

RENATA ALVES CAVALHEIRO

**EFEITO DO DERIVADO QUINAZOLÍNICO PD153035
SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL:
implicações na cardioproteção**

CAMPINAS

Unicamp

2008

RENATA ALVES CAVALHEIRO

**EFEITO DO DERIVADO QUINAZOLÍNICO PD153035
SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL:
implicações na cardioproteção**

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

ORIENTADOR: PROF. DR. ANÍBAL E. VERCESI

CO-ORIENTAÇÃO: PROF. DR. ROGER F. CASTILHO

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

C314e Cavalheiro, Renata Alves
Efeito do derivado quinazolínico PD153035 sobre a função
mitocondrial: implicações na cardioproteção / Renata Alves
Cavalheiro. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores : Aníbal Eugênio Vercesi, Roger Frigério Castilho
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Mitocondria. I. Vercesi, Aníbal Eugenio. II. Castilho, Roger
Frigério. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Effect of the 4-anilinoquinazoline PD153035 on
mitochondrial function: implication in cardioprotection**

Keywords: • Mitochondria

Titulação: Doutor em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

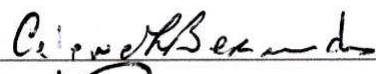
Banca examinadora:

Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi
Prof. Dr. Jiri Borecký
Profa. Dra. Celene Fernandes Bernardes
Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria
Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior

Data da defesa: 30 - 01 - 2008

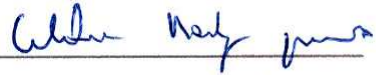
Banca examinadora da tese de Doutorado da aluna Renata Alves Cavaleiro

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Aníbal Eugênio Vercesi

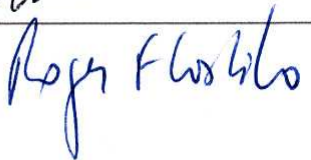
Profª. Dra. Celene Fernandes Bernardes 

Prof. Dr. Jiri Borecky 

Profª. Dra. Eliana Cotta de Faria 

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior 

Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi 

Co-orientador: Prof. Dr. Roger Frigério Castilho 

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

Data: 30/01/2008

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. Aníbal Eugênio Vercesi, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) e Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP-UNICAMP).

DEDICATÓRIA

Ao sol da minha vida, HENRIQUE...

A Deus...

Aos animais que foram utilizados para a realização dos experimentos...

Ao Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi pela oportunidade e orientação no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr Roger F. Castilho pela co-orientação, dedicação, sugestões, apoio na análise de resultados, correções da tese e ajuda na escrita do artigo.

Ao Prof. Dr Kleber G. Franchini e a Profa. Dra. Silvana Ap. Rocco do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular por colaborarem com minha pesquisa, fornecendo o composto PD153035 para o desenvolvimento deste trabalho e aos alunos e amigos, Rodrigo Miguel Marin e Luiz de Arruda Rolim Filho que foram responsáveis pela realização dos experimentos de coração isolado através da Técnica de Langerdorff.

À profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski do Laboratório de Mitocôndrias e Viabilidade Celular da USP pela orientação e avaliação dos experimentos com canal de potássio e células HL-1 e aos seus alunos: Ariel, Bruno, Erick, Felipe, Heberty, Maynara, e em especial, a Camille que cultivava as células HL-1 e contribuía para a realização dos experimentos de simulação isquêmica e reperfusão.

Ao Prof. Dr Jiri, pelo ensino e ajuda nos programas de computador no decorrer deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Jiri borecky, Celene Fagundes Bernardes, Eliana Cotta de Faria, Wilson Nadruz Junior e Fernanda Ramos Gadelhapelas correções e sugestões desta tese.

Ao meu marido Luciano, pelo amor, ajuda, compreensão e pelo incentivo no decorrer destes anos.

Aos meus pais, Arlei e Ilenir e aos meus irmãos, Junior e Arleni, por estarem sempre do meu lado.

Aos amigos do Laboratório de Bioenergética: Anna Maria, Ana Luiza, Bruno, Camila, Carina, Catarina, Dani, Evelise, Fernando (Félix Guerreiro), Giovanna, Jesus, Karina, Kívia, Leandro, Leda, Luciane, Márcia, Mariana, Natália (Pit Menina) e Sandra, pela companhia, amizade, descontração, ajuda....

Às técnicas e amigas, Edilene (Didi) e Elisângela (Mariângela), pelo isolamento de mitocôndrias, preparo de algumas soluções e principalmente pelo companheirismo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro de grande valia e pelo incentivo à pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Quando os ventos de mudança sopram,
umas pessoas levantam barreiras,
outras constroem moinhos de vento. ”*

Érico Veríssimo

	Pág.
RESUMO	<i>xxxiii</i>
ABSTRACT	<i>xxxvii</i>
1- INTRODUÇÃO	41
1.1- Mitocôndrias	43
1.2- A Cadeia de transporte de elétrons	44
1.3- Geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio	46
1.4- Transição de permeabilidade mitocondrial	48
1.5- PD153035 e seu efeito cardioprotetor	51
1.6- Isquemia e o papel mitocondrial na morte celular	52
1.7- Isquemia cardíaca	53
1.8- Ciclo do potássio	54
1.9- Pré-condicionamento isquêmico	58
2- OBJETIVOS	61
3- MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1- Animais	67
3.2- Isolamento de mitocôndrias hepáticas	67
3.3- Isolamento de mitocôndrias cardíacas	67
3.4- Degradação da deoxiribose	68
3.5- Dosagem de proteína	68
3.6- Determinação do conteúdo de grupos tiólicos	68

3.7- Consumo de oxigênio pelas mitocôndrias.....	69
3.8- Transporte de cálcio pelas mitocôndrias.....	69
3.9- Medida de inchamento mitocondrial.....	70
3.10- Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)...	70
3.11- Preparação de tecido para obtenção de fibras cardíacas.....	70
3.12- Consumo de oxigênio em tecido cardíaco	71
3.13- Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	71
3.14- Determinação da produção de peróxido de hidrogênio.....	71
3.15- Sistema de perfusão de coração isolado (Técnica de Langendorff).....	72
3.15.1- Canulação e acoplamento do coração ao sistema.....	73
3.15.2- Sistema de registro e monitorização da pressão intraventricular.....	73
3.16- Cultura de células cardíacas HL-1.....	74
3.17- Modelo experimental de simulação isquêmica e reperfusão em células HL-1.....	74
3.18- Avaliação da viabilidade celular.....	75
3.19- Análises estatísticas.....	75
4- RESULTADOS.....	77
4.1- Efeito do PD153035 na fosforilação oxidativa por mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	79
4.2- PD153035 na transição de permeabilidade em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	81
4.3- Efeito de PD153035 na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio associada a transição de permeabilidade e na oxidação de deoxiribose por Fe(III)-EDTA na presença de ascorbato.....	86

4.4- Efeito de PD153035 in vitro e in vivo em mitocôndrias isoladas de coração de rato.....	88
4.5- Determinação do controle respiratório em mitocôndrias isoladas de coração de ratos tratados com PD153035 e submetidos à isquemia/reperfusão.....	94
4.6- PD153035 na permeabilidade mitocondrial a K⁺.....	95
4.7- PD153035 na viabilidade em células HL-1 quando submetidas a uma incubação transitória com cianeto de potássio, na ausência de glicose...	100
5- DISCUSSÃO.....	105
6- CONCLUSÃO.....	115
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
8- ANEXO.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Antimicina A
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina bovina sérica
CR	Controle respiratório
CsA	ciclosporina A
DCF	diclorofluoresceína
EGTA	ácido tetraacético - etileno glicol – bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'
EROs	espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo reduzido
FCCP	carbonyl cyanide p-trifluoromethoxylhydrazone
H ₂ DCF ₂	diclorodihidrofluoresceína
H ₂ DCF ₂ -DA	diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HEPES	ácido N-[2-hidroxiethyl]piperazino-N'-[2-ethanosulfônico]
IMS	<i>intermembrane space</i> / espaço intermembrana
KCl	cloreto de potássio
MFR	mitocôndria de fígado de rato
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)

NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)
NaOH	hidróxido de sódio
O ₂	anion radical superóxido
P _i	fosfato inorgânico
PD153035	cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-bromofenil) aminoquinazolina
PTP	poro de transição de permeabilidade
TPM	transição de permeabilidade mitocondrial
UQ	ubiquinona (forma oxidada da coenzima Q)
UQH ₂	ubiquinol (forma reduzida da coenzima Q)-
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i> / canal aniônico voltagem-dependente
5HD	ácido 5-hidroxidecanóico
$\Delta\Psi$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
$\Delta\mu_{\text{H}}^{+}$	Gradiente eletroquímico de prótons

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela I- Velocidades de respiração, controle respiratório e razão ADP/O em mitocôndrias de coração de ratos controles e tratados com PD153035.....	91
Tabela II- Velocidades de produção basal de espécies reativas de oxigênio (H ₂ O ₂) ou na presença de antimicina A e FCCP em mitocôndrias isoladas de coração de ratos controles e tratados com PD153035.....	93

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Anatomia bioquímica da mitocôndria.....	44
Figura 2- Esquema do fluxo de elétrons e prótons pelos quatro complexos da cadeia respiratória.....	45
Figura 3- Modelo proposto para a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e EROs na membrana mitocondrial interna.....	50
Figura 4- Fórmula química do PD153035.....	51
Figura 5- Ciclo do potássio mitocondrial.....	55
Figura 6- Esquema do sistema de perfusão de coração isolado e registro da pressão ventricular esquerda utilizado.....	72
Figura 7- Efeito de PD153035 sobre as velocidades de respiração mitocondrial..	79
Figura 8- Efeito de PD153035 sobre o controle respiratório e a razão ADP/O.....	80
Figura 9- PD153035 inibe o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+}	81
Figura 10- PD153035 e CsA inibem o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+}	83
Figuras 11- Efeito de Ca^{2+} e CsA no conteúdo de grupos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial.....	84
Figura 12- PD153035 aumenta a capacidade de mitocôndrias de fígado de rato em reter Ca^{2+}	85
Figura 13- Efeito de PD153035 no estímulo por Ca^{2+} na geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio.....	86
Figuras 14- Efeito de PD153035 e DMSO (seqüestrador de $\bullet\text{OH}$) na degradação oxidativa da deoxiribose induzida por Fe(III)-EDTA + ascorbato.....	88

Figura 15-	Efeito de concentrações micromolares de PD153035 na captação e retenção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias de coração de rato.....	89
Figura 16-	Efeito de concentrações nanomolares de PD153035 na captação e retenção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias de coração de rato.....	90
Figura 17-	Captação de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de coração de ratos controle e tratados com PD153035.....	92
Figura 18-	Controle respiratório em mitocôndrias isoladas após processo de isquemia/reperfusão em coração de ratos controles ou tratados com PD153035.....	94
Figura 19-	Efeito de PD153035 10 nM no inchamento mitocondrial induzido pela entrada de K^{+} em mitocôndrias isoladas de coração de rato.....	96
Figura 20-	Inchamento mitocondrial induzido pela entrada de K^{+} em mitocôndrias isoladas de coração de ratos controles e tratados com PD153035.....	97
Figura 21-	Caracterização do efeito <i>in vitro</i> de PD153035 no inchamento mitocondrial induzido pela entrada de K^{+} em mitocôndrias de coração de rato.....	98
Figura 22-	Consumo de O_2 por fibras cardíacas obtidas de animais controles e tratados com PD153035.....	99
Figura 23-	Estímulo do transporte de K^{+} por mitocôndrias de coração de ratos tratados com PD153035 está associado com a diminuição do potencial de membrana formado pela hidrólise de ATP através da atividade reversa da ATP sintase mitocondrial.....	100
Figura 24-	PD153035 protege células HL-1 após tratamento transitório com KCN na ausência de glicose.....	102
Figura 25-	5HD reverte o efeito protetor do PD153035 em células HL-1 submetidas a um tratamento transitório com KCN na ausência de glicose.....	103



RESUMO

A ação da aminoquinoxolína PD153035 sobre a função mitocondrial foi investigada. A adição de diversas concentrações de PD153035 em suspensões mitocondriais hepáticas diminuiu o controle respiratório de maneira dose-dependente, promoveu a inibição do fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) sensível a ciclosporina A, aumentaram também a capacidade em reter o Ca^{2+} e diminuíram a produção de espécies reativas de oxigênio. Nas mesmas condições experimentais, avaliando suspensões mitocondriais cardíacas de animais controles e tratados com PD153035 (32 mg/Kg, v.o.), nenhum efeito significativo foi observado. Comparando mitocôndrias isoladas de animais controles e tratados com PD153035, submetidos à isquemia/reperfusão, observamos que o controle respiratório do animal tratado manteve-se semelhante ao de organelas controles. Observou-se também que mitocôndrias isoladas de corações de ratos tratados aumentaram mais rapidamente de volume em relação ao controle, quando incubadas em solução hiposmótica contendo íons potássio, o que não ocorreu quando o K^+ do meio de reação foi substituído por Na^+ ou Li^+ . Efeito semelhante foi observado quando mitocôndrias isoladas de coração de rato foram incubadas *in vitro* com PD153035 (10 nM). O aumento de volume mitocondrial induzido por PD153035 *in vivo* e *in vitro* foi inibido por ATP e 5-hidroxi-decanoato (5HD) (antagonistas de canal mito K_{ATP}). Em mitocôndrias isoladas de ratos tratados com PD153035 observou-se um menor potencial de membrana mitocondrial interna formado pela hidrólise de ATP pela F_0F_1 ATPase. Em adição, fibras musculares cardíacas obtidas de ratos tratados com PD153035 *in vivo* apresentaram um leve aumento na respiração basal, o que está de acordo com uma maior permeabilidade mitocondrial à K^+ . Em células cardíacas (miócitos HL-1) submetidas a um tratamento transitório com cianeto de potássio na ausência de glicose e na presença de PD153035 mantiveram a viabilidade celular; o efeito foi abolido pelo 5HD. Estes resultados indicam que a cardioproteção conferida por este composto pode estar relacionada à ativação de canais de potássio mitocondriais (mito K_{ATP}), pois o 5HD reverteu o efeito causado pelo PD153035 no aumento na permeabilidade mitocondrial cardíaca a K^+ e na viabilidade observada nas células HL-1.



ABSTRACT

The action of the aminoquinazoline PD153035 on the mitochondrial functions was investigated. The addition of various PD153035 concentrations (5, 10, 20 and 40 μM) to liver mitochondria decreased the mitochondrial respiratory control, induced mitochondrial permeability transition cyclosporin A-sensitive, increased the mitochondrial calcium uptake capacity and reduced mitochondrial reactive oxygen species production. Under this same experimental conditions, no effect was observed in rat heart mitochondria when the rat was treated or not with PD153035 (32 mg/kg v.o.) No effect was also observed in the mitochondrial respiratory control of controls and PD153035-treated animals submitted to ischemia/reperfusion. A rapid rat heart mitochondrial swelling was observed when the mitochondrial suspensions were previously incubated in a hyposmotic solution containing potassium ions while no effect was observed when all K^+ of the medium were replaced by sodium or lithium ions. Similar results were observed in isolated rat heart mitochondria incubated *in vitro* with PD153035 (10 nM). This mitochondrial swelling induced by PD153035 *in vivo* and *in vitro* was inhibited by ATP or 5-hydroxydecanoate, both $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ channel antagonists. A smaller rat liver mitochondrial inner membrane potential was observed after PD153035 treatment and this effect was due to ATP hydrolysis by F_0F_1 ATPase. In addition, cardiac muscle fibers from PD153035-treated rats presented a slight increase in basal respiration supporting the higher mitochondrial K^+ permeability. Cardiac cells (HL-1) treated with PD153035 and submitted to a transitory treatment with potassium cyanide in the absence of glucose maintained the cellular viability that was abolished by 5HD. These results suggest that the cardioprotection conferred by the PD153035 probably was related with the $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ activation, since the $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ channel antagonist 5HD inhibited the PD153035 effect on both cardiac mitochondrial K^+ permeability and HL-1 cell viability.



1- INTRODUÇÃO

Infarto do miocárdio, aterosclerose, 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. Nos Estados Unidos da América o número de mortes anual relacionado a essas desordens ultrapassa 2,3 milhões e no Brasil 800 mil. Há perspectiva de que em 2020, o número de mortes causadas por doença coronariana, no mundo, aumente para 11,1 milhões (YELLON e DOWNEY, 2003).

1.1- Mitocôndrias

Estrutura

As mitocôndrias estão presentes em quase todas as células eucarióticas animais e vegetais. São as organelas responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução para a forma de energia química necessária para os processos celulares (NICHOLLS e FERGUSON, 2002).

As mitocôndrias têm dimensões da ordem de grandeza de 1 μm , e estruturalmente são constituídas por duas membranas e dois compartimentos por elas limitados. O compartimento mais interno é a matriz mitocondrial, que contém enzimas do ciclo de Krebs e da β -oxidação de ácidos graxos. O segundo compartimento, cujo volume é diminuto, é o chamado espaço intermembrana, localizado entre as membranas mitocondriais interna e externa. A membrana mitocondrial externa contém proteínas chamadas “porinas”, que atuam como poros não-específicos para solutos de peso molecular menor que 10 kDa, com tamanhos que variam entre 2,5 – 3,0 nm, pelos quais passam livremente a água e solutos de baixo peso molecular (CESAR e WILSON, 2004).

A membrana mitocondrial interna apresenta invaginações formando as cristas mitocondriais e é altamente seletiva, sendo permeável apenas para o O_2 , CO_2 , NO e H_2O . Nesta membrana encontram-se os componentes enzimáticos da cadeia respiratória, bem como os transportadores específicos para o ATP, ADP, piruvato, Ca^{2+} e fosfatos (NICHOLLS e FERGUSON, 2002). É constituída por cerca de 75% de proteínas e dentre os lipídeos presentes estão o colesterol, em pequenas concentrações e a cardiolipina, representando cerca de 20% do conteúdo total de fosfolipídios (SCHLAME et al., 2000).

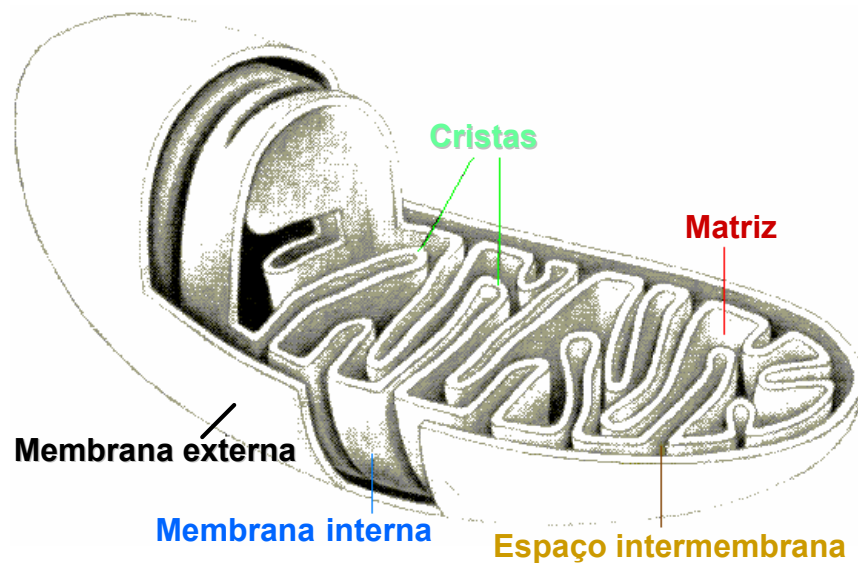


Figura 1- Anatomia bioquímica da mitocôndria.

www.juvenon.com/science.html

1.2- A Cadeia de Transporte de Elétrons

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, é a cadeia respiratória que controla a energia redox necessária para gerar este potencial de membrana mitocondrial e promover a fosforilação oxidativa (LEHNINGER, et al., 1995).

Os elétrons provenientes das coenzimas NADH e $FADH_2$, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos a NADH desidrogenase (complexo I, **FIGURA 1**). O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH_2). Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. 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 oxiredutase (como resultado da β -oxidação de ácidos graxos). A UQH_2 é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona ($UQH^\bullet$), a

forma que doa elétrons ao citocromo c. Existem dois conjuntos separados de UQH^+ , um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de UQH^+ são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o citocromo c. O citocromo c transfere elétrons a citocromo oxidase (complexo IV). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de elétrons (NICHOLLS e FERGUSON, 2002).

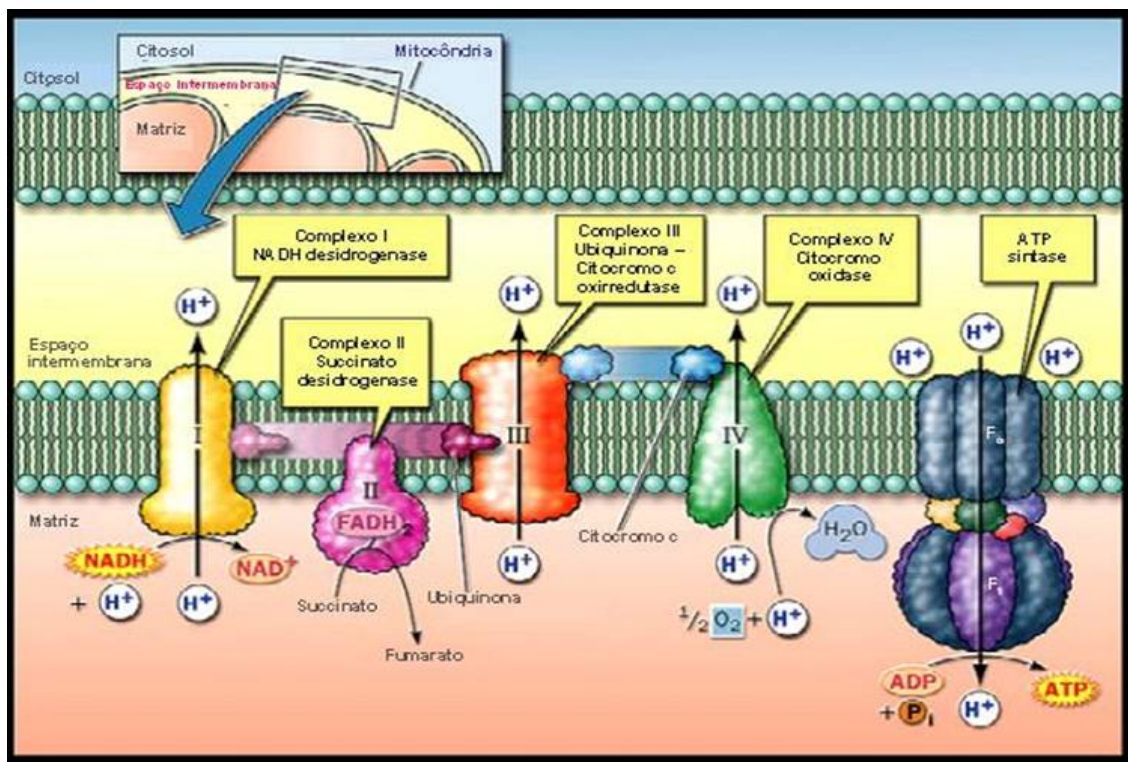


Figura 2- Fluxo de elétrons e prótons pelos quatro complexos da cadeia respiratória.

Os elétrons alcançam a UQ via complexo I e II. UQ funciona como um transportador móvel de elétrons e prótons. Ele passa elétrons ao Complexo III, que os passa a um outro componente, o citocromo c. O Complexo IV transfere elétrons do citocromo c reduzido ao O_2 . O fluxo de elétrons pelos Complexos I, III e IV é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembrana. O gradiente de prótons formado pela cadeia respiratória é utilizado pela ATP-sintase para fosforilar ADP formando ATP (NICHOLLS e FERGUSON, 2002).

Segundo MITCHELL (1961), a passagem de elétrons através da sequência de reações intermediárias da cadeia respiratória permite um fluxo de H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembrana, 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 (ΔpH) oscila na faixa de 0 a 1 unidade de pH. O fluxo de H^+ através da F_0F_1 -ATP sintase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, estaria diretamente acoplado à produção de ATP a partir da fosforilação do ADP por P_i . A ATP-sintase, responsável por esta reação, é uma enzima cuja composição varia um pouco de espécie para espécie, contém 16 proteínas diferentes e é constituída de duas regiões bem distintas denominadas: F_1 , solúvel e localizada na matriz mitocondrial e região F_o , hidrofóbica e mergulhada na membrana mitocondrial interna, onde estão também localizados os complexos da cadeia respiratória (LUTTER et al., 1993).

A geração de um gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons ($\Delta\mu H^+$) 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^{4-} por ADP^{3-} , a redução de $NAD(P)^+$ pela transidrogenase específica e a captação eletroforética de Ca^{2+} que transporta duas cargas positivas para o interior da mitocôndria (LEHNINGER, et al., 1995).

1.3- Geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio

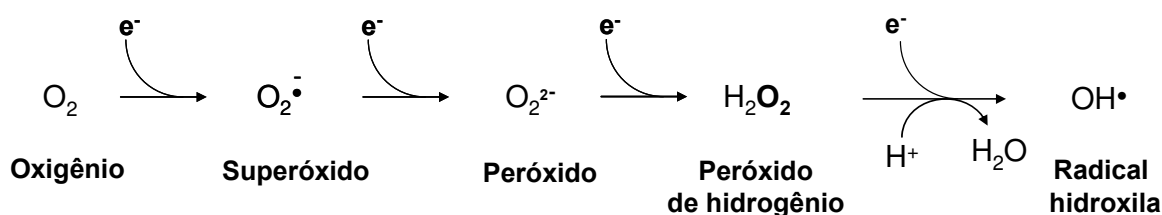
O funcionamento da cadeia de transporte de elétrons que reduz continuamente oxigênio molecular (O_2) para formar o potencial eletroquímico transmembrana de prótons necessário para a síntese de ATP, tem um importante efeito colateral para as células: a constante geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Durante a transferência de elétrons através da cadeia respiratória mitocondrial, grande parte dos elétrons é utilizado para reduzir o oxigênio à água. Um a dois elétrons perdidos, consumidos pela cadeia respiratória sofre redução monoelétrica, gerando o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (ver revisão: VERCESI et al., 2006). Devido ao contínuo funcionamento da cadeia respiratória, o vazamento de elétrons é suficiente para fazer com que a geração de $O_2^{\bullet-}$ seja a maior fonte celular de EROs na maioria dos tecidos. A produção de $O_2^{\bullet-}$ no complexo I ocorre na altura da NADH desidrogenase promovida pelos substratos dependentes de NAD^+ tais como malato, glutamato e piruvato. É estimulado por rotenona, um inibidor da transferência de elétrons do complexo I à coenzima Q (KAPLAN e PEDERSEN, 1983). O vazamento de elétrons ao nível de coenzima Q ocorre provavelmente durante a doação de elétrons do ânion semiquinona para o oxigênio e é estimulado por succinato, cianeto e antimicina A (ROBINSON e COPER, 1970; CADENAS et al, 1977; KAPLAN e PEDERSEN, 1983). A antimicina bloqueia a formação de $UQH^{\bullet}$ na face matricial da membrana mitocondrial interna, promovendo um acúmulo de semiquinona formados anteriormente na face citosólica da membrana mitocondrial interna (ROBINSON e COPER, 1970; TURRENS, 1997).

A geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um processo contínuo e fisiológico, por esse fato essas organelas desenvolveram um sistema de defesa antioxidante complexo. A mitocôndria contém uma superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) similar a SOD de bactérias (DOONAN et al., 1984), capaz de dismutar o $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . Este último, altamente permeável por membranas biológicas, pode ser removido por antioxidantes como a catalase, podendo ser encontrada em mitocôndrias de coração de rato (RADI et al., 1991) e tioredoxina peroxidase (KOWALTOWSKI et al., 1998). As mitocôndrias apresentam também glutathione peroxidase, capaz de remover o H_2O_2 utilizando glutathione reduzida como substrato (SIES e MOSS, 1978; ZAKOWSKI e TAPPEL, 1978). A forma oxidada da glutathione pode ser reduzida novamente através da glutathione redutase, tendo NADPH como doador de elétrons. O NADH pode então reduzir o $NADP^+$ numa reação catalisada pela NADH: $NADP^+$ transidrogenase (VERCESI et al., 1997). Alternativamente, H_2O_2 pode gerar $HO^{\bullet}$, que é altamente reativo e citotóxico por clivagem homolítica redutiva. A maior parte do $HO^{\bullet}$ gerado, *in vivo*, provém da reação de

Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{HO}^- + \text{Fe}^{3+}$) (ver revisão: HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1992). No coração a detoxificação do H_2O_2 mitocondrial é feita pela catalase (RADI et al., 1991).

Em casos de aumento na produção de EROs ou deficiência no sistema antioxidante mitocondrial, essas espécies reativas podem oxidar macromoléculas da membrana mitocondrial interna e esse dano pode levar a uma permeabilização não específica dessa membrana, processo conhecido como Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) (KOWALTOWSKI et al., 2001a).



1.4- Transição de permeabilidade mitocondrial

A membrana mitocondrial interna possui um alto conteúdo proteico, sendo assim alvo de EROs geradas pela mitocôndria (MURAMUTSU et al., 1977; KOWALTOWSKI et al., 2001a). A primeira evidência de que a TPM era causada por EROs geradas pela mitocôndria foi apresentada quando LEHNINGER e co-autores demonstraram que o estado oxidado de nucleotídeos de piridina estimulava o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial (JENSEN et al., 1986), resultados confirmados posteriormente (NICHOLLS e ÅKERMAN, 1982; VERCESI et al., 1991).

As alterações oxidativas das proteínas da membrana mitocondrial interna, que ocorrem na presença de Ca^{2+} levam a uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna (MACEDO et al., 1988; VERCESI et al., 1997). Esta permeabilização é dependente da presença de Ca^{2+} no espaço intermembrana e é inibida por concentrações submicromolares de ciclosporina A, um imunossupressor. Essa inibição ocorre pela ligação da ciclosporina a ciclofilinas da membrana mitocondrial interna, que seriam necessárias para a abertura do poro da TPM (LEBEL et al., 1982, GARCIA-RUIZ et al., 1997) (**FIGURA 3**).

O nome “transição de permeabilidade” é utilizado devido à observação de que a permeabilização mitocondrial nesta situação pode ser parcialmente revertida pela adição de quelantes de Ca^{2+} ou redutores ditiólicos logo após a permeabilização (HUNTER e HAWORTH, 1979; VALLE et al., 1993; CASTILHO et al., 1996). A transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca^{2+} pode ser estimulada por um grande número de compostos conhecidos como indutores (ZORATTI e SZABÒ, 1995), que incluem o fosfato inorgânico (P_i) (ROSSI e LEHNINGER, 1964), oxidantes de nucleotídeos de piridina, protonóforos (BERNARDI, 1992) e reagentes ditiólicos (LENARTOWICZ et al., 1991; BERNARDES et al., 1994). A maioria destes indutores são compostos capazes de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial promovido pelo Ca^{2+} (CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 1996; VERCESI et al., 1997). Peroxidasas tiólicas, como a ebselen e a proteína antioxidante específica para tióis (TSA) mostraram-se eficientes inibidores da TPM (KOWALTOWSKI et al., 1998), reforçando ainda mais esta hipótese. A ligação entre o Ca^{2+} , importante elemento para abertura do poro, e o aumento mitocondrial da geração de EROs pode ser dada por mudanças na organização lipídica da membrana mitocondrial interna, promovida pela interação de lipídios com esse íon (KOWALTOWSKI et al., 2001b).

O Ca^{2+} matricial liga-se a cardiolipina na face interna da membrana mitocondrial interna causando alteração ultraestrutural da cadeia respiratória que facilita a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e conseqüentemente de H_2O_2 (GRIJALBA et al., 1999). Este lipídeo possui cabeça polar eletronegativa e está presente em altas concentrações (14-23%) na membrana mitocondrial interna em uma grande variedade de tecidos. Simultaneamente, o Ca^{2+} mobiliza Fe^{2+} na matriz mitocondrial que estimula a reação de Fenton e a produção de radical hidroxil que ataca tióis de proteínas, lipídeos e DNA mitocondrial (MERRYFIELD e LARDY, 1982; CASTILHO et al., 1995; VERCESI et al., 1997). A oxidação de NADPH e GSH causada por próoxidantes prejudicam a eliminação de H_2O_2 pelas enzimas glutathione peroxidase (GP) e glutathione redutase (GR). Em contraste, a rápida difusão de H_2O_2 através da membrana mitocondrial permite a sua detoxificação por catalase extramitocondrial no coração (VALLE et al., 1993; CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 1998).

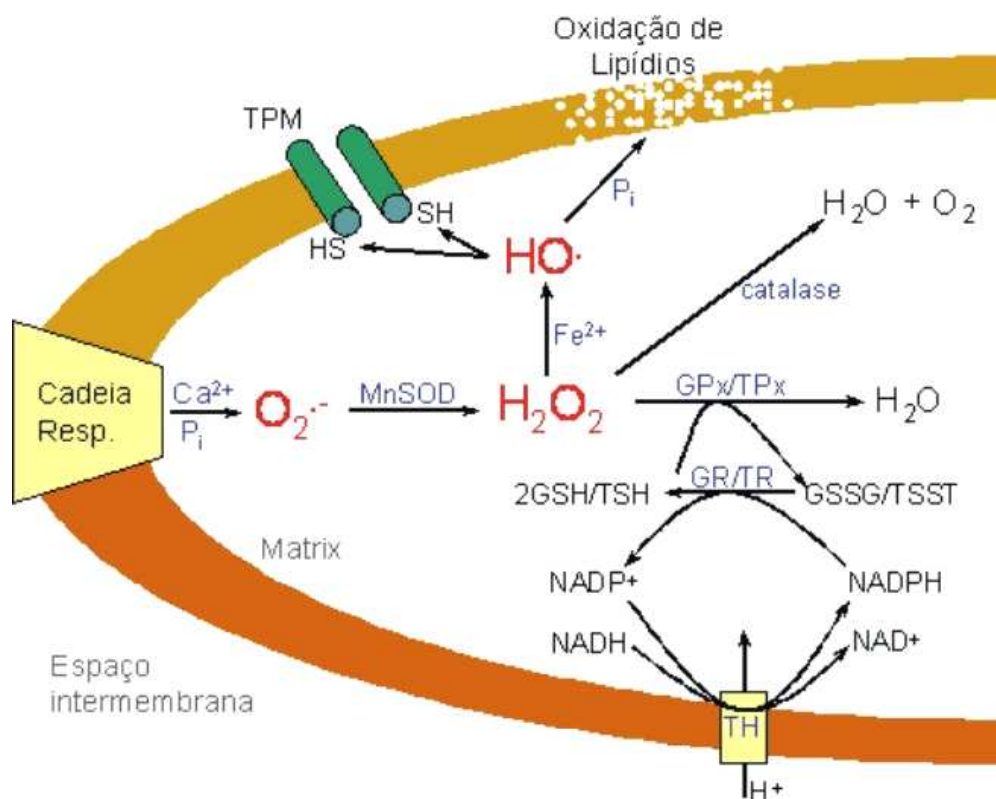


Figura 3- Modelo proposto para a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e EROs na membrana mitocondrial interna

Acúmulo de EROs mitocondrial causa TPM. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radicais $O_2^{\bullet-}$. Estes radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), que promove a geração de H_2O_2 . O H_2O_2 é então reduzido à H_2O pela glutatona peroxidase (GP), tioredoxina peroxidase (TP) ou catalase (em mitocôndria de coração). GSH, oxidado pela GP, e TSH, oxidado pela TP, são recuperados pelo sistema enzimático glutatona e tioredoxina redutases (GR e TR), que usam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então $NADP^+$ usando a NADH:NADP⁺ transidrogenase (TH). Quando a geração de $O_2^{\bullet-}$ aumenta na presença de Ca^{2+} e P_i , e/ou os mecanismos de remoção de H_2O_2 estão inativados, H_2O_2 acumula-se e na presença de Fe^{2+} gera o radical $OH^{\bullet}$ altamente reativo. $OH^{\bullet}$ oxida grupos tiólicos (-SH) do complexo do poro de TPM, levando à formação e abertura do poro. Alternativamente, $OH^{\bullet}$ pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i (KOWALTOWSKI et al., 2001b).

1.5- PD153035 e seu efeito cardioprotetor

Os derivados quinazolínicos possuem efeitos pleiotrópicos com capacidade de afetar as funções e atividades de receptores α_1 -adrenérgicos (BOLOGNESI et al., 2001), fosfodiesterases (UKITA et al., 2001), tirosina cinases (LEVITZKI et al., 1999) e de adenosina cinases (JARVIS, 2000; COWARD et al., 2001). Devido sua propriedade de inibir tirosina cinases, os derivados quinazolínicos têm sido atualmente empregados com sucesso no combate de doenças proliferativas como o câncer.

As 4-anilinoquinazolininas foram descobertas em 1994 (FRY et al., 1994; GAZIT et al., 1996), sendo que a 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-bromofenil) aminoquinazolina (PD153035) (**FIGURA 4**) foi o primeiro composto identificado como inibidor de tirosina cinase, em células A-431 (IC_{50} de 0,025 nM), com elevada potência e alta especificidade. Atualmente, este composto encontra-se em testes terapêuticos em pacientes com câncer.

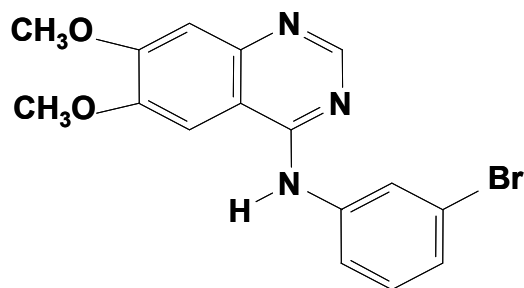


Figura 4- Fórmula química de 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-bromofenil) aminoquinazolina - PD153035.

Além disso, em corações isolados de ratos verificou-se este composto causou um aumento na pressão ventricular e diminuição dose-dependente da frequência cardíaca, resultando em resposta bradicárdica de aproximadamente 25% dos valores basais (MARIN, 2003). Foram realizados experimentos de isquemia em corações isolados para verificar se o tratamento com PD153035 também poderia estar protegendo o miocárdio. Os resultados

comprovaram a hipótese, revelando efeito protetor do PD153035 em corações isquêmicos a partir de concentrações de 1 nM. O mecanismo de ação do PD153035 como cardioprotetor ainda não é claro, sendo proposto que possa ser mediado direta ou indiretamente pela ativação de receptores de adenosina (MARIN e FRANCHINI, 2005). Outros mecanismos de ação possíveis para explicar o efeito cardioprotetor da PD153035 seria a inibição da TPM ou atuação desse fármaco induzindo a abertura do canal de potássio mitocondrial.

1.6- Isquemia e o papel mitocondrial na morte celular

Isquemia tecidual é a condição em que há deficiência parcial ou total na perfusão sanguínea de um tecido. A consequência principal da isquemia é a inibição do metabolismo energético aeróbio ocasionado pela rápida diminuição da concentração tecidual de O₂: ocorre a lentificação ou a parada da fosforilação oxidativa e a rápida diminuição dos níveis teciduais de ATP. A velocidade da glicólise é aumentada, há esgotamento do estoque de substratos fermentáveis e remoção ineficiente de alguns íons que se acumulam no meio extracelular (ver revisão: LIEBERTHAL et al., 1998).

A importância fisiopatológica da isquemia deriva do fato da mesma provocar, em um intervalo curto de tempo, ainda que variável, a ocorrência de disfunção e morte celular. Porém, a morte celular apresenta duas vias, necrose e apoptose. As células em necrose mostram aumento de volume celular e mitocondrial e distorção das cristas mitocondriais, ocasionando perda da integridade da membrana plasmática, liberação do conteúdo citosólico e desencadeamento de inflamação no local. Ao contrário, células em apoptose exibem perda precoce de adesão às células vizinhas e à matriz extracelular, redução de volume, mitocôndrias com escassas alterações morfológicas, condensação e fragmentação nuclear, ocasionando a desintegração em corpúsculos apoptóticos que são fagocitados por células vizinhas, sem ocorrência de inflamação (LIEBERTHAL et al., 1998).

A necrose derivada da isquemia tem como característica bioquímica principal a depleção exacerbada de ATP, resultando na ativação descontrolada de uma série de vias bioquímicas e alterações em numerosos componentes celulares: o ATP citosólico é hidrolisado a ADP e este a AMP e adenosina, que tendem a ser perdidos pela célula por difusão através da membrana plasmática e os níveis de ATP não podem ser recuperados pela reperfusão (WEIMBERG et al., 2000). O funcionamento da Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática e do retículo endoplasmático é prejudicado pela escassez de ATP, causando um aumento das concentrações de Ca^{2+} citosólico que contribui para a ativação desregulada de várias vias bioquímicas (EDELSTEIN et al., 1997). As mitocôndrias sofrem lesão significativa com destaque para a redução da atividade do complexo I, diminuindo a capacidade da produção de ATP e após a reperfusão há uma grande geração de EROs (WEIMBERG et al., 2000). Esta geração de EROs causa danos a proteínas, membranas lipídicas e ao DNA mitocondrial. Nas mitocôndrias, tanto o Ca^{2+} quanto EROs contribuem para desencadear a TPM, ocasionando morte celular.

O processo de morte celular por apoptose é efetuado diante da ativação de uma série de proteínas da família das caspases, formando uma via final comum, que regula a sobrevivência e o desencadeamento da apoptose (STELLER, 1995; THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998). Vários eventos celulares resultantes de isquemia que levam a necrose, como a depleção de ATP, estresse oxidativo e acúmulo mitocondrial de Ca^{2+} são capazes de desencadear a apoptose. O processo de apoptose tem influência mitocondrial onde há permeabilização da membrana mitocondrial externa, provocando a liberação para o citosol de proteínas como o citocromo c (fator indutor de apoptose) e Smac/DIABLO, que são capazes de ativar caspases. Se ocorrer ruptura da MME, essa permeabilização provavelmente seja consequência da TPM (GREEN e KROEMER, 2004).

1.7- Isquemia cardíaca

As modalidades farmacológicas disponíveis atualmente são eficientes no tratamento dos sintomas, mas não na progressão das cardiopatias de origem isquêmica. A isquemia cardíaca é caracterizada por redução no suprimento de oxigênio coronariano, limitando ou até cessando a fosforilação oxidativa (ver revisão: HALESTRAP et al., 2007).

Dessa forma, durante a isquemia, as células cardíacas tentam manter o nível de ATP através da glicólise, porém essa via não é suficiente para atender as necessidades desse órgão, que entra em falência assim que a concentração de ATP diminui. A produção aumentada de ácido láctico pela glicólise associada à inadequada remoção de lactato e prótons do miócito provocam a diminuição do pH intracelular. Isto tem efeito inibitório sobre a glicólise, contribuindo para diminuir ainda mais a concentração de ATP (HALESTRAP, et al., 1998; SULEIMAN et al., 2001; HALESTRAP et al., 2004). Na tentativa de restaurar o pH intracelular, o transportador Na^+/H^+ é ativado, levando a um aumento do Na^+ intracelular. Como a célula não possui ATP suficiente para ativar a Na^+/K^+ ATPase para bombear Na^+ para fora da célula, o Na^+ é acumulado, impedindo a saída de Ca^{2+} da célula através do antiporter $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Na mitocôndria, parte desse Ca^{2+} pode entrar pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial que em condições fisiológicas exclui Ca^{2+} da matriz mitocondrial, mas durante isquemia tem seu papel invertido, acumulando Ca^{2+} . Entretanto, é durante a reperfusão que um excesso de Ca^{2+} entra rapidamente na mitocôndria via uniporter de Ca^{2+} (GRIFFITHS e ELLNOR, 2001; HALESTRAP et al., 2001; ver revisão: HALESTRAP et al., 2007). Essas mudanças metabólicas e iônicas provocam redução na função miocárdica. Se o fluxo coronariano é rapidamente restaurado, as homeostases iônica e metabólica são re-estabelecidas, e a recuperação ocorre. Entretanto, se a reperfusão ocorrer depois de prolongada isquemia, pode haver lesão irreversível (SULEIMAN et al., 2001). Durante a reperfusão, o ressuprimento de O_2 associado a doadores monoelétrônicos da cadeia respiratória, formados durante o período de isquemia, leva a uma excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (MCFALLS et al., 2003).

1.8- Ciclo do potássio

O ciclo do K^+ mitocondrial consiste no influxo e efluxo de K^+ , H^+ e ânions que são trocados entre a matriz e o espaço intermembrana (**FIGURA 5**). O K^+ é o cátion mais abundante do citosol e da matriz mitocondrial presente em concentrações (~150 mM, Kowaltowski et al., 2002) similares àquelas do citosol. A membrana mitocondrial interna tem baixa permeabilidade ao K^+ , assim como para os outros íons, o que preserva a força próton-motriz para a síntese de ATP (MITCHELL, 1961). Além da pequena difusão de K^+

do citosol para a matriz mitocondrial, esse cátion pode ser transportado por processo eletroforético através de uniporters, localizados na membrana mitocondrial interna. Um desses canais foi identificado por se sensível a ATP (mitoK_{ATP}) (INOUE et al., 1991) e outro por ser ativado por Ca²⁺ (SIEMEN et al., 1999). A entrada do K⁺ na matriz mitocondrial é acompanhada osmoticamente por água e por fosfato (P_i), resultando no inchamento do volume da matriz mitocondrial; o excesso do íon é eliminado pelo trocador K⁺/H⁺, evitando a ruptura da organela (GARLID, 1978). O trocador K⁺/H⁺ usa o potencial de H⁺ como força motriz para transportar K⁺ para fora da matriz mitocondrial, causando leve diminuição no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) o que leva a um aumento da respiração da organela para recompor o gradiente de prótons e preservar a síntese de ATP.

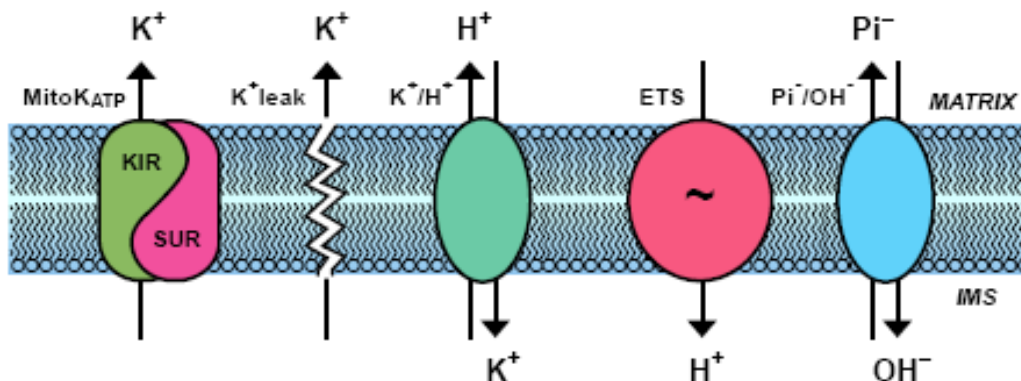


Figura 5- Ciclo do potássio.

Os mitoK_{ATP} são uniporters presentes na membrana mitocondrial interna que transportam K⁺ para a matriz. A entrada de K⁺ é acompanhada osmoticamente por H₂O₂ e o excesso do íon K⁺ é eliminado pelo trocador K⁺/H⁺. Estes canais são inibidos por ATP e 5HD (GARLID e PAUČEK, 2003).

Existem dois tipos de canais de potássio sensíveis a ATP: canal de K⁺ mitocondrial (mitoK_{ATP}) e canal de K⁺ de membrana plasmática (cellK_{ATP}). Os cellK_{ATP}s foram descritos em miócitos de ventrículos por NOMA em 1983 e são inibidos fisiologicamente por ATP e quando há queda de ATP, a abertura deste canal acontece. Estes canais parecem estar ligados ao estado metabólico da célula e estão presentes em vários tecidos incluindo o músculo esquelético, cérebro, fígado, coração, células pancreáticas β e músculo liso (ver revisão: EDWARDS e WESTON, 1993).

A secreção da insulina através das células pancreáticas β é controlada pelo metabolismo da glicose e a abertura de $\text{cellK}_{\text{ATP}}$ inibe a secreção da insulina devido a hiperpolarização da membrana, enquanto que a despolarização da membrana reduz a atividade do canal aumentando a secreção da insulina (ver revisão: EDWARDS e WESTON, 1993).

A glibenclamida, um inibidor de $\text{cellK}_{\text{ATP}}$, é utilizada para o tratamento de diabetes tipo II. Este medicamento despolariza as células β aumentando assim a secreção da insulina. O mesmo acontece em músculo liso onde a abertura de $\text{cellK}_{\text{ATP}}$ hiperpolariza a membrana causando relaxamento do músculo. Em miocárdio, o papel de $\text{cellK}_{\text{ATP}}$ não está bem esclarecido, mas em modelos isquêmicos, o bloqueio de $\text{cellK}_{\text{ATP}}$ inibe a arritmogênese e sua abertura inibe a despolarização isquêmica reduzindo a entrada de Ca^{2+} (bloqueio de canal de Ca^{2+} indireto) (ver revisão: GARLID et al.; 2003).

Os $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ são regulados negativamente por ATP, ADP, hidroxidecanoato e ativados pelo pinacidil (KOWALTOWSKI et al., 2001b), diazóxido (DZX) e cromacalina (GARLID et al., 1997). Evidências *in vivo* indicam que $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ é aberto por sinalizadores endógenos. Numerosas cinases são ativadas por estes caminhos e é sensato dizer que $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ *in vivo* regula o fluxo de K^+ para manter a estrutura e integridade funcional da mitocôndria necessária para a fosforilação oxidativa (GARLID et al., 2003).

GARLID e PAUCEK (2001) demonstraram que o $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ é composto por duas subunidades proteicas que são responsáveis pela atividade deste canal: mitoKIR tem propriedade de transporte e é similar ao $\text{cellK}_{\text{ATP}}$ e a subunidade mitoSUR que é uma subunidade receptora (MIRONOVA, et al., 2004). Segundo GARLID, o diazóxido (agonista farmacológico) é 1000 vezes mais potente na abertura do $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ cardíaco em comparação ao $\text{cellK}_{\text{ATP}}$ cardíaco e o 5HD inibe o $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, mas não $\text{cellK}_{\text{ATP}}$ (GARLID et al., 1997).

Dentre as principais funções demonstradas do transporte de K^+ para a matriz mitocondrial através dos $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ está a proteção do miocárdio frente a situações de isquemia e reperfusão (GARLID et al., 1997). Os resultados de TSUCHIDA et al. (2001) confirmaram a hipótese demonstrando que o diazóxido reduziu a área infartada quando

administrado depois da isquemia. Em 2001, KOWALTOWSKI et al., demonstrou que o mitoK_{ATP} poderia agir como um canal regulado para a entrada de K⁺ para a mitocôndria, permitindo o controle do volume mitocondrial independentemente de pequenas mudanças no potencial de membrana (KOWALTOWSKI et al., 2001a). A manutenção do volume inibe a captação de Ca²⁺ durante períodos isquêmicos (MURATA et al., 2001; FACUNDO et al., 2005) que, associada a uma menor geração de EROs na mitocôndria (FACUNDO et al., 2005, FACUNDO et al., 2006a), determina uma baixa permeabilidade da membrana plasmática a Ca²⁺, diminuindo a hidrólise de ATP durante a isquemia e preservando energeticamente o tecido isquêmico (BELISLE e KOWALTOWSKI, 2002; DOS SANTOS et al., 2002). A diminuição da geração de EROs pela mitocôndria leva a um efeito protetor através da inibição da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial.

Um ponto bastante controverso na literatura é a relação entre a abertura do mitoK_{ATP} e a geração de EROs. Neste contexto, VANDEN HOEK et al. (1998) demonstraram que a geração de EROs pela mitocôndria durante o recondicionamento isquêmico é necessária para ativar a proteção contra o estresse oxidativo gerado durante a reperfusão (VANDEN HOEK et al., 2000). De fato, adições exógenas de EROs podem promover proteção similar ao recondicionamento (YAGUCHI et al., 2003) e antioxidantes evitam os efeitos protetores (VANDEN HOEK et al., 1998).

Outra hipótese é que em mitocôndrias isoladas, a ativação do mitoK_{ATP} diminui a geração de EROs (FERRRANTI et al., 2003), onde a formação de EROs durante o pré-condicionamento é anterior a ativação pelo mitoK_{ATP} (FACUNDO et al., 2006a). Essas EROs devem ativar esse canal durante esse processo, diminuindo a geração destas espécies posteriormente (FACUNDO et al., 2007).

1.9- Pré-condicionamento isquêmico

Em 1986, MURRY et al. fizeram uma descoberta surpreendente: corações submetidos a um período curto de isquemia (5 min) apresentavam lesão menor quando eram posteriormente submetidos a um período isquêmico mais longo (40 min), se comparados a corações em que não houve o período curto de isquemia. Esse período curto de isquemia cardíaca não lesiva foi denominado “pré-condicionamento isquêmico” e a sua eficácia foi demonstrada em modelos experimentais. O pré-condicionamento também é eficaz na prevenção de danos isquêmicos em outros órgãos, como cérebro e rim (ver revisão: REIS et al., 1997; BONVENTRE, 2002).

Em 1997, BAINES demonstrou que a geração de EROs após períodos de isquemia e reperfusão eram possíveis sinalizadores do pré-condicionamento. Em seguida, outro grupo de pesquisa mostrou que durante o pré-condicionamento, a cadeia respiratória mitocondrial produzia uma grande quantidade de EROs (VANDEN HOEK et al., 1998).

O mecanismo pelo qual o pré-condicionamento determina uma menor lesão isquêmica ainda é motivo de intensa investigação. Reguladores de morte celular apoptótica, como o Bcl-2 (MAULIK et al., 1999; NAKAMURA et al., 2000), têm sua distribuição e expressão alterada pelo pré-condicionamento, o que indica que o pré-condicionamento pode inibir não só a morte celular necrótica, típica da área infartada central, como também a morte celular apoptótica, que ocorre na área periférica da área infartada (SARASTE et al., 1997). Pacientes com doença arterial coronária podem apresentar sinais de pré-condicionamento isquêmico, onde se observa que angina pré-infarto se associa a área de infarto, melhora a função cardíaca e reduz arritmias (HIRAI et al., 1992).

Agentes farmacológicos que ativam o mitoK_{ATP} promovem efeitos protetores iguais aos do pré-condicionamento cardíaco (LIU et al., 1998; FACUNDO et al., 2006a). A primeira evidência de um papel protetor do mitoK_{ATP} foi produzida na década de 1980, quando o nicorandil apresentou efeito protetor contra o dano cardíaco isquêmico (LAMPING et al., 1984; SHIMSHAK et al., 1986), embora seu mecanismo de ação ainda não tivesse sido compreendido naquela época. Mais tarde, foram encontrados outros agonistas de canais de potássio que possuíam efeito protetor contra isquemia cardíaca

(GROVER et al., 1989), explicando o possível modo de ação do nicorandil. Somente em 1997, usando o DZX, foi possível estabelecer que os efeitos protetores destes agonistas fossem devido à ativação do canal mitocondrial e não sarcoplasmático (GARLID et al., 1997). Este estudo colocou definitivamente a abertura do mitoK_{ATP} como um componente protetor do pré-condicionamento cardíaco. Este resultado foi confirmado por um grande número de grupos que mostraram que a ativação do mitoK_{ATP} tem um efeito protetor potente contra dano isquêmico em coração (VANDEN HOEK et al., 2000; FORBES et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2002; KICINSKA e SZEWCZYK, 2003; FACUNDO et al., 2005; FACUNDO et al., 2006a). Neste mesmo contexto, os agonistas do mitoK_{ATP} também são efetivos em proteger contra danos isquêmicos em cérebro e músculo esquelético (DOMOKI et al., 1999; PANG et al., 1997). Uma forte indicação de que o mitoK_{ATP} participa do processo de sinalização celular do pré-condicionamento é a observação que antagonistas do mitoK_{ATP}, como o ácido 5-hidroxidecanóico, são capazes de inibir os efeitos benéficos do pré-condicionamento quando administrados durante os períodos curtos de isquemia (AUCHAMPACH et al., 1992; FACUNDO et al., 2006a).

O pré-condicionamento isquêmico leva à abertura de mitoK_{ATP} por mecanismos ainda não determinados. Dados da literatura mostram que ativação deve ocorrer por aumento na fosforilação das proteínas do canal (SATO et al., 1998; COSTA et al., 2005) ou por oxidação de grupos tiólicos em proteína de membrana (ZHANG et al., 2001).

Sabe-se que a adenosina ativa mecanismos de proteção tecidual dependente de proteína cinase C, provocando aumento na atividade de mitoK_{ATP} (SHRYOCK e BELLARDINELL, 1997; KLINGER et al., 1997; MUBAGWA et al., 2001; SAFRAN et al., 2001) e consequentemente haverá cardioproteção. Baseando-se em dados de que o PD153035 é um inibidor de adenosina cinase (FRANCHINI et al., 2005) e que este composto protege o miocárdio através de efeito bradicárdico direta ou indiretamente dependentemente de adenosina (MARIN, 2003), torna-se necessário, iniciar o trabalho em busca de possíveis informações sobre o efeito cardioprotetor deste composto.



2- OBJETIVOS

Objetivo principal:

O objetivo deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação do composto PD153035, na proteção mitocondrial hepática, uma vez que a bioenergética neste órgão é bem conhecida e em mitocôndrias cardíacas onde foi relatado seu efeito protetor em corações isquêmicos a partir de concentrações de 100 pM.

Objetivos específicos:

1. Investigar o mecanismo de ação do PD153035 em mitocôndrias de fígado de rato através da avaliação de seu efeito no consumo de oxigênio, no processo de transição de permeabilidade mitocondrial em condições de estresse oxidativo, em grupos tiólicos de proteínas de membrana e possível papel sequestrador de radicais livres através da oxidação de deoxiribose.
2. Avaliar o efeito do tratamento de ratos com PD153035 em mitocôndrias de corações submetidos a situações de isquemia e reperfusão através da medida do consumo de oxigênio.
3. Comparar mitocôndrias isoladas de coração de ratos controles e tratados com PD153035, verificando mudanças no consumo de oxigênio, transporte de cálcio e produção de espécies reativas de oxigênio.
4. Estudar o efeito *in vivo* e *in vitro* do PD153035 sobre a abertura do canal de K^+ mitocondrial sensível a ATP (mito K_{ATP}).
5. Avaliar relação entre o pré-condicionamento isquêmico com PD153035 na ativação de mito K_{ATP} e os seus efeitos na viabilidade das células HL-1.



3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Ratos machos Wistar adultos (200-250 g) foram obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O coração ou o fígado foi retirado do animal após morte por deslocamento cervical. Para alguns experimentos, os ratos foram gavados com PD153035 (32 mg/kg v.o.) suspenso em uma solução aquosa contendo 10% propileno-glicol, 48 horas antes da obtenção do órgão para isolamento mitocondrial. Como controle de ratos tratados com PD153035, os animais foram gavados somente com uma solução aquosa contendo 10% propileno-glicol. Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) (Protocolo n 730-1).

3.2- Isolamento de mitocôndrias hepáticas

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos Wistar utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo SCHNEIDER e HOGEBORN (1950). O fígado retirado, foi lavado em solução gelada de sacarose 250 mM contendo HEPES 5,0 mM pH 7,2 e EGTA 0,5 mM, picado com tesoura e homogeneizado (10 vezes) em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 1250 x g por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 500 x g sendo a fase lipídica flutuante retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado 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 isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 50 mg de proteína por mL.

3.3- Isolamento de mitocôndrias cardíacas

Mitocôndrias foram isoladas de corações de ratos adultos Wistar utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial. Os corações foram colocados em meio gelado contendo manitol 200 mM, sacarose 75 mM, tampão HEPES 10 mM pH 7,2, EGTA 1 mM e BSA 0,1%, onde foram picados com tesoura e homogeneizados manualmente em Potter-

Elvehjem. O homogenato foi centrifugado a 800 x g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 6.000 x g. O pellet resultante foi ressuspensão no mesmo meio e centrifugado na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução, isenta de EGTA (KOWALTOWSKI, et al., 2001b).

3.4- Degradação da deoxiribose

A formação do radical $\text{OH}^\bullet$ foi verificada através da degradação oxidativa da 2-deoxiribose. O princípio do ensaio é a quantificação do produto da degradação da 2-deoxiribose, o malondialdeído (MDA) através de sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (HERMES-LIMA et al., 1994; LOPES et al., 1999).

3.5- 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 obtida é diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA 1% foi utilizada como padrão.

3.6- Determinação do conteúdo de grupos tiólicos

A determinação do conteúdo de grupos tiólicos de proteína de membrana mitocondrial foi realizada usando DTNB ácido [5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (*Ellman's reagent*) (ELLMAN, 1958)], conforme descrito anteriormente (KOWALTOWSKI et al., 1997). A suspensão de mitocôndrias hepáticas (1 mg/mL de proteína) foi incubada em meio de reação padrão [125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM

(pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, MgCl_2 1 mM, EGTA 100 μM] durante 10 minutos, em seguida foi submetida a 3 processos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para a liberação de proteínas da matriz. Após, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 2 minutos. O sedimento foi tratado com 200 μL de ácido tricloroacético 6,5 % e centrifugado a 12.000 x g por 2 minutos. O sedimento final foi ressuspensão em 1 ml de solução contendo DTNB 100 μM , EGTA 0,5 μM e Tris-HCl 0,5 M, pH 8,3 (PARDO-ANDREU et al., 2006). A absorbância foi mensurada a 412 nm e uma solução de GSH foi utilizada como padrão.

3.7- Consumo de oxigênio pelas mitocôndrias

O consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas foi medido utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado a oxígrafo Gilson, em uma câmara de vidro termostatizada de 1,2 ml equipada com agitador magnético. A concentração de oxigênio molecular (O_2) inicial no meio de reação foi 215 nmol/ml a 37°C, na condição experimental utilizada (ROBINSON E COOPER, 1970).

3.8- Transporte de cálcio pelas mitocôndrias

O movimento de Ca^{2+} através da membrana mitocôndrial foi verificado determinando-se as variações de absorbância diferencial do complexo Ca^{2+} -arsenazo III nos comprimentos de onda 675 e 685 nm (SCARPA, 1979) em um espectrofotômetro SLM Aminco DW2000 com capacidade de determinar as diferenças de absorbância em dois comprimentos de onda em uma mesma cubeta. O corante arsenazo III apresenta espectros de absorção diferentes na forma livre ou ligada ao Ca^{2+} . A variação na diferença de absorbância nos comprimentos de onda 675 e 685 nm está associada a variações na concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação (SCARPA, 1979). As calibrações foram feitas determinando-se a absorbância em função de adições de concentrações conhecidas de EGTA e Ca^{2+} presentes no meio de reação.

3.9- Medida de inchamento mitocondrial

As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A 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 et al., 2002). 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 da luz espalhada. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. 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 (et al., 2001-a) foi feito em um espectrofotômetro SLM AMINCO DW2000. As mitocôndrias de fígado e coração de rato (0,5 mg de proteína/ml) foram incubadas no meio de reação padrão [125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH₂PO₄ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 100 μM] e os experimentos foram realizados a temperatura de 37°C.

3.10- Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

O potencial de membrana mitocondrial foi monitorado através da medida das alterações de fluorescência da safranina O (5 μM) utilizando um espectrofotômetro Hitachi modelo F4500, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 e 596 nm, respectivamente (HOLDEN et al., 1987).

3.11- Preparação de tecido para obtenção de fibras cardíacas

Após o sacrifício do animal, o coração foi rapidamente dissecado e mantido em meio para biopsia [CaK₂EGTA 2,77 mM, K₂EGTA 7,23 mM, Na₂ATP 5,77 mM, MgCl₂ 6H₂O 6,56 mM, taurina 20 mM, Na₂ fosfo-creatina 15 mM, imidazol 20 mM, ditiotreititol

(DTT) 0,5 mM, MES 50 mM, pH 7.1] (LETELLIER, et al., 1992). Em cada experimento, aproximadamente 3 mg de tecido cardíaco foram incubados em 2 ml de meio de Krebs-Henseleit acrescido de Hepes-Na 20 mM (pH 7,4) a 37°C para a medida do consumo de O₂.

3.12- Consumo de oxigênio em tecido cardíaco

O consumo de oxigênio em tecido cardíaco foi medido por um respirômetro de alta resolução (Oroboros Oxygraph-2K), em 2 ml de meio de Krebs-Henseleit pH 7,4 em um conjunto de selas a 37°C e agitação a 750 rpm. O software DatLab 4 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) foi utilizado para aquisição de dados e análise em intervalos de 2 segundos e para o cálculo da linha do tempo derivado da concentração e correção do fluxo de oxigênio (GNAIGER, 2001).

3.13- Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio

A geração de EROs por mitocôndrias hepáticas isoladas foi monitorada espectrofluorimetricamente, usando o marcador permeável à membrana H₂-DCF-DA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína 1 µM) (LEBEL et al., 1992; GARCIA-RUIZ et al., 1997). Fluorescência foi monitorada em comprimento de onda 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, com a largura da fenda de 3 nm. A calibração foi feita pela adição de concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), produto da oxidação do H₂-DCF.

3.14- Determinação da produção de peróxido de hidrogênio

A liberação de H₂O₂ por mitocôndrias cardíacas foi determinada fluorimetricamente utilizando Amplex Red 20 µM (Molecular Probes, Eugene, OR) que é um substrato cuja oxidação por H₂O₂ é catalisada por peroxidase de raiz forte (HRP). A sua oxidação produz resofurina que é fluorescente (comprimentos de onda de

excitação e emissão de 563 e 587 nm, respectivamente), o que permite determinar a velocidade de produção de H_2O_2 (ZHOU e PANCHUK-VOLOSHINA, 1997; VOTYAKOVA e REYNOLDS, 2001).

3.15- Sistema de perfusão de coração isolado (Técnica de Langendorff)

O sistema de perfusão de coração isolado é constituído de um sistema cata-bolhas de vidro envolvido por jaqueta de água conectada a um circulador para aquecimento do tampão de perfusão a 37°C. A extremidade superior do cata-bolhas está conectada a um reservatório constituído de um frasco de Mariotti contendo a solução tampão de perfusão. Neste reservatório, o tampão é gaseificado com O_2 100% com fluxo controlado de forma a manter a pressão no frasco a 70 mmHg. A extremidade inferior é conectada a uma cânula de vidro que por sua vez, está conectada à aorta ascendente para perfusão retrógrada. Em paralelo, um balão de látex preenchido com salina é conectado a uma seringa de Hamilton para controle de seu volume e também a um transdutor de pressão para registro contínuo da pressão intraventricular (MARIN e FRANCHINI, 2005).

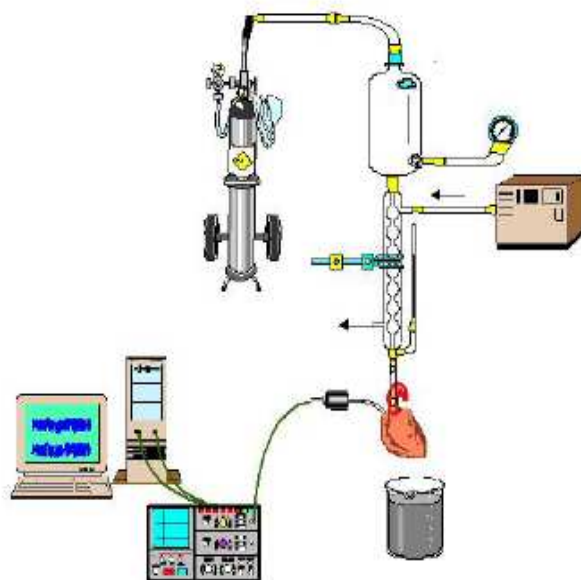


Figura 6- Esquema do sistema de perfusão de coração isolado e registro da pressão ventricular esquerda utilizado.

3.15.1 - Canulação e acoplamento do coração ao sistema.

Ratos Wistar foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e receberam injeção intraperitoneal de heparina sódica (1000 UI). Os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C, entubados por via orotraqueal com tubo plástico de Gelco^R e submetidos à ventilação controlada com ventilador Harvard e ar enriquecido com O₂ 100%. A temperatura corpórea e a ventilação permaneceram controladas durante o período de retirada do coração da cavidade torácica. A cavidade torácica foi aberta através de secção sagital do esterno; a aorta ascendente foi identificada, seccionada e conectada ao sistema de perfusão, onde foi fixada com fio de algodão 3.0, sendo iniciada imediatamente a perfusão com solução tampão HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 137 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,5 mM e glicose 6 mM, com, acrescentado de insulina (100 UI) e heparina (1000 UI), saturado com oxigênio 100% a uma pressão hidrostática de 70 mmHg e temperatura a 37°C (MARIN e FRANCHINI, 2005).

3.15.2 - Sistema de registro e monitorização da pressão intraventricular

A monitorização da pressão intraventricular esquerda foi realizada com balão de látex, inserido no ventrículo esquerdo (VE) através do átrio (AE). Este cate ter foi conectado a um transdutor de pressão (COBE, ARVADA, USA) para registro contínuo de pressão intraventricular. Para tanto, utiliza-se um sistema de registro Dataq (USA) com programa de aquisição e análise Windaq PRO. O sistema de onda de pulso da pressão foi amplificado em amplificador GP4A Steamtech, USA, convertido em sinal digital (frequência de amostragem 300 Hz) e gravado em computador para análise posterior. A onda de pressão ventricular foi analisada quanto ao pico máximo (pressão sistólica), pico mínimo (pressão diastólica), derivada da pressão em relação ao tempo ($\pm dP/dT$) e frequência cardíaca (MARIN e FRANCHINI, 2005).

3.16- Cultura de células cardíacas HL-1

As células HL-1 foram doadas pelo Prof. William C. Claycomb (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Louisiana State University Medical Center, New Orleans, LA, EUA). Estas células, originárias de átrios murinos, mantêm características morfológicas e propriedades bioquímicas e eletrofisiológicas de cardiomiócitos (CLAYCOMB et al., 1998), enquanto o isolamento e cultivo de cardiomiócitos primários produzem uma população celular heterogênea que inclui fibroblastos, células endoteliais e leucócitos (VANDEN HOEK et al., 1996). Além disso, o isolamento de cardiomiócitos pode promover seu pré-condicionamento, e produz preparações que perdem viabilidade com o passar do tempo. Como vantagens adicionais, as células HL-1 apresentam mecanismos de pré-condicionamento conservado dependentes de proteína quinase C e da ativação do canal de K^+ (SEYMOUR et al., 2003). Para rotina de passagem e crescimento, as células HL-1 foram mantidas em frascos T-75 a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 em meio Claycomb (JRH Biosciences) suplementado com norepinefrina 0,1 mM (Sigma-Aldrich), penicilina/estreptomicina 100 U/mL/100 µg/mL, glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich) e 10% de soro bovino fetal. Os experimentos foram iniciados em aproximadamente 100% de confluência a 37°C. Para todos os experimentos, as células foram recolocadas em tampão padrão (pH = 7,4) contendo em mmol/L: NaCl, 137; HEPES, 5; glicose, 22; taurina, 20; creatina, 5; KCl, 5,4; $MgCl_2$, 1; piruvato, 5 e $CaCl_2$, 1 (FACUNDO et al., 2005).

3.17- Modelo experimental de simulação isquêmica e reperfusão em células HL-1.

Para a realização dos experimentos células HL-1 foram incubadas em solução tampão padrão contendo NaCl 137 mM, HEPES-Na 5 mM, glicose 22 mM, taurina 20 mM, creatina 5 mM, KCl 5,4 mM, $MgCl_2$ 1 mM, piruvato 5 mM e $CaCl_2$ 1 mM (IRIE et al., 2003). Após 20 min de pré-incubação em solução tampão padrão, o meio foi trocado e a isquemia e reperfusão foram simuladas pela inibição metabólica e limitação de substrato usando-se KCN (10 mM) e 2 mM de deoxiglicose adicionados ao tampão padrão isento de glicose e piruvato. As células foram incubadas durante 60 minutos seguidos por 1000 x g

de centrifugação durante 5 minutos de e re-suspensão do sedimento celular em solução tampão padrão para a reperfusão simulada. Cardiomiócitos HL-1 controles foram incubados com solução tampão padrão durante todo o período experimental e submetidos somente às centrifugações e lavagens. A proteção de células HL-1 por PD153035 10 nM e sua reversão por 5HD foram obtidas pelo tratamento das células HL-1 com estes compostos durante todo o período experimental, incluindo a pré-incubação durante 20 min (FACUNDO et al., 2005).

3.18- Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada em diferentes períodos de tempo através da medida da fluorescência relativa de brometo de etídio (50 μ M) usando espectrofluorímetro Hitachi F4500, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 e 580 nm respectivamente (KARSTEN, 1980). As células foram permeabilizadas por digitonina (0.005%) no final de cada experimento para promover 100% de permeabilidade ao brometo de etídeo. Dados foram expressos em porcentagem de células vivas (FACUNDO et al., 2005).

3.19- Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio do erro da média (SEM). O “n” se refere ao número de experimentos realizados com preparações biológicas independentes. Para comparações múltiplas, as análises estatísticas foram feitas usando o método de ANOVA e teste de Tukey post-hoc. Para comparação de 2 médias, utilizou-se o teste *t* de Student. A diferença de valores foi considerada significativa com $p < 0,05$ foi considerado significativo. Todas as figuras apresentadas nos resultados são representativas de pelo menos três experimentos independentes.



4- RESULTADOS

4.1- Efeito do PD153035 na fosforilação oxidativa por mitocôndrias isoladas de fígado de rato

Inicialmente, para se estudar o efeito de PD153035 em funções mitocondriais utilizou-se mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (MFR). Os resultados da **FIGURA 6** mostram que PD153035 40 μ M induziu uma diminuição da velocidade de respiração estimulada por ADP (estado respiratório III: durante a fosforilação) em 13 % de inibição da respiração mitocondrial. Quando as concentrações de PD153035 foram testadas na respiração mitocondrial basal (estado respiratório IV: ausência de fosforilação) observou-se aumentos das velocidades de consumo de oxigênio em todas as concentrações testadas, sendo que a dose de PD153035 40 μ M resultou em estímulo de 98 % da respiração mitocondrial.

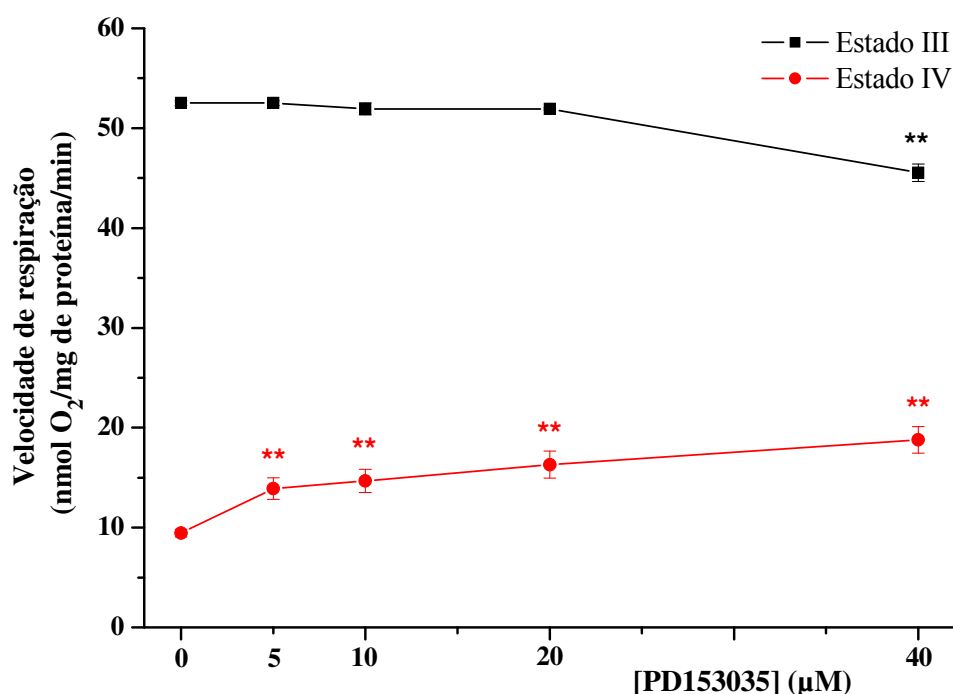


Figura 7- Efeito de PD153035 sobre as velocidades de respiração mitocondrial

Mitocôndrias de fígado de rato (0,5 mg/ml) foram adicionadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH₂PO₄ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 100 μ M, substratos ligados a NAD (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada) na presença de doses crescentes de PD153035 (5–40 μ M). Iniciou-se o estado III da respiração mitocondrial pela adição de ADP 150 μ M. Os pontos representam médias de três experimentos $\pm$ SEM. **significativamente diferente do controle ($p < 0,01$).

De maneira dose-dependente, o composto PD153035 diminuiu significativamente o controle respiratório (CR; estado III/IV) e a razão ADP/O (**FIGURA 8**). Estas razões fornecem uma medida da intensidade de acoplamento entre transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, refletindo a integridade da membrana mitocondrial (CHANCE e WILLIAMS, 1956). Os resultados demonstram ação desacopladora de concentrações micromolares de PD153035 entre a respiração mitocondrial e a fosforilação oxidativa.

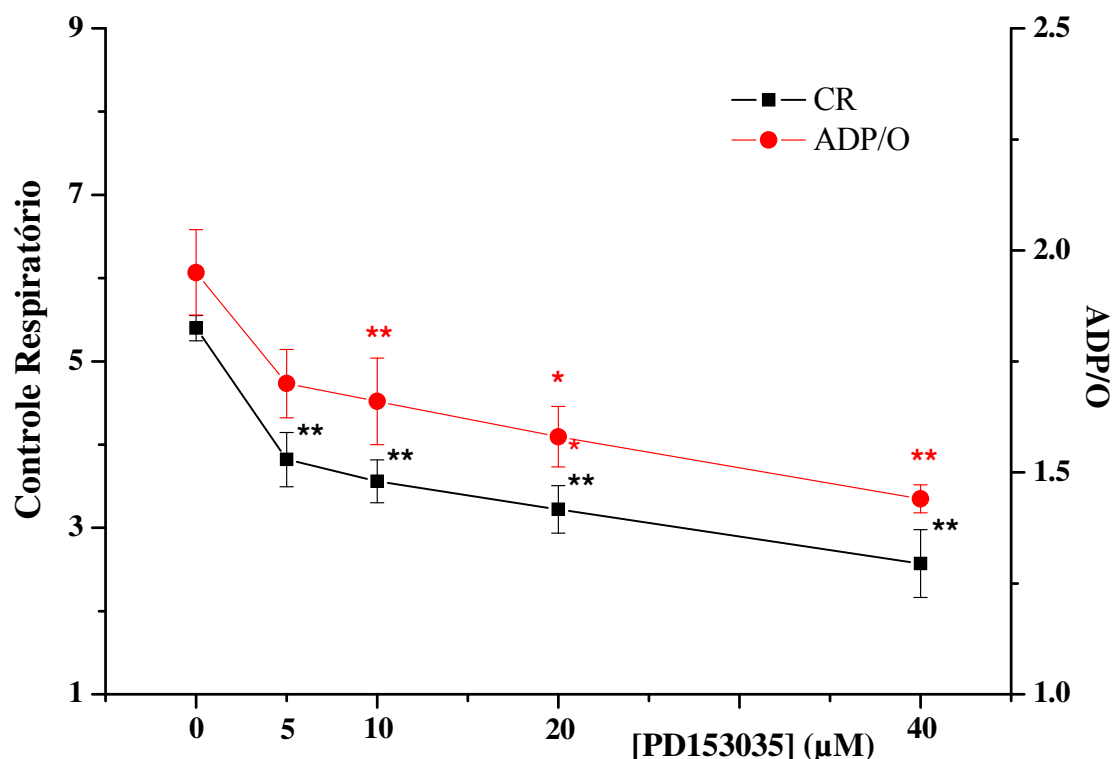


Figura 8- Efeito de PD153035 sobre o controle respiratório (CR) e a razão ADP/O

MFR (0,5 mg/ml) foram adicionadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, MgCl_2 1 mM, EGTA 100 μM, substratos ligados a NAD (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada) na presença de doses crescentes (5 - 40 μM) do PD153035. Iniciou-se o estado III da respiração mitocondrial pela adição de ADP 150 μM. Os pontos representam médias de três experimentos $\pm$ SEM. Os pontos representam médias de três experimentos $\pm$ SEM. **significativamente diferente do controle ($p < 0,01$).

4.2- Inibição da transição de permeabilidade por PD153035 em mitocôndrias isoladas de fígado de rato

A transição de permeabilidade mitocondrial é caracterizada pela formação e abertura de um poro não-seletivo na membrana interna, resultando em permeabilização a íons e macromoléculas de até 1,4 kDa (ZORATTI e SZABO, 1995; KOWALTOWSKI et al., 2001a), com conseqüente inchamento mitocondrial. A **FIGURA 9** mostra que mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com substratos ligados a NAD, na presença de Ca^{2+} 40 μM , sofreram um rápido e extenso inchamento (*linha a*), que foi sensível ao quelante de Ca^{2+} EGTA (*linha f*); o mesmo ocorreu na presença de DMSO 0,1%, concentração do solvente relativa a maior quantidade de PD153035 utilizada (dados não mostrados). Notadamente, o composto PD153035, em concentrações de 10 a 40 μM (*linhas c - e*), foi capaz de inibir o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} .

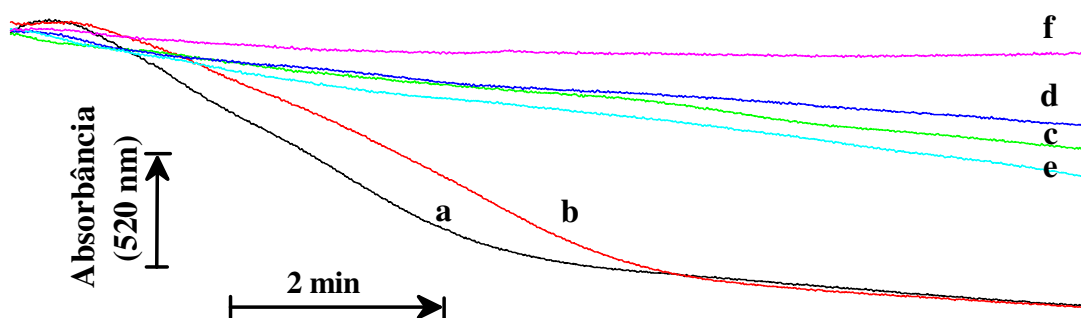


Figura 9- PD153035 inibe o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+}

MRF (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, MgCl_2 1 mM, substratos ligados a NAD (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada) e Ca^{2+} 40 μM , na ausência (*linha a*) ou na presença de PD153035 5 μM (*linha b*), 10 μM (*linha c*), 20 μM (*linha d*) ou 40 μM (*linha e*). A *linha f* representa um experimento controle na presença de EGTA 500 μM .

A TPM ocorre devido ao acúmulo excessivo de íons Ca^{2+} na matriz mitocondrial e é estimulada por vários pró-oxidantes (KOWALTOWSKI et al., 2001a). As espécies reativas de oxigênio produzidas pela cadeia respiratória reagem com grupos tiólicos de proteína de membrana mitocondrial levando a sua oxidação (FAGIAN et al., 1990; CASTILHO et al., 1995), o que está associado ao desencadeamento da TPM. Nesse sentido, realizamos experimentos para estudar o efeito de PD153035 na oxidação de grupos tiólicos de proteínas de membrana em condições em que não ocorre a abertura do poro de transição de permeabilidade, isto é, na presença de ciclosporina (CsA). Na **FIGURA 9** observamos que mitocôndrias de fígado de rato energizadas com substratos ligados a NAD na presença de Ca^{2+} 40 μM apresentaram inchamento mitocondrial (*linha a*). A CsA impediu o inchamento mitocondrial (*linha b*). Na presença de Ca^{2+} , detectou-se uma significativa oxidação de SH de proteínas de membrana mitocondrial, na ausência ou presença de CSA (**FIGURA 11A**). Na presença de PD153035 (10 - 40 μM) e ciclosporina A observou-se inibição completa do inchamento mitocondrial (**FIGURA 10 linhas c- e**). Nestas condições, observa-se que o PD153035 inibe a oxidação de SH de proteínas de membrana mitocondrial (**FIGURA 11B**). De acordo com resultados prévios do laboratório (BERNARDES et al., 1994; KOWALTOWSKI et al., 1998), a CsA, apesar de inibir a abertura do poro de TPM, não inibiu a oxidação de grupos tiólicos de proteínas de membrana.

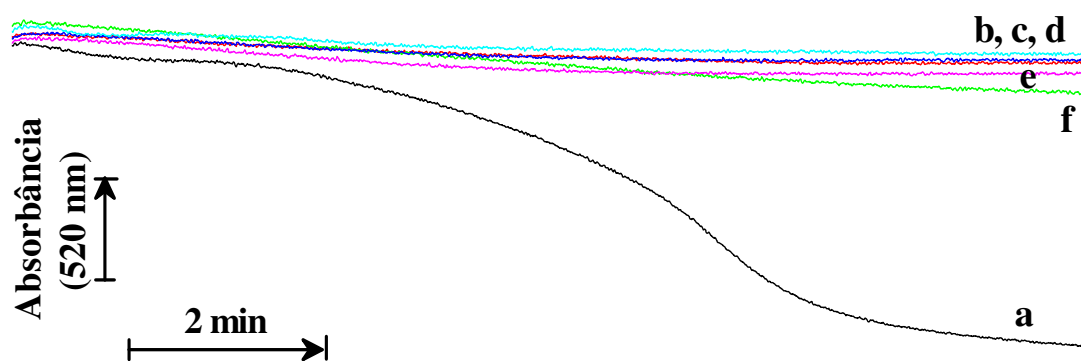


Figura 10- PD153035 e CsA inibem o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+}

MFR (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, MgCl_2 1 mM, substratos ligados a NAD (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada), na presença de Ca^{2+} 40 μM (*linha a*), Ca^{2+} 40 μM + CsA 1 μM (*linha b*), Ca^{2+} 40 μM + CsA 1 μM + PD153035 10 μM (*linha c*), Ca^{2+} 40 μM + CsA 1 μM + PD153035 20 μM (*linha d*), Ca^{2+} 40 μM + CsA 1 μM + PD153035 40 μM (*linha e*) ou Ca^{2+} 40 μM + EGTA 500 μM (*linha f*).

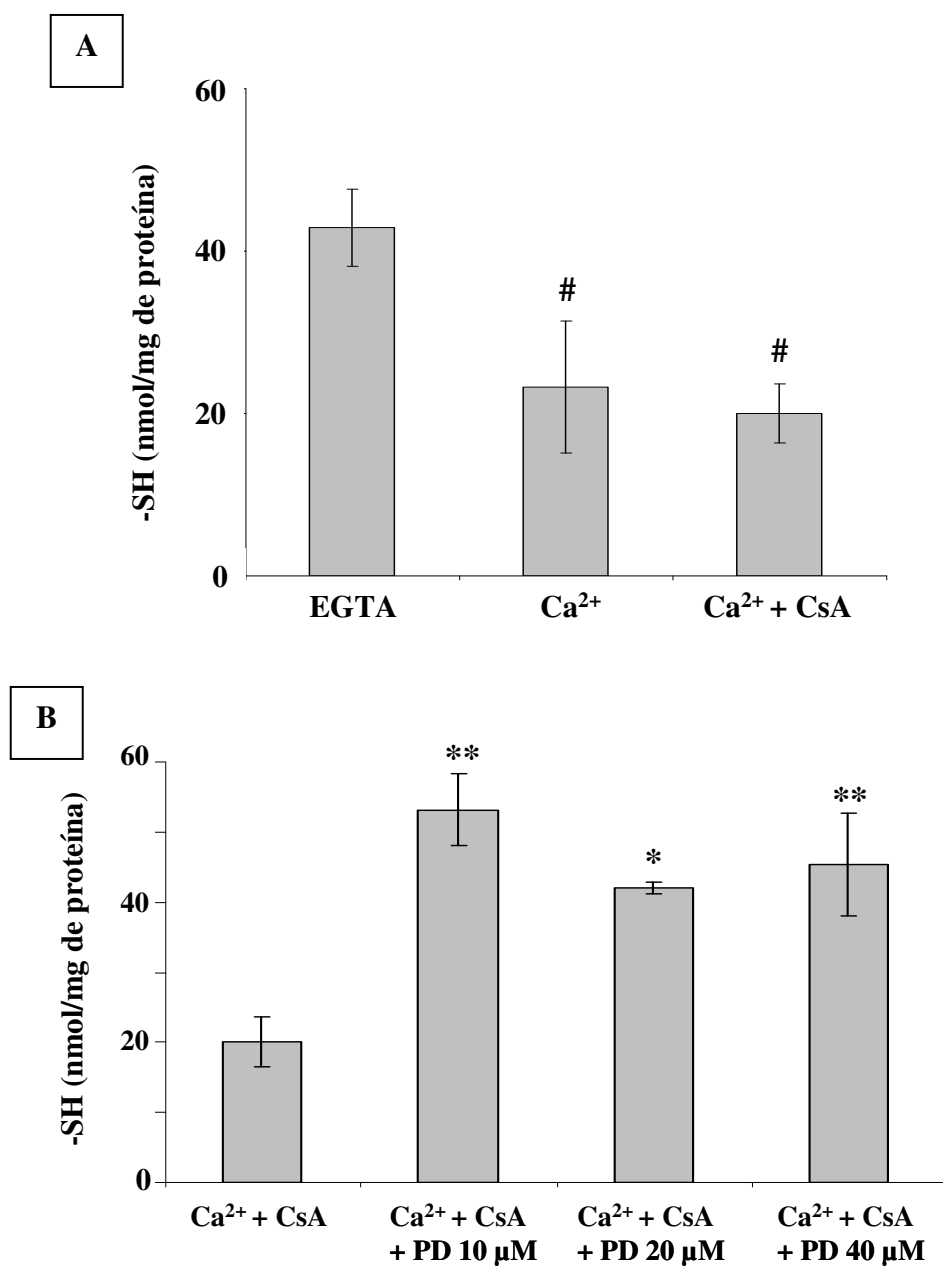


Figura 11- Efeito de Ca²⁺ e CsA no conteúdo de grupos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial

As condições experimentais foram às mesmas da Figura 8, sendo que as amostras para dosagem de -SH foram obtidas após 10 minutos de incubação. As barras representam médias de três experimentos $\pm$ SEM. # Significativamente diferente de “EGTA” ($p < 0,05$) e *, **significativamente diferente de “Ca²⁺ + CsA” ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

Um dos métodos utilizados para monitorar a ocorrência da TPM de mitocôndrias é a determinação do efluxo mitocondrial de Ca^{2+} (ZORATTI e SZABO, 1995). Em nossos experimentos, a concentração de Ca^{2+} no meio extramitocondrial foi acompanhada determinando-se as variações de absorbância do complexo Ca^{2+} -arsenazo III nos comprimentos de onda 665 e 685 nm (SCARPA, 1969). Na **FIGURA 12**, inicialmente a diferença de absorbância decai rapidamente indicando que o Ca^{2+} adicionado ao meio está sendo rapidamente captado e acumulado pelas mitocôndrias. Após aproximadamente 10 minutos observa-se que o Ca^{2+} é liberado (*linha a*). Esta liberação de Ca^{2+} foi sensível a CsA, indicando ser devida a TPM (resultados não mostrados). A adição de concentrações micromolares de PD153035 (10, 20 e 40 μM) promoveu um aumento da capacidade das mitocôndrias em reter o Ca^{2+} (*linhas b-d*). Na presença apenas de DMSO, solvente do PD153035, nenhuma proteção foi observada quando comparado ao controle (resultados não mostrados). Quando utilizado na concentração de 40 μM (*linha d*) o PD153035 promoveu um menor efeito na capacidade da mitocôndria em reter Ca^{2+} que em 20 μM (*linha c*).

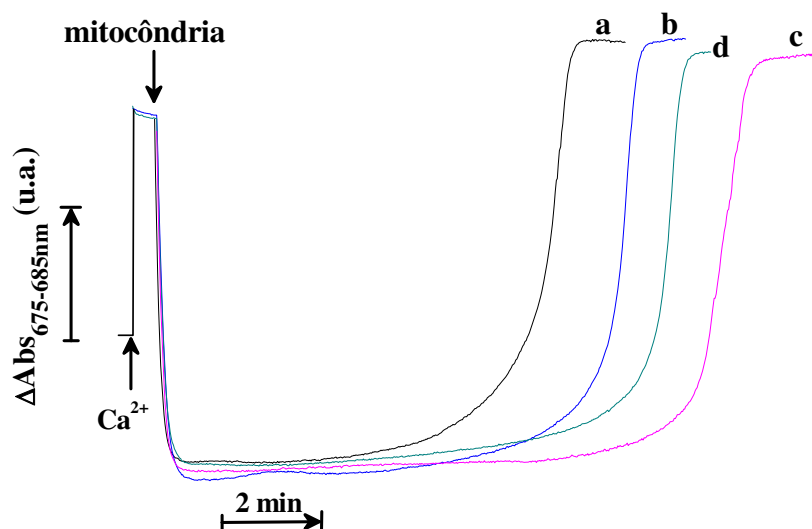


Figura 12- PD153035 aumenta a capacidade de mitocôndrias de fígado de rato em reter Ca^{2+}

MFR (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, MgCl_2 1 mM, arsenazo 40 μM , substratos ligados a NAD (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada), Ca^{2+} 40 μM na ausência (*linha a*) ou na presença de PD153035 10 μM (*linha b*), 20 μM (*linha c*), 40 μM (*linha d*).

4.3- Efeito de PD153035 na produção mitocondrial de EROs associada a TPM e na oxidação de deoxiribose por Fe(III)-EDTA na presença de ascorbato

A TPM induzida por Ca^{2+} está associada a um aumento na geração de EROs pela mitocôndria (GRIJALBA et al., 1999; MACIEL et al., 2001), em consequência da interação do Ca^{2+} com cardiolipina da membrana mitocondrial (GRIJALBA et al., 1999). Os resultados da **FIGURA 13** mostram que o PD153035 inibe parcialmente a produção de EROs em mitocôndrias na presença de Ca^{2+} . Observa-se que na ausência de Ca^{2+} (com adição de EGTA 0,5 mM), a fluorescência do DCF, devida à oxidação do $\text{H}_2\text{-DCF}$ adicionado ao meio, aumentou lentamente com passar do tempo, indicando uma baixa produção de EROs pelas mitocôndrias de fígado de rato (*linha a*). A *linha b* mostra uma maior produção de EROs após adição de Ca^{2+} na ausência de EGTA, sendo que esta produção de EROs foi parcialmente inibida pela presença de PD153035 20 e 40 μM (*linhas c e d*, respectivamente). Na presença de DMSO, solvente do PD153035, nenhuma proteção foi observada quando comparado à *linha b* (resultados não mostrados).

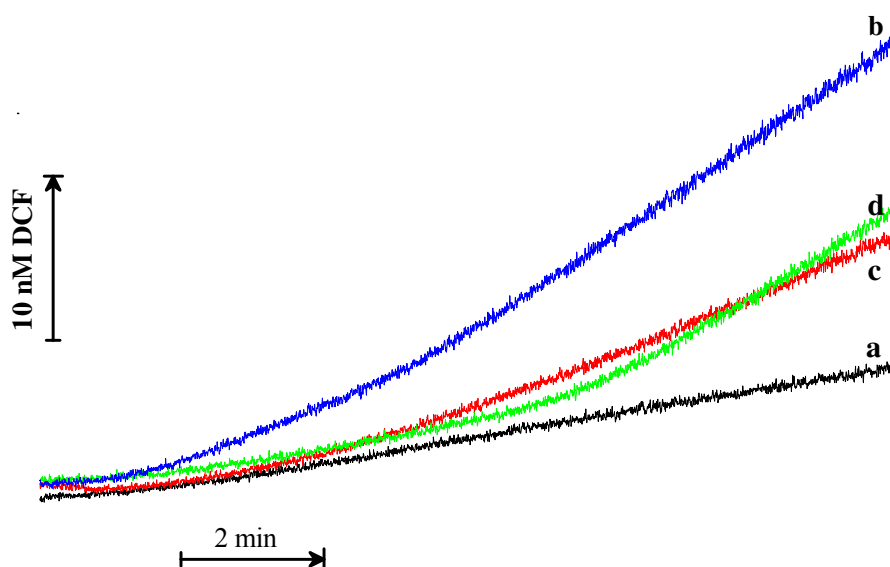


Figura 13- Efeito de PD153035 no estímulo por Ca^{2+} na geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio

Mitocôndrias de fígado (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, MgCl_2 1 mM, substratos ligados a NAD (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada) e $\text{H}_2\text{-DCFDA}$ 1 μM . *Linha a:* Ca^{2+} 40 μM + EGTA 0,5 mM; *linha b:* Ca^{2+} 40 μM ; *linha c:* Ca^{2+} 40 μM + PD153035 20 μM ; *linha d:* Ca^{2+} 40 μM + PD153035 40 μM .

Para estudar um possível papel seqüestrador de radicais livres do PD153035, testou-se o efeito desse composto na oxidação de deoxiribose por Fe(III)-EDTA na presença de ascorbato (HERMES-LIMA et al., 1994). A formação do radical hidroxila ($\bullet$ OH) catalisada pelo ferro promove a degradação de carboidratos, como a deoxiribose. O produto desta degradação é o malondialdeído que é quantificado pela sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (HERMES-LIMA et al., 2000). A **FIGURA 14** compara os efeitos de PD153035 e DMSO, um clássico seqüestrador de $\bullet$ OH, na degradação de 2-deoxiribose induzida por 10 μ M Fe(III)-EDTA e 2 mM ascorbato. Observamos que a quantidade de solvente relativa a maior concentração utilizada de PD153035 (DMSO 0,3 mM), assim como o PD153035 nas concentrações de 5 - 40 μ M não tiveram ação protetora. No entanto, DMSO 17 mM mostrou seu efeito antioxidante esperado.

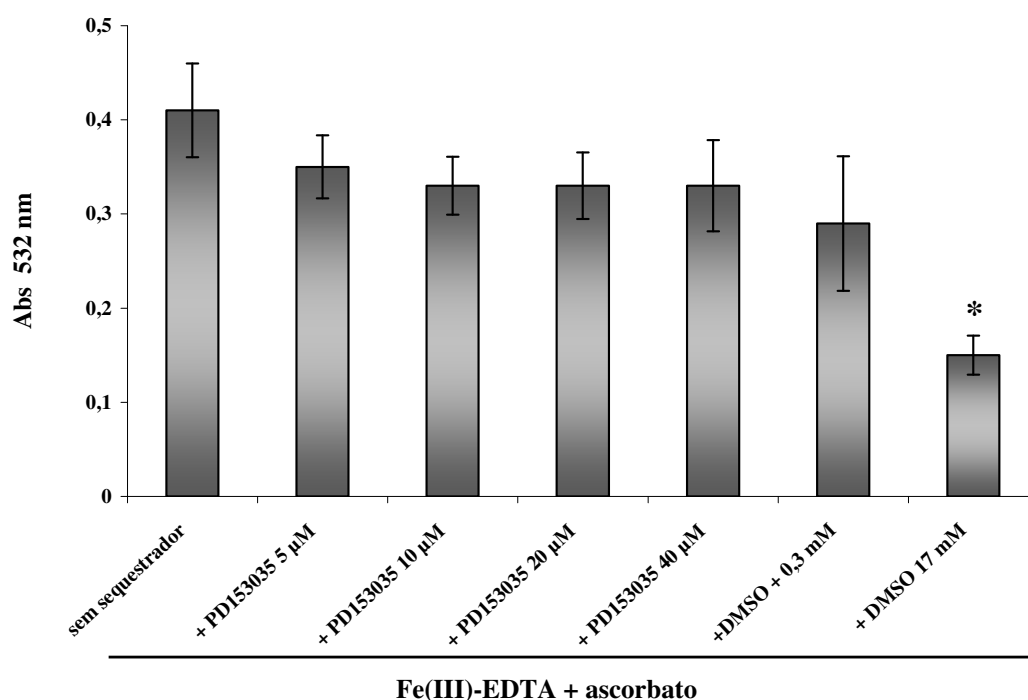


Figura 14- Efeito de PD153035 e DMSO (sequestrador de $\cdot\text{OH}$) na degradação oxidativa da deoxiribose induzida por Fe(III)-EDTA + ascorbato

As incubações foram realizadas durante 60 minutos a 37°C em meio contendo HEPES 20 mM (pH 7,2), 2-deoxiribose 15 mM, EDTA 50 µM e Fe(III) 10 µM. As concentrações de PD153035 ou de DMSO utilizadas durante as incubações estão indicadas na figura. A reação foi iniciada pela adição de ascorbato (concentração final 2 mM). As barras representam médias de três experimentos $\pm$ SEM. *significativamente diferente de “Fe(III)-EDTA + ascorbato sem sequestrador” ($p < 0,05$).

4.4- Efeito de PD153035 *in vitro* e *in vivo* em mitocôndrias isoladas de coração de rato

Nos experimentos *in vitro*, monitoramos a TPM em mitocôndrias isoladas de corações de ratos através do efluxo de Ca^{2+} , determinando as variações de absorbância do complexo Ca^{2+} -arsenazo III no meio extramitocondrial. Nas **FIGURAS 15 e 16** a diferença de absorbância decai rapidamente indicando que o Ca^{2+} está sendo rapidamente captado e acumulado pelas mitocôndrias cardíacas. No entanto, após aproximadamente 5 min, na situação controle, observou-se uma rápida liberação do Ca^{2+} acumulado. Esta liberação foi sensível a CsA (resultado não mostrado), indicando a participação da TPM nesta condição.

Diferentemente do observado em mitocôndrias isoladas de fígado, a adição de concentrações micromolares de PD153035 (1, 20 e 40 μM) tornou as mitocôndrias cardíacas mais sensíveis ao Ca^{2+} (**FIGURA 15**). Concentrações nanomolares de PD153035 (50 - 200 nM, *linhas b-d*; 1-30 nM, resultados não mostrados) não alteraram significativamente a capacidade de mitocôndrias cardíacas em captar e reter Ca^{2+} (**FIGURA 16**).

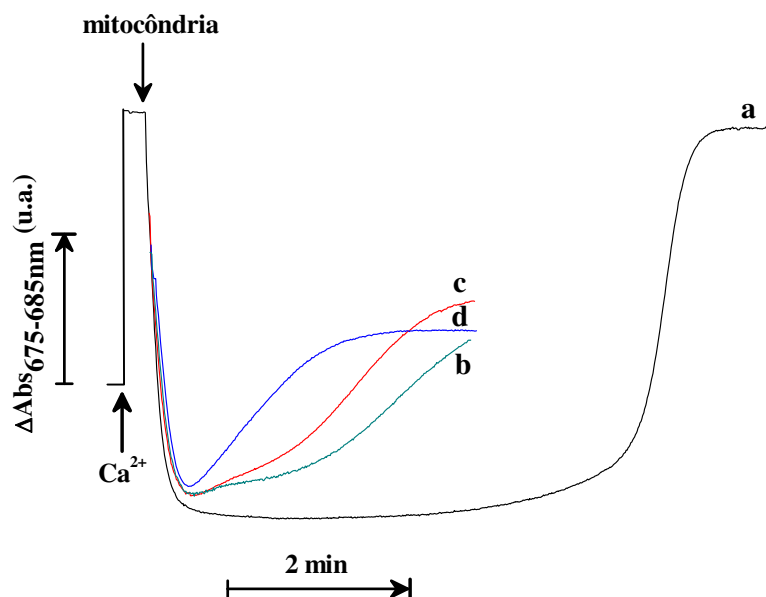


Figura 15- Efeito *in vitro* de concentrações micromolares de PD153035 na captação e retenção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias de coração de rato

Mitocôndrias de coração (0,5 mg/mL) foram adicionadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, arsenazo 40 μM , substratos ligados a NAD (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada) e Ca^{2+} 40 μM , na ausência (*linha a*) ou na presença de PD153035 1 μM (*linha b*), 20 μM (*linha c*) ou 40 μM (*linha d*), desde o início do experimento.

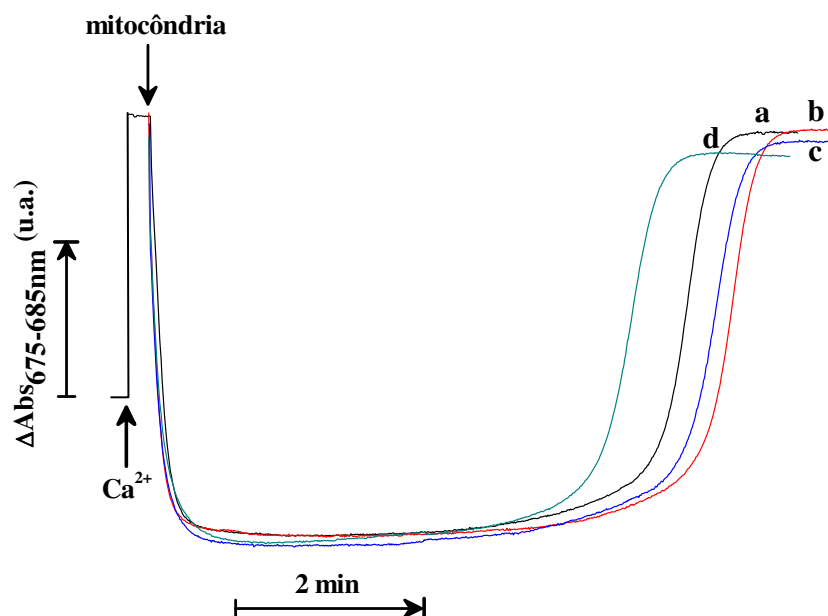


Figura 16- Efeito *in vitro* de concentrações nanomolares de PD153035 na captação e retenção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias de coração de rato

Mitocôndrias de coração (0,5 mg/mL) foram adicionadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, arsenazo 40 μM , substratos ligados a NAD (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada) e Ca^{2+} 40 μM na ausência (*linha a*) ou na presença de PD153035 50 nM (*linha b*), 100 nM (*linha c*) ou 200 nM (*linha d*), desde o início do experimento.

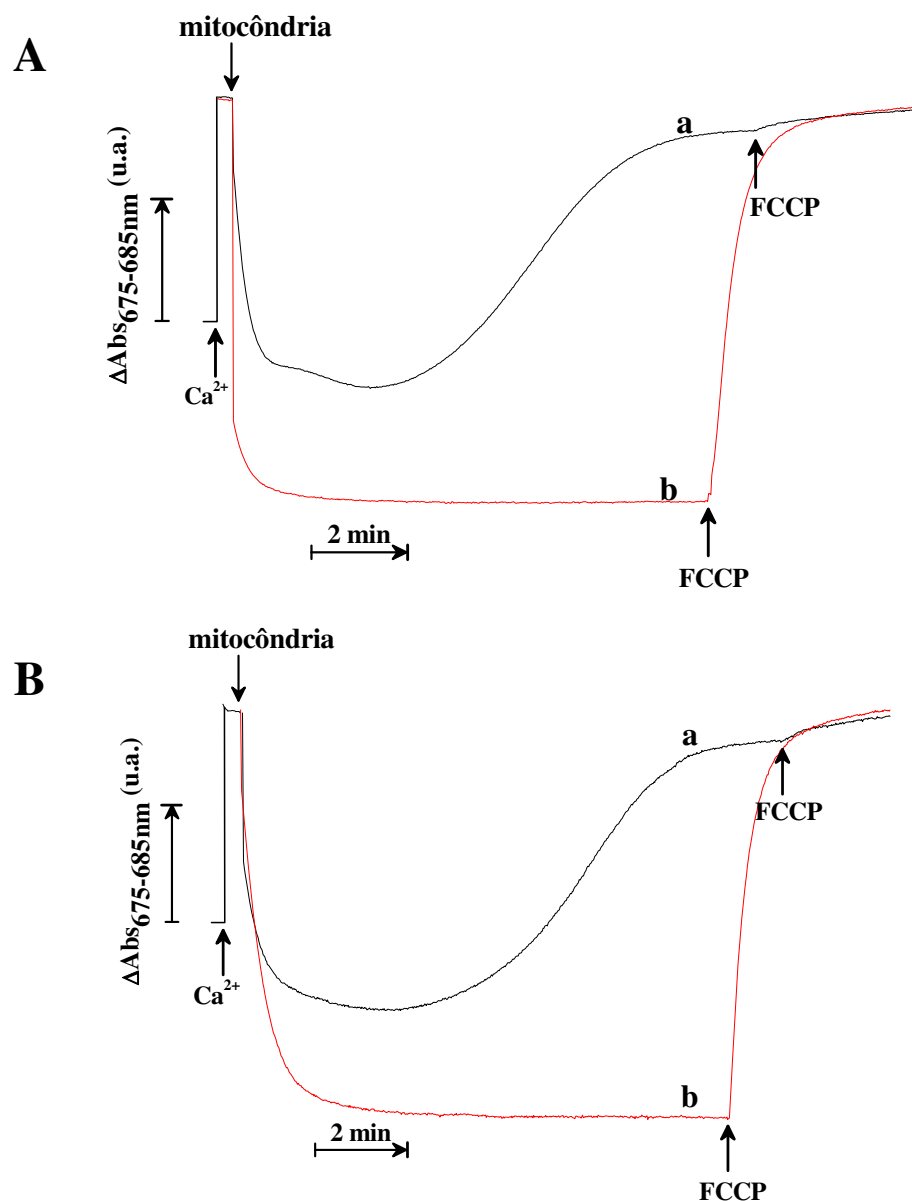
Uma vez que a adição de concentrações nanomolares e micromolares de PD153035 em mitocôndrias isoladas cardíacas não teve efeitos significativos, resolvemos verificar o efeito *in vivo* do PD153035. Os animais foram tratados com 32 mg/kg (v.o.) do composto e após 48 h, mitocôndrias cardíacas foram isoladas. Os resultados mostram que o controle respiratório (CR) e a razão ADP/O (eficiência de fosforilação) foram similares aos das mitocôndrias isoladas de coração de ratos não tratados com PD (**Tabela I**).

Tabela I – Velocidades de respiração, controle respiratório e razão ADP/O em mitocôndrias de coração de ratos controles e tratados com PD153035

	estado III	estado IV	estado III / estado IV	ADP/O
Controle	105,3 ± 2,8	19,7 ± 1,08	4,8 ± 0,1	2,02 ± 0,11
Tratado	101,6 ± 13,5	18,5 ± 4,7	5,0 ± 0,3	2,14 ± 0,13

Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/ml) foram adicionadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, EGTA 100 μM , substratos ligados a NAD (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada). Iniciou-se o estado III da respiração mitocondrial pela adição de ADP 150 μM . Ratos foram tratados com PD153035 (32 mg/kg, v.o.) ou com o solvente propilenoglicol, 48 h antes do isolamento mitocondrial. Média $\pm$ SEM (n=5) ($p \geq 0,05$). Velocidades de respiração em nmoles de O_2 /mg de proteína/min.

A suscetibilidade a TPM foi investigada em mitocôndrias isoladas de corações de ratos tratados com PD153035, utilizando-se a metodologia do efluxo de Ca^{2+} . A **FIGURA 17** mostra que o Ca^{2+} adicionado ao meio de reação é rapidamente captado e liberado pelas mitocôndrias isoladas de coração de rato controle (**FIGURA 16A**, linha a) e de rato tratado (**FIGURAS 17B**, linha a). Na presença de CsA (linhas b), o Ca^{2+} é rapidamente captado, acumulado e somente após a adição do protonóforo FCCP é liberado para o meio extramitocondrial. Pelos resultados da **FIGURA 17**, nota-se que o tratamento *in vivo* com PD153035 não alterou a suscetibilidade a TPM induzida por Ca^{2+} em mitocôndrias de coração, sugerindo que a ação cardioprotetora do PD153035 deve ser independente da prevenção da TPM.



Figuras 17- Captação de Ca^{2+} por mitocôndrias isoladas de coração de ratos controle (A) e tratados com PD153035 (B)

As mitocôndrias de coração (0,5 mg/mL) foram adicionadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, arsenazo 40 μM , substratos ligados a NAD^+ (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada), Ca^{2+} 40 μM na ausência (*linha a*) ou na presença de CsA 1 μM (*linha b*). FCCP 1 μM foi adicionado onde indicado. Ratos foram tratados com PD153035 (32 mg/kg, v.o.) ou com o solvente propileno-glicol, 48 h antes do isolamento mitocondrial.

Visto que o tratamento *in vivo* com PD153035 não alterou a suscetibilidade à TPM induzida por Ca^{2+} , investigamos a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em mitocôndrias isoladas de corações de ratos tratados com PD153035. Para a medida da produção mitocondrial de EROs utilizou-se Amplex Red, na presença de HRP (peroxidase de raiz forte), que detecta a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com produção do composto fluorescente resofurina (ZHOU et al, 1997). Da mesma maneira como observado nos experimentos de respiração mitocondrial (**Tabela I**), observa-se que o PD153035 não exerceu nenhum efeito na produção de EROs, seja na produção basal ou na presença de antimicina A e FCCP (**Tabela II**).

Tabela II – Velocidades de produção basal de EROs (H_2O_2) ou na presença de antimicina A e FCCP em mitocôndrias isoladas de coração de ratos controles e tratados com PD153035

	Basal	Antimicina A	FCCP
Controle	97,9 ± 10,3	778,1 ± 192,1	12,5 ± 2,0
Tratado	96,8 ± 7,8	721,8 ± 170,3	12,5 ± 2,0

Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/ml) foram adicionadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, EGTA 100 μM e substratos ligados a NAD(malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM cada). Ratos foram tratados com PD153035 (32 mg/kg, v.o.) ou com o solvente propileno-glicol, 48 h antes do isolamento mitocondrial. Média ± SEM (n=4) ($p \geq 0,05$). Velocidades de produção de H_2O_2 são expressas em nmol/mg de proteína/min.

4.5- Controle respiratório em mitocôndrias isoladas de coração de ratos tratados com PD153035 e submetidos à isquemia/reperfusão é mantido

Os resultados da **FIGURA 18** mostram que mitocôndrias isoladas de corações submetidos a 40 min de isquemia e 30 min de reperfusão apresentam controle respiratório significativamente menor quando comparadas ao controle (5,7 e 8,6; respectivamente). Quando os ratos foram tratados com PD153035 48 h antes, observa-se que o controle respiratório das mitocôndrias isoladas de corações submetidos à isquemia/reperfusão (8,1) manteve-se semelhante ao de organelas controles. Este resultado indica que o tratamento *in vivo* com PD153035 resulta em preservação da função mitocondrial em corações submetidos à isquemia/reperfusão.

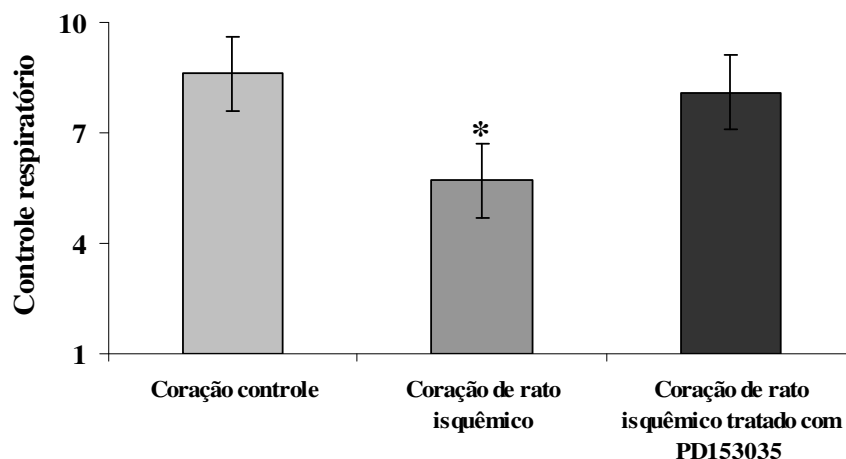


Figura 18-Controle respiratório em mitocôndrias isoladas após processo de isquemia/reperfusão em coração de ratos controles ou tratados com PD153035

Mitocôndrias de coração de rato (0,5 mg/ml) foram adicionadas em meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), KH_2PO_4 2,5 mM, MgCl_2 1 mM, EGTA 100 μM e substratos ligados a NAD (malato, glutamato, piruvato e α -cetoglutarato, 1,25 mM). Ratos foram tratados com PD153035 (32 mg/kg v.o.) ou com o solvente propileno-glicol, 48 h antes do isolamento mitocondrial, conforme indicado. O controle respiratório foi calculado pela razão entre os estados respiratórios III e IV, o estado III foi induzido pela adição de ADP 150 μM . As barras representam médias de três experimentos $\pm$ SEM, *significativamente diferente de “Coração controle” ($p < 0,05$).

4.6- PD153035 aumenta a permeabilidade mitocondrial a K^+

Os experimentos com mitocôndrias isoladas de corações submetidos à isquemia/reperfusão indicaram um claro efeito cardioprotetor do tratamento prévio dos animais com PD153035. Estes efeitos estão de acordo com os resultados obtidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Kleber Franchini do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular da Unicamp (MARIM, 2003) que revelam efeito cardioprotetor do PD153035 em experimentos de isquemia/reperfusão em corações perfundidos com o composto. Nos resultados descritos até aqui indicam que o efeito cardioprotetor de PD153035 não está relacionado à diminuição da suscetibilidade a TPM, a um efeito antioxidante direto deste composto ou a uma redução da produção de EROs pela cadeia respiratória mitocondrial. Assim, a seguir estudamos o efeito do PD153035 no aumento do transporte de K^+ pela membrana mitocondrial interna, efeito que está relacionado a cardioproteção conferida por compostos como o pinacidil, diazóxido (DZX) e cromarcalina (GARLID et al., 1997; KOWALTOWSKI et al., 2001b; ver revisão: GARLID et al., 2001). Propõe-se que a cardioproteção conferida por estes compostos esteja relacionada a indução da abertura de canais de K^+ mitocondriais sensíveis a ATP (mitoK_{ATP}), com conseqüente aumento do influxo mitocondrial de K^+ (ver revisão: GARLID e PAUČEK, 2003). Isto levaria a alterações de algumas propriedades mitocondriais, com uma menor produção de EROs (FERRANTI et al., 2003) e menor hidrólise de ATP durante o período isquêmico (DOS SANTOS et al., 2002; ALA-RAMI et al., 2003).

A entrada de K^+ na matriz mitocondrial é acompanhada pela difusão de H_2O e ânions, principalmente P_i , resultando em aumento de volume da matriz (ver revisão: GARLID e PAUČEK, 2001) que pode ser acompanhado pela redução do espalhamento de luz pela suspensão mitocondrial. A análise do inchamento de mitocôndrias cardíacas na presença e ausência de PD153035 (**FIGURA 19**) revelou que a presença deste composto, 10 nM, resulta em um aumento de volume mais rápido e extenso das mitocôndrias incubadas. Esse aumento adicional de volume foi em grande parte prevenido pela presença de ATP, um inibidor clássico de mitoK_{ATP}.

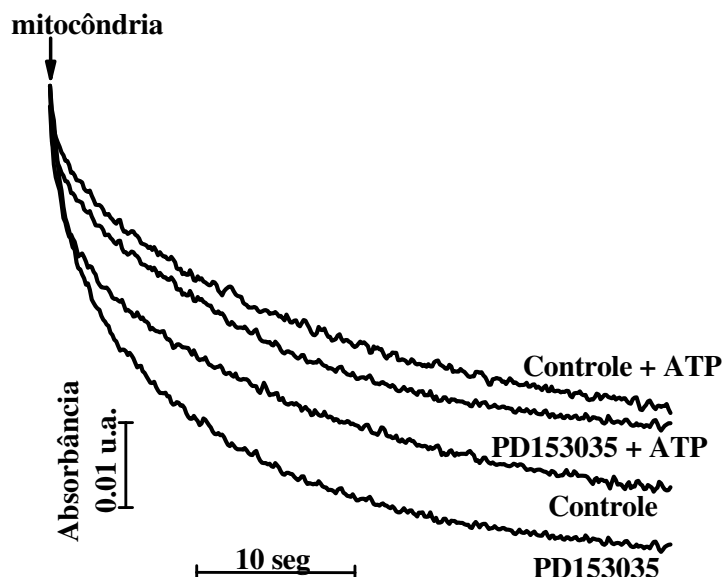


Figura 19- Efeito de PD153035 no inchamento mitocondrial induzido pela entrada de K^+ em mitocôndrias isoladas de coração de rato

Traçados representativos de inchamento obtido nos primeiros 40 segundos. Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo KCl 100 mM, HEPES 5 mM (pH 7.4), K_2PO_4 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 0,1 mM, oligomicina 1 μ g/ml, succinato 10 mM, na presença ou ausência de PD153035 10 nM e/ou de ATP 200 μ M, conforme indicado.

Como a incubação *in vitro* de mitocôndrias isoladas de corações de ratos com PD153035 resultou em estímulo do transporte de K^+ através da membrana mitocondrial interna (**FIGURA 19**), testou-se a seguir o efeito do tratamento *in vivo* com PD153035. Efeito semelhante foi observado em mitocôndrias isoladas de coração de ratos tratados com PD153035 (32 mg/kg v.o.) 48 h antes do isolamento mitocondrial (**FIGURA 19**). O maior inchamento de mitocôndrias cardíacas isoladas de ratos tratados com PD153035 também foi quase totalmente revertido pela presença de ATP. A concentração 10 nM foi escolhida através de uma curva dose-resposta com PD153035 1, 3, 10 e 30 nM (dados não mostrados).

Os resultados da **FIGURA 20** mostram que, conforme esperado, a inibição do inchamento mitocondrial na presença de ATP é revertida na presença de diazóxido (DZX), agonista de mitoK_{ATP}, num mecanismo sensível a 5-hidroxidecanoato (5HD), um antagonista de mitoK_{ATP}.

Notadamente, o aumento de volume mitocondrial induzido por PD153035 *in vitro* (**FIGURA 19**) e *in vivo* (dados não mostrados) foi inibido por 5HD. Quando K⁺ foi substituído por Li⁺ no meio de reação, não se observou maior inchamento induzido pelo tratamento *in vivo* (**FIGURA 20**) ou *in vitro* por PD153035 (**FIGURA 21**) com PD153035, o que caracteriza a dependência do íon K⁺ no mecanismo de inchamento na presença deste composto.

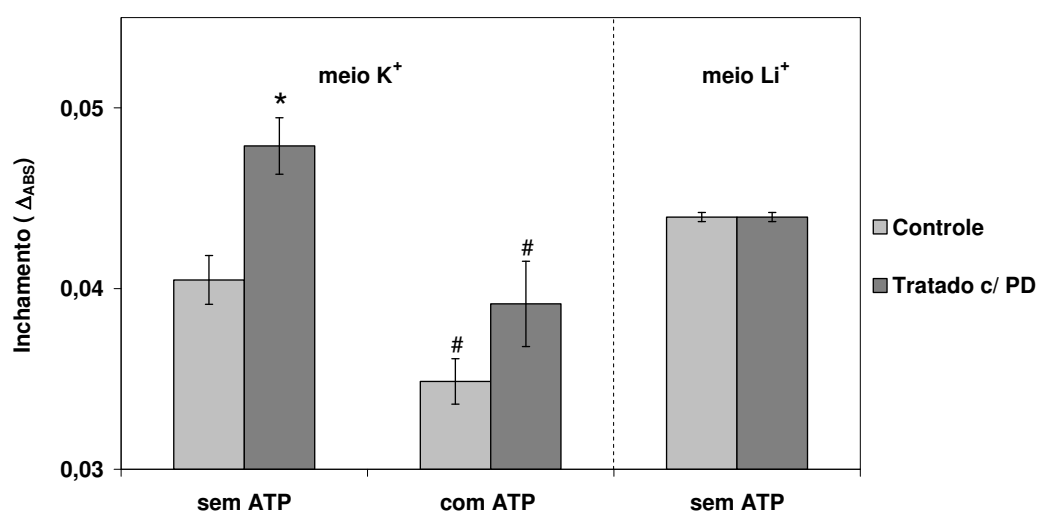


Figura 20- Inchamento mitocondrial induzido pela entrada de K⁺ em mitocôndrias isoladas de coração de ratos controles e tratados com PD153035

Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo KCl 100 mM, HEPES 5 mM, pH 7,4, K₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 0,1 mM, oligomicina 1 µg/ml e succinato 10 mM. Onde indicado, os experimentos foram realizados na presença de ATP 200 µM. Nas barras indicadas com “meio Li⁺”, KCl 100 mM foi substituído por LiCl 100 mM. Os valores representam médias de 17 experimentos ± SEM. *significativamente diferente de “Controle” ($p<0,01$) e #significativamente diferente da respectiva situação experimental na ausência de ATP ($p<0,05$).

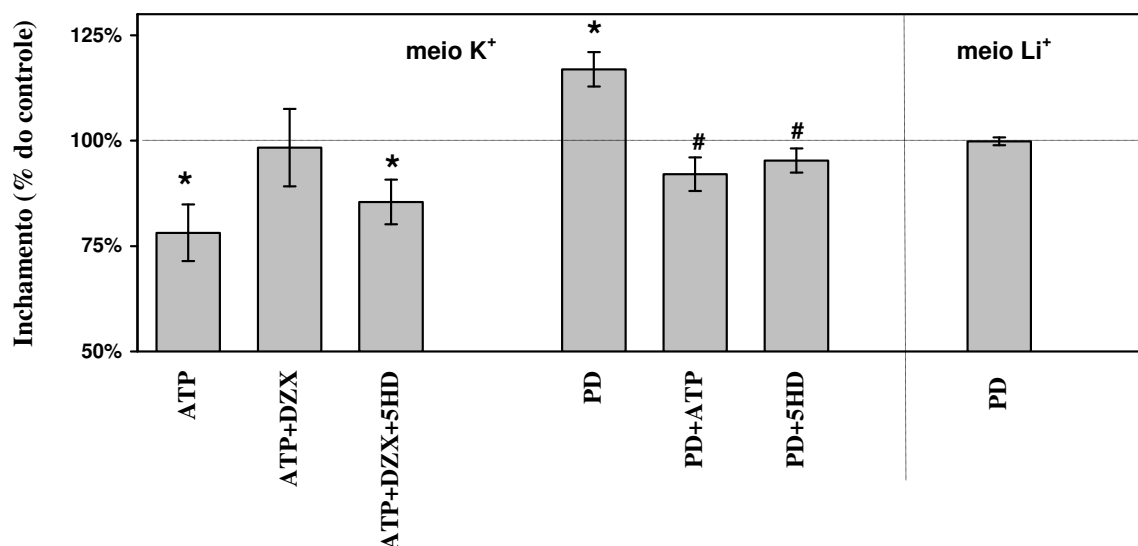


Figura 21- Caracterização do efeito *in vitro* de PD153035 no inchamento mitocondrial induzido pela entrada de K⁺ em mitocôndrias de coração de rato

Os dados estão representados em porcentagem de inchamento relativo ao controle (meio de K⁺ ou Li⁺). Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação (KCl 100 mM ou LiCl 100 mM, HEPES 5 mM, pH 7.4, K₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 0,1 mM, oligomicina 1 µg/ml e succinato 10 mM) na presença de ATP 200 µM, DZX 20µM, 5HD 60 µM e/ou PD153035 10 nM, conforme indicado na abscissa da figura. Onde indicado, o KCl foi substituído por LiCl. Os valores representam médias de 8 experimentos ± SEM. *significativamente diferente da situação controle ($p<0,01$) e #significativamente diferente de “PD” ($p<0,01$).

A entrada excessiva de K⁺ na matriz mitocondrial acompanhada pela sua extrusão através de um trocador K⁺/H⁺, promove uma pequena diminuição do potencial eletroquímico de H⁺ ($\Delta\mu_H^+$), que é recomposto às custas do aumento da respiração. Para investigar essa possibilidade, estudamos a velocidade de consumo de O₂ em tecido cardíaco extraído de animais tratados ou não com PD153035. Como mostra a **FIGURA 22**, fibras cardíacas de animais tratados com PD153035, quando incubadas em meio Krebs-Henseleit, apresentaram velocidade de respiração de repouso 8 % maior do que fibras cardíacas de animais controle. Esse aumento do consumo de O₂ pode ser atribuído ao leve desacoplamento causado pela entrada excessiva de K⁺ na matriz mitocondrial.

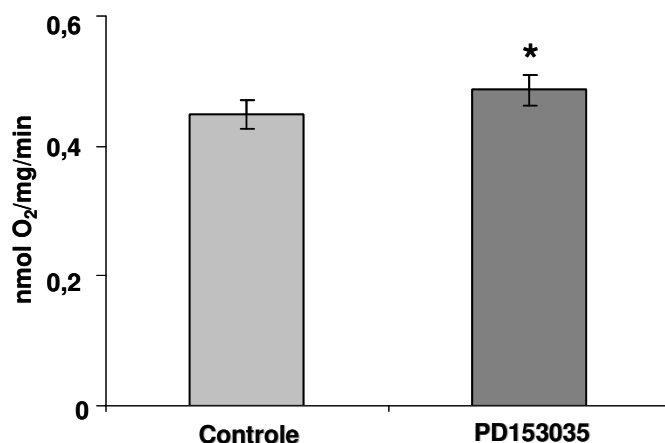


Figura 22- Consumo de O₂ por fibras cardíacas obtidas de animais controles e tratados com PD153035

Tecido cardíaco (~3 mg) foi incubado em 2 mL de meio de Krebs-Henseleit (37 C) acrescido de HEPES Na⁺ 20 mM, pH 7.4. Os valores representam médias de 7 experimentos ± SEM. *significativamente diferente de “Controle” ($p < 0,05$, teste t-Student pareado).

É conhecido que a ATP-sintase mitocondrial (F₁F₀-ATPase) pode apresentar reversão de sua atividade quando há ATP disponível, diminuindo o gradiente de potencial eletroquímico para o H⁺ através da membrana mitocondrial interna (HARRIS e DAS, 1991). Essa situação é observada durante isquemia tecidual e acredita-se que de fato pode ocorrer atividade reversa da ATP sintase *in vivo*, o que contribuiria para reduzir os níveis de ATP e acelerar a morte celular (JENNINGS et al., 1991; ROUSLIN, 1983) em situações de privação energética. Como há descrições de inibição da atividade reversa da ATP sintase pela abertura do canal mitoK_{ATP} (DOS SANTOS et al., 2002; ALA-RAMI et al., 2003), investigamos, se o mesmo ocorreria em mitocôndrias cardíacas de animais tratados com PD153035. Para estimar a atividade reversa da ATP sintase mitocondrial, acompanhamos o potencial elétrico transmembrana gerado pela hidrólise de ATP por mitocôndrias incubadas na presença de antimicina A, um inibidor da cadeia de transporte de elétrons (**FIGURA 23**). Nestas condições, o potencial de membrana foi estimado com o marcador fluorescente safranina O e espera-se que a adição de ATP seja acompanhada por um decréscimo temporário da fluorescência deste marcador, consequência de um aumento do potencial elétrico transmembrana que decorre da atividade reversa da ATP-sintase, o que é

revertido quanto ocorre o esgotamento do ATP adicionado. Na **FIGURA 23**, observa-se que o potencial elétrico transmembrana gerado pela adição de ATP 200 μ M a mitocôndrias cardíacas de animais tratados com PD153035 foi menor que em organelas controles. Este resultado sugere que o tratamento com PD153035 possa resultar em menor atividade hidrolítica da ATP sintase.

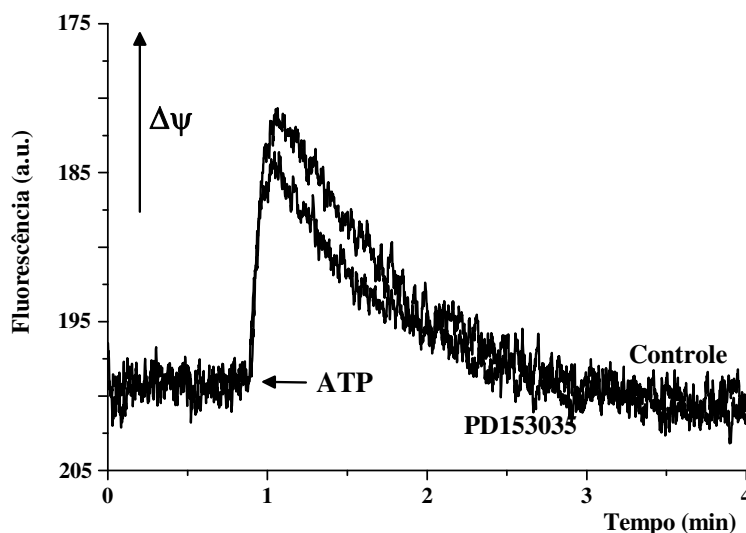


Figura 23- Estímulo do transporte de K^+ por mitocôndrias de coração de ratos tratados com PD153035 está associado com a diminuição do potencial de membrana formado pela hidrólise de ATP através da atividade reversa da ATP sintase mitocondrial

Mitocôndrias (0,2 mg/ml) isoladas de corações de ratos controles ou tratados com PD153035 (32 mg/kg v.o.) foram incubadas em meio de reação contendo KCl 150 mM, KH_2PO_4 10 mM, $MgCl_2$ 1mM, EGTA 0,1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,4 (KOH) e antimicina A 2 μ g/ml. Onde indicado pela seta foi adicionado ATP 200 μ M.

4.7- PD153035 mantém a viabilidade em células HL-1 quando submetidas a uma incubação transitória com cianeto de potássio, na ausência de glicose

Dados da literatura mostram que fármacos que ativam $mitoK_{ATP}$ promovem efeitos protetores teciduais iguais aos do pré-condicionamento cardíaco (LIU et al., 1998; FACUNDO et al., 2006a). Desta maneira, decidimos verificar se era possível obter

proteção com o uso de PD153035 numa linhagem de células cardíacas murinas (miócitos HL-1) submetidas a um tratamento transitório com cianeto de potássio (KCN), na ausência de glicose. Miócitos HL-1 mantêm características morfológicas e propriedades bioquímicas e eletrofisiológicas de cardiomiócitos (CLAYCOMB et al., 1998), apresentando ainda mecanismos de pré-condicionamento conservados (CHAUDARY et al., 2004; SEYMOUR et al., 2003).

A **FIGURA 24** mostra que células HL-1 quando submetidas a uma incubação transitória com KCN, na ausência de glicose, apresentaram uma rápida queda da viabilidade na ocasião do retorno do meio de reação padrão (▲). Esta queda de viabilidade celular não foi observada quando o mesmo experimento foi realizado na presença de PD153035 (●), mas não de DMSO (▼), solvente deste composto. Durante o tempo do experimento (140 min), células incubadas em situação controle e submetidas às trocas de meio de reação padrão não apresentaram queda significativa de viabilidade.

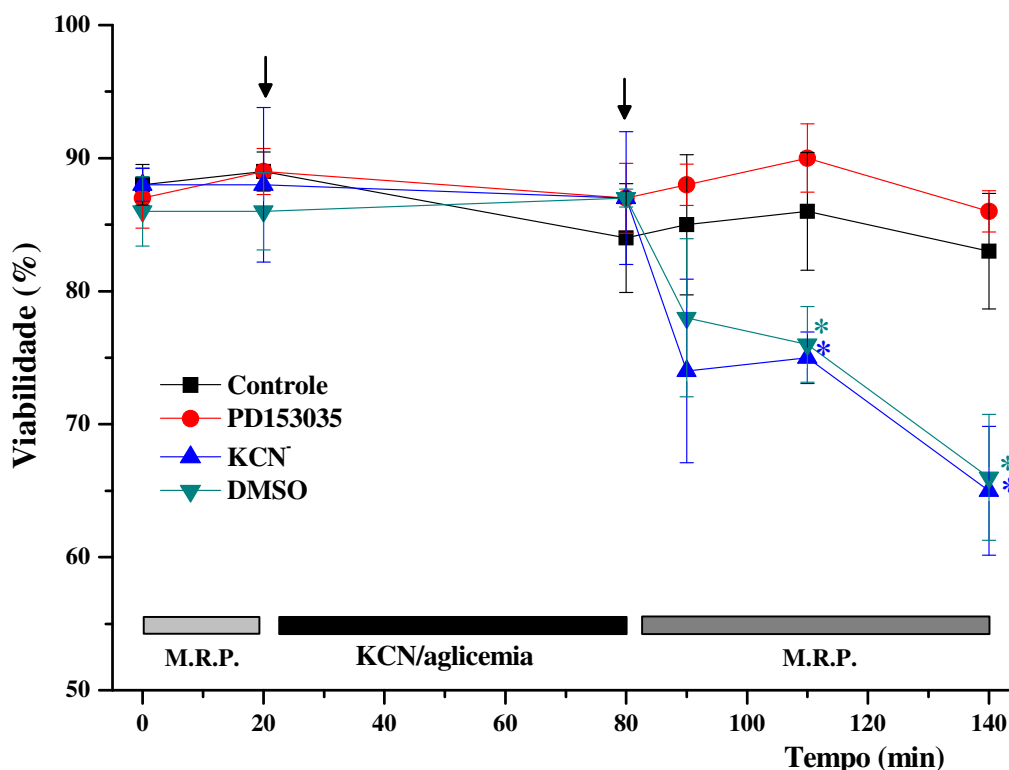


Figura 24- PD153035 protege células HL-1 após tratamento transitório com KCN, na ausência de glicose

Durante o tempo indicado (20 a 80 min), células HL-1, exceto na condição “Controle”, foram incubadas em meio de reação padrão (M.R.P.) contendo KCN 10 mM e 2-deoxiglicose 2 mM. PD153035 10 nM ou DMSO estiveram presentes durante todo o tempo de incubação. O volume de DMSO (6 μ L) utilizado foi o mesmo utilizado como solvente de PD153035. Onde indicado pelas setas, as células foram centrifugadas e o meio de reação padrão foi trocado. Os valores representam médias de 5 experimentos $\pm$ SEM. *significativamente diferente da situação “Controle” e “KCN + PD153035” nos respectivos tempos ($p < 0,05$).

Os mecanismos através dos quais a abertura de canais de K^+ resulta em cardioproteção ainda não são totalmente conhecidos, mas devem estar associados à manutenção do volume mitocondrial (KOWALTOWSKI et al., 2001b), inibição da hidrólise de ATP pela ATP-sintase (DOS SANTOS et al., 2002) e/ou redução da produção mitocondrial de EROs (FACUNDO et al., 2005). Dados da literatura mostram que inibidores da abertura de mitoK_{ATP}, como o 5HD, são capazes de reverter efeitos cardioprotetores do pré-condicionamento isquêmico (SCHULTZ et al., 1997) e do agonista

de mitoK_{ATP} diazóxido (DOS SANTOS et al., 2002). Para verificar se o efeito citoprotetor de PD153035 em células HL-1 submetidas ao tratamento com KCN, na ausência de glicose, é mediado pela abertura de mitoK_{ATP}, experimentos foram realizados na presença de 5HD. Notadamente, os resultados da **FIGURA 25** mostram que a presença de 5HD resultou em completa reversão dos efeitos protetores de PD153035 em células HL-1 submetidas ao tratamento com KCN na ausência de glicose. Experimentos controles mostram que isoladamente, o 5HD não teve efeito na viabilidade de células HL-1 incubadas em situação controle (Controle + 5HD) ou quando tratadas com KCN, na ausência de glicose (KCN + 5HD).

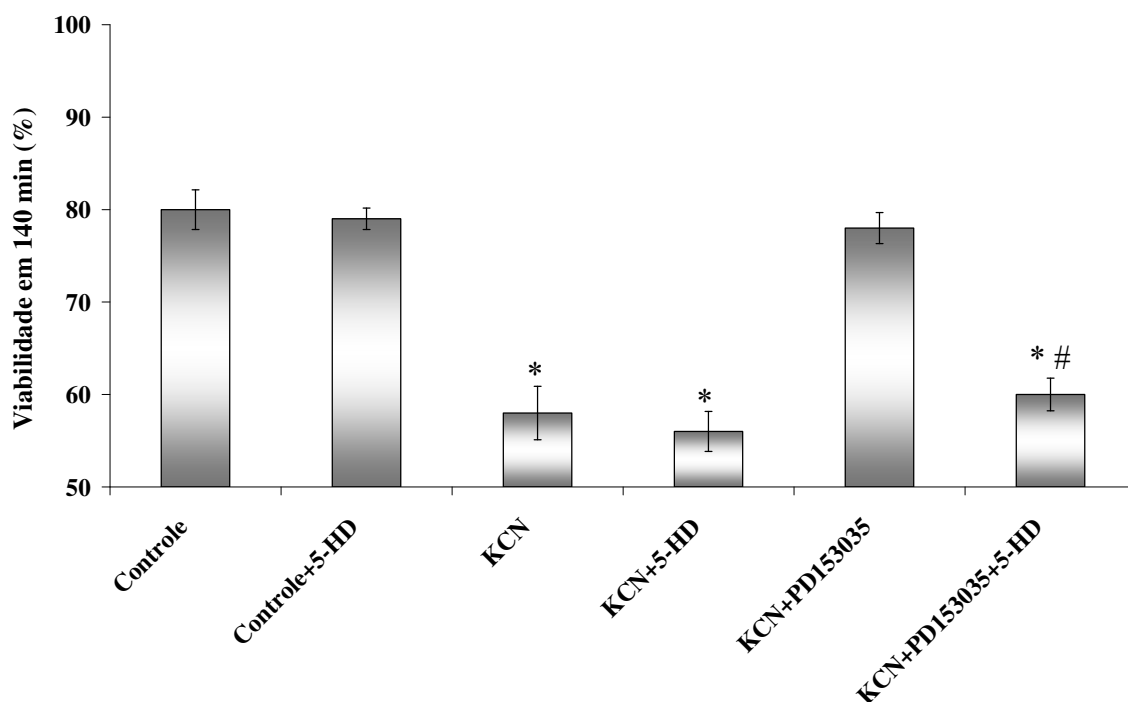


Figura 25- 5HD reverte o efeito protetor do PD153035 em células HL-1 submetidas a um tratamento transitório com KCN, na ausência de glicose

Durante 20 min, células HL-1 foram pré-incubadas em meio de reação padrão (M.R.P.). A seguir, células HL-1 foram submetidas a tratamento com KCN, na ausência de glicose durante 60 minutos, seguido de nova incubação em M.R.P. por 60 minutos e a viabilidade das células foi estimada. As incubações foram realizadas na presença de PD153035 10 nM e/ou 5HD 60 µM, conforme indicado na abscissa da figura. Os valores representam médias de 7 experimentos ± SEM. *significativamente diferente de “Controle” ($p<0,05$) e #significativamente diferente de “KCN + PD153035” ($p<0,05$).



5- DISCUSSÃO

FRY em 1994 publicou que um inibidor de tirosina cinase, o PD153035 era capaz de regredir tumores em camundongos portadores de carcinoma humano de epiderme (IC_{50} de 0,025 nM) com elevada potência e alta especificidade. Atualmente este composto encontra-se em testes terapêuticos com câncer. A partir destes dados, o grupo de pesquisa do Prof. Kleber Franchini descobriu que este composto oferece proteção miocárdica imediata e tardia aos danos ocasionados por isquemia/reperfusão (MARIN, 2003).

O efeito de PD153035 em corações isolados de ratos foi verificado através de experimentos dose-resposta sobre a pressão sistólica do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca (MARIN, 2003). Este composto causou aumento na pressão ventricular e diminuição dose-dependente da frequência cardíaca, resultando em resposta bradicárdica de aproximadamente 25% dos valores basais. Foram realizados experimentos de isquemia em corações isolados para verificar se o tratamento com PD153035 também poderia estar protegendo o miocárdio. Os resultados comprovaram a hipótese, revelando efeito protetor do PD153035 em corações isquêmicos a partir de concentrações de 100 pM (MARIN, 2003). Foi sugerido que o mecanismo de ação do PD153035 como cardioprotetor poderia ser mediado direta ou indiretamente pela ativação de receptores de adenosina (MARIN, 2005).

Com base no efeito protetor do PD153035 em miocárdio, neste trabalho foi investigado o efeito direto do composto sobre as funções mitocondriais hepáticas isoladas de rato. Em relação ao consumo de O_2 observamos uma diminuição no controle respiratório de maneira dose-dependente: primeiramente, observamos seu efeito desacoplador, um aumento progressivo na velocidade de consumo de O_2 mitocondrial no estado 4 (não-fosforilante) em todas concentrações, enquanto que a velocidade de respiração de estado 3 (fosforilante) foi significativamente inibida na concentração de 40 μ M.

Conforme descrito anteriormente, a combinação Ca^{2+} e EROs causa disfunção mitocondrial mediada pela oxidação de grupos tióis de proteínas e com formação do poro de transição de permeabilidade (KOWALTOWSKI et al., 2001a). O aumento na geração de EROs e/ou uma redução no processo de inativação destas espécies reativas pelo sistema de defesa antioxidante mitocondrial pode levar a danos oxidativos na organela, resultando numa permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, um fenômeno

conhecido como poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A TPM leva ao comprometimento da síntese de ATP mitocondrial, liberação de componentes da matriz, inchamento mitocondrial e conseqüente ruptura da membrana externa com a liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembrana (ZORATI e SZABO, 1995). As mitocôndrias são consideradas as principais fontes de geração de EROs intracelular, o que é aumentado pelo íon Ca^{2+} e este efeito é aumentado na condição de TPM.

Nas condições experimentais realizadas neste trabalho, mostramos que a TPM na presença de Ca^{2+} foi inibida pelo composto PD153035 em concentrações. Como foi observado, o PD153035 diminuiu significativamente a produção de EROs mitocondrial e a possível capacidade deste composto em ser um inibidor de TPM foi comprovada em experimentos de inchamento mitocondrial e em experimentos avaliando a capacidade mitocondrial em reter o Ca^{2+} . Observamos ainda que a CsA (inibidor clássico do PTP) na presença ou ausência de 10, 20 e 40 μM de PD não foi capaz de inibir a oxidação de grupos tiólicos de proteína de membrana (BERNARDES et al., 1994), descartando a hipótese que a inibição da abertura do PTP pelo composto esteja ligada à diminuição da oxidação de grupamentos tióis.

Para checar se os efeitos do PD153035 sobre a inibição do PTP *in vitro* em mitocôndrias isoladas seria conseqüência de um efeito antioxidante, avaliamos a degradação oxidativa da deoxiribose (HERMES-LIMA et al., 2000), comparando o PD153035 ao DMSO, um clássico seqüestrador de $\cdot\text{OH}$ que impede a degradação da 2-deoxiribose induzida por Fe(III)-EDTA na presença de ascorbato. Nas concentrações testadas, pode-se observar que o PD153035 não teve ação protetora indicando que este composto não possui efeito antioxidante.

Investigando o mecanismo de ação do PD153035 *in vitro* em mitocôndrias de coração de rato, o efluxo de Ca^{2+} foi monitorado e observa-se que concentrações micromolares do composto tornaram as mitocôndrias cardíacas mais sensíveis ao Ca^{2+} , isto é, tornaram as mitocôndrias mais susceptíveis à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca^{2+} . Concentrações nanomolares do composto não alteraram a capacidade de mitocôndrias cardíacas em captar e reter Ca^{2+} .

Foi analisado também o mecanismo de ação do PD153035 *in vivo* em mitocôndrias isoladas de coração de ratos controles e tratados na respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa, transição de permeabilidade e produção de EROs. Nas condições experimentais apresentadas, nossos resultados mostraram que o composto não exerceu qualquer efeito sobre as velocidades de consumo de O₂ nos estados III e IV sobre o controle respiratório e razão ADP/O. Verificamos também que o tratamento com o PD153035 não alterou a abertura do MPT induzida por cálcio e a velocidade de produção de H₂O₂ também não foi alterada.

Os resultados até o momento sugerem que o tratamento com PD153035 não teve efeito em mitocôndrias cardíacas isoladas, pois não houve alteração tanto na homeostase intracelular de Ca²⁺ como na bioenergética mitocondrial.

É sabido que o PD153035 protege o miocárdio através de efeito bradicárdico dependentemente da ativação direta ou indireta de receptores de adenosina e que esta proteção é revertida pelo antagonista inespecífico destes receptores (MARIN e FRANCHINI, 2005). A adenosina protege o miocárdio e outros tecidos de hipóxia e isquemia através da ativação do receptor A₁ e A₃ (receptores que atuam ativando canais de potássio e inibe a ação da adenilato-ciclase, o que prolonga a despolarização diastólica). Os mecanismos envolvidos neste efeito não são bem conhecidos, no entanto, postula-se que a adenosina ativa os mecanismos de proteção tecidual devido o aumento da atividade de canais de potássio mitocondrial ATP-dependente através de vias de sinalização que envolve a ativação de proteína cinase (SHRYOCK e BELLARDINELL, 1997; KLINGER et al., 1997; MUBAGWA et al., 2001; SAFRAN et al., 2001)

A partir destes dados, foram realizados experimentos comparando mitocôndrias isoladas de animais tratados ou não com PD153035 submetidas ao processo de isquemia/reperfusão. Observou-se que o CR das mitocôndrias isoladas de corações submetidos à isquemia/reperfusão manteve-se semelhante ao CR de organelas controles, indicando que o tratamento *in vivo* com PD153035 resultou em preservação da função mitocondrial de corações submetidos à isquemia/reperfusão, sendo relacionada à proteção miocárdica observada por MARIN (2003).

A proteção do miocárdio frente a situações de isquemia e reperfusão, é dada principalmente pelo transporte de K^+ para a matriz mitocondrial através dos mitoK_{ATP} (GARLID et al., 1997). Esses canais permitem a entrada adicional de K^+ na matriz mitocondrial que é acompanhada pela extrusão através de um trocador K^+/H^+ , cuja principal função é evitar o acúmulo excessivo de K^+ na matriz, que resultaria em inchamento e ruptura da organela (ver revisão: GARLID e PAUČEK, 2001). A manutenção do volume determina uma baixa permeabilidade da membrana plasmática à Ca^{2+} , diminuindo a hidrólise de ATP durante a isquemia e preservando energeticamente o tecido isquêmico (BELISLE e KOWALTOWSKI, 2002; DOS SANTOS et al., 2002)

Desta maneira, estudamos então um possível mecanismo protetor do PD153035 avaliando inicialmente o aumento da permeabilidade a K^+ pelas mitocôndrias cardíacas. A entrada de K^+ na matriz mitocondrial é acompanhada pela difusão de H_2O e ânions, principalmente P_i , resultando em aumento do volume da matriz. (ver revisão: GARLID e PAUČEK, 2003). A análise de inchamento mitocondrial em mitocôndrias cardíacas *in vitro* na presença de PD153035 10 nM revelou um maior aumento de volume quando adicionadas em meio de reação hiposmótico suplementado com K^+ . Comparando mitocôndrias de animais tratados ou não com PD153035, foi demonstrado que as mitocôndrias cardíacas dos animais tratados também ficaram mais susceptíveis à entrada de K^+ quando submetidas às mesmas condições experimentais *in vitro*. Estes aumentos adicionais de volume mitocondrial em ambas situações foram prevenidos pela adição de ATP ou 5-HD (inibidores clássicos do mitoK_{ATP}). Quando K^+ foi substituído por Li^+ no meio de reação, não foi observado maior inchamento induzido pelo tratamento *in vivo* ou *in vitro* por PD153035, o que caracteriza a dependência do íon K^+ no mecanismo de inchamento na presença deste composto.

Os mitoK_{ATP} inibidos por ATP, ADP, hidroxidecanoato (5HD) e ativados pelo pinacidil (KOWALTOWSKI et al., 2001b), diazóxido e cromacalina (GARLID et al., 1997). Evidências *in vivo* indicam que mitoK_{ATP} também é aberto por sinalizadores endógenos. Numerosas cinases são ativadas por estes caminhos e é sensato dizer que mitoK_{ATP} *in vivo* regula o fluxo de K^+ para manter a estrutura e integridade funcional da mitocôndria necessária para a fosforilação oxidativa (GARLID et al., 2003).

Uma vez que o aumento da permeabilidade a K^+ por mitocôndrias cardíacas *in vitro* e *in vivo* foram induzidas pelo composto, investigou-se o aumento da velocidade de respiração basal *in situ* utilizando fibras cardíacas de animais tratados ou não com PD153035. A análise do consumo de O_2 do tecido cardíaco dos animais tratados revelou que estas mitocôndrias *in situ* apresentaram uma respiração de repouso maior quando comparado às mitocôndrias dos animais controle, indicando que a entrada de K^+ através de mitoK_{ATP} resultou em significativa diminuição de $\Delta\psi$ e aumento da respiração. Em cérebro, rim e coração, o potencial de membrana mitocondrial pode diminuir de 3 a 11 mV com correspondente aumento na velocidade de consumo de O_2 (BAJGAR et al., 2001; CANCHERINI et al., 2003). Dessa forma, o mitoK_{ATP} agindo como um discreto desacoplador, é suficiente para aumentar a respiração sem impedir a fosforilação oxidativa. Isso ocorre porque o aumento da respiração diminui a tensão de O_2 e também diminui a concentração de intermediários da cadeia respiratória na forma de doadores monoelétrônicos ao oxigênio (TURRENS, 1997).

De qualquer maneira, estes resultados *in vivo* e *in vitro* sugerem que o aumento na permeabilidade mitocondrial cardíaca a K^+ induzida por PD153035 e revertidos pela adição de ATP ou 5-HD pode estar relacionada à ativação de canais de potássio mitocondriais.

Os agonistas e antagonistas do mitoK_{ATP} apresentam características que afetam a função celular e mitocondrial, particularmente quando usados em altas concentrações. O DZX é o agonista do mitoK_{ATP} mais amplamente usado para os canais de potássio mitocondriais (GARLID et al., 1997) em relação aos de membrana plasmática. Porém é um potente inibidor da succinato desidrogenase quando usado em concentrações $\geq 100 \mu M$; em mitocôndrias isoladas a concentração de $30 \mu M$ é suficiente para ativar completamente o mitoKATP (KOWALTOWSKI et al., 2001-a). O 5HD, freqüentemente usado como inibidor do mitoK_{ATP} (JABUREK et al., 1998), pode ser convertido para 5-hidroxidecanoato-coenzima A na mitocôndria, afetando a respiração (HANLEY et al., 2003) e interferindo na oxidação de ácidos graxos (HANLEY et al., 2005). Já a glibenclamida, outro antagonista do mitoK_{ATP}, não é seletiva para este canal, inibindo também canais de K^+ de membrana plasmática, além de ser um forte inibidor respiratório (JABUREK et al., 1998).

Através do uso de DZX e 5HD, GARLID et al. (1997) verificou que a proteção cardíaca à isquemia promovida por drogas que abrem canais de K^+ se deve à abertura do canal mitocondrial. Esses mecanismos envolvem regulação do volume mitocondrial (KOWALTOWSKI et al., 2001a), levando à melhora da fosforilação oxidativa pós-isquêmica (DOS SANTOS et al., 2002) e preservação energética do tecido durante a isquemia (BELISLE e KOWALTOWSKI, 2002).

A ATP-sintase é responsável pela fosforilação do ADP, que é revertida na ausência do gradiente de próton, hidrolisando ATP e bombeando prótons para o espaço intermembrana. Durante a isquemia, a falta de O_2 e substratos podem levar a mitocôndria a hidrolisar ATP, havendo depleção energética e eventualmente morte celular. Na ausência de O_2 a abertura de mito K_{ATP} diminui o potencial de membrana mitocondrial, hidrólise de ATP e captação de Ca^{2+} . Na presença de O_2 e substratos, a cadeia respiratória gera um gradiente de H^+ , o qual é usado pela ATP-sintase para fosforilar o ADP transportado para dentro da mitocôndria através do translocador de nucleotídeo de adenina. O gradiente de H^+ favorece a captação de Ca^{2+} mitocondrial através do uniporter de Ca^{2+} . Sob condições isquêmicas, na ausência de O_2 e substratos não ocorre transporte de H^+ pela cadeia respiratória. A ausência $\Delta\Psi$ suportado pela cadeia respiratória promove a atividade reversa da atividade da ATP sintase, com a produção de ADP e bombeamento de H^+ . Os níveis de ATP citosólico diminuem e a captação de Ca^{2+} acontece devido à hidrólise de ATP suportada pelo gradiente de H^+ . Sob condições isquêmicas na qual o mito K_{ATP} está ativado, a hidrólise de ATP é inibida, provavelmente devido ao transporte pelo translocador de nucleotídeo de adenina para dentro da matriz mitocondrial (DOS SANTOS et al., 2002), mantendo altos níveis de ATP citosólico. A ausência da hidrólise de ATP também resulta na redução da captação de Ca^{2+} pela mitocôndria, prevenindo a transição de permeabilidade mitocondrial.

Assim, observamos que em suspensão mitocondrial cardíaca de animais tratados com PD153035 com inibição da cadeia de transporte de elétrons, houve uma redução do potencial de membrana provocada pela hidrólise de ATP. Nossos resultados estão de acordo com os resultados mostrados por DOS SANTOS em 2002, onde o diazóxido reduziu a atividade reversa da ATP sintase em mitocôndrias isoladas de coração (DOS SANTOS et al., 2002) e em mitocôndrias renais (CANCHERINI, et al., 2003).

Agentes farmacológicos que ativam o mitoK_{ATP} promovem efeitos protetores iguais aos do pré-condicionamento cardíaco (LIU et al., 1998; FACUNDO et al., 2006a). Da mesma forma, outros estudos mostraram que o pré-condicionamento e ativação de transporte de K⁺ mitocondrial pode ser induzidoS por acetilcolina (YAO et al., 1999) e por hipóxia (VANDEN HOEK et al., 1998). Os mitoK_{ATP} também estão envolvidos nos mecanismos de proteção isquêmica, incluindo o pré-condicionamento isquêmico (BAINES et al., 1997) e tratamento com adenosina (HUH et al., 2001). Uma forte indicação de que o mitoK_{ATP} participa do processo de sinalização celular do pré-condicionamento é a observação que antagonistas do mitoK_{ATP}, como o 5-hidroxidecanóico inibidor específico de mitoK_{ATP} (GARLID et al., 1997), são capazes de inibir os efeitos benéficos do pré-condicionamento quando administrados durante os períodos curtos de isquemia (AUCHAMPACH et al., 1992; FACUNDO et al., 2006a).

Em continuidade à investigação sobre a proteção mitocondrial cardíaca, examinamos a relação entre o pré-condicionamento isquêmico com PD153035 na ativação de mitoK_{ATP} e os seus efeitos na viabilidade das células HL-1 pois elas apresentam mecanismos de pré-condicionamento conservado dependentes da ativação do canal de K⁺ mitocondrial (SEYMOUR et al., 2003). O pré-condicionamento durante vinte minutos na presença de PD153035 foi capaz de manter a viabilidade celular de maneira significativa, após simulação isquêmica/reperfusão. Este efeito protetor foi revertido pela adição de 5HD.

Baseando-se no efeito cardioprotetor de PD153035, mediado direta ou indiretamente por adenosina (Marin, 2003) e baseando-se nos nossos resultados, nossa proposta é que o composto é capaz de inibir a adenosina cinase aumentando a concentração de adenosina. A concentração aumentada de adenosina estimula o receptor de adenosina sinalizando a PKC, ativando mitoK_{ATP}.



6- CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que a adição de diversas concentrações de PD153035 em suspensões mitocondriais hepáticas diminui o controle respiratório de maneira dose-dependente, promove a inibição do fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) sensível a ciclosporina A, aumenta a capacidade em reter o Ca^{2+} e também diminui a produção de espécies reativas de oxigênio.

Nossos resultados mostram também que o aumento da permeabilidade mitocondrial cardíaca à K^+ induzida por PD153035 *in vivo*, modifica a bioenergética das mitocôndrias cardíacas, elevando o consumo de O_2 no estado de repouso e diminui a hidrólise de ATP pela $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$. Além disso, o composto mantém a viabilidade em células HL-1 após simulação isquêmica/reperfusão. Estes resultados estão de acordo com a ativação da atividade de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ e representa uma nova função cardioprotetora conferida pelo PD153035.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALA-RAMI, A.; YLITALO, K. V.; HASSINEM, I.E. Ischaemic preconditioning and a mitochondrial K⁺ ATP channel opener both produce cardioprotection accompanied by F₁F_o-ATPase inhibition in early ischemia. **Basic Res Cardiol**, **98**: 250-258, 2003.

AUCHAMPACH, J.A.; GROVER, G.J.; GROSS, G.J. Blockade of Ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP-dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. **Cardiovasc Res**, **26**: 1054–1062, 1992.

BAINES, C.P.; GOTO, M.; DOWNEY, J.M. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. **J Mol Cell Cardiol**, **29**: 207-216, 1997.

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**: 33369-33374, 2001.

BELISLE, E. e KOWALTOWSKI, A.J. Opening of mitochondrial K⁺ channels increases ischemic ATP levels by preventing hydrolysis. **J Bioenerg Biomembr**, **34**: 285-298, 2002.

BERNARDES, C.F.; MEYER-FERNANDES, J.R.; BASSERES, D.S.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Ca²⁺-dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4-diisothiocyanatostilbene-2,2-disulfonic acid (DIDS). **Biochim Biophys Acta**, **1188**: 93–100, 1994.

BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. **J Biol Chem**, **267**: 8834-8839, 1992.

BOLOGNESI, M.L.; MARUCCI, G.; ANGELI P.; BUCCIONI M.; MINARINI, A.; ROSINI, M.; TUMIATTI V.; MELCHIORRE, C. Analogues of Prazosin that bear a benextramine-related polyamine backbone exhibit different of iobitridol in plasma, urine and bile. **J Chromatogr B B Appl**, **44**: 362-371, 2001.

BONVENTRE, J.V. Kidney ischemic preconditioning. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, **11**: 43-48, 2002.

CADENAS, E.; BOVERIS, A.; RAGAN, C.I.; STOPPANI, A.O. 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.; REBOUÇAS, N.A.; KOWALTOWSKI, A.J. ATP-sensitive K^+ channels in renal mitochondria. **Am J Physiol Renal Physiol**, **285**: 1291-1296, 2003.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; MEINICKE, A. R.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A. E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ion is stimulated by t-butyl hidroperoxide and mediated by reactive species generated by mitochondria. **Free radic Biol Med**, **18**: 479-486, 1995.

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

CESAR, M. de C. e WILSON, J.E. All three isoforms of the voltage-dependent anion channel (VDAC1, VDAC2, and VDAC3) are present in mitochondria from bovine, rabbit, and the brain. **Arch Biochem Biophys**, **422**: 191-196, 2004.

CHANCE, B. e WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv Enzymol**, **17**: 65-134, 1956.

CHAUDARY, N.; NAYDENOVA, Z.; SHURALYOVA, I.; COE, I.R. The adenosine transporter, mENT1, is a target for adenosine receptor signaling and protein kinase Cepsilon in hypoxic and pharmacological preconditioning in the mouse cardiomyocyte cell line, HL-1. **J Pharmacol Exp Ther**, **310**: 1190- 1198, 2004.

CLAYCOMB, W.C.; LANSON, N.A.; STALLWORTH, B.S.; EGELAND, D.B.; DELCARPIO, J.B.; BAHINSKI, A.; IZZO, N.J. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. **Proc Natl Acad Sci**, **95**: 2979-2984, 1998.

COSTA, A.D.; GARLID, K.D.; WEST, I.C.; LINCOLN, T.M.; DOWNEY, J.M.; COHEN, M.V.; CRITZ, S.D. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. **Circ Res**, **97**: 329-336, 2005.

COWARD, M.; LEE, C.H.; GFESSER, G.A.; BAYBURT, E.K.; BHAGWAT, S.S.; STEWART, A.O. Structure-activity studies of 5-substituted pyridopyrimidines as adenosine kinase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, **11**: 83-86, 2001.

DOMOKI, F.; PERCIACCANTE, J.V.; VELTKAMP, R.; BARI, F.; BUSIJA, D.W. Mitochondrial potassium channel opener diazoxide preserves neuronal– vascular function after cerebral ischemia in newborn pigs. **Stroke**, **30**: 2713–2718, 1999.

DOONAN, S.; BARRA, D.; BOSSA, F. Structural and genetic relationships between cytosolic and mitochondrial isoenzymes. **Int J Biochem**, **16**: 1193-1199, 1984.

DOS SANTOS, P.; KOWALTOWSKI, A.J.; LACLAU, M.N.; SEETHARAMAN, S.; PAUCEK, P.; BOUDINA, S.; THAMBO, J.B.; TARIOSSE, L.; BONORON-ADÈLE, S.; GARLID, K.D. Mechanisms by which Opening the Mitochondrial ATP-sensitive Potassium Channel Protects the Ischemic heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, **283**: 296-301, 2002.

EDELSTEIN, C. L.; ALKHUNAIZI, A. A.; SCHRIER, R. W. The role of calcium in the pathogenesis of acute renal failure. **Ren Fail**, **19**: 199-207, 1997.

EDWARDS, G. e WESTON, A. H. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, **33**: 597-637, 1993.

ELLMAN, G.L. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. **Arch Biochem Biophys**, **2**: 443-50, 1958.

FACUNDO, H.T.; DE PAULA, J.G.; KOWALTOWSKI, A.J Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. **J. Bioenerg Biomembr**, **37**: 75-82, 2005.

FACUNDO, H.T.; CARRERA, R.S.; DE PAULA, J. G.; SANTOS, C.C.; FERRANTI, R.; LAURINDO, F.R.; KOWALTOWSKI, A.J. Ischemic preconditioning requires increases in reactive oxygen release independent of mitochondrial K^+ channel activity. **Free Radic Biol Med**, **40**: 469-479, 2006a.

FACUNDO, H.T.; FORNAZARI, M.; KOWALTOWSKI, A.J. Tissue protection mediated by mitochondrial K^+ channels. **Biochim Biophys Acta**, **1762**: 202–212, 2006b.

FACUNDO, H.T.; DE PAULA, J.G.; KOWALTOWSKI, A.J. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. **Free Radic Biol Med**, **42**: 1039- 1048, 2007.

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

FERRANTI, R.; DA SIVA, M.M.; KOWALTOWSKI, A.J. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel opening decreases reactive oxygen species generation. **FEBS Letters**, **536**: 51-55, 2003.

FORBES, R.A.; STEENBERGEN, C.; MURPHY, E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. **Circ Res**, **88**: 802-809, 2001.

FRANCHINI, K.G.; SAAD, M.J.A.; RITTNER, R.; MARIN, R.M.; ROCCO, S.A. Compounds derived from 4-anilinequinazolines with adenosine-kinase inhibitor properties. World Intellectual Property Organization; Patent WO 2005/085213 A1 (2005).

FRY, D.W.; KRABER, A.J.; MCMICHAEL, A.; AMBROSO, L.A.; NELSON, J.M.; LEOPOLD, W.R. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. **Science**, **265**: 1093-1095, 1994.

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**: 11369-11377, 1997.

GARLID, K.D. Unmasking the mitochondrial K/H exchanger: swelling-induced K^{+} -loss. **Biochem Biophys Res Commun**, **83**: 1450-5, 1978.

GARLID, K.D.; PAUCEK, P.; YAROV- YAROVY, 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^{+} channels. Possible mechanism of cardioprotection. **Circ Res**, **81**: 1072-1082, 1997.

GARLID, K.D. e PAUCEK, P. The mitochondrial potassium cycle. **IUBMB Life**, **52**: 153-158, 2001.

GARLID, K.D.; DOS SANTOS, P.; XIE, Z. J.; PAUCEK, P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K^{+} channel in cardiac function and cardioprotection. **Biochim Biophys Acta**, **1606**: 1-21, 2003.

GARLID, K.D. e PAUČEK, P. Mitochondrial potassium transport: the K^{+} cycle. **Biochem Biophys Acta**, **1606**: 23-41, 2003.

GAZIT, A.; CHEN, J.; MCMAHON, G.; HIRTH, P.; CHEN, I.; LEVITZKI, A. Tyrophostins IV-highly potent inhibitors of EGF receptor kinase. Structure-activity relationship study of 4-anilidoquinazolines. **Bioorg Med Chem**, **4**: 1203-1207, 1996.

GNAIGER, E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. **Respir Physiol**, **128**: 277-297, 2001.

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

GREEN, D.R. e KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, **305**: 626-629, 2004.

GRIFFITHS, E.J. e ELLNOR, J. in: Mitochondria in pathogenesis (Lemasters, J.J. and Nieminen A.L., Eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, in press, 2001.

GRIJALBA, M.T.; VERCESI, A.E.; SCHEREIER, S. Ca^{2+} - induced increase lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} - stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, **38**: 13279-13287, 1999.

GROVER, G.J.; MCCULLOUGH, J.R.; HENRY, D.E.; CONDER, M.L.; SLEPH, P.G. Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and cromakalin and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide. **J Pharmacol Exp Ther**, **251**: 98-104, 1989.

HALESTRAP, A.P.; KERR, P.M.; JAVADOV, S.; WOODFIELD, K.Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **Biochim Biophys Acta**, **1366**: 79-94, 1998.

HALESTRAP, A.P.; KERR, P.M.; JAVADOV, S.; SULEIN, M.S. Mitochondria in pathogenesis (Lemasters, J.J. and Nieminen A.L., Eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, in press, 2001.

HALESTRAP, A.P.; CLARKE, S.J.; JAVADOV, S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - A target for cardioprotection, **Cardiovasc Res**. **61**: 372-385, 2004.

HALESTRAP, A.P.; CLARKE, S.J.; KHALIULIN, I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. **Biochim Biophys Acta**. **1767**: 1007-1031, 2007.

HALLIWELL, B. E GUTTERIDGE, J.M. .Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. **FEBS Lett**, **27**: 108-112. 1992.

HANLEY, P.J.; GOPALAN, K.V.; LAREAU, R.A.; SRIVASTAVA, D.K.; VON MELTZER, M.; DAUT, J. Beta-oxidation of 5-hydroxydecanoate, a putative blocker of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. **J Physiol**, **547**: 387-393, 2003.

HANLEY, P.J.; DROSE, S.; BRANDT, U.; LAREAU, R.A.; BANERJEE, A.L.; SRIVASTAVA, D.K.; BANASZAK, L.J.; BARYCKI, J.J.; VAN VELDHoven, P.P.; DAUT, J. 5- Hydroxydecanoate is metabolised in mitochondria and creates a rate-limiting bottleneck for beta-oxidation of fatty acids. **J Physiol**, **562**: 307-318, 2005.

HARRIS, D.A e DAS, A.M. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. **Biochem J**, **280**: 561-573, 1991.

HIRAI, T.; FUJITA, M.; YAMANISHI, K.; OHNO, A.; MIWA, K.; SASAYAMA, S. Significance of pre-infarction angina for prevention of left ventricular function in acute myocardial infarction. **Am Heart J**, **124**: 19–24, 1992.

HERMES-LIMA, M.; WANG, E.M.; SCHULMAN, H. M.; STORREY, K.B.; PONKA, P. Deoxyribose degradation catalyzed by Fe(III)-EDTA: kinetic aspects and potential usefulness for submicromolar iron measurements. **Mol Cel Bioch**, **137**: 65-73, 1994.

HERMES-LIMA, M.; PONKA, P.; SCHULMAN, H. M. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbato. **Bioch Bioph Acta**, **1523**: 154-160, 2000.

HOLDEN, M.J. e SZE, H. Dissipation of the membrane potential in susceptible corn mitochondria by the toxin of *Helminthosporium maydis*, race T, and toxin analogs. **Plant Physiol**, **84**: 670–676, 1987.

HUH, J., GROSS, G.J.; NAGASE, H.; LIANG, B.T. Protection of cardiac myocytes via delta(1)-opioid receptors, protein kinase C, and mitochondrial K(ATP) channels. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, **280**: 377-383, 2001.

HUNTER, D. R. e HAWORTH, R.A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria: The protective mechanisms. **Arch Biochem Biophys**, **195**: 453-459, 1979.

IRIE, H.; GAO, J.; GAUDETTE, G.R.; COHEN, I.S.; MATHIAS, R.T.; SALTMAN, A.E.; KRUKENKAMP, I.B. Both metabolic inhibition and mitochondrial K_{ATP} channel opening are myoprotective and initiate a compensatory sarcolemmal outward membrane current. **Circulation**, **108**: 341-347, 2003.

INOUE, I.; NAGASE, H.; KISHI, K.; HIGUTI, T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. **Nature**, **352**: 244-7, 1991.

JABUREK, M.; YAROV-YAROVY, V.; PAUČEK, P.; GARLID, K.D. State-dependent inhibition of the mitochondrial KATP channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. **J Biol Chem**, **273**: 13578-13582, 1998.

JARVIS, M.F. ABT-702 (4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholino-pyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyridine), a Novel orally effective adenosine kinase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory properties: *in vitro* characterization and acute antinociceptive effects in the mouse. **The J Pharmacol and Exp Ther**, **295**: 1156-1164, 2000.

JENSEN, B.D.; GUNTER, K.K.; GUNTER, T.E. The efficiencies of the component steps of oxidative phosphorylation. II. Experimental determination of the efficiencies in mitochondria and examination of the equivalence of membrane potential and pH gradient in phosphorylation. **Biochem J**, **248**: 305-323, 1986.

JENNINGS, R.B.; REIMER, H.A.; STEENBERGEN, C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. **J Mol Cell Cardiol**, **23**: 1383-1395, 1991.

KARSTEN, U. Fluorometric estimation of dead cells in cell suspensions. **Experientia**, **36**: 263-264, 1980.

KAPLAN, R.S. e PEDERSEN, P.L. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. **Biochem J**, **212**: 279-288, 1983.

KICIŃSKA, A. e SZEWCZYK, A. Protective effects of the potassium channel opener-diazoxide against injury in neonatal rat ventricular myocytes. **Gen Physiol Biophys**, **22**: 383-395, 2003.

KLINGER, M.; FREISSMUTH M.; NANOFF, C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. **Cell Signal**, **14**: 99-108, 2002.

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^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol Chem**, **271**: 2929-2934, 1996.

KOWALTOWSKI, A. J.; NETTO, L.E.; VERCESI, A.E. The thiol- specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition: Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. **J Biol Chem**, **273**: 12766-12769, 1998.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, **495**: 12-15, 2001a.

KOWALTOWSKI, A.J.; SEETHARAMAN, S.; PAUCEKK, P.; Garlid, K.D. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K^{+} channel of heart mitochondria. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, **280**: 649-657, 2001b.

KOWALTOWSKI, A.J.; COSSO, R.G.; CAMPOS, C.B.; FISKUM, G. Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. **J. Biol. Chem.** **277**: 42802-4280, 2002.

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**: 359-363, 1984.

LEHNINGER, A.L.; COX, Y.M.; NELSON, D.L. Fosforilação oxidativa e fotofosforilação. In: LEHNINGER, A.L.; COX, Y.M.; NELSON, D.L. **Princípios de bioquímica**. 2ª ed, Barcelona: Omega, p.404-424, 1995

LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlororofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol**, **5**: 227-231, 1982.

LENARTOWICZ, E.; BERNARDI, P.; AZZONE, G.F. Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. **J Bioenerg biomembr**, **23**: 679-688, 1991.

LEVITZKI, A. Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. **Pharmacol Ther.** **82**: 231-239, 1999.

LETELLIER, T.; MALGAT, M.; COQUET, M.; MORETTO, B.; PARROT-ROULAUD, F.; MAZAT, J.P. Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers **Pediatr Res**, **32**: 17-22, 1992.

LIEBERTHAL, W.; KOH, J.S.; LEVINE, J.S. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. **Semin Nephrol**, **18**: 505-518, 1998.

LIU, Y.; SATO, T.; O'ROURKE, B.; MARBAN, E. Mitochondrial ATP-dependente potassium channels: novel effectors of cardioprotection? **Circulation**, **97**: 2463-2469, 1998.

LOPES, G.K.B.; SCHULMAN, H.M. ; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochim Biophys Acta** **1472**; 142–152, 1999.

LUTTER, R.; SARASTE, M.; VAN WALRAVEN, H.S.; RUNSWICK, M.J.; FINEL, M., DEATHERAGE, J.F., WALKER, J.E. F₁F₀-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. **Biochem J**, **295**: 799-806, 1993.

MACEDO, D.V., FERRAZ, V.L., PEREIRA DA SILVA, L.; VERCESI, A.E. Ca²⁺ dependent NAD(P)⁺-induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria—integration of mitochondrial function, **Ed J Lemasters Plenum**, New York, pp. 535-542, 1988.

MACIEL, E.N.; VERCESI, A.E.; CASTILHO, R.F. Oxidative stress in Ca²⁺-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. **J Neurochem**, **79**: 1237-1245, 2001.

MARIN, R.M. Tese de Mestrado. **UNICAMP**, 2003.

MARIN, R.M. e FRANCHINI, K.G. Reduced oxygen supply explains the negative force-frequency relation and the positive inotropic effect of adenosine in buffer-perfused hearts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, **289**: 131-136, 2005.

MAULIK, N.; ENGELMAN, R. M.; ROUSON, J. A. FLACK, J. E.; DEATON, D.; DAS, D.K. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by up regulating anti-death gene Bcl-2. **Circulation**, **100**: 11369-11375, 1999.

MCFALLS, E.O.; LIEM, D.; SCHOONDERWOERD, K.; LAMERS, J.; SLUITER, W.; DUNCKER, D. Mitochondrial function: The heart of myocardial preservation. **J Lab Clin Med**, **142**: 141-149, 2003.

MERRYFIELD, M.L. E LARDY, H.A. Ca^{2+} - mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of Fe^{2+} from rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, **257**: 3628-3635, 1982.

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^{+} channel (mitoKATP) and its inward rectifier subunit (mitoKIR), **J Biol Chem**, **30**: 32562-32568, 2004.

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

MUBAGWA, K. e FLAMENG, W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. **Cardiovasc Res**, **52**: 25-39, 2001.

MURAMUTSU, M.; KAMO, N.; KURIKARA, K.; KOBATAKI, Y. Selective electrode for dibenzyl dimethyl ammonium cation as indicator of membrane potential in biological systems. **Biochem B Biophys Acta**, **484**: 613-619, 1977.

MURATA, M.; AKAO, M.; O'ROURKE, B.; MARBAN, E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. **Circ Res**, **89**: 891-898, 2001.

MURRY, C.E.; JENNINGS, R.B.; REIMER, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, **74**: 1124- 1136, 1986.

NAKAMURA, M.; WANG, N.P.; ZHAO, Z.Q.; WILCOX, J.N.; THOURANI, V.; GUYTON, R. A.; VINTEN-JOHANSEN, J. Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. **Cardiovasc Res**, **45**: 661-670, 2000.

NICHOLLS, D.G. e ÅKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. **Biochim BiophysActa**, **683**: 57-88, 1982.

NICHOLLS, D.G. e FERGUSON, S.J. Proton Current and Respiratory Control. In: **Bioenergetics 3**. London, Academic Press Inc., 3th edition, p. 69-75, 2002.

NOMA, A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. **Nature**, **305**: 147-148, 1983.

PANG, C.Y.; NELIGAN, P.; XU, H.; HE, W.; ZHONG, A.; HOPPER, R.; FORREST, C.R. Role of ATP-sensitive K⁺ channels in ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. **Am J Physiol**, **273**: 44–51, 1997.

PARDO-ANDREU, G.L.; DORTA, D.J.; DELGADO, R.; CAVALHEIRO, R.A.; SANTOS, A.C.; VERCESI, A.E.; CURTI, C. Vimang (Mangifera indica L. extract) induces permeability transition in isolated mitochondria, closely reproducing the effect of mangiferin, Vimang's main component. **Chem Biol Interact**, **159**: 141-148, 2006.

RADI, R.; TURRENS, J.F.; CHANG, L.Y.; BRUSH, K.M.; CRAPO, J.D.; FREEMAN, B.A. Detection of catalase in rat heart mitochondria. **J Biol Chem**, **266**: 22028-22034, 1991.

REIS, D.J.; GOLANOV, E.V.; GALEA, E.; FEINSTEIN, D.L. Central neurogenic neuroprotection: central neural systems that protect the brain from hypoxia and ischemia. **Ann N Y Acad Sci**, **19**: 168-86, 1997.

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

ROSSI, C. S.; LEHNINGER, A. L. Stoichiometry of respiration stimulation, accumulation of Ca^{2+} and phosphate and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. **J Biol Chem**, **239**: 3971-3980, 1964.

ROUSLIN, W. Protonic inhibition of the mitochondrial oligomycin-sensitive adenosine 5'-triphosphatase in ischemic and autolyzing cardiac muscle. Possible mechanism for the mitigation of ATP hydrolysis under nonenergizing conditions. **J Biol Chem**, **258**: 9697-9661, 1983.

SAFRAN, N.; SHNEYVAYS, V.; BALAS, N.; JACOBSON, K.A.; NAWRATH, H.; SHAINBERG A. Cardioprotective effects of adenosine A1 and A3 receptor activation during hypoxia in isolated rat cardiac myocytes. **Mol Cell Biochem**, **217**: 143-152, 2001.

SARASTE, A.; VOIPPIO-PULKKI, L.M.; PARVINEN, M.; PULKKI, K. Apoptosis in the heart. **N Engl J Med**, **336**: 1025-1026, 1997.

SATO, T.; O'ROURKE, B.; MARBAN, E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent K^+ channels by protein kinase. **C Circ Res**, **83**: 110-114, 1998.

SEYMOUR, E.M.; WU, J.S.; KOVACH, M.A.; ROMANO, M.A.; JONATHAN, R.T.; CLAYCOMB, W.C.; BOLLING, S.F. HL-1 myocytes exhibit PKC and K(ATP) channel-dependent delta opioid preconditioning. **J Surg Res**, **114**: 187-194, 2003.

SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. **Methods enzymol**, **56**: 301-338, 1979.

SHIMSHAK, T.M.; PREUSS, K.C.; GROSS, G.J.; BROOKS, H.L.; WARLTIER, D.C. Recovery of contractile function in post-ischemic reperfused myocardium of conscious dogs: influence of nicorandil, a new antianginal agent. **Cardiovasc Res**, **20**: 621-626, 1986.

SCHLAME, M.; RUA, D.; GREENBERG, M. L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. **Prog Lipid Res**, **39**: 257-288, 2000.

SCHNEIDER, W.C. e HOGEBOM, G. H. Cytochemical studies of mammalian tissues: the isolation of cell components by differential centrifugations. **Cancer Res**, **11**: 1-22, 1950.

SHRYOCK, J.C. e BELLARDINELLI, L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. **Am J Cardiol**, **79**: 2-10, 1997.

SCHULTZ, J.E.; QIAN, Y.Z.; GROSS, G.J.; KUKREJA, R.C. The ischemia-selective KATP channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart. **Mol Cell Cardiol**, **29**: 1055-1060, 1997.

SIEMEN D.; LOUPATATZIS, C.; BORECKY J., GULBINS E.; LANG F. Ca^{2+} -activated K^{+} channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. **Biochem Biophys Res Commun**, **257**: 549-554, 1991.

SIES, H.; MOSS, K. M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. **Eur J Biochem**, **84**: 377-383, 1978.

STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science**, **267**: 1445-1449, 1995.

SULEIMAN, M.S.; HALESTRAP, A.P.; GRIFFITHS, E.J. Mitochondria: a target for myocardial protection. **Pharmacology and Therapeutics**, **89**: 29-46, 2001.

THORNBERRY, N. A. e LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, **281**: 1312-1316, 1998.

TSUCHIDA, A.; MIURA, T.; MIKI, T., KUNO, A.; TANNO, M.; NOZAWA, Y.; MATSUMOTO, T., SHIMAMOTO, K. Critical timing of mitochondrial K-(ATP) channel opening for enhancement of myocardial tolerance against infarction. **Basic Res Cardiol**, **96**: 446-453, 2001.

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

UKITA, T.; NAKAMURA, Y.; KUBO, A.; YAMAMOTO, Y.; MORITANI, Y.; SARUTA, K.; Novel, potent, and selective phosphodiesterase 5 inhibitors: synthesis and biological activities of a series of 4-aryl-1-isoquinoline derivatives. **J Med Chem**, **44**: 2204-2218, 2001.

VALLE, V. G.; FAGIAN, M. M.; PARENTONI, L. S.; MEININCKE, A. R.; VERCESI, A. E. The participation of reactive oxygen species and protein tilos in the mechanism of mithochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. **Arch Biochem Biophys**, **307**: 1-7, 1993.

VANDEN HOEK, T.L.; SHAO, Z.; LI, C.; ZAK, R.; SCHUMACKER, P.T.; BECKER, L.B. Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia. **Am J Physiol**, **270**: 1334-1341, 1996.

VANDEN HOEK, T.L.; BECKER, L.B.; SHAO, Z. H.; LI, C.Q.; SCHUMACKER, P.T. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. **J Biol Chem**, **273**: 18092-18098, 1998.

VANDEN HOEK, T.L.; BECKER, L.B.; SHAO, Z.; LI, C.; SCHUMACKER, P.T. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. **Circ Res**, **86**: 541-548, 2000.

VERCESI, A.E.; BERNARDES, C.F.; HOFFMANN, M.E.; GADELHA, F.R.; DOCAMPO, R. Digitonin-permeabilization does not affect mitochondrial fuction and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi in situ*. **J Biol Chem**, **266**: 14431-14434, 1991.

VERCESI, A. E.; KOWALTOWSKI, A. J.; GRIJALBA, M. T.; MEININKE, A.R. ; CASTILHO, R. F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeabilty transition. **Biosc Reports**, **17**: 43-52, 1997.

VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; OLIVEIRA, H.C.; CASTILHO, R.F. Mitochondrial Ca^{2+} transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. **Front Biosci**, **11**: 2554-2564, 2006.

VOTYAKOVA, T.V. e REYNOLDS, I.J. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. **J Neurochem**, **79**: 266-77, 2001.

WEIMBERG, J. M; VENKATACHALAM, M. A.; ROESER, N.F.; NISSIM, I. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. **Proc Natl Acad Sci USA**, **97**: 2826-2831, 2000.

YAO, Z.; TONG, J.; TAN, X.; LI, C.; SHAO, Z.; KIM, W.C.; VANDEN HOEK, T.L.; BECKER, L.B.; HEAD, C.A.; SCHUMACKER, P.T. Role of reactive oxygen species in acetylcholine-induced preconditioning in cardiomyocytes. **Am J Physiol**, **277**: 2504-2509, 1999.

YAGUCHI, Y.; SATOH, H.; WAKAHARA, N.; KATOH, H.; UEHARA, A.; TERADA, H.; FUJISE, Y.; HAYASHI, H. Protective effects of hydrogen peroxide against ischemia/reperfusion injury in perfused rat hearts. **Circulation J**, **67**: 253-258, 2003.

YELLON, D.M. e DOWNEY, J. M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. **Physiol Rev**, **83**: 1113-1151, 2003.

ZAKOWSKI, J. J.; TAPPEL, A. L. Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase. **Biochim Biophys Acta**, **526**: 65-76, 1978.

ZHANG, D.X.; CHEN, Y.F.; CAMPBELL, W.B.; ZOU, A.P.; GROSS, G.J.; LI, P.L. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. **Circ Res**, **89**: 1177-1183., 2001.

ZORATTI, M. e SZABÓ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, **1241**: 139-176, 1995.

ZHOU, M. e PANCHUK-VOLOSHINA, N. A one-step fluorometric method for the continuous measurement of monoamine oxidase activity, **Anal Biochem**, **253**: 169–174, 1997.



8- ANEXOS

Potent cardioprotective effect of the 4-anilinoquinazoline derivative
PD153035: Involvement of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel
activation

Renata A. Cavaleiro^{a,§}, Rodrigo M. Marin^{b,§}, Silvana A. Rocco^b, Camille C.
Caldeira da Silva^c, Alicia J. Kowaltowski^c, Anibal E. Vercesi^a, Kleber G. Franchini^{b,*},
Roger F. Castilho^{a,*}

Submetido à revista *Cardiovascular Research*

**Potent cardioprotective effect of the 4-anilinoquinazoline derivative
PD153035: Involvement of mitochondrial K_{ATP} channel activation**

Renata A. Cavalheiro^{a,§}, Rodrigo M. Marin^{b,§}, Silvana A. Rocco^b,
Camille C. Caldeira da Silva^c, Alicia J. Kowaltowski^c, Anibal E. Vercesi^a,
Kleber G. Franchini^{b,*}, Roger F. Castilho^{a,*}

^a *Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade
Estadual de Campinas, Campinas, SP 13083-887, Brazil*

^b *Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade
Estadual de Campinas, Campinas, SP 13083-887, Brazil*

^c *Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São
Paulo, SP 05508-900, Brazil*

[§]These authors contributed equally.

*Corresponding authors. Tel.: +55 19 3521 7370; fax: +55 19 3521 9434. *E-mail address:*
roger@fcm.unicamp.br (R. F. Castilho). Tel./fax: +55 19 3521 8023. *E-mail address:*
franchin@unicamp.br (K. G. Franchini).

Number of words: 4878.

Potent cardioprotective effect of the 4-anilinoquinazoline derivative PD153035: Involvement of mitochondrial K_{ATP} channel activation

Renata A. Cavaleiro, Rodrigo M. Marin, Silvana A. Rocco, Camille C. Caldeira da Silva, Alicia J. Kowaltowski, Anibal E. Vercesi, Kleber G. Franchini, Roger F. Castilho

Abstract

Aims: To evaluate the cardioprotective effects of the 4-anilinoquinazoline derivative PD153035 on cardiac ischemia/reperfusion and mitochondrial function. **Methods:** Perfused rat hearts and cardiac HL-1 cells were used to determine cardioprotective effects of PD153035. Isolated rat heart mitochondria were studied to uncover mechanisms of cardioprotection. **Results:** Nanomolar doses of PD153035 strongly protect against heart and cardiomyocyte damage induced by ischemia/reperfusion and cyanide/aglycemia. PD153035 did not alter oxidative phosphorylation, nor directly prevent Ca^{2+} induced inner mitochondrial membrane permeability transition. Interestingly, PD153035 activated K^+ transport into isolated mitochondria, in a manner decreased by ATP and 5-hydroxydecanoate, inhibitors of mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels (mito K_{ATP}). 5-hydroxydecanoate also inhibited the cardioprotective effect of PD153035, demonstrating that this protection is dependent on mito K_{ATP} activation. **Conclusion:** PD153035 is a potent cardioprotective compound and acts in a mechanism involving mito K_{ATP} activation.

Keywords: energy metabolism; anoxia/reoxygenation; infarction; ion transport; K_{ATP} channel.

Classifications - Discipline: experimental. **Object of Study:** heart. **Level:** organ, cellular, subcellular. **Expertise:** biochemistry. **Alphabetical:** apoptosis, energy metabolism, ischemia, K_{ATP} channel, mitochondria, reperfusion.

1. Introduction

Ischemic heart disease is a global health concern, and the development of new strategies to protect the heart has attracted significant attention. Mitochondrial damage is a well known consequence of heart ischemia, and many cardioprotective drugs are targeted to this organelle.¹⁻³ Ischemia followed by reperfusion leads to increases in intracellular Ca^{2+} levels and oxidative stress, which promotes the oxidation of inner mitochondrial membrane proteins, resulting in non-selective permeabilization of this membrane. This process is known as the mitochondrial permeability transition.^{4,5} Inhibition of the permeability transition during reperfusion results in substantial prevention of structural cardiac damage and improvements of cardiac function.^{2,3,6,7}

In addition to undergoing damage during ischemia, mitochondria have been uncovered as important sites for signaling processes related to ischemia and myocardial protection. Ischemic preconditioning, a protocol in which short periods of ischemia protect against subsequent longer damaging ischemic periods,⁸ involves changes in mitochondrial reactive oxygen species release and ion transport.^{2,9-11} More specifically, activation of ATP-sensitive K^+ channels in mitochondria ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) is a necessary step for cardioprotection promoted by ischemic preconditioning.^{12,13} $\text{MitoK}_{\text{ATP}}$ activation is also necessary for cardioprotection promoted by adenosine, respiratory chain inhibitors and some anesthetics.^{11,14} Adenosine has previously been shown to activate a protein kinase C-dependent pathway that leads to enhanced $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ activity and cardioprotection.¹⁴⁻¹⁷

Here, we tested the possible cardioprotective effects of PD153035, a 4-anilinequiazoline derivative developed as a tyrosine kinase inhibitor.¹⁸ 4-anilinequiazoline derivatives also have potent effects as adenosine kinase inhibitors,¹⁹ and may thus be strong candidates for cardioprotective agents.^{19,20} We found that PD153035 is a potent cardioprotective agent in perfused rat hearts and cardiac HL-1 cells. Interestingly, we demonstrate that cardioprotection by PD153035 is associated with $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ activation, and

provide evidence that this drug is a direct agonist of this channel, effective at very low concentrations and under conditions in which other known activators are ineffective.

2. Materials and Methods

2.1. *Materials and laboratory animals*

All reagents used were of analytical grade or better, and deionized water was used for all aqueous solutions. PD153035 [4-*N*-(3'-bromophenylamino)-6,7-dimethoxyquinazoline hydrochloride] (> 99% purity) was synthesized as previously described.²¹

Male Wistar rats were obtained from the UNICAMP Central Animal Breeding Facilities (Campinas, Brazil). Protocols used were approved by the local Committee for Ethics in Animal Research, and conformed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

2.2. *Isolated heart preparations*

Male Wistar rats weighing 200-250 g were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg i.p.) and placed on a temperature-controlled surgical table. After injection of heparin sodium (500 U/kg i.v.), hearts were removed,²² and the aorta was cannulated with a 20-gauge catheter positioned ~2 mm above the coronary ostia. Hearts were perfused with HEPES buffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 6 mM glucose, 2 U/L insulin, 0.0001% xylocaine, 1000 U/L heparin and 20 mM HEPES, pH 7.4) bubbled with 100% O₂ at a constant pressure of 70 mmHg, at 37°C. A constant flow rate of 10 mL/min was maintained. Where indicated, PD153035 was added to the perfusion buffer and present during the full perfusion protocol, from the stabilizing period until the end of the reperfusion. Left ventricular diastolic pressure was kept constant at 5 mmHg and continuously monitored (WINDAQ) through a water-filled latex balloon inserted into the lumen of the left ventricle via the left atrium. The distal end of the balloon-attached catheter

was connected to a pressure transducer for intraventricular pressure monitoring. Ventricular function was determined from left ventricular pressure measurements.

2.3. Cell cultures

Murine atrial HL-1 cells were developed and kindly donated by Prof. William C. Claycomb (Louisiana State University, New Orleans, LO, USA). These cells maintain their cardiac phenotype during extended passages, present ordered myofibrils, cardiac-specific junctions and several voltage-dependent currents that are characteristic of a cardiac myocyte phenotype.²³ Furthermore, HL-1 cells present conserved preconditioning mechanisms dependent on protein kinase C and K⁺ channel activation²⁴ and ischemic damage dependent on the mitochondrial permeability transition.⁷ For routine growth, HL-1 cells were maintained in T-75 flasks at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in Claycomb medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) supplemented with 0.1 mM norepinephrine, 100 U/mL and 100 µg/mL penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine and 10% fetal bovine serum. Experiments were conducted at 100% confluence, after trypsinization and resuspension in a standard buffer (pH = 7.4) containing (in mmol/L): NaCl, 137; Hepes, 5; glucose, 22; taurine, 20; creatine, 5; KCl, 5.4; MgCl₂, 1; sodium pyruvate, 5 and CaCl₂, 1.^{7,25}

2.4. Simulated ischemia/reperfusion (cyanide/aglycemia) in cultured HL-1 cells

Ischemia was simulated by metabolic inhibition and substrate deprivation using 500 µM potassium cyanide and 2 mM 2-deoxyglucose, added to standard buffer devoid of glucose and pyruvate. HL-1 myocytes were incubated under cyanide/aglycemia during 60 min followed by 5 min centrifugation and re-suspension of the cell pellet in control buffer for simulated reperfusion. Where indicated, 10 nM PD153035, 0.05% DMSO and/or 60 µM 5HD were present during the 20 min pre-incubation period before cyanide/aglycemia.

Control HL-1 myocytes were incubated with standard buffer solution the entire experimental period, and submitted only to the centrifugations in order to ensure that all cells undergo equal mechanical damage.^{7,25}

2.5. Cell viability

Cell viability was assessed by relative fluorescence of 50 μ M ethidium bromide (Sigma-Aldrich) using a Hitachi F4500 spectrofluorometer at excitation and emission wavelengths of 365 and 580 nm, respectively.²⁶ Cells were permeabilized with 0.005% digitonin at the end of the each experiment to promote 100% cell permeabilization. The auto-fluorescence of ethidium bromide was subtracted from total fluorescence in the presence of cells, ethidium bromide or digitonin. Data are expressed as the percentage of total cells.^{7,25}

2.6. Isolation of rat heart mitochondria

Heart mitochondria were isolated from male Wistar rats as described by Kowaltowski *et al.*²⁷ Mitochondria were kept over ice until the experiments were initiated. To ensure mitoK_{ATP} activity and its pharmacological regulation, all experiments using isolated mitochondria were conducted within 1 h of isolation.

2.7. Oxygen uptake measurements

Oxygen consumption was measured in a 1.4 mL temperature controlled vessel equipped with a magnetic stirrer, using a Clark-type electrode (Yellow Spring Instruments Company). Mitochondria were incubated in medium (37°C) containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM KH₂PO₄ and 0.4 mM EGTA. Respiratory chain

activity was maintained using a mixture of NAD-linked substrates (malate, glutamate, α -ketoglutarate and pyruvate, 1.25 mM each).

2.8. Mitochondrial Ca^{2+} transport

Variations in medium free Ca^{2+} concentrations were examined by measuring changes in the absorbance spectrum of arsenazo III (40 μM) using an SLM Aminco DW-2000 spectrophotometer (SLM Instruments, Inc., Urbana, USA) set at the 675–685nm wavelength pair.²⁸

2.9. 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 equipped with continuous stirring at 37°C. Swelling rates of freshly isolated mitochondria were measured soon after their addition to K^+ -rich, hyposmotic buffers. This procedure allows for a magnified measurement of K^+ uptake rates due to prior K^+ depletion during the mitochondrial isolation procedure.²⁷

2.10. Data analysis

Experiments depict typical traces or averages $\pm$ standard errors of the mean from at least 3 identical repetitions using different preparations. Data were compared by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test performed by OriginPro 7.5 SRO (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). When one parameter was compared between two groups, Student's t-test was used.

3. Results

Perfused rat hearts were pre-treated with different concentrations of PD153035 and submitted to 40 min ischemia followed by reperfusion. **Figs. 1A-D** show representative left ventricular pressure measurements in these perfused hearts. Upon global ischemia the contractile function of the isolated rat hearts ceased within a few cycles (**Panel A**). Following the reperfusion, spontaneous beating is reassumed but with increases in diastolic pressures and decreased systolic performance as indicated by the marked reduction in the developed pressure. On the other hand, hearts pre-treated with increasing PD153035 concentrations (10 pM, **Panel B**; 1 nM, **Panel C** or 100 nM, **Panel D**) presented significantly less increases in the diastolic pressure and reductions in the systolic performance. **Figs. 1E-F** shows the average left ventricular developed pressures (**Panel E**) and diastolic pressures (**Panel F**) in hearts submitted to ischemia/reperfusion in the presence of 10 pM ($\blacktriangle$), 1 nM ($\circ$) or 100 nM PD153035 ($\blacklozenge$). Compared to controls ($\square$), PD153035 treatment strikingly improved cardiac function, with a maximal effect observed at 1 nM.

The cardioprotective effects of PD153035 were confirmed using a cultured cell model involving murine cardiac HL-1 cells.^{23,25} In these cells, metabolic inhibition promoted by treatment with cyanide and 2-deoxyglucose, followed by return to control conditions, mimics cardiac ischemia/reperfusion (**Fig. 2A**, $\diamond$). Indeed, cell death occurs predominantly after the return of metabolic activity (the simulated reperfusion period which begins where represented by the second arrow).²⁵ The presence of 10 nM PD153035 in the preincubation media completely abrogated cell death promoted by cyanide/aglycemia in cardiac HL-1 cells ($\blacktriangle$), while an equal quantity of the compound's solvent, DMSO, had no protective effect ($\blacksquare$).

Under these conditions, HL-1 cell death is dependent on the induction of the permeability transition, a Ca^{2+} -induced non-selective inner mitochondrial

permeabilization.^{4,5,7} In order to verify if inhibition of mitochondrial permeability transition was involved in the cardioprotective effects of PD153035, we tested if the compound could inhibit this process in isolated rat heart mitochondria (**Fig. 3**). Isolated mitochondria are able to take up large quantities of Ca^{2+} , followed by release of this ion due to non-selective permeabilization (*line a*). The presence of the permeability transition inhibitor cyclosporin A prevents Ca^{2+} release without affecting uptake (*line b*). On the other hand, PD153035 did not inhibit either Ca^{2+} uptake or release at nanomolar (*lines c-f*) or micromolar concentrations (up to 40 μM , results not shown).

Since mitochondria are intimately involved in ischemic cardioprotection^{1-3,6,7,11} we also investigated if PD153035 affected respiration and oxidative phosphorylation in these organelles (**Table I**). We found that nanomolar PD153035 concentrations did not affect mitochondrial respiratory rates in the presence (state 3) or absence (state 4) of oxidative phosphorylation. PD153035 also did not affect ATP synthesis, as determined by the lack of change in respiratory control and ADP/O ratios.

An important phenomenon involved in cardioprotection in both ischemic/reperfused hearts and cyanide-treated/aglycemic cardiomyocytes is the activation of mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$).^{2,29} Indeed, we found that cytoprotection promoted by PD153035 could be completely abrogated by $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ inhibitor 5-hydroxydecanoate (5HD), which had no effect on the survival of control cells or cyanide/aglycemic cells not treated with PD153035 (**Fig. 2B**). This finding leads to the hypothesis that PD153035 could activate $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. In order to test this possibility, we added PD153035 directly to isolated mitochondria and followed organellar swelling due to K^+ uptake. Under these conditions, typical $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ agonists such as diazoxide (DZX) reverse ATP-inhibited mitochondrial swelling in K^+ media, in a manner inhibited by 5HD (**Fig. 4B**). Interestingly, PD153035 partially reversed the inhibitory effect of ATP on mitochondrial swelling (see **Fig. 4A** for typical traces and **4B** for averages). More strikingly, PD153035 increased swelling under control conditions in K^+ , but not Li^+ , media (**Fig. 5B**). This indicates that PD153035

increases overall mitochondrial ATP-sensitive K^+ transport activity. The activation was prevented by mitoK_{ATP} inhibitor 5HD (**Fig. 5B**), which does not affect swelling in the absence of PD153035 (not shown). The equivalent concentration of PD153035 solvent DMSO (0.05%) had no significant effect on mitochondrial swelling (not shown).

4. Discussion

We demonstrate here that the 4-anilinoquinazoline derivative PD153035 is a potent cardioprotective agent capable of preventing reperfusion injury when used in the nanomolar concentration range (**Fig. 1**). Furthermore, nanomolar concentrations of PD153035 were capable of completely preventing cardiac HL-1 cell death promoted by metabolic inhibition followed by a return of oxidative metabolism (**Fig. 2**), a situation in which cellular damage occurs through mechanisms similar to those found in ischemia/reperfusion.^{7,25}

Cytoprotection by PD153035 was completely reversed by 5HD (**Fig. 2B**), an antagonist of mitoK_{ATP} channels, well known mediators of ischemic cardioprotection promoted by preconditioning or other known cardioprotective drugs.^{2,11} In fact, when tested in isolated mitochondria, PD153035 directly activated K⁺ uptake in an ATP-sensitive, 5HD-inhibited manner (**Fig. 4**). No effects of PD153035 were observed in media in which all K⁺ ions were substituted by Li⁺. Together, these data demonstrate that PD153035 directly activates a K⁺-selective, ATP-sensitive transport typical of mitoK_{ATP}. On the other hand, we found no significant effect of PD153035 on oxidative phosphorylation (**Table I**) or mitochondrial Ca²⁺ uptake and retention (**Fig. 3**). The direct activation of mitoK_{ATP} by PD153035 can explain cardioprotection by this compound, which may also involve increases of this channel's activity by intracellular signaling events initiated by this compound's inhibitory effect on adenosine kinase and consequent adenosine accumulation,¹⁹ a strongly cardioprotective event.¹⁴⁻¹⁷

MitoK_{ATP} are highly K⁺-selective channels, which promote uptake of this ion down the mitochondrial electrochemical gradient. Transport through these channels is inhibited physiologically by ATP and ADP, and activated by GTP, GDP and UDP.³⁰ Many pharmacological agonists and antagonists for this channel have been studied. In particular, diazoxide (DZX) is widely used as a mitoK_{ATP} agonist due to its selectivity toward

mitochondrial, and not plasma membrane, ATP-sensitive K^+ channels.²⁹ DZX is capable of overcoming the inhibitory effect of ATP or ADP on $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. Similarly, 5-hydroxydecanoate (5HD) is a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ antagonist with no measurable effect on sarcolemal K^+ transport.¹³ 5HD prevents the agonistic effect of DZX and other physiological and pharmacological $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ activators, but does not inhibit channel activity in the absence of ATP or ADP.

The mechanisms through which $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ promotes ischemic cardioprotection are complex and still remain to be completely understood. MitK_{ATP} activity is capable of preventing loss of cellular high energy phosphates, resulting in a more favorable energetic state.^{31,32} The channel activation also prevents excessive Ca^{2+} uptake in mitochondria exclusively during ischemia, when this uptake is supported by ATP hydrolysis by the ATPsynthase.^{31,33,34} This inhibition of Ca^{2+} uptake, in association with a decrease in mitochondrial oxidative stress also promoted by $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ activity, results in prevention of mitochondrial permeability transition and ensuing loss of organellar functionality.^{2,7}

Although DZX is a useful tool for *in vitro* $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ studies, this drug has limited applicability for *in vivo* myocardial protection, since its effect on pancreatic islet K^+ channel transport results in decreases in insulin secretion.³⁵ Furthermore, a desirable $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ agonist should be active at very low concentrations, preferably less than the micromolar range necessary for DZX to activate $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$.

The direct activation of $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ by PD153035 in isolated mitochondria was a surprising finding of the present study, since this compound bears no strong structural resemblance with any known $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ agonist.^{2,11} On the other hand, PD153035 is a kinase inhibitor due to its ability to prevent ATP binding to these enzymes.¹⁸ Since $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ is also inhibited by ATP and ADP, it is tempting to speculate that PD153035 activates the channel by interfering with binding of these nucleotides to the protein. Interestingly, PD153035 is, to our knowledge, the only compound capable of activating mitochondrial K^+ uptake in the absence of added ATP or ADP, possibly due to displacement of endogenous adenine nucleotides. This unique characteristic may render the drug more effective as an

agonist. Another desirable characteristic of PD153035 is that its activating effects were observed in the low nanomolar range.

4-anilinoquinazoline derivatives are currently believed to be viable clinical tools for control of proliferative diseases, and act by inhibiting the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases.³⁶⁻³⁸ Quinazoline derivatives also act as antagonists of α -adrenergic receptors and may be used as anti-hypertensives.³⁹ Our results uncover another potential application for the derivative PD153035, as a powerful protective agent in ischemic heart disease. Furthermore, our results demonstrate that this compound is capable of substantially activating mitochondrial ATP-sensitive K^+ uptake. Thus, PD153035 may be useful not only as a cardioprotective agent but also as a pharmacological tool to evaluate characteristics and consequences of $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ activity.

Funding

Supported by Brazilian funding agencies *Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP)* and *Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq)*. R.A.C. and R.M.M. are graduate students supported by CNPq and FAPESP fellowships, respectively.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the expert technical support of Edilene S. Santos and Elisangela J. Gomes. HL-1 cells were kindly donated by Prof. William Claycomb (Louisiana State University, New Orleans, LO, USA).

Conflict of Interests

Under an agreement between the *Universidade Estadual de Campinas* and *Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda* (Itapira, Brazil), R. M. M., S. A. R. and K. G. F. are entitled to a share of sales royalty from Cristália, which develops compounds derived from 4-anilinequinazolines with adenosine-kinase inhibitor properties for cardioprotective purposes. All other authors declare no conflicting interests.

References

- [1] Marozin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2003; **420**: 222-236.
- [2] Facundo HT, Fornazari M, Kowaltowski AJ. Tissue protection mediated by mitochondrial K⁺ channels. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1762**: 202-212.
- [3] Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1767**: 1007-1031.
- [4] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; **341**: 233-249.
- [5] Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001; **495**: 12-15.
- [6] Duchen MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1993; **27**: 1790-1794.
- [7] Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. *J Bioenerg Biomembr* 2005; **37**: 75-82.
- [8] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; **74**: 1124-1136.
- [9] Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998; **273**: 18092-1808.
- [10] Gross GJ, Peart JN. K_{ATP} channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **285**: H921-H930.

- [11] Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1606**: 1-21.
- [12] Auchampach JA, Grover GJ, Gross GJ. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res* 1992; **26**: 1054-1062.
- [13] Jabůrek M, Yarov-Yarovoy 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.
- [14] Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001; **52**: 25-39.
- [15] Carroll R, Yellon DM. Delayed cardioprotection in a human cardiomyocyte-derived cell line: the role of adenosine, p38MAP kinase and mitochondrial K_{ATP}. *Basic Res Cardiol* 2000; **95**: 243-249.
- [16] Minners J, van den Bos EJ, Yellon DM, Schwalb H, Opie LH, Sack MN. Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2000; **47**: 68-73.
- [17] Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, Marbán E. Adenosine primes the opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: a key step in ischemic preconditioning? *Circulation* 2000; **102**: 800-805.
- [18] Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, Ambroso LA, Nelson JM, Leopold WR, Connors RW, Bridges AJ. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* 1994; **265**: 1093-1095.

- [19] Franchini KG, Saad MJA, Rittner R, Marin RM, Rocco SA. Compounds derived from 4-anilinequinazolines with adenosine-kinase inhibitor properties. *World Intellectual Property Organization*; Patent WO 2005/085213 A1 (2005).
- [20] Smolenski RT, Raisky O, Slominska EM, Abunasra H, Kalsi KK, Jayakumar J, Suzuki K, Yacoub MH. Protection from reperfusion injury after cardiac transplantation by inhibition of adenosine metabolism and nucleotide precursor supply. *Circulation* 2001; **104** (12 Suppl 1): I246-I252.
- [21] Rocco SA, Barbarini JE, Rittner R. Syntheses of some 4-anilinoquinazoline derivatives. *Synthesis* 2004; **3**: 429-435.
- [22] Domingos PP, Fonseca PM, Nadruz W Jr, Franchini KG. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **282**: H556-H564.
- [23] Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 2979-2984.
- [24] Seymour EM, Wu SY, Kovach MA, Romano MA, Traynor JR, Claycomb WC, Bolling SF. HL-1 myocytes exhibit PKC and K_{ATP} channel-dependent delta opioid preconditioning. *J Surg Res* 2003; **114**: 187-194.
- [25] Facundo HT, Carreira RS, de Paula JG, Santos CC, Ferranti R, Laurindo FR, Kowaltowski AJ. Ischemic preconditioning requires increases in reactive oxygen release independent of mitochondrial K^+ channel activity. *Free Radic Biol Med* 2006; **40**: 469-479.
- [26] Karsten U. Fluorometric estimation of dead cells in cell suspensions. *Experientia* 1980; **36**: 263-264.

- [27] Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K^+ channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; **280**: H649-H657.
- [28] Scarpa A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. *Methods Enzymol* 1979; **56**: 301-338.
- [29] Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 1997; **81**: 1072-1082.
- [30] Garlid KD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K^+ cycle. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1606**: 23-41.
- [31] Belisle E, Kowaltowski AJ. Opening of mitochondrial K^+ channels increases ischemic ATP levels by preventing hydrolysis. *J Bioenerg Biomembr* 2002; **34**: 285-298.
- [32] Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, Seetharaman S, Paucek P, Boudina S, Thambo JB, Tariosse L, Garlid KD. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP- sensitive K^+ channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **283**: H284-295.
- [33] Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marbán E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 2001; **89**: 891-898.
- [34] Ishida H, Hirota Y, Genka C, Nakazawa H, Nakaya H, Sato T. Opening of mitochondrial K_{ATP} channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circ Res* 2001; **89**: 856-858.
- [35] Doyle ME, Egan JM. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev* 2003; **55**: 105-131.

- [36] Fry DW. Inhibition of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases as an approach to cancer chemotherapy: progression from reversible to irreversible inhibitors. *Pharmacol Ther* 1999; **82**: 207-218.
- [37] Ciardiello F. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs* 2000; **60 Suppl 1**: 25-32.
- [38] Rewcastle GW, Denny WA, Showalter HD. Synthesis of 4-(phenylamino)pyrimidine derivatives as ATP-competitive protein kinase inhibitors with potential for cancer chemotherapy. *Curr Org Chem* 2000; **4**: 679-706.
- [39] Minarini A, Budriesi R, Chiarini A, Leonardi A, Melchiorre C. Search for alpha(1)-adrenoceptor subtypes selective antagonists: Design, synthesis and biological activity of cystazosin, an alpha(1D)-adrenoceptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; **8**: 1353-1358.

Figure Legends

Fig. 1 - PD153035 improves cardiac function after ischemia/reperfusion.

Panels A-D: Perfused rat hearts were submitted to left ventricular pressure measurements after 15 min stabilizing perfusion, as described in the Methods section. PD153035 was present at 10 pM, 1 nM or 100 nM (**Panels B, C and D**, respectively) during the full experimental period. **Panel A** shows hearts in the absence of PD153035. After 10 min, the hearts were submitted to 40 min ischemia by interruption of coronary flow, followed by 35 min reperfusion. Data are representative traces of 3 similar repetitions. LVP: Left ventricular pressure.

Panels E-F: Averages $\pm$ SEM of 3 experiments conducted under the conditions of Panels A-D. DLVP: developed left ventricular pressure; DP: diastolic pressure. Values for 10 pM, 1 nM and 100 nM PD153035 concentrations were significantly different from controls at 85 min ($p < 0.05$).

Fig. 2 - PD153035 protects against cardiac cell damage promoted by cyanide/aglycemia.

Panel A: Cardiac HL-1 cells were preincubated in standard media (see Materials and Methods) containing 10 nM PD153035 ($\blacktriangle$), the equivalent concentration of PD153035 solvent DMSO (0.05%; $\blacksquare$) or no further additions ($\circ$, $\diamond$). Where indicated, all cells except controls ($\circ$) were treated with 10 mM K-cyanide (CN) and 2 mM 2-deoxyglucose (2-DG). All cells were submitted to equal centrifugations and media changes where indicated by the arrows.

Panel B represents average cellular viability at 140 min. HL-1 cells were treated as described in Panel A. Where indicated, cells were preincubated in the presence of 60 μ M

5-hydroxydecanoate (5HD) and/or 10 nM PD153035 (PD). Data represent average cell viability (see Materials and Methods) of 5 experiments $\pm$ SEM.

* $p < 0.05$ relative to control and "CN + 2-DG + PD153035" at the respective time point. # $p < 0.05$ relative to "CN + 2-DG" at the respective time point.

Fig. 3 - PD153035 does not decrease mitochondrial Ca^{2+} uptake, nor prevent permeability transition. Isolated rat heart mitochondria (RHM; 0.5 mg/mL) were incubated in 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 2.5 mM P_i , 40 μM arsenazo III, 1.25 mM malate, 1.25 mM glutamate, 1.25 mM pyruvate and 1.25 mM α -ketoglutarate, pH 7.2 (KOH). Ca^{2+} was added where indicated in four consecutive boluses of 10 μM , totaling 40 μM . *Line a* represents a control experiment with no further additions. *Line b* represents an experiment conducted in the presence of 1 μM cyclosporin A. *Lines c-f* represent experiments conducted in the presence of 1 nM, 10 nM, 30 nM and 100 nM PD153035, sequentially. Data are representative traces of 3 similar repetitions.

Fig. 4 - PD153035 increases mitochondrial ATP-sensitive K^+ transport. Isolated rat heart mitochondria (RHM; 0.5 mg/mL) were suspended in 100 mM KCl, 5 mM HEPES, 2 mM P_i , 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM EGTA, 1 $\mu\text{g/mL}$ oligomycin and 10 mM succinate, pH 7.4 (KOH), and light scattering changes were recorded over the first 40 seconds to follow swelling rates. Where indicated, 200 μM ATP, 10 nM PD153035, 20 μM DZX and/or 60 μM 5-HD were present. **Panel A** depicts representative traces, while **Panel B** shows average $\pm$ SEM swelling rates relative to control of 8 experimental repetitions. The black column represents an experiment in which all K^+ salts were substituted by Li^+ . * $p < 0.01$ versus control; # $p < 0.01$ versus PD.

Table I**PD153035 does not change mitochondrial respiratory parameters**

Rat heart mitochondria were incubated in 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 2.5 mM K-P_i, 0.4 mM EGTA, 1.25 mM malate, 1.25 mM glutamate, 1.25 mM pyruvate and 1.25 mM α -ketoglutarate, pH 7.2 (KOH), in the presence or absence of 10 nM PD153035, as indicated. ADP (250 μ M) and 1 μ g/mL oligomycin were added to achieve state 3 and 4 respiratory rates, respectively. Respiration was measured using a Clark-type electrode, and respiratory parameters were calculated as described in Materials and Methods. None of the values obtained in the presence of PD153035 are significantly different from controls (three independent preparations, experiments performed in triplicate).

	Control	PD153035
State 3 respiratory rate (nmols O ₂ · mg protein ⁻¹ · min ⁻¹)	53.49 ± 2.53	53.76 ± 2.47
State 4 respiratory rate (nmols O ₂ · mg protein ⁻¹ · min ⁻¹)	6.92 ± 0.24	6.47 ± 0.22
Respiratory control ratio (state 3/state4)	7.72 ± 0.40	8.31 ± 0.27
ADP/O ratio	2.31 ± 0.09	2.32 ± 0.09

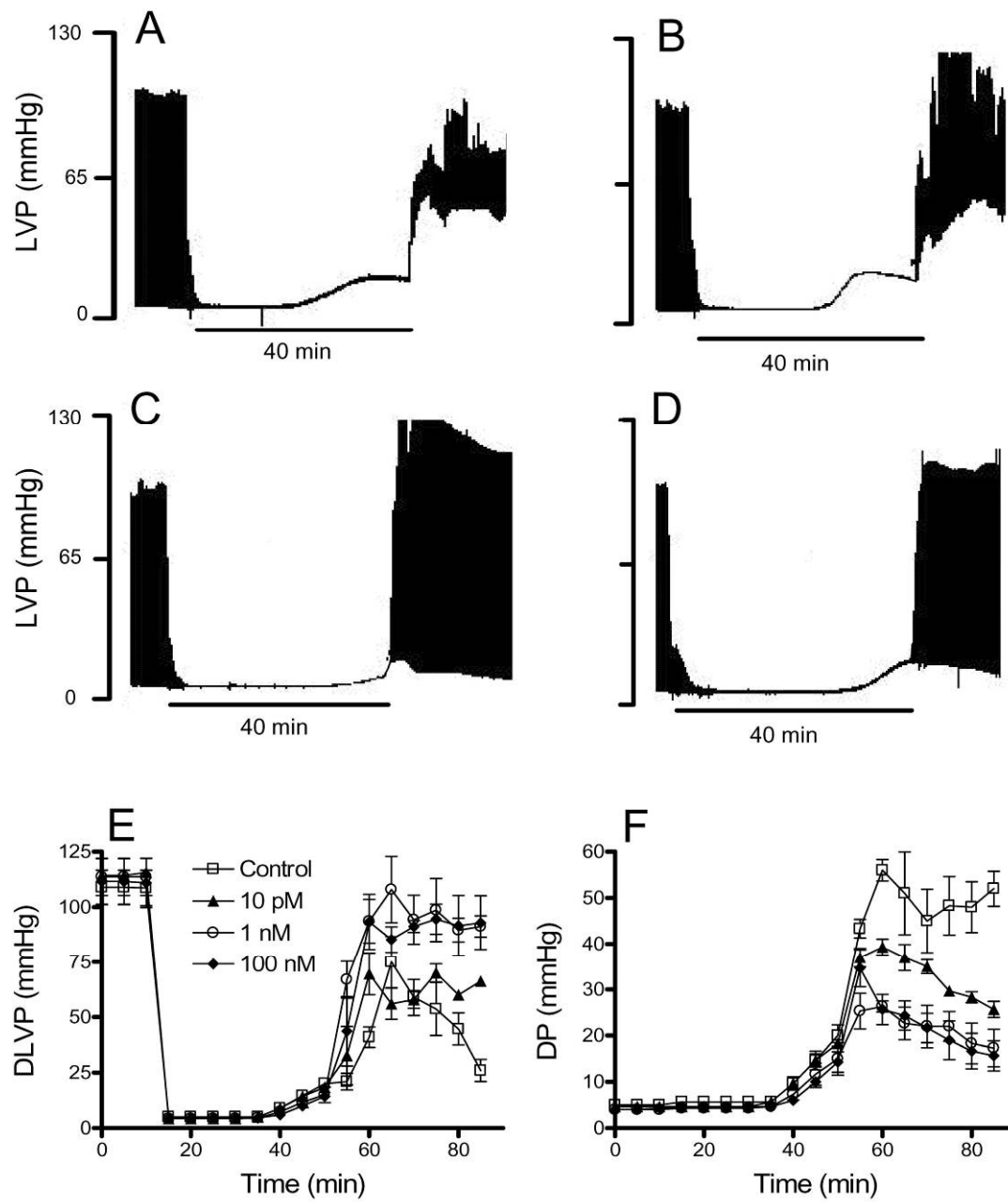


Fig. 1 - Cavalheiro et al., 2007

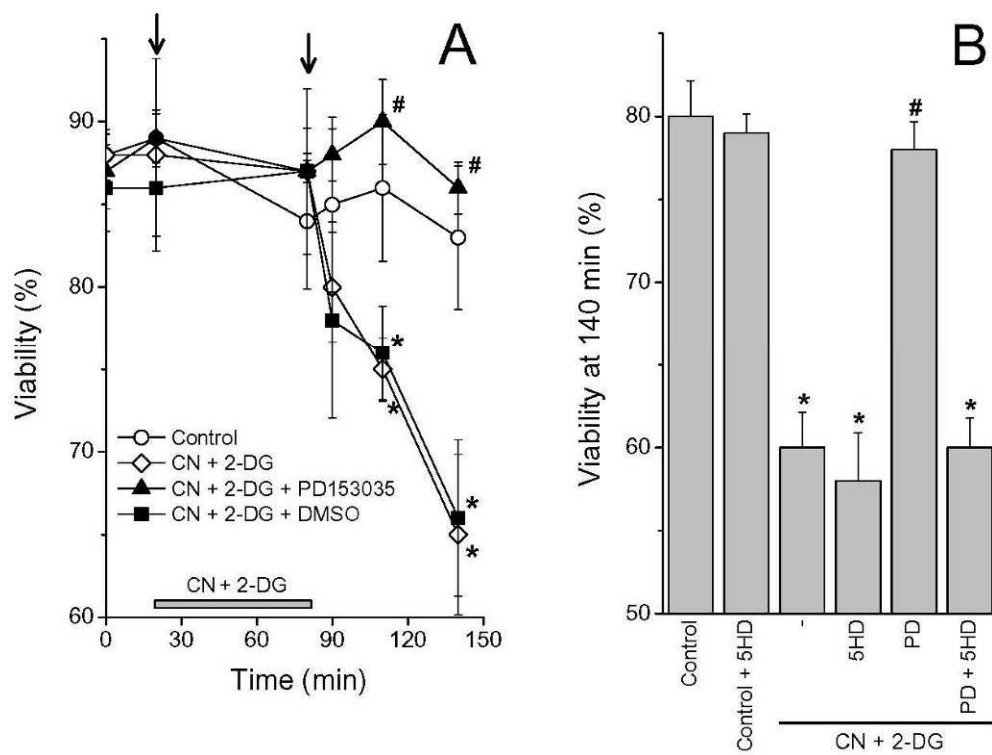


Fig. 2 - Cavalheiro et al., 2007

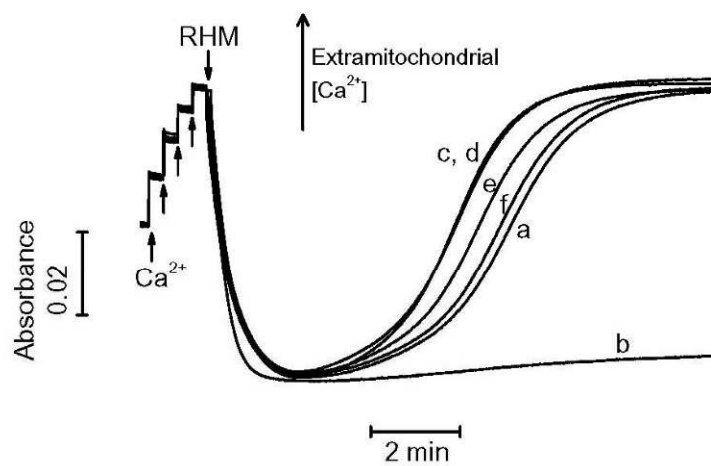


Fig. 3 - Cavalheiro et al., 2007

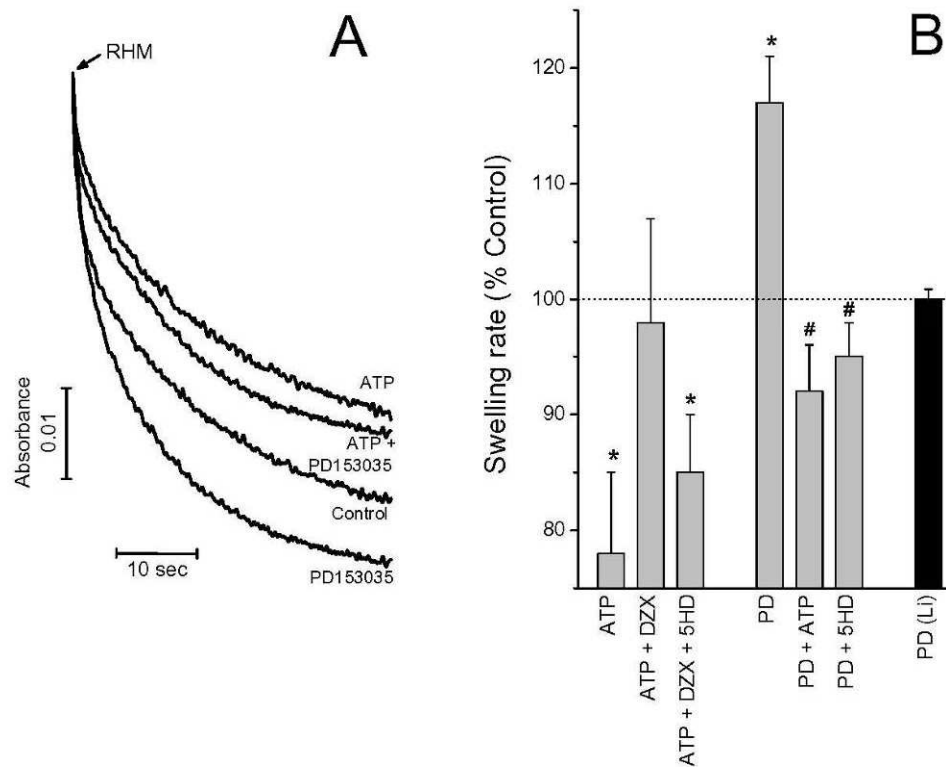


Fig. 4 - Cavalheiro et al., 2007

