

*LUCIANE CARLA ALBERICI*

**CAMUNDONGOS HIPERLIPIDÊMICOS TRANSGÊNICOS  
PARA A APOLIPOPROTEÍNA-CIII TEM AUMENTO DE  
CATABOLISMO CORPORAL E ATIVIDADE DO CANAL  
MITOCONDRIAL DE K<sup>+</sup> SENSÍVEL A ATP**

*CAMPINAS*

*2006*



*LUCIANE CARLA ALBERICI*

**CAMUNDONGOS HIPERLIPIDÊMICOS TRANSGÊNICOS  
PARA A APOLIPOPROTEÍNA-CIII TEM AUMENTO DE  
CATABOLISMO CORPORAL E ATIVIDADE DO CANAL  
MITOCONDRIAL DE K<sup>+</sup> SENSÍVEL A ATP**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração  
em Ciências Biomédicas.*

***ORIENTADOR: PROF. DR. ANIBAL EUGENIO VERCESI***

***CO-ORIENTADORA: PROF. DRA. HELENA C. F. OLIVEIRA***

**CAMPINAS**

**2006**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Al 14c                      Alberici, Luciane Carla  
                                    Camundongos hiperlipidêmicos transgênicos para a apolipoproteína-  
                                    CIII tem aumento de catabolismo corporal e atividade do canal  
                                    mitocondrial de K<sup>+</sup> sensível a ATP/ Luciane Carla Alberici. Campinas,  
                                    SP : [s.n.], 2006.

Orientadores : Aníbal Eugenio Vercesi, Helena Coutinho Franco de  
Oliveira

Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Metabolismo energético. 2. Mitocôndria. 3. Dislipidemia.  
4. Camundongos transgênicos. I. Vercesi, Aníbal Eugenio. II.  
Oliveira, Helena Coutinho Franco de. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Hyperlipidemic mice present enhance catabolism and  
higher mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> channel activity**

**Keywords:** • Energy Metabolism

- Mitochondria
- Dyslipidemia
- Mice transgenic

**Área de concentração : Ciências Biomédicas**

**Titulação: Doutorado em Ciências Médicas**

**Banca examinadora: Prof Dr Aníbal Eugenio Vercesi**

**Prof Dr Luis Eduardo Soares Netto**

**Prof Dr Antonio Galina Filho**

**Prof Dr Mário José Abdalla Saad**

**Prof Dr José Barreto Campello Carvalho**

**Data da defesa: 03-10-2006**

## Banca examinadora da tese de Doutorado

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Anibal E. Vercesi**

### Membros:

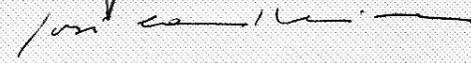
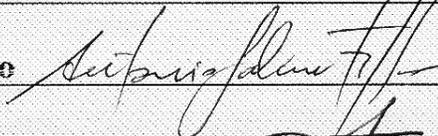
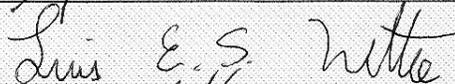
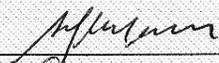
1. Prof. Dr. Anibal E. Vercesi

2. Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto

3. Prof. Dr. Antonio Galina Filho

4. Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad

5. Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira



Dr. Antonio Galina Filho  
Prof. Adjunto  
Departamento de Bioquímica  
Médica, ICB, UFRJ

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 03/10/2006**



O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob orientação do professor Dr. Anibal Eugenio Vercesi, com bolsa de doutorado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e na vigência de auxílios concedidos pela FAPESP, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP-UNICAMP).



***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais, Geraldo e Juana, com amor...*



## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao meu orientador Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi pela orientação, confiança e por proporcionar uma excelente estrutura de trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Helena C. F. Oliveira pela orientação, confiança e dedicação.

À Profa. Dra. Alicia J. Kowaltowski pela orientação nos experimentos com canais de  $K^+$  sensíveis a ATP.

À Profa. Dra. Eliana C. de Faria pela colaboração nos experimentos de suplementação de ratos com glicose.

À aluna Patrícia R. Patrício pelos experimentos de monitoramento da ingestão alimentar e ganho de peso.

Ao aluno Alessandro G. Salerno pela colaboração nos experimentos de suplementação de camundongos com dieta rica em gordura.

Ao Prof. Dr. Roger F. Castilho pelas discussões científicas, atenção e pela estrutura de trabalho adequada.

Ao Dr. Jiri Borecky pelas discussões científicas e atenção.

Às técnicas do laboratório Elisangela J. Gomes e Edilene S. S. Campos pela ajuda.

Aos amigos do laboratório de bioenergética pela colaboração e apoio.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À Denile Boer pelo companheirismo.

À minha família, Geraldo e Juana, Rosana, Carlos, Otávio e Murilo, André e Poliana, Denile e Nina, pelo amor, apoio e dedicação.

À Deus, acima de tudo.



*“Aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós,  
mas nós somos responsáveis por nós mesmos.*

*Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com  
o melhor que pode ser”.*

***SHEAKESPEARE***



	<i>Pág.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxvii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xxxi</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	35
<b>Metabolismo de lipídios</b> .....	38
<b>Via exógena de transporte de lipídios</b> .....	38
<b>Via endógena de transporte de lipídios</b> .....	39
<b>Metabolismo de AGL plasmático no fígado</b> .....	39
<b>Transporte reverso do colesterol</b> .....	40
<b>Hipertrigliceridemia</b> .....	41
<b>Camundongos transgênicos que super expressam a apolipoproteína CIII humana: um modelo para o estudo da hipertrigliceridemia</b> .....	43
<b>Bioenergética mitocondrial</b> .....	43
<b>Cadeia respiratória</b> .....	44
<b>Geração de oxigênio reativo pela mitocôndria, sistema anti-oxidante e transição de permeabilidade mitocondrial</b> .....	46
<b>Canais de K<sup>+</sup> mitocondriais sensíveis a ATP (mitoK<sub>ATP</sub>)</b> .....	48
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	51
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	55
<b>Animais</b> .....	57
<b>Determinação das concentrações plasmáticas triglicérides</b> .....	57
<b>Tratamento com insulina</b> .....	57
<b>Tratamento com dieta rica em gordura em camundongos C57Bl6</b> .....	58



Tratamento com suplementação com glicose em ratos wistar.....	58
Isolamento de linfócitos a partir de baço de camundongos.....	58
Isolamento de mitocôndrias hepáticas.....	58
Dosagem de proteína.....	59
Monitoramento do consumo de oxigênio.....	59
Tratamento com ácido 5-hidroxicanônico (5-HD) e preparação do tecido hepático.....	60
Medida de inchamento mitocondrial.....	60
Quantificação dos canais mitocondriais de K <sup>+</sup> sensíveis a ATP.....	61
Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	61
Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) por células mononucleares de baço.....	61
Análise do potencial de membrana mitocondrial em células mononucleares de baço.....	62
Determinação da taxa respiratória de camundongos <i>in vivo</i> .....	62
Medida da temperatura corporal retal.....	63
Monitoramento do ganho de peso e ingestão alimentar.....	64
Análises estatísticas.....	64
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>
<b>8- TABELAS E FIGURAS.....</b>	<b>105</b>
<b>9- ANEXO.....</b>	<b>127</b>



## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

<b>ABCA1</b>	“ATP binding cassette transporter”
<b>ADP<sup>3</sup></b>	adenosina 5-difosfato
<b>AGL</b>	ácidos graxos livres
<b>AIF</b>	fator indutor de apoptose
<b>ApoLP</b>	apolipoproteínas
<b>ATP<sup>4</sup></b>	adenosina 5-trifosfato
<b>AVC</b>	acidente vascular cerebral
<b>BAT</b>	tecido adiposo marrom (“brown adipose tissue”)
<b>BHT</b>	butil-hidroxitolueno
<b>BSA</b>	albumina de soro bovino
<b>CCCP</b>	cianeto de carbonila metaclorofenilhidrazona
<b>CE</b>	ésteres de colesterol
<b>CETP</b>	proteína de transferência de ésteres de colesterol (“cholesteryl ester transfer protein”)
<b>CL</b>	colesterol livre
<b>CoQ</b>	coenzima Q
<b>CR</b>	controle respiratório
<b>CSA</b>	ciclosporina A



<b>DiOC<sub>6</sub>(3)- 3,3'</b>	dihexiloxacarbocianeto iodina
<b>Dig</b>	digitonina
<b>DHE</b>	dihidroetídio
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>DNAmt</b>	ácido desoxirribonucléico mitocondrial
<b>EGTA</b>	etileno glico – bis (β-aminoetil éter)-N,N,N',N' – ácido tetraacético
<b>EROs</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>FADH<sub>2</sub></b>	flavina adenina dinucleotídeo (estado reduzido)
<b>GDP</b>	guanosina 5-difosfato
<b>GLY</b>	glibenclamida
<b>GTP</b>	guanosina 5-trifosfato
<b>H<sub>2</sub>-DCFDA</b>	diacetato de diclorodihidrofluoresceína
<b>HDL</b>	lipoproteína de alta densidade
<b>HEPES</b>	(N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N' –[2-ethanesulfonic acid])
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogênio
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	ácido fosfórico
<b>HTG</b>	camundongo transgênico hipertrigliceridêmico
<b>IDL</b>	lipoproteínas de densidade intermediária
<b>kDa</b>	kilodaltons



<b>LDL</b>	lipoproteína de baixa densidade
<b>LLH</b>	lipoproteína lípase hepática
<b>LP</b>	Lipoproteínas
<b>LRP</b>	“LDL receptor related protein”
<b>mitoK<sub>ATP</sub></b>	canais de K <sup>+</sup> sensíveis a ATP
<b>MME</b>	membrana mitocondrial externa
<b>MMI</b>	membrana mitocondrial interna
<b>NADH</b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)
<b>NAD(P)<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)
<b>NAD(P)H</b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
<b>NaOH</b>	hidróxido de sódio
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	anion superóxido
<b>P<sub>i</sub></b>	fosfato inorgânico
<b>PL</b>	fosfolipídios
<b>PUFA</b>	ácidos graxos polinsaturados
<b>QM</b>	quilomícrons
<b>QM-rem</b>	remanescentes de QM
<b>razão ADP/O</b>	eficiência de fosforilação



<b>RE</b>	retículo endoplasmático
<b>SRB1</b>	“scavenger receptor type B class 1”
<b>TBARS</b>	produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico
<b>TG</b>	triglicérides
<b>TNA</b>	translocador de nucleotídeos de adenina
<b>UQ</b>	coenzima Q
<b>UQH<sub>2</sub></b>	forma reduzida da CoQ
<b>UCPs</b>	proteínas desacopladoras
<b>VLDL</b>	lipoproteínas de densidade muito baixa
<b>WHO</b>	Organização Mundial da Saúde
<b><math>\Delta\psi_m</math></b>	potencial de membrana mitocondrial
<b><math>\Delta\mu H^+</math></b>	gradiente eletroquímico de prótons
<b>5-HD</b>	ácido 5-hidroxicanônico





## ***RESUMO***



*Introdução e objetivo:* Alterações no metabolismo energético mitocondrial promovidas por proteínas desacopladoras (UCPs) são frequentemente encontradas em desordens metabólicas. Recentemente demonstramos que camundongos hipertrigliceridêmicos (HTG) apresentam uma respiração mitocondrial de repouso elevada, não relacionada a UCPs. Neste trabalho, nós elucidamos o mecanismo responsável por esta elevação da respiração de repouso e demonstramos algumas conseqüências dessa resposta mitocondrial à hiperlipidemia no fígado e no metabolismo corporal total. *Resultados:* Mitocôndrias isoladas de fígados e de células mononucleares de baço de camundongos HTG apresentaram velocidades respiratórias elevadas comparadas aos camundongos controles. Mudanças no consumo de oxigênio em mitocôndrias de fígados de camundongos HTG foram sensíveis a ATP, diazóxido e ácido 5-hidroxicanônico (5-HD) indicando que o consumo pode ser atribuído à atividade dos canais de  $K^+$  sensíveis a ATP (mito $K_{ATP}$ ). Do mesmo modo, as mitocôndrias HTG apresentaram um maior inchamento na presença de íons  $K^+$ , sensível aos agonistas e antagonistas do mito $K_{ATP}$ . Além disso, a ligação de glibenclamida marcada às mitocôndrias indica que os camundongos HTG expressaram maiores quantidades de receptores de sulfoniluréias, um componente os mito $K_{ATP}$ . Aumento da velocidade de metabolismo foi evidenciado por um aumento no consumo de oxigênio no fígado (sensível ao tratamento agudo *in vivo* pela administração de 5-HD), elevada temperatura retal e maior produção corporal de  $CO_2$  nesses camundongos. De acordo com a velocidade metabólica elevada, a ingestão alimentar foi significativamente maior em camundongos HTG, sem concomitante aumento de peso. Assim como verificado em camundongos HTG, mitocôndrias de fígados de animais submetidos à dietas ricas em substratos energéticos apresentaram também elevação da respiração mitocondrial de repouso. *Conclusões:* Esses resultados demonstram que a hiperlipidemia primária leva ao aumento da atividade dos mito $K_{ATP}$  em fígados, o que pode representar uma adaptação regulada para oxidar o excesso de ácidos graxos em camundongos HTG. Além disso, nossos resultados indicam que os mito $K_{ATP}$ , além das UCPs, podem estar envolvidos no controle do metabolismo energético e do peso corporal.





***ABSTRACT***



*Background and Aims:* Changes in mitochondrial energy metabolism promoted by uncoupling proteins (UCPs) are often found in metabolic disorders. We have recently shown that hypertriglyceridemic (HTG) mice present higher mitochondrial resting respiration unrelated to UCPs. Here, we disclose the underlying mechanism and consequences, in tissue and whole body metabolism, of this mitochondrial response to hyperlipidemia. *Results:* As observed in HTG mice, liver mitochondria from animals submitted to the rich energy diets presented high resting respiration. Mitochondria isolated from the livers and spleen mononuclear cells of HTG mice presented enhanced respiratory rates compared to those from wild-type mice. Changes in oxygen consumption of liver mitochondria from HTG mice were sensitive to ATP, diazoxide and 5-hydroxydecanoate (5-HD), indicating they can be attributable to mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (mitoK<sub>ATP</sub>) activity. Indeed, mitochondria from HTG mice presented enhanced swelling in the presence of K<sup>+</sup> ions, sensitive to mitoK<sub>ATP</sub> agonists and antagonists. Furthermore, mitochondrial binding to fluorescent glibenclamide indicates that HTG mice expressed higher quantities of sulfonylurea receptors, a component of mitoK<sub>ATP</sub>. An overall faster metabolic state was evidenced by increased liver oxygen consumption (sensitive to acute *in vivo* 5-HD administration), higher body CO<sub>2</sub> release and temperature in these mice. In agreement with higher metabolic rates, food ingestion was significantly larger in HTG mice, without enhanced weight gain. Liver mitochondria isolated from rats fed glucose rich diet or from mice fed fat rich diet also presented higher resting respiration rates. *Conclusions:* These results demonstrate that primary hyperlipidemia leads to an elevation in liver mitoK<sub>ATP</sub> activity, which may represent a regulated adaptation to oxidize excess fatty acids in HTG mice. Furthermore, our data indicate that mitoK<sub>ATP</sub>, in addition to UCPs, may be involved in the control of energy metabolism and body weight.





## ***1- INTRODUÇÃO***

Aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e doença vascular periférica são desordens cardiovasculares responsáveis por uma em cada três mortes no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003). Nos Estados Unidos da América o número de mortes anual relacionado a essas desordens ultrapassa 2,3 milhões e no Brasil 800 mil. Algumas doenças como diabetes, obesidade, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, ou fatores ambientais como estresse, fumo e sedentarismo, aumentam o risco para estas doenças. Estudos com animais e humanos têm sido realizados em busca do entendimento dos mecanismos celulares e moleculares implicados nestas patologias para potenciais medidas preventivas e intervenções terapêuticas.

O aumento das concentrações plasmáticas de TG representa um fator de risco independente de outras co-variáveis para o desenvolvimento de doenças ateroscleróticas. Essas doenças são reduzidas por tratamentos que diminuam as concentrações de TG plasmáticos. A hipertrigliceridemia também está presente em outros distúrbios metabólicos como obesidade e diabetes e síndrome metabólica.

Em estudos prévios (ALBERICI, et al., 2003) demonstramos que mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (que super expressam a apo CIII humana) apresentam elevada velocidade de respiração de repouso quando comparadas às mitocôndrias de animais controles. Sugerimos que se tratava de um mecanismo adaptativo de dissipação de energia independente de UCPs. A partir dessa observação, buscamos identificar o mecanismo responsável por esta adaptação e verificar suas conseqüências sobre o metabolismo energético global desses animais. Procuramos verificar também se a hipertrigliceridemia secundária induzida por dieta provoca a mesma resposta adaptativa de dissipação de energia verificada na hipertrigliceridemia primária.

## **Metabolismo de lipídios**

O metabolismo de lipídios é controlado por um complexo sistema que envolve a interação de diversos transportadores de lipídios, proteínas de transferência plasmáticas, receptores de lipoproteínas e enzimas regulatórias de síntese e modificação de lipoproteínas. Lipoproteínas (LP) são complexos macromoleculares constituídos de lipídios hidrofóbicos (triglicérides e ésteres de colesterol) envolvidos por uma camada de lipídios anfipáticos (fosfolipídios e colesterol livre) e de proteínas específicas, denominadas apolipoproteínas (apoLP). As LP têm função de transportar seus componentes hidrofóbicos provenientes da dieta (via exógena) ou sintetizados endogenamente (via endógena) para todos os tecidos do corpo através da corrente sanguínea. Existem cinco classes de LP que diferem umas das outras quanto a composição lipídica, densidade e tipos de apoLP. Em ordem decrescente de densidade, estabelecido pelo método de ultracentrifugação preparativa (WILCOX, 1968) as LP são classificadas em: lipoproteínas de alta densidade (HDL); lipoproteínas de densidade intermediária (IDL); lipoproteínas de baixa densidade (LDL); lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e quilomícrons (QM) (para revisão ver WILSON, 1998).

### **Via exógena de transporte de lipídios**

O transporte de lipídios de origem alimentar está esquematizado na Figura 1A. Colesterol (COL) e triglicérides (TG), derivados da absorção intestinal, são complexados às apoLP no enterócito e secretados na linfa mesentérica na forma de quilomícrons (QM). Pelo ducto linfático torácico eles entram na circulação sanguínea e incorporam as apo-CII, CIII e apo-E, vindas de transferência de outras LP circulantes. Os TG dos QM são hidrolisados pela lipoproteína lipase periférica (LPL), uma enzima “ancorada” na membrana basal das células endoteliais cujo co-fator é a apoCII, liberando monoglicerídeos e ácidos graxos livres (AGL). Estes últimos são captados localmente e esterificados nos adipócitos ou oxidados nos músculos. Os AGL ligados à albumina plasmática são também captados pelo fígado e outros tecidos. Os remanescentes de QM (QM-rem) possuem grande quantidade de ésteres de colesterol (CE), pois também os recebe das HDL através ação da

proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP). Esse rearranjo favorece a incorporação de apo-E nos QM e, ao mesmo tempo, a saída de fosfolipídios (PL), colesterol livre (CL) e apoLP dos grupos C e A, que podem retornar às HDL. Os QM-rem têm meia vida curta (minutos), sendo rapidamente conduzidos ao hepatócito, onde são removidos por vias que incluem o receptor de partículas remanescentes (*LRP:LDL receptor related protein* ou receptor E). O colesterol liberado na célula hepática pode ser convertido em ácidos biliares ou ser secretado na bile sem sofrer alterações e pode ainda ser novamente secretado para a circulação sanguínea na forma de VLDL.

### **Via endógena de transporte de lipídios**

No fígado, AG provenientes da circulação são oxidados ou esterificados a TG e CE, os quais são secretados associados com as apo-B100, apo-CII, apo-CIII e apo-E formando as VLDL (Figura 1B). No plasma, esta lipoproteína sofre ação da LPL, como na via exógena, liberando AGL para os tecidos extra-hepáticos. Os AG captados podem ser re-esterificados e armazenados nos adipócitos ou oxidados nos músculos e outros tecidos. Os remanescentes de VLDL, chamados IDL, têm meia vida curta (minutos a algumas horas) e são parcialmente removidos pelos hepatócitos através de dois receptores, o LRP e o receptor de LDL, também chamado de receptor B/E, que interagem com resíduos de arginina da apoB-100 e da apo-E. As IDL não removidas sofrem a ação da lipoproteína lípase hepática (LLH) e perdem mais TG e PL, e são então denominadas LDL, ricas em CE. Estas constituem uma fonte de colesterol para síntese de hormônios esteróides nas gônadas e adrenal, membranas plasmáticas em tecidos em proliferação e ácidos biliares no fígado. As células que necessitam de colesterol expressam grandes quantidades de receptores de LDL e assim captam-na por endocitose.

### **Metabolismo de AGL plasmático no fígado**

O fígado tem influência imediata, porém pequena, no nível de AGL no sangue quando comparado aos elevados graus de oxidação e reesterificação realizados pelo músculo e tecido adiposo, respectivamente (KALDERON et al., 2000). A captação de AGL pelos hepatócitos, seja por difusão (cadeias pequenas e médias) ou por proteínas de

transporte (cadeias longas e muito longas), é proporcional à sua concentração no plasma. A quantidade captada pode ser: 1) ser oxidado nas mitocôndrias ou peroxissomos; 2) esterificada em PL ou em TG no retículo endoplasmático (RE) e reexportado para a circulação como VLDL; 3) esterificado e armazenado dentro de gotas de lipídios no citosol. O grau de oxidação de AG parece ser o principal regulador dessas diferentes vias, já que uma elevada oxidação inibe a esterificação e formação de VLDL, assim como a inibição da oxidação exerce efeito contrário (BREMER 2001).

Condições de elevação extrema do nível de AGL plasmático, como ocorre no diabetes por exemplo, induzem a captação hepática elevada desses lipídios e acúmulo de altas concentrações de TG intracelulares, caracterizando “fígado gorduroso” (VAN HARKEN, 1969 e BERGSETH et al., 1986). A análise microscópica de fígados gordurosos de humanos diabéticos demonstra anormalidades ultraestruturais nas mitocôndrias que se mostram grandemente aumentadas, inchadas e com cristas distorcidas, quando comparadas com mitocôndrias de fígados normais. O mesmo foi demonstrado em outros modelos humanos de fígados gordurosos como de obesos e alcoólatras (PETERSEN 1977).

### **Transporte reverso do colesterol**

O transporte reverso do colesterol (TRC) é um eficiente mecanismo para descartar o excesso de COL dos tecidos através da excreção pelo fígado. Este sistema envolve o efluxo de colesterol livre (CL) das membranas celulares, via ABCA1 (*ATP binding cassette transporter*) (DEAN et al., 2001; ORAM et al., 2000) dependente de ATP e via receptor SR-B1 (*scavenger receptor type B class 1*) (ACTON et al., 1996) para as apo-A1 e subfrações precursoras de HDL. Os passos subsequentes do TRC são a esterificação do COL pela LCAT (*lecithin-cholesterol acyl transferase*) (GLOMSET, 1968) e a transferência do CE para lipoproteínas ricas em TG pela CETP (HESLER et al., 1987; TALL et al., 2000). Posteriormente, o CE pode ser transferido para o fígado diretamente da HDL através dos receptores SR-B1 (LANDSCHULZ et al., 1996) e indiretamente através das LP que contém apo-B, através do receptor de LDL (BROWN e GOLDSTEIN, 1986) e

LRP (HERZ et al., 1988). A ação da CETP na HDL facilita a velocidade de efluxo de COL da célula. Também a ação combinada da CETP e LLH na HDL<sub>2</sub> madura, regenera HDL<sub>3</sub> e pré-beta-HDL, subfrações que são melhores aceptoras para o COL da célula (BRUCE et al., 1998).

## **Hipertrigliceridemia**

Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado que as concentrações de TG e lipoproteínas ricas em TG estão diretamente associadas a uma maior incidência de aterotrombose, representando um fator de risco independente para doenças coronarianas (MALLOY, 2001). As conseqüências negativas da hipertrigliceridemia incluem acentuada captação de lipoproteínas ricas em TG e seus remanescentes por macrófagos, síntese aumentada de fatores pró-trombóticos, e predominância de partículas de LDL pró aterogênicas (MILLER, 2000). A hipertrigliceridemia pode ser primária (origem genética) ou secundária a fatores ambientais ou outras doenças.

Na condição primária de hipertrigliceridemia, se incluem as heranças autossômicas recessivas ou dominantes (Tabela I). Dentre as recessivas estão as que exibem hiperquilomicronemia (acúmulo plasmático de QM), que podem ser originadas por deficiência de lipoproteína lípase ou deficiência de apo-CII, ambas de ocorrência rara ( $1/10^6$ ), e a disbetalipoproteinemia, um pouco mais freqüente ( $1/10^4$ ), caracterizada pelo acúmulo plasmático de partículas remanescentes de QM e VLDL (QM-rem e IDL, respectivamente), ricas em apoE, TG e COL. A hipertrigliceridemia familiar é uma herança autossômica dominante, com maior freqüência entre as primárias (0,5 a 1% da população), caracterizada pela elevada síntese ou reduzido catabolismo de VLDL, ou mista, quando ocorre aumento de QM (para revisão ver CARMENA, 1999).

A hipertrigliceridemia secundária pode decorrer de fatores ambientais ou de outras patologias. Agentes como álcool, dieta desequilibrada, beta-bloqueadores, sequestradores de ácido biliar, estrógenos orais, retinóides e esteróides (MILLER, 2000) podem modificar o sistema de síntese e transporte de lipídios, principalmente os TG.

A hipertrigliceridemia pode também estar associada à outras doenças como diabetes (GINSBERG, 2001) e a síndrome metabólica X (REAVEN, 1994). Nesta última ocorre associação de diversas desordens tais como resistência à insulina, obesidade central e hipertensão, além da dislipidemia caracterizada por aumento de TG e redução de HDL-COL (REAVEN, 1994 e HANSEN, 1999).

Elevados níveis plasmáticos de TG e AGL são comuns em pacientes com diabetes tipo I e II. O elevado fluxo de AGL para o fígado estimula a produção e secreção de LP contendo apoB, ricas em TG (VLDL), concomitantemente à redução da atividade da LPL no compartimento vascular, o que leva ao aumento da trigliceridemia. Por outro lado, no diabetes ocorre aumento da atividade da lipase hepática nos sinusóides hepáticos o que favorece a geração de LDL pequenas e densas (mais aterogênicas) a partir das VLDL (GINSBERG, 1996; GINSBERG e ILLINGWORTH, 2001). Este perfil, acentuado na situação pós-prandial, representa um fator de risco independente para doenças coronarianas (STAMLER et al., 1993).

A literatura tem evidenciado, em diferentes modelos de estudo, que o aumento nos níveis de TG plasmáticos ou hepáticos estão associados com a peroxidação lipídica. A esteatose aguda ou crônica leva à peroxidação lipídica hepática em camundongos (LETTERÓN, et al., 1996) e algumas formas de hepatite por esteatose podem levar à peroxidação lipídica sistêmica (CHALASANI, et al., 2004). YESILBURSA et al. (2004) demonstraram a relação entre obesidade e aumento de peróxidos lipídicos circulantes, os quais foram diminuídos com a redução de peso. RUMLEY et al. (2004) demonstraram uma forte correlação entre altos níveis de TG circulantes e oxidação de lipídios plasmáticos, inclusive em LDL, mecanismo através do qual um aumento dos níveis de TG plasmáticos pode aumentar os riscos de doenças cardiovasculares.

## **Camundongos transgênicos que super expressam a apo-CIII humana: um modelo para o estudo da hipertrigliceridemia**

A apolipoproteína CIII (apo-CIII) é a mais abundante apo-C no plasma humano, onde está presente como uma glicoproteína de 8.8 kDa (Jong et al., 1999 e 2001). Existe uma correlação positiva entre níveis plasmáticos de apo-CIII e TG circulantes em humanos (CALSON e BALLANTYNE et al., 1976; SCHONFELD et al., 1979). Camundongos geneticamente modificados para super expressar a apolipoproteína CIII humana são um bom modelo para o estudo das conseqüências da hipertrigliceridemia, sem outros fatores metabólicos relacionados. A apo-CIII é produzida pelo fígado e intestino e secretada como constituinte das VLDL e QM (BREWER et al., 1974; LENICH et al., 1988). A presença de apo-CIII em excesso nas VLDL reduz a velocidade de remoção dessas lipoproteínas e seus remanescentes do compartimento plasmático por dificultar ou inibir sua interação com receptores específicos, principalmente o LRP (AALTO-SETALA et al., 1992). Desse modo, a meia-vida estendida dessas lipoproteínas no compartimento plasmático resulta principalmente em elevados níveis de TG, o que implica em aumento da geração de AGL pela ação da LPL (AALTO SETALA, 1996; ITO, 1990). Por outro lado, a deficiência de apo-CIII em camundongos agrava a obesidade induzida por dieta, provavelmente através de aumento da lipólise de lipoproteínas ricas em TG, aumentando a captação de ácidos graxos no tecido adiposo (DUIVENVOORDEN et al., 2005).

## **Bioenergética mitocondrial**

As mitocôndrias estão presentes em quase todas as células eucarióticas vegetais e animais. São as organelas responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução para a forma de energia química necessária para os processos celulares. Este processo de conversão de energia de óxido redução em energia química na forma de ATP é denominado de fosforilação oxidativa e envolve uma série de complexos transportadores de elétrons e a enzima ATP sintase localizada na membrana mitocondrial interna (MMI).

## Cadeia respiratória

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém do potencial eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons que reduz o  $O_2$  à  $H_2O$ . Esta energia é utilizada pela ATP sintase para fosforilar ADP à ATP. Assim, a cadeia respiratória converte a energia redox gerada pelo catabolismo em potencial de membrana mitocondrial que é força motriz para a fosforilação oxidativa.

Na membrana mitocondrial interna, elétrons provenientes das coenzimas NADH e  $FADH_2$ , reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos à cadeia de transportadores de elétrons, um conjunto de complexos protéicos que contém centros redox com aumento progressivo de afinidade por elétrons (potencial de redução). A transferência de elétrons se inicia com a oxidação de NADH e  $FADH_2$  pela CoQ (UQ), catalisada pelos Complexos I (NADH desidrogenase) e II (succinato desidrogenase), respectivamente, gerando a forma reduzida da CoQ ( $UQH_2$ ). Em alguns tecidos a coenzima Q pode também ser reduzida pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (na presença de glicerol-3-fosfato citosólico) ou pela ubiquinona oxireductase (como resultado da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos). A oxidação da  $UQH_2$  pelo citocromo C é então catalisada pelo Complexo III (ubiquinona-citocromo C oxireductase). Por fim, o Complexo IV (citocromo oxidase) catalisa a oxidação do citocromo C reduzido, com redução de  $O_2$  à  $H_2O$  (VOET, 1999).

Segundo MITCHELL (1961), a passagem de elétrons através da seqüência de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de  $H^+$  da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas, contra um gradiente de concentração. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a utilização desta energia. O componente elétrico ( $\Delta\psi$ ) deste potencial atinge valores de aproximadamente 180 mV no estado de repouso, enquanto o componente químico ( $\Delta pH$ ) oscila na faixa de 0 a 1 unidade de pH. O fluxo de  $H^+$  do espaço intermembranas através da ATP sintase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, estaria diretamente acoplado à fosforilação do ADP. A ATP sintase, responsável por esta reação, é constituída de duas unidades distintas denominadas

F<sub>1</sub>, solúvel e localizada na matriz mitocondrial, e F<sub>o</sub>, hidrofóbica e mergulhada na membrana mitocondrial interna, onde estão também localizados os complexos da cadeia respiratória (Figura 2).

A geração de um gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) é um elemento central no aproveitamento de energia em sistemas biológicos. Evolutivamente este mecanismo é fundamental, já que é aproveitado tanto na fosforilação oxidativa em mitocôndrias quanto na fotossíntese de ATP em cloroplastos. Além disso, este gradiente pode ser usado diretamente para processos endergônicos sem a participação de ATP. São exemplos deste mecanismo de acoplamento direto as trocas eletroforéticas de ATP<sup>4+</sup> por ADP<sup>3+</sup>, a redução de NAD(P)<sup>+</sup> pela transidrogenase específica e a captação eletroforética de Ca<sup>2+</sup> que transporta duas cargas positivas para o interior da mitocôndria.

Alguns mecanismos são capazes de desviar o gradiente de H<sup>+</sup> da síntese de ATP, e são chamados de mecanismos de desacoplamento. Ânions AG possuem essa habilidade quando protonados, pois atravessam facilmente as membranas mitocondriais, carregando um próton para a matriz por mecanismo de “flip-flop” (WALTER e GUTKNECHT, 1984 e ANDREYEV et al., 1989). Devido à alcalinidade da matriz em relação ao espaço intermembranas, o AGL é desprotonado no interior da mitocôndria e, em sua forma aniônica, pode ser transportado de volta ao espaço intermembranas por dois processos eletroforéticos: 1) pelo translocador de nucleotídeos de adenina (TNA), na ausência de seus substratos específicos – ADP e ATP (SKULACHEV, 1991), e 2) por proteínas desacopladoras (UCPs - GARLID et al., 1996). Esse transporte de ânions de AGLs para o espaço intermembranas é seguido pelo seu rápido retorno na forma protonada. Isto constitui-se num ciclo fútil, que resulta na transferência de um H<sup>+</sup> para a matriz mitocondrial para cada ciclo.

A UCP foi descoberta em estudos com mitocôndrias de tecido adiposo marrom, onde é responsável pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa para a geração de calor (NICHOLLS, 1976). Posteriormente, essas proteínas foram também identificadas em plantas (PUMP – VERCESI et al., 1995). Em mamíferos, foram identificadas outras isoformas de UCP em outros tecidos, designadas de UCP2 a UCP4. Sugere-se que essas

proteínas podem atuar no controle de peso e na redução da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). No entanto, a função dessas novas isoformas nos outros tecidos ainda é incerta (para revisão KRAUSS et al., 2005).

Outro mecanismo de desacoplamento ocorre através de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP, que veremos mais detalhadamente a diante.

### **Geração de oxigênio reativo pela mitocôndria, sistema anti-oxidante e transição de permeabilidade mitocondrial**

Mitocôndrias são particularmente propensas à lesão oxidativa por EROs geradas continuamente pela cadeia respiratória mitocondrial (BOVERIS E CHANCE, 1973; TURRENS, 1997; KOWALTOWSKI et al., 1999) ou produzidas através do metabolismo de compostos endógenos, como o ácido 5-aminolevulínico, um precursor do heme, ou xenobióticos (HERMES-LIMA, 1995). Muitos estudos associam a disfunção mitocondrial causada por EROs à morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (ZAMZAMI et al., 1997; ZHANG et al., 1997).

Normalmente, o oxigênio é reduzido à água pela citocromo c oxidase, em quatro passos consecutivos de um elétron, pois o oxigênio molecular apresenta uma configuração triplete (DEPIERRE e ERNSTER, 1977). Esta enzima é altamente especializada neste processo, sendo capaz de se ligar fortemente ao oxigênio parcialmente reduzido, impedindo sua liberação antes da obtenção de sua redução total (para revisão, veja TURRENS, 1997). Deste modo, a produção de radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) através da redução monoelétrica do  $O_2$  pela citocromo c oxidase é praticamente inexistente. No entanto, até 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria é convertido a  $O_2^{\cdot-}$  (anion superóxido) em passos intermediários da cadeia respiratória mitocondrial (BOVERIS e CHANCE, 1973; Turrens, 1997), principalmente nos complexos I (TURRENS e BOVERIS, 1980) e III (CADENAS et al., 1977).

O  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser o principal agente estimulador da geração mitocondrial de EROs (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). O  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial liga-se a cardiolipina na face interna da membrana mitocondrial interna causando alteração ultraestrutural das proteínas da cadeia respiratória que facilita a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e subsequentemente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (GRIJALBA et al., 1999). Este fosfolípídeo possui cabeça polar eletronegativa e está presente em altas concentrações (14-23%) na membrana mitocondrial interna em uma grande variedade de tecidos. Simultaneamente, o  $\text{Ca}^{2+}$  mobiliza  $\text{Fe}^{2+}$  na matriz mitocondrial que estimula a reação de Fenton e a produção do radical hidroxil que ataca tióis de proteínas, lipídios e DNA mitocondrial (MERRYFIELD e LARDY, 1982; CASTILHO et al., 1995; VERCESI et al., 1997). Na presença de altas concentrações de fosfato inorgânico (Pi), a enolização de aldeídos formados por peroxidação lipídica de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) leva a produção final de espécies tripletes que estimulam o processo de peroxidação dos PUFA da membrana (KOWALTOWSKI et al., 1996A, 1996B) (Figura 3).

Como a geração mitocondrial de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é um processo contínuo e fisiológico, a mitocôndria possui um eficiente sistema antioxidante, composto por enzimas tiólicas, superóxido dismutase, glutatona, NADPH, vitaminas E e C (SUTTON e WINTERBOURN, 1989; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; WATABE et al., 1997; NETTO et al., 2002) (Figura 3).

Além do sistema antioxidante, a mitocôndria possui mecanismos que promovem um leve desacoplamento da fosforilação oxidativa e podem diminuir a geração de EROs (SKULACHEV, 1991). Entre eles estão as proteínas desacopladoras (UCPs - KLINGENBERG et al., 2001), o translocador de nucleotídeos de adenina (TNA - SAMARTSEV et al., 1997) e os canais de  $\text{K}^+$  sensíveis a ATP (mito $\text{K}_{\text{ATP}}$  - FERRANTI et al., 2003). Eles promovem uma pequena diminuição do potencial eletroquímico de  $\text{H}^+$  suficiente para aumentar o consumo de  $\text{O}_2$  e mudar o estado redox dos transportadores de elétrons da cadeia respiratória. Essa alteração é suficiente para diminuir a redução monoelétrica de oxigênio em estágios intermediários da cadeia de transporte de elétrons, principalmente nos complexos I e III.

Frente a situações de aumento da geração de EROs, como a exposição de mitocôndrias à agentes pró-oxidantes ou altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , pode ocorrer permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna, que gradativamente permite a passagem de prótons, íons, suporte osmótico e até mesmo de pequenas proteínas (VERCESI et al., 1997). Este processo é conhecido como abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM – KOWALTOWSKI et al., 2001) (Figura 3). Esse mecanismo é comum na morte celular, e está relacionado à liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais, devido ao inchamento da organela e ruptura da membrana mitocondrial externa (MME) (GREEN e REED, 1998; GREEN e KROEMER, 2005).

### **Canais de $\text{K}^+$ mitocondriais sensíveis a ATP (mito $\text{K}_{\text{ATP}}$ )**

O  $\text{K}^+$  é o cation mais abundante do citosol e da matriz mitocondrial, presente em concentrações de aproximadamente 150 mM. A membrana mitocondrial interna tem baixa permeabilidade ao  $\text{K}^+$ , assim como para outros íons, o que preserva a força próton-motriz para a síntese de ATP (MITCHELL, 1961). Além da pequena difusão de  $\text{K}^+$  do citosol para a matriz mitocondrial, esse cátion pode ser transportado por processo eletroforético através de canais protéicos específicos (uniportes), localizados na membrana mitocondrial interna. Um desses canais foi identificado por ser sensível a ATP (mito $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) (INOUE et al., 1991) e outro por ser ativado por  $\text{Ca}^{2+}$  (SIEMEM et al., 1999). A saída de  $\text{K}^+$  para fora da matriz ocorre por um processo eletroneuro em troca por um  $\text{H}^+$  ( $\text{K}^+/\text{H}^+$ ) (GARLID, 1978). Em outras palavras, o trocador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  usa o potencial de  $\text{H}^+$  como força motriz para transportar  $\text{K}^+$  para fora da matriz (via B, Figura 4), o que leva ao aumento da respiração para recompor o gradiente de prótons e preservar a síntese de ATP. A entrada de  $\text{K}^+$  na matriz mitocondrial é acompanhada pela difusão, no mesmo sentido, de  $\text{H}_2\text{O}$  e ânions (principalmente fosfatos) resultando em aumento do volume da matriz (Figura 5).

Os canais mito $\text{K}_{\text{ATP}}$  não são abertos por voltagem, mas o fluxo de  $\text{K}^+$  do citosol para a matriz mitocondrial depende da atração eletronegativa exercida pela matriz (GARLID et al., 2003). Eles são regulados negativamente por ATP, ADP, palmitoil CoA, oleoil CoA (PAUCEK et al., 1992 e 1996) e  $\text{Mg}^{2+}$  (BEDNARCZYK et al., 2005), e

positivamente por GTP, GDP (PAUCEK et al., 1996), UDP (MIRONOVA et al., 2004) e radicais superóxido (LAMPING et al., 1984). Além desses, existem reguladores farmacológicos, como a glibenclamida e o ácido 5-hidroxicanônico (5-HD), que inibem, e pinacidil (KOWALTOWSKI et al., 2001), diazóxido (DZX) e cromarcalina, que ativam estes canais (GARLID et al., 1997).

Garlid e colaboradores (2004) demonstraram que o mitoK<sub>ATP</sub> é composto por duas subunidades protéicas de 63 e 55 kDa que, sozinhas, são responsáveis pela atividade desse canal: a de 55 kDa tem propriedade de transporte similar ao canal K<sub>ATP</sub> de membrana plasmática, e é identificada como K<sup>+</sup> *inward rectifier* (mitoKIR). A de 63 kDa é uma subunidade receptora de sulfoniluréias (mitoSUR) (para revisão MIRONOVA et al., 2004). Por outro lado, um outro estudo propôs que o mitoK<sub>ATP</sub> seria composto de 5 proteínas, dentre elas o translocador de nucleotídeos de adenina, ATP sintase e a succinato desidrogenase (SDH), sendo que esta última age como reguladora do canal (ARDEHALI et al., 2004).

Dentre as principais funções demonstradas do transporte de K<sup>+</sup> para a matriz mitocondrial através dos mitoK<sub>ATP</sub> estão a proteção do miocárdio frente a situações de isquemia e reperfusão (GARLID et al., 1997) e a diminuição da produção de EROs pelas mitocôndrias (FERRANTI et al., 2003). As EROs mitocondriais estão envolvidas em uma variedade de patologias como a doença de Parkinson, Huntington e envelhecimento (KOWALTOWSKI e VERCESI, 2001; NICHOLLS, 2002). Alguns grupos apóiam a idéia de que a limitada velocidade de entrada de K<sup>+</sup> através dos mitoK<sub>ATP</sub> resulta em significativa diminuição de  $\Delta\psi$  e aumento da respiração. Em cérebro, rim e coração o potencial pode diminuir de 3 a 11 mV com correspondente aumento na velocidade de consumo de O<sub>2</sub> (BAJGAR et al., 2001; CANCHERINI et al., 2003). Dessa forma, o mitoK<sub>ATP</sub> agindo como um discreto desacoplador, é suficiente para aumentar a respiração sem impedir a fosforilação oxidativa. Esse leve desacoplamento, pode representar um efeito benéfico para a mitocôndria e para a célula ao reduzir a formação de EROs. Isto ocorre porque o aumento da respiração baixa a tensão de oxigênio e diminui a concentração de intermediários da cadeia respiratória na forma de doadores monoelétrônicos ao oxigênio (TURRENS, 1997).





## ***2- OBJETIVO***



Em estudos prévios demonstramos que a condição de hipertrigliceridemia genética leva a uma resposta de aumento da velocidade de respiração de repouso mitocondrial, independente da atividade de UCPs. Neste trabalho nossos objetivos foram:

- 1) Verificar se manipulações dietéticas (suplementação com carboidratos ou dieta rica em gordura) em animais controles podem levar a mesma resposta mitocondrial observada na hipertrigliceridemia genética.
- 2) Estudar a repercussão do aumento da respiração de repouso mitocondrial *in situ*: consumo de O<sub>2</sub>, potencial de membrana e produção de EROs em células mononucleares de baço de camundongos HTG e controles.
- 3) Elucidar o mecanismo bioquímico responsável pelo aumento da respiração de repouso mitocondrial nos camundongos HTG: caracterização do desacoplamento mediado por mitoK<sub>ATP</sub>.
- 4) Estudar a repercussão do aumento da respiração de repouso mitocondrial *in vivo*: velocidade de metabolismo corporal (produção de CO<sub>2</sub> e temperatura retal) e padrão de ingestão alimentar e crescimento corporal.





### ***3- MATERIAL E MÉTODOS***



## **Animais**

Camundongos transgênicos para apolipoproteína CIII humana (linhagem 3707) foram originalmente doados pelo Dr. Alan R. Tall em 1996 (Columbia University, NY) e sua colônia é mantida no biotério do departamento de Fisiologia e Biofísica, IB, UNICAMP. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA), IB/UNICAMP. Os camundongos tiveram acesso a dieta padrão (Nuvital CR1, PR, Brasil) e água a vontade. Foram criados e mantidos em sala climatizada em  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  com ciclo claro-escuro de 12 horas. Machos e fêmeas transgênicos para apoCIII heterozigotos e irmãos não-transgênicos (controles) de 4 a 6 meses de idade foram utilizados neste estudo.

## **Determinação das concentrações plasmáticas triglicérides**

Amostras de sangue dos camundongos em jejum de 16 horas foram colhidas do plexo retro-orbital de camundongos anestesiados (ketamina 50 mg/kg, Parke-Davis e Rompun 5-16 mg/kg, Bayer) usando tubos heparinizados. As amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para separação do plasma. Foi utilizado o método enzimático colorimétrico para determinar as concentrações plasmáticas de triglicérides seguindo as instruções do fabricante (Roche Diagnostic GmbH., Mannheim, Alemanha). Os triglicérides da amostra são determinados após hidrólise enzimática com lipases. O indicador é a quinonimina formada a partir do peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol sob a influência catalítica da peroxidase. O ensaio foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

## **Tratamento com insulina**

Aos camundongos apoCIII<sup>tg</sup> foram administradas injeções subcutâneas diárias de doses crescentes de insulina NPH (0.14-0.8 U/30 g peso corporal; IOLIN, Eli Lilly, Indianapolis, USA) por 7 dias. Um-terço da dose era administrada as 9:00 h e dois-terços as 19:00 h. Para prevenir a hipoglicemia, os animais tratados com insulina tiveram livre acesso a cubos de açúcar, além da dieta padrão, de acordo com KOBAYASHI e OLEFSKY, 1978.

### **Tratamento de camundongos C57Bl6 com dieta rica em gordura**

Os animais foram tratados a partir do desmame e durante 20 semanas com dieta rica em gordura (em % de peso: 21% proteína, 59% carboidrato e 14% de gordura). Para 1 Kg de dieta foram usados: 214,7 g de caseína, 3,3 g de L-Cistina, 54,4 g de amido de milho, 108,7 g de maltodextrina, 371,8 g de açúcar refinado, 54,3 g de celulose, 120 g de banha, 10 ml de óleo de soja, 38 g de mistura de minerais, 11 g de mistura de vitamina, 2,7 g de colina, 0,04 g de BHT (butil-hidroxi tolueno), 100 ml de H<sub>2</sub>O.

### **Tratamento de ratos wistar com suplementação de glicose**

Ratos wistar machos foram gavados com uma solução de glicose (0.8 g/100 g peso /dia) adicionalmente a dieta padrão *ad libitum*, durante 21 dias.

### **Isolamento de linfócitos a partir de baço de camundongos**

O baço, retirado após a morte do animal por deslocamento cervical, foi lavado e colocado em 16 mL de tampão PBS 1%, homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. A suspensão de células foi então dividida e transferida em 2 tubos de 15 ml contendo 2 ml de Ficoll-Hypaque e centrifugadas a 1350 xg por 25 minutos, à temperatura ambiente. Os linfócitos foram removidos da interfase, lavados duas vezes com 10 mL de tampão PBS e ressuspensos em 0.5 ml do mesmo tampão. A quantificação das células viáveis foi feita na câmara de Newbauer.

### **Isolamento de mitocôndrias hepáticas**

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de camundongos adultos utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo SCHNEIDER e HOGEBOM (1950), após jejum de 16 hs. O fígado, retirado após a morte do animal por deslocamento cervical, foi

lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão HEPES 5,0 mM pH 7,2, EGTA 0,5 mM e BSA 0,1%, picado com tesoura e homogeneizado (10 *strokes*) em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 10000 rpm sendo a fase lipídica flutuante retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em sacarose 250 mM, HEPES 5,0 mM pH 7,2 e EGTA 0,3 mM, e novamente centrifugado na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução sendo que isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 50 mg de proteína por ml.

### **Dosagem de proteína**

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto (GORNALL, et al., 1949), modificado pela adição de colato 1% (KAPLAN e PEDERSEN, 1983). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

### **Monitoramento do consumo de oxigênio**

O consumo de oxigênio por mitocôndrias, fragmentos de fígados ou células mononucleares de baço foi medido utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Hansatech Instruments Ltd conectado ao software OXIGRAPH V1.10, England) em uma câmara de 1 ml, termostatizada e equipada com agitador magnético. A concentração de oxigênio inicial no meio de reação foi de 225 nmol/ml (ROBINSON e COOPER, 1970) a 28°C.

## **Tratamento com ácido 5-hidroxicanônico (5-HD) e preparação do tecido hepático**

Os camundongos controles e transgênicos fêmeas foram tratados com salina (i.p.) ou 5-HD (10 mg/Kg BW) 1 hora antes do sacrifício. Após o sacrifício, os fígados foram rapidamente dissecados e cortados em cubos de 1 mm, usando um cortador de tecidos. Em cada experimento, aproximadamente 50 mg de fígado foram incubadas em 1 ml de meio Krebs-Henseleit acrescido de glicose 10 mM à (37°C) para a medida do consumo de O<sub>2</sub>, como descrito acima. O conteúdo de proteína exato em cada amostra de tecido homogeneizado foi determinado através do método de Biureto, e as velocidades de consumo de O<sub>2</sub> foram calculadas.

## **Medida de inchamento mitocondrial**

As suspensões mitocôndriais são turvas e espalham a luz incidente. O nível da luz espalhada é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz e do meio e, qualquer processo que diminua esta diferença, irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (NICHOLLS, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a conseqüente diminuição do espalhamento da luz. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias são ideais à aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramento de suas pregas. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm (MACEDO, et al., 1988) foi feito em um espectrofotômetro (DW 2000, SLM Aminco). As mitocôndrias de fígado de camundongo (0,5 mg de proteína/ml) foram incubadas em 2 ml de meio de reação, e os experimentos foram realizados a temperatura de 37°C.

## **Quantificação dos canais mitocondriais de K<sup>+</sup> sensíveis a ATP**

Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos transgênicos e controles (1 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão contendo 10 µM do marcador glibenclamida fluorescente (ER Tracker<sup>TM</sup> Green (glibenclamide BODIPY<sup>®</sup> FL), Molecular Probes<sup>TM</sup>). As amostras foram agitadas constantemente a 28°C, ao abrigo da luz, por 45 minutos e posteriormente centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos. O pellet resultante foi diluído em 2 ml de meio de reação padrão e essa mistura foi lida fluorimetricamente (F-4010, HITACHI) a 504/511 nm de excitação/emissão, respectivamente.

## **Medida de produtos oxidados pela quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A produção de TBARS pelas mitocôndrias foi monitorada de acordo com BUEGE e AUST, 1978. Primeiramente, 0,4 ml de amostras foram retiradas após 10 minutos de incubação em meio de reação padrão e nas condições descritas, misturadas com 0,4 ml de ácido tiobarbitúrico 1% em 0,05 N NaOH, 0,2 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e 40µl de NaOH 10 N. A mistura foi aquecida a 90-100°C por 15 minutos na presença de butil hidroxitolueno 1 mM. Após resfriamento, 1,5 ml butanol foi adicionado à solução. A mistura foi agitada e centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos. A densidade óptica da camada sobrenadante foi determinada a 535 nm.

## **Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) por células mononucleares de baço**

A geração de EROS (superóxido, O<sub>2</sub><sup>-</sup>) por células intactas foi medida através de duas metodologias: (1) citometria de fluxo, através do marcador fluorescente dihidroetídio (DHE) que fluoresce quando oxidado a etídio. O acúmulo de marcador oxidado ao longo do tempo forneceu medida de produção de EROS das células em diferentes períodos de tempo. A leitura da fluorescência do composto foi feita no canal FL-2 do citômetro de fluxo

(FACSCalibur, Becton Dickinson); e (2) espectrofluorimetricamente, usando o corante permeável à membrana H<sub>2</sub>-DCF-DA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína, 1 µM) (LEBEL et al., 1992; GARCIA-RUIZ et al., 1997). Fluorescência foi monitorada em 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, com a largura da fenda de 3 nm. Calibração foi feita pela adição de concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), o produto da oxidação do H<sub>2</sub>-DCF. A leitura da fluorescência foi feita em espectrofotômetro de fluorescência F-4010 (HITACHI).

### **Análise do potencial de membrana mitocondrial em células mononucleares de baço**

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial, os linfócitos foram incubados com o marcador catiônico fluorescente 3,3'-dihexyloxacarbocianido iodina (DiOC<sub>6</sub>(3)), que liga-se a membranas lipídicas que apresentam diferença de potencial elétrico, na presença ou não de CCCP, que dissipa este potencial. A razão de fluorescência do DiOC pela fluorescência do DiOC+CCCP fornece a medida proporcional à amplitude do potencial de membrana mitocondrial (ROTTENBERG e WU., 1998). A leitura da fluorescência foi feita no canal FL-1 do citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson).

### **Determinação da taxa respiratória de camundongos *in vivo***

Para determinação da expiração de CO<sub>2</sub> por camundongos *in vivo* foi utilizado o sistema de análise em fluxo, preparado de acordo com uma metodologia previamente estabelecida em nosso laboratório (CALEGARIO, et al, 2002). Esse sistema é composto por um fluxo gasoso (doador de CO<sub>2</sub> – cuba fechada com os camundongos) e um fluxo de água deionizada fresca (receptor de CO<sub>2</sub>). Esses dois fluxos correm em direção a lados opostos de uma membrana de teflon® permeável a gás, mas impermeável a água, sustentada por uma cela acrílica (célula de difusão). Uma bomba peristáltica é usada para circular os fluxos aquoso e gasoso. O fluxo receptor flui para dentro de uma micro célula de condutividade conectada a um condutivímetro, cuja saída liga-se a um registrador

potenciométrico. O método é baseado na difusão de CO<sub>2</sub> gasoso (provindo da cuba onde os camundongos estão fechados) através da membrana de Teflon® para o fluxo de água deionizada. O CO<sub>2</sub>, ao entrar em contato com a água, dissocia-se produzindo íons que, ao atravessarem a cela de condutividade, geram um gradiente de condutividade registrado em forma de curvas. O incremento na condutividade é proporcional à concentração de CO<sub>2</sub> expirado pelos camundongos. Os sinais do condutivímetro são enviados ao registrador. As velocidades de expiração de CO<sub>2</sub> foram determinadas utilizando-se uma curva de calibração com concentrações conhecidas de CO<sub>2</sub>. Os camundongos foram submetidos à adaptação ao experimento (permanência por 5 minutos no reator, duas vezes ao dia) durante 5 dias antecedentes às medições. Foram selecionados camundongos com idade entre 4 e 6 meses, e peso corporal entre 24 e 28 gramas. A partir das 10:00 h, os camundongos eram colocados individualmente no reator e a expiração de CO<sub>2</sub> registrada por 5 minutos, em 5 dias consecutivos. Durante as medições, a temperatura externa do reator foi mantida à 25 °C e a interna foi controlada para a base de cálculos ( $pV = nRT$ ). A produção de CO<sub>2</sub> de cada animal foi a média das 5 medições diárias.

### **Medida da temperatura corporal retal**

Durante 5 dias, a temperatura retal dos camundongos foi monitorada através de um termômetro clínico digital, modelo BD Basic (Becton Dickinson and Company, São Paulo, SP, Brasil). Uma vez ao dia, aproximadamente às 14 horas, cada camundongo foi rapidamente imobilizado e a temperatura retal medida por 20 segundos por 3 vezes. Obteve-se o valor final de temperatura de cada camundongo pela média dos valores obtidos em 5 dias consecutivos.

## **Monitoramento da ingestão alimentar e ganho de peso**

O ganho de peso e da ingestão alimentar foram monitorados em camundongos de 30 dias até 6 meses de idade. Os camundongos e a ração ingerida foram pesados 3 vezes/semana. O peso corporal foi medido individualmente e a ingestão alimentar foi determinada pela média do peso de ração consumida /4 camundongos /caixa /dia.

## **Análises estatísticas**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  epm. O n se refere ao número de animais utilizados em cada experimento. As análises estatísticas foram feitas usando one-way ANOVA para comparações múltiplas e teste *t* de *Student* para comparação de 2 médias, usando o programa Origin 7.0.  $P \leq 0.05$  foi considerado significativo.



## ***4- RESULTADOS***



#### **4.1- Análise da bioenergética mitocondrial em fígados de animais tratados com dietas rica em carboidrato ou rica em gordura.**

Com o objetivo de verificar se o aumento do consumo de O<sub>2</sub> no estado de repouso encontrado em mitocôndrias de fígados de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (ALBERICI et al., 2003) ocorria também em animais submetidos a dietas ricas em substratos energéticos, dois modelos foram utilizados.

No primeiro modelo, ratos foram suplementados diariamente com concentrações altas de glicose. Dietas ricas em carboidratos induzem a transcrição de 15 genes que codificam enzimas chave da lipogênese hepática (GRANNER e PILKIS, 1990) e causam o fenótipo da síndrome X (ZHU et al., 2004), que inclui principalmente a hipertrigliceridemia, resistência à insulina e obesidade central (REAVEN, 1994).

As células de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) recebem um aporte de ácidos graxos maior que as células de camundongos controles devido à maior quantidade de TG na circulação sanguínea que, através da ação da lipoproteína lípase, libera os AGL constantemente para os tecidos. Simulando o que ocorre nesses animais, um segundo modelo de estudo foi gerado submetendo camundongos não-transgênicos (controles) à dieta rica em gordura por um longo período de tempo (4 meses), com o intuito de verificar se a elevação do aporte de AGL aos tecidos, independente da trigliceridemia, induziria um aumento da respiração em mitocôndrias de fígado. Os camundongos HTG também foram submetidos à esta dieta para exacerbar o aporte de AGL aos tecidos destes animais.

Os níveis plasmáticos de TG dos ratos e camundongos submetidos a esses tratamentos estão mostrados na Tabela II. Os ratos suplementados com glicose exibiram concentrações plasmáticas de TG 89% mais elevadas do que os ratos não suplementados. Já em camundongos, a dieta rica em gordura não aumentou as concentrações plasmáticas de TG em animais controles, assim como não alterou o perfil de TG em animais transgênicos em relação à dieta padrão (ALBERICI, et al., 2003).

A análise da bioenergética mitocondrial mostrou que nas mitocôndrias de fígados de ratos suplementados com glicose, ocorreu uma diminuição do controle respiratório (CR, razão entre as velocidades de respiração mitocondrial nos estados III e IV) em 17%, devido ao aumento da velocidade de respiração de repouso de 32% (estado IV) quando comparado à mitocôndrias de fígados de ratos controles (Tabela III). O mesmo ocorreu nas mitocôndrias de fígados de camundongos controles submetidos à dieta rica em gordura, que também apresentaram uma diminuição do CR e uma respiração de repouso aumentada em relação à dieta padrão, mas semelhante às mitocôndrias de fígado de camundongos HTG (Tabela IV).

A respiração de fosforilação (estado III) foi elevada apenas pela suplementação com glicose. Isso não ocorreu devido a um aumento na atividade dos complexos da cadeia de transporte de elétrons, visto que a velocidade máxima da cadeia respiratória (na presença de FCCP) não foi alterada com o tratamento. Isto sugere que nessas mitocôndrias o tratamento tenha induzido adicionalmente uma outra adaptação no estado de fosforilação, como por exemplo, um aumento na atividade de ATP sintases.

A eficiência de fosforilação (razão ADP/O) não foi significativamente alterada em mitocôndrias de fígados de ambos os modelos de manipulação dietética, comparadas aos seus respectivos controles, indicando que a capacidade de fosforilação oxidativa foi preservada nos ratos portadores de hipertrigliceridemia secundária e nos camundongos submetidos à dieta rica em gordura (Tabela III e IV). Como a principal característica da atividade de UCPs é desviar os  $H^+$  da síntese de ATP, e dessa forma, reduzir a eficiência de fosforilação (razão ADP/O), nossos resultados sugerem que a atividade destas proteínas não está envolvida nestas alterações de velocidade de consumo de  $O_2$ .

#### **4.2- Análise dos efeitos do tratamento hipolipemiante com insulina na bioenergética de mitocôndrias de fígados de camundongos HTG**

Resultados anteriores do nosso laboratório demonstraram que o tratamento hipolipemiante com ciprofibrato corrigiu a respiração de repouso elevada em mitocôndrias de camundongos HTG (ALBERICI et al., 2003). O tratamento com ciprofibrato classicamente reduz os TG e AGL plasmáticos, assim como as concentrações intracelulares

de ácidos graxos por aumentar sua oxidação. Com o intuito de verificar se as concentrações intracelulares de ácidos graxos são as responsáveis pelo aumento da respiração de repouso em animais HTG, tratamos estes camundongos com insulina, que também é um tratamento hipolipemiante, porém distinto do ciprofibrato. Conhecidamente, o tratamento com insulina reduz os níveis plasmáticos de TG por estimular a LPL e a atividade de proteínas transportadoras de ácidos graxos. No entanto, induz a lipogênese no tecido adiposo e reduz a  $\beta$ -oxidação em todos os tecidos alvos da insulina. Como esperado, o tratamento crônico com insulina reduziu os níveis plasmáticos elevados de TG em camundongos HTG (Tabela V). Apesar disso, o tratamento com insulina nesses animais não normalizou o elevado consumo de  $O_2$  no estado de repouso e, conseqüentemente, nem o baixo CR das mitocôndrias de fígados de camundongos transgênicos, comparadas as mitocôndrias de fígados de camundongos controles. A razão ADP/O e o estado III de respiração, que já não estavam alterados nos camundongos HTG, também não sofreram modificações com o tratamento (Tabela V).

#### **4.3- Análise da bioenergética mitocondrial *in situ* (células mononucleares de baço) de camundongos HTG**

A análise da bioenergética mitocondrial de camundongos HTG *in situ* se mostrou necessária para a comprovação dos resultados obtidos em mitocôndrias isoladas e para o entendimento da amplitude desse fenômeno adaptativo. Células mononucleares de baço são um bom modelo para o estudo dos efeitos da hipertrigliceridemia na bioenergética mitocondrial *in situ*. Primeiro, pela facilidade de isolamento e viabilidade dessas células *in vitro*. Segundo, pelo fato destes tipos celulares serem encontrados também na parede celular durante o processo de aterogênese, principalmente em animais hipertrigliceridêmicos, já que a hipertrigliceridemia representa um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MALLOY, 2001).

O consumo de oxigênio por células mononucleares isoladas de baços extraídos de camundongos HTG e controles foi analisado em diferentes estados respiratórios (Figura 6). Nota-se que as células HTG (barras cheias) apresentaram velocidade de

respiração aproximadamente 40% e 50% maior do que as células controles (barras vazias), antes e depois da permeabilização com 0,001% de digitonina, respectivamente. Nas células permeabilizadas, observa-se que em condições de elevada síntese de ATP pelas mitocôndrias (na presença de ADP), as células HTG e controles não apresentaram diferença significativa entre as velocidades de consumo de oxigênio. A inibição da síntese mitocondrial de ATP pela oligomicina (bloqueio da  $F_0F_1$ ATP-sintetase) retornou a respiração celular ao estado de repouso (estado IV de respiração mitocondrial), no qual observa-se que as células HTG voltaram a apresentar um maior consumo de oxigênio. A adição de CCCP aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial interna (MMI) à  $H^+$  e dessa forma desfaz rapidamente o potencial eletroquímico de membrana ( $\Delta\psi_m$ ), o que aumenta o consumo de oxigênio para a velocidade máxima da cadeia respiratória mitocondrial. Nesse estado, como no estado de fosforilação (estado III), não foi observada diferença significativa entre as células HTG e controles. A respiração das células intactas também foi analisada em meio RPMI 1640 (como meio extracelular), onde apresentaram o mesmo perfil dos experimentos feitos em meio de reação padrão (livre de  $Ca^{2+}$ ), ou seja, as células HTG apresentaram valores de respiração ( $2,28 \pm 0,3$ ) maiores que as células controles ( $1,73 \pm 0,22$ ). Valores de média  $\pm$  epm, em  $nmol O_2 \cdot 1,5 \cdot 10^7 \text{ células}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $n = 4$ ,  $p = 0,028$ ).

A velocidade de respiração da mitocôndria é regulada pelo potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) para garantir a síntese de ATP (MITCHELL, 1961). Para comprovação dos resultados obtidos na respiração, foram analisados os potenciais de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) em linfócitos de baços de camundongos HTG e controles, através da citometria de fluxo. Foi utilizado o marcador catiônico fluorescente 3,3'-dihexiloxacarbocianeto iodina ( $DiOC_6(3)$ ), que liga-se a membranas lipídicas que apresentam diferença de potencial elétrico, na presença ou não de CCCP, que dissipa o  $\Delta\psi_m$ . A razão de fluorescência do  $DiOC_6(3)$  pela fluorescência do  $DiOC_6 + CCCP$  fornece a medida proporcional à amplitude do  $\Delta\psi_m$ . A Figura 7 mostra que não houve diferença significativa entre as razões de fluorescência entre os dois tipos de células intactas, indicando que as mitocôndrias de linfócitos transgênicos e controles possuem semelhantes  $\Delta\psi_m$ . A inibição da síntese de ATP pela oligomicina induziu um pequeno aumento nos

potenciais de membrana em ambos tipos celulares, como esperado. De acordo com estes resultados e com os obtidos na avaliação da respiração, o potencial de membrana mitocondrial de células HTG, que é utilizado pelo processo de desacoplamento, está sendo restabelecido às custas do aumento do consumo de oxigênio.

Pequenos desacoplamentos entre respiração e fosforilação oxidativa, como causados pelos canais de  $K^+$  sensíveis a ATP (mitoK<sub>ATP</sub>) ou UCPs, promovem o aumento da respiração que baixa a tensão de oxigênio e diminui a concentração de intermediários da cadeia respiratória na forma de doadores monoelétrônicos (TURRENS, 1997). Como a hipertrigliceridemia aumentou o consumo de  $O_2$  em células mononucleares de baço, procuramos verificar se esse aumento era suficiente para reduzir a geração de EROs nessas células.

A geração de EROS por células mononucleares isoladas de baços de camundongos HTG e controles foi monitorada através de duas metodologias: citometria de fluxo, através do marcador dihidroetídio (DHE), e pela espectrofluorimetria, através do marcador  $H_2$ -DCFDA que emite fluorescência quando oxidado à DCF. A análise do perfil de oxidação do DHE pela citometria de fluxo (Figura 8) mostrou que as células de camundongos HTG, ao longo do tempo de 60 a 90 minutos, produziram semelhantes quantidades de EROs quando comparadas às células de camundongos controles. Esse resultado foi confirmado pela quantificação espectrofluorimétrica da fluorescência do DCF (Figura 9), que além disso, mostrou que a permeabilização das células em meio contendo  $Ca^{2+}$  contaminante ( $\sim 10 \mu M$ ) provocou um aumento na produção de EROs semelhante em ambos grupos de células.

#### **4.4- Envolvimento de canais de $K^+$ sensíveis à ATP (mitoK<sub>ATP</sub>) no desacoplamento em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos transgênicos HTG**

##### **4.4.1- Respiração e inchamento mitocondrial**

Como nossos experimentos iniciais em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos HTG indicaram que as UCPs e o TNA não estão envolvidos no aumento da velocidade de respiração no estado de repouso (ALBERICI, et al., 2003), estudamos agora um outro possível mecanismo de desacoplamento nessas mitocôndrias: o aumento do fluxo

de  $K^+$  pela membrana mitocondrial interna, devido a abertura de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP (mitoK<sub>ATP</sub>). A atividade aumentada destes canais promove a entrada excessiva de  $K^+$  na matriz mitocondrial que é acompanhada da extrusão do íon através de um trocador  $K^+/H^+$ . Isso conseqüentemente promove uma pequena diminuição do potencial eletroquímico de  $H^+$  ( $\Delta\mu H^+$ ), que é recomposto às custas do aumento de respiração. Para investigar essa possibilidade, verificamos a velocidade de consumo de  $O_2$  por mitocôndrias de fígado HTG e controles em diversas condições experimentais. Nota-se que em meio de reação padrão contendo  $K^+$ , as mitocôndrias de fígados HTG apresentaram uma velocidade de respiração de repouso aproximadamente 24 % maior do que as mitocôndrias de fígados de camundongos controles (Figura 10). A substituição de  $K^+$  por  $Li^+$  (sem  $K^+$ ) no meio de reação padrão restabeleceu a velocidade de respiração das mitocôndrias HTG ao nível das controles, o que caracterizou a dependência do íon  $K^+$  no mecanismo de desacoplamento em mitocôndrias HTG. Observou-se também, somente nas mitocôndrias HTG, uma redução da velocidade de respiração na presença de ATP ( $K^+/ATP$ ), o que indicou um possível envolvimento de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP (mitoK<sub>ATP</sub>). Observamos também o efeito de ativadores e inibidores clássicos do mitoK<sub>ATP</sub> sobre a velocidade de respiração das mitocôndrias HTG: o diazóxido ( $K^+/ATP/DZX$ ) reverteu a inibição por ATP e abriu o canal novamente para a entrada de  $K^+$ , elevando novamente a velocidade respiração; o ácido 5-hidroxicanônico ( $K^+/ATP/DZX/5-HD$ ) reverteu a abertura do canal induzida por DZX, ou seja, fechou o canal e diminuiu novamente a velocidade de respiração das mitocôndrias transgênicas ao nível das controles. A adição desses mesmos compostos nas mitocôndrias controles não promoveu alterações significativas na velocidade de respiração (Figura 10).

A entrada de  $K^+$  na matriz mitocondrial é acompanhada pela difusão de  $H_2O$  e ânions, principalmente  $Pi$ , resultando em aumento do volume da matriz. A análise de inchamento mitocondrial em mitocôndrias de fígado de camundongos HTG e controles (Figura 11A e 11B) revelou um maior aumento de volume das mitocôndrias transgênicas, comparadas às mitocôndrias controles, quando adicionadas em meio de reação hiposmótico suplementado com  $K^+$ . Esse aumento adicional de volume foi prevenido pela adição de ATP, glibenclamida ou 5-HD e estimulado por DZX (Figura 11B). Os resultados obtidos com ativadores e inibidores do MitoK<sub>ATP</sub> demonstram que esses canais participam do desacoplamento em mitocôndrias de fígados de camundongos hipertrigliceridêmicos: eles

permitem a entrada adicional de  $K^+$  na matriz mitocondrial, verificado pelo aumento de volume da organela. A extrusão desse íon em troca por  $H^+$  do espaço intermembranas diminui o potencial eletroquímico de  $H^+$ , que é restabelecido através do aumento do consumo de oxigênio.

#### 4.4.2– Ensaio de ligação da subunidade SUR do mitoK<sub>ATP</sub> com glibenclamida fluorescente

O aumento da respiração provocado pelo mitoK<sub>ATP</sub> em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos transgênicos poderia ocorrer devido a um aumento na quantidade e/ou atividade desses canais. Devido a falta de anticorpos comerciais de boa qualidade, não realizamos a técnica de Western Blotting. Alguns grupos de pesquisadores usaram anticorpos contra determinadas mitoKIRs e mitoSURs mas os resultados foram controversos (SUZUKI et al., 1997; LACZA et al., 2003; TAI et al., 2003). Alguns outros estudos indicam que esses anticorpos reagem também contra outras proteínas mitocondriais (GROVER e GARLID, 2000). Recentemente, a Molecular Probes<sup>TM</sup> disponibilizou uma glibenclamida marcada fluorescentemente que se liga às subunidades SUR de retículo endoplasmático. Como sabemos que na mitocôndria, subunidades SUR estão presentes apenas em mitoK<sub>ATP</sub> (para revisão MIRONOVA et al., 2004), utilizamos essa mesma técnica de marcação em preparações de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos. A leitura da fluorescência emitida pelas mitocôndrias incubadas com a glibenclamida marcada revelou uma maior ligação deste marcador fluorescente nas mitocôndrias HTG quando comparadas as controles (Figura 12), o que sugere uma maior quantidade de subunidades mitoSUR e, provavelmente, uma maior quantidade de mitoK<sub>ATP</sub> em mitocôndrias de fígado de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos.

#### 4.4.3- Consumo de oxigênio por fragmentos de fígados de camundongos tratados com 5-HD

O leve desacoplamento promovido pela expressão e atividade de mitoK<sub>ATP</sub> em mitocôndrias de fígado de camundongos HTG poderia resultar em alterações no metabolismo total do fígado intacto desses animais. Para checar essa possibilidade, o consumo de O<sub>2</sub> foi medido em fragmentos de fígados extraídos de camundongos controles e HTG. Como mostra a Figura 13, o consumo de O<sub>2</sub> pelos fígados HTG foi 16 % maior que o consumo dos fígados controles. O aumento do consumo de O<sub>2</sub> pelos fragmentos HTG pode ser atribuído ao mitoK<sub>ATP</sub> visto que o 5-HD, injetado intraperitonealmente 1 hora antes da retirada dos fígados dos camundongos, diminuiu significativamente o consumo de O<sub>2</sub> somente no fígado HTG, retornando o consumo de O<sub>2</sub> aos níveis dos controles.

#### 4.5 - Velocidade de produção de CO<sub>2</sub> *in vivo* e temperatura corporal em camundongos hipertrigliceridêmicos e controles

Devido ao fígado ter um papel importante no metabolismo oxidativo corporal, verificamos se os camundongos HTG apresentam maior velocidade metabólica corporal quando comparados aos controles. Para isso, determinamos a liberação de CO<sub>2</sub> *in vivo* e a temperatura corporal destes animais. A velocidade de expiração de CO<sub>2</sub> por camundongos HTG foi superior em 17% em relação aos camundongos controles (Figura 14) assim como temperatura corporal foi superior em 0,7 °C (Figura 15). O aumento da liberação de CO<sub>2</sub> e da temperatura corporal são indicativos de que camundongos HTG possuem um metabolismo mais elevado que camundongos controles.

Se esses camundongos HTG têm aumento de metabolismo oxidativo corporal, eles deveriam ser mais magros ou apresentar maior ingestão alimentar. De fato, verificamos que os camundongos HTG mantêm um peso semelhante aos controles às custas de maior ingestão e menor eficiência alimentar (Figura 16).

#### **4.6 - Peroxidação lipídica em mitocôndrias de fígado de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos e controles**

Nossos resultados anteriores demonstraram que as mitocôndrias de fígado de camundongos HTG são mais suscetíveis à abertura do poro de TPM induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  do que mitocôndrias controles (ALBERICI et al., 2003). A abertura do poro de TPM pode ocorrer devido a oxidação de proteínas da membrana mitocondrial interna por EROs na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (FAGIAN et al., 1990; CASTILHO et al., 1996; KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). Assim, investigamos nestas mitocôndrias a suscetibilidade a peroxidação de lipídios da membrana mitocondrial interna.

Sabe-se que a lipoperoxidação da membrana mitocondrial interna resulta em aumento de sua permeabilidade, o que ocasiona prejuízo de suas funções bioenergéticas, tais como respiração, fosforilação oxidativa, transporte de íons, e outros (BINDOLI, 1988; CHANCE e WILLIAMS, 1956). O dano à membrana mitocondrial interna pode ser monitorado pelo influxo do suporte osmótico e água, que resulta em inchamento. O experimento descrito na Figura 18, mostra que em contraste com as mitocôndrias controles, as mitocôndrias HTG sofreram extenso inchamento após a incubação na presença de  $\text{P}_i$  (4 mM). Na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , o  $\text{P}_i$  estimula a propagação de reações de lipoperoxidação iniciadas por EROS (KOWALTOWSKI, et al., 1996). O inchamento das mitocôndrias transgênicas foi parcialmente protegido pelo antioxidante butil-hidroxitolueno (BHT) ou ciclosporina A (CSA) e totalmente prevenido pela combinação de ambos. Esses dados indicam que as membranas de mitocôndrias HTG, na presença de pró-oxidantes, são mais suscetíveis ao processo de permeabilização, mediado parcialmente por peroxidação lipídica e parcialmente pela abertura do poro de TPM.

Medimos também nas mitocôndrias isoladas controles e transgênicas a geração de produtos oxidados que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Essa dosagem mostrou que, em condições basais (meio de reação padrão, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  contaminante:  $\sim 10 \mu\text{M}$ ), as mitocôndrias de fígado isoladas de camundongos HTG apresentaram quantidades similares de TBARS quando comparadas às mitocôndrias de camundongos controles (Figura 17). Porém, quando na presença do pró-oxidante Fe(II)citrato e  $\text{Ca}^{2+}$ , as mitocôndrias HTG apresentaram maiores quantidades de TBARS do que mitocôndrias controles.





## ***5- DISCUSSÃO***



Alterações no metabolismo energético mitocondrial têm sido encontradas em diversas doenças metabólicas, onde participam tanto como causa quanto como conseqüências dessas doenças (para revisão LEMASTERS, 2001). Como causa, por exemplo, uma mutação no DNA mitocondrial (DNAMt) adquirida maternalmente, que codifica um RNA de transferência, pode causar hipomagnesemia, hipertensão e hipercolesterolemia conjuntas (WILSON et al., 2004). Certos polimorfismos do DNAMt são relatados na resistência a insulina e podem predizer o risco de desenvolvimento do diabetes (CLAPHAM et al., 2000). Por outro lado, tem sido descrito aumento de expressão de UCPs frente a situações metabólicas como obesidade (BAO et al., 1998), resistência à insulina (SAMEC, et al., 1999), concentrações elevadas de AGL circulantes (BOSS, et al., 1998) e diabetes (BAO et al., 1998; HIDAKA et al., 2000). Apesar da atividade de UCPs mediar a dissipação de energia, favorecendo um estado catabólico, os efeitos das UCPs no controle de peso são ainda incertos. Enquanto camundongos que superexpressam a UCP3 humana em músculos esqueléticos são hiperfágicos e magros (CLAPHAM et al., 2000), camundongos que tiveram este gene desativado não apresentam alterações de peso em relação aos controles (GONG et al., 2000; VIDAL-PUIG et al., 2000).

Nestes últimos anos temos estudado as alterações do metabolismo energético mitocondrial de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos, que superexpressam a apo-CIII humana (HTG). Esses camundongos são um bom modelo de estudo dos efeitos das concentrações plasmáticas elevadas de TG e AGL, sem outros fatores metabólicos relacionados, normalmente presentes na obesidade, resistência à insulina, diabetes e síndrome metabólica. As mitocôndrias de fígado desses animais apresentam um consumo de oxigênio no estado de repouso 23 % maior que mitocôndrias de animais controles, fenômeno que não está relacionado ao aumento da atividade de UCPs ou do translocador de nucleotídeos de adenina (ALBERICI et al., 2003). A partir desta constatação, supusemos que o aumento da respiração refletia a existência de um outro mecanismo adaptativo de dissipação de energia nestes camundongos. Assim, procuramos identificar este mecanismo e verificar sua repercussão *in situ* e *in vivo*.

Verificamos se o excesso de energia fornecida pela induziria o aumento do consumo de O<sub>2</sub> por mitocôndrias isoladas de fígado. Nossos resultados demonstraram que ratos suplementados diariamente com altas concentrações de glicose desenvolveram uma hipertrigliceridemia secundária que, assim como na hipertrigliceridemia primária em camundongos HTG, também modificou a bioenergética de mitocôndrias de fígado, elevando o consumo de O<sub>2</sub> no estado de repouso. O tratamento com dieta rica em gordura, apesar de não ter induzido a hipertrigliceridemia em camundongos controles, aumentou o aporte de AGL aos tecidos desses animais, o que induziu um aumento da respiração no estado de repouso, muito semelhante ao aumento encontrado nos camundongos HTG e nos ratos com hipertrigliceridemia secundária. Essa dieta também não alterou as concentrações de TG plasmáticos em animais HTG, assim como não modificou adicionalmente sua respiração no estado de repouso (que já é elevada mesmo na dieta pobre em gordura) indicando que esta adaptação já se encontra no limite máximo nos camundongos HTG. Esses resultados indicaram a importância não só da hipertrigliceridemia, mas também de elevado aporte de AGL na indução do aumento do consumo de O<sub>2</sub> no estado de repouso, como um mecanismo adaptativo de dissipação de excesso de substrato energético.

Apesar das manipulações dietéticas para a indução de dislipidemias estarem geralmente associadas à indução de UCPs em diversos tecidos (LANGIN, 2003; BAO et al., 1998; SAMEC, et al., 1999), a participação dessa proteína no mecanismo de desacoplamento encontrado em nossos dois modelos de tratamento foi descartada, uma vez que a razão ADP/O não foi alterada pelos tratamentos. Acreditamos que os camundongos HTG, assim como os ratos com hipertrigliceridemia secundária e os camundongos controles submetidos à dieta rica em gordura, desenvolveram um mesmo mecanismo adaptativo mitocondrial de dissipação de energia.

Visto que um aumento na velocidade de respiração de repouso mitocondrial foi induzido pelo aumento do aporte de ácidos graxos aos tecidos de camundongos controles, averiguamos se as elevadas concentrações de lipídios intracelulares são necessárias para que ocorra o aumento da velocidade de respiração de repouso em mitocôndrias de fígados de camundongos HTG. Os tratamentos realizados com ciprofibrato (ALBERICI et al., 2003) ou com insulina diminuíram as concentrações plasmáticas de TG e AGL aumentadas

em camundongos HTG, através da estimulação da atividade da lipoproteína lípase plasmática e da expressão de proteínas de transporte/ligação de ácidos graxos. Porém, somente o ciprofibrato, que aumenta a oxidação intracelular de ácidos graxos, foi capaz de normalizar a respiração de repouso mitocondrial, diferentemente da insulina que inibe a beta-oxidação de ácidos graxos. A interpretação dos efeitos desses dois tratamentos indica que a concentração intracelular de ácidos graxos elevada, secundária à hipertrigliceridemia, é a responsável pela indução do aumento do consumo de O<sub>2</sub> no estado de repouso em mitocôndrias em fígado de camundongos transgênicos.

Para comprovar se os resultados obtidos com mitocôndrias isoladas ocorriam também no ambiente celular, verificamos a bioenergética de mitocôndrias de camundongos HTG *in situ*. A análise do consumo de O<sub>2</sub> pelas células mononucleares de baços revelou que as mitocôndrias *in situ* de camundongos HTG apresentaram uma respiração de repouso elevada, assim como ocorre em mitocôndrias de isoladas de fígado desses animais. Esse resultado demonstrou que o mecanismo de desacoplamento em camundongos HTG ocorre *in situ* e em outros tecidos além do fígado.

Apesar da velocidade de respiração ser regulada pelo potencial de membrana mitocondrial, verificamos que as mitocôndrias HTG e controles *in situ* possuem potenciais de membrana semelhantes. Isto indica que, provavelmente, o desacoplamento em mitocôndrias HTG promove uma ligeira diminuição do potencial de membrana que não pode ser detectado com precisão ou que foi restabelecido pelo aumento da respiração. Embora uma ligeira redução do potencial de membrana mitocondrial, com conseqüente aumento da velocidade de respiração de repouso, possa reduzir a geração de EROs, nossos resultados indicaram que as células mononucleares de baços de camundongos HTG e controles produzem semelhantes quantidades de EROs. Por outro lado, isso indica que o O<sub>2</sub> consumido adicionalmente pelas células HTG está sendo utilizado pelas mitocôndrias e não pelos outros sistemas de geração de EROs. Nessas células, as EROs também podem ser geradas por outras vias além da mitocondrial, como pelo citocromo P-450, sistema xantina-xantina oxidase, via das lipoxigenases e NADPH oxidase de membrana plasmática (ALLEN e TRESINE, 2000), que compõe um sistema bem regulado de produção de EROs, especialmente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que funciona como segundo mensageiro da ativação linfocitária (RETH, 2002).

Nossos resultados anteriores demonstraram que as mitocôndrias de fígado desses animais, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , são mais suscetíveis ao processo de permeabilização da membrana mitocondrial interna provocado pela abertura do poro de TPM (ALBERICI et al., 2003), independente de grandes quantidades de EROs. Adicionando mais informações a este contexto, nossos resultados demonstraram que na presença de agentes pró-oxidantes, as mitocôndrias de fígado HTG produzem maiores quantidades de produtos oxidados, assim como também se mostram mais suscetíveis a permeabilização da membrana mitocondrial interna provocada pelo processo de peroxidação lipídica.

Esses resultados sugerem que pode existir uma maior quantidade de substratos lipídicos nas mitocôndrias HTG que, em situações onde ocorre uma produção excessiva de EROs (na presença de altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  e  $\text{Fe(II)citrato}$ ), servem de substratos para a peroxidação lipídica. Nestas condições, mesmo os  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  agindo como discretos desacopladores, provavelmente não conseguem reduzir a geração de EROs e evitar a peroxidação lipídica em mitocôndrias HTG. Em condições basais, a atividade dos  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  deve diminuir a geração de EROs e dessa forma reduzir o processo de peroxidação lipídica provocado pelo excesso de lipídios.

Outra hipótese é de que o desacoplamento contínuo provocado pelo  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  para aumentar o metabolismo, estaria também reduzindo a geração de EROs e, por conseqüência, promovendo uma regulação negativa do sistema anti-oxidante em mitocôndrias HTG. Em situações de estresse oxidativo induzido por  $\text{Ca}^{2+}$ , esse sistema anti-oxidante “menos eficiente” poderia permitir uma maior formação do radical hidroxil ( $\text{OH}\bullet$ ), que na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{P}_i$ , aumentaria os danos à membrana mitocondrial interna, levando ao processo de permeabilização desta membrana, mediado parcialmente pela abertura do poro de TPM e parcialmente por peroxidação lipídica.

Existem evidências experimentais de que a TPM pode ser um evento essencial em mecanismos de morte celular tanto por apoptose como por necrose (LEMASTERS et al., 1998). O aumento sustentado da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e intramitocondrial pode induzir a TPM. Na morte celular necrótica, o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ocorre por falência dos mecanismos de regulação intracelular da concentração do cátion e a TPM generalizada leva à depleção de ATP seguida de morte celular. No caso da

morte por apoptose, a TPM seria um evento localizado a sítios de aumento regulado do  $\text{Ca}^{2+}$  e a produção do ATP, necessário para este tipo de morte celular, seria preservada às custas de mitocôndrias não atingidas. A abertura do poro de TPM facilitaria a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais tais como Smac/Diablo, fator indutor de apoptose (AIF) e citocromo c. A presença destes fatores no citosol leva a ativação de proteases denominadas caspases, que promovem a morte “limpa”. Desta forma, os experimentos deste trabalho sugerem que os animais hipertrigliceridêmicos são mais susceptíveis à TPM que pode levar a morte celular, seja por necrose ou apoptose, em situações que aumentam os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , ou na presença de agentes pró-oxidantes.

Procuramos ainda identificar o mecanismo de desacoplamento mitocondrial responsável pelo aumento do consumo de  $\text{O}_2$  em mitocôndrias de fígado de camundongos HTG. Nossos resultados demonstraram claramente que este mecanismo adaptativo de dissipação de energia ocorre através de aumento de atividade de canais de  $\text{K}^+$  sensíveis a ATP (mito $\text{K}_{\text{ATP}}$ ). Dentre as principais funções demonstradas do transporte de  $\text{K}^+$  para a matriz mitocondrial através dos mito $\text{K}_{\text{ATP}}$  estão a proteção do miocárdio frente a situações de isquemia e reperfusão (GARLID et al., 1997) e a diminuição da produção de EROs pelas mitocôndrias (FERRANTI et al., 2003). Esses canais permitem a entrada adicional de  $\text{K}^+$  na matriz mitocondrial que é acompanhada de sua extrusão através de um trocador  $\text{K}^+/\text{H}^+$ , com conseqüente diminuição do potencial eletroquímico de  $\text{H}^+$  ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ). A recomposição desse potencial ocorre às custas do aumento da respiração e da oxidação de coenzimas NADH e  $\text{FADH}_2$ . A regeneração destas coenzimas acelera a velocidade do ciclo de Krebs, que assim consome maiores quantidades de grupos acetil derivados da oxidação de glicose, ácidos graxos ou aminoácidos.

Verificamos que este estado catabólico elevado em mitocôndrias de fígado de camundongos HTG resultou em aumento do metabolismo hepático nesses animais, visto que o consumo de  $\text{O}_2$  pelos fígados HTG foi 16 % maior que o consumo dos fígados controles. Este aumento é menor do que os 24 % encontrados nas mitocôndrias isoladas de fígados desses animais, provavelmente devido às mitocôndrias no fígado intacto estarem em um estado um pouco mais próximo de fosforilação oxidativa, e não totalmente em estado de repouso como obtido com mitocôndrias isoladas. O tratamento dos camundongos com 5-HD, um inibidor dos mito $\text{K}_{\text{ATP}}$ , restabeleceu o consumo de  $\text{O}_2$  em fígados de

camundongos HTG para o nível dos controles, caracterizando o envolvimento desses canais. Esses resultados demonstraram que os fígados íntegros de camundongos HTG refletem o aumento no consumo de  $O_2$  mitocondrial promovido pelos mitoK<sub>ATP</sub>.

Devido ao fígado ter um papel importante no metabolismo oxidativo corporal, verificamos alguns parâmetros metabólicos corporais dos camundongos HTG. Constatamos que esses camundongos produziram maiores quantidades de  $CO_2$  quando comparados aos controles, provavelmente devido ao aumento da velocidade do ciclo de Krebs, que a cada volta gera também duas moléculas de  $CO_2$ . A temperatura corporal elevada encontrada em camundongos HTG é também um outro indicativo de que nesses animais ocorre um aumento de metabolismo. Como resultado do curto circuito de  $H^+$  pela membrana mitocondrial interna, a energia da oxidação de substratos não é conservada pela formação de ATP, mas é dissipada na forma de calor, elevando a temperatura corporal desses camundongos.

Todos os resultados sugerem que o aumento de metabolismo corporal em camundongos HTG se deva ao aumento de atividade de mitoK<sub>ATP</sub> em mitocôndrias de fígado e provavelmente de outros tecidos desses animais. Para fazermos esta afirmação, seria necessário verificar se o tratamento crônico *in vivo* desses animais com antagonistas do mitoK<sub>ATP</sub> restabeleceria o metabolismo dos camundongos HTG ao nível dos controles. Isso é inviável devido a aos demais efeitos sistêmicos provocados por esses fármacos. Por exemplo, as sulfoniluréias (glibenclamida, tolbutamida e outras) são utilizadas no tratamento do diabetes, aumentam a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas e podem causar hipoglicemia em controles não-diabéticos. Além disso, diminuem a depuração hepática da insulina e suprimem discretamente a secreção do hormônio glucagon (GOODMAN e GILMAN, 1996). Nesses casos, o efeito antagonista dos mitoK<sub>ATP</sub> no metabolismo de camundongos HTG poderia ser mascarado por outras alterações metabólicas e efeitos colaterais provocados pela administração dos fármacos.

De qualquer maneira, esta resposta adaptativa das mitocôndrias ao excesso de substrato energético intracelular teve uma potente repercussão *in vivo*. Ao aumentar de modo global o metabolismo corporal, os camundongos HTG aumentaram também a ingestão alimentar e puderam manter o peso corporal apesar da hipertrigliceridemia e da hiperfagia.



## ***6- CONCLUSÕES***



Nossos resultados demonstraram que concentrações intracelulares elevadas de ácidos graxos, tanto na hipertrigliceridemia primária quanto na secundária, modificam a bioenergética de mitocôndrias de fígado, elevando o consumo de  $O_2$  no estado de repouso. Na hipertrigliceridemia primária esse aumento ocorre devido a atividade dos mitoK<sub>ATP</sub> em fígados, que eleva o metabolismo corporal nestes camundongos transgênicos. Esse mecanismo pode representar uma resposta adaptativa para oxidar o excesso de ácidos graxos intracelulares. Nosso trabalho atribui uma nova função para o canal mitocondrial de K<sup>+</sup> sensível a ATP na regulação do metabolismo de substratos energéticos intracelulares e possivelmente no controle do peso corporal.





## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



AALTO-SETALA, K; FISHER E. A; CHEN X.; CHAJEK-SHAUL T.; HAYEK T.; ZECHNER, R. et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. **J Clin Invest**, 90: 1889-900, 1992.

AALTO-SETALA K.; WEINSTOCK P. H.; BISGAIER, C. L.; WU, L.; SMITH, J. D.; BRESLOW, J. L. Further characterization of the metabolic properties of triglyceride-rich lipoproteins from human and mouse apoC-III transgenic mice. **J Lipid Res**, 37: 1802-11, 1996.

ACTON, S.; RIGOTTI, A.; LANDSCHULZ, K. T.; XU, S.; HOBBS, H. H.; KRIEGER, M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. **Science**, 271: 518-20, 1996.

ALBERICI, L.C; OLIVEIRA, H.C; BIGHETTI, E.J, DE FARIA, E.C, DEGASPARI, G.R, SOUZA, C.T, VERCESI, A.E. Hypertriglyceridemia increases mitochondrial resting respiration and susceptibility to permeability transition. **J Bioenerg Biomembr**, 35(5):451-7, 2003.

ALLEN, R.G; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic Biol Med**, 28:463-99, 2000.

ANDREYEV, A. Y.; BONDAREVA, T. O.; DEDUKHOVA, V. I.; MOKHOVA, E. N.; SKULACHEV, V. P.; TSOFINA, L. M. et al. The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. **Eur J Biochem**, 182: 585-92, 1989.

ARDEHALI H; CHEN Z,KO Y; MEJIA-ALVAREZ R; MARBAN E. Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101(32): 11880-5, 2004.

BAJGAR, R; SEETHARAMAN, S; KOWALTOWSKI, A.J; GARLID, K.D; PAUCEK, P. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. **J Biol Chem.**, 276:33369-74, 2001.

BAO, S; KENNEDY, A; WOJCIECHOWSKI, B; WALLACE, P; GANAWAY, E; GARVEY, W.T. Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes. **Diabetes.**, 47:1935-1940, 1998.

BEDNARCZYK, P; DOLOWY, K; SZEWCZYK, A. Matrix Mg<sup>2+</sup> regulates mitochondrial ATP-dependent potassium channel from heart. **FEBS Lett.**, 579:1625-32, 2005.

BERGSETH, S.; CHRISTIANSEN. E. N.; BREMER, J. The effect of feeding fish oils, vegetable oils and clofibrate on the ketogenesis from long chain fatty acids in hepatocytes. **Lipids**, 21: 508-14, 1986.

BINDOLI A. Lipid peroxidation in mitochondria. **Free Radic Biol Med**, 5(4):247-61, 1988.

BODNAR JS, CHATTERJEE A, CASTELLANI LW, ROSS DA, OHMEN J, CAVALCOLI J; et al. Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene Hyplip1. **Nat Genet**, 30(1):110-6, 2002.

BOSS, O; BOBBIONI-HARSCH, E; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F; MUZZIN, P; MUNGER, R; GIACOBINO, J.P; et al. Uncoupling protein-3 expression in skeletal muscle and free fatty acids in obesity. **Lancet.**, 351:1933, 1998.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, 134: 707-16, 1973.

BREMER, J. The biochemistry of hypo- and hyperlipidemic fatty acid derivatives: metabolism and metabolic effects. **Prog Lipid Res**, 40: 231-68, 2001.

BREWER, H.B; SHULMAN, R; HERBERT, P; RONAN, R; WEHRLY, K. The complete amino acid sequence of alanine apolipoprotein (apoC-3), and apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins. **J Biol Chem**, 249: 4975-84, 1974.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, 232: 34-47, 1986.

BRUCE, C.; CHOUINARD, R. A. JR.; TALL, A. R. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. **Annu Rev Nutr**, 18: 297-330, 1998.

BUEGE, J. A; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 52:302-10, 1978.

CADENAS, E.; BOVERIS, A.; RAGAN, C. I.; STOPPANI, A. O. M. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 180: 248-257, 1977.

CANCHERINI, D.V; TRABUCO, L.G; REBOUCAS, N.A; KOWALTOWSKI, A.J. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in renal mitochondria. **Am J Physiol Renal Physiol.**, 285:1291-6, 2003.

CLAPHAM, J.C, ARCH JR, CHAPMAN H, HAYNES A, LISTER C, MOORE GB, et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. **Nature**, 406:415-8, 2000.

CARLSON, L.A; BALLANTYNE, D. Changing relative proportions of apolipoproteins CII and CIII of very low density lipoproteins in hypertriglyceridaemia. **Atherosclerosis**, 23(3):563-8, 1976.

CARMENA, R., ORDOVÁS J.M. **Hiperlipemias. Clínica e tratamento**. São Paulo, AP Americana de Publicações,1999. p.109-127.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; MEINICKE, A. R.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A.E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca<sup>2+</sup> ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radical Biol Med**, 18: 479-486, 1995.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A.E. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J. Bioenerg. Biomembr**, 28: 523-529, 1996.

CHALASANI, N; DEEG, M.A; CRABB, D.W. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Gastroenterol**, 99(8):1497-502, 2004.

CHANCE B, WILLIAMS GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv Enzymol Relat Subj Biochem**, 17:65-134, 1956.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **J Lipid Res**, 42: 1007-17, 2001.

DEPIERRE, J.W; ERNSTER, L. Enzyme topology of intracellular membranes. **Annu Rev Biochem**, 46:201-62, 1977.

DUIVENVOORDEN, I; TEUSINK, B; RENSEN, P.C; ROMIJN, J.A; HAVEKES, L.M; VOSHOL, P.J. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. **Diabetes**, 54(3):664-71, 2005.

FAGIAN, M. M.; PEREIRA DA SILVA, L.; MARTINS, I. S.; VERCESI, A. E. Membrane protein thiol cross-linking associated by  $Ca^{2+}$  plus prooxidants. **J Biol Chem**, 265: 19955-19960, 1990.

FERRANTI, R; DA SILVA, MM; KOWALTOWSKI, A.J. Mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channel opening decreases reactive oxygen species generation. **FEBS Lett.**, 536:51-5, 2003.

GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MARI, M.; MORALES, A.; FERNANDEZ-CHECA, J. C. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. **J Biol Chem**, 272: 11369-77, 1997.

GARLID, K.D; PAUCEK, P. Mitochondrial potassium transport: the  $K^+$  cycle. **Biochim Biophys Acta.**, 1606:23-41, 2003. Review.

GARLID, K.D; OROSZ, D.E.; MODRIANSKY, M.; VASSANELLI, S.; JEZEK, P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. **J Biol Chem**, 271(5): 2615-20, 1996.

GARLID KD. Unmasking the mitochondrial K/H exchanger: swelling-induced K<sup>+</sup>-loss. **Biochem Biophys Res Commun**, 83(4): 1450-5, 1978.

GARLID, K.D; PAUCEK, P; YAROV-YAROVOY, V; MURRAY, H.N; DARBENZIO, R.B; D'ALONZO, A.J; LODGE, N.J; SMITH, M.A; GROVER, G.J. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. **Circ Res.**, 81:1072-82, 1997.

GINSBERG, H. N. Diabetic dyslipidemia: basic mechanisms underlying the common hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol levels. **Diabetes**, 45: 27-30, 1996.

GINSBERG, H. N.; ILLINGWORTH, D. R. Postprandial dyslipidemia: an atherogenic disorder common in patients with diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, 88: 9H-15H, 2001.

GLOMSET, J. A. The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. **J Lipid Res**, 9: 155-67, 1968.

GONG, D.W; HE, Y; KARAS, M; REITMAN, M. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. **J Biol Chem.**, 272:24129-24132, 1997.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da Terapêutica**. Espanha, The MacGraw-Hill Companies, Inc., 1996. p. 1118-1120.

GORNALL, A.G.; BARDWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **J Biol Chem**, 177: 751-766, 1949.

GRANNER, D; PILKISM S. The genes of hepatic glucose metabolism. **J Biol Chem**. 265(18):10173-6, 1990.

GREEN, D.R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281: 1309-1312, 1998.

GREEN, D.R; KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? **J Clin Invest.**, 115:2610-7, 2005.

GROVER, G.J. AND GARLID, K.D. ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. **J Mol Cell Cardiol** 32, 677–695, 2000.

HALLIWELL, B and GUTTERIDGE, JMC in Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press – Oxford, pp. 188-277, 1989.

HANSEN, B. C. The metabolic syndrome X. **Ann N Y Acad Sci**, 892: 1-24, 1999.

HESLER, C. B.; SWENSON, T. L.; TALL, A. R. Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein. **J Biol Chem**, 262: 2275-82, 1987.

HERMES-LIMA M, CASTILHO RF, MEINICKE AR, VERCESI AE. Characteristics of Fe(II)ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondrial membrane. **Mol Cell Biochem**, 145(1):53-60, 1995.

HERZ, J.; HAMANN, U.; ROGNE, S.; MYKLEBOST, O.; GAUSEPOHL, H.; STANLEY, K. K. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. **Embo J**, 7: 4119-27, 1988.

HIDAKA, S; YOSHIMATSU, H; KAKUMA, T; SAKINO, H; KONDOU, S; HANADA, R. Tissue-specific expression of the uncoupling protein family in streptozotocin-induced diabetic rats. **Proc Soc Exp Biol Med.**, 224:172-177, 2000.

INOUE I,NAGASE H,KISHI K,HIGUTI T ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane. **Nature**, 352(6332): 244-7, 1991.

ITO, Y.; AZROLAN, N.; O'CONNELL, A.; WALSH, A.; BRESLOW, J. L. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. **Science**, 249: 790-3, 1990.

KLINGENBERG, M . Uncoupling proteins--how do they work and how are they regulated. **IUBMB Life**, 52:175-9, 2001.

KOBAYASHI, M.; OLEFSKY J. M. Effect of experimental hyperinsulinemia on insulin binding and glucose transport in isolated rat adipocytes. **Am. J. Physiol**, 235: E53-62, 1978.

KRAUSS, S. ZHANG, C.Y; LOWELL, B.B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 6:248-61, 2005.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 26: 463-71, 1999.

KOWALTOWSKI A. J.; CASTILHO R. F.; GRIJALBA M. T.; BECHARA E.J.; VERCESI A. E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca<sup>2+</sup> ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol Chem**, 271: 2929-34, 1996A.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca<sup>2+</sup> is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett**, 378: 150-152, 1996B.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 26: 463-71, 1999.

KOWALTOWSKI, A.J; CASTILHO, R.F; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, 495:12-5, 2001.

KOWALTOWSKI, A.J; SEETHARAMAN, S; PAUCEK, P; GARLID, K.D. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 280:H649-57, 2001.

LACZA Z, SNIPES JA, KIS B, SZABO C, GROVER G & BUSIJA DW. Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in the brain. **Brain Res**, 994: 27–36, 2003.

LAMPING, K.A; WARLTIER, D.C; HARDMAN, H.F; GROSS, G.J. Effects of nicorandil, a new antianginal agent, and nifedipine on collateral blood flow in a chronic coronary occlusion model. **J Pharmacol Exp Ther.**, 229:359-63, 1984.

LANDSCHULZ, K. T.; PATHAK, R. K.; RIGOTTI, A.; KRIEGER, M.; HOBBS, H. H. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. **J Clin Invest**, 98: 984-95, 1996.

LANGIN, D. The role of uncoupling protein 2 in the development of type 2 diabetes. **Drugs Today (Barc)**, 39:287-95, 2003.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol**, 5: 227-31, 1992.

LEMASTERS, J. J.; NIEMINEN, A. L.; QIAN, T.; TROST, L. C.; ELMORE, S. P.; NISHIMURA, Y. et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, 1366: 177-196, 1998.

LENICH, C; BRECHER, P; MAKRIDES, S; CHOBANIAN, A; ZANNIS, V.I. Apolipoprotein gene expression in the rabbit: abundance, size, and distribution of apolipoprotein mRNA species in different tissues. **J Lipid Res**, 29: 755-64, 1988.

LETTERON P, FROMENTY B, TERRIS B, DEGOTT C, PESSAYRE D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. **J Hepatol**, 24(2):200-8, 1996.

MACEDO, D. V.; FERRAZ, V. L.; PEREIRA DA SILVA, L.; VERCESI, A. E. Ca<sup>2+</sup> - dependent NAD(P)<sup>+</sup>-induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. In: Integration of Mitochondrial Function, Ed. J. Lemasters, Plenum, New York, 1988, p. 535-542.

MALLOY, M. J.; KANE, J. P. A risk factor for atherosclerosis: triglyceride-rich lipoproteins. **Adv Intern Med**, 47: 111-36, 2001.

MERRYFIELD, M. L.; LARDY, H. A. Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of Fe<sup>2+</sup> from rat liver **J Biol Chem**, 257: 3628-3635, 1982.

MILLER, M. Current perspectives on the management of hypertriglyceridemia.

**Am Heart J**, 140(2): 232-40, 2000.

MIRONOVA, G.D; NEGODA, A.E; MARINOV, B.S; PAUCEK, P; COSTA, A.D; GRIGORIEV, S.M; SKARGA, Y.Y; GARLID, K.D. Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channel (mitoKATP) and its inward rectifier subunit (mitoKIR). **J Biol Chem.**, 279:32562-8, 2004.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, 191: 144-148, 1961.

NETTO, L.E; KOWALTOWSKI, A.J; CASTILHO, R.F; VERCESI, A.E. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. **Methods Enzymol**, 348:260-70, 2002.

NICHOLLS, D.G. The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria. **FEBS Lett.** 61: 103-110, 1976.

NICHOLLS, D.G.; ÅKERMAN, K. E. O. Mitochondrial calcium transport. **Biochim Biophys Acta**, 683: 57-88, 1982.

NICHOLLS, D.G. Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, 34:1372-81, 2002.

NOGUCHI O, TAKEUCHI H, KUBOTA F, TSUJI H, AOYAMA T. Larger diet-induced thermogenesis and less body fat accumulation in rats fed medium-chain triacylglycerols than in those fed long-chain triacylglycerols. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, 48(6):524-9, 2002.

NOSAKA N, MAKI H, SUZUKI Y, HARUNA H, OHARA A, KASAI M, et al. Effects of margarine containing medium-chain triacylglycerols on body fat reduction in humans. **J Atheroscler Thromb**, 10(5):290-8, 2003.

ORAM, J. F.; LAWN, R.M.; GARVIN, M. R.; WADE, D. P. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. **J Biol Chem**, 275: 34508-11, 2000.

PAUCEK, P; YAROV-YAROVOY, V; SUN, X; GARLID, K.D. Inhibition of the mitochondrial KATP channel by long-chain acyl-CoA esters and activation by guanine nucleotides. **J Biol Chem.**, 271:32084-8, 1996.

PAUCEK, P; MIRONOVA, G; MAHDI, F; BEAVIS, A.D; WOLDEGIORGIS, G; GARLID, K.D. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K<sup>+</sup> channel from rat liver and beef heart mitochondria. **J Biol Chem.**, 267:26062-9, 1992.

PETERSEN, P. Ultrastructure of periportal and centrilobular hepatocytes in human fatty liver of various aetiology. **Acta Pathol Microbiol Scand**, 85: 421-7, 1977.

REAVEN, G.M.; MONDON, C. E.; CHEN, Y. D.; BRESLOW, J. L. Hypertriglyceridemic mice transgenic for the human apolipoprotein C-III gene are neither insulin resistant nor hyperinsulinemic. **J Lipid Res**, 35: 820-4, 1994.

ROBINSON, J.; COOPER, J. M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Anal Biochem**, 33: 390-399, 1970.

ROTTENBERG, H; WU, S. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. **Biochim Biophys Acta**, 1404(3):393-404, 1998.

RUMLEY AG, WOODWARD M, RUMLEY A, RUMLEY J, Lowe GD. Plasma lipid peroxides: relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. **QJM**, 97(12):809-16, 2004.

SCHONFELD, G; GEORGE, P.K; MILLER, J; REILLY, P; WITZTUM, J. Apolipoprotein C-II and C-III levels in hyperlipoproteinemia. **Metabolism**, 28(10):1001-10, 1979.

SAMEC, S; SEYDOUX, J; DULLOO, A.G. Post-starvation gene expression of skeletal muscle uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 in response to dietary fat levels and fatty acid composition: a link with insulin resistance. **Diabetes.**, 48:436-441, 1999.

SCHNEIDER, W. C.; HOGEBROOM, G. H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. **J Biol Chem**, 183: 123-128, 1950.

SIEMEN D, LOUPATATZIS C, BORECKY J, GULBINS E, LANG F Ca<sup>2+</sup>-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. **Biochem Biophys Res Commun**, 257(2): 549-54, 1999.

SKULACHEV, V. P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS Lett**. 294: 158-62, 1991.

STAMLER. J.; VACCARO, O.; NEATON, J. D.; WENTWORTH, D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Diabetes Care**, 16(2): 434-44, 1993.

ST-ONGE MP, JONES PJ. Greater rise in fat oxidation with medium-chain triglyceride consumption relative to long-chain triglyceride is associated with lower initial body weight and greater loss of subcutaneous adipose tissue. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 12:1565-71, 2003.

SUTTON, H.C; WINTERBOURN, C.C. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. **Free Radic Biol Med**, 6(1):53-60, 1989.

SUZUKI M, KOTAKE K, FUJIKURA K, INAGAKI N, SUZUKI T, GONOI T, SEINO S & TAKATA K. Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, 241, 693-697, 1997.

TAI KK, MCCROSSAN ZA & ABBOTT GW. Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels increases cell viability against rotenone-induced cell death. **J Neurochem** 84, 1193-1200, 2003.

TALL, A.R., JIANG, X.; LUO, Y.; SILVER, D. 1999 George Lyman Duff memorial lecture: Lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20: 1185-8, 2000.

TURRENS, J. F., BOVERIS, A. Generation of the superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J**, 191: 421-427, 1980.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosci Rep** 17: 3-8, 1997.

VAN HARKEN, D.R.; DIXON, C.W.; HEIMBERG, M. Hepatic lipid metabolism in experimental diabetes. V. The effect of concentration of oleate on metabolism of triglycerides and on ketogenesis. **J Biol Chem**, 244(9): 2278-85, 1969.

VERCESI, A. E.; MARTINS, I. S.; SILVA, M. A. P.; LEITE, H. M. F.; CUCCOVIA, I. M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**, 375: 24, 1995.

VERCESI, A.E; KOWALTOWSKI, A.J; GRIJALBA, M.T; MEINICKE, A.R; CASTILHO, R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosci Rep.**, 17(1):43-52, 1997.

VIDAL-PUIG, A.J; GRUJIC, D; ZHANG, C.Y; HAGEN, T; BOSS, O; IDO, Y; et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. **J Biol Chem.**, 275:16258-16266, 2000.

VOET, D; VOET, J.G. AND PRATT, C.W. Fundamentals of Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. USA, 2001.

ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GOMEZ-MONTERREY, I.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **J Exp Med**, 183: 1533-1544, 1996.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol. Ther**, 92: 57-70, 2001.

ZHANG, P; LIUM B; KANG, S.W; SEO, M.S; RHEE, S.G; OBEID, L.M. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. **J Biol Chem**, 272(49):30615-8, 1997.

ZHU, S; ST-ONGE, M.P; HESHKA, S; HEYMSFIELD, S.B. Lifestyle behaviors associated with lower risk of having the metabolic syndrome. **Metabolism.**, 53:1503-11, 2004.

WALTER, A.; GUTKNECHT, J. Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. **J Membr Biol**, 77(3): 255-64, 1984.

WATABE S, HIROI T, YAMAMOTO Y, FUJIOKA Y, HASEGAWA H, YAGO N, TAKAHASHI, S.Y. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. **Eur J Biochem**, 249(1):52-60, 1997.

WILCOX, H.G.; HEIMBERG, M. The isolation of human serum lipoproteins by zonal ultracentrifugation. **Biochim Biophys Acta**,152(2): 424-6, 1968.

WILSON J.D. Disorders of Lipid Metabolism. In: Williams, R.H. **Textbook of endocrinology**. 9a. ed. Philadelphia: Saunders, 1998. p.1099-155

WILSON FH, HARIRI A, FARHI A, ZHAO H, PETERSEN KF, TOKA HR, NELSON-WILLIAMS C et al. A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. **Science**, 306:1190-4, 2004.

YESILBURSA D, SERDAR Z, SERDAR A, SARAC M, COSKUN S, JALE C. Lipid peroxides in obese patients and effects of weight loss with orlistat on lipid peroxides levels. **Int J Obes Relat Metab Disord**. 2004;





***8- TABELAS E  
FIGURAS***



**Tabela 1** - Classificação das hipertrigliceridemias primárias.

Doença	Gene mutante	Classe de partículas aumentadas	Defeito metabólico	Prevalência
Deficiência familiar de LPL	LPL	QM	↓ catabolismo QM	1/10 <sup>6</sup>
Deficiência familiar de apoC-II	Apo-CII	QM	↓ catabolismo QM	1/10 <sup>6</sup>
HTG familiar	desconhecido	QM e VLDL	↓ catabolismo VLDL ↑ síntese VLDL, QM	0,5-1/100
Disbetalipo-proteinemia familiar	desconhecido	IDL e QM rem	↓ catabolismo IDL ↓ catabolismo QMrem	1/10 <sup>4</sup>

HTG; hipertrigliceridemia; LPL, lipoproteína lípase; QM, quilomicron; VLDL, lipoproteína de baixa densidade; apo-CII, apolipoproteína CII;

**Tabela 2** - Concentrações plasmáticas de triglicérides (TG) em ratos submetidos à suplementação crônica com glicose ou água, e em camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles submetidos à dieta rica em gordura ou à dieta padrão.

Animais	Linhagem (n)	Tratamento	TG (mg/dl)
Ratos	Wistar (25)	Suplementação glicose	172 ± 9 <sup>a</sup>
	Wistar (24)	Suplementação água	91 ± 7 <sup>a</sup>
Camundongos	HTG (7)	Dieta rica em gordura	510 ± 50 <sup>b,c</sup>
	Controles (12)	Dieta rica em gordura	73 ± 7 <sup>b</sup>
	Controles (9)	Dieta padrão	73 ± 15 <sup>c</sup>

Média ± epm: Mesmos símbolos <sup>a, b, c</sup> são estatisticamente diferentes. p < 0,001. Suplementação com glicose 0,8 g /100 g peso/dia por 3 semanas. Dieta rica em gordura (14%) por 20 semanas.

**Tabela 3** - Efeito da suplementação crônica com glicose na respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.

	CR	estado III	estado IV	ADP/O	FCCP
Tratados	3,9 ± 0,10*	69,3 ± 1,2*	17,9 ± 0,3 <sup>#</sup>	1,6 ± 0,2	91,3 ± 4,3
Controles	4,72 ± 0,08	63,5 ± 1,4	13,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	91,3 ± 9,6

As mitocôndrias foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM pH 7.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, succinato 5 mM, rotenona 2 µM e EGTA 0,5 mM. O estado III foi iniciado com a adição de 200 nmol ADP. FCCP 1 µM. CR: controle respiratório (estado III/estado IV). Média ± epm (n = 11). Valores em nmoles O<sub>2</sub>/mg proteína/min. Tratados versus controles nas mesmas condições: \*p < 0,001; <sup>#</sup>p<0,0001.

**Tabela 4** - Consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles submetidos à dieta rica em gordura ou à dieta padrão.

Camundongo/dieta	estado III	estado IV	CR	ADP/O
HTG/ rica em gordura	70,2 ± 2,3	17,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,06 <sup>c</sup>	1,3 ± 0,01
controles/ rica em gordura	69,2 ± 1,3	16,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	4,1 ± 0,05 <sup>d</sup>	1,2 ± 0,03
controles/ padrão	64,4 ± 3,2	13,7 ± 0,2 <sup>ab</sup>	4,6 ± 0,07 <sup>cd</sup>	1,2 ± 0,02

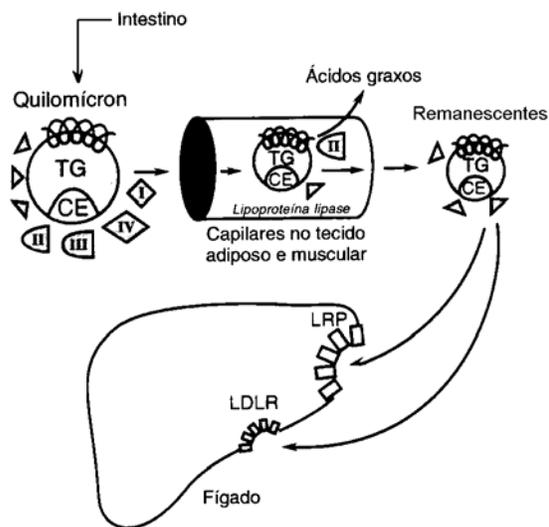
As mitocôndrias foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM pH 7.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, succinato 5 mM, rotenona 2 µM e EGTA 0,5 mM. O Estado III foi iniciado após a adição de 200 nmol ADP. Valores de velocidade de respiração em nmoles O<sub>2</sub>/mg proteína/min. CR: controle respiratório (estado III/estado IV). Média ± epm (n = 9). Mesmos símbolos <sup>a,b,c,d</sup> são estatisticamente diferentes (p<0.05).

**Tabela 5** - Concentrações plasmáticas de triglicérides (TG) e consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles submetidos ao tratamento crônico com insulina ou salina.

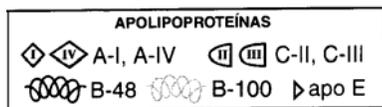
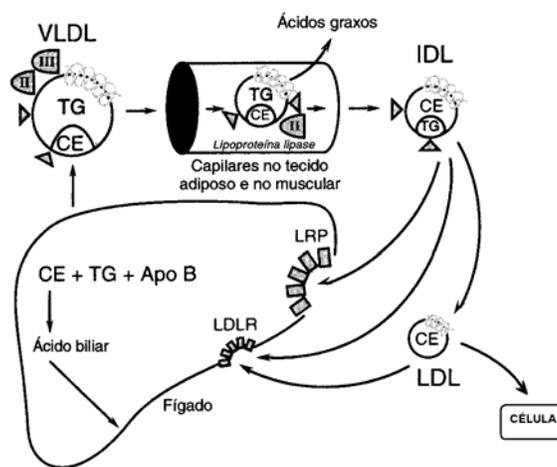
Camundongo (tratamento)	TG (mg/dl)	estado III	estado IV	CR	ADP/O
HTG (salina)	481 ± 91,2 <sup>e</sup>	63,5 ± 1,7	15,4 ± 0,5 <sup>c</sup>	4,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,02
HTG (insulina)	340 ± 55,9 <sup>e</sup>	60,2 ± 2,2	15,0 ± 0,5 <sup>d</sup>	4,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,28 ± 0,02
Controles (salina)	60 ± 10 <sup>e</sup>	60,9 ± 3,2	13,0 ± 0,6 <sup>c,d</sup>	4,6 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	1,28 ± 0,03

As mitocôndrias foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM pH 7.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, succinato 5 mM, rotenona 2 µM e EGTA 0,5 mM. O Estado III foi iniciado após a adição de 200 nmol ADP. Valores de velocidade de respiração em nmoles O<sub>2</sub>/mg proteína/min. CR: controle respiratório (estado III/estado IV). Média ± epm (n = 6). Mesmos símbolos <sup>a,b,c,d,e</sup> são estatisticamente diferentes (p<0.05).

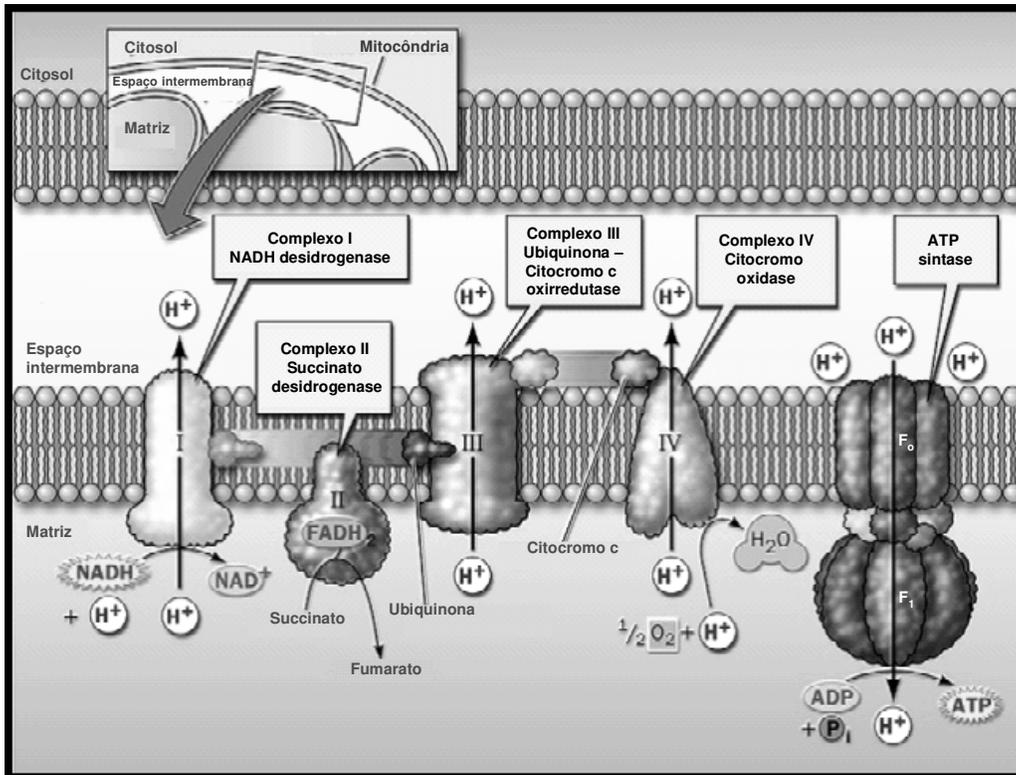
A)



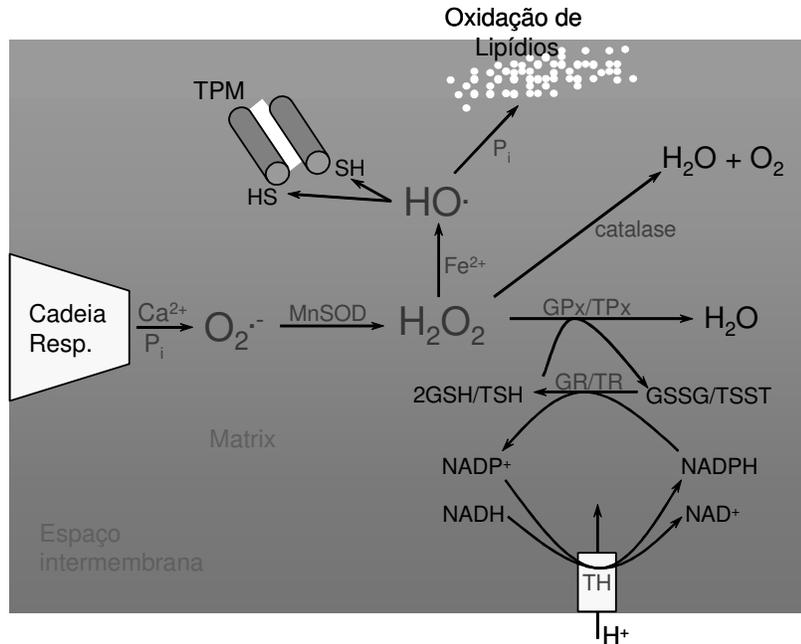
B)



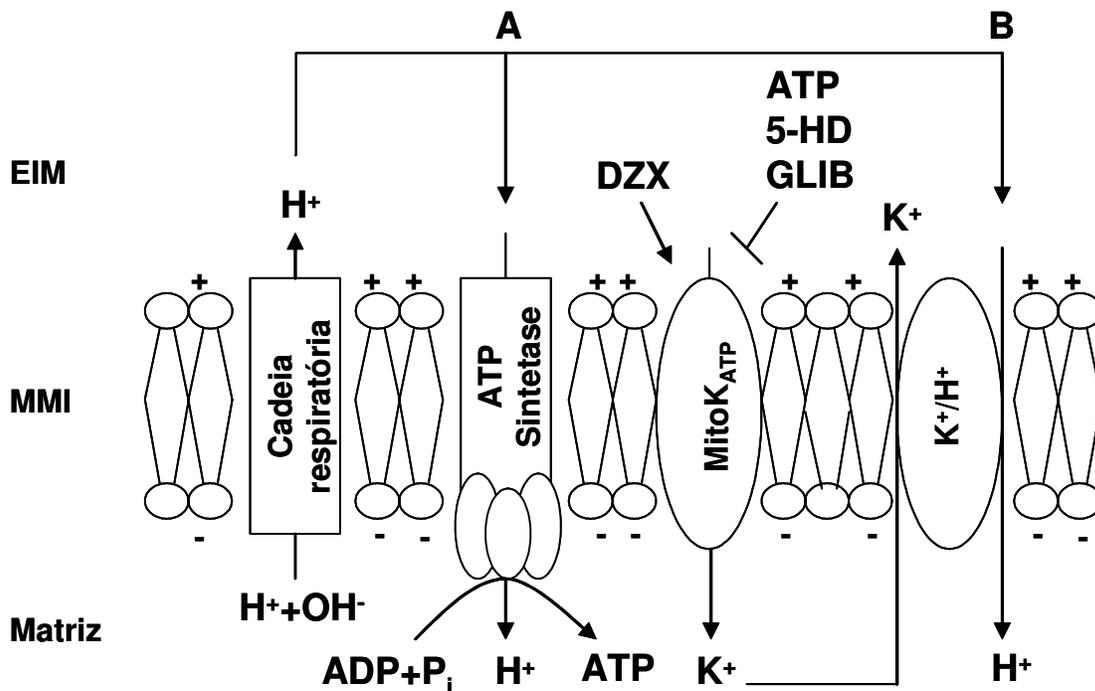
**Figura 1** - Vias de transporte de lipídios no plasma. A) Via exógena; B) Via endógena; TG, triglicerídeo; CE, colesteril éster; apolipoproteínas A-I, A-IV, C-II, C-III, E, B-100, B-48; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; LDLR, receptor de LDL; LRP, proteína relacionada ao receptor de LDL; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; IDL, lipoproteínas de densidade intermediária. (Adaptado de Witztum, 1996)



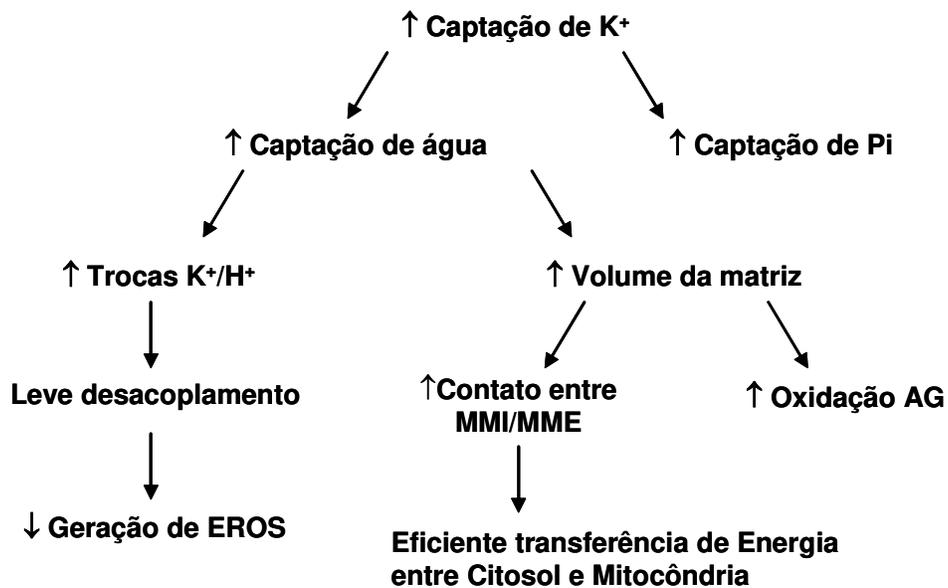
**Figura 2-** Versão simplificada da cadeia respiratória e teoria quimiosmótica (LEHNINGER, 2000). Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo tanto um gradiente químico ( $\Delta pH$ ) quanto elétrico ( $\Delta \Psi$ ). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, os quais podem reentrar na matriz através de canais específicos de prótons ( $F_0$ ). A força próton-motora que impulsiona os prótons de volta para a matriz fornece a energia para a síntese do ATP, catalisada pelo complexo  $F_1$  associado com  $F_0$ .



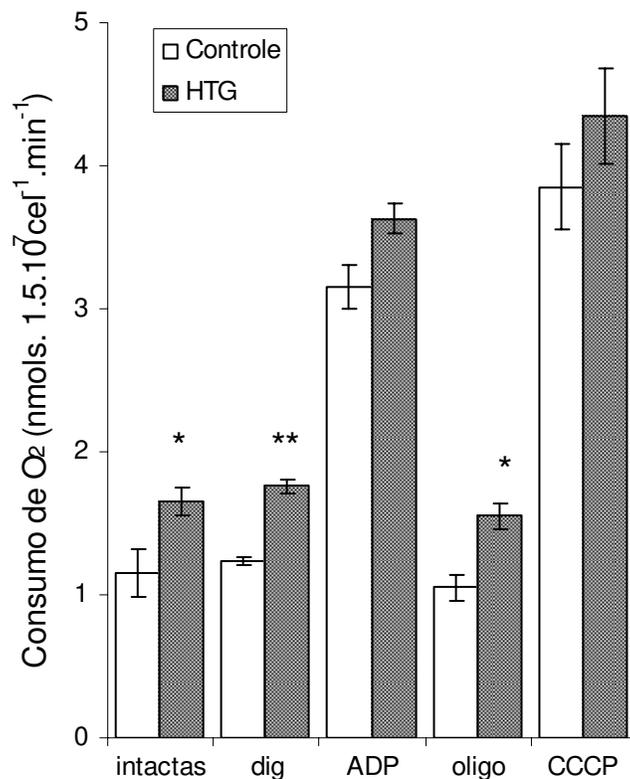
**Figura 3 - Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  e EROs na membrana mitocondrial interna (KOWALTOWSKI et al., 2001).** A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, gera constantemente pequenas quantidades de radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Estes radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), gerando  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é então reduzido à  $\text{H}_2\text{O}$  pela glutatona peroxidase (GPx), tioredoxina peroxidase (TPx) ou catalase (em mitocôndrias de coração). A glutatona (GSH), oxidada pela GPx e a tioredoxina (TSH), oxidada pela TPx, são recuperados pelo sistema enzimático glutatona e tioredoxina redutases (GR e TR), que usam NADPH como doador de elétrons. O  $\text{NADP}^+$  é regenerado pela transidrogenase (TH) as custas de NADH. Quando a geração de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  aumenta na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{P}_i$ , ou quando os mecanismos de remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  estão exauridos, acumula-se  $\text{H}_2\text{O}_2$  que na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ , gera o radical  $\text{OH}^{\bullet}$ .  $\text{OH}^{\bullet}$  oxida grupos tiólicos (-SH) proteicos gerando o poro de TPM. Alternativamente,  $\text{OH}^{\bullet}$  pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por  $\text{P}_i$ . GSSG: glutatona oxidada. TSST: tioredoxina oxidada.



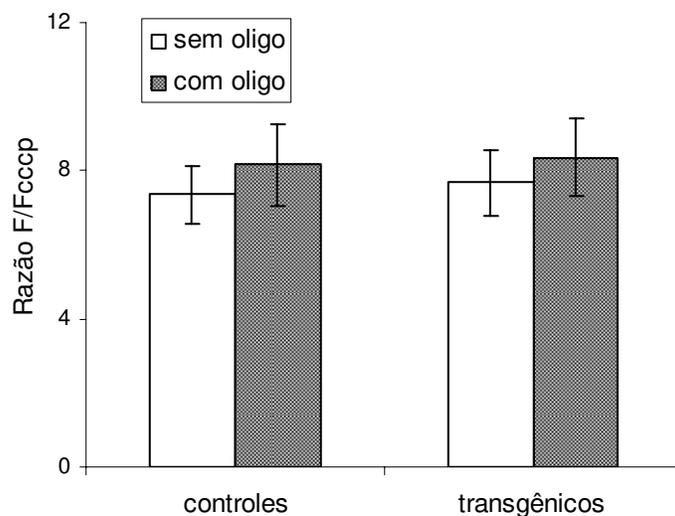
**Figura 4 - Mecanismo de transporte de  $K^+$  através da membrana mitocondrial interna (MMI).** A cadeia respiratória gera um gradiente de prótons que é utilizado pela ATP sintetase para promover a fosforilação do ADP (fosforilação oxidativa, via A). O  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  transporta  $K^+$  para a matriz, processo que pode ser inibido por ATP, Glibenclamida (GLIB) ou ácido 5-hidroxidecanóico (5-HD) e estimulado por diazóxido (DZX). A saída de  $K^+$  para fora da matriz ocorre por um processo eletroneutro em troca por um  $H^+$  através de um trocador  $K^+/H^+$ , resultando em pequeno desacoplamento (via B). EIM: espaço intermembranas.



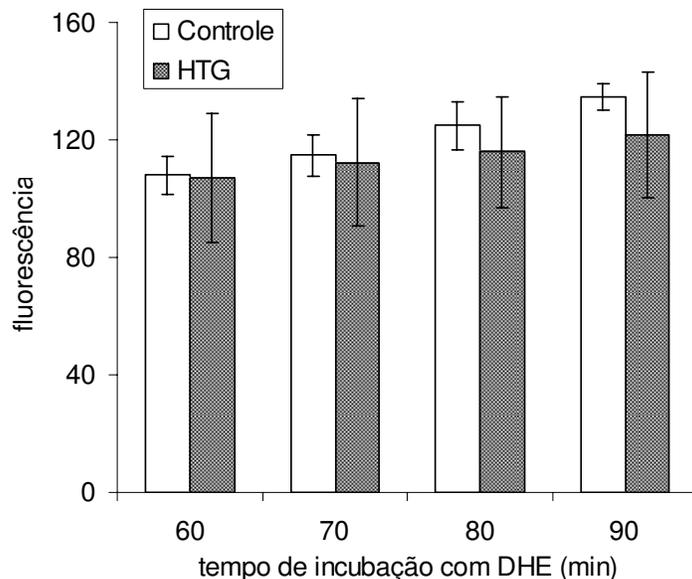
**Figura 5 - Modelo proposto sobre os efeitos da captação elevada de  $K^+$  pela mitocôndria.** O aumento do volume da matriz pode ativar a transferência de elétrons, especialmente quando providos da oxidação de ácidos graxos. Em adição, um aumento no volume da matriz diminui o espaço intermembranas e aumenta o contato entre MMI e MME. Esse processo diminui o transporte de ATP e ADP através das membranas mitocondriais, o que favorece o transporte de fosfatos de alta energia da mitocôndria para o citosol na forma de creatina-fosfato (FACUNDO et al, 2005). MMI: membrana mitocondrial interna. MME: membrana mitocondrial externa.



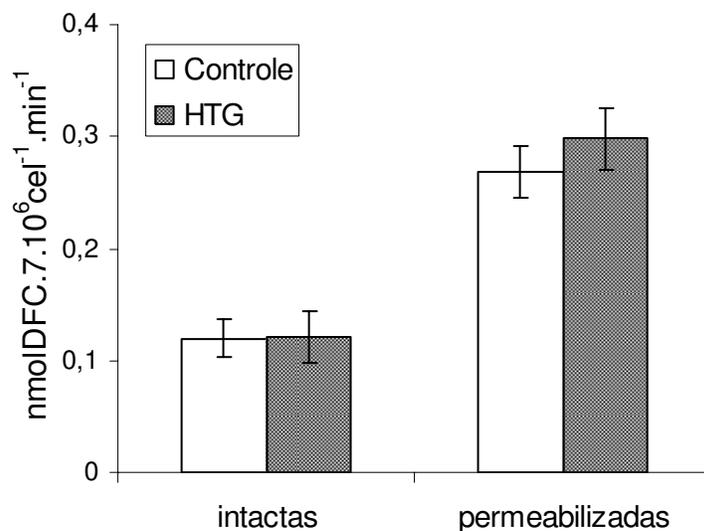
**Figura 6 - Consumo de oxigênio por células mononucleares de baço de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles.** Células mononucleares de baço ( $1,5 \times 10^7$  cel.,  $37^\circ\text{C}$ ) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65mM, HEPES 10mM pH 7.2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 mM, succinato 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM e EGTA 20  $\mu\text{M}$ . A permeabilização foi feita com a adição de 0,001% de digitonina (dig). O Estado III foi iniciado após a adição de 400 nmol ADP. O estado IV foi determinado pela adição de  $1\mu\text{g/ml}$  de oligomicina (Oligo). CCCP  $1\mu\text{M}$ . Média  $\pm$  epm ( $n = 7$ ). Valores em nmols  $\text{O}_2$ .  $1,5 \cdot 10^7 \text{cels}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  Transgênicos versus controles nas mesmas condições: \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0.001$ .



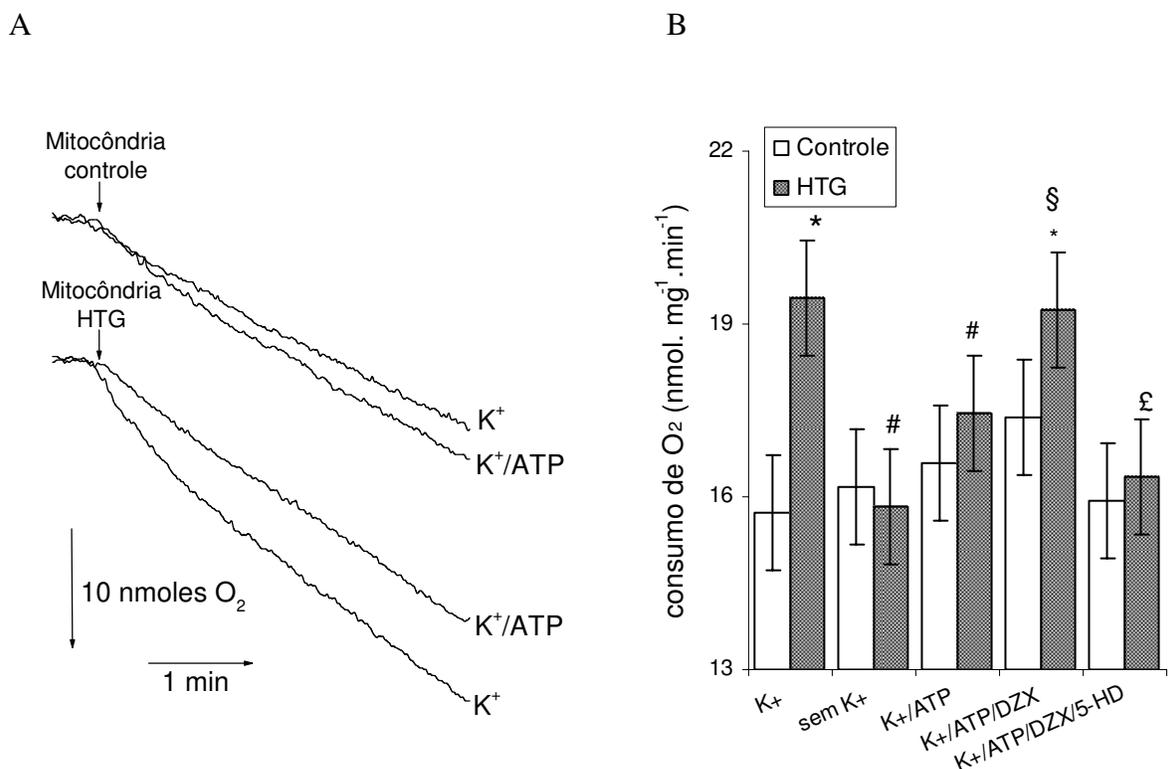
**Figura 7- Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) de células mononucleares isoladas de baços de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos e controles marcados com DiOC<sub>6</sub>(3).** Células mononucleares de baço ( $1 \times 10^6$  cel/ml) foram incubadas em meio RPMI 1640, suplementado com 1% de soro fetal bovino (FBS). As células foram aclimatizadas por 30 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C e posteriormente incubadas com 0,2 nM de DiOC<sub>6</sub>(3) com ou sem 1 µg/ml de oligomicina. 50 µM de CCCP foram adicionados após 30 minutos de incubação com DiOC<sub>6</sub>(3). Após 30 minutos, as leituras foram feitas em canal FL-1. Barras sem preenchimento: linfócitos sem oligomicina – Razão F/FCCCP: Razão entre os valores de fluorescência e fluorescência com e sem CCCP (mediana  $\pm$  epm). n = 8



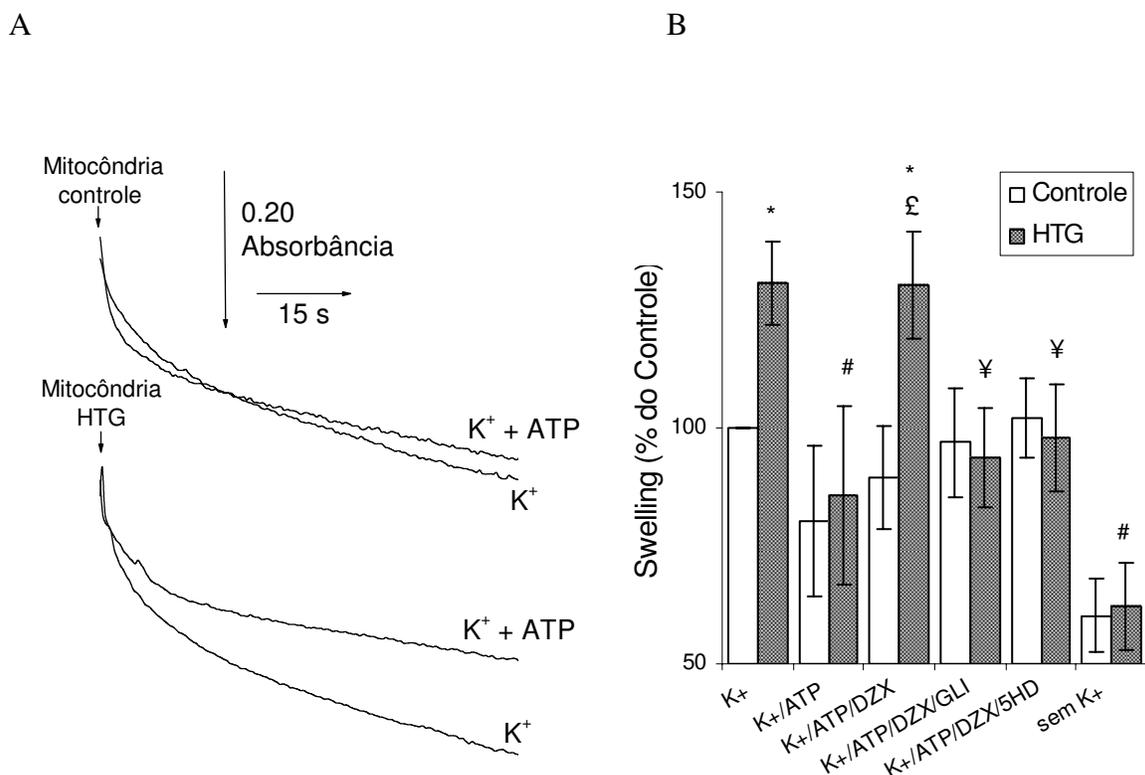
**Figura 8- Perfil de oxidação de dihidroetídio (DHE) a etídio em células mononucleares isoladas de baços de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles.** Células ( $1 \times 10^6$  cel./ml) foram incubadas em meio RPMI 1640, suplementado com 1% de soro fetal bovino (FBS). As células foram aclimatizadas por 30 minutos em estufa de  $\text{CO}_2$  (5%) a  $37^\circ\text{C}$  e posteriormente incubadas com  $5 \mu\text{M}$  de DHE para leitura em FL-2. Média  $\pm$  epm (n = 7).



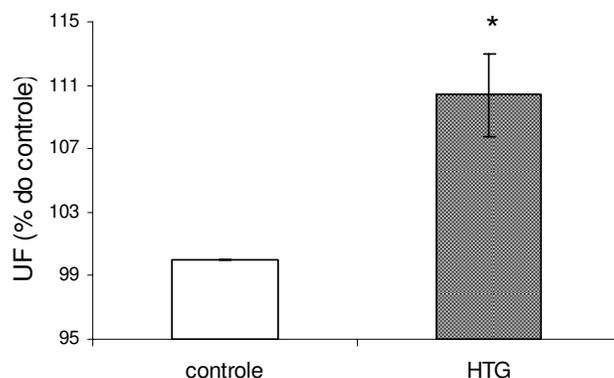
**Figura 9 - Velocidade de produção de EROS medida pela oxidação de diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA) por células mononucleares isoladas de baços de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles.** Células ( $7,7 \times 10^6$  cel/ml) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM pH 7.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, succinato 5 mM, EGTA 20  $\mu$ M e 3  $\mu$ M de H<sub>2</sub>DCF-DA . A permeabilização foi feita com 0,001% de digitonina. Média  $\pm$  epm (n = 3).



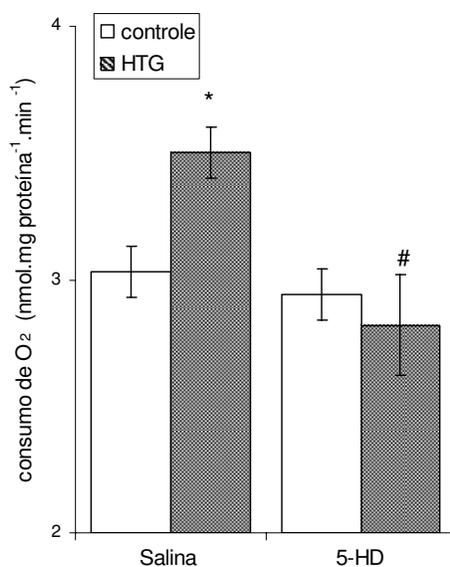
**Figura 10 - Consumo de oxigênio no estado de repouso por mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles na presença dos reguladores fisiológicos ou farmacológicos do mitoK<sub>ATP</sub>.** Traçados representativos estão apresentados em A e a velocidade de consumo de O<sub>2</sub> em B. Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 5 mM pH 7.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EGTA 0,4 mM, succinato 5 mM, oligomicina 1 µg/ml. ATP 100 µM, diazóxido (DZX) 12 µM e ácido 5-hidroxidecanóico (5HD) 60 µM. Nas barras indicadas por “sem K<sup>+</sup>”, o KCl 65 mM foi substituído no meio de reação padrão por LiCl 65 mM. Valores em média ± epm (n = 7). \*p < 0.01 versus controle em condições controles; #p < 0.01 versus HTG em condições controles; §p = 0.05 versus HTG na presença de ATP; £p < 0.05 versus HTG na presença de ATP/DZX.



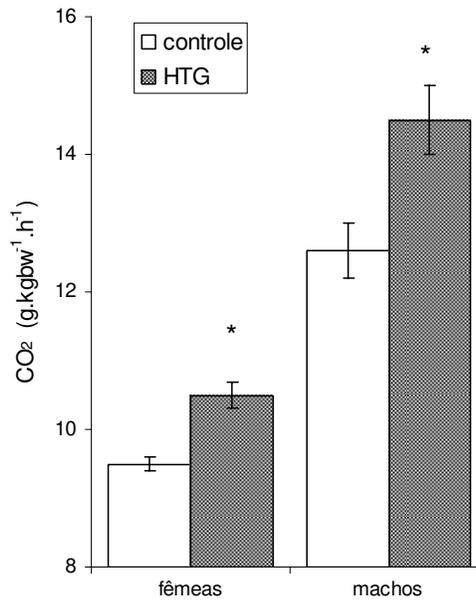
**Figura 11- Inchamento mitocondrial induzido pela entrada de K<sup>+</sup> através de mitoK<sub>ATP</sub> em mitocôndrias de fígado de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles.** Traçados representativos estão apresentados em A e a porcentagem de inchamento relativo ao controle (Média ± epm) em B (n = 3). Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubados em meio de reação contendo KCl 100 mM, Hepes 5 mM pH 7,4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl 1 mM, oligomicina 1 µg/ml, EGTA 0,1 mM e succinato 2 mM. ATP 200 µM, DZX 30 µM, glibenclamida (GLY) 10 µM e 5-HD 60 µM. Nas barras indicadas por “sem K<sup>+</sup>”, o KCl 100 mM foi substituído no meio de reação padrão por LiCl 100 mM. \*p < 0,05 versus controle em condições controles; #p < 0,05 versus HTG em condições controles; £p < 0,05 versus HTG na presença de ATP; ¥p ≤ 0,05 versus HTG na presença de ATP + DZX.



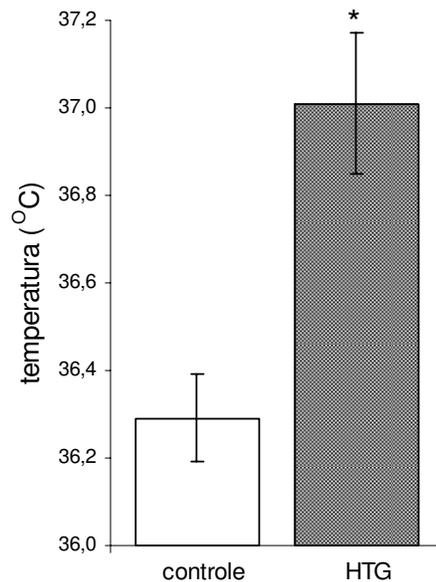
**Figura 12- Ligação de glibenclamida fluorescente às subunidades SUR dos mitoK<sub>ATP</sub> em mitocôndrias de fígado de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles.** Mitocôndrias (1 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 5 mM pH 7.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EGTA 0,4 mM e succinato 5 mM, acrescidas de 10 μM de glibenclamida marcada. Dados mostrados como porcentagem do controle. Média ± epm (n = 6). \*p = 0,001.



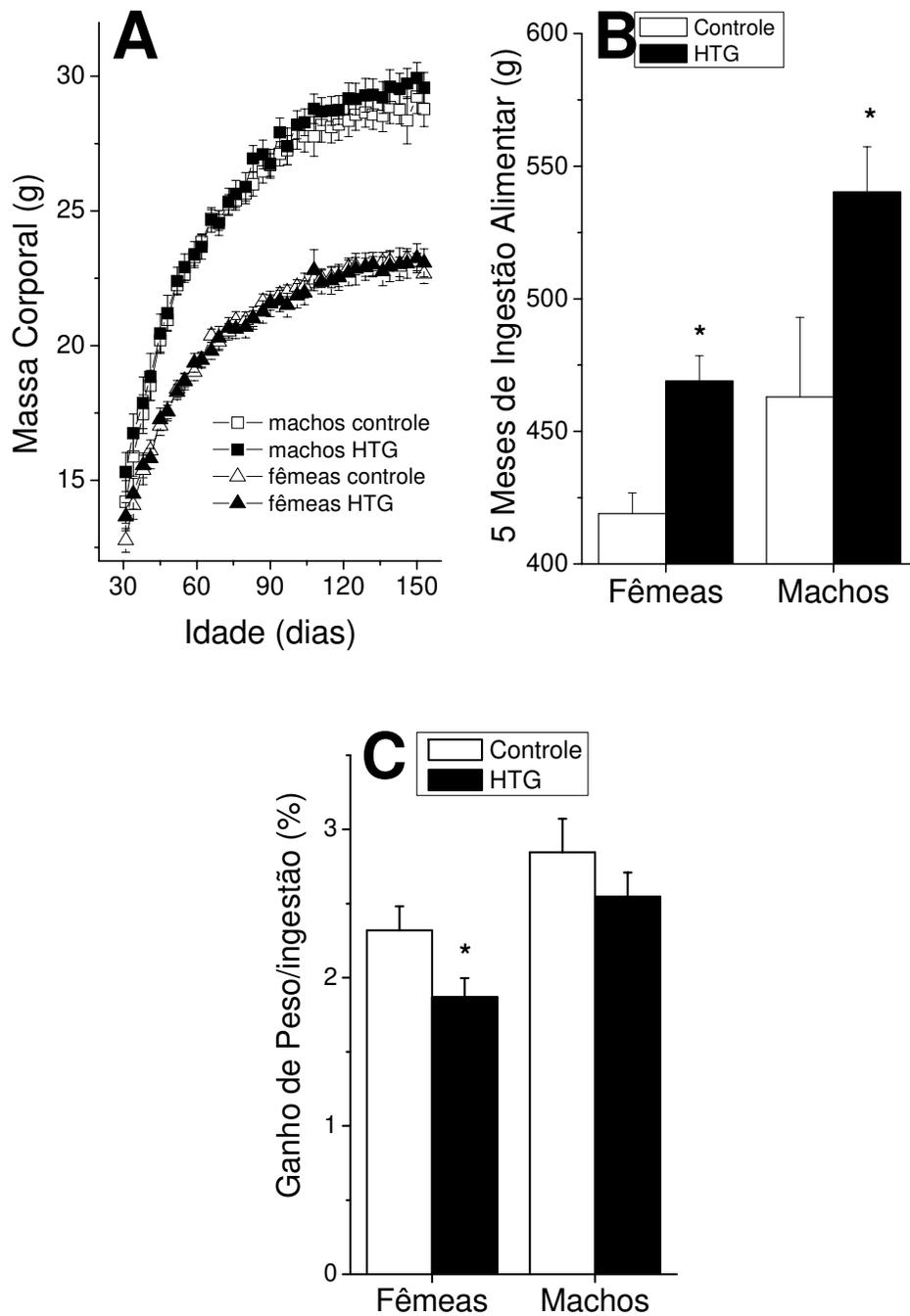
**Figura 13- Consumo de O<sub>2</sub> por fragmentos de fígados de camundongos controles e transgênicos (HTG) tratados previamente (1 hora) com salina ou ácido 5-hidroxidecanóico (5-HD, 10 mg/kg peso).** Cubos de Fígado (~ 50 mg) foram incubadas em 1 ml de meio Krebs-Henseleit (37°C). Média ± epm (n = 7). \*p < 0.05 versus controle salina; #p < 0.05 versus HTG salina.



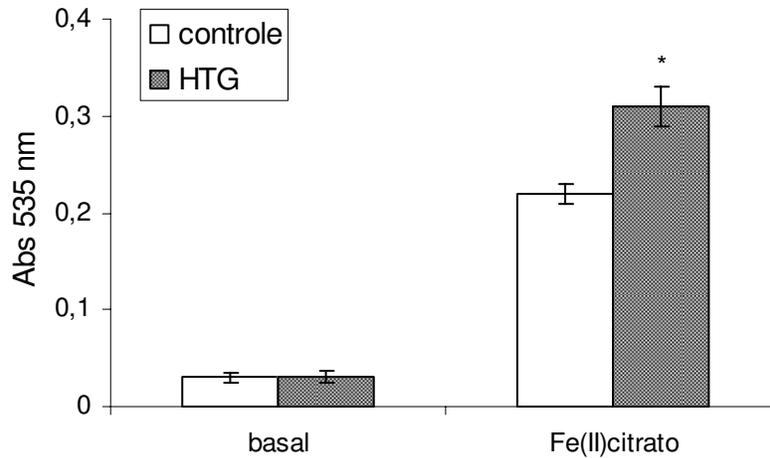
**Figura 14 - Produção de CO<sub>2</sub> por camundongos machos e fêmeas transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles.** Valores de velocidade de produção de CO<sub>2</sub> em g.kg peso<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Média ± epm (n = 7). \*p < 0.05 versus controles do mesmo sexo.



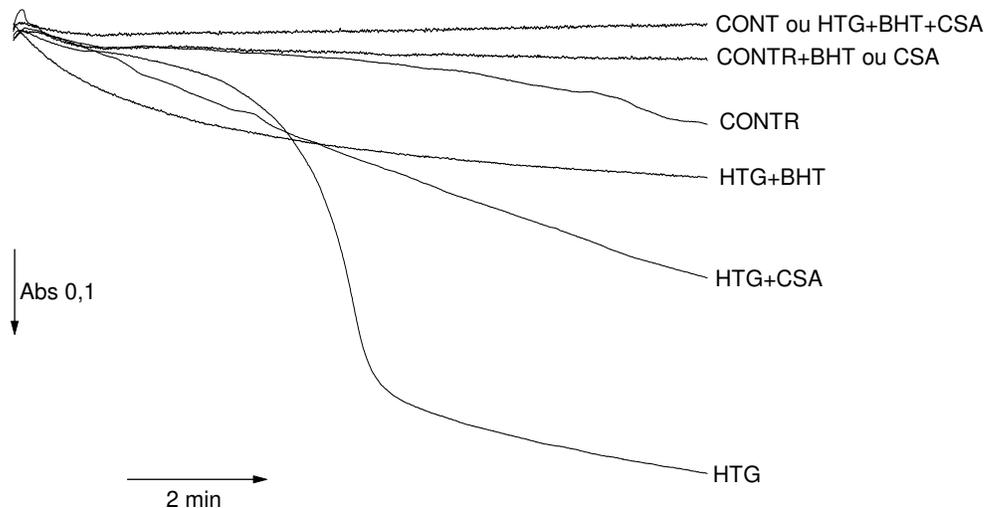
**Figura 15- Temperatura corporal retal em camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles machos e fêmeas.** Valores de temperatura retal em °C. Média ± epm (n = 8). \*p < 0.05 versus controles.



**Figura 16 – Peso corporal (A), ingestão alimentar (B) e eficiência alimentar (C) em camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos e controles. Valores em gramas. Média ± epm (n = 12). \*P < 0.05 versus controle.**



**Figura 17 – Indução da formação de produtos reativos com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) por Fe(II)citrato em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles.** Mitocôndrias (0,5 mg proteína/ml, 28°C) foram adicionadas ao meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 5 mM pH 7.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM e succinato 5 mM, contendo Fe(II) 50 µM/citrato 2 mM ou não (basal). Valores de absorbância a 535 nm. Média ± epm (n = 7). \*p < 0.05 versus HTG na presença de Fe(II)citrato.



**Figura 18- Inchaço mitocondrial induzido por  $\text{CaCl}_2$  35  $\mu\text{M}$  e  $\text{P}_i$  4 mM em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles (CONTR).** Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 5 mM pH 7.2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4 mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM, succinato 5 mM e  $\text{CaCl}_2$  35  $\mu\text{M}$  (28°C). Nos traçados indicados foram adicionados: ciclosporina A (CSA) 1  $\mu\text{M}$  e butil-hidroxitolueno (BHT) 5  $\mu\text{M}$ . Traçados representativos de 4 experimentos independentes.





***9- ANEXO***



## Hyperlipidemic Mice Present Enhanced Catabolism and Higher Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel Activity

LUCIANE C. ALBERICI,\* HELENA C. F. OLIVEIRA,† PATRÍCIA R. PATRÍCIO,‡ ALICIA J. KOWALTOWSKI,§ and ANIBAL E. VERCESI\*

\*Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, and †Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo; and ‡Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

**Background & Aims:** Changes in mitochondrial energy metabolism promoted by uncoupling proteins (UCPs) are often found in metabolic disorders. We have recently shown that hypertriglyceridemic (HTG) mice present higher mitochondrial resting respiration unrelated to UCPs. Here, we disclose the underlying mechanism and consequences, in tissue and whole body metabolism, of this mitochondrial response to hyperlipidemia. **Methods:** Oxidative metabolism and its response to mitochondrial adenosine triphosphate (ATP)-sensitive K<sup>+</sup> channel (mitoK<sub>ATP</sub>) agonists and antagonists were measured in isolated mitochondria, livers, and mice. **Results:** Mitochondria isolated from the livers of HTG mice presented enhanced respiratory rates compared with those from wild-type mice. Changes in oxygen consumption were sensitive to adenosine triphosphate (ATP), diazoxide, and 5-hydroxydecanoate, indicating they are attributable to mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (mitoK<sub>ATP</sub>) activity. Indeed, mitochondria from HTG mice presented enhanced swelling in the presence of K<sup>+</sup> ions, sensitive to mitoK<sub>ATP</sub> agonists and antagonists. Furthermore, mitochondrial binding to fluorescent glibendamide indicates that HTG mice expressed higher quantities of mitoK<sub>ATP</sub>. The higher content and activity of liver mitoK<sub>ATP</sub> resulted in a faster metabolic state, as evidenced by increased liver oxygen consumption and higher body CO<sub>2</sub> release and temperature in these mice. In agreement with higher metabolic rates, food ingestion was significantly larger in HTG mice, without enhanced weight gain. **Conclusions:** These results show that primary hyperlipidemia leads to an elevation in liver mitoK<sub>ATP</sub> activity, which may represent a regulated adaptation to oxidize excess fatty acids in HTG mice. Furthermore, our data indicate that mitoK<sub>ATP</sub>, in addition to UCPs, may be involved in the control of energy metabolism and body weight.

High plasma levels of triglycerides and free fatty acids can occur due to primary inherited disorders or secondarily to other metabolic diseases such as diabetes and the metabolic syndrome, which also includes insulin resistance, obesity, and hypertension.<sup>1</sup> In conjunction with these disorders, or even individually, hypertriglyceridemia is a risk factor for coronary heart disease, stroke, and nonalcoholic fatty liver disease.<sup>1–3</sup>

A group of proteins that plays a role in the pathogenesis or consequences of metabolic diseases is the uncoupling proteins (UCPs).<sup>4–6</sup> These proteins act as mitochondrial inner membrane fatty acid anion transporters and are widely distributed in many mammalian organs.<sup>7</sup> Because of the proton gradient and free permeability of protonated fatty acids across the inner

membrane, a result of UCP activity is mitochondrial uncoupling, including increased resting respiration and decreased membrane potentials and oxidative phosphorylation efficiency.<sup>7</sup> Interestingly, UCP expression is altered by obesity and diabetes<sup>8–10</sup> and in some conditions where circulating lipid levels are modified by hormones,<sup>11</sup> dietary fat,<sup>12</sup> and intravenous heparin plus lipid infusion.<sup>13</sup>

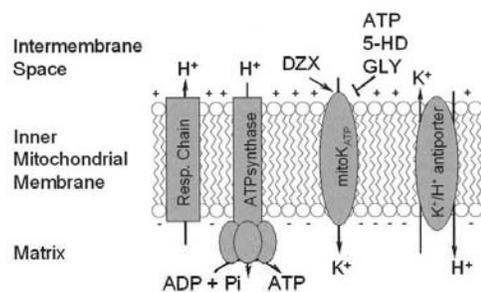
All these conditions present a complex metabolic context where it is difficult to discriminate the role of hyperlipidemia. To study the effects of elevated plasma lipid levels per se, without other metabolic confounding factors, we used mice overexpressing the apolipoprotein CIII, which develop severe hypertriglyceridemia and high plasma levels of free fatty acids<sup>14</sup> but retain normal glucose homeostasis.<sup>15,16</sup> The increased apolipoprotein CIII content in the surface of triglyceride-rich lipoproteins hampers their recognition by specific liver receptors, thus increasing their half-life and free fatty acid release in the plasma compartment.<sup>17</sup> We found that liver mitochondria from these mice presented higher resting respiratory rates.<sup>18</sup> This increase in respiration was not related to the activity of UCPs because (1) the effect was present even in media in which free fatty acids were quenched by bovine serum albumin and (2) uncoupling was not eliminated by the UCP inhibitor GDP (guanosine 5'-diphosphate).<sup>18</sup>

To uncover the cause of this mitochondrial uncoupling in hypertriglyceridemic mice, we now focus our attention on another recently described mild mitochondrial uncoupling pathway: the activity of adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels (mitoK<sub>ATP</sub>).<sup>19,20</sup> These inner membrane uniporters promote K<sup>+</sup> influx in a manner counteracted by the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (see Figure 1 and Garlid and Paucek<sup>19</sup> for review). The resulting uptake of H<sup>+</sup> through the antiporter decreases the efficiency of oxidative phosphorylation. Uncoupling is limited by K<sup>+</sup> transport rates of mitoK<sub>ATP</sub>, which are quite slow and only allow for mild uncoupling. In addition to mild uncoupling, these channels also promote low-amplitude mitochondrial swelling when active due to the uptake of K<sup>+</sup>, the counter-ion phosphate, and water.<sup>21,22</sup> We found strong evidence that the activity and quantity of mitoK<sub>ATP</sub> channels is augmented in hypertriglyceridemic

**Abbreviations used in this paper:** DZX, diazoxide; EGTA, ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; GLY, glyburide/glibenclamide; 5-HD, 5-hydroxydecanoate; HTG, hypertriglyceridemic; mitoK<sub>ATP</sub>, mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels; UCP, uncoupling protein; WT, wild-type.

© 2006 by the American Gastroenterological Association (AGA) Institute  
0016-5085/06/\$32.00

doi:10.1053/j.gastro.2006.07.021



**Figure 1.** Mitochondrial inner membrane K<sup>+</sup> transport. The mitochondrial respiratory chain generates a proton gradient used by ATP synthase to promote oxidative phosphorylation. Mitok<sub>ATP</sub> mediates K<sup>+</sup> transport into the matrix in a manner inhibited by ATP, GLY, or 5-HD and stimulated by DZX. K<sup>+</sup> is removed from the mitochondrial matrix in exchange for H<sup>+</sup> by the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, resulting in mild uncoupling.

(HTG) mice, providing a mechanistic explanation for the observed uncoupling. In addition, we show evidence that this uncoupling leads to increases in overall respiratory rates and catabolism in HTG livers in mice.

## Materials and Methods

### Animals

Human apolipoprotein CIII transgenic (line 3707)<sup>23</sup> founders were donated by Dr Alan R. Tall (Columbia University, New York, NY) and crossbred with wild-type (WT) C57Bl6 mice. The apolipoprotein CIII transgenic colony has been kept for 10 years at the animal facilities of the Department of Physiology and Biophysics at the State University of Campinas (Campinas, Brazil). The experiments were approved by the university's ethics committee and are in accordance with the Guidelines for Handling and Training of Laboratory Animals published by the University's Federation for Animal Welfare. Mice had access to standard laboratory rodent chow (CR1; Nuvital, Colombo, Paraná, Brazil) and water ad libitum and were housed at 22°C ± 2°C on a 12-hour light-dark cycle. Male and female heterozygous apolipoprotein CIII transgenic (HTG) and nontransgenic (WT) littermates, aged 4–6 months, were used in this study. Total cholesterol and triglyceride (Chod-Pap; Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) and plasma free fatty acid (Wako Chemical, Neuss, Germany) levels were determined by enzymatic-colorimetric methods according to the manufacturers' instructions. Transgenic mice presented fasting plasma triglyceride levels >300 mg/dL and WT mice levels <100 mg/dL. Four groups (n = 12) of male and female transgenic and WT mice had their body weight gain and food ingestion followed up from weaning (30 days of age) to 6 months of age. Mice and ingested food were weighed 3 times a week. Body weights were taken individually, whereas food ingestion was measured as the average consumed by 4 mice per cage per day. Two groups of transgenic mice (n = 6) were treated with insulin or saline as previously described.<sup>24</sup> Briefly, mice received daily subcutaneous injections of increasing doses of NPH insulin (0.14–1.63 U/30 g body wt, Iolin; Eli Lilly, Indianapolis, IN) or the same volume of saline solution for 7

days. Two thirds of the dose was given at 8 PM and one third at 8 AM. To prevent hypoglycemia, these mice had free access to sugar cubes in addition to the chow diet, and a 5% glucose solution was the only drinking solution offered.

### Isolation of Mouse Liver Mitochondria

Mitochondria were isolated by conventional differential centrifugation<sup>25</sup> at 4°C. No differences between sexes of the animals were noted in isolated mitochondrial studies, so analyzed samples from male and female animals were pooled. A liver homogenate was prepared in 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 10 mmol/L HEPES buffer (pH 7.2), and 0.01% bovine serum albumin and centrifuged at 600g for 10 minutes. The supernatant was recentrifuged at 7000g for 10 minutes. The pellet was washed in the same medium devoid of bovine serum albumin and containing 0.1 mmol/L EGTA. The final mitochondrial pellet was diluted in 250 mmol/L sucrose to a protein concentration of 60–80 mg/mL, measured using the Biuret method and bovine serum albumin as the protein standard. Isolated mitochondria were kept over ice and used within 90 minutes of preparation to ensure mitok<sub>ATP</sub> activity. Mitochondria isolated in this manner lose matrix K<sup>+</sup> and contract due to low levels of this ion in the isolation buffer and recover K<sup>+</sup> when suspended in K<sup>+</sup>-rich buffers.<sup>21,22</sup>

### Mitochondrial and Respiratory Rates

Oxygen consumption was measured using a temperature-controlled computer-interfaced Clark-type oxygen electrode from Hansatech Instruments Ltd. (King's Lynn, Norfolk, England) equipped with magnetic stirring at 28°C.

### Mitochondrial Swelling

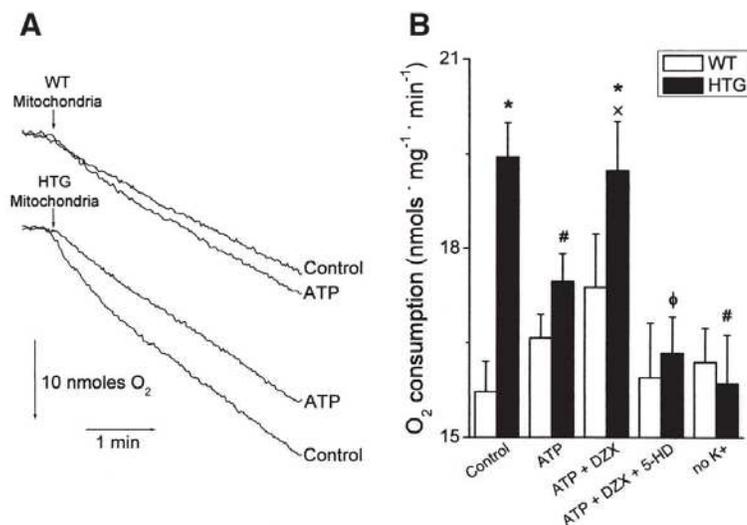
Mitochondrial swelling was estimated from the decrease in absorbance of the mitochondrial suspension measured at 520 nm using a temperature-controlled SLM Aminco DW 2000 spectrophotometer (SLM Instruments, Inc., Urbana, IL) equipped with continuous stirring at 37°C. Swelling rates of freshly isolated mitochondria were measured soon after their addition of K<sup>+</sup>-rich, hyposmotic buffers. This procedure allows for a magnified measurement of K<sup>+</sup> uptake rates due to prior K<sup>+</sup> depletion during the mitochondrial isolation procedure.<sup>22</sup>

### Liver Respiratory Rates

Mouse livers were rapidly dissected and chopped into 1-mm cubes using a tissue chopper. Approximately 50-mg liver samples were incubated in 1 mL Krebs-Henseleit solution (37°C) containing 10 mmol/L glucose. Oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode as described previously. The exact protein content of each homogenized tissue sample was then determined using the Biuret method, and respiratory rates were calculated.

### CO<sub>2</sub> Production Rates In Vivo

CO<sub>2</sub> production in vivo was measured in a temperature-monitored respirometer described by Calegario et al.<sup>26</sup> Fed mice weighing between 24 and 28 g were adapted to the respirometer chamber twice a day for 5 minutes for 5 days. After the adaptation period, CO<sub>2</sub> expiration of each mouse was monitored for 5 minutes once a day, between 9 AM and 11 AM, for 5 consec-



**Figure 2.** Enhanced resting respiration in HTG mitochondria is due to ATP-sensitive  $K^+$  uptake. Typical traces are shown in A, and averages  $\pm$  SEM are depicted in B. WT and HTG mitochondria (0.5 mg/mL) were added to 28°C, pH 7.2 (KOH) medium containing 125 mmol/L sucrose, 65 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, 2 mmol/L  $P_i$ , 1 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.4 mmol/L EGTA, 4 mmol/L succinate, and 1  $\mu$ g/mL oligomycin in the presence of 0.1 mmol/L ATP, 12  $\mu$ mol/L DZX, and 60  $\mu$ mol/L 5-HD, as shown. No  $K^+$ , experiments conducted in media in which all  $K^+$  salts were substituted by Li-positive salts. \* $P < .01$  vs WT under control conditions; # $P < .01$  vs HTG under control conditions;  $\phi P = .05$  vs HTG in the presence of ATP;  $\phi P < .05$  vs HTG in the presence of ATP plus DZX.

utive days.  $CO_2$  production rates were calculated as averages of 5 measurements for each mouse.

#### Body Temperature

Rectal temperatures were measured using a digital thermometer (BD Basic; Becton Dickinson and Company, São Paulo, Brazil). Mice were adapted to rapid comfortable immobilization and rectal temperature measurements for 5 days, between 2 PM and 3 PM. Measurements were then conducted for 5 days, during three 20-second periods. Average rectal temperatures for each animal during these measurements were then determined and compared.

#### Data Analysis

Data shown as traces are representative of at least 3 repetitions using different preparations. Other data are averages  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance comparisons (Figures 2–4) and analysis of variance and Student *t* tests (with similar results; Figures 5 and 6) conducted using Origin 7.0 software (OriginLab Corp., Northampton, MA).  $P \leq .05$  was considered significant.

#### Results

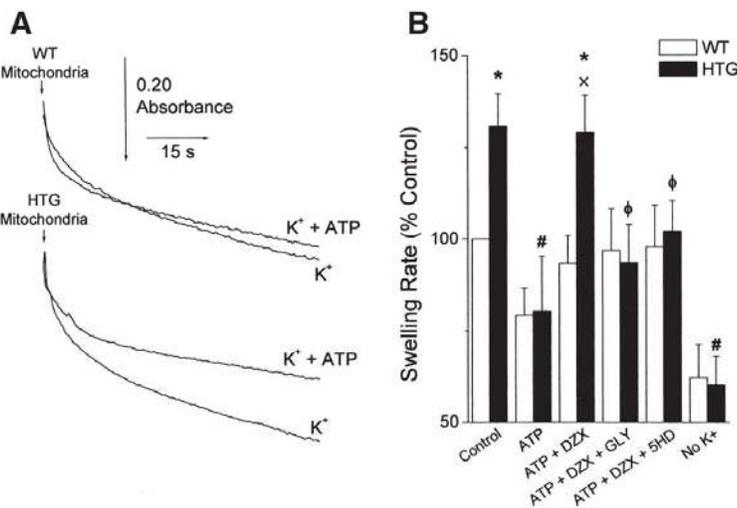
Confirming previous results,<sup>18</sup> we found that mitochondria isolated from livers of HTG mice present higher  $O_2$  consumption rates than WT mitochondria when incubated under basal conditions in which no oxidative phosphorylation occurs (see representative traces in Figure 2A and averages in Figure 2B). In our prior study,<sup>18</sup> no increases in respiratory rates under state III conditions, in which oxidative phosphorylation is stimulated, were observed, indicating these changes are not due to higher maximal respiratory capacity. Instead, we found here that enhanced respiratory rates of HTG mitochondria were significantly prevented by the presence of ATP (Figure 2). Fur-

thermore, the effects of ATP were reversed by the  $mitoK_{ATP}$  agonist diazoxide (DZX),<sup>27</sup> strongly suggesting that the increase in respiration is due to  $K^+$  cycling stimulated by the activity of this channel. Indeed, the DZX effect was completely abrogated by the  $mitoK_{ATP}$  antagonist 5-hydroxydecanoate (5-HD),<sup>28</sup> and no differences in respiratory rates could be observed in media devoid of  $K^+$  salts. These results indicate that the increased respiratory rates observed in HTG mitochondria are due to the activity of  $mitoK_{ATP}$ .

To directly assess if ATP-sensitive  $K^+$  transport was enhanced in HTG compared to WT mitochondria, we measured light scattering changes in these suspensions. Mitochondria lose  $K^+$  during isolation, and the uptake of this ion during the first few seconds of incubation in  $K^+$ -rich media is enhanced by  $mitoK_{ATP}$  activity. Because  $K^+$  uptake is accompanied by phosphate (as a counter-ion) and water, mitochondrial matrix swelling occurs, with concomitant decreases in light scattering of the suspension.<sup>21,22</sup> Swelling experiments are an important complement to the respiratory rate measurements conducted earlier, because DZX is known to have protonophoric effects and leads to respiratory inhibition in mitochondria when used at toxic concentrations.<sup>22</sup> Because the inner membrane potential is a driving force for  $K^+$  uptake,<sup>19</sup> both respiratory inhibition and protonophoric activity decrease mitochondrial swelling, while  $mitoK_{ATP}$  activation promoted by low doses of DZX enhances swelling.<sup>22</sup>

We found that swelling in WT mitochondria was poorly inhibited by ATP, indicating low levels of  $mitoK_{ATP}$  activity (see Figure 3A for typical traces and Figure 3B for average swelling rates). On the other hand, swelling rates in HTG mitochondria were significantly larger and prevented by ATP. This difference in swelling rates was only noted in media containing  $K^+$  ions. Indeed, as expected for  $mitoK_{ATP}$ -mediated swelling, DZX reversed the ATP effect in a manner prevented by  $mitoK_{ATP}$

**Figure 3.** HTG mitochondria present enhanced ATP-sensitive K<sup>+</sup> uptake. Typical traces are shown in *A*, and averages ± SEM of swelling rates during the first 15 seconds are depicted in *B*. Mitochondria (0.5 mg/mL) were added to 28°C, pH 7.2 (KOH) medium containing 100 mmol/L KCl, 5 mmol/L HEPES, 2 mmol/L P<sub>i</sub>, 1 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.1 mmol/L EGTA, 2 mmol/L succinate, and 1 μg/mL oligomycin in the presence of 0.2 mmol/L ATP, 30 μmol/L DZX, 10 μmol/L GLY, and 60 μmol/L 5-HD as indicated. No K<sup>+</sup>, experiments conducted in media in which all K<sup>+</sup> salts were substituted by Li-positive salts. \**P* < .05 vs WT under control conditions; #*P* < .05 vs HTG under control conditions; \**P* < .05 vs HTG in the presence of ATP; #*P* ≤ .05 vs HTG in the presence of ATP plus DZX.

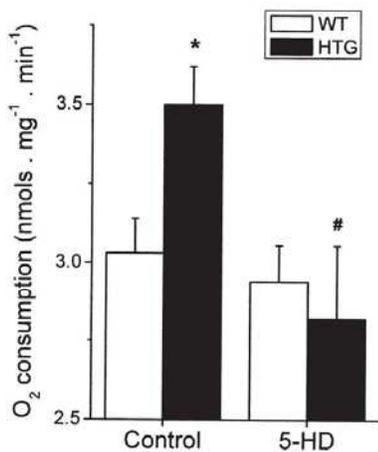


antagonists glibenclamide (glyburide [GLY]) and 5-HD. Based on these findings, we conclude that mitoK<sub>ATP</sub> activity is enhanced in the livers of HTG mice.

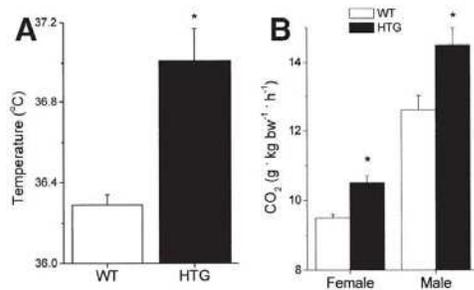
Next, we assessed if larger quantities of mitoK<sub>ATP</sub> were present in HTG mitochondria compared with WT. Because the molecular identity of mitoK<sub>ATP</sub> is a matter of debate, we com-

pared levels of bound fluorescent GLY (BODIPY FL GLY; Molecular Probes, Eugene, OR) in isolated mitochondrial preparations. This measurement estimates the content of mitochondrial sulfonylurea receptors, a component of mitoK<sub>ATP</sub>.<sup>29</sup> We found that the fluorescent GLY binding to HTG mitochondria was significantly enhanced (110.4% ± 2.4% of WT; *P* < .05), confirming that liver content of mitochondrial sulfonylurea receptors is higher in HTG mice.

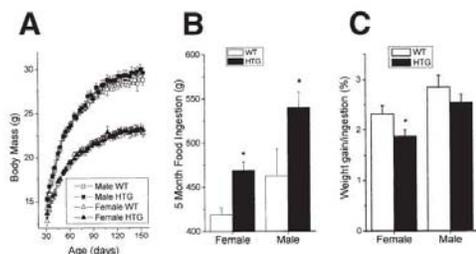
The activation of mitoK<sub>ATP</sub> in HTG mice could be a consequence of higher circulating or intracellular lipids. We showed previously<sup>18</sup> that fibrate treatment, which decreases plasma triglyceride levels and accelerates intracellular fatty acid beta oxidation, normalized mitochondrial respiration in these HTG mice. To further check the specific role of intracellular free fatty acid content, we treated HTG mice with increasing doses of insulin<sup>24</sup> during a 7-day period, a protocol that also decreases



**Figure 4.** MitoK<sub>ATP</sub> activity increases respiratory rates in HTG livers. Data shown are average ± SEM respiratory rates of liver fragments incubated at 37°C in Krebs–Henseleit solution, as described in Materials and Methods. Mice received intraperitoneal saline (control) or 5-HD (10 mg/kg body wt) 1 hour before liver excision. \**P* < .05 vs WT under control conditions; #*P* < .05 vs HTG under control conditions.



**Figure 5.** Body temperature and CO<sub>2</sub> production is enhanced in HTG mice. (A) Rectal body temperatures and (B) CO<sub>2</sub> release rates were compared in WT and HTG mice, as described in Materials and Methods. \**P* < .05 vs WT.



**Figure 6.** Food ingestion is enhanced in HTG mice. (A) Body weight, (B) food ingestion, and (C) the efficiency of the conversion of ingested food in HTG and WT mice were measured from weaning (1 month) to 6 months of age, as described in Materials and Methods. Data represent means  $\pm$  SEM (in grams). \* $P < .05$  vs WT.

plasma lipid levels but stimulates intracellular fatty acid synthesis. Indeed, *in vivo* insulin treatment reduced triglyceride levels by 30% ( $340 \pm 56$  vs  $481 \pm 91$  mg/dL, respectively, for insulin- and saline-treated HTG mice;  $P < .05$ ). However, insulin did not correct higher resting respiration in HTG liver mitochondria ( $22.4 \pm 2.5$  vs  $21.8 \pm 1.5$  nmol oxygen  $\cdot$  mg protein $^{-1} \cdot$  min $^{-1}$ , respectively, for insulin- and saline-treated HTG mice). Thus, both fibrates and insulin correct plasmatic triglyceride levels but present opposite effects on intracellular fatty acid metabolism, while fibrates, but not insulin, reverse the respiratory increments observed in these animals. As a result, we conclude that higher respiratory rates observed in HTG mitochondria are related to changes in intracellular fatty acid metabolism observed in HTG mice but not enhanced plasmatic lipid contents.

Mild levels of uncoupling promoted by enhanced mitoK<sub>ATP</sub> expression and activity in mitochondria isolated from HTG mice could result in changes in overall liver metabolism. To check this possibility, we measured oxygen consumption in liver fragments (Figure 4). HTG liver oxygen consumption rates were about 16% greater than those of WT livers. This increase is lower than the 24% increase in resting respiratory rates observed in mitochondria isolated from these livers (see Figure 2), probably because intact liver samples conduct oxidative phosphorylation and thus are not in resting state. The increment in respiratory rates in intact livers could nonetheless be ascribed to mitoK<sub>ATP</sub> activity, because 5-HD injected 1 hour before liver excision significantly decreased O<sub>2</sub> consumption only in HTG liver fragments and made respiratory rates indistinguishable from those of WT livers (Figure 4).

Because the liver has an important role in overall oxidative metabolism and nonshivering thermogenesis,<sup>30</sup> we evaluated whether HTG mice present different metabolic rates compared with WT mice. As shown in Figure 5A, body temperatures in HTG mice were significantly augmented, a finding that could indicate a hypermetabolic state in these mice. Indeed, CO<sub>2</sub> production rates by both female and male HTG mice were significantly higher than WT mice (Figure 5B).

If HTG mice present a higher metabolic rate, they should be leaner or present higher food ingestion than WT mice. Thus, we followed up body weight gain and food ingestion in these mice from weaning up to 6 months of age. As shown in Figure 6,

although body weight gain along time is similar, the amount of food ingested is significantly greater for female and male HTG than WT mice and efficiency of the conversion of ingested food is reduced in HTG mice, especially in HTG female mice, confirming higher energy dissipation in HTG mice.

## Discussion

Recently, much attention has been focused on correlations between changes in mitochondrial energy metabolism and pathologic conditions found in metabolic disorders. Altered mitochondrial energy metabolism has been shown to be both cause and consequence of these conditions. For example, a mutation in mitochondrial DNA encoding a transfer RNA causes maternally inherited hypomagnesemia, hypertension, and hypercholesterolemia.<sup>31</sup> Certain mitochondrial DNA polymorphisms are related to insulin resistance and can be predictors of the development of diabetes.<sup>32</sup> Furthermore, UCP expression has been shown to change not only in diabetes<sup>9,10</sup> but also with altered dietary and metabolic conditions. These changes may be related to body mass index,<sup>9</sup> insulin resistance,<sup>12</sup> or circulating free fatty acids.<sup>8</sup> Although UCP activity mediates energy dissipation, favoring a catabolic state, the effect of UCPs on the control of body weight is uncertain. While mice overexpressing human UCP3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean,<sup>33</sup> knockout mice in which UCP3 is absent are not obese.<sup>34,35</sup>

We found that normal-weight, glucose-tolerant, and HTG mice present enhanced liver mitochondrial inner membrane proton conductance (Figure 2 and Alberici et al<sup>18</sup>). However, we could not find evidence that this uncoupling was related to UCP activity.<sup>18</sup> Thus, to explain the uncoupling observed in HTG mice, we focused our attention on another regulated mitochondrial uncoupling pathway: the concerted activity of mitoK<sub>ATP</sub> and the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (see Figure 1). Potassium uptake into the mitochondrial matrix through mitoK<sub>ATP</sub> channels is accompanied by phosphate and water, resulting in matrix swelling. This swelling activates K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters,<sup>19</sup> and the net result is the entrance of a proton for every K<sup>+</sup> exchanged, resulting in uncoupling.

Using 3 different techniques, mitochondrial oxygen consumption measurements (Figure 1), light scattering estimates of mitochondrial swelling (Figure 2), and binding to fluorescent GLY (data in text), we found that mitoK<sub>ATP</sub> activity and expression is augmented in the livers of HTG mice. This enhanced mitoK<sub>ATP</sub> activity increases mitochondrial respiratory rates under nonphosphorylating conditions (Figure 2) and enhances K<sup>+</sup> uptake and matrix volumes relative to control mitochondria (Figure 3). Indeed, these respiratory and volume effects are inhibited by mitoK<sub>ATP</sub> antagonists ATP, GLY, and 5-HD (Figures 2 and 3). The lack of observable uncoupling and swelling in HTG relative to WT mitochondria in media devoid of K<sup>+</sup> ions (Figure 2) provides unequivocal evidence that this effect occurs secondarily to enhanced K<sup>+</sup> cycling.

It should be noted that, due to reports from both our group and others<sup>22,28,26,37</sup> (see Facundo et al<sup>20</sup> for a critical review) of toxic effects of drugs such as DZX, 5-HD, and GLY that are unrelated to mitoK<sub>ATP</sub> activity, we conducted extensive control experiments to ensure our results were not attributable to these toxic effects. These controls include avoiding the use of GLY in respiratory experiments (due to its inhibitory effect at low doses<sup>29</sup>), experiments using only the physiologic mitoK<sub>ATP</sub> in-

hibitor ATP, experiments conducted in the absence of K<sup>+</sup> salts, comparisons between respiration and swelling effects, and the use of low drug doses, previously shown not to cause changes in inner membrane potentials under conditions similar to ours.<sup>22</sup> Indeed, toxic effects of 5-HD and GLY in our isolated mitochondrial studies are unlikely because their effects were state dependent<sup>28</sup> and not observed in the absence of ATP and DZX (results not shown). Furthermore, toxic effects of DZX (which include respiratory inhibition and protonophoric effects) cannot lead to mitochondrial swelling or alterations in swelling and respiration exclusively in HTG animals. Finally, our results are not observable in media devoid of K<sup>+</sup>, confirming they are related to a selective K<sup>+</sup> transport pathway that promotes swelling and increases respiration, such as mitoK<sub>ATP</sub>.

In addition to presenting increased respiratory rates in isolated mitochondria, HTG mice display enhanced oxygen consumption rates in intact liver tissue in a manner prevented by prior *in vivo* intraperitoneal administration of the mitoK<sub>ATP</sub> antagonist 5-HD (Figure 4). Furthermore, HTG mice present elevated overall metabolic rates, as attested by increased body temperature, CO<sub>2</sub> release (Figure 5), and food ingestion (Figure 6). These results suggest that the enhanced activity of mitoK<sub>ATP</sub> observed in HTG livers may have important overall whole body metabolic consequences. Unfortunately, we were unable to directly test this hypothesis due to the multiple systemic effects of mitoK<sub>ATP</sub> antagonists unrelated to the activity of this channel. However, we were able to address the probable cause of these changes. Intracellular availability of fatty acids is likely implicated in this adaptive phenomenon, because higher resting respiration in HTG mice was corrected by activation of fatty acid beta oxidation promoted by fibrate treatment<sup>8</sup> but not by fatty acid oxidation suppression promoted by insulin. While both fibrates and insulin correct hyperlipidemia, they have opposite effects on intracellular fatty acid metabolism. The lack of an insulin effect in mitochondrial K<sup>+</sup>-dependent uncoupling differs from previously described mitochondrial alterations found in diabetes, obesity, and the metabolic syndrome, often attributed directly to hyperinsulinemia or insulin resistance.<sup>8-10,12</sup>

In conclusion, we found clear evidence that hyperlipidemia increases mitoK<sub>ATP</sub> expression and activity. We propose that changes in mitoK<sub>ATP</sub> activity represent an adaptation that allows HTG mice to oxidize excess intracellular free fatty acids. This suggests that mitoK<sub>ATP</sub>, in addition to UCPs, is involved in the control of the energy metabolism and body weight.

#### References

- Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109:433-438.
- Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of non-alcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-455.
- Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001; 121:710-723.
- Jezeq P, Garlid KD. Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1163-1168.
- Boss O, Muzzin P, Giacobino JP. The uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinol* 1998;139:1-9.
- Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* 2005;2: 85-93.
- Garlid KD, Jaburek M, Jezek P, Varecha M. How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim Biophys Acta* 2000;1459:383-389.
- Boss O, Bobbioni-Harsch E, Assimacopoulos-Jeannet F, Muzzin P, Munger R, Giacobino JP, Golay A. Uncoupling protein-3 expression in skeletal muscle and free fatty acids in obesity. *Lancet* 1998;351:1933.
- Bao S, Kennedy A, Wojciechowski B, Wallace P, Ganaway E, Garvey WT. Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes. *Diabetes* 1998;47:1935-1940.
- Hidaka S, Yoshimatsu H, Kakuma T, Sakino H, Kondou S, Hanada R, Oka K, Teshima Y, Kurokawa M, Sakata T. Tissue-specific expression of the uncoupling protein family in streptozotocin-induced diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;224: 172-177.
- Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem* 1997;272:24129-24132.
- Samec S, Seydoux J, Dulloo AG. Post-starvation gene expression of skeletal muscle uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 in response to dietary fat levels and fatty acid composition: a link with insulin resistance. *Diabetes* 1999;48:436-441.
- Nisoli E, Carruba MO, Tonello C, Macor C, Federspil G, Vettor R. Induction of fatty acid translocase/CD36, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2, leptin, uncoupling proteins 2 and 3, and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human subcutaneous fat by lipid infusion. *Diabetes* 2000;49:319-324.
- Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science* 1990;249:790-793.
- Reaven GM, Mondon CE, Chen YD, Breslow JL. Hypertriglyceridemic mice transgenic for the human apolipoprotein C-III gene are neither insulin resistant nor hyperinsulinemic. *J Lipid Res* 1994; 35:820-824.
- Amaral MEC, Oliveira HCF, Carneiro EM, Delghingaro-Augusto V, Vieira E, Berti JA, Boschero AC. Plasma glucose regulation and insulin secretion in hypertriglyceridemic mice. *Horm Metab Res* 2002;34:21-26.
- Aalto-Setälä K, Fisher EA, Chen X, Chajek-Shaul T, Hayek T, Zechner R, Walsh A, Ramakrishnan R, Ginsberg HN, Breslow JL. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J Clin Invest* 1992;90:1889-900.
- Alberici LC, Oliveira HC, Bighetti EJ, de Faria EC, Degaspari GR, Souza CT, Vercesi AE. Hypertriglyceridemia increases mitochondrial resting respiration and susceptibility to permeability transition. *J Bioenerg Biomembr* 2003;35:451-457.
- Garlid KD, Pauczek P. Mitochondrial potassium transport: the K<sup>+</sup> cycle. *Biochim Biophys Acta* 2003;1606:23-41.
- Facundo HT, Fornazari M, Kowaltowski AJ. Tissue protection mediated by mitochondrial K<sup>+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta* 2006;40:469-479.
- Beavis AD, Lu Y, Garlid KD. On the regulation of K<sup>+</sup> uniport in intact mitochondria by adenine nucleotides and nucleotide analogs. *J Biol Chem* 1993;268:997-1004.
- Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Pauczek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280: H649-H657.
- Walsh A, Azrolan N, Wang K, Marcigliano A, O'Connell A, Breslow JL. Intestinal expression of the human apoA-I gene in transgenic

- mice is controlled by a DNA region 3' to the gene in the promoter of the adjacent convergently transcribed apoC-III gene. *J Lipid Res* 1993;34:617-623.
24. Berti JA, Casquero AC, Patricio PR, Bighetti EJB, Carneiro EM, Boschero AC, Oliveira HCF. Cholesteryl ester transfer protein expression is down-regulated in hyperinsulinemic transgenic mice. *J Lipid Res* 2003;44:1870-1876.
  25. Kaplan RS, Pedersen PL. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. *Biochem J* 1983;212:279-288.
  26. Calegario FF, Cosso RG, Fagian MM, Almeida FV, Jardim WF, Jezek P, Arruda P, Vercesi AE. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J Bioenerg Biomembr* 2003;35:211-220.
  27. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovsky V, Sun X, Schindler PA. The mitochondrial  $K_{ATP}$  channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem* 1996;271:8796-8799.
  28. Jaburek M, Yarov-Yarovsky V, Paucek P, Garlid KD. State-dependent inhibition of the mitochondrial  $K_{ATP}$  channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *J Biol Chem* 1998;273:13578-13582.
  29. Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, Paucek P. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem* 2001;276:33369-33374.
  30. Rolfe FS, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 1997;77:731-758.
  31. Wilson FH, Hariri A, Farhi A, Zhao H, Petersen KF, Toka HR, Nelson-Williams C, Raja KM, Kashgarian M, Shulman GI, Scheinman SJ, Lifton RP. A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science* 2004;306:1190-1194.
  32. Lee HK, Park KS, Cho YM, Lee YY, Pak YK. Mitochondria-based model for fetal origin of adult disease and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1042:1-18.
  33. Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD, Abuin A. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 2000;406:415-418.
  34. Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman ML. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* 2000;275:16251-16257.
  35. Vida-Puga AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 2000;275:16258-16266.
  36. Holmuhamedov EL, Jahangir A, Oberlin A, Komarov A, Colombini M, Terzic A. Potassium channel openers are uncoupling protonophores: implication in cardioprotection. *FEBS Lett* 2004;568:167-170.
  37. Minners J, McLeod CJ, Sack MN. Mitochondrial plasticity in classical ischemic preconditioning moving beyond the mitochondrial  $K_{ATP}$  channel. *Cardiovasc Res* 2003;59:1-6.

---

Received February 24, 2006. Accepted June 21, 2006.

Address requests for reprints to: Anibal E. Vercesi, MD, PhD, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil. e-mail: anibal@unicamp.br; fax: (55) 19-37887414.

Supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). L.C.A. and P.R.P. are supported by FAPESP and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), respectively.