, S, Steenbergen, C, Murphy, E (1995) A redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic preconditioning in perfused rat heart. *Circ. Res.* 77:424-429.
- Claycomb, WC, Lanson, NA, Stallworth, BS, Egeland, DB, Delcarpio, JB, Bahinski, A, Izzo, NJ (1998) HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2979-2984.
- Cone, J, Liu, YG (2001) No evidence of mitoK_{ATP} channel-mediated elevation of reactive oxygen species in isolated rabbit ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33:A23-A23 (abstract).

- Costa, AD, Garlid, KD, West, IC, Lincoln, TM, Downey, JM, Cohen, MV, Critz, SD (2005) Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res.* 97:329-36.
- Crompton, M, Ellinger, H, Costi, A (1988) Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* 255:357-360.
- Das, M, Parker JE, Halestrap, AP (2003) Matrix volume measurements challenge the existence of diazoxide/glibenclamide-sensitive K_{ATP} channels in rat mitochondria. *J. Physiol.* 547:893–902.
- da Silva, MM, Sartori, A, Belisle, E, Kowaltowski, AJ (2003) Ischemic Preconditioning Inhibits Mitochondrial Respiration, Increases H_2O_2 Release and Enhances K^+ Transport. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H154-H162.
- Diwan, JJ, Haley, T, Sanadi, DR (1988) Reconstitution of transmembrane K^+ transport with a 53 kilodalton mitochondrial protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:224-230.
- Domoki, F, Perciaccante, JV, Veltkamp, R, Bari, F, Busija, DW (1999) Mitochondrial potassium channel opener diazoxide preserves neuronal–vascular function after cerebral ischemia in newborn pigs. *Stroke* 30:2713–2718.
- Dos Santos, P, Kowaltowski, AJ, Laclau, MN, Seetharaman, S, Paucek, P, Boudina, S, Thambo, JB, Tariosse, L, Bonoron-Adèle, S, Garlid, KD (2002) Mechanisms by which Opening the Mitochondrial ATP-sensitive Potassium Channel Protects the Ischemic heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283:H296-H301.
- Drose, S, Brandt, U, Hanley, PJ (2006) K^+ -independent actions of diazoxide question the role of inner membrane K_{ATP} channels in mitochondrial cytoprotective signaling *J. Biol. Chem.* 281:23733–23739.
- Dzeja, PP, Bast, P, Ozcan, C, Valverde, A, Holmuhamedov, EL, Van Wylen, DG, Terzic, A (2003) Targeting nucleotide-requiring enzymes: implications for diazoxide-induced cardioprotection. *Am. J. Physiol.* 284:H1048-H1056.

- Echtay, KS, Roussel, D, St-Pierre J, Jekabsons, MB, Cadenas, S, Stuart, JA, Harper, JA, Roebuck, SJ, Morrison, A, Pickering, S, Clapham, JC, Brand MD (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins *Nature* 415 :96-99.
- Eng, J, Lynch, RM, Balaban, RS (1989) Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. *Biophys. J.* 55:621-630.
- Facundo, HTF, de Paula, JG, Kowaltowski, AJ (2005) Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels Prevent Oxidative Stress, Permeability Transition and Cell Death. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37:75-82.
- Facundo, HTF, Carrera RS, De Paula, JG, Santos, CCX, Ferranti, R, Laurindo, FRM, Kowaltowski, AJ (2006a) Ischemic Preconditioning Requires Increases In Reactive Oxygen Release Independent of Mitochondrial K⁺ Channel Activity. *Free Radic. Biol. Med.* 40:469-479.
- Facundo, HT, Fornazari, M, Kowaltowski AJ (2006b) Tissue protection mediated by mitochondrial K⁺ channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1762:202–212.
- Facundo, HTF, de Paula, JG, Kowaltowski, AJ (2007) Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels are Redox-Sensitive Pathways that Control Reactive Oxygen Species Production *Free Radic. Biol. Med.* 42:1039-1048.
- Ferranti, R, da Silva, MM, Kowaltowski, AJ (2003) Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening decreases reactive oxygen species generation. *FEBS Lett.* 536:51-55.
- Forbes, RA, Steenbergen, C, Murphy, E (2001) Oxygen free radical signaling in ischemic preconditioning. *Circ. Res.* 88:802-809.
- Friberg, H, Ferrand-Drake, M, Bengtsson, F, Halestrap, AP, Wieloch, T (1998) Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J. Neurosci.* 18:5151-5159.
- Fridovich, I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112.

- Garlid, KD, Paucek, P, Yarov-Yarovoy, V, Sun, X, Schindler, PA (1996) The mitochondrial K_{ATP} as a receptor for potassium channel openers. *J. Biol. Chem.* 271:8796-8799.
- Garlid, KD, Paucek, P, Yarov-Yarovoy, V, Murray, HN, Darbenzio, RB, D'Alonzo, AJ, Lodge, NJ, Smith, MA, Grover, GJ (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 81:1072-1082.
- Garlid, KD, Paucek, P (2001) The mitochondrial potassium cycle. *IUBMB Life* 52:153-158.
- Garlid, KD, Paucek, P (2003) Mitochondrial potassium transport: the $K(+)$ *Biochim Biophys Acta*.1606:23-41.
- Green, DR, Reed, JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Griffiths, EJ, Halestrap, AP (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* 307:93-98.
- Grijalba, MT, Vercesi, AE, Schreier, S (1999). Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry* 38:13279-13287.
- Grover, GJ, McCullough, JR, Henry, DE, Conder, ML, Sleph, PG (1989) Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and cromakalim and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251:98–104.
- Gunter, TE, Buntinas, L, Sparagna, GC, Gunter, KK (1998) The Ca^{2+} transport mechanisms of mitochondria and Ca^{2+} uptake from physiological-type Ca^{2+} transients. *Biochim. Biophys. Acta* 1366:5-15.
- Halestrap, AP, Kerr, PM, Javadov, S, Woodfield, KY (1998) Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1366:79-94.
- Hausenloy, DJ, Duchen, MR, Yellon, DM (2003) Inhibition mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 60:617-625.

- Hausenloy, DJ, Yellon, DM, Mani-Babu, S, Duchen, MR (2004) Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287:H841-H849.
- Halliwell, B, Gutteridge, JMC (1999) Free radicals in biology and medicine (3rd ed.): Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hanley, PJ, Gopalan, KV, Lareau, RA, Srivastava DK, von Meltzer M, Daut J (2003) Beta-oxidation of 5-hydroxydecanoate, a putative blocker of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *J. Physiol.* 547:387-393.
- Hanley, PJ, Droese, S, Brandt, U, Lareau, RA, Banerjee, AL, Srivastava, DK, Banaszak, LJ, Barycki, JJ, Van Veldhoven, PP, Daut (2005) 5-Hydroxydecanoate is metabolised in mitochondria and creates a rate-limiting bottleneck for beta-oxidation of fatty acids. *J. Physiol.* 562:307-318.
- Hille, B (1973). Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations. *J. Gen. Physiol.* 61:669–686.
- Hirai, T, Fujita, M, Yamanishi K, Ohno A, Miwa K, Sasayama, S (1992) Significance of preinfarction angina for prevention of left ventricular function in acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 124:19–24.
- Hodgkin, AL, Keynes, RD (1955). The potassium permeability of a giant nerve fibre. *J. Physiol. (Lond)* 128:61–88.
- Hoerter, J, Gonzalez-Barroso, MD, Couplan, E, Mateo, P, Gelly, C, Cassard-Doulcier, AM, Diolez, P, Bouillaud, F (2004) Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation* 110:528-533.
- Holmuhamedov, EL, Jahangir, A, Oberlin, A, Komarov, A, Colombini, M, Terzic, A (2004) Potassium channel openers are uncoupling protonophores: implication in cardioprotection. *FEBS Lett.* 568:167–170.
- Hunter, DR, Haworth, RA (1979) The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 195:453-477.
- Inoue, I, Nagase, H, Kishi, K, Higuti, T (1991) ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352:244-247.
- Irie, H, Gao, J, Gaudette, GR, Cohen, IS, Mathias, RT, Saltman, AE, Krukenkamp, IB (2003) Both metabolic inhibition and mitochondrial K_{ATP}

- channel opening are myoprotective and initiate a compensatory sarcolemmal outward membrane current. *Circulation* 108:341-347.
- Ishida, H, Hirota, Y, Genka, C, Nakazawa, H, Nakaya, H, Sato, T (2001). Opening of mitochondrial K_{ATP} channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circ. Res.* 89:856-858.
- Jaburek, M, Yarov-Yarovoy, V, Paucek, P, Garlid, KD (1998) State-dependent inhibition of the mitochondrial K_{ATP} channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *J. Biol. Chem.* 273:13578-13582.
- Karsten, U (1980) Fluorometric estimation of dead cells in cell suspensions. *Experientia* 36:263-264.
- Kicinska, A, Szewczyk, A (2003) Protective effects of the potassium channel opener-diazoxide against injury in neonatal rat ventricular myocytes, *Gen. Physiol. Biophys.* 22:383–395.
- Kim, JS, He, L, Lemasters, JJ (2003) Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis *Biochem Biophys Res Commun.* 304:463-470.
- Korshunov, SS, Skulachev, VP, Starkov, AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416:14-18.
- Kowaltowski, AJ, Castilho, RF, Vercesi, AE (1995) Ca²⁺-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *Am. J. Physiol.* 269:C141-147.
- Kowaltowski, AJ, Netto, LES, Vercesi, AE (1998) The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *J. Biol. Chem.* 273:12766-12769.
- Kowaltowski, AJ, Vercesi, AE (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26:463-471.
- Kowaltowski, AJ (2000) Alternative Mitochondrial Functions in Cell Physio-Pathology: Beyond ATP Production. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33:241-250.
- Kowaltowski, AJ, Vercesi, AE (2001) em: Mitochondria in pathogenesis (Lemasters, J.J. and Nieminem, A.L., Eds), pp. 281- 300, Plenum Publishing Corporation, New York.

- Kowaltowski, AJ, Seetharaman, S, Paucek, P, Garlid, K (2001a) Bioenergetic consequences of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel Opening. *Am. J. Physiol.* 280:H649-657.
- Kowaltowski, AJ, Castilho, RF, Vercesi, A.E. (2001b) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 495:12-15.
- 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.
- Krenz, M, Oldenburg, O, Wimpee, H, Cohen, MV, Garlid, KD, Critz, SD, Downey, JM, Benoit, JN (2002) Opening of ATP-sensitive potassium channels causes generation of free radicals in vascular smooth muscle cells. *Basic Res. Cardiol.* 97:365-373.
- Kroemer, G, Reed, JC (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6:513-519.
- Lamping, KA, Warltier, DC, Hardman, HF, Gross, GJ (1984) Effects of nicorandil, a new antianginal agent, and nifedipine on collateral blood flow in a chronic coronary occlusion model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229:359–363.
- LeBel, CP, Ischiropoulos, H, Bondy, SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5:227-231.
- Lebuffe, G, Schumacker, PT, Shao, ZH, Anderson, T, Iwase, H, Vanden Hoek, TL (2003) Reactive Oxygen and Nitrogen Species Trigger Early Preconditioning: Relationship to the Mitochondrial K_{ATP} Channel. *Am. J. Physiol.* 284:H299-308.
- Liu, Y, Sato, T, O'Rourke, B, Marban, E (1998) Mitochondrial ATP-dependente potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97:2463-2469.
- Liu, Y, Fiskum, G, Schubert, D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 80:780-787.
- Mignotti, B, Vayssiere, J (1998) Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 252:1-15.

- Mironova, GD, Fedotcheva, NI, Makarov, PR, Pronevich, LA, Mironov, GP (1981) Protein from beef heart mitochondria inducing the potassium channel conductivity of bilayer lipid membrane. *Biofizika* 26:451-457.
- Mironova, GD, Negoda, AE, Marinov, BS, Paucek, P, Costa, AD, Grigoriev, SM, Skarga, YY, Garlid, KD (2004) Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K⁺ channel (mitoK_{ATP}) and its inward rectifier subunit (mitoKIR). *J. Biol. Chem.* 279:32562-32568.
- Murata, M, Akao, M, O'Rourke, B, Marban, E (2001) Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca²⁺ overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 89:891-898.
- Murphy, AN, Bredesen, DE, Cortopassi, G, Wang, E, Fiskum, G (1996) Free in PMC Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:9893–9898.
- Murry, CE, Jennings, RB, Reimer, KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136.
- Neher, E, Sakmann, B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799–802.
- Nicolli, A, Basso, E, Petronilli, V, Wenger, RM, Bernardi, P (1996) Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* 271:2185–2192.
- Niemann, CU, Saed, M, Akbari, H, Wolfgang, J, Benet, LZ, Christians, U, Serkova, N (2002) Close association between the reduction in myocardial energy metabolism and infarct size: dose-response assessment of cyclosporin. *J. Pharm. Exp. Therap.* 302:1123-1128.
- Newmeyer, DD, Ferguson-Miller, S (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112:481-490.
- Oldenburg, O, Cohen, MV, Yellon, DM, Downey, JM (2002) Mitochondrial K_{ATP} channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 55:429-437.
- Oldenburg, O, Yang, X, Krieg, T, Garlid, KD, Cohen, MV, Grover, GJ, Downey, JM (2003) P1075 opens mitochondrial K_{ATP} channels and generates

- reactive oxygen species resulting in cardioprotection of rabbit hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35:1035–1042.
- Ockaili, RA, Bhargava, P, Kukreja, RC (2001). Chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in hearts: role of mitochondrial K_{ATP} channel. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280:H2406–H2411.
- Pain, T, Yang, XM, Critz, SD, Yue, Y, Nakano, A, Liu, GS, Heusch, G, Cohen, MV, Downey, JM, (2000) Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ. Res.* 87:460–466.
- Pang, CY, Neligan, P, Xu, H, He, W, Zhong, A, Hopper, R, Forrest, CR (1997) Role of ATP-sensitive K^+ channels in ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am. J. Physiol.* 273:H44–H51.
- Paucek, P, Mironova, G, Mahdi, F, Beavis, AD, Woldegiorgis, G, Garlid, KD (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K^+ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 267:26062–26069.
- Paucek, P, Yarov-Yarovoy, V, Sun, X, Garlid, KD (1996) Inhibition of the Mitochondrial K_{ATP} Channel by Long-chain Acyl-CoA Esters and Activation by Guanine Nucleotides *J. Biol. Chem.* 271:32084–32088.
- Petronilli, V, Costantini, P, Scorrano, L, Colonna, R, Passamonti, S, Bernardi, P (1994) The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents *J Biol Chem.* 269:16638–16642.
- Piot, CA, Padmanaban, D, Ursell, PC, Sievers, RE, Wolfe, CL (1997) Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo. *Circulation* 96:1598–1604.
- Poot, M, Zhang, YZ, Kramer, JA, Wells, KS, Jones, LJ, Hanzel, DK, Lugade, AG, Singer, VL, Haugland, RP (1996) Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J. Histochem. Cytochem.* 44:1363–1372.
- Radi, R, Turrens, JF, Chang, LY, Bush, KM, Crapo, JD, Freeman, BA (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 266:22028–22034.

- Rego, AC, Vesce, S, Nicholls, DG (2001) The mechanism of mitochondrial membrane potential retention following release of cytochrome *c* in apoptotic GT1-7 neural cells. *Cell Death Differ.* 8:995-1003.
- Rhee, SG, Kang, SW, Netto, LE, Seo, MS, Stadtman, ER (1999) A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors* 10:207-209.
- Rodrigo, GC, Lawrence, CL, Standen, NB (2002) Dinitrophenol pretreatment of rat ventricular myocytes protects against damage by metabolic inhibition and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34:555–569.
- Rota, C, Chignell, CF, Mason, RP (1999) Evidence for free radical formation during the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implication for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 27:873-881.
- Sato, T, O'Rourke, B, Marban, E (1998) Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. *Circ. Res.* 83:110-114.
- Scorrano, L, Petronilli, V, Colonna, R, Di Lisa, F, Bernardi, P (1999) Chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker Orange) induces the mitochondrial permeability transition and inhibits respiratory complex I. Implications for the mechanism of cytochrome *c* release. *J. Biol. Chem.* 274: 24657-24663.
- Seymour, EM, Wu, JS, Kovach, MA, Romano, MA, Jonathan, RT, Claycomb, WC, Bolling SF (2003) HL-1 myocytes exhibit PKC and K_{ATP} channel-dependent delta opioid preconditioning. *J. Surg. Res.* 114:187-194.
- Shimshak, TM, Preuss, KC, Gross, GJ, Brooks, HL, Warltier, DC (1986) Recovery of contractile function in post-ischaemic reperfused myocardium of conscious dogs: influence of nicorandil, a new antianginal agent. *Cardiovasc. Res.* 20:621–626.
- Shlafer, M, Myers, CL, Adkins, S (1987) Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19:1195–1206.
- Simmons, TW, Jamall, IS (1989) Relative importance of intracellular glutathione peroxidase and catalase *in vivo* for prevention of peroxidation to the heart. *Cardiovasc. Res.* 23:774–779.

- Skulachev, VP (1996) Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quart. Rev. Biophys.* 29:169-202.
- Starke, DW, Chen, Y, Bapna, CP, Lesnefsky, EJ, Mieyal, JJ (1997) Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 23:373–384.
- Starkov, AA (1997) "Mild" uncoupling of mitochondria. *Biosci. Rep.* 17:273-279.
- Starkov, AA, Fiskum, G, Chinopoulos, C, Lorenzo, BJ, Browne, SE, Patel, MS, Beal, MF (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species *J Neurosci.* 2004 24:7779-77788.
- Spyrou, G, Enmark, E, Miranda-Vizuete, A, Gustafsson, J (1997) Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem.* 272:2936-2941.
- 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.
- St-Pierre, J, Drori, S, Uldry, M, Silvaggi, JM, Rhee, J, Jager, S, Handschin, C, Zheng, K, Lin, J, Yang, W, Simon, DK, Bachoo, R, Spiegelman, BM (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators *Cell* 127:397-408.
- Susin, SA, Zamzami, N, Kroemer, G (1998) Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta* 1366:151-165.
- Szewczyk, A, Wojcik, G, Lobanov, NA, Nalecz, MJ (1999) Modification of the mitochondrial sulfonylurea receptor by thiol reagents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262:255-258.
- Thannickal, VJ, Fanburg, BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol.* 279:L1005-1028.
- Tsujimoto, Y, Nakagawa, T, Shimizu, S (2006) Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1757:1297-300.
- Tomai, FMD, Crea, FMD, Chiariello, LMD, Giofrè, MD (1999) Ischemic preconditioning in humans: models, mediators and clinical relevance. *Circulation* 100:559-553.

- Turrens, JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosc. Rep.* 17:3-8.
- Turrens, JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552:335-344.
- Vanden Hoek, TL, Shao, A, Li, C, Zak, R, Schumacker, PT, Becker, LB (1996) Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia. *Am. J. Physiol.* 270:H1334-1341.
- Vanden Hoek, TL, Becker, LB, Shao, Z, Li, C, Schumacker, PT (1998) Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 273:18092-18098.
- Vanden Hoek, TL, Becker, LB, Shao, Z, Li, C, Schumacker, PT (2000) Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ. Res.* 86:541-548.
- Wolfe, AD, Beers, RF Jr, Sizer, IW (1957) Cyanide inhibition of the catalase system. *Arch Biochem Biophys.* 72(2):353-7.
- Yaguchi, Y, Satoh, H, Wakahara, N, Katoh, H, Uehara, A, Terada, H, Fujise, Y, Hayashi, H (2003) Protective effects of hydrogen peroxide against ischemia/reperfusion injury in perfused rat hearts. *Circulation J.* 67:253-258.
- Yao, Z, Tong, J, Tan, X, Li, C, Shao, Z, Kim, WC, Vanden Hoek, TL, Becker, LB, Head, CA, Schumacker, PT (1999) Role of reactive oxygen species in acetylcholine-induced preconditioning in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 277:H2504-2509.
- Yellon, DM, Baxter, GF, Garcia-Dorado, D, Heusch, G, Sumeray, MS (1998) Ischemic preconditioning: present position and future direction. *Cardiovasc. Res.* 37:21-33.
- Zhang, DX, Chen, YF, Campbell, WB, Zou, AP, Gross, GJ, Li, PL (2001) Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ. Res.* 89:1177-1183.
- Zhang, HY, McPherson, BC, Liu, H, Baman, TS, Rock, P, Yao, Z (2002) H₂O₂ opens mitochondrial K_{ATP} channels and inhibits GABA receptors via protein kinase C-epsilon in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 282:H1395-H1403.

- 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.
- Zoratti, M, Szabo, I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 1241:139-176.
- Zweier, JL, Flaherty, JT, Weisfeldt, ML (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1404-1407.

Anexo A

Título: Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels Prevent Oxidative Stress, Permeability Transition and Cell Death.

Trabalho Publicado na Revista: *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 37; 75-82.

Autoria: Facundo, H.T.F.; De Paula, J.G.; Kowaltowski, A.J. (2005).

Anexo B

Título: Mitochondrial K⁺ Transporte and Cardiac Protection During Ischemia/Reperfusion.

Trabalho Publicado na Revista: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 345-352.

Autoria: Carrera R.S.; **Facundo, H.T.F.**; Kowaltowski, A.J. (2005)

Anexo C

Título: Letter regarding article by Argaud et al, "postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition".

Carta Publicada na Revista: *Circulation* 111(24):e442.

Autoria: Facundo, H.T.F.; Kowaltowski, A.J. (2005).

Anexo D

Título: Tissue Protection Mediated by Mitochondrial K⁺ Channels.

Trabalho Publicado na Revista: *Biochimica et Biophysica Acta* 1762:202 – 212.

Autoria: Facundo, H.T.F.; Fornazari, M.; Kowaltowski, A.J. (2006).

Anexo E

Título: Ischemic Preconditioning Requires Increases In Reactive Oxygen Release Independent Of Mitochondrial K⁺ Channel Activity

Trabalho Publicado na Revista: *Free Radical Biology & Medicine* 40:469-479.

Autoria: Facundo, H.T.F.; Carrera R.S.; De Paula, J.G.; Santos, C.C.X.; Ferranti, R.; Laurindo, F.R.M. Kowaltowski, A.J. (2006)

.

Anexo F

Título: Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels are Redox-Sensitive Pathways that Control Reactive Oxygen Species

Trabalho Publicado na Revista: *Free Radical Biology & Medicine* (In Press).

Autoria: Facundo, H.T.F.; De Paula, J.G.; Kowaltowski, A.J. (2007)

Anexo G

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Heberty di Tarso Fernandes Facundo
Local e data de nascimento: Juazeiro do Norte – CE, 13 de setembro de 1977

EDUCAÇÃO

Colégio, local, ano: Geo Studio Juazeiro do Norte, 1995

Universidade, local, ano: Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2000,
Graduação: Bacharel em Ciências Farmacêuticas

Universidade, local, ano: Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2000
Mestrado em Bioquímica

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, FAPESP, Setembro de 2003 – Fevereiro de 2007.

PUBLICAÇÕES

RESUMOS EM CONGRESSOS:

- 1. Facundo, H.T.F.;** Guedes, L.S.; Soares, M.G.C.B. (1999) Efeito do Malondialdeído Sobre a Resistência Osmótica dos Eritrócitos. XIV Annual Meeting of the Brazilian Society for Experimental Biology - FESBE Caxambu, MG, Brasil - *Livro de Resumos*, pg: 191.
- 2. Facundo, H.T.F.;** Guedes, L.S.; Lima, V.L.M. (2000) Preliminary Evaluation of Lipid Peroxidation in Blood From Healthy Individual and

Patients Infected by *Schistosoma Mansoni*. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Caxambu, MG, Brasil - *Livro de Resumos*, pg: 157.

3. Correia, M.T.S.; Carneiro-da-Cunha, M.G.; Carneiro-da-Cunha, P.; Medeiros, T.S.; Silva, G.R.; Silva, C.A.; Ventura, C.A.; **Facundo, H.T.F.**; Pimentel, M.C.B. (2000) The Fate of the "Big Mac": A Teaching of Aid for Biochemistry. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Caxambu, MG, Brasil - *Livro de Resumos*, pg: 86.
4. Guedes, L.S.; Soares, M.; Hidd, S.; Lima, V.; **Facundo, H.T.F.** (2000) Índice de massa corpórea e a resistência osmótica dos eritrócitos em homens e mulheres saudáveis. XVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Experimental Biology - FESBE. Caxambu, MG, Brasil - *Livro de Resumos*, pg: 214.
5. **Facundo, H.T.F.**; Silva, C.A.; Lima, V.L.M. (2001) Age-related changes in malondialdehyde concentration from human plasma. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Caxambu, MG, Brasil - *Livro de Resumos*, pg: 217
6. **Facundo, H.T.F.**; Silva, C.A.; Brandt, C.T.; Lima, V.L.M. (2001) Malondialdehyde and conjugated dienes levels from *schistosoma mansoni* infected patients after surgical and clinical treatment. VI Pharmatech - International Conference on Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Recife, PE, Brasil - *Livro de Resumos*, pg: 169-170.
7. **Facundo, H.T.F.**; Brandt, C.T.; Lima, V.L.M. (2001) Indicadores de peroxidação lipídica em pacientes infectados por *Schistosoma mansoni* após tratamento clínico e cirúrgico. VII National congress of the SOBRADPEC. Recife, PE, Brasil. Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 17, suppl. 1, pg: 59.

- 8. Facundo, H.T.F.;** Costa, S.P.M.; Alessio, M.L.M.; Lima, V.L.M. (2002) Avaliação da peroxidação lipídica em órgãos de ratos desnutridos. XVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Experimental Biology - FESBE. Salvador, BA, Brasil - *Livro de Resumos, número do resumo: 17041.*
- 9. Facundo, H.T.F.;** Brant, C.T.; Lima, V.L.M. (2002) Increased lipid peroxidation in schistosomiasis mansoni as indicated by conjugated diene level but not by malondialdehyde level. XVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Experimental Biology - FESBE. Salvador, BA, Brasil - *Livro de Resumos, número do resumo: 18027.*
- 10. Facundo, H.T.F.;** Costa, S.P.M.; Alessio, M.L.M.; Lima, V.L.M. (2002) Lipid peroxidation in undernourished young rats. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Caxambu, MG, Brasil - *Livro de Resumos, pg: 230*
- 11. Facundo, H.T.F.;** Alessio, M.L.M.; Lima, V.L.M. (2003) Influence of a multideficient diet on lipid peroxidation in liver and cerebral cortex from undernourished rat. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Caxambu, MG, Brasil - *Livro de Resumos, pg: 240.*
- 12. Facundo, H.T.F.;** De Paula, J.G.; Kowaltowski, A.J. (2004) Mitochondrial Permeability Transition is Delayed by ATP-sensitive K^+ Channel (mitoK_{ATP}) opening. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Caxambu, MG, Brasil - *Livro de Resumos, pg: 40 (CD).*
- 13. Facundo, H.T.F.;** De Paula, J.G.; Kowaltowski, A.J. (2004) ATP-sensitive K^+ Channel (mitoK_{ATP}) Opening Protects Against Cellular Damage Preventing Mitochondrial Permeability Transition. XII Congress

of the Brazilian Society of Cell Biology, Campinas, SP, Brasil - *Livro de Resumos, número do resumo: I-041 (CD)*.

- 14. Facundo, H.T.F.; De Paula, J.G.; Kowaltowski, A.J. (2005)** Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ Channel Avoid Oxidative Stress During Ischemia/Reperfusion. IV Meeting of the South American Group Of The Society For Free Radical Biology and Medicine, Águas de Lindóia, SP, Brasil - *número do resumo: 27-1 (CD)*.

- 15. Facundo, H.T.F.; De Paula, J.G.; Kowaltowski, A.J. (2005)** Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ Channel Avoid Oxidative Stress During Ischemia/Reperfusion. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Águas de Lindóia, SP, Brasil - *número do resumo: A-1 (CD)*.

- 16. De Paula, J.G.; Facundo, H.T.F.; Kowaltowski, A.J. (2005)** Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ Channels Prevent Oxidative Stress, Permeability Transition and Cell Death. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Águas de Lindóia, SP, Brasil - *número do resumo: A-37 (CD)*.

- 17. Facundo, H.T.F.; De Paula, J.G.; Kowaltowski, A.J. (2006)** Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channel Activity is Regulated by Reactive Oxygen Species Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Águas de Lindóia, SP, Brazil - *Abstract number: T-03 (CD)*.

- 18. Facundo, H.T.F.; De Paula, J.G.; Kowaltowski, A.J. (2006)** Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels act as redox sensors and protect against oxidative cell death following ischemia/reperfusion. In: 6th International Cell Death Symposium, 2006, Angra dos Reis. *Abstract Book*, 2006. *pg: 62 (CD)*.

PUBLICAÇÕES EM REVISTAS ESPECIALIZADAS

1. **Facundo, H.T.F.**; Brandt, C.T.; Owen J.S.; Lima V.L.M. (2004) Elevated levels of erythrocyte conjugated dienes indicate increased lipid peroxidation in schistosomiasis mansoni patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37: 957-962.
2. **Facundo, H.T.F.**; De Paula, J.G.; Kowaltowski, A.J. (2005) Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels Prevent Oxidative Stress, Permeability Transition and Cell Death. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 37; 75-82.
3. Carrera R.S.; **Facundo, H.T.F.**; Kowaltowski, A.J. (2005) Mitochondrial K⁺ Transporte and Cardiac Protection During Ischemia/Reperfusion. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 345-352.
4. **Facundo, H.T.F.**; Kowaltowski, A.J. (2005) Letter regarding article by Argaud et al, "Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition". *Circulation* 111: e442.
5. **Facundo, H.T.F.**; Fornazari, M.; Kowaltowski, A.J. (2006) Tissue Protection Mediated by Mitochondrial K⁺ Channels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762:202 – 212.
6. **Facundo, H.T.F.**; Carrera R.S.; De Paula, J.G.; Santos, C.C.X.; Ferranti, R.; Laurindo, F.R.M. Kowaltowski, A.J. (2006) Ischemic Preconditioning Requires Increases In Reactive Oxygen Release Independent Of Mitochondrial K⁺ Channel Activity. *Free Radical Biology & Medicine* 40:469-479.
7. **Facundo, H.T.F.**; De Paula, J.G.; Kowaltowski, A.J. (2006) Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels are Redox-Sensitive Pathways that Control Reactive Oxygen Species Production *Free Radical Biology & Medicine* (Em Impressão).