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

MAYNARA FORNAZARI

**PROPRIEDADES REDOX DE CANAIS DE POTÁSSIO
MITOCONDRIAIS ATP-SENSÍVEIS EM CÉREBRO E SEU
EFEITO NEUROPROTETOR EM EXCITOTOXICIDADE**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
07/07/2008

MAYNARA FORNAZARI

**PROPRIEDADES REDOX DE CANAIS DE POTÁSSIO MITOCONDRIAIS
ATP-SENSÍVEIS EM CÉREBRO E SEU EFEITO NEUROPROTETOR EM
EXCITOTOXICIDADE**

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
2008

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Alicia Juliana Kowaltowski por tornar possível a realização deste trabalho em seu laboratório, pela sua amizade, paciência, incentivo e acima de tudo pela sua atenção durante a execução dos experimentos.

Ao Professor Dr. Roger F. Castilho pela orientação e pelo auxílio no estabelecimento de protocolos importantes para este trabalho, como cultura primária de células granulosas de cerebelo e o modelo de excitotoxicidade *in vitro*.

Aos colegas de laboratório Graciele Oliveira, Bruno Queliconi, Ariel Cardoso, Fernanda Cerqueira e, em especial, ao Erich Tahara pelos auxílios na execução dos experimentos que constituem esta tese e pelos momentos de descontração no laboratório.

Aos ex-colegas de laboratório e eternos amigos Raquel de Sousa Carreira, Douglas Cancherini e Heberty Facundo pelas discussões científicas altamente produtivas, bem como pelo apoio para enfrentar as dificuldades do caminho.

Ao apoio técnico e à amizade dos profissionais Camille Caldeira Ortiz, Edson Souza e Felipe Navarete, que com seu trabalho facilitam a execução dos experimentos que compõem esta tese.

Às alunas de iniciação científica e grandes amigas, Ângela Saito (Unicamp) e Juliana de Paula (IQ-USP) pela colaboração em experimentos que originaram uma publicação essencial para esta tese.

Aos amigos do laboratório de Bioenergética e Neurodegeneração, Daniela, Luciane, Renata, Bruno e Juliana pelo apoio durante a realização de experimentos e, em especial às grandes amigas Ana Catarina e Mariana por me acolherem carinhosamente em sua casa e, assim, tornando super agradável a temporada em Campinas.

Ao apoio técnico e ao bom humor dos profissionais do laboratório de Bioenergética e Neurodegeneração (Unicamp), Roberto, Elisângela e Edilene.

Aos meus familiares, em especial, minha mãe, por sempre acreditar no meu potencial e por ter me propiciado toda a base para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu namorado, Mauricio Goldfeder pela sua paciência, compreensão, companheirismo e incentivo na carreira acadêmica.

À minha professora de Bioquímica da graduação, Julieta Sannazzaro, que com muito carinho, forneceu-me um grande incentivo no ingresso à carreira acadêmica e pela sua eterna amizade.

Finalmente ao apoio financeiro recebido pelas agências de fomento FAPESP, CNPq, NIH, Guggenheim Foundation e Instituto do Milênio Redoxoma.

RESUMO

Fornazari, M. **Propriedades Redox de Canais de Potássio Mitocondriais ATP-Sensíveis em Cérebro e Seu Efeito Neuroprotetor em Excitotoxicidade**. 2008. 101 páginas. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Muitos estudos demonstram que a abertura de canais de K^+ mitocondriais sensíveis à ATP (mitoK_{ATP}) previnem danos promovidos por isquemia/reperfusão em coração. Em geral, esta proteção envolve mudanças no estado redox mitocondrial. Em cérebro, sabe-se que agonistas farmacológicos de mitoK_{ATP} também protegem em modelo de isquemia/reperfusão. Entretanto, os mecanismos envolvidos na prevenção de danos em cérebro ainda não estão claros. O objetivo principal deste trabalho é compreender os efeitos de canais de K^+ mitocondriais ATP-sensíveis em tecido cerebral e os mecanismos pelos quais a sua ativação pode proteger contra danos promovidos por excitotoxicidade, uma das principais consequências de um evento isquêmico em cérebro. Neste contexto, demonstramos a proteção pelo mitoK_{ATP} em modelo de excitotoxicidade induzida pela ativação direta de receptores NMDA, utilizando cultura de células granulosas de cerebelo. Paralelamente a essa proteção, verificamos que a ativação de mitoK_{ATP} reduz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em mitocôndrias isoladas, observamos que ROS geradas pela mitocôndria ativam mitoK_{ATP} cerebral, resultando em um aumento da captação de K^+ para a matriz, medida através da técnica de inchamento mitocondrial. Em condições de baixa geração de ROS, a adição de H_2O_2 exógeno ativa o inchamento mitocondrial em resposta à entrada de K^+ de modo prevenido por catalase, assim, confirmando que a atividade desses canais é redox-sensível. A ativação de mitoK_{ATP} por agonistas farmacológicos, como diazóxido, também é maior na presença de alta geração de ROS, conforme indicado por uma leve diminuição no potencial de membrana mitocondrial. Interessantemente, a adição de um redutor tiólico, 2-mercaptopropionilglicina (MPG) previne a ativação de mitoK_{ATP}. A ativação de mitoK_{ATP} não alterou a capacidade de captar Ca^{2+} pela mitocôndria, demonstrando que este não é o mecanismo pelo qual esses canais previnem morte celular excitotóxica. Não foram observados efeitos desses canais em modelo de excitotoxicidade *in vivo* e em modelo de doença neurodegenerativa, acidose metilmalônica. Juntos, nossos resultados demonstram que mitoK_{ATP} cerebrais agem como sensores de ROS mitocondrial, que quando ativados reduzem a liberação de ROS por um leve desacoplamento, prevenindo morte neuronal por excitotoxicidade NMDA-induzida.

Palavras-Chaves: cérebro, canal mitocondrial de potássio sensível a ATP, excitotoxicidade, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Fornazari, M. **Redox Properties of Brain Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels and Neuroprotective Effects in Excitotoxicity**. 2008. 101 pages. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Several studies have shown that mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel (mitoK_{ATP}) opening prevents ischemia/reperfusion injuries in heart, in a manner involving changes in redox state. In brain, mitoK_{ATP} agonists also protect against ischemia/reperfusion. However, the exactly mechanism that mitoK_{ATP} protects the brain is still unclear. The purpose of this work is to understand the effects of mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels in brain and how this channel can protect against excitotoxic cell death, the main consequence of a cerebral ischemia. In this context, we demonstrate that mitoK_{ATP} protects against excitotoxicity promoted by NMDA receptor activation in cultured cerebellar granule cells. In parallel, we verified that mitoK_{ATP} activation also decreases reactive oxygen species (ROS). In isolated mitochondria, we observed that mitochondrially-generated ROS can activate brain mitoK_{ATP}, resulting in enhanced K^+ uptake into the matrix, measured as swelling of the organelle. Under conditions in which mitochondrial ROS release is low, exogenous H₂O₂ activated swelling secondary to K^+ entrance, in a manner prevented by catalase, confirming that the activity of this channel is redox-sensitive. Activation of mitoK_{ATP} channels by the pharmacological agonist diazoxide was also improved when endogenous mitochondrial ROS release was enhanced, as indicated by mild decreases in mitochondrial membrane potentials. Interestingly, mitoK_{ATP} activation was prevented by the thiol reductant 2-mercaptopyrionylglycine (MPG). Mitochondrial Ca²⁺ uptake was not modified by opening mitoK_{ATP}, suggesting that this is not the mechanism through which this channel prevents excitotoxic cell death. In an *in vivo* excitotoxicity model and also neurodegenerative disease model, methylmalonic acidemia, the effects of mitoK_{ATP} agonists were not observed. Together, our results demonstrate that brain mitoK_{ATP} acts as a mitochondrial ROS sensor, which, when activated, prevents ROS release by mildly uncoupling respiration from oxidative phosphorylation, decreasing excitotoxic cell death.

Key-Words: Brain, mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, excitotoxicity, reactive oxygen species.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARA-C = 1- β -D-arabinofuranosídeo citosina
ADP = Adenosina bifosfato
ATN = Atractilosídeo
ATP = Adenosina trifosfato
CCCP = Carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona
Cat = Catalase
CN = Cianeto
CsA = Ciclosporina
DCF = Diclorofluoresceína
DMSO = Dimetilsulfóxido
DZX = Diazóxido
GTP = Guanosina trifosfato
Glu = Glutamato
Hepes = 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinoetanosulfônico
HRP = Peroxidade de raiz forte
5-HD = 5-Hidroxidecanoato
H₂DCF-DA = 2', 7'- Diclorofluoresceína diacetato
LDH = Lactato desidrogenase
Mal = Malato
MMA = Ácido metil malônico
MPG = 2- Mercaptopropionil glicina
MitoK_{ATP} = Canal de potássio mitocondrial sensível a ATP
MitoKIR = *Mitochondrial potassium inner rectifier* (Transportador de potássio da membrana interna mitocondrial)
MitoSUR = Receptor de sulfoniluréia mitocondrial
NMDA = N-metil D-aspartato
Pyr = Piruvato
ROS = *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)
Rot = Rotenona
SOD = Superóxido dismutase
Suc = Succinato
TPM = Transição de Permeabilidade Mitocondrial
U.A. = Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1. Fluxo de K ⁺ e Canais de K ⁺ Mitocondriais Sensíveis a ATP.....	11
1.2. Sistema Nervoso Central: Excitotoxicidade e Neurodegeneração.....	18
1.3. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e a Mitocôndria.....	21
1.4. Homeostase de Ca ²⁺ e TPM.....	24
1.5. Acidose Metilmalônica.....	25
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Materiais.....	30
3.2. Animais.....	30
3.3. Cultura Primária de Células Granulosas de Cerebelo.....	31
3.4. Tratamento das Placas de Cultura.....	31
3.5. Viabilidade Celular.....	32
3.6. Quantificação de Proteínas pelo Método de Folin.....	33
3.7. Medida de ROS Intracelular.....	33
3.8. Isolamento de Mitocôndrias Cerebrais.....	34
3.9. Isolamento de Mitocôndrias Sinápticas e Não Sinápticas com Gradiente de Percoll.....	35
3.10. Medidas de Potencial de Membrana Mitocondrial.....	35
3.11. Medidas de Razão do Controle Respiratório.....	36
3.12. Medida de ROS Mitocondrial.....	37
3.13. Inchamento Mitocondrial.....	37
3.14. Captação de Ca ²⁺	37
3.15. Modelo de Excitotoxicidade <i>in vivo</i>	38
3.16. Modelo de Envelhecimento Celular <i>in vitro</i>	39
3.17. Marcação com FI-Glibenclamida.....	40

3.18. Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Modelo de Excitotoxicidade <i>in vitro</i> Induzido pela Ativação Direta de Receptores NMDA.....	41
4.2. Medida de ROS Intracelular.....	46
4.3. Medida do Potencial de Membrana Mitocondrial.....	48
4.4. Controle Respiratório e Razões ADP/O.....	50
4.5. Produção de ROS Mitocondrial.....	51
4.6. Produção de ROS e Atividade de MitoK _{ATP}	55
4.7. Atividade de MitoK _{ATP} na Presença de Redutor Tiólico.....	57
4.8. Captação de Ca ²⁺ Mitocondrial.....	59
4.9. Estudo da Permeabilização Mitocondrial Induzida por Ca ²⁺ em Modelo de Acidose Metilmalônica.....	61
4.10. Modelo de Excitotoxicidade <i>in vivo</i>	62
4.11. Atividade de MitoK _{ATP} em Mitocôndrias Sinaptossomais e Não Sinaptossomais.....	66
4.12. Efeitos do MitoK _{ATP} em Modelo de Envelhecimento <i>in vitro</i>	68
5. DISCUSSÃO.....	72
6. CONCLUSÃO.....	81
7. REFERÊNCIAS.....	82
LISTA DE ANEXOS.....	97
A. Anexo A.....	98
Título: Tissue Protection Mediated by Mitochondrial K ⁺ Channels.	
B. Anexo B.....	99
Título: Diazoxide Protects Against Methylmalonate-Induced Neuronal Toxicity.	
C. Anexo C.....	100
Título: Redox Properties of the Adenosine Triphosphate-Sensitive K ⁺ Channel in Brain Mitochondria.	

SÚMULA CURRICULAR.....	101
-------------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO

Como uma organela que apresenta potencial de membrana interno ($\Delta\Psi$), a mitocôndria apresenta um transporte iônico altamente controlado, em especial o de potássio, por ser o cátion mais abundante no meio intracelular. Assim, íons K^+ atravessam constantemente a membrana interna em direção à matriz mitocondrial, estimulados, em geral, por altos potenciais de membrana. Para compensar este “vazamento” de potássio, a mitocôndria apresenta um trocador K^+/H^+ , que é ativado pelo aumento do volume da matriz mitocondrial em resposta a este vazamento de K^+ . Este trocador remove íons K^+ excedentes em troca da entrada de prótons, prevenindo o aumento excessivo do volume da matriz mitocondrial e a conseqüente ruptura da organela (Garlid et al., 2003).

Além desse trocador K^+/H^+ , a mitocôndria possui um mecanismo regulado que controla a captação de K^+ : canais de potássio sensíveis a ATP ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$), localizados na membrana mitocondrial interna (Garlid et al., 2003; Facundo et al., 2006b). Esses canais promovem a entrada de K^+ na matriz em quantidades suficientes para aumentar o volume da matriz, porém sem levar à ruptura da organela (Kowaltowski et al., 2001) (Esquema 1).

Esquema 1. Fluxo de K^+ pela mitocôndria. O esquema mostra o constante vazamento de K^+ para a matriz mitocondrial estimulado pelo $\Delta\Psi$, a presença de um trocador K^+/H^+ e canais K^+ mitocondriais sensíveis a ATP.

O transporte de K^+ através de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ é fisiologicamente inibido por ATP e ADP, enquanto GTP e GDP atuam como ativadores do canal (Paucek et al., 1996; Mironova et al., 1999, 2004). $\text{MitoK}_{\text{ATP}}$ também apresentam uma grande variedade de agonistas e antagonistas farmacológicos, como diazóxido (DZX) e 5-hidroxidecanoato (5-HD), respectivamente. Devido à alta seletividade por canais de K^+ mitocondriais em relação a

mitoK_{ATP}s de outras membranas, são as drogas mais utilizadas em estudos envolvendo esses canais (Garlid et al., 1997; Jaburek et al., 1998).

Através do uso seletivo de agonistas e antagonistas de mitoK_{ATP}, foi verificado que a abertura destes canais previne danos durante isquemia/reperfusão em muitos tecidos, como coração (Garlid et al., 2007; Facundo et al., 2006b), músculo esquelético (Grover et al., 2003) e cérebro (Liu et al., 2002; Shimizu et al., 2002). O mecanismo pelo qual esses canais protegem tem sido amplamente estudado em coração (Garlid et al., 2003) e parece estar relacionado a mudanças no estado redox mitocondrial (Facundo et al., 2006b). Enquanto espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pela mitocôndria ativam mitoK_{ATP} em coração (Zhang et al., 2001; Facundo et al., 2007), a abertura desses canais leva a uma redução de ROS durante a reperfusão (Vander Hoek et al., 2000; Facundo et al., 2006a). A diminuição da geração de ROS está relacionada a uma redução do potencial de membrana mitocondrial e a um aumento da taxa respiratória, resultantes da abertura desses canais de K⁺ (Kowaltowski et al., 2001; Ferranti et al., 2003; Facundo et al., 2007).

Em cérebro, a atividade de mitoK_{ATP} é relativamente alta, alcançando níveis cerca de 10 vezes maiores em relação à encontrada em coração, embora sua regulação seja similar (Bajgar et al., 2001; Debska et al., 2001). Apesar dessa diferença de atividade, sabe-se que a abertura de mitoK_{ATP} cerebrais também protege neurônios contra morte celular isquêmica (Liu et al., 2002; Shimizu et al., 2002). O principal fator que leva a danos celulares em um evento isquêmico cerebral é excitotoxicidade promovida por glutamato. Glutamato, uma vez liberado, ativa receptores N-metil D-aspartato (NMDA), que aumentam a captação de Na⁺ e Ca²⁺, levando a morte neuronal (Coyle e Puttfarcken, 1990). A morte excitotóxica tem sido extensamente relacionada ao excessivo acúmulo de Ca²⁺ e ao estresse oxidativo gerados pela mitocôndria (Castilho et al., 1998, 1999; Luetjens et al., 2000; Korde et al., 2005).

1.1. Fluxo de K^+ e Canais de K^+ Mitocondriais Sensíveis a ATP

Íons K^+ vazam constantemente através da membrana mitocondrial interna para a matriz mitocondrial favorecidos pela diferença de potencial de membrana entre a matriz (negativa) e o espaço intermembranas (positivo) (Garlid e Paucek, 2001). Dessa maneira, canais mitocondriais *antiporters* de K^+/H^+ são necessários para manter a integridade da organela, já que previnem o aumento excessivo do volume da matriz mitocondrial em resposta à contínua captação de K^+ e impedem a ruptura da organela. Na década de 60, Mitchell previu a presença de um trocador K^+/H^+ na membrana mitocondrial interna (Mitchell, 1966), porém, sua presença foi confirmada na década de 70 por Garlid através da técnica de espalhamento de luz (Garlid, 1978, 1979, 1980). O trocador K^+/H^+ remove K^+ em excesso em troca da entrada de H^+ , assim, impedindo inchamento mitocondrial excessivo. Embora as propriedades de transporte observadas foram atribuídas a uma proteína de 82-kDa (Martin et al., 1984), a identidade molecular desses transportadores não foi elucidada.

A presença de canais *uniporters* que regulariam a entrada de K^+ na matriz mitocondrial seria uma outra maneira de controlar o volume mitocondrial. Enquanto trocadores K^+/H^+ promovem contração mitocondrial, canais de K^+ mitocondriais resultam em um inchamento. Todavia, a primeira evidência da existência de canais que transportavam íons K^+ para a matriz mitocondrial foi em 1981 quando Mironova et al. tentaram isolar a proteína deste canal e a reconstituíram em lipossomos. Porém, a regulação destes canais não foi bem estabelecida por este grupo. Diwan et al. reconstituíram uma proteína com 53 kDa, purificada de um extrato de membrana mitocondrial de fígado, em vesículas lipídicas e observaram atividade de *uniporter* de K^+ e baixa permeabilidade a H^+ mas não descreveram a regulação deste canal. Através da técnica de *Patch Clamp*, Inoue et al. (1991) provaram a evidência da presença de *uniporters* de K^+ na membrana mitocondrial interna em mitocôndrias isoladas de mamíferos, que eram inibidos por ATP, por isso denominados canais de K^+ mitocondriais sensíveis a ATP (mitoK_{ATP}). Estes canais foram posteriormente purificados e reconstituídos (Paucek et al., 1992) e assim, foi visto uma grande

semelhança com canais de K^+ presentes na membrana plasmática por um estudo detalhado das propriedades regulatórias destes canais.

Apesar da semelhança estrutural com K_{ATP} s de membrana plasmática, o canal mitocondrial apresenta respostas diferentes à ativação por drogas. Deste modo, $mitoK_{ATP}$ é cerca de 2000 vezes mais sensível à abetura por diazóxido (DZX) do que o canal da membrana plasmática, enquanto 5-hidroxicanoato (5-HD) atua como um inibidor específico de canais mitocondriais (Garlid et al., 1996; Jaburek et al., 1998).

Paucek et al. purificaram uma fração de proteína de membrana interna mitocondrial de fígado e coração de rato que induziu uma condutância de K^+ quando reconstituída em lipossomos ou incorporada a bicamadas lipídicas. A proteína predominante na fração era de 54 kDa e, portanto, semelhante a $mitoK_{ATP}$. Porém, sua identidade não foi estabelecida com certeza. Através de estudos com a proteína reconstituída foi demonstrado a alta seletividade a K^+ e grande similaridade a canais de K^+ sensíveis a ATP da membrana plasmática.

A identidade molecular de $mitoK_{ATP}$ em mamíferos é altamente discutida. Garlid e colaboradores demonstraram uma fração purificada em coluna de DEAE-celulose, a qual foi ativa após ser reconstituída e separada em duas bandas em um gel de SDS-PAGE, uma com 63 kDa e outra com 55 kDa (Paucek et al., 1992). Através de estudos de extração com etanol, foi demonstrado que esta proteína de 55 kDa tinha propriedades de transporte de K^+ semelhantes a $mitoK_{ATP}$ (Mironova et al., 1981). Posteriormente essa proteína foi identificada como a parte do complexo por onde passam íons K^+ ($mitoKIR$). A proteína isolada de 55 kDa não responde a sulfoniluréias, mas a fração que contém a proteína com 63 kDa responde positivamente, levando à suposição que a proteína de 63 kDa corresponde a uma subunidade receptora de sulfoniluréias ($mitoSUR$). De fato, esta fração se liga a glibenclamida marcada, uma sulfoniluréia (Bajgar et al., 2001).

Por outro lado, Ardehali et al. (2004) propôs recentemente que $mitoK_{ATP}$ é constituído por um complexo que contém pelo menos cinco proteínas, incluindo succinato desidrogenase, que age como um regulador deste canal. Essa hipótese parte

da ação inibitória do DZX sobre a atividade dessa enzima (Dzeja et al., 2003). Porém, o complexo protéico descrito não parece conter uma subunidade retificadora, que transporte K^+ (mitoKIR). Além disso, os efeitos farmacológicos de mitoK_{ATP} são observados em concentrações mais baixas do que a requerida para inibir a SDH, sugerindo que o efeito do DZX sobre a SDH é apenas uma toxicidade da droga e, portanto, esse modelo não seja adequado para explicar o transporte de K^+ mitocondrial ATP-sensível (Kowaltowski et al., 2001a).

Portanto, esses estudos juntos sugerem que essas duas frações constituem o canal e são responsáveis pela sua atividade, o que concorda com a estrutura dos canais de K^+ sensíveis a ATP presentes na membrana plasmática.

Esquema 2. Estrutura do MitoK_{ATP} segundo Garlid e colaboradores. O esquema mostra que canais de K^+ mitocondriais sensíveis a ATP são constituídos por duas frações protéicas: MitoKIR, por onde passam os íons de K^+ e MitoSUR, receptor de sulfonilurías. São demonstrados alguns efeitos de inibidores e ativadores fisiológicos e farmacológicos.

Graças às diferentes sensibilidades a drogas, é possível atribuir efeitos *in vivo* de medicamentos que abrem ou fecham canais de K^+ à proteína plasmática ou mitocondrial. Através do uso de DZX e 5-HD, verificou-se que a proteção cardíaca à isquemia promovida por ativadores de canais de K^+ se deve ao efeito de canais mitocondriais (Garlid et al., 1997; Takashi et al., 1999). Em coração, o efeito benéfico da abertura de mitoK_{ATP} está relacionado a alterações na geração de ROS (Ferranti et al., 2003; Facundo et al., 2007), mudanças na homeostase de Ca^{2+} mitocondrial (Belisle e Kowaltowski, 2002; Murata et al., 2001) e melhora nos níveis teciduais de compostos fosfatados ricos em energia (Dos Santos et al., 2002; Belisle e Kowaltowski, 2002).

Porém, uma característica indesejável da maioria dos agonistas e antagonistas de mitoK_{ATP} é a presença de outros efeitos nas funções celulares e mitocondriais, particularmente quando utilizados em altas concentrações. Um exemplo é o DZX, que apesar de amplamente utilizado como agonista de mitoK_{ATP} pela sua alta sensibilidade a canais mitocondriais em coração (Garlid et al., 2007), é um potente inibidor da succinato desidrogenase (SDH), quando utilizado em concentrações não muito maiores das necessárias para ativar completamente esses canais em mitocôndrias cardíacas isoladas (Kowaltowski et al., 2001). 5-HD utilizado como inibidor de mitoK_{ATP} pode ser convertido a 5-HD-CoA na mitocôndria, que pode afetar a respiração (Jaburek et al., 1998; Lim et al., 2002) e impedir a oxidação de ácidos graxos (Hanley et al., 2002, 2003, 2005).

Baseado nesses achados e dificuldades para medir mudanças no volume mitocondrial decorrente da entrada de K^+ , alguns autores têm questionado se os efeitos dos agonistas de mitoK_{ATP} podem ser atribuídos a este canal ou outros efeitos destas drogas (Das et al., 2003; Bednarczyk et al., 2008). Entretanto, o grande número de dados que suportam a presença desses canais e a variedade de agonistas e antagonistas (cada um com diferentes efeitos tóxicos) sugere fortemente a existência desses canais e da sua presença na membrana mitocondrial interna (Garlid e Paucek, 2003; Facundo et al., 2006b; Fornazari et al., 2007).

Apesar da presença e atividade terem sido bem caracterizadas nos tecidos hepático e cardíaco, esse canal só foi localizado em mitocôndrias de tecido nervoso em 2001 (Bajgar et al., 2001). Alguns estudos anteriores mostraram que agonistas de K_{ATP} como cromakalina e DZX protegiam cérebro contra danos em isquemia/reperfusão (Heurteaux et al., 1993; Reshef et al., 1998; Domoki et al., 1999), demonstrando que o mecanismo de proteção era muito similar ao encontrado em coração e mediado por $mitoK_{ATP}$. Desse modo, o trabalho de Bajgar et al. foi importante para estabelecer a presença desses canais em tecido cerebral com regulação qualitativamente idêntica ao canal encontrado em fígado e coração. Porém, a quantidade de canais em mitocôndrias cerebrais foi sete vezes maior por miligrama de proteína mitocondrial. A quantidade de canais foi verificada através de uma técnica para marcação de receptor de sulfoniluréia (mitoSUR), uma das subunidades do canal. Após esse trabalho, outros grupos demonstraram o mesmo efeito protetor de $mitoK_{ATP}$ prevenindo morte neuronal isquêmica (Liu et al., 2002; Shimizu et al., 2002; Lenzser et al., 2005; Nakagawa et al., 2005). Nós demonstramos que a morte neuronal promovida por acidose metilmalônica, que ocorre por mecanismos similares aos encontrados em isquemia/reperfusão, podem ser prevenidos pela ativação de $mitoK_{ATP}$, bem como pela inibição de transição de permeabilidade mitotondrial (TPM) (Kowaltowski et al., 2006).

Uma das conseqüências da abertura de $mitoK_{ATP}$ é um aumento do volume da matriz mitocondrial. Esse aumento é observado em condições fisiológicas e em condições nas quais a respiração está inibida, semelhante a uma isquemia. Quando a cadeia respiratória é inibida, a captação de K^+ e o potencial de membrana diminuem, levando a uma contração mitocondrial, um processo que pode ser revertido próximo a níveis fisiológicos, quando $mitoK_{ATP}$ é ativado (Kowaltowski et al., 2001). Baseado nesses dados, o grupo do Prof. Garlid propôs que o principal papel desses canais durante eventos isquêmicos é preservar a proximidade entre as membranas interna e externa da mitocôndria, tendo em vista que esta é uma condição regulatória da permeabilidade a ADP e ATP. ATP e ADP são transportados dentro e fora da mitocôndria através de um canal aniônico voltagem-dependente (VDAC) na membrana externa e translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) na membrana interna. A permeabilidade do VDAC a ADP ou ATP depende do estado de condutância, que é

quase limitante em baixa condutância (Rostovtseva e Colombini, 1996, 1997). Estudos sugerem que a permeabilidade mitocondrial cardíaca a nucleotídeos de adenina em condições fisiológicas é similar ao estado de condutância do VDAC (Saks et al., 1993), enquanto outros experimentos demonstram que a condutância de ADP ou ATP é derivada de uma aproximação entre as membranas mitocondriais devido a perda de K^+ (Garlid e Paucek, 2003).

Todavia, em isquemia, a permeabilidade limitada a nucleotídeos pode ser altamente benéfica, uma vez que na ausência de O_2 e substratos, a mitocôndria não forma potencial de membrana através da cadeia de transporte. Na ausência de potencial de membrana, a ATPsintase pode funcionar de um modo reverso e hidrolisar ATP a ADP e P_i , enquanto bombeia H^+ para o espaço intermembranas. A atividade de ATPsintase é uma importante causa para a diminuição dos compostos fosfatados ricos em energia durante isquemia. Este fato é condizente com o aumento nos níveis de ATP em corações isquêmicos tratados com atractilósídeo (inibidor de ANT) ou oligomicina (inibidor de ATPsintase) (Belisle e Kowaltowski, 2002). O tratamento de corações isquêmicos com DZX mostrou efeitos similares, sugerindo que a abertura de mitoK_{ATP} limita o transporte e hidrólise de ATP.

Outro efeito da abertura de mitoK_{ATP} é a prevenção da captação e acúmulo excessivo de Ca^{2+} em resposta à diminuição do potencial de membrana e, portanto, diminuição de transição de permeabilidade mitocondrial, que será abordada mais adiante (Facundo et al., 2005).

Vanden Hoek et al. em 1998 demonstraram que a geração de ROS mitocondrial durante pré-condicionamento isquêmico é necessária para ativar a proteção em resposta a estresse oxidativo gerado na reperfusão (Vanden Hoek et al., 2000). Além disso, a adição de ROS exógeno pode promover efeitos similares em pré-condicionamento isquêmico (Yaguchi et al., 2003) e antioxidantes revertem esses efeitos protetores (Vanden Hoek et al., 1998). Já que a abertura de canais de K^+ tem sido relacionada ao efeito benéfico conferido pelo pré-condicionamento isquêmico, a relação entre ROS e mitoK_{ATP} vem sendo amplamente questionada. Neste contexto, um

modelo de pré-condicionamento no qual a abertura de mitoK_{ATP} aumenta a geração de ROS no início do pré-condicionamento isquêmico foi sugerido (Carroll et al., 2001; Forbes et al., 2001; Krenz et al., 2002). Foi sugerido que essa liberação de ROS é estimulada por um aumento do Δ pH (alcalinização da matriz mitocondrial) em resposta à entrada de K⁺ e subsequente estímulo à fosforilação de mensageiros e à transcrição gênica (Andriukiv et al., 2006). Uma evidência que suporta esse modelo é que DZX aumenta a fluorescência de sondas fluorescentes sensíveis a ROS intracelular, diclorofluoresceína (DCF) e Mito Tracker[®] (Carroll et al., 2001; Forbes et al., 2001; Andriukiv et al., 2006) e o efeito protetor de agonistas de mitoK_{ATP} pode ser revertido por antioxidantes tiólicos, como N-acetilcisteína e 2-mercaptopropionilglicina (MPG) (Forbes et al., 2001; Pain et al., 2000).

Por outro lado, os experimentos do nosso laboratório em coração sugerem um aumento na geração de ROS durante pré-condicionamento isquêmico anterior à ativação de mitoK_{ATP} (Facundo et al., 2006b). Essas espécies reativas possivelmente devem ativar mitoK_{ATP}, que quando ativado reduz a formação de ROS durante a reperfusão (Facundo et al., 2007; Fornazari et al., 2007). Nós acreditamos que a ativação de mitoK_{ATP} pode prevenir o acúmulo excessivo de ROS por promover um leve desacoplamento e, assim, reduzir a geração de ROS. Um fato que suporta nossa hipótese é o aumento da fluorescência de DCF, utilizado para medir ROS intracelular, promovido pelo DZX. Esta interferência na fluorescência de DCF não foi encontrada com outros agonistas de mitoK_{ATP}, como pinacidil. Estudos feitos pelo nosso grupo em homogenatos de coração demonstram um pequeno aumento da fluorescência do DCF promovido por DZX. Porém, esse aumento estava presente mesmo na presença de antimicina ou desacopladores mitocondriais, sugerindo que esse efeito não pode ser atribuído a ROS mitocondrial. Também verificamos que o efeito de DZX pode ser diretamente revertido por antioxidantes tiólicos, como N-acetilcisteína ou MPG, fato que fortemente apóia nossa hipótese na qual a abertura de mitoK_{ATP} reduz a geração de ROS. Esse papel de prevenir a formação de ROS é completamente compatível com sua natureza protetora e com sua habilidade de prevenir TPM, uma consequência de

estresse oxidativo (Hausenloy et al., 2004; Facundo et al., 2005; Kowaltowski et al., 2001) (Esquema 3).

Facundo et al., 2005

Esquema 3. Efeitos benéficos de mitoK_{ATP} durante isquemia/reperfusão. O esquema acima mostra que a abertura de canais de K⁺ mitocondriais promove um aumento do volume mitocondrial, que reduz a hidrólise de ATP e, portanto leva a uma conservação de energia maior e diminuição do potencial de membrana, que resulta em uma menor captação de Ca²⁺. Paralelamente, a captação promove um leve desacoplamento que reduz a geração de ROS. Juntos, os efeitos levam a prevenção de TPM (anexo I).

1.2. Sistema Nervoso Central: Excitotoxicidade e Neurodegeneração

Aguda degeneração neuronal ocorre quando o tecido cerebral é exposto a períodos prolongados de níveis sanguíneos abaixo do nível considerado crítico, como observado em infartos, traumas cerebrais e deficiência cardíaca (Siesjo, 1992). A hipóxia também pode levar à morte celular, principalmente em neonatos. A diminuição nos níveis de glicose sanguínea, em decorrência de falhas hepáticas ou por

hiperinsulinemia, levam a uma morte neuronal seletiva (Auer et al., 1984). Nessas condições, a disfunção mitocondrial é um evento essencial para a morte celular e é precedida por falta de ATP, perda da homeostase de Ca^{2+} , estresse oxidativo e liberação de fatores mitocondriais pró-apoptóticos. Muitos estudos sugerem que a mitocôndria apresenta um papel central na neurodegeneração, pois participa do processo de sinalização de morte celular é uma importante fonte de ROS e pode contribuir para o envelhecimento através do acúmulo de mutações no seu DNA (Danial e Korsmeyer, 2004). Além disso, a mitocôndria é uma organela responsável pela produção de ATP, manter a homeostase de Ca^{2+} (Nicholls, 1985) e proteger as células de lesões por excitotoxicidade (Dubinsky et al., 2004).

Durante a isquemia cerebral, a concomitante redução da fosforilação oxidativa (produção de ATP) mitocondrial e falta de substrato para a glicólise levam a um rápido declínio e quase completa perda do ATP tecidual (Ljunggren et al., 1974; Nordstrom e Siesjo, 1978). Como consequência da redução da razão ATP/ADP, o gradiente iônico através da membrana plasmática não pode ser mantido, ocorrendo despolarização da membrana plasmática, efluxo de K^+ para o meio extracelular, influxo de Ca^{2+} e Na^+ para o citosol acompanhado de influxo de Cl^- e água, resultando em inchamento celular. Paralelamente a esse aumento de permeabilidade iônica através da membrana plasmática ocorre uma massiva liberação de neurotransmissores, como glutamato, para o meio extracelular. Uma vez no meio extracelular, o glutamato poderá estimular receptores N-metil-D-aspartado da membrana plasmática de neurônios que promoverão maior influxo de Ca^{2+} e Na^+ do meio extracelular para o citosol, podendo levar a lesão e morte celular (excitotoxicidade) (Coyle e Puttfarcken, 1993; Castilho et al., 1998; Rothman e Olney, 1986; Albin e Greenamyre, 1992; Choi, 1996; Nicholls e Budd, 2000). Enquanto o influxo de Na^+ parece estar associado ao inchamento celular, a entrada de Ca^{2+} está correlacionada com a toxicidade celular (Choi, 1987).

Paralelamente à captação citosólica de Ca^{2+} , a mitocôndria é a principal organela responsável pelo seqüestro de Ca^{2+} (Nicholls e Budd, 2000). O aumento da concentração de Ca^{2+} pode induzir TPM, a qual será abordado mais adiante, e estresse oxidativo.

A redução na síntese de ATP leva a uma disfunção da Na^+/K^+ ATPase, que promove uma despolarização da membrana plasmática ocasionando a ativação de canais de Ca^{2+} voltagem-dependente. Além disso, essa despolarização impede o bloqueio dos receptores por íons Mg^{2+} deixando os receptores NMDA hipersensíveis a glutamato (Greene et al., 1996). O excesso de Ca^{2+} intracelular induz a geração de ROS (Lafon-Cazal et al., 1993; Reynolds e Hastings, 1995; Bindokas et al., 1996; Atlante et al., 1997; Castilho et al., 1998; Sengpiel et al., 1998) e pode levar à morte neuronal (Esquema 4).

Esquema 4. Excitotoxicidade induzida por glutamato. A liberação de glutamato ativa receptores NMDA, que aumentam a captação de Na^+ e Ca^{2+} e o bloqueio da Na^+/K^+ ATPase em decorrência da redução na síntese de ATP promove uma despolarização da membrana plasmática e ativa canais de Ca^{2+} voltagem-dependente. O excesso de Ca^{2+} leva à produção de ROS e morte neuronal.

A mitocôndria parece ser a maior fonte de ROS em neurônios expostos a glutamato (Dugan et al., 1995; Reynolds e Hastings, 1995; Bindokas et al., 1996; Castilho et al., 1998; Sengpiel et al., 1998). Foi demonstrado que o estresse oxidativo ocorre em consequência do acúmulo de Ca^{2+} mitocondrial (Castilho et al., 1998). O acúmulo de Ca^{2+} leva a um colapso no potencial de membrana e déficit na produção de ATP. O papel de ROS será abordado no item 1.3.

1.3. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e a Mitocôndria

A mitocôndria é a fonte mais importante de produção de superóxido *in vivo* na maioria das células aeróbicas, pois apresenta a cadeia de transporte de elétrons em sua membrana mitocondrial interna (Halliwell e Gutteride, 1998). Assim, a cadeia respiratória pode apresentar vazamentos de elétrons, principalmente via complexos I e III, o que pode resultar em passos intermediários da formação de ânion $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Boveris e Chance, 1973; Kowaltowski e Vercesi, 1999; Kowaltowski et al., 2000). Nestes complexos, $\text{O}_2^{\cdot-}$ é gerado, respectivamente, ao nível da NADH desidrogenase e pelo vazamento da semiquinona para o oxigênio molecular (Esquema 3). A geração de superóxido pelo complexo I pode ser estimulada por substratos respiratórios como malato, glutamato e piruvato, bem como através de sua inibição por rotenona (Turens, 1997; da Silva et al., 2003). O escape de elétrons ao nível da coenzima Q pode ser estimulado por antimicina A, cianeto e succinato (Kowaltowski et al., 1998). É interessante notar que geralmente em situações nas quais a taxa respiratória está alta, a formação de ROS é menor e em situações nas quais a taxa respiratória está baixa, a liberação de ROS é maior. Isso pode ser explicado por uma manutenção maior do fluxo de elétrons, reduzindo a probabilidade de redução monoeletrônica do oxigênio (Skulachev, 1996).

Uma outra fonte de geração de ROS mitocondrial é através da atividade de fluxo reverso de elétrons. Assim, em mitocôndrias em suspensão, na presença de succinato e na ausência de inibidores de complexo I, elétrons da cadeia de transporte podem

retornar via complexo I e formar ROS. De modo geral, essa transferência só ocorre devido ao alto potencial de membrana mitocondrial (Liu et al., 2002; Turrens et al., 2003). Assim, como fluxo reverso de elétrons, desidrogenases da matriz mitocondrial, como α -cetoglutarato desidrogenase, podem contribuir para o aumento da geração de ROS na ausência de inibidores da cadeia respiratória (Starkov et al., 2004), visto que a redução de flavinas e flavoproteínas pode gerar superóxido (Chan e Bielski, 1974, 1980; Bunik e Sievens, 2002).

Esses radicais superóxido produzem outras espécies reativas, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através da dismutação catalizada pela superóxido dismutase, radicais hidroxila, através da reação de H_2O_2 com Fe^{2+} , ou peroxinitrito, através da combinação de radicais superóxido com óxido nítrico, gerado pela óxido nítrico sintase (NOS) (Kowaltowski e Vercesi, 2001). Essa geração de ROS tem sido implicada em danos celulares ocorridos em diversas patologias cerebrais, como isquemia/reperfusão, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica (ELA) e doença de Huntington e envelhecimento (Nicholls, 2002). Portanto, é extremamente importante entender a regulação da geração de ROS mitocondrial.

Para compensar a formação de ROS através da cadeia de transporte de elétrons, a mitocôndria apresenta um sistema de antioxidantes composto por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) (em coração), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase, glutathiona, NADPH e vitaminas C e E (Kowaltowski e Vercesi, 1999). Assim, o superóxido formado pode ser convertido em peróxido de hidrogênio através da enzima superóxido dismutase mitocondrial que tem como cofator o Manganês (MnSOD), ou da Cobre e Zinco SOD, presente no espaço intermembranas (Fridovich, 1995; Okado-Matsumoto e Fridovich, 2001). Esse H_2O_2 pode se difundir pela membrana ou se acumular na mitocôndria, onde pode ser transformado em água pela ação da catalase, ou pelo sistema glutathiona peroxidase/ tioredoxina peroxidase. Este sistema transforma o peróxido em água através de uma reação acoplada da glutathiona/tioredoxina (GSH/TSH). A glutathiona oxidada ou tioredoxina oxidada podem ser reconvertidas a GSH e TSH pela glutathiona redutase (GR) ou tioredoxina redutase (TR), respectivamente. Ambas enzimas, GR ou TR, utilizam NADPH como fonte de

elétrons. Se esse sistema antioxidante não for eficaz, H_2O_2 pode reagir com Fe^{2+} e através da reação de Fenton, gerar radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) (Esquema 5). Uma das principais consequências da geração do radical hidroxila é a peroxidação lipídica, que ocorre em ácidos graxos polinsaturados (McBride e Kraemer, 1999). Portanto, o H_2O_2 pode ser um indicador de estresse oxidativo mitocondrial (Kowaltowski e Vercesi, 1999, 2001).

Não são somente essas espécies reativas de oxigênio que são capazes de promover efeitos tóxicos nas células. Por exemplo, o óxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$), uma molécula sinalizadora através da modificação de sítios heme e sulfidril de proteínas, em níveis elevados pode levar a nitrosilação e nitrosação de proteínas (Beckman e Koppenol, 1996; Garthwaite e Boulton, 1995; Zhang e Snyder, 1995). Além disso, em resposta a aminoácidos excitatórios, neurotransmissores e neuromoduladores, $\text{NO}^\cdot$ em excesso promove múltiplas doenças neurodegenerativas como epilepsia, acidente vascular cerebral (AVC) e excitotoxicidade (Bryan et al., 2005). Uma vez sintetizado, $\text{NO}^\cdot$ é rapidamente difundido pela membrana celular e pode alcançar compartimentos celulares e outros tipos de células ao redor.

A atuação de $\text{NO}^\cdot$ em excitotoxicidade parece ser dependente do aumento da produção de superóxido. Nessas condições, $\text{NO}^\cdot$ reage com superóxido rapidamente e forma peroxinitrito (Thiyagarajan et al., 2004). O peroxinitrito pode resultar em diferentes reações químicas e reagir com diversos substratos, como hidroxilação ou nitração de resíduos de tirosina, peroxidação lipídica e sua decomposição em NO_2 e $\text{OH}^\cdot$. Estas moléculas resultantes da decomposição do peroxinitrito parecem estar associadas a danos celulares ou perda neuronal por necrose (Augusto et al., 2002).

Esquema 5. Formação e Remoção de ROS Mitocondrial. O esquema mostra a formação de superóxido através da cadeia de transporte de elétrons e em consequência, a geração de H_2O_2 . Este peróxido formado pode seguir diferentes caminhos, como se difundir pela membrana, ser removido pela ação da catalase ainda na mitocôndria, ser transformado em água através do sistema glutatona peroxidase/tioredoxina peroxidase e se o sistema de defesa não for eficaz, esse H_2O_2 gerado pode reagir com Fe^{2+} e através da reação de Fenton, produzir radical hidroxila.

1.4. Homeostase de Ca^{2+} e TPM

Os níveis de Ca^{2+} intracelulares são mantidos em concentrações 10000 vezes menores que as concentrações extracelulares. Este alto gradiente eletroquímico de Ca^{2+} entre os compartimentos intra e extracelulares é essencial para a sua função como carregador de sinais bioquímicos ao interior das células. A distribuição do Ca^{2+}

intracelular é controlada por processos de transporte do íon através da membrana plasmática e das membranas de organelas subcelulares, como o retículo endoplasmático, através das Ca^{2+} ATPases, núcleo e mitocôndria (Gunter e Gunter, 1994). Se a mitocôndria torna-se disfuncional e a síntese de ATP é reduzida, a homeostase do Ca^{2+} será afetada.

Tem sido demonstrado que qualquer modificação funcional nos translocadores de Ca^{2+} pode levar à morte celular. Em 1979, Hunter e Haworth demonstraram que mitocôndrias isoladas tratadas com quantidades excessivas de Ca^{2+} sofriam uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna que pode preceder necrose ou morte celular apoptótica. Essa permeabilização da membrana interna, provocada por TPM, resulta na perda de componentes da matriz, redução da função mitocondrial e aumento substancial do volume da organela, com conseqüente ruptura da membrana externa, liberação de citocromo c (Liu et al., 1996), e outros fatores pró-apoptóticos e morte celular (Zoratti e Szabò, 1995; Green e Reed, 1998; Crompton, 1999). Ademais, Ca^{2+} citosólico pode ativar diferentes enzimas envolvidas na morte celular, como fosfolipase A2, caucineurina, proteases e endonucleases (Leist e Nicotera, 1998; Orrenius et al., 1996; Coyle e Puttfarcken, 1993; Wang et al., 1999) e induzir estresse oxidativo (Coyle e Puttfarcken, 1993; Lafon-Cazal et al., 1993; Reynolds e Hasting, 1995; Castilho et al., 1999).

Em neurônios, a ativação de receptores de glutamato metabotrópicos ou inotrópicos pode elevar o Ca^{2+} citosólico de maneira transiente (Castilho et al., 1998), levando a estresse oxidativo mitocondrial, um processo associado à morte celular.

1.5. Acidose Metilmalônica

A acidose metilmalônica é um distúrbio metabólico hereditário autossômico recessivo que afeta cerca de 1 em 48000 nascidos (Coulombe et al., 1981; Fenton et al., 2001). É uma das mais freqüentes acidemias orgânicas e é causada pela deficiência severa da enzima metilmalonil-CoA mutase que é responsável pela

conversão de metilmalonil-CoA a succinil-CoA no catabolismo de aminoácidos de cadeias laterais ramificadas (isoleucina, valina, treonina e metionina), colesterol e ácidos graxos com cadeias carbônicas ímpares (Nyhan, 1998; Fenton et al., 2001, veja Esquema 6). Existem sete variantes distintas para essa desordem: duas decorrentes de mutações no *locus* apomutase, levando a total ou quase total ausência de atividade da enzima, e outras cinco resultantes de defeitos durante o processo de síntese, ativação ou transporte de cobalamina (Pettenuzzo et al., 2006). Esses defeitos resultam em quantidades aumentadas de metilmalonil-CoA, que é espontaneamente convertido a ácido metilmalônico (MMA) (Fenton, et al., 2001). Os indivíduos afetados apresentam letargia, coma, vômitos, hipotonia muscular e retardo no desenvolvimento.

Desse modo, metilmalonil-CoA, MMA e outros metabólitos se acumulam nos tecidos levando a danos celulares. Esses danos ocorrem com maior frequência em tecido cerebral devido ao maior acúmulo de MMA em decorrência da grande dependência desse tecido em metabolismo aeróbio (Hoffmann et al., 1993, 1994; Baulny et al., 2005). Vários estudos animais *in vivo* e *in vitro* demonstram que MMA compromete a produção energética do cérebro (Marisco et al., 2003; Fleck et al., 2004; Royes et al., 2003; Brusque et al., 2002; Calabresi et al., 1998, 2001; McLaughlin et al., 1998; Wajner e Coelho, 1997; Narasimhan et al., 1996; Toyoshima et al., 1995; Dutra et al., 1993; Wajner et al., 1992). MMA induz peroxidação lipídica no cérebro *in vitro* (Fontella et al., 2000) indicando que este ácido também pode gerar estresse oxidativo. MMA pode ainda alterar neurotransmissão glutamatérgica *in vitro* (Brusque et al., 2001; Fontella et al., 2000). Em conclusão, o déficit energético, estresse oxidativo e excitotoxicidade devem agir sinergisticamente e provocam danos característicos de acidose metilmalônica. Neste cenário, MMA induziu excitotoxicidade (indireta) e produção de radicais livres, de modo similar ao ácido 3-nitropropiónico, um inibidor irreversível de complexo II mitocondrial (Binienda et al., 1998; Beal et al., 1993). Assim, os danos cerebrais causados pela acidose metilmalônica são semelhantes às condições de uma isquemia química ou metabólica (Brusque et al., 2002), sugerindo que estudos mitocondriais utilizados na prevenção de morte celular isquêmica podem também ser aplicados para prevenir danos por MMA.

Esquema 6 - O metabolismo de aminoácidos de cadeias laterais ramificadas, colesterol e ácidos graxos com cadeias carbônicas ímpares é dependente da atividade de metil-malonil-CoA mutase.

2. OBJETIVOS

A proposta principal deste trabalho é compreender os efeitos de canais de K^+ mitocondriais ATP-sensíveis em tecido cerebral e os mecanismos pelos quais a sua ativação pode proteger contra danos promovidos por excitotoxicidade. Serão enfocados os seguintes aspectos específicos:

2.1. Estudo do papel de mitoK_{ATP} na morte neuronal induzida por NMDA ou cianeto/aglicemia. Dados da literatura indicam um papel da hiper-ativação de receptores N-metil D-aspartato na morte neuronal pós-isquêmica (Castilho et al., 1998; Leist e Nicotera, 1998). A ativação destes receptores leva a um influxo de Ca^{2+} ao interior da célula, resultando em danos mitocondriais que desencadeiam a morte celular (Kowaltowski et al., 2001). Assim, iremos abordar o papel neuroprotetor de mitoK_{ATP} em modelos de excitotoxicidade e privação energética.

2.2. Estudo do efeito de mitoK_{ATP} sobre a geração de ROS e captação de Ca^{2+} . Sabe-se que a ativação de receptores NMDA leva a um influxo de Ca^{2+} e a um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Recentemente, tem-se proposto que a abertura do poro de TPM na membrana mitocondrial interna teria um importante papel na cascata de eventos que resulta na morte neuronal em diversos modelos experimentais (Friberg et al., 1998; Fiskum et al., 1999; Nieminen et al., 1996; Schinder et al., 1996; Sawa et al., 1999). Dois eventos da abertura de mitoK_{ATP} podem contribuir para a prevenção de TPM: a diminuição da captação de Ca^{2+} (Belisle e Kowaltowski, 2002) e a prevenção da geração de ROS (Ferranti et al., 2003). Deste modo, iremos abordar o papel de mitoK_{ATP} na geração de ROS e na captação de Ca^{2+} em cérebro.

2.3. Estudo do efeito de mitoK_{ATP} em modelo de excitotoxicidade *in vivo*. Após a constatação que canais de K^+ mitocondriais previnem a morte neuronal em excitotoxicidade *in vitro*, tentamos reproduzir os efeitos destes canais em modelo de excitotoxicidade *in vivo* através da ativação de receptores NMDA por ácido quinolínico.

2.4. Estudo do efeito de mitoK_{ATP} em modelo de doença neurodegenerativa. Sabe-se que, em decorrência da deficiência na enzima metilmalonil-CoA mutase dependente de vitamina B12, metilmalonil-CoA e ácido metilmalônico se acumulam nos tecidos levando a danos celulares. Esses danos ocorrem com maior frequência em cérebro devido a grande dependência deste tecido em metabolismo aeróbico (Hoffmann et al., 1993; Hoffmann et al., 1994; Baulny et al., 2005). Acredita-se que os danos causados por acidose metilmalônica são devido a uma deficiência do metabolismo energético, semelhante às condições de uma isquemia química ou metabólica (Brusque et al., 2002), sugerindo que estudos mitocondriais podem ser utilizados para prevenir estes danos. Desta forma, iremos abordar o papel de mitoK_{ATP} em modelo de acidose por MMA.

2.5. Efeito do estado redox na ativação de mitoK_{ATP}. Resultados anteriores do nosso laboratório mostraram a inativação destes canais na presença de redutores tiólicos em coração. Iremos abordar o papel do balanço redox na atividade de mitoK_{ATP} em mitocôndrias de cérebro.

2.6. Atividade de mitoK_{ATP} em mitocôndrias sinaptossomais e não sinaptossomais. Há questionamentos sobre a presença de atividade de mitoK_{ATP} em cérebro (Brustovetsky et al., 2005). Este estudo utilizou um protocolo de isolamento que produz uma preparação rica em mitocôndrias não sinaptossomais. Iremos abordar a atividade destes canais em frações mitocondriais sinápticas e não sinápticas para verificar se há diferença de atividade de mitoK_{ATP} nessas frações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais. Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e todas as soluções aquosas foram preparadas em água deionizada. As drogas mais lipofílicas, como diazóxido (DZX), ciclosporina A (CsA), antimicina A (AA), diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA), Amplex Red, rotenona (Rot) e carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP) foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções de 2-mecaptopropionil glicina (MPG), catalase (Cat), H₂O₂, N-metil D-aspartato (NMDA), ácido metilmalônico (MMA) e 5-hidroxicanoato foram preparadas em água logo antes de cada experimento. HRP, safranina O, ATP, GTP, succinato, malato, piruvato e glutamato foram preparadas em alíquotas aquosas, mantidas congeladas. ATP, GTP, MMA e MPG tiveram o pH corrigido entre 7,0 e 7,4 com NaOH. As soluções de H₂O₂ foram calibradas pela medida da absorbância em 240 nm e a concentração calculada usando o coeficiente de extinção molar de 43,6 M · cm⁻¹.

3.2. Animais. Ratos Sprague-Dawley machos pesando entre 250 e 300 gramas, utilizados para os experimentos, foram mantidos em condições de temperatura constante (22 ± 2 °C) com 12 horas de ciclo claro/escuro (12h/12h), com livre acesso à água e ração irradiada da marca Nuvlab (Navital, Paraná, Brasil) no Biotério do Conjunto das Químicas, Universidade de São Paulo. As condições sanitárias do ambiente obedeceram ao padrão sanitário livre de patógenos específicos com umidade adequada. Os ratos foram mantidos em gaiolas de plástico com cobertura de metal e serragem de madeira, no máximo 5 animais por gaiola. Para experimentos com cultura primária foram utilizados ratos Sprague-Dawley neonatos machos. Os neonatos foram mantidos no biotério em gaiolas junto com a mãe sob as mesmas condições sanitárias de ratos adultos e retirados com entre 6-8 dias de vida no momento da cultura. Para o modelo de excitotoxicidade *in vivo* foram utilizados ratos Lewis machos, pesando entre 250 e 350 gramas. Estes animais foram também mantidos nas mesmas condições ambientais, no Biotério da Universidade Estadual de Campinas e devidamente manipulados sob anestesia e analgesia com pentobarbital e codeína, respectivamente. Todos os estudos foram conduzidos de acordo com as normas para estudos com

animais, estabelecias pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal do Instituto de Química, USP e Unicamp.

3.3. Cultura Primária de Células Granulosas de Cerebelo. As culturas primárias de células granulosas de cerebelo foram preparadas a partir de oito ratos neonatos com sete dias de vida. Os ratos foram decapitados e os cerebelos foram removidos através de dois cortes laterais a partir da medula. Estes cerebelos foram imediatamente colocados em tampão fosfato contendo glicose 3 mM, BSA 3 mg/mL e Mg_2SO_4 0,038% e, então, triturados com cortes verticais e horizontais utilizando um bisturi. Este homogenato foi colocado sob uma solução de tripsina 0,025% e incubado por 20 minutos a 37°C em banho-maria. Em seguida, foram adicionados 20 mL de uma solução contendo DNAase 128 U/mL, inibidor de tripsina 0,16 mg/mL e Mg_2SO_4 0,02 % e esse homogenato centrifugado por 2 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em solução contendo DNAase 800 U/mL, utilizando pipetas Pasteur de tamanhos diferentes. A este pellet foram adicionados 6 mL de uma solução contendo NaCl 170 mM, NaHCO_3 25 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1 mM, KCl 5 mM, D-glicose 5 mM, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 3 mM e BSA 4%, que em seguida foi centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm. Novamente o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em meio essencial Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM). Esse homogenato de células foi plaqueado numa densidade de aproximadamente 250.000 células/cm² em placa de cultura celular de 48 ou 24 poços tratada com 10 mg/ml de poli-L-lisina. As culturas foram incubadas em 5% CO₂/95% O₂ e 95% de umidade a 37°C. Após 24 horas foi acrescentado ao meio citosina β arabnofuranosídeo 10 μM (ARA-C).

3.4. Tratamento das Placas de Cultura. Após sete dias de cultura, as placas foram divididas em seis grupos e tratadas com **A-** apenas DMEM (controle negativo); **B-** digitonina 1% (controle positivo); **C-** N-metil D-aspartato (NMDA) 100 μM; **D-** diazóxido (DZX) 0,5 μM; **E-** DZX 0,5 μM + NMDA 100 μM e **F-** DZX 0,5 μM + NMDA 100 μM + 5-hidroxidecanoato (5-HD) 100 μM.

Foi realizado um pré-tratamento com diazóxido 0,5 μ M (grupos D, E e F) e 5-HD 1 μ M (grupo F) durante 20 minutos. Para determinar a concentração de diazóxido ideal para as células, foram feitos experimentos preliminares utilizando várias concentrações da droga (0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 30 μ M). Foi visto que doses de diazóxido superiores a 1 μ M são tóxicas para as células.

Após o tratamento com diazóxido, o meio da placa foi trocado novamente e foram adicionados digitonina 1% (grupo B) e NMDA 100 μ M (grupos C, E e F). A placa foi, então, incubada por 4 horas em estufa a 37°C.

3.5. Viabilidade Celular. Logo após o tratamento das placas, foi verificada a porcentagem de morte celular utilizando dois métodos: dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), a qual é liberada no meio quando ocorre o rompimento da membrana celular, e método de MTT (reagente 1-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-3,5-dimetilformazan), dependente da integridade da cadeia respiratória mitocondrial. A viabilidade celular foi determinada por porcentagem (LDH) ou por mg de proteína (MTT).

3.5.1. Dosagem da Atividade de Lactato Desidrogenase

A atividade da enzima foi determinada através do kit comercial Doles específico para desidrogenase láctica em uma mistura de reagentes contendo lactato, NAD^+ , fenazina metossulfato (FMS), alumínio férrico e 1,10-fenantrolina. A detecção é feita da seguinte maneira:

Em cada tubo de ensaio foram adicionados 100 μ l das amostras. Em seguida foram adicionados a cada tubo 1 mL de substrato e 50 μ L da solução de alumínio férrico

(Tabela 1). As amostras foram incubadas por 2-3 minutos em banho-maria a 37°C e logo em seguida colocadas no gelo. Foram acrescentados 50 µL da solução de NAD-ferranzina e novamente os tubos (Tabela 1) foram incubados em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Os tubos foram, então, colocados no gelo e foi adicionado 1 mL da solução estabilizadora (Tabela 1). Em paralelo ao teste das amostras, foi preparado um tubo branco. As amostras foram lidas em espectrofotômetro Ultrospec 1000 a 510 nm.

3.5.2. Formação de MTT Formazan

A viabilidade celular foi determinada através da conversão do composto brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (tetrazol), um composto amarelo, em um composto de cor púrpura (formazan). A redução desse composto é dependente da atividade de redutases mitocondriais. Portanto, essa conversão pode ser proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983).

Após o tratamento, a placa foi lavada com solução salina de fosfato e foram adicionados 500 µL de solução de MTT 0,5 mg/mL. A placa foi incubada por 2 horas e após esse período, o MTT foi removido e adicionados 800 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização do formazan que não se dissolveu. Em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro a 550 nm.

3.6. Quantificação de Proteínas pelo Método de Folin. Após o tratamento da placa com NMDA, o pellet foi ressuspenso com 100 µM de solução de SDS 0,01% e foram adicionados 50 µL desse homogenato em tubos de ensaio contendo 600 µL de água destilada. Foram adicionados 3 mL de solução de cobre contendo Na₂CO₃ 2% / NaOH 0,1 M, CuSO₄ 1% e Na-tartarato 2%. Essa mistura foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foram adicionados 300 µL de solução de Folin. Os tubos foram incubados em banho fervente por 2 minutos e a absorbância lida em espectrofotômetro a 750 nm.

3.7. Medida de ROS Intracelular. O meio da placa foi trocado por meio sem KCl e foi feito um pré-tratamento com diclorofluoresceína-diacetato (H₂DCF-DA) 10 µM. 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 ROS. A placa foi dividida em sete grupos: **A-** DMEM (controle); **B-** NMDA 100 μ M; **C-** DZX 0,5 μ M e NMDA 100 μ M; **D-** DZX 0,5 μ M, NMDA 100 μ M e 5-HD 100 μ M; **E-** antimicina 1 mg/mL (controle positivo); **F-** rotenona 1,5 μ M. Após 30 minutos do tratamento com H₂DCF-DA, a placa foi tratada com DZX e 5-HD nos grupos determinados e incubada por 20 minutos. Após esse período, o meio foi trocado novamente e acrescentado NMDA, antimicina e rotenona. A placa foi incubada por 4 horas em estufa a 5% CO₂/95% O₂ e 95% de umidade a 37°C. Em seguida, o meio foi trocado e adicionados 500 μ L de solução salina de fosfato e digitonina 1%. A leitura foi feita em fluorímetro Hitachi F4500 em 488 nm de excitação e 530 nm de emissão, *slit width* de 5 nm a 37°C.

3.8. Isolamento de Mitocôndrias Cerebrais. Mitocôndrias de cérebro de rato foram isoladas por centrifugação diferencial. O rato adulto foi decapitado, o cérebro retirado e colocado em solução tampão contendo manitol 225 mM, sacarose 75 mM, Hepes 5 mM, EGTA 1 mM, BSA 1 mg/mL, pH 7,4. O cérebro foi então triturado, lavado com solução tampão, cortado novamente e foram adicionados 2,5 mg de protease (Sigma P4630) dissolvidos em 5 mL de solução tampão. Em seguida é feita a homogeneização através de potter de vidro manual. Este homogenato foi centrifugado por 3 minutos a 2000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi reservado e o pellet foi ressuscitado com 5 mL de solução tampão e centrifugado novamente por 3 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi reservado e o pellet foi descartado. Os dois sobrenadantes resultantes das duas centrifugações foram centrifugados por 8 minutos a 12000 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado com 10 mL de solução tampão e 20 μ L de digitonina 10%. Esse homogenato é centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet sem a camada mais clara foi ressuscitado com 5 mL de solução tampão sem EGTA e centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm. Por fim, o pellet sem a camada clara foi ressuscitado com 100 μ L de tampão sem EGTA e a suspensão homogênea obtida foi mantida no gelo até o início dos experimentos que foram realizados imediatamente após o isolamento.

3.9. Isolamento de Mitocôndrias Sinápticas e Não Sinápticas com Gradiente de Percoll. Mitocôndrias de cérebros de rato foram isoladas utilizando um gradiente de densidade de percoll (Simns, 1990). Os cérebros foram picotados e homogeneizados em meio contendo manitol 225 mM, sacarose 75 mM, Hepes 10 mM e EGTA 1 mM. O homogenato foi centrifugado a 1300 g por 3 minutos. O sobrenadante (S1) foi reservado, o pellet foi ressuspensionado e homogeneizado em meio de isolamento. O homogenato foi novamente centrifugado a 1300 g por 3 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes (S1 e S2) foram juntados e centrifugados a 20000 g por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 12 ml de percoll 15% e distribuído sobre um gradiente de percoll (23% e 40%) previamente preparado. Os tubos foram centrifugados a 30000 g por 9 minutos em baixa aceleração e desaceleração. Após a centrifugação, são percebidas três camadas: 1- mielina; 2- mitocôndrias sinaptossomais e, 3- mitocôndrias não sinaptossomais. A fração que corresponde à mielina foi descartada e as outras duas frações foram retiradas separadamente, diluídas em meio de isolamento com digitonina 0,01% e centrifugadas a 17000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuspensionado com meio de isolamento contendo 200 µM de EGTA e BSA 1% e centrifugado a 8000 g por 10 minutos. Então, o pellet foi ressuspensionado em 100 µl de meio sem EGTA. Após o isolamento, foram quantificadas as proteínas utilizando o método de biureto.

3.10. Medidas de Potencial de Membrana Mitocondrial. Para estimar o potencial de membrana mitocondrial, foi utilizada a safranina O (Akerman e Wikstrom, 1976; Kowaltowski et al., 2002), um cátion lipofílico que se acumula em membranas mitocondriais proporcionalmente ao potencial de membrana. Assim, o acúmulo de safranina O promove uma redução na fluorescência da suspensão. Em uma cubeta foram adicionados 2,5 mL de meio essencial (KCl 150 mM, succinato 1 M, BSA 0,1 mg/mL, EGTA 100 µM, Mg^{2+} 5 mM, fosfato 2 mM pH 7,4), ATP 1 µM, safranina 5 µM e homogenato de mitocôndrias (aproximadamente 2 mg/mL). A cubeta foi colocada no fluorímetro e observada a fluorescência utilizando como parâmetros 496 nm de excitação e 586 nm de emissão. Foi adicionado à cubeta ADP 2 mM e observado a

fluorescência até a estabilização da curva. Foram acrescentados oligomicina 1 µg/mL, seguida de CCCP 1 µM. Em uma segunda cubeta foram adicionados 2,5 mL de meio essencial, ATP 1 mM, safranina 5µM, DZX 10 µM e homogenato de mitocôndria. Em seguida foram colocados ADP, oligomicina e CCCP seqüencialmente. Após a obtenção da segunda medida, o teste foi repetido com diazóxido em diferentes concentrações. O potencial de membrana foi calibrado utilizando meio sem K⁺ e adicionando um ionóforo de K⁺, valinomicina 0,1 mg/mL (Kowaltowski et al., 2002). Assim, após a estabilização do potencial de membrana ao adicionar mitocôndria, adiciona-se concentrações crescentes de K⁺ e através da equação de Nernst estima-se os valores do potencial de membrana:

$$\Delta\Psi = 60 \log \frac{K_{out}}{K_{in}}$$

3.11. Medidas de Razão do Controle Respiratório. O consumo de O₂ mitocondrial foi acompanhado através de um eletrodo de Clark conectado a um oxígrafo Hansatech, em câmara de acrílico fechada e termostatizada, sob constante agitação (da Silva et al., 2003). Esse eletrodo é composto por um cátodo de platina e um ânodo de prata, que estão imersos em uma solução eletrolítica de cloreto de potássio. Assim, o consumo de O₂ pode ser medido através da relação estequiométrica entre a corrente gerada pelos eletrodos e à concentração de O₂ na superfície do cátodo. Estes impulsos elétricos gerados são transmitidos ao oxígrafo. Então, no oxígrafo, foram colocados 2,5 mL de meio essencial (KCl 150 mM, succinato 1 M, Hepes 5 mM, BSA 0,1 mg/mL, EGTA 100 µM, Mg²⁺ 5 mM, fosfato 2 mM, pH 7,4), ATP 1 mM e mitocôndrias (aproximadamente 2 mg/mL). Foram iniciadas as medidas e foram acrescentados ADP 2 mM, oligomicina 1 µg/ml e CCCP 1 µM. Em seguida, o experimento foi repetido acrescentando DZX 10-30 µM desde o início. A medida do controle respiratório foi obtida a partir da relação entre a taxa do consumo de O₂ em presença de ADP e oligomicina. A razão ADP/O foi calculada através da medida de O₂ necessário para fosforilar 100 nmoles de ADP.

3.12. Medida de ROS Mitochondrial. A quantidade de H_2O_2 gerada pela mitocôndria foi medida através da oxidação de Amplex Red 50 μM (Molecular Probes A12222) em presença de horseradish peroxidase (HRP 1 U/mL) a um composto fluorescente denominado resorufina. As medidas foram feitas utilizando um fluorímetro Hitachi F4500 operando em comprimentos de excitação e emissão de 563 e 587 nm respectivamente em agitação constante a 37°C. As mitocôndrias foram incubadas em tampão Hepes 5 mM contendo KCl 150 mM, succinato 5 mM, malato 2 mM, piruvato 2 mM, glutamato 2 mM, BSA 0,1 mg/mL, EGTA 100 μM , Mg^{2+} 5 mM, fosfato 2 mM, oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$, pH 7,4. Foram feitos controles em presença de CCCP 1 μM e rotenona 1 μM . Foram realizados experimentos em presença de DZX 5 μM e ATP 1 mM.

3.13. Inchamento Mitochondrial. O inchamento mitocondrial foi estimado através de mudanças no espalhamento de luz devido à captação de K^+ . Sabe-se que a entrada de K^+ na mitocôndria é acompanhada pela entrada de fosfato e água (Kowaltowski et al., 2001). Com isso, observamos uma diminuição do espalhamento de luz de mitocôndrias em suspensão. Então, pode-se avaliar a atividade do $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ através da medida do espalhamento de luz: quanto maior a diferença de espalhamento de luz, maior será a atividade do canal. Para isso, acompanhamos o inchamento de mitocôndrias isoladas utilizando um fluorímetro Hitachi F4500 operando em comprimento de excitação e emissão de 520 nm e slit de 2.5 nm, a 37°C com agitação constante. As mitocôndrias isoladas foram adicionadas em um meio de reação com baixa concentração de K^+ (KCl 100 mM, succinato 1 M, Hepes 5 mM, BSA 0,1 mg/ml, EGTA 100 μM , Mg^{2+} 5 mM, fosfato 2 mM, pH 7,4) e oligomicina 1 $\mu\text{g/ml}$. Foram feitos experimentos na presença de **A-** ATP 1 mM; **B-** ATP 1 mM e DZX 10 μM ; **C-** ATP 1 mM e um redutor tiólico, mercaptopropionilglicina (MPG) 200 μM ; **D-** ATP 1 mM, DZX 10 μM e MPG 200 μM . Foram feitos experimentos controles na ausência de ATP 1 mM. Aos traçados que não continham diazóxido, foram adicionados DMSO na mesma concentração que o DZX.

3.14. Captação de Ca^{2+} . A captação de Ca^{2+} pela mitocôndria foi acompanhada através da incubação de mitocôndrias isoladas em presença de um fluoróforo (Calcium Green 5N – Molecular Probes 0,1 μM) que interage com Ca^{2+} extramitocondrial utilizando um

fluorímetro Hitachi F4500 operando em comprimento de excitação e emissão de 506 nm e 531 nm respectivamente e *slit width* de 5.0 nm, a 37°C com agitação constante. Para esse experimento, as mitocôndrias foram incubadas em um tampão Hepes 5 mM contendo KCl 150 mM, succinato 5 mM, BSA 0,1 mg/mL, Mg^{2+} 2 mM, fosfato 2 mM, oligomicina 0,1 µg/ml, pH 7,4. Foram feitas adições de 50 µM de cloreto de cálcio. Assim, foi estimada a quantidade de Ca^{2+} captada pela mitocôndria através da diminuição da fluorescência. Os experimentos foram feitos em presença de ATP 100 µM ou ADP 100 µM e DZX 10 µM.

3.15. Modelo de Excitotoxicidade *in vivo*. Para estudar os efeitos protetores do mitoK_{ATP} *in vivo*, ratos Lewis machos de aproximadamente 250-300g foram submetidos a um procedimento cirúrgico no qual foi feita uma lesão do estriato dos animais através da injeção de ácido quinolínico (50 nmoles). O ácido quinolínico é um agonista de receptor NMDA e, portanto, media morte neuronal através do influxo de Na^+ e Ca^{2+} (Choi, 1987).

3.15.1. Cirurgia. Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com pentobarbital 3% (1,2 mg/kg) após 15 minutos da aplicação de um opióide de ação moderada, cloridrato de tramadol, que auxilia na analgesia e diminui, portanto, o risco de perda do animal em cirurgia. Após a anestesia e tricotomia da cabeça, os ratos eram fixados em estereotático e injeções de 50 nmoles de ácido quinolínico foram feitas no hemisfério direito seguindo as coordenadas do estereotático: 1,5 mm anteroposterior do bregma, 2,7 mm medianolateral do bregma e 4,5 mm dorsoventral da superfície dural. A injeção de quinolínico foi feita através de uma seringa Hamilton de 10 mL durante 2 minutos. Após concluída a lesão, foi inserida uma cânula no ventrículo cerebral esquerdo seguindo as seguintes coordenadas do estereotático: 0,92 mm anterioposterior, 1,5 mm medianolateral e 3,6 mm dorsoventral da superfície dural.

3.15.2. Pós-operatório. Logo após a cirurgia, foram injetados DZX ou DMSO através da cânula e essas injeções foram feitas a cada 24 h por 3 dias. Após 3 dias da cirurgia e de tratamento, foi feita a validação do experimento através da injeção de 3 µL de

angiotensina na cânula, posicionada no ventrículo. Essa verificação possibilita saber se o posicionamento da cânula está adequadamente no ventrículo. Quando a cânula está na posição correta, o animal apresenta polidipsia, confirmando, assim, que o tratamento foi feito corretamente. Assim, os animais com o posicionamento correto da cânula foram eutanasiados através de anestesia profunda de pentobarbital 3% e perfundidos por via transcardíaca com 250 ml de solução salina seguido de 250 mL de solução de formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4, para melhor conservação do cérebro. Após a perfusão, os cérebros foram retirados e mantidos na mesma solução de paraformaldeído 4% por 24 h e depois transferidos para solução de sacarose 20% e 30% respectivamente, onde foram mantidos por 2 dias em cada solução. Após retirados da solução de sacarose 30%, os cérebros foram cortados em micrótomo por congelamento em 3 séries de 40 μ m na posição do estriato.

3.15.3. Fluoro-Jade. Depois de montadas e secas, as lâminas com os cortes dos cérebros foram coradas pelo método de Fluoro-Jade (Schmued, et al., 2005). Assim, as lâminas foram imersas em uma solução 1% de NaOH e em 80% de etanol por 5 minutos. Em seguida, foram imersas em álcool 70% por 2 minutos e em água destilada por mais 2 minutos. Sob agitação leve, as lâminas foram imersas em KMnO_4 0,06% por 10 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas com água destilada por 2 minutos e submetidas a coloração Fluoro-Jade B sob agitação leve por cerca de 20 minutos. Após a coloração, foi feita a lavagem das lâminas com água destilada e, assim, foram mantidas na posição vertical até a secagem.

3.16. Modelo de Envelhecimento Celular in vitro. Para estudar se o mitoK_{ATP} apresenta algum efeito protetor durante a senescência de uma célula neuronal, foram utilizadas culturas primárias de células granulosas de cerebelo. As células granulosas foram cultivadas e no segundo dia adicionado ARA-C. Após 72 h de tratamento com ARA-C, a placa foi lavada com PBS, o meio foi trocado e assim, as células foram tratadas com DMSO (controle) ou DZX 0,5 μ M (tratado). Essas células foram acompanhadas por cerca de 20 dias. Em dias alternados, eram coletados os meios de um controle e de um tratado para analisar através da atividade de LDH a viabilidade

celular. As células aderidas à placa eram tratadas com iodeto de propídio 1 μ M por 20 minutos, lavadas com PBS e analisadas por microscopia de fluorescência. Após a análise microscópica, as células eram permeabilizadas com SDS 0,01% e assim, as proteínas eram quantificadas pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

3.17. Marcação com FI-Glibenclamida. Frações mitocondriais sinápticas e não sinápticas (1 mg/mL) foram incubadas em meio de reação contendo KCl 150 mM, succinato 5 mM, BSA 0,1 mg/mL, EGTA 100 μ M, Mg^{2+} 5 mM, fosfato 2 mM (pH 7,4) e FI-glibenclamida (BODIPYFI-Gly) 10 μ M por 45 minutos em temperatura ambiente e com agitação. Após esse período, as mitocôndrias foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos e o pellet ressuspensionado no mesmo meio de reação. A fluorescência da FI-Gly foi acompanhada em fluorímetro Hitachi F4010, operando em comprimento de excitação e emissão de 504 nm e 511 nm respectivamente, *slit width* de 3.0 nm, a 37°C com agitação constante.

3.18. Análise Estatística. Os dados foram analisados através do teste t de student (resultados com mitocôndria isolada) ou análise de variância one-way (Anova) (resultados de cultura primária) utilizando os softwares GraphPad Prism ou Origin 7.0. Alguns resultados foram mostrados como experimentos representativos de pelo menos três repetições similares. Os gráficos de barras representam média $\pm$ S.E. Para todas as análises, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

1. Modelo de Excitotoxicidade in vitro Induzido pela Ativação Direta de Receptores NMDA.

Sabe-se que durante a isquemia cerebral, paralelamente ao aumento de permeabilidade iônica através da membrana plasmática, ocorre a liberação massiva de neurotransmissores, principalmente glutamato, que é o neurotransmissor mais abundante. A liberação de glutamato pode estimular receptores N-metil D-aspartato (NMDA) da membrana plasmática de neurônios que promoverão maior influxo de Ca^{2+} e Na^{+} do meio extracelular para o citosol (Esquema 7).

Então, para tentar reproduzir essa situação de excitotoxicidade decorrente de um processo isquêmico, foi feito um tratamento de células granulosas de cerebelo com glutamato 100 μM . Foi verificado neste modelo se a abertura de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ exerce algum efeito protetor. Para isso, foi utilizado diazóxido (DZX), um agonista de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, em várias doses. Para avaliar a porcentagem de morte celular, foi verificada a atividade da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante (vide Materiais e Métodos).

Foram avaliadas 14 placas de cultura e DZX em altas concentrações (5 μM e 30 μM), e em tempo de exposição superior a 20 minutos, mostrou-se tóxico às células (dados não mostrados). A concentração ideal, não tóxica, de DZX em células granulosas de cerebelo foi de 0,5 μM . Porém, apesar de em algumas placas o DZX reduzir a porcentagem de morte celular por excitotoxicidade por glutamato (Tabela 1), o resultado não foi reprodutível em outras preparações, provavelmente devido a alterações na cultura. Também observou-se que o dano promovido pelo glutamato foi baixo em relação a porcentagem de morte do controle, sendo assim, a diferença entre os grupos tratados apenas com glutamato e com DZX + glutamato foi pequena. Esse fato pode, também, justificar a ausência de proteção pelo DZX.

Tabela 1: Excitotoxicidade por glutamato

Atividade de lactato desidrogenase (U.A.)	
Controle	0.334 ± 0.036
Digitonina	0.618 ± 0.067
Glutamato	0.397 ± 0.043
Diazóxido 0,5 µM + glutamato	0.257 ± 0.023

Como foi observada a diminuição da atividade de lactato desidrogenase nas preparações abaixo dos níveis do controle, foi feito um teste para determinar se DZX interfere na reação colorimétrica do kit de dosagem da atividade enzimática. Para este experimento, foi utilizado um homogenato de células cerebrais e foi visto que DZX não inibiu significativamente a reação (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade da enzima LDH em homogenato de células cerebrais (U.A.)

Controle	DZX0,5 µM	DZX 1 µM	DZX 5 µM
0,108	0,098	0,085	0,094

Assim, devido à baixa reprodutibilidade dos experimentos de excitotoxicidade por glutamato e tendo em vista que grande parte do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular para o intracelular é mediado por receptores NMDA (Coyle e Puttfarcken, 1993; Lee et al., 1999; Fiskum et al., 1999), testamos a ativação direta de receptores NMDA (Esquema 7). Foram testadas duas concentrações (100 µM e 1000 µM). Para determinar a porcentagem de morte celular, foram utilizados dois métodos: atividade de LDH e MTT formazan (vide Materiais e Métodos).

Esquema 7. Excitotoxicidade induzida pela ativação direta do receptor NMDA. O esquema acima mostra que a ativação direta de receptores NMDA leva a um aumento da captação de Ca^{2+} e, portanto um aumento de ROS, levando a morte celular.

Interessantemente, DZX protegeu contra danos em morte celular induzida por NMDA 100 μM (Figura 1).

Figura 1: Diazóxido previne morte neuronal induzida por NMDA. Células granulosas de cerebelo foram incubadas com diazóxido (DZX) 0,5 μM e 5-hidroxidecanoato (5HD) 0,1 mM, onde indicado, por 20 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com NMDA 100 μM por 4 horas. A porcentagem de morte celular foi determinada utilizando um kit comercial para dosar lactato desidrogenase (LDH). * $p < 0.05$ em relação ao controle; ** $p < 0.05$ em relação ao NMDA; *** $p < 0.05$ em relação ao DZX + NMDA.

Foram feitas seis repetições com resultados reprodutíveis e estatisticamente significantes. Para confirmar se o efeito benéfico da proteção em excitotoxicidade foi devido a ativação de canais de potássio mitocondriais, utilizamos um antagonista de

mitoK_{ATP}, 5-HD. Assim, verificamos que o efeito do DZX foi revertido por 5-HD, sugerindo fortemente que os efeitos são atribuíveis ao mitoK_{ATP}. Em altas doses de NMDA, 1000 μ M, não foram observados efeitos protetores (dados não mostrados).

Também foi feito um modelo que simularia uma situação isquêmica através da incubação das células com cianeto (0,5 mM) e deoxiglicose (20 mM) e avaliação da porcentagem de morte celular (Facundo et al., 2006a). O cianeto inibe complexo IV da cadeia de transporte de elétrons, assim, impede a produção de oxigênio e a deoxiglicose não consegue ser metabolizada pelas células, não sendo reconhecida pela enzima glicolítica hexoquinase. Deste modo, o aporte de oxigênio e nutrientes pelas células foi impedido. As células granulosas foram pré-incubadas com DZX 0,5 μ M e 5-hidrodecanoato 100 μ M por 20 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com cianeto/deoxiglicose 0,5 mM/20 mM por 4 horas. A porcentagem de morte celular foi determinada através da atividade da enzima LDH.

Foram feitas seis repetições do experimento com resultados reprodutíveis e foi observado que diazóxido não protegeu contra danos promovidos por cianeto/aglicemia (Figura 2).

Figura 2. Diazóxido não previne morte neuronal induzida por cianeto/aglicemia. Células granulosas foram incubadas com DZX 0,5 μ M e 5-hidrodecanoato 0,1 mM por 20 minutos, onde indicado. Em seguida, as células foram tratadas com cianeto/deoxiglicose 0,5 mM/20 mM por 4 horas. A porcentagem de morte celular foi determinada utilizando um kit comercial para dosar lactato desidrogenase (LDH). * $p < 0.05$ em relação ao controle.

Interessantemente, esse resultado se contrasta com experimentos anteriores do nosso laboratório feitos em coração (Facundo et al., 2006a). Com esse resultado, concluímos que há diferenças das propriedades citoprotetoras de mitoK_{ATP}s entre os diferentes tecidos.

Além desses modelos, um modelo de acidose metil malônica (MMA) foi utilizado para avaliar se estes estudos feitos na prevenção de morte celular excitotóxica podem ser úteis para prevenir danos por MMA, pois acredita-se que danos cerebrais causados por acidose metil malônica são devidos a uma deficiência do metabolismo energético, semelhantes às condições de isquemia química ou metabólica (Brusque et al., 2002).

As células granulosas de cerebello foram pré-incubadas com diazóxido 0,5 μ M e 5-HD 100 μ M por 20 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com ácido metil malônico 10 mM por 4 horas e a morte celular foi determinada através da dosagem da atividade da enzima LDH.

Não foi observada nenhuma redução nos danos causados por MMA (Figura 3). Estes dados não corroboram com experimentos feitos pelo grupo (Kowaltowski et al., 2006) em células neuronais PC12 e fatias cerebrais. Nessas condições, diazóxido previne contra danos provocados por MMA. Esta discrepância de resultados pode ser explicada por variações na cultura e pela baixa morte celular causada pelo MMA nessas culturas, que possuem metabolismo glicolítico predominante.

Figura 3. Neurotoxicidade induzida por ácido metilmalônico: efeito do mitoK_{ATP}. Células granulosas de cerebello foram incubadas com diazóxido (DZX) 0,5 μ M e 5-hidroxidecanoato (5HD, um antagonista do mitoK_{ATP}) 0,1 mM por 20 minutos onde indicado. Em seguida, as células foram tratadas com metil malonato (MMA) 10 mM por 4 horas. A morte celular foi determinada utilizando um kit comercial para dosar lactato desidrogenase (LDH).

2. Medida de ROS Intracelular.

Tendo em vista que uma das principais consequências isquêmicas e excitotóxicas é o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), foram feitos experimentos para avaliar se a abertura de mitoK_{ATP} reduz essa liberação exacerbada de ROS utilizando cultura de células granulosas de cerebello.

Para isso, foram feitos testes fluorimétricos utilizando como indicador fluorescente o H₂DCF-DA. O H₂DCF-DA é a forma comercializada de H₂DCF, um indicador fluorescente para espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que pode ser acumulado no interior de células (Brandt et al., 1965; Keston et al., 1965). O H₂DCF-DA não possui carga e, portanto, não se acumula na mitocôndria dependentemente do potencial de membrana. Esta sonda é alvo de esterases celulares, sendo convertida a H₂DCF que é, então, oxidada por ROS a DCF e pode ter sua intensidade de fluorescência detectada. Dessa forma, este método foi utilizado para avaliar o aumento de ROS intracelular em excitotoxicidade promovida por NMDA (Figura 4).

Figura 4. Efeito de DZX na produção de ROS em excitotoxicidade por NMDA. Células granulosas de cerebello foram tratadas com DCF 10 μ M por 30 minutos e incubadas com diazóxido 0,5 μ M e 0,1 mM de 5 hidroxidecanoato por 20 minutos. NMDA 100 μ M, antimicina 1 μ M e rotenona 1,5 μ M foram adicionados como descrito em materiais e métodos. A fluorescência de DCF foi medida após 4 h, e normalizada para a fluorescência média dos controles. * $p < 0.05$ em relação ao controle; ** $p < 0.05$ em relação ao NMDA; *** $p < 0.05$ em relação a DZX + NMDA.

Foi verificado que o aumento de fluorescência de DCF promovido por NMDA foi prevenido pela adição de DZX, de modo revertido por 5-HD. Estes dados indicam, portanto, que a abertura de mitoK_{ATP} previne estresse oxidativo associado a excitotoxicidade. Foram utilizados como controles positivos para a geração de ROS rotenona e antimicina, inibidores de complexo I e III da cadeia de transporte de elétrons respectivamente.

Também foi verificado se a ativação destes canais preveniria a liberação de ROS em situação fisiológica e o efeito observado em relação ao DZX não foi significativo (Figura 5), provavelmente devido ao alto erro em determinação de quantidades baixas de ROS.

Figura 5. Efeito de diazóxido na geração fisiológica de ROS. Células granulosas de cerebelo foram tratadas com DCF 10 μ M por 30 minutos e incubadas com diazóxido 0,5 μ M e 0,1 mM de 5 hidroxidecanoato por 20 minutos. Antimicina 1 μ M e rotenona 1,5 μ M foram adicionados como descrito em Materiais e Métodos. A fluorescência de DCF foi medida após 4 h.

Esses resultados demonstram que a abertura de mitoK_{ATP} não diminui mensuravelmente a produção de ROS em situação fisiológica, mas previne estresse oxidativo induzido por NMDA.

3. Medida do Potencial de Membrana Mitocondrial.

Em degeneração celular induzida por NMDA, descrita anteriormente, observamos que os efeitos protetores do DZX incluíam uma diminuição da geração de ROS aumentada em presença de NMDA. A diminuição da geração de ROS pode estar relacionada à diminuição do potencial de membrana pelo canal de potássio mitocondrial (Ferranti et al., 2003). Para avaliar os efeitos da abertura de mitoK_{ATP} por diazóxido no potencial de membrana mitocondrial, foram realizados experimentos em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (vide Materiais e Métodos), utilizando como substratos malato/glutamato 2 mM, succinato 5 mM ou succinato 5 mM + rotenona 1 μ M. Foram utilizadas quatro concentrações de DZX: 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M e 30 μ M.

Verificamos que o potencial de membrana mitocondrial não sofre modificações significativas nem com substrato de complexo I (malato/glutamato), nem em presença de succinato+rotenona. Porém, em mitocôndrias energizadas com succinato apenas, foi observada uma diferença significativa estatisticamente (Figura 6).

Figura 6. Potencial de membrana mitocondrial. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (~0,5 mg/mL) foram incubadas em tampão contendo KCl 150 mM, Hepes 5 mM, BSA 1 mg/mL, EGTA 100 μ M, Mg²⁺ 5 mM, 1 mM ATP, oligomicina 1 μ g/mL e 2 mM PO₄, em pH 7,4. O potencial de membrana foi medido de acordo com mudanças na fluorescência de 5 μ M safranina O. 5 mM succinato, 1,5 μ M rotenona e 2 mM malato e 2 mM glutamato foram adicionados onde indicados. 5 μ M DZX foi adicionado onde indicado. *, p < 0,05 em relação ao controle.

Esses experimentos foram repetidos na ausência de K^+ para avaliar se havia algum efeito do diazóxido no potencial de membrana mitocondrial em condições nas quais o $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ não pode estar ativo. Para manter a osmolaridade, foi adicionado ao meio sacarose 150 mM. Como esperado, nessas condições não foi observada nenhuma mudança no potencial de membrana. A Figura 7 mostra um traçado representativo de quatro repetições com resultados reprodutíveis. Assim, confirmando os efeitos do $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ em presença de succinato.

Figura 7. Potencial de membrana em tampões sem K^+ . Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato foram incubadas em meio com sacarose 150 mM, Hepes 5 mM, BSA 1 mg/ml, EGTA 100 μM , Mg^{2+} 5 mM, succinato 1 mM, PO_4 2 mM e ATP 1 mM. O potencial de membrana foi medido através da mudança de fluorescência de safranina O (5 μM). Oligomicina 1 $\mu\text{g/ml}$, ADP 2 mM, CCCP 1 μM e diazóxido 30 μM foram adicionados onde indicados.

Desse modo, concluímos que a atividade de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ é maior na presença de succinato. Na presença de malato/glutamato, não observamos mudanças significativas do potencial de membrana. Então, nessas situações, a atividade de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ é provavelmente menor.

4. Controle respiratório e razões ADP/O.

Tendo em vista que alterações no potencial de membrana mitocondrial podem reduzir a eficiência respiratória, foi avaliada a fosforilação oxidativa através das medidas de controle respiratório e razões ADP/O (vide Materiais e Métodos).

Assim, mitocôndrias de cérebro de rato foram isoladas e incubadas na presença de succinato ou malato/glutamato. O controle respiratório foi determinado dividindo a taxa do consumo de O_2 na presença de ADP pela taxa na presença de oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$. O ADP/O foi calculado pela medida de O_2 necessário para fosforilar 100 nmoles de ADP.

Os experimentos foram feitos em presença de diazóxido e 5-HD. Não foram observadas alterações no controle respiratório ou razões ADP/O em nenhuma das situações, tanto com succinato, quanto com malato/glutamato (Figura 8).

Figura 8. Controle respiratório e razões ADP/O na presença de succinato. O controle respiratório e ADP/O foram determinadas em condições semelhantes à figura 7 dividindo a taxa de consumo de O_2 na presença de ADP 2 mM pela taxa na presença de oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$. O ADP/O foi calculado pela medida de O_2 necessário para fosforilar 100 nmoles de ADP. Diazóxido 10 μM e 5-hidroxidecanoato 100 μM foram adicionados onde indicados. (A) e (B) succinato 5 mM; (C) e (D) malato/glutamato 2 mM.

Assim, apesar da grande atividade de mitoK_{ATP} em cérebro em relação a outros tecidos, essa atividade não interfere de maneira quantificável na eficiência da fosforilação oxidativa. Portanto, a diminuição no potencial de membrana mitocondrial observada anteriormente não está relacionada a alterações significativas no controle respiratório, mas pode estar relacionada ao estado redox mitocondrial.

5. Produção de ROS Mitocondrial

Com o objetivo de avaliar se as mudanças no potencial de membrana são devido ao estado redox mitocondrial, conduzimos experimentos com mitocôndria isolada de cérebro de rato e avaliamos a produção de ROS endógena em mitocôndrias energizadas com substrato de Complexo I, II e em presença de substrato de Complexo II e um inibidor de Complexo I, succinato, malato/glutamato e succinato + rotenona respectivamente. A geração de ROS foi determinada através da fluorescência de Amplex Red e peroxidase de raiz forte (HRP), que na presença de H₂O₂ formam um complexo e seu produto, resorufina, pode ser detectado. Assim, o aumento da fluorescência é proporcional ao aumento da geração de ROS.

Foi observado que em mitocôndrias energizadas com substrato de Complexo I, malato/glutamato, a produção de ROS é baixa em relação à produção de ROS de mitocôndrias em presença de succinato e (Figura 9).

Essa diferença pode ser explicada pela atividade de fluxo reverso de elétrons em presença de succinato, visto que em alto potencial de membrana, os elétrons da cadeia de transporte de elétrons podem vazar principalmente via Complexo I ou III e assim, produzir ânion superóxido, que por sua vez, pode gerar H₂O₂. Turrens e colaboradores em 2003 demonstraram que em cérebro, a atividade de fluxo reverso de elétrons é bastante relevante. Uma evidência dessa atividade de fluxo reverso é a redução da produção de ROS quando adicionado um inibidor de Complexo I, rotenona, que impede o escape de elétrons.

Figura 9. Produção de ROS endógeno.

Mitocôndrias foram incubadas em meio contendo KCl 150 mM, Hepes 5 mM, BSA 1 mg/mL, EGTA 100 μ M, Mg²⁺ 5 mM, ATP 1 mM e oligomicina 1 μ g/mL. Succinato 5 mM, malato/glutamato 2 mM e rotenona 1,5 μ M foram adicionados onde indicados. A produção de ROS foi determinada a partir da fluorescência de Amplex Red 50 μ M e horseradish peroxidase 1 U/mL. * $p < 0,05$ succinato em relação ao malato/glutamato, ** $p < 0,05$ succinato/rotenona em relação ao succinato.

Através das mesmas condições experimentais, pôde-se medir as diferenças de atividade de mitoK_{ATP} em condições de alta geração de ROS (succinato) ou baixa geração de ROS (succinato + rotenona). Isso foi feito pela avaliação da captação de K⁺ em mitocôndrias isoladas através da técnica de inchamento. Sabe-se que a entrada de K⁺ na matriz mitocondrial é acompanhada da entrada de íons de fosfato e água, que levam a um aumento do volume da matriz mitocondrial e conseqüentemente a uma redução do espalhamento de luz de mitocôndrias em suspensão (Kowaltowski et al., 2001). Assim, a diminuição no espalhamento de luz é inversamente proporcional ao inchamento do volume da matriz mitocondrial.

Deste modo, foi observado um aumento discreto, porém significativo, do inchamento mitocondrial em condições em que a liberação de ROS é maior, apenas com succinato (representado pela linha tracejada - Figura 10). Esse aumento foi significativamente revertido pela adição de rotenona (cerca de 38%), sugerindo que a redução na geração de ROS diminui a atividade de mitoK_{ATP}. Como um controle, utilizamos um inibidor fisiológico do canal, ATP, e como esperado, a atividade do canal mostrou-se diminuída. Interessantemente, a adição de H₂O₂ exógeno restabeleceu a alta atividade do canal, de modo prevenido pela catalase. Este resultado indica que mitoK_{ATP} é regulado pelo estado redox mitocondrial e corrobora resultados do laboratório obtidos em coração.

Figura 10. Ativação de mitoK_{ATP} por ROS endógeno e exógeno.

Mitocôndrias isoladas foram incubadas em meio contendo KCl 100 mM, Hepes 5 mM, BSA 1 mg/mL, EGTA 100 μ M, Mg²⁺ 5 mM, ATP 1 mM, succinato 5 mM, rotenona 2 μ M e oligomicina 1 μ g/mL. H₂O₂ 1 μ M, catalase 2 μ M foram adicionados onde indicados. *, p < 0,05 em relação ao succinato; **, p < 0,05 em relação ao succinato+rotenona; ***, p < 0,05 em relação ao succinato + rotenona + H₂O₂.

Para validar esses resultados e descartarmos possíveis artefatos, conduzimos experimentos sob as mesmas condições anteriores, porém, substituindo os íons K⁺ do meio de reação por Na⁺ (Figura 11). Assim, a adição de ATP não reverteu significativamente o inchamento promovido pelo controle com apenas succinato. Quando adicionados ATP e DZX, ATP e rotenona ou ATP, rotenona e H₂O₂, não observamos essa diminuição do inchamento. Foi realizada, também, uma adição com DZX 10 μ M para verificar se havia atividade desses canais em Na⁺ e não foi observado um aumento da captação de K⁺. Como na ausência de K⁺ não observamos inchamento, pôde-se concluir que os efeitos observados anteriormente são atribuídos à atividade de mitoK_{ATP}.

Figura 11: Atividade do MitoK_{ATP} não é vista em meio com Na⁺. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo 100 mM de KCl, 5 mM de Hepes, 0,1 mg/mL de BSA, 100 μ M de EGTA, 5 mM de Mg²⁺, 5 mM de succinato e 1 μ g/mL de oligomicina. O inchamento mitocondrial foi medido através das taxas de espalhamento de luz como descrito em Materiais e Métodos. 1 mM de ATP, 10 μ M de diazóxido, 2 μ M de rotenona e 1 μ M de H₂O₂ foram adicionados onde indicados. O painel representa a média e desvio padrão de pelo menos 3 repetições utilizando diferentes preparações mitocondriais.

Em conclusão, esses resultados indicam fortemente que mitoK_{ATP} apresenta maior atividade quando a geração mitocondrial de ROS é maior.

Em seguida, foi realizado um experimento com o intuito de verificar se a enzima catalase também era capaz de prevenir a queda do potencial de membrana mitocondrial como observado na presença de succinato, anteriormente. Na Figura 12, observamos que mesmo na presença de catalase, há uma diminuição do potencial de membrana quando se ativa o canal com diazóxido.

Concluimos, assim, que a ativação do mitoK_{ATP} neste caso, não depende diretamente de H₂O₂, que é removido pela catalase, mas possivelmente pode estar associada à atividade de outras espécies oxidantes, como radical ânion superóxido.

Figura 12. Efeito da catalase na Ativação do mitoK_{ATP}. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato foram incubadas em meio com KCl 150 mM, Hepes 5 mM, BSA 1 mg/ml, EGTA 100 μ M, Mg²⁺ 5 mM, succinato 1mM, ATP 1 mM, catalase 2 μ M e oligomicina 1 μ g/ml. O potencial de membrana foi medido através da mudança de fluorescência de safranina O (5 μ M), na presença de DZX, conforme indicado.

6. Produção de ROS e Atividade de MitoK_{ATP}

Em cultura de células granulosas de cerebelo, demonstramos que a abertura de mitoK_{ATP} reduz a geração de ROS em modelo de excitotoxicidade induzida pela ativação direta de receptores NMDA. A ativação do canal por DZX foi revertida significativamente por 5-HD, conforme mostrado anteriormente. Demonstramos, também, que a atividade de mitoK_{ATP} é modificada pelo estado redox mitocondrial. Porém, em decorrência o grande erro experimental observado em cultura e tendo em vista que a técnica utilizada para medir a geração de ROS intracelular tem diversos artefatos, avaliamos se em mitocôndria isolada esse resultado se repete.

Assim, para avaliar se a abertura de mitoK_{ATP} pode alterar diretamente a liberação de ROS mitocondrial, medimos a geração de H₂O₂ em presença de Amplex Red e HRP, utilizando uma mistura de substratos fisiológicos relevantes: succinato, piruvato, malato e glutamato (Figuras 13A e 13B).

Figura 13. Atividade do mitoK_{ATP} diminui a geração de H₂O₂ mitocondrial. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (~0.5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo 150 mM KCl, 5 mM Hepes, 0,1 mg/mL BSA, 100 µM EGTA, 5 mM Mg²⁺, 5 mM succinato, 2 mM malato, 2 mM glutamato, 2 mM piruvato, 1 µg/ml oligomicina e 1 mM ATP, em pH 7,4. A produção de H₂O₂ foi medida através da presença de 50 µM Amplex red e 1 U/mL de uma peroxidase de raiz forte, como descrito em Materiais e Métodos. 5 µM DZX, 1,5 µM rotenona e 1 µM CCCP foram adicionados onde indicados. O painel A mostra traçados representativos de um experimento, enquanto o painel B mostra a média e desvio padrão de pelo menos 3 repetições utilizando diferentes preparações mitocondriais. A figura inserida no painel A mostra traçados com e sem DZX na ausência de K⁺ e presença de 250 mM de sacarose, representadas nas barras vazias no painel B. * p < 0.05 em relação ao controle.

A liberação de H₂O₂ foi parcialmente inibida por rotenona, sugerindo que uma das principais fontes de ROS mitocondrial é o fluxo reverso de elétrons, em consequência da passagem de elétrons do complexo II para o complexo I. Esse resultado corrobora a hipótese de que o fluxo reverso de elétrons é a principal fonte geradora de ROS (Turrens, 2003). Como controle, observamos que a produção de ROS foi quase completamente abolida por desacoplador (CCCP), que além de inibir a formação de ROS via fluxo reverso de elétrons, também previne formação de ROS

mitocondrial de outros níveis da cadeia de transporte, como ciclo da coenzima Q (Kowaltowski e Vercesi, 1999; Turrens, 2003).

Através deste experimento, também demonstramos uma diminuição de ROS quando adicionado DZX 5 μ M em relação ao controle. Então, para confirmarmos se este efeito era proveniente da abertura de canais de K^+ mitocondriais, em condições experimentais semelhantes, observamos a geração de H_2O_2 na ausência de K^+ (Figura inserida). Conforme esperado, não foi observada uma diminuição da produção de ROS em relação à situação controle, quando adicionamos DZX.

Portanto, esses dados sugerem que tanto em mitocôndrias isoladas, quanto em cultura de células granulosas de cerebelo, a atividade de mito K_{ATP} inibe a formação de ROS.

7. Atividade de Mito K_{ATP} na Presença de Redutor Tiólico

Conforme demonstrado anteriormente, a abertura de canais de K^+ mitocondriais previne morte neuronal afetando o balanço redox. Em coração, a atividade desses canais é regulada por estado redox: oxidantes ativam enquanto redutores diminuem o transporte de íons de K^+ (Zhang et al., 2001; Facundo et al., 2007).

Para investigar a sensibilidade redox de mito K_{ATP} em cérebro, avaliamos a captação de K^+ em mitocôndrias isoladas através da técnica de inchamento. Mitocôndrias foram incubadas em meio de reação contendo succinato na ausência de ATP (controle), na presença de ATP, na presença de ATP e DZX, na presença de ATP e um redutor tiólico (MPG) ou na presença de ATP, DZX e MPG (Figuras 14A e 14B).

Figura 14. Atividade de mitoK_{ATP} é inibida por um redutor tiólico. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato foram incubadas em meio de experimento contendo 100 mM KCl, 5 mM Hepes, 0,1 mg/ml BSA, 100 μ M EGTA, 5 mM Mg²⁺, 5 mM succinato e 1 μ g/ml oligomicina. O inchamento mitocondrial foi medido através das taxas de espalhamento de luz como descrito em materiais e métodos. 1 mM ATP, 10 μ M DZX e/ou 200 μ M MPG foram adicionados onde indicados. O Painel A representa um traçado de um experimento enquanto o painel B mostra a média e desvio padrão de pelo menos 3 repetições utilizando diferentes preparações mitocondriais. * p < 0.05 em relação ao controle.

Assim, mitocôndrias incubadas na ausência de ATP, inibidor fisiológico do canal, apresentaram uma diminuição significativa no espalhamento de luz comparadas às mitocôndrias na presença de ATP. A adição de DZX reverteu essa inibição promovida pelo ATP.

Interessantemente, a adição de um redutor tiólico, MPG, preveniu esse efeito promovido pelo DZX na presença de ATP. Na presença de ATP e MPG não foi observada mudança no espalhamento de luz. Esses resultados indicam que redutores tiólicos previnem a atividade de mitoK_{ATP} estimulada por agonistas farmacológicos e corrobora experimentos similares feitos pelo nosso laboratório em mitocôndrias de coração (Facundo et al., 2006; Facundo et al., 2007).

Assim, demonstramos que a ativação de mitoK_{ATP} previne a geração de ROS mitocondrial e esta ativação é sensível a mudanças em potenciais de óxido-redução, sendo maior na presença de oxidantes.

8. Captação de Ca²⁺ Mitocondrial

Sabe-se que uma das razões para o aumento da geração de ROS em excitotoxicidade é a massiva captação de Ca²⁺ pela mitocôndria. O acúmulo de ROS e a morte neuronal excitotóxica podem ser prevenidos através da inibição da captação de Ca²⁺ mitocondrial (Castilho et al., 1999).

Para verificar se a abertura de mitoK_{ATP} pode alterar a captação de Ca²⁺, fizemos experimentos em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato, na presença de ATP ou ADP, ambos inibidores fisiológicos do canal (Figuras 15A e 15B).

A captação de Ca²⁺ foi avaliada através da fluorescência de Ca²⁺ Green, uma sonda que não consegue entrar na mitocôndria, portanto interage com Ca²⁺ extramitocondrial. Ao adicionar Ca²⁺, observa-se um pico que vai decaindo à medida que esse Ca²⁺ vai sendo captado pela mitocôndria.

Observamos que a capacidade máxima de acúmulo de Ca²⁺ pela mitocôndria tanto na presença de ADP quanto na presença de ATP não foi alterada pela abertura de mitoK_{ATP}, visto nenhum efeito do DZX. Para um controle, conduzimos experimentos com ciclosporina A (CsA), um inibidor de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), que aumentou a quantidade de Ca²⁺ acumulado (Figura 15C).

Figura 15. Mitok_{ATP} não diminui a captação de Ca^{2+} mitocondrial. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato foram incubadas em meio de reação contendo KCl 150 mM, Hepes 5 mM, BSA 0,1 mg/mL, EGTA 100 μM , Mg^{2+} 5 mM, succinato 5 mM e oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$. A captação de Ca^{2+} foi medida através da fluorescência de Ca^{2+} Green 5-N como descrito em Materiais e Métodos. ATP 100 μM ou ADP 100 μM e DZX 10 μM foram adicionados onde indicados. Os Painéis A e B representam traçados de um experimento típico e cada pico representa uma adição de Ca^{2+} 50 μM . O Painel C mostra a média e desvio padrão de pelo menos três repetições utilizando preparações mitocondriais diferentes.

Foram feitos, também, experimentos utilizando uma concentração de ATP próxima de uma situação fisiológica, 1 mM (dados não mostrados). Porém, mesmo nesta concentração a atividade do canal não altera a capacidade de reter Ca^{2+} .

Assim, estes resultados sugerem que em situações de excitotoxicidade, a prevenção da morte neuronal promovida pela abertura de mitok_{ATP} não é decorrente da

alteração da captação de Ca^{2+} , mas sim por uma ação direta na diminuição da geração de ROS mitocondrial.

9. Estudo da Permeabilização Mitocondrial Induzida por Ca^{2+} em Modelo de Acidose Metilmalônica

A acidose metilmalônica é um distúrbio metabólico que ocorre devido a deficiência na enzima metilmalonil-CoA mutase dependente de vitamina B12. Esta enzima é responsável pela conversão de metilmalonil-CoA a succinil-CoA no catabolismo de aminoácidos de cadeias laterais ramificadas, colesterol e ácidos graxos com cadeias carbônicas ímpares. Sem a enzima, metilmalonato se acumula nos tecidos e leva a danos celulares, principalmente em cérebro, já que o cérebro tem uma grande dependência pelo metabolismo aeróbico (Hoffmann et al., 1993; Hoffmann et al., 1994; Baulny et al., 2005). Acredita-se que estes danos cerebrais são devido a uma deficiência do metabolismo energético, semelhantes a condições isquêmicas (Brusque et al., 2002) promovidas pela ação inibitória de metilmalonato sobre o metabolismo de succinato (Maciel et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006). Assim, estudos mitocondriais podem auxiliar em mecanismos para prevenir contra danos neuronais em caso de acidose por MMA.

Foi demonstrado que o MMA promove neurodegeneração de modo prevenido por diazóxido, em células PC12 e fatias cerebrais (Kowaltowski et al., 2006). Desta forma, realizamos experimentos para verificar se a abertura de mitoK_{ATP} poderia inibir transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) induzida por Ca^{2+} , como observado em coração (Facundo et al., 2005). Para estudar essa possibilidade, foram analisadas mudanças no potencial de membrana mitocondrial induzidos por MMA na presença e na ausência de DZX (Figura 16). A medida do potencial de membrana mitocondrial foi feita através da fluorescência de safranina O.

Figura 16. Medida do potencial de membrana mitocondrial em ácido metilmalônico. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato foram incubadas em meio com sacarose 100 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM, EGTA 30 μ M, succinato 2 mM e fosfato 2 mM. O potencial de membrana foi medido através da mudança de fluorescência de safranina O 5 μ M. Foi adicionado Ca^{2+} 100 μ M onde indicado (a) sem MMA; (b) MMA 4 mM; (c) MMA 4 mM + DZX 10 μ M.

Interessantemente, DZX não preveniu contra danos por MMA e Ca^{2+} no $\Delta\psi$ mitocondrial. Isso sugere que $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ não está diretamente relacionado à prevenção de TPM em cérebro, mas pode melhorar os níveis energéticos do tecido ao prevenir a hidrólise de ATP tecidual (Kowaltowski et al., 2006).

10. Modelo de Excitotoxicidade *in vivo*

Dado o potente efeito neuroprotetor *in vitro*, com o objetivo de avaliar a atividade do $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ *in vivo*, desenvolvemos um modelo de excitotoxicidade em colaboração com o professor Dr. Roger F. Castilho do Departamento de Patologia e Ciências

Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Utilizamos ratos Lewis com aproximadamente 300 g.

Desse modo, foi feita aplicação intraestriatal de 2 μ l de ácido quinolínico (50 nmoles), um agonista de receptos NMDA, de acordo com parâmetros estereotáticos e, no mesmo procedimento, foi colocada uma cânula no ventrículo direito, oposto à lesão, por onde foram injetados DMSO ou diazóxido por 3 dias, conforme descrito em Materiais e Métodos. Assim, foi observado se a abertura do mitoK_{ATP} diminui a lesão promovida por excitotoxicidade.

Após a padronização das coordenadas do local da lesão e do grau de intensidade da mesma lesão, foram operados 4 animais, divididos em grupo controle (DMSO) e tratado (DZX). As injeções foram feitas por 3 dias consecutivos, conforme descrito por Shimizu et al., 2002 (vide Materiais e Métodos).

Porém, com a injeção no primeiro dia, alguns ratos não sobreviveram. Após a análise microscópica, percebemos que os ratos que sobreviveram à cirurgia apresentaram o ventrículo direito parcialmente degradado, demonstrando que o volume aplicado foi inadequado. Então, decidimos preparar uma solução de diazóxido mais concentrada para reduzir o volume aplicado.

Foram feitas mais 4 cirurgias, sendo dois ratos controles e dois ratos tratados. Interessantemente, ao analisar as lâminas, não observamos lesão em ambos os grupos, sugerindo que o DMSO, por apresentar uma atividade antioxidante, protegeu os neurônios contra danos promovidos pelo ácido quinolínico.

Sendo assim, decidimos reduzir ao máximo a concentração de DMSO, como diluente do DZX, que permaneceu 1%. Assim, para testar a concentração de DMSO, fizemos um teste com 4 ratos e injetamos solução salina no grupo controle e DMSO diluído em solução salina no grupo tratado. Porém, verificamos em ambos os grupos uma lesão pequena com poucos neurônios marcados (Figura 17).

Figura 17. Corte transversal de um cérebro de rato com lesão no estriato. A figura mostra um exemplo de um corte transversal de um cérebro de rato tratado com ácido quinolínico intra estriatal no hemisfério direito. Após a aplicação do ácido, o rato foi perfundido e o cérebro fixado e corado como descrito em Materiais e Métodos. Os focos de fluorescência correspondem à incorporação do Fluoro-Jade em neurônios lesionados. Os quadros representam lesões em ratos tratados com PBS (A) e (B) ou DMSO (C) e (D) em aumento de 5x (A) e (C) e 20x (B) e (D).

Apesar da pequena lesão apresentada, foram feitas 8 cirurgias, sendo 4 ratos controles (DMSO 1%) e 4 ratos tratados (diazóxido). Interessantemente, os ratos controles não apresentaram neurônios marcados, apenas uma morfologia diferente, indicando que o DMSO foi injetado corretamente, mas, houve uma proteção contra o dano promovido pela administração de ácido quinolínico. Os ratos tratados com diazóxido apresentaram lesões até mais numerosas em relação aos controles (Figura 18).

Figura 18. Corte transversal de um cérebro de rato com lesão no estriato. A figura mostra um exemplo de um corte transversal de um cérebro de rato tratado com ácido quinolínico intra estriatal no hemisfério direito. Após a aplicação do ácido, o rato foi perfundido e o cérebro fixado e corado como descrito em Materiais e Métodos. Os focos de fluorescência correspondem à incorporação do Fluoro-Jade em neurônios lesionados. Os quadros representam lesões em ratos tratados com DMSO (A) e (B) ou diazóxido (C) e (D) em aumento de 5x (A) e (C) e 20x (B) e (D).

Em conclusão, os resultados demonstram que DMSO protege contra os danos promovidos pelo ácido quinolínico e, portanto, fica difícil observar os efeitos do mitoK_{ATP} nesse modelo. Aparentemente, não há evidências da ação benéfica desses canais em modelo de excitotoxicidade induzida por ácido quinolínico *in vivo*.

11. Atividade de MitoK_{ATP} em Mitocôndrias Sinaptossomais e Não Sinaptossomais.

No decorrer deste trabalho, observamos claramente a presença de canais de potássio em mitocôndrias cerebrais. Porém, resultados controversos de artigos atuais levam a uma conclusão oposta à nossa: a ausência de mitoK_{ATP} em mitocôndrias cerebrais. Brustovetsky et al., 2005 demonstraram pela mesma técnica de inchamento a ausência da atividade de mitoK_{ATP} com uma diferença experimental no isolamento de mitocôndrias. Para a obtenção das mitocôndrias, eles utilizaram um gradiente de densidade de percoll e utilizaram apenas uma fração mitocondrial, correspondente às mitocôndrias não sinaptossomais. Ao isolarmos as mitocôndrias cerebrais, utilizamos digitonina para romper a membrana dos sinaptossomos e, assim, conduzirmos experimentos com uma mistura de mitocôndrias sinaptossomais e não sinaptossomais.

Então, para avaliarmos essa discrepância de resultados, isolamos mitocôndrias através da técnica de gradiente de percoll (vide Materiais e Métodos), porém, ao invés de utilizarmos apenas a fração não sinaptossomal, isolamos as duas separadamente e verificamos a atividade de mitoK_{ATP} em ambas as frações. Embora não apresentem diferenças morfológicas, pode ser que as frações apresentem diferenças na atividade desse canal que justifiquem essa discrepância de resultados observados.

Assim, foram feitos experimentos em três condições com cada fração mitocondrial isolada: apenas meio de reação (controle), com ATP e com ATP + DZX. Aos traçados que não continham DZX, foi adicionado DMSO na mesma concentração.

Interessantemente, observamos uma tendência maior da atividade de mitoK_{ATP} em mitocôndrias sinaptossomais (Figura 19), visto que ao adicionar DZX, observamos um aumento do inchamento mitocondrial de maneira prevenido por ATP. Em frações não sinaptossomais, também observamos um aumento do inchamento ao adicionar DZX, mas o efeito era menor. Porém, este resultado não foi estatisticamente significativo e não foi semelhante em todos os experimentos realizados (sete repetições).

Desta forma, fizemos o controle respiratório das mitocôndrias de ambas as frações e obtivemos valores satisfatórios da fração sinaptossomal (aproximadamente 5). Em contrapartida, os controles respiratórios da fração não sinaptossomal foram bem mais baixos (aproximadamente 2).

Assim, concluímos que através desta técnica não podemos confirmar a falta de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ em mitocôndrias cerebrais. A técnica de isolamento com percoll é bem mais demorada do que o isolamento com digitonina e o percoll talvez danifique o canal.

Figura 19. Atividade de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ em mitocôndrias isoladas com percoll. Mitocôndrias de cérebro de rato (0,125 mg/mL) foram isoladas em um gradiente de densidade de percoll e incubadas em meio contendo KCl 100 mM, Hepes 5 mM, BSA 0,1 mg/mL, EGTA 100 μM , Mg^{2+} 5 mM, succinato 5 mM e oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$. O inchamento mitocondrial foi medido através das taxas de espalhamento de luz como descrito em Materiais e Métodos. ATP 1 mM e DZX 10 μM foram adicionados onde indicados. S-Sinaptossomal e NS-Não sinaptossomal.

Desse modo, utilizamos um antagonista de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ marcado (FI-glibenclamida) para avaliarmos sua incorporação em ambas as frações mitocondriais, sináptica e não sináptica e, portanto procurar confirmar a ausência de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ em mitocôndrias não sinápticas (Figura 20).

Figura 20. Ligação de FI-Gly em mitocôndrias sinaptossomais e não sinaptossomais. Mitocôndrias de cérebro de rato (1 mg/mL) foram isoladas em um gradiente de densidade de percoll e incubadas em meio contendo KCl 150 mM, Hepes 5 mM, BSA 0,1 mg/mL, EGTA 100 μ M, Mg^{2+} 5 mM, succinato 5 mM e FI-Gly 10 μ M. A incorporação de FI-Gly foi acompanhada por fluorescência como descrito em Materiais e Métodos.

Interessantemente, ambas as frações apresentaram incorporações de FI-Gly semelhantes, ainda que a fração sináptica apresentou uma fluorescência pouco maior que a não sináptica. Porém, não podemos afirmar com certeza que tanto mitocôndrias sinaptossomais quanto não sinaptossomais apresentam atividade de mitoK_{ATP} semelhante ou mesma quantidade de canais, já que o marcador pode interagir inespecificamente com outros receptores protéicos. Para isso, são necessários mais estudos realizados com frações mitocondriais mais puras.

12. Efeitos do MitoK_{ATP} em Modelo de Envelhecimento *in vitro*.

A abertura de mitoK_{ATP} promove um leve desacoplamento e sabe-se que desacopladores exercem efeitos benéficos em modelos de envelhecimento, tanto em mamíferos quanto em leveduras (Barros et al., 2004).

Dessa forma, avaliamos se a abertura de mitoK_{ATP} exerce algum efeito sob a senescência de neurônios em cultura. Assim, células granulosas de cerebelo foram isoladas e tratadas com um inibidor de células da glia, ARA-C. Após 72h de incubação com ARA-C, as células foram tratadas com DZX 0,5 μ M ou com DMSO na mesma

concentração e em dias alternados o meio de cada grupo (DZX e DMSO) foi coletado e analisado pela atividade de LDH. As células, como crescem aderidas a placa, foram em seguida tratadas com iodeto de propídio. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e analisadas por microscopia. Após a análise microscópica, as células foram permeabilizadas com SDS 0,01% e as proteínas foram dosadas pelo método de Lowry para que obtivéssemos uma razão de LDH liberada no meio por mg de proteína. Assim, pôde-se avaliar a viabilidade dessas células através de dois métodos diferentes. Foram analisadas 4 placas de cultura. A figura 21 representa a média e desvio padrão destes experimentos no 6°, 7°, 10° e 12° dias em cultura.

Figura 21. Efeitos do mitoK_{ATP} em células neuronais. Células granulosas de cerebelo foram cultivadas e tratadas com DZX 0,5 μ M ou DMSO. O meio foi coletado em dias alternados para a análise da porcentagem de morte celular por atividade de LDH em relação à quantidade de proteína presente.

Os resultados sugerem que DZX apresenta um pequeno efeito benéfico no tratamento das células granulosas de cerebelo retardando o envelhecimento.

Resultados similares foram encontrados na análise de microscopia com iodeto de propídio. O iodeto de propídio cora os núcleos das células mortas. Porém, os efeitos do DZX se prolonga até o fim do tratamento. Assim, a figura 22 mostra um experimento representativo após o 6° e 12° dias de tratamento de neurônios controles à esquerda e neurônios marcados com iodeto de propídio à direita.

Figura 22. Efeitos do mitoK_{ATP} em células neuronais. Células granulosas de cerebelo foram isoladas e tratadas após 24h com ARA-C. Após 72h de incubação com ARA-C, as células foram tratadas com DZX 0,5 μ M ou DMSO. Em dias alternados, as células foram tratadas com iodeto de propídio 1 μ M e analisadas em microscopia vide Materiais e Métodos.

Os painéis A, B, C e D representam células tratadas com DMSO enquanto os painéis E, F, G e H representam células tratadas com DZX. Enquanto a figura 23 representa a média e desvio padrão dos experimentos feitos no 6°, 7°, 10° e 12° dias em cultura.

Figura 23. Efeitos do mitoK_{ATP} em células neuronais. Células granulosas de cerebelo foram isoladas e tratadas após 24h com ARA-C. Após 72h de incubação com ARA-C, as células foram tratadas com DZX 0,5 μ M ou DMSO. Em dias alternados, as células foram tratadas com iodeto de propídio 1 μ M e analisadas em microscopia vide Materiais e Métodos. A figura representa a média e desvio padrão de 4 repetições.

Em conclusão, estes resultados sugerem que canais de K⁺ mitocondriais parecem exercer um efeito benéfico no envelhecimento de células em cultura, porém não há um efeito altamente significativo devido ao erro experimental.

5. DISCUSSÃO

Doenças neurodegenerativas englobam um grupo heterogêneo de desordens caracterizadas por progressiva perda anatômica ou fisiológica do sistema nervoso. Exemplos típicos desse tipo de doença incluem doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington. Muitas evidências sugerem que a mitocôndria tem um papel muito importante no desenvolvimento dessas doenças, já que exercem uma função na regulação de morte celular, têm um papel fundamental no envelhecimento e interagem com muitas das proteínas envolvidas em doenças neurodegenerativas (Lin e Beal, 2006). A excitotoxicidade promovida por glutamato também apresenta um efeito proeminente em muitas desordens neurológicas (Dawson e Dawson, 1998; Lynch e Guttman, 2002).

Sabe-se que agonistas de mitoK_{ATP} reduzem os danos cerebrais isquêmicos e morte neuronal excitotóxica *in vitro* (Abele e Miller, 1990; Liu et al., 2002, 2003; Nagy et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006). Neste trabalho, demonstramos que a abertura de mitoK_{ATP} por DZX previne eficientemente morte de células granulosas de cerebelo, promovida por excitotoxicidade induzida pela ativação direta de receptores NMDA. Esta proteção foi revertida pelo uso do antagonista do canal, 5-HD. Nesses resultados, observou-se uma alta porcentagem de morte celular do grupo tratado com 5-HD e NMDA que pode ser explicada provavelmente por um efeito tóxico do antagonista do canal (Hanley et al., 2005), demonstrado em mitocôndrias isoladas e em células.

Paralelamente ao efeito protetor do DZX, demonstramos uma diminuição nos níveis de ROS intracelular, conforme indicado pela diminuição da fluorescência de DCF. Esses resultados corroboram dados encontrados por Nagy e colaboradores (2004) sugerindo que DZX protege contra estresse oxidativo induzido por glutamato em neurônios corticais de ratos. Porém, os dados obtidos em cultura de células, apesar da significância estatística, apresentaram erros consideravelmente grandes. Ainda, a sonda utilizada para marcar a geração de ROS intracelular, o DCF, apesar de ser amplamente utilizada como um indicador de ROS, apresenta muitos artefatos: além de

não apresentar especificidade a algum tipo de ROS, pode ser auto-oxidada ou interagir com o próprio DZX, atrapalhando as conclusões (Facundo et al., 2006b). Embora esta sonda não seja seletiva e não responda linearmente aos níveis de ROS gerados, pode ser aplicada em estudos qualitativos, indicando a liberação de ROS em função do tempo (LeBel et al., 1992). Assim, mesmo não podendo concluir com estes resultados encontrados, observamos um indício da redução na formação de ROS em consequência da atividade de mitoK_{ATP}. Logo, decidimos investigar por outros métodos os efeitos de mitoK_{ATP}.

Já que o método utilizado para detecção de ROS intracelular é muito controverso, investigamos se mitoK_{ATP} poderia afetar diretamente a liberação de ROS em cérebro através de experimentos feitos em mitocôndrias isoladas. Medimos a geração de H₂O₂ utilizando uma mistura de substratos fisiológicos relevantes, como piruvato, glutamato, succinato e malato e uma sonda mais específica (Amplex Red). Nessas condições, a liberação de H₂O₂ foi parcialmente inibida por rotenona, sugerindo que a maior fonte de ROS é a atividade de fluxo reverso de elétrons proveniente da passagem para o Complexo II para o I (Turrens, 2003). A liberação de ROS foi quase totalmente abolida pela adição de um desacoplador, CCCP, que fortemente inibe a formação de ROS via fluxo reverso de elétrons e previne a geração de ROS proveniente de outros níveis da cadeia de transporte de elétrons, como o ciclo da coenzima Q (Skulachev, 1997; Korshunov et al., 1997; Kowaltowski e Vercesi, 1999; Turrens, 2003). Interessantemente, a liberação de ROS mitocondrial foi também reduzida significativamente quando adicionado DZX. Neste caso, não utilizamos o antagonista de mitoK_{ATP}, 5-HD, pois verificamos que 5-HD inibe inchamento mitocondrial em cérebro na presença de ATP, uma condição em que o canal não está ativo. Isso sugere que 5-HD exerce algum efeito que não está relacionado à inibição de mitoK_{ATP} em mitocôndrias isoladas de cérebro (Hanley et al., 2005). Entretanto, para confirmar se os efeitos observados era devido à ação de mitoK_{ATP}, conduzimos experimentos na ausência de K⁺ e não observamos o mesmo resultado. Assim, demonstramos que a abertura de mitoK_{ATP} inibe a formação de ROS mitocondrial.

Em condições de hiperestimulação de receptores NMDA, como por exemplo, em situações isquêmicas, uma das razões que levam a morte neuronal é o massivo aumento da captação de Ca^{2+} pela mitocôndria (Budd e Nicholls, 1996; Castilho et al., 1999). Além disso, dados sugerem que o acúmulo de ROS e morte celular podem ser prevenidos em excitotoxicidade apenas inibindo a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria (Castilho et al., 1999). Em preparações de mitocôndrias isoladas de cérebro, ativamos o canal através do DZX e inibimos com ATP ou ADP, ambos inibidores fisiológicos do canal, para medir a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria. Observa-se um acúmulo de Ca^{2+} parcialmente limitado na presença de ADP. Isso pode ser devido à ocorrência de transição de permeabilidade mitocondrial, visto que ao adicionarmos ciclosporina A essa captação aumenta. Entretanto, a ativação do canal por DZX não altera significativamente a captação, capacidade total ou retenção de Ca^{2+} pela mitocôndria cerebral tanto na presença de ATP quanto ADP. Assim, este resultado sugere que provavelmente não é por alterar a capacidade de reter Ca^{2+} que a atividade de mitoK_{ATP} protege contra morte celular excitotóxica, mas sim, reduzindo a geração de ROS.

Esses resultados corroboram outros achados do nosso laboratório em tecidos cardíaco e hepático (Ferranti et al., 2003; Facundo et al., 2006a, 2007), mas diferem de resultados encontrados pelo grupo do Prof. Garlid, que propõe que a atividade desses canais aumenta a liberação de ROS mitocondrial (Andrukhiv et al., 2006). Um dos fatores que pode explicar essa discrepância de resultados é o uso de diclorodihidrofluoresceína na matriz mitocondrial para medir a geração de ROS. Sabe-se que essa sonda, além de não ser específica e ter muitos artefatos (Bonini et al., 2006), ela é sensível a mudanças no pH, gerando um aumento da fluorescência em meios mais básicos (Wrona e Wardman, 2006). A abertura de mitoK_{ATP} leva a uma alcalinização da matriz mitocondrial de mais de uma unidade de pH (Andrukhiv et al., 2006). Logo, este aumento da fluorescência da sonda pode ser explicado apenas pela alcalinização da matriz e não pelo aumento de ROS (Facundo et al., 2007).

Observamos, então, que canais de K^+ mitocondriais em cérebro podem afetar o balanço redox celular e mitocondrial. A partir destes resultados, exploramos as propriedades regulatórias de óxido-redução desses canais e, também, verificamos se o

estado redox poderia determinar a atividade de mitoK_{ATP} em cérebro. MitoK_{ATP} cardíacos são ativados por oxidantes e inibidos por redutantes tiólicos (Zhang et al., 2001; Facundo et al., 2007). Desta maneira, medimos a captação de K⁺ através da técnica de inchamento em mitocôndrias isoladas de cérebro. Sabe-se que a captação de K⁺ via canais de K⁺ é acompanhada de um influxo de íons fosfato e água, promovendo um aumento no volume da matriz mitocondrial e em consequência, uma redução no espalhamento de luz de mitocôndrias em suspensão (Kowaltowski et al., 2001).

Mitocôndrias incubadas na ausência de ATP apresentaram uma grande redução no espalhamento de luz quando comparadas a mitocôndrias com mitoK_{ATP} inibido pela adição de ATP. Este efeito inibitório não foi observado em mitocôndrias incubadas em meio sem K⁺. Como esperado, DZX completamente reverteu o efeito do ATP em meio com K⁺, resultando em um inchamento similar ao controle. Interessantemente, a adição de um redutor tiólico, MPG, preveniu o efeito do DZX, mas não modificou as taxas de inchamento na presença de ATP sozinho. Isso sugere que redutores tiólicos previnem a atividade de mitoK_{ATP} de maneira similar a observada em coração, interferindo na propriedade do DZX em ativar o fluxo de K⁺ via mitoK_{ATP} (Zhang et al., 2001; Facundo et al., 2006b, 2007). Este resultado corrobora dados na literatura que sugerem a ativação de canais de K⁺ mitocondriais é inibida por redução e ativado por oxidação de grupamentos tiólicos em prováveis cisteínas presentes na sua estrutura (Szewczyk et al., 1999; Zhang et al., 2001; Facundo et al., 2007).

Assim, investigamos se a oxidação poderia aumentar a atividade de mitoK_{ATP} cerebral. Para isso, estabelecemos condições nas quais as mitocôndrias apresentassem diferentes taxas de liberação de ROS resultante da energização com diferentes substratos. Mitocôndrias na presença de substratos ligados a NADH, como malato + glutamato, geraram baixos níveis de H₂O₂ em relação a mitocôndrias energizadas com succinato. Essa liberação maior de ROS na presença de succinato ocorre em decorrência ao fluxo reverso de elétrons, visto que na presença de rotenona esta geração é relevantemente revertida. Dessa forma, a atividade de mitoK_{ATP} foi

determinada em três condições (malato + glutamato, succinato, succinato + rotenona) através da medida do potencial de membrana mitocondrial.

Mitocôndrias isoladas de cérebro foram incubadas na presença de ATP ou na presença de ATP + DZX. Quando energizadas com malato + glutamato, as mitocôndrias não apresentaram alterações no potencial de membrana mitocondrial entre a situação controle e com DZX. Este resultado é compatível com medidas em mitocôndrias de coração, nas quais mudanças no $\Delta\Psi$ promovidas pela ativação de canais de K^+ são muito baixas para serem detectadas devido ao transporte limitado por estes canais (Kowaltowski et al., 2001). Interessantemente, quando medimos o $\Delta\Psi$ utilizando succinato como substrato, uma condição na qual a geração de ROS mitocondrial foi bem maior, DZX promoveu uma diminuição estatisticamente significativa no $\Delta\Psi$. A adição de rotenona reduziu esta diferença nas mudanças do $\Delta\Psi$. Interessantemente, sabe-se que mudanças no potencial de membrana alteram a fosforilação oxidativa, então, como um resultado da ativação de mitoK_{ATP}, deveríamos ter visto, paralelamente a diminuição do $\Delta\Psi$, um aumento da respiração. Porém, não observamos alterações na fosforilação oxidativa, sugerindo que o desacoplamento provocado pela ativação desses canais pode ser pequeno, por isso, difícil de ser detectado pela respiração. Foram conduzidos experimentos na presença de succinato como substrato, porém, trocando os íons K^+ do meio de reação por Na^+ . Não foram encontradas alterações no $\Delta\Psi$ quando adicionado DZX.

Deste modo, a diminuição no $\Delta\Psi$ nessas condições foi atribuída à atividade de mitoK_{ATP}. Estes resultados sugerem fortemente que a atividade desses canais é maior em situações de alta geração de ROS. Porém, experimentos feitos na presença da enzima catalase, mostraram que o potencial de membrana ainda diminui quando adicionado DZX. Concluímos, assim, que a ativação do mitoK_{ATP} neste caso, não depende diretamente de H_2O_2 , que é removido pela catalase, mas possivelmente pode estar associada à atividade de outras espécies oxidantes. Zhang et al. (2001) demonstrou que o canal poderia ser ativado por superóxido quando reconstituído e purificado. Dados de experimentos feitos recentemente pelo nosso laboratório em mitocôndrias isoladas de coração de rato demonstram claramente a ativação de

mitoK_{ATP} por superóxido através de xantina/xantina oxidase. Outros resultados suportam a hipótese de que óxido nítrico também poderia ativar diretamente esses canais (Queliconi, dados não publicados).

Infelizmente, a medida do $\Delta\Psi$ representa um método de quantificação indireta da atividade de transporte de K⁺ e, portanto, apresenta erros experimentais substanciais. Nota-se nos resultados que os níveis basais do $\Delta\Psi$ com os diferentes substratos são diferentes e possivelmente o transporte de K⁺ também pode variar. Para investigar mais diretamente, então, se ROS mitocondrial poderia ativar canais de K⁺ mitocondriais em cérebro, foram feitos experimentos utilizando a técnica de espalhamento de luz. Assim, a captação de K⁺ foi acompanhada na presença de succinato sozinho, ou com rotenona. Nestas condições, apesar da ausência de diferenças nos níveis basais do $\Delta\Psi$, foi demonstrado que a liberação de ROS é diferente: na presença de rotenona a geração de ROS é significativamente menor. O inchamento mitocondrial promovido por succinato sozinho foi reduzido quando adicionado rotenona. A adição de H₂O₂ exógeno reverteu completamente essas baixas taxas de inchamento de modo inibido por catalase. Porém, não foi observado o aumento do inchamento em presença de H₂O₂ exógeno e ATP. Resultados encontrados por Facundo et al. (2007) mostraram que na presença de baixas doses de ATP, ou seja, doses que afetam apenas uma das subunidades do canal, a mitoSUR (sabe-se que altas concentrações de ATP, ambas as subunidades do canal são inibidas), a adição de H₂O₂ reverte esta inibição, sugerindo que a regulação redox deste canal deve ocorrer na mitoSUR e a mitoKIR apenas transportaria K⁺. Esse resultado corrobora o modelo proposto por Mironova et al. (2004) que o mitoK_{ATP} apresenta uma subunidade que transporta K⁺ (mitoKIR), denominada retificadora e outra sensível a sulfoniluréias (mitoSUR), denominada receptora de sulfoniluréias. Esses efeitos foram diretamente atribuídos a mudanças no transporte de K⁺ visto que na presença de meio com Na⁺ não foram observados.

Em contrapartida, a atividade de mitoK_{ATP} em mitocôndria isolada de cérebro vem sendo recentemente questionada (Brustovetsky et al., 2005), com base em experimentos usando mitocôndrias não sinaptossomais isoladas através de um gradiente de percoll. Essa ausência de atividade pode ser explicada pelas diferentes

populações mitocondriais utilizada por este grupo e a nossa. A nossa preparação inclui ambas as populações de mitocôndria, sinaptossomais e não sinaptossomais, semelhante às utilizadas por outros grupos (Bajgar et al., 2001; Brown et al., 2006). Além disso, a atividade desses canais é ideal em mitocôndrias frescas (imediatamente após o isolamento) e diminui com o passar do tempo. Também, o tempo do nosso isolamento é de aproximadamente 45 minutos. O isolamento pelo gradiente de percoll demora cerca de 2 horas. Então, é possível que o tempo de isolamento leva a uma inativação do canal, ou ainda, que a população de mitocôndrias cuja atividade do canal é notória seja a sinaptossomal.

Assim, foram feitos experimentos com as frações mitocondriais separadamente, obtidas a partir da técnica do gradiente de percoll. Nós verificamos uma atividade de mitoK_{ATP} maior em mitocôndrias sinaptossomais. Porém, os resultados não foram sempre reprodutíveis, deixando a dúvida se realmente em mitocôndrias sinápticas a atividade de mitoK_{ATP} é maior, ou se a quantidade de proteína de cada fração isolada é muito pequena para evidenciar a atividade destes canais, visto que em algumas preparações observamos a ativação por DZX na população não sináptica. Fizemos também uma marcação com glibeclamida marcada (BODIPY-FL-glibenclamida), que se liga a receptores de sulfoniluréias, então, que se liga a mitoSUR. As frações apresentaram uma pequena diferença na fluorescência, mas não suficiente para explicar a ausência de atividade em mitocôndrias não sinaptossomais. Assim, não podemos afirmar certamente que a fração sinaptossomal possui maior atividade de mitoK_{ATP} ou maior quantidade de canais. Outros estudos serão necessários para que se esclareça esta discrepância de resultados.

Juntos, nossos resultados demonstram que canais de K⁺ mitocondriais de cérebro são ativos por ROS endógeno e exógeno, o que resulta na captação de K⁺, diminuição no $\Delta\Psi$ e, em consequência, um aumento do volume da matriz mitocondrial (Figura 24).

Figura 24. Regulação e efeitos redox de mitoK_{ATP} em cérebro. O estado redox de mitoK_{ATP} determina sua atividade: redutores inibem e oxidantes ativam o transporte de K^+ . Quando ativos, estes canais levam a uma captação de K^+ para a matriz mitocondrial e uma pequena diminuição no potencial de membrana. Como resultado, a liberação de ROS diminui em comparação a condições e que mitoK_{ATP} encontram-se fechados.

A natureza exata da regulação de oxidação e redução em mitoK_{ATP} cerebrais ainda não fica clara neste trabalho, mas pode ser especulada tomando como base dados da literatura. A mitocôndria apresenta muitos componentes sensíveis a oxido-redução, incluindo um *pool* de glutatona, NAD(P)H e coenzima Q, que podem participar na regulação do mitoK_{ATP}. Entretanto, estudos em mitocôndrias isoladas e canais de K^+ mitocondriais de coração reconstituídos indicam que o canal mantém uma resposta a reagentes tiólicos e ROS (Grigoriev et al., 1999; Zhang et al., 2001). Este resultado é compatível ao fato de canais de K^+ da membrana plasmática apresentam regulação por grupos tiólicos (Islam et al., 1993).

Tentamos reproduzir o modelo de excitotoxicidade promovido pela ativação de receptores NMDA *in vivo*. Administramos ácido quinolínico intra-estriatal e tratamos posteriormente os animais com DZX aplicado diretamente no ventrículo cerebral por 3

dias. Conseguimos estabelecer a posição e o tamanho da lesão promovida pelo AQ. Porém, nossos experimentos foram dotados de insucessos em decorrência da propriedade antioxidante do veículo do DZX, o DMSO. Assim, não foi possível verificar se *in vivo* os canais de K^+ também conseguem reduzir os danos promovidos por excitotoxicidade conforme verificado em células granulosas de cerebelo.

Em uma outra tentativa de reproduzir um modelo de doença neurodegenerativa para investigar os efeitos de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, tentamos reproduzir o modelo de acidose metilmalônica, que afeta principalmente os tecidos cerebrais. Acredita-se que os danos decorrentes da acidose metilmalônica são devido a uma deficiência no metabolismo energético, semelhante às condições de isquemia química ou metabólica (Brusque et al., 2002). Sendo assim, este modelo se encaixaria perfeitamente neste estudo, visto que demonstramos efeitos em excitotoxicidade, uma consequência direta de um evento isquêmico cerebral. Mas, infelizmente, não conseguimos demonstrar nenhum efeito benéfico nem em cultura de células granulosas de cerebelo nem em mitocôndrias isoladas. Apenas concluímos que $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ não está diretamente relacionado à prevenção de TPM, mas pode melhorar os níveis energéticos do tecido ao prevenir a hidrólise de ATP tecidual, visto que DZX não diminui a captação de Ca^{2+} (Kowaltowski et al., 2006).

Tendo em vista que a abertura do $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ leva a um leve desacoplamento e que desacopladores exercem efeitos benéficos em modelos de envelhecimento, tanto em mamíferos quanto em leveduras (Barros et al., 2004), avaliamos o efeito da abertura do $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ sob a senescência de neurônios em cultura. Porém, apesar de uma pequena evidência da participação desses canais no retardamento da morte celular, os erros experimentais foram grandes e, por isso, não podemos afirmar com certeza que a ativação de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ previne o envelhecimento celular.

6. CONCLUSÃO

Nesta tese, abordamos alguns aspectos importantes para entender o papel de canais de K^+ mitocondriais em tecido cerebral.

Demonstramos que $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ têm um papel importante na proteção contra danos promovidos por excitotoxicidade NMDA-induzida. Verificamos que esta proteção é devido a uma redução na geração de espécies reativas de oxigênio e não na alteração da captação de Ca^{2+} .

Nossos resultados sugerem que $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ apresentam um efeito redox muito relevante em cérebro. A ativação desses canais é capaz de prevenir geração de ROS, prevenindo estresse oxidativo e morte neuronal.

Evidenciamos a participação de ROS na ativação desses canais. A atividade de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ pôde ser inibida por redutores tiólicos.

A atividade de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ parece ser maior em mitocôndrias proveniente dos sinaptossomos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abele AE, Miller RJ (1990) Potassium channel activators abolish excitotoxicity in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Neurosci Lett.* 115: 195-200.
- Akerman KE, Wikstrom MK (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68: 191-197.
- Albin RL, Greenamyre JT (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology.* 42: 733-738.
- 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 USA.* 101: 11880-11885.
- Atlante A, Gagliardi S, Minervini GM, Ciotti MT, Marra E, Calissano P (1997) Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells: a major role for xanthine oxidase in oxygen species. *Neurosci Lett.* 68: 2038-2045.
- Auer, RN, Olsson Y, Siesjo BK (1984) Hypoglycemia brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG isoelectric time: a quantitative study. *Diabetes.* 33: 1090-1098.

- Augusto O, Lopes de Menezes S, Linares E, Romero N, Radi R, Denicola A (2002) EPR detection of glutathyl and hemoglobin-cysteinyl radicals during the interaction of peroxynitrite with human erythrocytes. *Biochemistry* 48: 14323-14328.
- 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.
- 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.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman B (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci.* 13: 4181-4192.
- Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: The good, the bad and the ugly. *Am J Physiol.* 271: C1424-C1437.
- Bednarczyk P, Barker GD, Halestrap AP (2008) determination of the rate of K⁺ movement through potassium channels in isolated rat heart and liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* (in press).
- Belisle E, Kowaltowski AJ (2002) Opening of mitochondrial K⁺ channels increases ischemic ATP levels by preventing hydrolysis. *J Bioenerg Biomembr.* 34: 285-98.
- Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci.* 16: 1324-1336.
- Binienda Z, Simmons C, Hussain S, Slikker Jr W, Ali SF (1998) Effect of acute exposure to 3-nitropropionic acid on activities of endogenous anti-oxidants in the rat brain. *Neurosci Lett.* 251: 173-176.
- Bonini MG, Rota C, Tomasi A, Mason RP (2006) The oxidation of 2'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? *Free Radic Biol Med.* 40: 968-975.
- Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134: 707-716.

- Brandt R, Keston AS (1965) Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: A stable reagent for fluorimetric analysis. *Anal Biochem.* 11: 6-9.
- Brown MR, Sullivan PG, Geddes JW (2006) Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca^{2+} overload than nonsynaptic mitochondria. *J Biol Chem.* 281: 11658-11668.
- Brusque AM, Rotta LN, Tavares RG, Emanuelli T, Schwarzbald CV, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse AT, Duval Wannmacher CM, Gomes de Souza DO, Wajner M (2001) Effects of methylmalonic and propionic acids on glutamate uptake by synaptosomes and synaptic vesicles and on glutamate release by synaptosomes from cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 920: 194-201.
- Brusque AM, Borba Rosa R, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CA, Silva CG, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Briones P, Wajner M (2002) Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 40: 593-601.
- Brustovetsky T, Shalbuyeva N, Brustovetsky N (2005) Lack of manifestations of diazoxide/5-hydroxydecanoate-sensitive K_{ATP} channel in rat brain nonsynaptosomal mitochondria. *J Physiol.* 568: 47-59.
- Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milson AB, Rassaf T, Maloney RE, Bharti A, Rodriguez J, Feelich M (2005). Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol.* 5: 235-297.
- Budd SL, Nicholls DG (1996) Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 67: 2282-2291.
- Bunik VL, Sievers C (2002) Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species. *Eur J Biochem.* 269: 5004-5015.
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Sancesario G, Gubellini P, Marfia GA, Bernardi G (1998) Striatal spiny neurons and cholinergic interneurons express differential ionotropic glutamatergic responses and vulnerability: implications for ischemia and Huntington's disease. *Ann Neurol.* 43: 586-597.
- Calabresi P, Gubellini P, Picconi B, Centonze D, Pisani A, Bonsi P, Greengard P, Hipskind RA, Borelli E, Bernardi G (2001) Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J Neurosci.* 21: 5110-5120.

- 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.
- Castilho RF, Hansson O, Ward MW, Budd SL, Nicholls DG (1998) Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci.* 24: 10277-10286.
- Castilho RF, Ward MW, Nicholls DG (1999) Oxidative stress, mitochondrial function, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 72: 1394-1401.
- Chan PC, Bielski BH (1974) Enzyme-catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotides. II. Lactate dehydrogenase-catalyzed oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by superoxide radicals generated by xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 249: 1317-1319.
- Chan PC, Bielski BH (1980) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-catalyzed chain oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by perhydroxyl radicals. *J Biol Chem.* 255: 874-876.
- Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7: 369-379.
- Choi DW (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol.* 6: 667-672.
- Coulombe JT, Shih VE, Levy HL (1981) Massachusetts metabolic disorders screening program. II. Methylmalonic aciduria. *Pediatrics.* 67: 26-31.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 262: 689-695.
- Crompton MR (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 341: 233-249.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell.* 116: 205-219.
- 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.* 574: 893-902.
- Dawson VL, Dawson TM (1998) Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog Brain Res.* 118: 215-229.

- Debska G, May R, Kicinska A, Szewczyk A, Elger CE, Kunz WS (2001) Potassium channel openers depolarize hippocampal mitochondria. *Brain Res.* 892: 42-50.
- 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.
- De Baulny HO, Benoist JF, Rigal O, Touati G, Rabier D, Saudubray JM (2005) Methylmalonic and propionic acidemias: management and outcome. *J Inherit Metab Dis* 28: 415-423.
- 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, Garlid KD (2002) Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP- sensitive K⁺ channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283: H284-295.
- Dubinsky JM, Brustovetsky N, LaFrance R (2004) Protective Roles of CNS Mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 36: 299-302.
- Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LMT, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW (1995) Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to NMDA. *J Neurosci.* 15: 6377-6388.
- Dutra JC, Dutra-Filho CS, Cardozo SE, Wannmacher CM, Sarkis JJ, Wajner M (1993) Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. *J Inherit. Metab Dis.* 16: 147-153.
- 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.
- Facundo HT, 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 HTF, 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 Pathway that Control Reactive Oxygen Species Production. *Free Radic Biol Med.* 42: 1039-1048.
- Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS (2001) Disorders of propionate and methylmalonate metabolism, In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle AD, Sly WS. The metabolic and molecular basis of the inherited disease. McGraw-Hill, 8 ed, 24: 2165-2193.
- Ferranti R, da Silva MM, Kowaltowski AJ (2003) Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening decreases reactive oxygen species generation. *FEBS Lett* 536: 51-5.
- Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E (2001) Oxygen free radical signaling in ischemic preconditioning. *Circ Res.* 88: 802-809.
- Fiskum G, Murphy AN, Beal MF (1999) Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 351-369.
- Fleck J, Ribeiro MC, Schneider CM, Sinhorin VD, Rubin MA, Mello CF (2004) Intrastriatal malonate administration induces convulsive behaviour in rats. *J Inherit Metab Dis.* 27: 211-219.
- Fontella F, Pulronick V, Gassen E, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho, CS (2000) Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport.* 28: 541-544.
- Fornazari MF, de Paula JG, Castilho RF, Kowaltowski AJ (2008) Redox properties of the adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel in brain mitochondria. *J Neurosci Res.* 86: 1548-1556.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64: 97-112.

- Garlid KD (1978) Unmasking the mitochondrial K/H exchanger: swelling-induced K⁺-loss. *Biochem Biophys Res Commun.* 83: 1450-1455.
- Garlid KD (1979) Unmasking the mitochondrial K/H exchanger: tetraethylammonium-induced K⁺-loss. *Biochem Biophys Res Commun.* 87: 842-847.
- Garlid KD (1980) On the mechanism of regulation of the mitochondrial K⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem.* 255: 11273-11279.
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA (1996) The mitochondrial K_{ATP} channel 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.
- Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta.* 1606: 1-21.
- Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 57: 683-706.
- Gunter KK, Gunter TE (1994) Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 26: 471-485.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
- Greene JG, Greenamyre JT (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol.* 48: 613-634.
- Grigoriev SM, Skarga YY, Mironova GD, Marinov BS (1999) Regulation of mitochondrial K_{ATP} channel by redox agents. *Biochim Biophys Acta.* 1410: 91-96.

- Grover GJ, Burkett DE, Parham CS, Scalese RJ, Sadanaga KK (2003) Protective effect of mitochondrial K_{ATP} activation in an isolated gracilis model of ischemia and reperfusion in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 42: 790-792.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine (3rd ed): Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hanley PJ, Mickel M, Löffler M, Brandt U, Daut J (2002) K_{ATP} channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. *J Physiol.* 542: 735-741.
- 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 J (2005) 5-Hydroxydecanoate is metabolised in mitochondria and creates a rate-limiting bottleneck for beta-oxidation of fatty acids. *J Physiol.* 562: 307-318.
- Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, Duchene MR (2004) Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287: H841-H849.
- Heurteaux C, Bertina V, Widmann C, Lazdunski M (1995) K⁺ channel openers prevent global ischemia-induced expression of c-fos, c-jun, heat shock protein, and amyloid β -protein precursor genes and neuronal death in rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci.* 90: 9431-9435.
- Hoffmann GF, Meier-Augenstein W, Stockler S, Surtees R, Rating D, Nyhan WL (1993) Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J Inher Metab Dis* 16: 648-669.
- Hoffmann GF, Gibson KM, Trefz FK, Nyhan WL, Bremer HJ, Rating D (1994) Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur J Pediatr* 153: S94-S100.
- Hunter DR, Haworth RA (1979) The Ca²⁺-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.
- Islam MS, Berggren PO, Larsson O (1993) Sulfhydryl oxidation induces rapid and reversible closure of the ATP-regulated K^+ channel in the pancreatic beta-cell. *FEBS Lett*. 319: 128-132.
- 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.
- Keston AS, Brandt R (1965) The fluorimetric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem*. 11: 1-5.
- Korde AS, Pettigrew LC, Craddock SD, Maragos WF (2005) The Mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem*. 94: 1676-1684.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 416: 15-18.
- 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, Smaili SS, Russel JT, Fiskum G (2000) Elevation of resting mitochondrial membrane potential of neural cells by cyclosporin A, BAPTA-AM, and Bcl-2. *Am J Physiol: Cell Physiol*. 279: C852-C859.
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE (2001) in: Mitochondria in pathogenesis (Lemasters JJ e Nieminen AL. Eds), pp. 281-300, Plenum Publishing Corporation, New York.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (2001) 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.
- Kowaltowski AJ, Maciel EN, Fornazari M, Castilho RF (2006) Diazoxide protects against methylmalonate-induced neuronal toxicity. *Exp Neurol.* 201: 165-171.
- 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.
- Lafon Cazal M, Pietri S, Culcasi M (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature.* 6437: 535-537.
- Le-Bel 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.
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399: A7-A14.
- Leist M, Nicotera P (1998) Calcium and neuronal death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 132: 79-125.
- Lenzser G, Kis B, Bari F, Busija DW (2005) Diazoxide preconditioning attenuates global cerebral ischemia-induced blood-brain barrier permeability. *Brain Res.* 1051: 72-80.
- Lim KH, Javadov SA, Das M, Clarke SJ, Suleiman MS, Halestrap AP (2002) The effects of ischaemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration. *J Physiol.* 545: 961-974.
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443: 787-795.
- Liu D, Lu C, Wan R, Auyeung WW, Mattson MP (2002) Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22: 431-443.

- Liu D, Slevin JR, Lu C, Chan SL, Hansson M, Elmer E, Mattson MP (2003) Involvement of mitochondrial K^+ release and cellular efflux in ischemic and apoptotic neuronal death. *J Neurochem.* 86: 966-979.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*. *Cell.* 86: 147-157.
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 80: 780-787.
- Ljunggren B, Schutz H, Siesjö BK (1974) Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischaemia. *Brain Res.* 73: 277-289.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Luetjens CM, Bui NT, Segpiel B, Munstermann G, Poppe M, Krohn AJ, Bauerbach E, Krieglstein J, Prehn JH (2000) Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome *c* release and a secondary increase in superoxide production. *J Neurosci.* 20: 5715-5723.
- Maciel EN, Kowaltowski AJ, Schwalm FD, Rodrigues JM, Souza DO, Vercesi AE, Wajner M, Castilho RF (2004) Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca^{2+} and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem.* 90: 1025-1035.
- Marisco PC, Ribeiro MC, Bonini JS, Lima TT, Mann KC, Brenner GM, Dutra-Filho CS, Mello CF (2003) Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. *Exp Neurol.* 182: 455-460.
- Martin WH, Beavis AD, Garlid KD (1984) Identification of an 82000-dalton protein responsible for K^+/H^+ antiport in rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 259: 2062-2065.
- McBride JM, Kraemer WJ (1999) Free radicals, exercise and antioxidants. *J Strength Cond Res.* 13: 175-183.
- McLaughlin BA, Nelson D, Silver IA, Erecinska M, Chesselet MF (1998) Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience.* 86: 279-290.

- 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.
- Mitchell P (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 41: 445-502.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 65: 55-63.
- 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.
- Nagy K, Kis B, Rajapakse NC, Bari F, Busija DW (2004) Diazoxide preconditioning protects against neuronal cell death by attenuation of oxidative stress upon glutamate stimulation. *J Neurosci Res*. 76: 697-704.
- Nakagawa I, Alessandri B, Heimann A, Kempinski O (2005) MitoK_{ATP} channel opener protects against neuronal death in rat venous ischemia. *Neurosurgery*. 57: 334-340.
- Narasimhan P, Sklar R, Murrel M, Swanson RA, Sharp FR (1996) Methylmalonyl-CoA mutase induction by cerebral ischemia and neurotoxicity of the mitochondrial toxin methylmalonic acid. *J Neurosci*. 16: 7336-7346.
- Nicholls DG (1985) A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog Br Res*. 63: 97-106.
- Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*. 80: 315-360.
- Nicholls DG. (2002) Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1372-1381.

- Nieminen AL, Petrie TG, Lemasters JJ, Selman WR (1996) Cyclosporin a delays mitochondrial depolarization induced by N-methyl D-aspartate in cortical neurons: evidence of the mitochondrial permeability transition. *Neuroscience*. 75: 993-997.
- Nordstrom CH, Siesjo BK (1978) Effects of Phenobarbital in cerebral ischaemia. Part I: cerebral energy metabolism during pronounced incomplete ischaemia. *Stroke*. 9: 327-335.
- Nyhan WL (1998) Methylmalonic acidemia. Atlas of Metabolic Diseases. Chapman and Hall Medical, London, pp. 13-23.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*. 276: 38388-38393.
- Orrenius S, Ankarcrona M, Nicotera P (1996) Mechanisms of calcium-related cell death. *Adv Neurol*. 71: 137-149.
- 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.
- 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.
- Pettenuzzo LF, Ferreira GC, Schmidt AL, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M (2006) Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Int J Devl Neuroscience*. 24: 45-52.
- Reshef A, Sperling O, Zoref-Shani E (1998) Opening of ATP-sensitive potassium channels by cromakalim confers tolerance against chemical ischemia in rat neuronal cultures. *Neurosci Lett*. 250: 111-114.

- Reynolds IJ, Hasting TG (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 15: 3318-3327.
- Rostovtseva T, Colombini M (1996) ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem.* 271: 28006-28008.
- Rostovtseva T, Colombini M (1997) VDAC channels mediate and gate the flux of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J.* 72: 1954-1962.
- 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.
- Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol.* 19: 105-111.
- Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, da Silva LG, Malfatti CR, Schneider PH, Braga AL, Wajner M, Mello CF (2003) Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience.* 118: 1079-1090.
- Saks VA, Vasil'eva E, Belikova Yu O, Kuznetsov AV, Lyapina S, Petrova L, Perov NA (1993) Retarded diffusion of ADP in cardiomyocytes: possible role of mitochondrial outer membrane and creatine kinase in cellular regulation of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 1144: 134-148.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L (2005) Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.* 1035: 24-31.
- Schneider AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M (1996) Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate excitotoxicity. *J Neurosci.* 16: 6125-6133.
- Sengpiel B, Preis E, Kriegstein J, Prehn JHM (1998) NMDA- induced superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: role of mitochondria. *Eur J Neurosci.* 10: 1903-1910.
- Shimizu K, Lacza Z, Rajapakse N, Horiguchi T, Snipes J, Busija DW (2002) MitoK_{ATP} opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Physiol.* 283: H1005-H1011.

- Siesjo BK (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischaemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg.* 77: 169-184.
- Sims NR (1990) Rapid Isolation of Metabolically Active Mitochondria from Rat Brain and Subregions Using Percoll Density Gradient Centrifugation. *J Neurochem.* 55: 698-707.
- Skulachev VP (1996) Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quart Rev Biophys.* 29: 169-202.
- Skulachev VP (1997) Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Biosci Rep.* 17: 347-366.
- 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.* 24: 7779-7788.
- 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.
- Takashi E, Wang Y, Ashraf M (1999) Activation of mitochondrial K_{ATP} channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res.* 85: 1146-1153.
- Thiyagarajan M, Kaul CL, Sharma SS (2004) Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxynitrite decomposition catalysts in focal cerebral ischemia in rats. *British J Pharmacol.* 142: 899-911.
- Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Miyatake K, Nakano Y (1995) Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *J Nutr.* 125: 2846-2850.
- Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep.* 17: 3-8.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552: 335-344.
- 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.
- Wajner M, Dutra JC, Cardozo SE, Wannmacher CMD, Motta ER (1992) Effect of methylmalonate on in vivo lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. *J Inherit Metab Dis.* 15: 92-96.
- Wajner M, Coelho JC (1997) Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *J Inherit Metab Dis.* 20: 761-768.
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC (1999) Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science.* 284: 339-343.
- Wrona M, Wardman P (2006) Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2'7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 41: 657-667.
- 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.
- Zhang J, Snyder SH (1995) Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35: 213-233.
- 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.
- Zoratti M, Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 1241: 139-176.