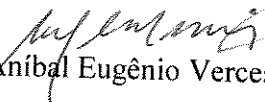


JESUS ANTONIO VELHO

**EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA
GENÉTICA E ESTATINAS SOBRE A
FUNÇÃO MITOCONDRIAL**

Este exemplar corresponde à versão final da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de Biologia Molecular Celular e do Desenvolvimento do (a) aluno (a) **JESUS ANTONIO VELHO**
Campinas, 27 de fevereiro de 2007.


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

CAMPINAS

2007

JESUS ANTONIO VELHO

**EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA
GENÉTICA E ESTATINAS SOBRE A
FUNÇÃO MITOCONDRIAL**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia
estrutural, celular e molecular.*

ORIENTADOR: PROF. DR. ANÍBAL EUGÊNIO VERCESI

CAMPINAS

2007

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

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

DADE BC
CHAMADA: _____
TIUNICAMP
EX. _____
MBO BCCL 73539
OC 26.145-07
D X
ECO 11.00
A 3105107
ID 417544

V543e

V543e

Velho, Jesus Antônio

Efeitos da hipercolesterolemia genética e estatinas sobre a função mitocondrial / Jesus Antônio Velho. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Aníbal Eugênio Vercesi

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

1. Mitocôndria. 2. Hipercolesterolemia. 3. Inibidores da Hidroximetilglutaril-CoA Redutases. I. Vercesi, Aníbal Eugênio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Effects of genetic hypercholesterolemia and statins on mitochondrial functions

Keywords: • Mitochondria

- Hypercholesterolemia
- Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors

Área de concentração : Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento

Titulação: Doutorado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora: Prof Dr Aníbal Eugênio Vercesi

Prof Dr Carlos Curti

Profa. Dra. Iseli Lourenlo Nantes

Prof Dr Wilson Nadruz Júnior

Profa. Dra. Lúcia Nassi Castilho

Data da defesa: 27-02- 2007

Banca examinadora da tese de Doutorado

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

Professor Doutor Carlos Curti

Professora Doutora Iseli Lourenço Nantes

Professor Doutor Wilson Nadruz Júnior

Professora Doutora Lúcia Nassi Castilho

Professor Doutor Aníbal Eugênio Vercesi

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

Data: 27/02/2007

200733218

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 pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de Campinas (FAEPEX-UNICAMP).

DEDICATÓRIA

*Aqueles que sempre estiveram ao meu
lado durante esta trajetória, dando
força, carinho e incentivo:
Meus pais, Jesus e Isabel.*

Ao Prof. Dr. Anibal E. Vercesi, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pela orientação e por ter proporcionado, sempre, condições excelentes de trabalho.

Ao Prof. Dr. Roger F. Castilho pelo apoio na análise de resultados e protocolos experimentais e por sugestões a esta tese.

À Profª. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira pelo incentivo e pela ajuda cedida todas as vezes que precisei.

Aos colegas de laboratório Anna Maria, Ana Luiza, Bruno, Camila, Dani, Evelise, Fernando, Giovanna, Karina, Leandro, Leda, Luciane, Natália, Renata, Sandra e Solange, pela companhia, amizade, descontração, ajuda, festas, ...

Às técnicas, Edilene e Elisângela, pelo isolamento de mitocôndrias, preparo de algumas soluções e principalmente pelo companheirismo.

Aos peritos Luiz Antonio Ribeiro da Silva e Marcos Salvador Dias, por terem possibilitado a montagem de escalas flexíveis de trabalho, tornando possível o término desta tese.

Ao Dr. Jiri Borecký e a Dra. Márcia M. Fagian por estarem sempre à disposição, ajudando a resolver os problemas deste período.

A Deus, nome pelo qual trato esta força divina, a quem devo tudo que sou hoje.

E a todos, não citados nominalmente aqui, que direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

*"Pedras no caminho? Guardo todas,
um dia vou construir um castelo..."*

Fernando Pessoa

	PÁG.
RESUMO	<i>xxvii</i>
ABSTRACT	<i>xxxi</i>
1- INTRODUÇÃO	35
MITOCÔNDRIAS	37
Estrutura.....	37
A cadeia de transporte de elétrons.....	37
Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema antioxidante mitocondrial.....	40
Transição de permeabilidade mitocondrial.....	42
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL EM DISLIPIDEMIAS	46
COLESTEROL E ATEROSCLEROSE	46
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA	48
ESTATINAS	49
2- OBJETIVOS	53
3- MATERIAIS E MÉTODOS	57
Reagentes.....	59
Animais.....	59
Dosagem de colesterol.....	59
Tratamento de camundongos com lovastatina.....	60
Isolamento de mitocôndrias de fígado e músculo.....	60
Dosagem de proteína.....	60

Condições experimentais.....	61
Consumo de oxigênio mitocondrial.....	61
Determinação do conteúdo de grupos tiólicos.....	61
Determinação do estado redox de NAD(P).....	62
Níveis de GSH e GSSG.....	62
Determinação da produção de $O_2^{\bullet -}$	62
Determinação da produção de H_2O_2	62
Determinação do potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana mitocondrial com eletrodo de TPP ⁺	63
Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial pelo método da Safranina O.....	64
Medida do inchamento mitocondrial.....	65
Estimativa de atividade do sistema Glutathione Peroxidase/Redutase.....	65
Determinação do conteúdo de grupos carbonilas.....	66
Determinação do conteúdo de isocitrato e seus precursores.....	66
Análises estatísticas.....	66
4- RESULTADOS.....	67
PARTE I- Caracterização do estresse oxidativo mitocondrial em camundongos hipercolesterolêmicos por deficiência do receptor de LDL (LDLR^{-/-}).	69
PARTE II- Efeito do tratamento com estatinas sobre a função mitocondrial.....	80
5- DISCUSSÃO	95
6- CONCLUSÕES	105
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
8 - ANEXOS.....	123

ANT	translocador de nucleotídeos de adenina
AT(D)P	adenosina tri (di)-fosfato
BSA	albumina de soro bovina
C.R.	controle respiratório
CsA	ciclosporina A
CyD	ciclofilina-D
Cyt-c	citocromo c
DTT	ditiotreitól
EGTA	etileno glicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo reduzido
FCCP	carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazone
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDLR ^{-/-}	“knock out” do receptor de LDL
MFC	mitocôndria de fígado de camundongo
MFR	mitocôndria de fígado de rato
MMC	mitocôndria de músculo de camundongo
MnSOD	superóxido dismutase dependente de manganês
Myx	mixotiazol

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)
P _i	fosfato inorgânico
PTPM	poro de transição de permeabilidade mitocondrial
PUFA	ácidos graxos polinsaturados
Rot	rotenona
Succ	succinato
TPM	transição de permeabilidade mitocondrial
TPP ⁺	cloreto de tetrafenilfosfônio
U.a.f.	unidades arbitrárias de fluorescência
UQ	ubiquinona (forma oxidada da coenzima Q)
UQH [•]	radical ânion semiquinona
UQH ₂	ubiquinona (forma reduzida da coenzima Q)
VDAC	canal de ânions voltagem dependente
$\Delta\mu\text{H}^+$	gradiente eletroquímico de prótons
$\Delta\Psi$	potencial elétrico transmembrana
ΔpH	gradiente químico de prótons
O ₂ ^{•-}	radical ânion superóxido

	PÁG.
Figura 1- Versão simplificada da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria.....	39
Figura 2- Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e EROs na membrana mitocondrial interna.....	45
Figura 3- Estrutura química da lovastatina, sinvastatina e pravastatina.....	50
Figura 4- Mecanismo de ação das estatinas na via de síntese do colesterol.....	51
Figura 5- Efeito da catalase sobre a oxidação de NADP(H) em mitocôndrias isoladas de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$	70
Figura 6- Geração de superóxido por mitocôndrias de fígado de camundongos controles e $\text{LDLR}^{-/-}$	71
Figura 7- Liberação de peróxido de hidrogênio por mitocôndrias de camundongos controles e $\text{LDLR}^{-/-}$	72
Figura 8- Estimativa da atividade do sistema glutathiona peroxidase e redutase em mitocôndrias isoladas de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$	74
Figura 9- A razão GSH/GSSG é menor em mitocôndrias de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ quando comparado a camundongos controles.....	75
Figura 10- Consumo de oxigênio mantido por substratos endógenos (Painel A) e com suplementação do meio de reação com isocitrato (Painel B) por mitocôndrias de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ e controles..	77
Figura 11- Conteúdo de isocitrato em mitocôndrias de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$.	78
Figura 12- Concentração de grupos carbonilas em homogenato de fígado de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ e controles.....	79

Figura 13-	Concentração plasmática de colesterol em camundongos LDLR ^{-/-} antes e após o tratamento com lovastatina.....	81
Figura 14-	Mudanças no $\Delta\Psi$ induzidas por adições sequenciais de Ca ²⁺ em mitocôndrias de fígado de camundongos controles e LDLR ^{-/-}	83
Figura 15-	Efeito do tratamento com lovastatina, <i>in vivo</i> , sobre a perda do potencial transmembrânico mitocondrial induzido por Ca ²⁺	84
Figura 16-	Efeito do tratamento com lovastatina, <i>in vivo</i> , sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca ²⁺	85
Figura 17-	Lovastatina induz a perda do potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de músculo de camundongos.....	87
Figura 18-	Colapso do potencial de membrana induzido pela lovastatina, <i>in vitro</i> , em mitocôndrias de fígado de camundongos.....	88
Figura 19-	Colapso do potencial de membrana induzido pela lovastatina, <i>in vitro</i> , em mitocôndrias de fígado de rato.....	89
Figura 20-	Efeito dose-dependente da lovastatina sobre o inchamento mitocondrial.....	90
Figura 21-	Efeito de EGTA, DTT, ADP e catalase sobre o inchamento mitocondrial induzido pela lovastatina.....	92
Figura 22-	Efeito comparativo da lovastatina, pravastatina e sinvastatina sobre o inchamento mitocondrial.....	94
Figura 23-	Modelo proposto para explicar o estado de estresse oxidativo mitocondrial em camundongos hipercolesterolêmicos (LDLR ^{-/-}).....	100

RESUMO

Resultados recentes do nosso grupo demonstram que mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos por deficiência do receptor de LDL (LDLR^{-/-}) apresentam uma baixa capacidade antioxidante em função do alto consumo de NADPH para sustentar elevadas taxas de lipogênese (Oliveira et al., FASEB J. 19: 278-280; 2005). Neste trabalho, o estresse oxidativo mitocondrial dos camundongos LDLR^{-/-} foi caracterizado, mostrando uma diminuição da razão GSH/GSSG e altos níveis de grupos carbonilas protéicos quando comparado com camundongos controles. Não foram encontradas diferenças significativas na atividade do sistema antioxidante glutationa peroxidase/redutase. Catalase exógena preveniu a oxidação espontânea de NAD(P)H endógeno em mitocôndrias isoladas de camundongos LDLR^{-/-}, indicando que esta oxidação é mediada por H₂O₂ gerado pela mitocôndria. A alta taxa de liberação de H₂O₂ por mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} também foi prevenida na presença de rotenona e isocitrato exógeno, os quais mantêm o conteúdo endógeno de NAD(P) completamente reduzido. A nossa hipótese de que altas taxas de lipogênese diminuem a razão NADPH/NADP⁺ devido à redução do conteúdo de substratos ligados ao NADP é suportada pela observação de que o consumo de oxigênio mantido por substratos endógenos foi menor em mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} quando comparado com mitocôndrias controles, mas foi similar na presença de isocitrato exógeno. De fato, os níveis mitocondriais de isocitrato foram significativamente menores em camundongos LDLR^{-/-}.

Na segunda parte do trabalho, nós utilizamos estatinas (inibidores da 3- hidróxi-3- metilglutaril CoA redutase) na tentativa de corrigir o estresse oxidativo observado em camundongos LDLR^{-/-}, mas descobrimos que o tratamento com a lovastatina piora este efeito. Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLR^{-/-} tratados durante 15 dias com doses terapêuticas (100 mg/kg, v.o.) de lovastatina apresentaram uma maior susceptibilidade para desenvolver transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). Em experimentos *in vitro*, lovastatina induziu TPM de forma dose-dependente (10-80 µM) por um mecanismo sensível a ciclosporina A (inibidor de ciclofilina), ditiotreitól (agente redutor), ADP (inibidor do translocador de nucleotídeo de adenina), catalase (redutor de H₂O₂) e EGTA (quelante de cálcio). Em concordância com a inibição do inchamento mitocondrial por ditiotreitól, a lovastatina também diminuiu o conteúdo de grupos tiólicos de proteínas de membrana. Sinvastatina teve efeitos similares a lovastatina

sobre as mitocôndrias; entretanto a pravastatina, uma estatina hidrofílica, apresentou menor capacidade de induzir a TPM. Estes resultados demonstram que estatinas podem atuar diretamente na mitocôndria tanto *in vivo* quanto *in vitro* induzindo transição de permeabilidade, que é um processo envolvido na morte celular.

ABSTRACT

Recent results from our group demonstrated that hypercholesterolemic LDL receptor knockout (LDLR^{-/-}) mice mitochondria possess a lower antioxidant capacity due to a large consumption of reducing equivalents from NADPH to sustain high rates of lipogenesis (Oliveira et al., FASEB J.; 19: 278-280; 2005). In this work, LDLR^{-/-} mice oxidative stress was further characterized by showing a lower mitochondrial GSH/GSSG ratio and a higher liver content of protein carbonyls as compared to control mice. No differences in the activity of the antioxidant enzyme system glutathione reductase/peroxidase was observed. Exogenous catalase prevented the spontaneous oxidation of endogenous NAD(P)H in mitochondria isolated from LDLR^{-/-} mice, indicating that this oxidation is mediated by mitochondrial generated H₂O₂. The higher rate of H₂O₂ release in LDLR^{-/-} mitochondria was also prevented by the presence of exogenous isocitrate and rotenone, which maintain NADP fully reduced. Our hypothesis that high rates of lipogenesis decreases NADPH/NADP⁺ ratio due to a decreased content of NADP-linked substrates is supported by observations that oxygen consumption supported by endogenous substrates was lower in LDLR^{-/-} mice than in control mitochondria, but was similar in the presence of exogenous isocitrate. Indeed, endogenous mitochondrial levels of isocitrate were significantly lower in LDLR^{-/-} mice.

In the second part of this work, we used statins (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors) in an attempt to correct the oxidative stress observed in LDLR^{-/-} mice, but we found that the drug treatment worsened this defect. We report here that liver mitochondria isolated from hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice treated during 15 days with therapeutic doses (100 mg/kg, p.o.) of lovastatin presented a higher susceptibility to develop membrane permeability transition (MPT). In experiments *in vitro*, lovastatin induced MPT in a dose-dependent manner (10-80 μ M) by a mechanism sensitive to cyclosporin A (cyclophilin inhibitor), dithiothreitol (reducing agent), ADP (adenine nucleotide carrier inhibitor), catalase (H₂O₂ reductant) and EGTA (calcium chelator). In agreement with the inhibition of the mitochondrial swelling by dithiothreitol, lovastatin also decreased the content of total mitochondrial membrane protein thiol groups. Simvastatin had similar effects on mitochondria; however, pravastatin, a hydrophilic statin, had a weaker effect in inducing MPT. These results demonstrate that statins can act directly on mitochondria either *in vivo* or *in vitro* inducing permeability transition, which is a process involved in cell death.

1- INTRODUÇÃO

MITOCÔNDRIAS

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 & 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 intermembranar, 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 et al., 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 . É nesta membrana que se encontram os componentes enzimáticos da cadeia respiratória, bem como os transportadores específicos para o ATP, ADP, piruvato, Ca^{2+} e fosfatos (NICHOLLS & 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 fosfolipídeos (SCHLAME et al., 2000).

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.

Normalmente, elétrons provenientes das coenzimas NADH e FADH₂, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos à 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 (UQH₂). 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 UQH₂ é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona (UQH[•]), 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 à citocromo oxidase (complexo IV). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio molecular, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

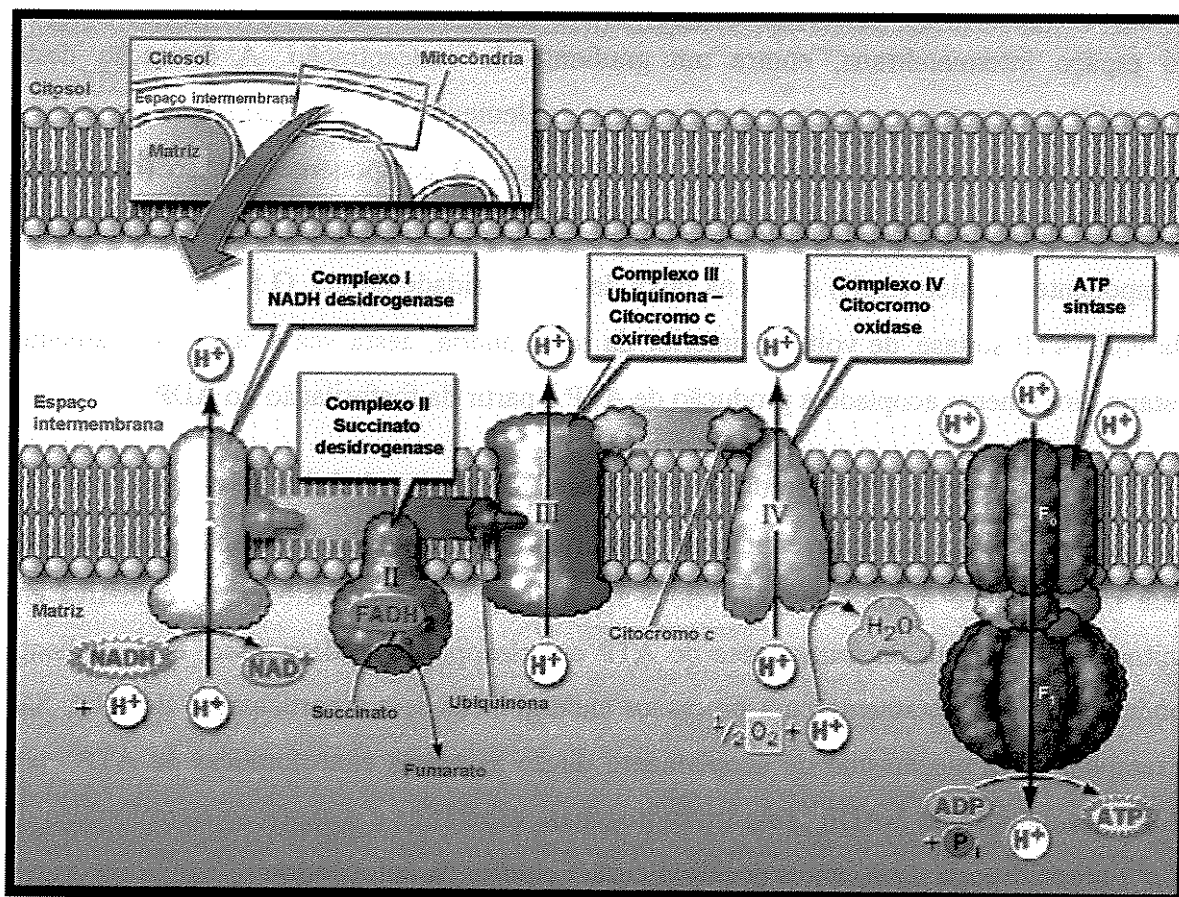


Figura 1- Versão simplificada da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria (LEHNINGER, 2000).

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

Segundo MITCHELL (1961), a passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox 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.

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 $NADP^+$ pela transidrogenase específica e a captação eletroforética de Ca^{2+} que transporta duas cargas positivas para o interior da mitocôndria.

Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema antioxidante mitocondrial

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).

Quando se leva em conta a complexidade do processo de transferência de elétrons através da cadeia respiratória, é surpreendente que somente de 0,02 a 2% dos elétrons que entram na cadeia respiratória não sejam usados para reduzir O_2 à H_2O . A maioria destes elétrons “perdidos” se combina com o oxigênio em passos intermediários da

cadeia respiratória, promovendo a sua redução monoeletrônica, gerando assim radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (BOVERIS & CHANCE, 1973; LIU, 1997; TURRENS, 1997).

O $O_2^{\bullet-}$ pode ser gerado nos complexos I, II e III da cadeia respiratória (TURRENS, 2003). Há evidências recentes que a geração de $O_2^{\bullet-}$ também é promovida por desidrogenases da matriz como piruvato e α -cetoglutarato desidrogenases (STARKOV et al., 2004; TRETTER & ADAM-VIZI, 2004).

Pelo fato da produção de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial ser um processo contínuo, ainda sob condições fisiológicas, essas organelas desenvolveram um sistema complexo de defesa antioxidante. A mitocôndria contém uma superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) similar à 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, que foi evidenciada em mitocôndrias de coração de rato (RADI et al., 1991), e tiorredoxina peroxidase (KOWALTOWSKI et al., 1998). As mitocôndrias apresentam também glutathione peroxidase, capaz de remover o H_2O_2 utilizando glutathione reduzida como substrato (SIES & MOSS, 1978; ZAKOWSKI & 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 NAD(P) transidrogenase (VERCESI et al., 1997). Alternativamente, H_2O_2 pode gerar $HO^{\bullet}$, que é altamente reativo e citotóxico por clivagem homolítica. A maior parte do $HO^{\bullet}$ gerado, *in vivo*, provém da reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^- + Fe^{3+}$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1992).

Resíduos de metionina de proteínas mitocondriais também parecem fazer parte das defesas antioxidantes da organela. Quando oxidados esses resíduos geram sulfóxido de metionina, o que resultaria em importantes alterações na estrutura e função protéicas (BERLETT & STADTMAN, 1997).

Nas mitocôndrias também ocorre a geração de espécies reativas de nitrogênio, como óxido nítrico, que é relativamente estável, permeável à membrana e está envolvido em várias vias de sinalização celular (STAMLER, 1994). A existência do óxido nítrico

sintase mitocondrial (NOSmt) foi primeiramente sugerida por estudos imunohistoquímicos, os quais revelaram que anticorpos anti-NOS ligavam-se na mitocôndria (BATES et al., 1995). Posteriormente aspectos bioquímicos da NOSmt foram caracterizados (GHAFOURIFAR & RICHTER, 1997; GIULIVI et al., 1998), entretanto ainda não é consenso a identidade molecular desta enzima (BROOKES, 2004).

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas na mitocôndria podem oxidar macromoléculas tanto na própria organela como em outros sítios intracelulares. Proteínas, principalmente da membrana mitocondrial interna, são alvos primários de danos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, grande parte desses danos envolvem a formação de grupos carbonila e a oxidação de grupos tióis, esse dano pode levar a uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, conhecida como Transição de Permeabilidade Mitocondrial (KOWALTOWSKI et al., 2001).

Transição de permeabilidade mitocondrial (TPM)

A TPM é caracterizada por uma permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna, que gradativamente se torna permeável a prótons, íons, suporte osmótico e até mesmo pequenas proteínas. O Ca^{2+} parece ser o principal agente estimulador da geração mitocondrial de EROs (KOWALTOWSKI et al., 2001; Figura 4). A permeabilização da membrana interna causada pela TPM resulta na liberação de componentes da matriz, perda da capacidade de síntese de ATP e inchamento mitocondrial, com conseqüente ruptura da membrana externa e liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembrana (KOWALTOWSKI et al., 2001). Em consequência desse processo, a TPM participa de eventos que levam a morte celular tanto por necrose como por apoptose.

Apesar do grande número de investigações científicas, a natureza das alterações de membrana que levam a TPM, ainda permanece em debate. A TPM claramente envolve proteínas de membrana. Possíveis componentes do poro de TPM incluem translocador de

nucleotídeos de adenina, VDAC, ciclofilina D, hexoquinase, creatina quinase e o receptor benzodiazepínico (HALESTRAP et al., 2002).

A TPM é prevenida por redutores ditiólicos como ditioneitol, enquanto oxidantes de tióis promovem este processo, indicando que modificações protéicas que levam a abertura do poro de TPM envolvem a oxidação de grupos tióis (FAGIAN et al., 1990).

Vercesi e colaboradores observaram que uma grande variedade de antioxidantes impede a abertura do poro de transição de permeabilidade causada por diferentes condições, sugerindo que este processo é consequência da oxidação de grupos tiólicos provocada por um estado de estresse oxidativo mitocondrial (FAGIAN et al., 1990; VALLE et al., 1993; CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 1998). Evidência adicional de que a TPM poderia ser causada por EROs foi a demonstração de que este processo pode ser desencadeado através da adição de fontes externas de EROs (HERMES-LIMA et al., 1991).

A ligação entre o Ca^{2+} , importante elemento para abertura do poro de TPM, 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 cátion. O Ca^{2+} intramitocondrial 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 consequentemente 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. 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 & LARDY, 1982; CASTILHO et al., 1995; VERCESI et al., 1997). A oxidação de NAD(P)H e GSH causada por próoxidantes prejudica a eliminação de H_2O_2 pelas enzimas glutathione peroxidase (GP) e glutathione reductase (GR). Em contraste, a rápida difusão de H_2O_2 através da membrana mitocondrial permite seu consumo por catalase extramitocondrial (VALLE et al., 1993; CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 1998). Na presença de altas

concentrações de fosfato inorgânico (P_i), a enolização de aldeídos formados por lipoperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) leva a produção final de espécies tripletes que estimulam o processo de lipoperoxidação dos PUFA da membrana (KOWALTOWSKI et al., 1996A, 1996B).

A ciclosporina A (CsA) é um dos mais efetivos membros da família dos endecapeptídeos cíclicos, que atuam como imunossuppressores e foi descoberta como um potente inibidor do poro de TPM (FOURNIER et al., 1987; CROMPTON et al., 1988; BROEKEMEIER et al., 1989).

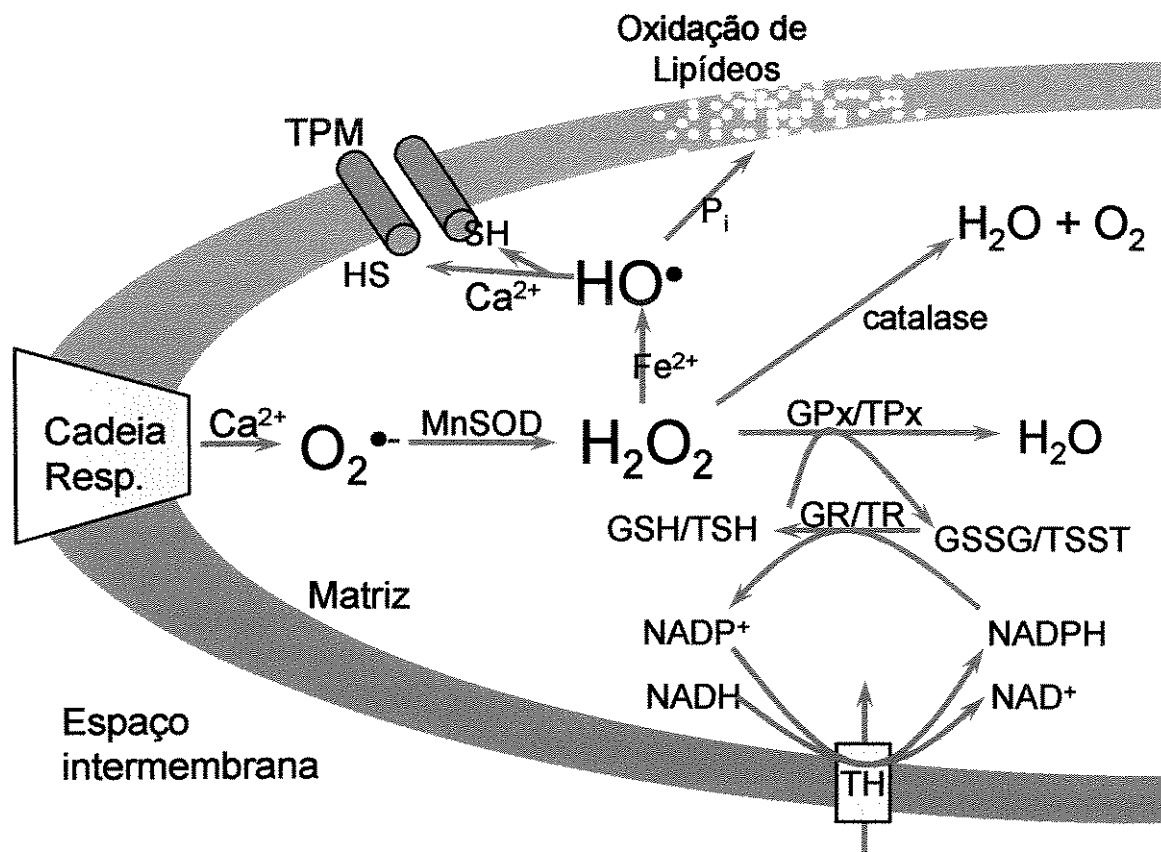


Figura 2- Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e EROs na membrana mitocondrial interna (adaptado de KOWALTOWSKI et al., 2001). Acúmulo de EROs mitocondrial causa TPM. A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente 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 glutathiona peroxidase (GP), tirodoxina peroxidase (TP) ou catalase (em mitocôndria de coração). GSH, oxidado pela GP, e TSH, oxidado pela TP, são recuperados pelo sistema enzimático glutathiona 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 NAD(P) 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 .

BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL EM DISLIPIDEMIAS

Recentes descobertas têm mostrado que o metabolismo energético está alterado em condições de dislipidemias. Por exemplo, alterações nos níveis de lipídeos por hormônios e dieta rica em gordura (SAMEC et al., 1999) causam variações na expressão de proteínas desacopladoras mitocondriais, que estão envolvidas na regulação do metabolismo energético e na produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria (JEZEK & GARLID, 1998).

Utilizando-se de um modelo de camundongo geneticamente modificado, nosso grupo de pesquisa mostrou pela primeira vez que existem alterações no sistema redox de mitocôndria de animais em situação de hipercolesterolemia (OLIVEIRA et al., 2005). Nós descobrimos que camundongos hipercolesterolêmicos por deficiência no receptor de LDL (LDLR^{-/-}) apresentam uma alta produção mitocondrial de EROs na presença de Ca²⁺, sendo mais susceptíveis ao processo de TPM. Foi demonstrado que este processo de estresse oxidativo não ocorre em função de diferenças de fluidez da membrana mitocondrial, do conteúdo de colesterol de membrana ou alteração de atividade de MnSOD. Em adição, nós mostramos que camundongos LDLR^{-/-} apresentam uma elevação na taxa de síntese de colesterol quando comparados a animais controles, processo que consome poder redutor na forma de NADPH (OLIVEIRA et al., 2005).

COLESTEROL E ATEROSCLEROSE

Embora a biossíntese *de novo* do colesterol ocorra em, virtualmente, todas as células, esta capacidade é maior no fígado, no intestino, no córtex adrenal e nos tecidos reprodutores, incluindo ovários, testículos e placenta (DEVLIN, 2002). Além da fonte de átomos de carbono, a biossíntese de colesterol requer um considerável poder redutor. Todos os átomos de carbono do colesterol são derivados do acetato proveniente da hidrólise de ligações tioéster de alta energia da acetil CoA e de ligações fosfoanidrido do ATP, em uma série de aproximadamente trinta reações enzimáticas (IKONEN, 2006). Poder redutor citosólico na forma de NADPH é fornecido principalmente pela glicose 6-fosfato

desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, enzimas da via das pentoses, enquanto o NADPH mitocondrial é gerado principalmente pela isocitrato desidrogenase (JO et al., 2001) e pela NAD(P) transidrogenase (HOEK et al., 1998).

Em condições fisiológicas, a síntese *de novo* de colesterol não é fator limitante para o funcionamento da maioria das células do corpo, mesmo na ausência de colesterol da dieta. Por outro lado, o acúmulo de colesterol intracelular é altamente citotóxico, uma vez que as células dos mamíferos não têm capacidade para degradar a molécula do colesterol. No entanto, as células desenvolveram um eficiente mecanismo homeostático de proteção contra o acúmulo de colesterol. Tal mecanismo foi elegantemente elucidado por M. Brown e J. Goldstein, laureados com o prêmio Nobel de Medicina em 1985 (BROWN & GOLDSTEIN, 1986). Na vigência de aporte aumentado de colesterol, as células respondem com 3 ações contra-regulatórias principais:

1 - bloqueio da síntese *de novo* do colesterol, através da inibição da transcrição dos genes das enzimas hidroximetil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) sintetase e HMG-CoA redutase. Esta última catalisa a etapa limitante da via da síntese do colesterol.

2 - bloqueio da principal via de entrada de colesterol exógeno na célula, através da inibição da transcrição do gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL), principal transportador de colesterol nos seres humanos.

3 - aumento da esterificação do colesterol livre, através do aumento da atividade da enzima acil colesterol acil transferase (ACAT), evitando uma elevação do conteúdo de colesterol nas membranas celulares.

Assim, na condição de aporte aumentado de colesterol (dieta) ou na deficiência genética de receptores de LDL, o colesterol acumula-se nos compartimentos extracelulares, principalmente no sangue. A hipercolesterolemia resultante é um conhecido fator de risco primário para o desenvolvimento da aterosclerose.

A aterosclerose é uma doença da parede arterial que está associada com uma progressiva perda da função de células endoteliais e o acúmulo de macrófagos sobrecarregados de colesterol (células espumosas) (NAVAB et al., 1995; ROSS, 1999). Um processo chave na aterogênese é a modificação oxidativa de lipídeos, que estão envolvidos

no recrutamento de leucócitos mononucleares para a porção íntima das artérias, um processo regulado por várias moléculas de adesão e citocinas (PUDDU et al., 2005). Mitocôndrias de leucócitos ativados, bem como de células endoteliais podem produzir altas taxas de EROs, as quais podem levar a disfunção endotelial, um evento que contribui para a formação da lesão aterosclerótica (KNIGHT-LOZANO et al., 2002).

A idéia central da hipótese de oxidação (BERLINER & HEINECKE, 1996; ESTERBAUER et al., 1990) para o desenvolvimento de aterosclerose, é que EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) medeiam a modificação oxidativa de LDL e levam a formação de células espumosas (BERLINER & HEINECKE, 1996). Esta idéia é apoiada por estudos que demonstram a presença de LDL modificada *in vivo* e a habilidade que EROs e ERNs têm em converter lipoproteínas a uma forma potencialmente pró-aterogênica quando adicionados a LDL natural *in vitro* (KLATT & ESTERBAUER, 1996).

MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA

Uma das principais vias de entrada do colesterol nas células é o receptor de LDL. Defeitos genéticos neste receptor levam à hipercolesterolemia e aterosclerose precoce em seres humanos (BROWN & GOLDSTEIN, 1986).

Ishibashi et al. (1993) empregaram a técnica da recombinação homóloga em células embrionárias para produzir camundongos com o gene do receptor de LDL inativado e assim reproduziram o fenótipo da hipercolesterolemia familiar. Camundongos machos e fêmeas que não expressam receptor de LDL (camundongos LDLR^{-/-}) são viáveis e férteis. Sob dieta pobre em gordura e colesterol, os níveis de colesterol plasmático são duas vezes maiores que aqueles dos camundongos selvagens, devido a um aumento de sete a nove vezes nas lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sem uma significativa mudança nas lipoproteínas de alta densidade (HDL). Os níveis de triglicérides são normais. O tempo de metabolização de IDL e LDL está aumentado em 30 vezes e 2 vezes respectivamente, mas de HDL é normal nos camundongos LDLR^{-/-}. O conteúdo de colesterol total no fígado não difere dos camundongos selvagens (OSONO et al., 1995).

ESTATINAS

As estatinas são substâncias originárias de culturas de fungos, sendo a compactina a primeira estatina isolada, em 1976, de uma cultura de *Penicillium citrinum*. A compactina revelou-se excelente inibidora da síntese do colesterol, mas, por sua toxicidade, não reuniu condições de uso clínico. Posteriormente, foi isolada a lovastatina da cultura do *Aspergillus terreus*, com igual propriedade da substância anterior, mas com toxicidade muito menor. Desde então foram produzidas várias outras substâncias com fórmulas estruturais semelhantes às acima referidas, todas mostrando efeito inibidor da síntese do colesterol, recebendo a denominação genérica de estatinas (GIANNINI et al., 1999).

Estatinas constituem uma notável classe de medicamentos redutores dos níveis plasmáticos de colesterol e têm sido associadas com uma expressiva diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular para pacientes em prevenção primária ou secundária da doença coronariana (BALLANTYNE, 1998).

As estatinas têm em comum um anel hidronaftaleno. Neste trabalho de tese foram utilizadas três estatinas: lovastatina, sinvastatina e pravastatina, cuja estrutura química são mostradas na Figura 3. A pravastatina foi obtida de cultura do fungo *Nocardia autrophica*. A sinvastatina resultou de pequena modificação na fórmula estrutural da lovastatina (adição de radical metila). A lovastatina e a sinvastatina são lipossolúveis, ao passo que a pravastatina é hidrossolúvel, particularidade que confere diferenças em relação a farmacocinética destas drogas.

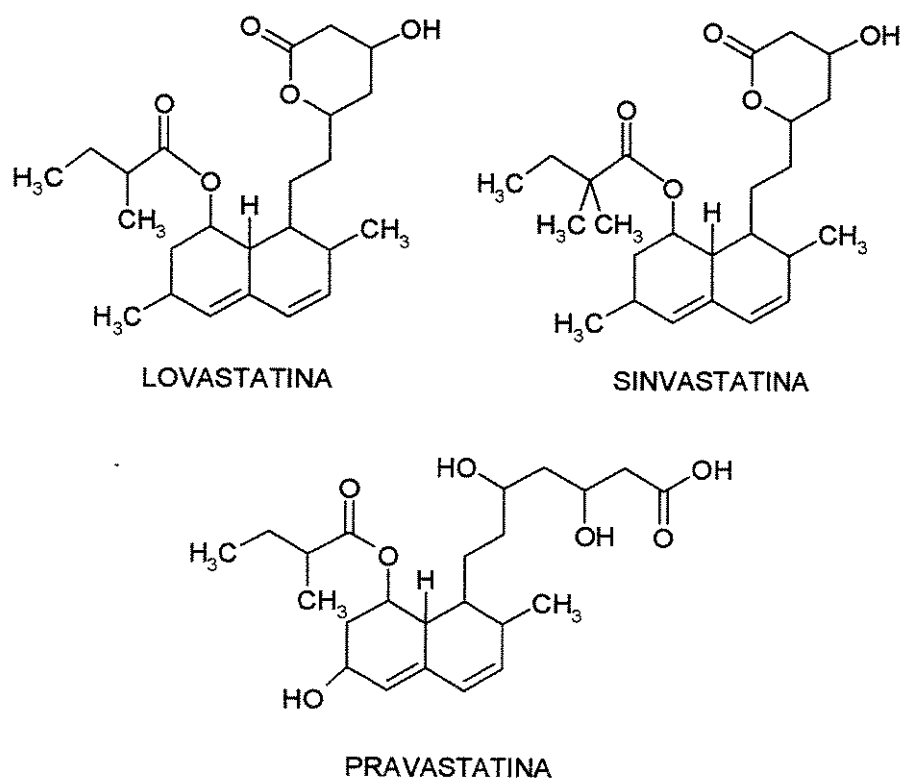


Figura 3- Estrutura química da lovastatina, sinvastatina e ravastatina.

As estatinas são absorvidas no intestino e são metabolizadas pelo citocromo P450 em células hepáticas (SHITARA & SUGIYAMA, 2006).

O mecanismo de ação das estatinas para a redução dos níveis plasmático de colesterol se deve a inibição da enzima HMG-CoA redutase, impedindo a transformação do HMG-CoA em ácido mevalônico, etapa chave para a síntese do colesterol (Figura 4). Esta inibição é reversível e competitiva com o substrato HMG-CoA (MCTAGGART et al., 2001).

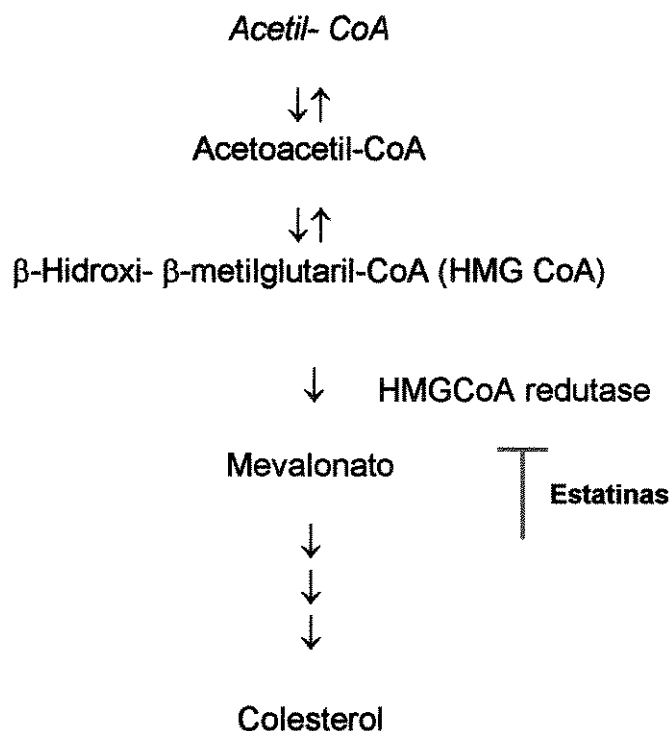


Figura 4- Mecanismo de ação das estatinas na via de síntese do colesterol.

As estatinas são geralmente bem toleradas, mas efeitos adversos são descritos, os quais compreendem danos à função hepática, músculo esquelético e nervos periféricos (MUSCARI et al., 2002). A miopatia é o efeito adverso mais relatado (ROSENSEN, 2004) sendo um processo dose-dependente. A incidência de miopatia aumenta até cinco vezes (~0,3 a ~1,5%) (JACOBSON, 2004) quando certas estatinas (lovastatina, simvastatina, atorvastatina) são co-administradas com outros medicamentos como fibratos (OMAR & WILSON, 2002), bloqueadores de canais de cálcio (LEWIN et al., 2002), agentes antifúngicos (SKAUKAT et al., 2003), drogas antiretrovirais como os inibidores de protease (FICHTENBAUM et al., 2002) e combinações destas e outras drogas. O mecanismo que estatinas induzem miopatia ainda não é muito claro, mas parece estar relacionado com alterações de membranas celulares e inibição de formação de substâncias importantes para o metabolismo celular e mitocondrial como a ubiquinona (BLIZNAKOV et al, 2002; ROSENSEN, 2004).

Outros efeitos de proteção das estatinas não hipolipemiantes, coletivamente chamados de pleiotrópicos têm sido descritos. Estes efeitos parecem ser consequência de uma menor ativação de algumas proteínas que interferem em várias e importantes vias de sinalização celular, relacionadas a genes que condicionam a síntese de citocinas inflamatórias, fatores de coagulação, ou relacionados a maior expressão de óxido nítrico. Assim, a redução de mevalonato determina menor ativação das proteínas Ras e Rho, promovendo efeitos antiinflamatórios, melhor balanço da hemostasia e recuperação da vasorreatividade dependente do endotélio (FUTTERMAN & LEMBERG, 2004; LIAO, 2002).

2- OBJETIVOS

Em estudos prévios demonstramos que na condição de hipercolesterolemia genética as mitocôndrias são mais susceptíveis ao estresse oxidativo e a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Neste trabalho nossos objetivos específicos foram:

- 1) Caracterizar o mecanismo bioquímico de estresse oxidativo em mitocôndrias isoladas de camundongos hipercolesterolêmicos (LDLR^{-/-});
- 2) Verificar o efeito do tratamento da hipercolesterolemia por lovastatina, assim como o efeito *in vitro* de lovastatina, sinvastatina e pravastatina sobre a bioenergética mitocondrial.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Lovastatina, sinvastatina e pravastatina foram adquiridas da Galena Química e Farmacêutica Ltda (SP, Brazil). Todos os outros reagentes utilizados nos experimentos com mitocôndrias isoladas foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), Cutilab (Campinas, Brasil) ou da Molecular Probes (Eugene, OR, USA)

Animais

Camundongos hipercolesterolêmicos por inativação do gene do receptor de LDL ($LDLR^{-/-}$), provenientes do laboratório Jackson (Bar Harbor, ME), foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, UNICAMP. Como controle foram usados camundongos selvagens C57Bl6, a linhagem parental do “knock out” do receptor de LDL, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), UNICAMP.

Nos experimentos relacionados ao efeito das estatinas em mitocôndrias isoladas foram utilizados ratos adultos Wistar, provenientes do CEMIB, da UNICAMP. Os camundongos tiveram acesso a dieta padrão (Nuvital CR1, PR, Brasil) e água a vontade.

Os ratos e camundongos foram criados e mantidos em sala climatizada em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro-escuro de 12 horas. Machos e fêmeas de 4 a 6 meses de idade foram utilizados neste estudo.

Dosagem de colesterol

Amostras de sangue dos camundongos em jejum por 12 horas foram colhidas do plexo retro-orbital de camundongos anestesiados (cetamina 50 mg/kg, Parke-Davis e xilazina 16mg/kg, Bayer) usando tubos heparinizados. Colesterol total foi determinado no plasma usando método enzimático colorimétrico (Merck, Alemanha) de acordo com o manual do fabricante.

Tratamento com Lovastatina

Lovastatina ou placebo (goma arábica 2%, veículo para a lovastatina) foram administrados diariamente através de gavagem oral, na dose de 100 mg/kg de peso corporal (Bisgaier et al., 1997), durante 15 dias.

Isolamento de mitocôndrias de fígado e músculo

Mitocôndrias de fígado foram isoladas de ratos ou camundongos adultos utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo SCHNEIDER e HOGEBOM (1951), após jejum de 12 h. O fígado, retirado após a morte do animal por concussão cerebral, foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão 10 mM de HEPES pH 7,2 e EGTA 0,5 mM, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 2500 x g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 8000 x g sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em solução de sacarose 250 mM, HEPES 5 mM, pH 7,2 e EGTA 0,3 mM, e novamente centrifugado como a condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução sendo que isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 80 mg de proteína por mililitro de suspensão mitocondrial.

Mitocôndrias de músculo foram isoladas a partir de músculo esquelético de camundongos adultos. Após a dissecação do animal, os músculos foram picados e homogenizados em solução contendo sacarose 100 mM, K_2HPO_4 1 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 0,2 %, e tampão de Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, seguido por uma série de centrifugações diferenciais (TONKONOGI & SALMIN, 1997). A fração mitocondrial final foi ressuspensa em solução de manitol 0,2 M, sacarose 0,1 M e Tris-HCl 5 mM, pH 7,4.

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 & 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 foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

Condições experimentais

Os experimentos com mitocôndrias isoladas foram realizados a 30°C em meio de reação padrão contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM e HEPES 10 mM, pH 7,2. Como substrato respiratório foram utilizados 5 mM de Succinato de potássio ou 5 mM de malato, piruvato, glutamato e α -cetoglutarato. Nos experimentos que avaliaram o efeito das estatinas sobre a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial foram adicionados ao meio de reação padrão rotenona 2 μ M, cloreto de cálcio 30 μ M, e succinato de potássio 5 mM. Outros reagentes adicionados estão indicados nas figuras.

Consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio por mitocôndrias foi medido utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado a um oxígrafo Gilson, em uma câmara de vidro de 1,7 ml equipada com agitador magnético. A concentração de oxigênio inicial no meio de reação é de 225 nmol/ml, na condição experimental utilizada (ROBINSON & COOPER, 1970).

Determinação do conteúdo de grupos tiólicos

A suspensão mitocondrial foi incubada em meio de reação padrão durante 10 minutos, em seguida foi submetida a 3 processos de congelamento/ descongelamento em nitrogênio líquido para a liberação de proteínas da matriz. Após, o material foi centrifugado

a 10.000 rpm por 2 minutos. O sedimento foi tratado com 200 µl de ácido tricloroacético 6,5 % e centrifugado a 10.000 rpm por 2 minutos. O sedimento final foi ressuspenso em 1 ml de solução contendo DTNB 100 µM, EGTA 0,5 µM e Tris-HCl 0,5 M, pH 8,3. A absorção foi mensurada a 412 nm, usando cisteína para calibração.

Determinação do estado redox de NAD(P)

A oxidação ou redução de NAD(P) nas suspensões mitocondriais foram acompanhadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-4010 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japão) operando nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 366 e 450 nm, respectivamente.

Níveis de GSH e GSSG

Os níveis de GSH e GSSG nas mitocôndrias foram determinados espectrofluorimetricamente usando-se o-ftaldeído (OPT) como indicador (HISSIN & HILF, 1976).

Determinação da produção de $O_2^{\bullet-}$

A produção de superóxido pelas mitocôndrias foi monitorada fluorimetricamente, incubando-se, em meio de reação padrão, a suspensão mitocondrial (0,5 mg/ml) na presença do marcador hidroetidina (5 µM), o qual é oxidado por $O_2^{\bullet-}$ a um produto fluorescente, utilizando-se 470 e 585 nm, para excitação e emissão, respectivamente.

Determinação da produção de H_2O_2

A liberação de H_2O_2 por mitocôndrias foi determiada fluorimetricamente utilizando Amplex red 10 µM (Molecular Probes, Eugene, OR) que é um substrato cuja oxidação por H_2O_2 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 (VOTYAKOVA & REYNOLDS, 2001).

Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial com eletrodo de TPP^+

O potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana foi determinado a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP^+) entre o meio de reação e a matriz mitocondrial, com eletrodo específico construído no Laboratório de Bioenergética, Departamento de Patologia Clínica, FCM-UNICAMP, de acordo com KAMO, et al. (1979). Neste eletrodo utiliza-se uma membrana de cloreto de polivinila (PVC) contendo tetrafenilborato (TPB^-) como trocador de íons. Esta membrana foi preparada adicionando-se 3,0 ml de tetrafenilborato de sódio 10 mM (dissolvidos em tetrahidrofurano) a 10,0 ml de tetrahidrofurano contendo 0,5 g de cloreto de polivinila e 1,5 ml de dioctilftalato. A solução final foi colocada em placa de Petri de 60 cm^2 de área e o solvente evaporado lentamente à temperatura ambiente. A membrana assim obtida é transparente e possui de 0,15 a 0,20 cm de espessura. Um fragmento desta membrana foi colado, com o uso de tetrahidrofurano, à extremidade de um tubo de PVC (3,5 cm de comprimento/0,5 cm de diâmetro) que, por sua vez, foi preenchido com TPP^+ 1,0 mM ($[TPP^+]_{in}$). Este eletrodo de TPP^+ foi conectado a um eletrodo de referência. Este eletrodo foi preparado a partir de um tubo de PVC, no qual uma das extremidades foi fechada com uma pequena camada de resina epóxi e preenchido com solução de KCl 3,0 M. As concentrações de TPP^+ no meio de reação foram monitoradas continuamente e os valores de $\Delta\psi$ calculados através da equação:

$$\Delta\psi = 2,3 RT/F \log v/V - 2,3 RT/F \log (10^{F\Delta E/2,3RT} - 1)$$

onde v representa o volume mitocondrial por mg de proteína, considerado 1,4 μl (KAMO *et al.*, 1979), V o volume do meio de incubação e ΔE o potencial do eletrodo fornecido pelo gradiente de concentração de TPP^+ ($[TPP^+]_{in}/[TPP^+]_{ex}$) através da membrana, sendo que $[TPP^+]_{ex}$ refere-se à concentração de TPP^+ no meio de reação. Esta

equação é derivada assumindo-se que a distribuição de TPP^+ entre as mitocôndrias e o meio segue a equação de Nernst (MURATSUGU et al., 1977). Entretanto, uma quantidade significativa de TPP^+ se liga às membranas mitocondriais (JENSEN et al., 1986) e os valores de potencial elétrico obtidos foram corrigidos utilizando-se a equação:

$$\Delta\psi = (\Delta\psi_{\text{eletrodo}} - 66,16 \text{ mV})/0,92$$

Os sinais do eletrodo (ΔE) foram quantificados com o auxílio de uma curva de calibração construída com adições conhecidas de TPP^+ ao meio de reação (normalmente contendo substrato e 0,2 mM de fosfato). Os experimentos foram iniciados pela adição de 1 mg proteína mitocondrial/ml do meio de reação e realizados em câmara de vidro termostatzada (30°C), com agitação magnética, e eletrodo acoplado a um registrador potenciométrico (Kipp & Zonen, modelo BD121).

Suspensão mitocondrial (1 mg/ml) foi incubada em meio de reação padrão contendo TPP^+ 3 μM . A concentração de TPP^+ no meio extramitocondrial foi monitorada continuamente com o eletrodo de íon seletivo.

Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial pelo método da Safranina O

A medida do potencial de membrana mitocondrial também foi feita fluorimetricamente usando-se o indicador safranina O, que se adsorve à membrana de mitocôndrias energizadas. Esta adsorção é seguida de alteração do espectro de fluorescência da safranina na faixa de 495 a 586 nm, para excitação e emissão, respectivamente. Nestas condições, as diferenças de fluorescência nos comprimentos 495 - 586 são proporcionais à amplitude do potencial até valores de aproximadamente 170 mV (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976). $\Delta\psi$ foi calculado de acordo com ÅKERMAN & WIKSTRON (1976) utilizando-se de uma curva de calibração feita pela titulação do potencial de membrana mitocondrial com a captação de potássio (K^+) na presença de valinomicina, em meio de reação isento de K^+ e contendo sacarose 250 mM,

HEPES de sódio 20 mM pH 7,2, $MgCl_2$ 1,0 mM, rotenona 4,0 μM , EGTA 0,5 mM, succinato 5,0 mM e valinomicina 0,06 $\mu g/ml$. Foram realizadas adições sucessivas de KCl, seguidas de uma adição de nigericina 0,15 $\mu g/ml$. Os valores de potencial de membrana foram calculados utilizando-se a equação de Nerst, considerando-se a concentração intramitocondrial inicial de K^+ igual a 120 mM.

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 E ÅKERMAN, 1982). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a conseqüente diminuição da luz espalhada. Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo simples para se estudar o fluxo de solutos através da membrana mitocondrial interna. As mitocôndrias são ideais à aplicação desta técnica porque sua matriz pode sofrer grandes variações de volume, já que a membrana interna sofre apenas desdobramento de suas pregas. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância aparente a 520 nm (MACEDO et al, 1988) foi feito em um espectrofotômetro.

Estimativa de atividade do sistema Glutathione Peroxidase/Redutase.

As mitocôndrias (1 mg/ml) foram lisadas pela adição de 0,1 % de triton X - 100 em meio de reação padrão acrescido de GSH 500 μM e NADPH 100 μM . Na sequência t-BOOH 0,5 mM foi adicionado. A estimativa de atividade do sistema GPx/GR foi feita em função da velocidade de oxidação do NADPH, medida fluorimetricamente.

Determinação do conteúdo de grupos carbonilas

Grupos carbonilas foram determinados espectrofotometricamente, através da reação com dinitrofenilhidrazina (SCHILDE et al., 1997). Amostras de homogenato de fígado (5 mg/ml) foram tratadas com dinitrofenilhidrazina 10 mM em solução de HCl 2,5 M, por uma hora a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de TCA 20 %. Após o material foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com solução de etanol absoluto/acetato de etila (1:1) para remover a dinitrofenilhidrazina livre e lipídeos contaminantes. O sedimento final foi dissolvido em 1,5 ml de hidrocloreto de guanidina 6 M e incubado por 10 minutos a 37°C com agitação esporádica. A absorção foi mensurada a 370 nm. O conteúdo de carbonilas foi calculado usando o coeficiente de absortividade da dinitrofenilhidrazina (22000/M.cm) e expresso em nmol de carbonilas/mg de proteína.

Determinação do conteúdo de isocitrato e seus precursores

A suspensão mitocondrial (10 mg/ml) foi adicionada em solução contendo MgCl_2 2 mM, triton X-100 0,5 %, NADP^+ 2 mM e tampão Tris 40 mM, pH 7,4. Após a homogenização foi adicionado NADP-isocitrato desidrogenase (5 μg). A concentração de isocitrato e seus precursores foi estimada através da produção de NADPH, medida fluorimetricamente. Para análise de linearidade e correlação entre as concentrações de NADPH e isocitrato, foi realizada uma curva de calibração com concentrações conhecidas de isocitrato.

Análises estatísticas

Os dados são apresentados como média $\pm$ dpm. O “n” se refere ao número de experimentos realizados com preparações biológicas independentes. As análises estatísticas foram feitas usando ANOVA para comparações múltiplas, seguida pelo pós teste de Tukey e teste *t* de *Student* para comparação de 2 médias. $p < 0.05$ foi considerado significativo. Todas as figuras apresentadas nos resultados são representativas de pelo menos três experimentos independentes.

4- RESULTADOS

PARTE I- CARACTERIZAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO MITOCONDRIAL EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS POR DEFICIÊNCIA NO RECEPTOR DE LDL (LDLR^{-/-})

Catalase inibe a oxidação espontânea de NAD(P)H em mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-}

Resultados recentes de nosso laboratório mostraram que mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLR^{-/-} apresentam uma maior susceptibilidade à condição de transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca²⁺ quando comparadas as de animais controles (normocolesterolêmicos). Esta maior susceptibilidade parece ser consequência da baixa capacidade destas organelas em manter o poder redutor da matriz mitocondrial na forma de NADPH (OLIVEIRA et al., 2005). Uma vez que o NADPH é consumido no processo de detoxificação de EROs na mitocôndria, investigamos se a suplementação do meio de reação com catalase interferiria no processo de oxidação espontânea de NAD(P)H observado nas mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos.

A Figura 5 mostra que quando as mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLR^{-/-} foram incubadas na presença de 1 µM de catalase o processo de oxidação espontânea de NAD(P)H foi completamente inibido. Este resultado indica que o consumo de NAD(P)H observado nestas condições está relacionado à detoxificação do H₂O₂.

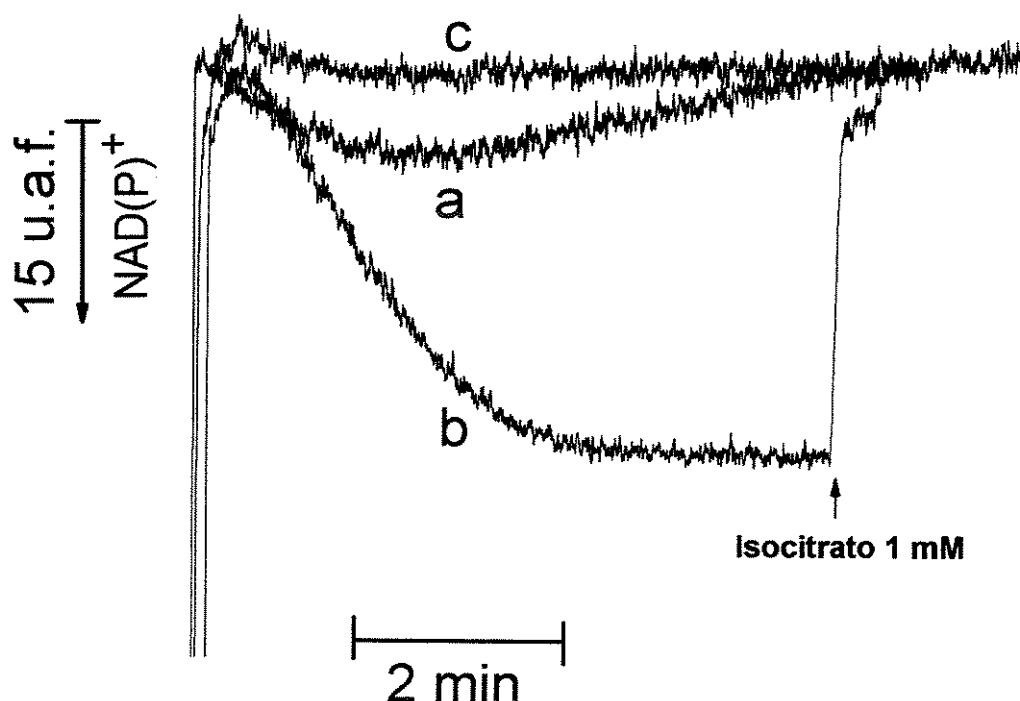


Figura 5- Efeito da catalase sobre a oxidação de NAD(P)H em mitocôndrias isoladas de camundongos $LDLR^{-/-}$. MFC (1,0 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação padrão acrescido de EGTA 100 μ M. *Linha a:* representa mitocôndrias isoladas de camundongos controles, *linha b:* mitocôndrias de camundongos $LDLR^{-/-}$, e *linha c:* mitocôndrias de camundongos $LDLR^{-/-}$ na presença de catalase 1 μ M. Onde indicado foi adicionado isocitrato 1 mM.

Mitocôndrias de camundongos $LDLR^{-/-}$ liberam maior quantidade de H_2O_2 , mas apresentam geração similar de $O_2^{\bullet -}$

Uma vez que a adição de catalase ao meio de reação inibiu a oxidação de NAD(P)H em mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos, nós partimos com o intuito de verificar se havia maior geração de EROs por mitocôndrias isoladas de fígado destes camundongos. Na Figura 6 observa-se que na ausência de Ca^{2+} (com adição de EGTA 100 μ M ao meio de reação) não há diferença significativa na produção de radical

superóxido entre mitocôndrias de camundongos controles e hipercolesterolêmicos. Em contraste, nas mesmas condições experimentais, observou-se uma detecção $20\% \pm 0.5\%$ ($n = 5$, $p < 0,05$) maior de H_2O_2 em mitocôndrias de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos quando comparado a controles (Figura 7, *linha a e b*). Isto foi revertido pela suplementação do meio de reação com isocitrato 1 mM e rotenona 1 μM (Figura 7, *linha c*), que restauram o poder redutor mitocondrial.

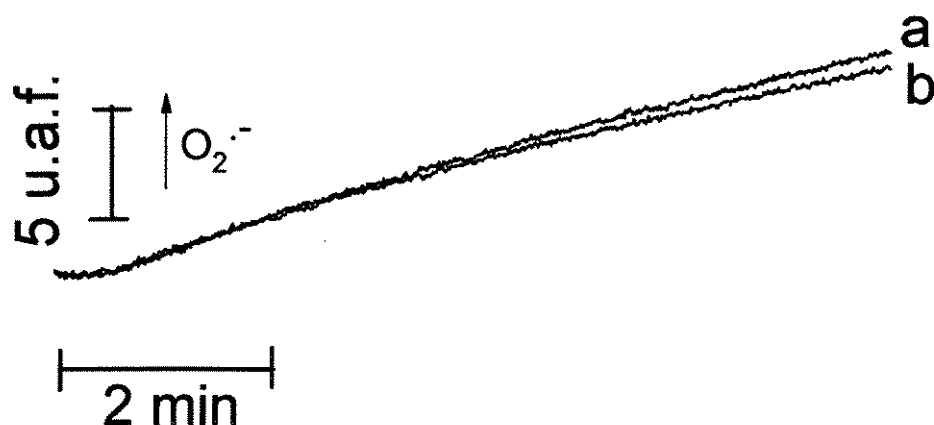


Figura. 6- Geração de superóxido por mitocôndrias de fígado de camundongos controles e $LDLR^{-/-}$.

MFC (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação padrão acrescido de EGTA 100 μM e hidroetidina 5 μM . *Linha a:* representa mitocôndrias isoladas de camundongos controles e *linha b:* representa mitocôndrias isoladas de camundongos $LDLR^{-/-}$.

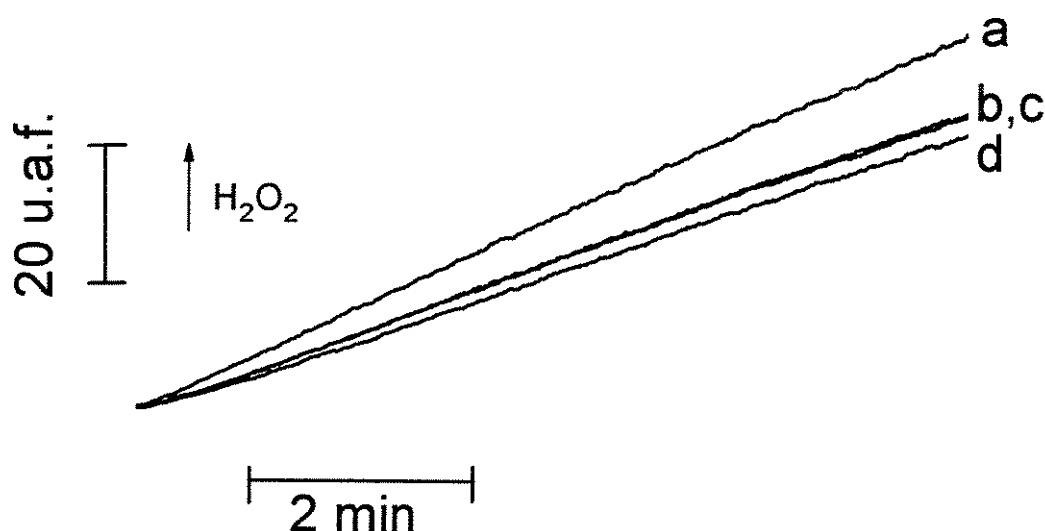
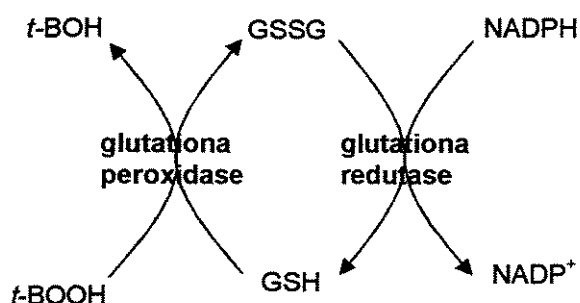


Figura 7- Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por mitocôndrias de camundongos controles e $LDLR^{-/-}$. MFC (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação padrão acrescido de EGTA 100 μ M, Amplex 10 μ M e HRP 1 U/ml. *Linha a:* representa mitocôndrias isoladas de camundongos hipercolesterolêmicos, *linha b:* mitocôndrias isoladas de camundongos controles, *linha c:* mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos incubadas na presença de isocitrato 1 mM e rotenona 1 μ M, *linha d:* mitocôndrias de camundongos controles incubadas na presença de isocitrato 1 mM e rotenona 1 μ M.

Atividade do sistema glutathiona peroxidase/redutase (GPx/GR) em mitocôndrias de camundongos $LDLR^{-/-}$ e controles

Uma vez que foi detectada maior produção de H_2O_2 por mitocôndrias de fígado de animais hipercolesterolêmicos, sem, no entanto, se verificar diferenças na produção de superóxido nestas mitocôndrias, investigamos possíveis diferenças na atividade do sistema antioxidante mitocondrial GPx/GR dos animais controles e $LDLR^{-/-}$. Para tanto, elaboramos um protocolo para estimativa da atividade da glutathiona peroxidase e glutathiona redutase em

mitocôndrias, como descrito a seguir: adicionou-se ao meio de reação um excesso de GSH (500 μ M) e de NADPH (100 μ M) e um extrato lisado, pela adição de triton X-100, de mitocôndrias de camundongos controles ou hipercolesterolêmicos, o qual continha as enzimas do sistema antioxidante mitocondrial. A seguir acrescentou-se *t*-butilhidroperóxido (*t*-BOOH), o qual é detoxificado pela glutathiona peroxidase, num processo que leva a oxidação da glutathiona. A forma oxidada da glutathiona pode ser novamente reduzida pela glutathiona redutase, levando a oxidação de NADPH, conforme esquematizado abaixo:



Assim a estimativa da atividade do sistema glutathiona peroxidase e glutathiona redutase em mitocôndrias de camundongos controles ou hipercolesterolêmicos foi feita em função da velocidade de oxidação de NADPH, monitorada pelo decréscimo da fluorescência deste nucleotídeo em função do tempo. Conforme se pode observar na Figura 8, encontrou-se uma tendência de diminuição da atividade de glutathiona peroxidase e redutase nas mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLR^{-/-}. Para as mitocôndrias de fígado de camundongos controle a taxa média de oxidação de NADPH foi de $34,54 \pm 1,58$ nmol de NADPH/mg de proteína/min e para o LDLR^{-/-} foi de $30,98 \pm 2,52$ nmol de NADPH/mg de proteína/min ($n = 4$, $p = 0,078$).

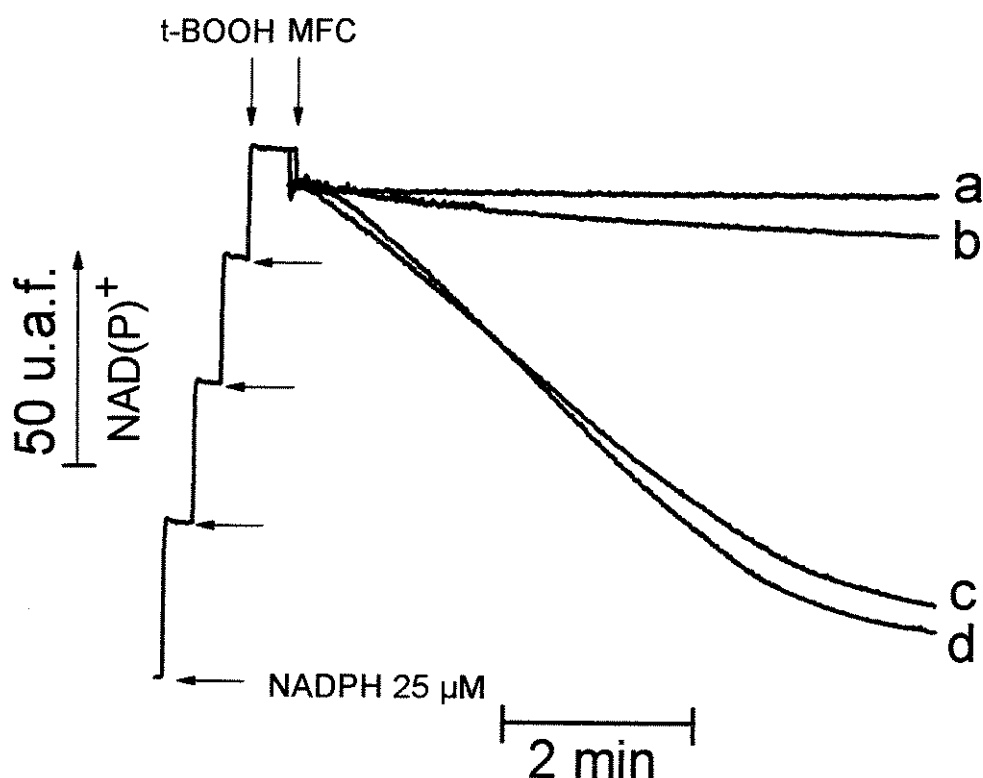


Figura 8- Estimativa da atividade do sistema glutatona peroxidase e redutase em mitocôndrias isoladas de camundongos LDLR^{-/-}. MFC (1,0 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação padrão contendo NADPH 100 μM, GSH 500 μM, triton x-100 0,1% e t-BOOH 0,5 mM, sendo que a *linha c* representa a incubação feita na presença de mitocôndrias isoladas de camundongos LDLR^{-/-} e a *linha d* mitocôndrias isoladas de camundongos controles. A *linha a* representa a incubação de TBOOH 0,5 mM no meio de reação na ausência de mitocôndrias e a *linha b* incubação de mitocôndrias na ausência de t-BOOH.

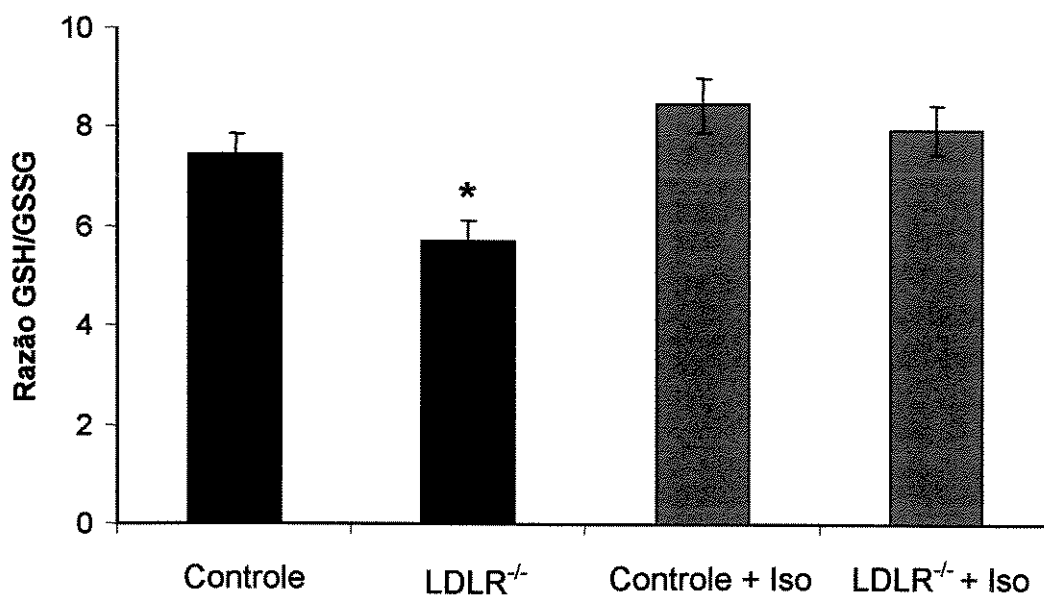


Figura 9- A razão GSH/GSSG é menor em mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} quando comparada a de camundongos controles. MFC (0,5 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação padrão, na presença (barras em vermelho) ou ausência (barras em preto) de isocitrato 1 mM e rotenona 1 μ M (Iso). Após 10 minutos de incubação foi retirado uma alíquota da mistura para dosagem de GSH e GSSG, conforme descrito em Materiais e Métodos. * significativamente diferente do controle ($p < 0,05$).

Apesar de não detectarmos diferença significativa de atividade enzimática no sistema glutatona peroxidase/glutathione redutase, inferimos que o balanço GSH/GSSG poderia estar alterado em mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-}, uma vez que estas mitocôndrias apresentam baixa capacidade em manter o conteúdo de NADPH no estado reduzido. Como esperado, pode-se observar na Figura 9 que mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} apresentaram uma diminuição de 30% na razão GSH/GSSG quando comparada a de mitocôndrias de animais controles. Nota-se ainda na Figura 9 que essa diferença na razão GSH/GSSG é eliminada quando as mitocôndrias são pré-incubadas na presença de rotenona 1 μ M e isocitrato 1 mM.

Mitocôndrias de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos apresentam menor consumo de oxigênio mantido por substratos endógenos

Para testar se o limitante para inativação de EROs em mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} seria o conteúdo de substratos respiratórios endógenos ligados ao NAD(P)H, incubamos mitocôndrias em meio de reação, sem a adição de substratos exógenos, e estimulamos o consumo de O₂ pela adição de ADP 2 mM. Como pode ser observado na Figura 10A, as mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos apresentaram menor velocidade de respiração quando comparadas a mitocôndrias de animais controles (3.20 ± 0.15 vs 5.40 ± 0.27 nmol de O₂/mg de proteína/min, $n = 4$, $p < 0,05$). A adição de isocitrato ao meio de reação levou os dois grupos a uma mesma velocidade de respiração (Figura 10B), o que indica que ambas as mitocôndrias são igualmente funcionais.

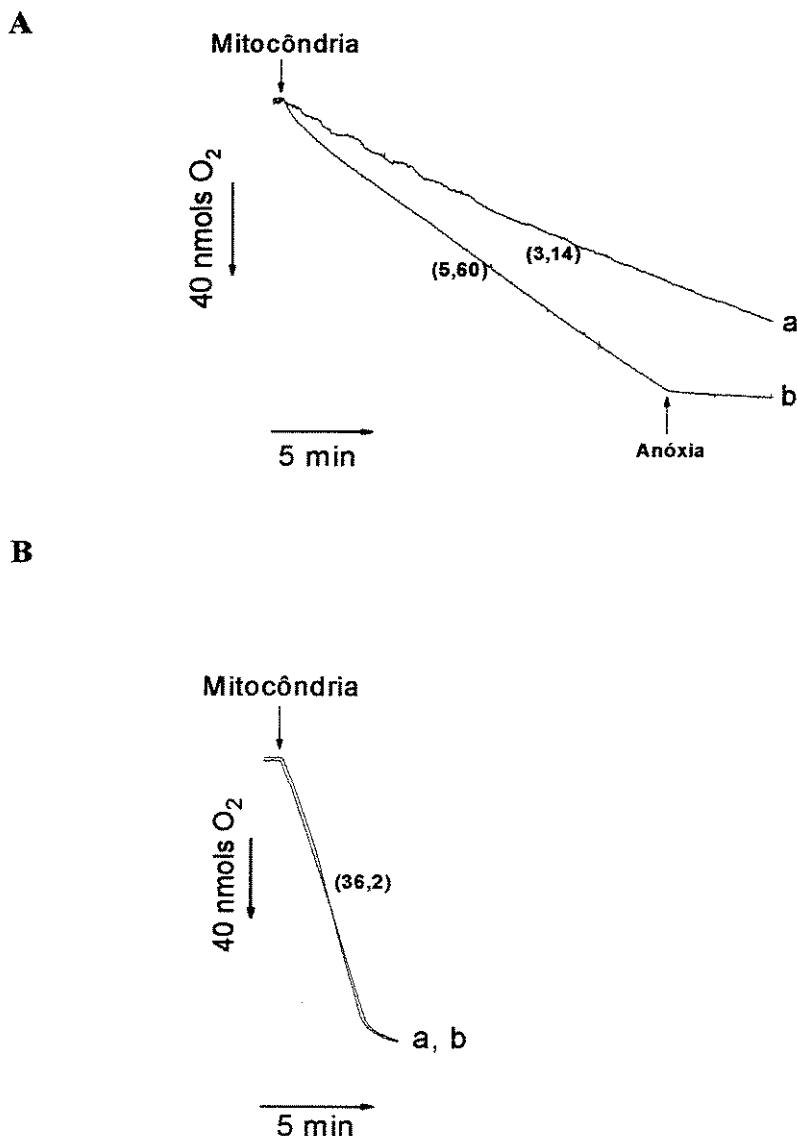


Figura 10- Consumo de oxigênio mantido por substratos endógenos (Painel A) e com suplementação do meio de reação com isocitrato (Painel B) por mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} e controles. MFC (2,0 mg/mL) foram adicionadas ao meio de reação padrão contendo EGTA 100 μ M e ADP 2 mM (Painel A) ou acrescido de isocitrato 1 mM (Painel B). Linha a: representa mitocôndrias isoladas de camundongos LDLR^{-/-} e linha b: mitocôndrias de camundongos controles. As taxas médias de consumo de O₂ (nmol de O₂/mg de proteína/min) foram: 3,20 $\pm$ 0,15 (Painel A, linha a); 5,40 $\pm$ 0,27 (Painel A, linha b); 36,50 $\pm$ 3,02 (Painel B, linha a); 37,20 $\pm$ 3,95 (Painel B, linha b). Apenas no painel A, as taxas de respiração foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Conteúdo de isocitrato e seus precursores em mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} e controles

Em concordância com os resultados que mostram um menor consumo de O₂ mantido por substratos endógenos em mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos, a Figura 11 demonstra que o conteúdo de isocitrato e seus precursores foi menor em mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} ($1,40 \pm 0,19$ nmol/mg de proteína) quando comparadas a mitocôndrias controles ($2,35 \pm 0,17$ nmol/mg de proteína).

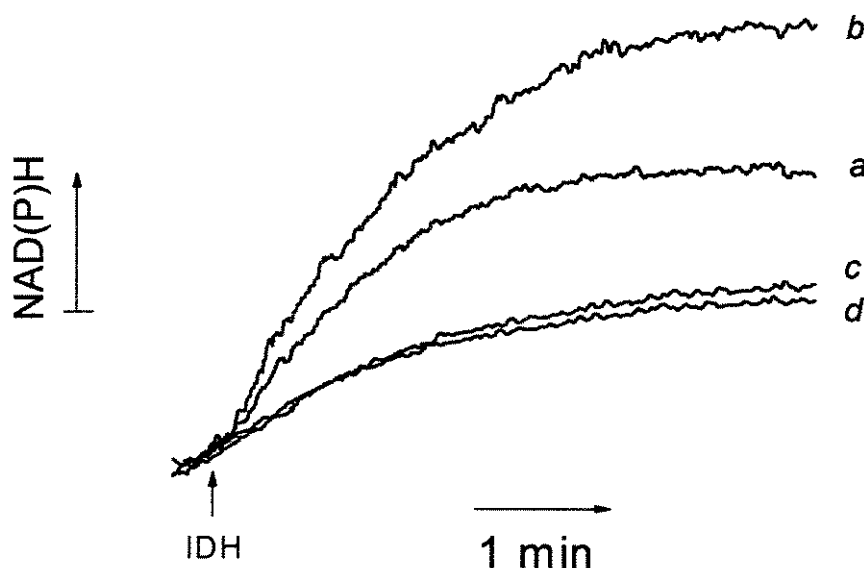


Figura 11- Conteúdo de isocitrato em mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-}. MFC (10.0 mg/ml) de camundongos LDLR^{-/-} (a) ou controles (b) foram incubadas em meio de reação contendo Triton X-100 0.5%, NADP⁺ 2 mM, e MgCl₂ 2 mM. Isocitrato desidrogenase (IDH) (5 µg) foi adicionado onde indicado. Linhas (c) e (d) representam experimentos com mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} e controles, respectivamente, sem a adição de IDH. As taxas de substratos endógenos (isocitrato e seus precursores) em nmol/mg de proteína foram as seguintes: $1,40 \pm 0,19$ para LDLR^{-/-} (a) vs. $2,35 \pm 0,17$ para o controle (b). Linhas são representativas de seis experimentos independentes; (a) e (b) foram significativamente diferentes, $p < 0,05$.

Nível de oxidação protéica foi maior em fígado de camundongos LDLR^{-/-} quando comparado ao grupo controle

Uma das consequências do processo de estresse oxidativo celular é a oxidação de proteínas, que pode ser estimada pela determinação de certos compostos, como por exemplo, grupos carbonilas. A Figura 12 mostra que o nível de grupos carbonilas é significativamente maior em fígado de camundongos hipercolesterolêmicos.

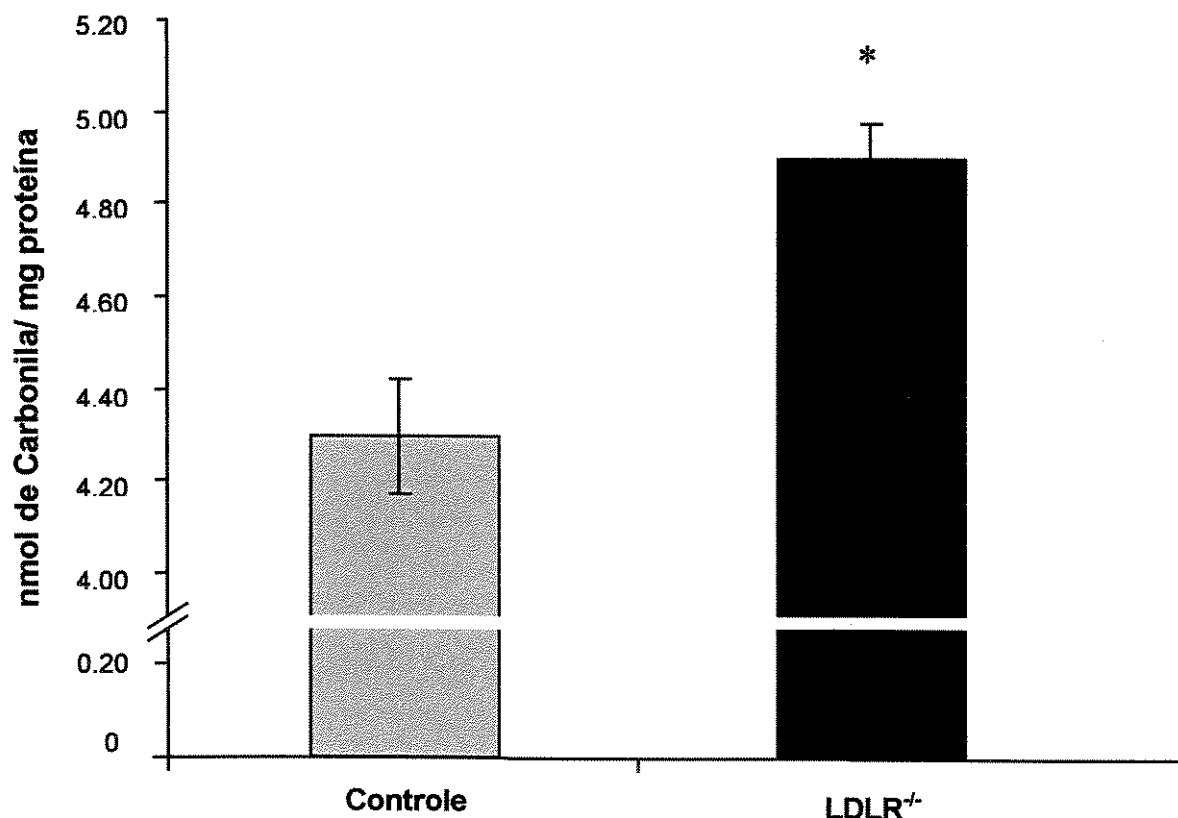


Figura 12- Concentração de grupos carbonilas em homogenato de fígado de camundongos LDLR^{-/-} e controles. Homogenato de fígado de camundongos (5 mg/ml) foi submetido a ensaio químico para determinação de grupos carbonila, conforme descrito em Materiais e Métodos.
* $p < 0,05$ quando comparado o grupo controle com o LDLR^{-/-}.

PARTE II- EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTATINAS SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL

Níveis de colesterol plasmático e respiração mitocondrial em camundongos hipercolesterolêmicos tratados com estatinas

Quando tratados com lovastatina (100 mg/kg), durante quinze, dias camundongos LDLR^{-/-} tiveram uma redução de 20 % no teor de colesterol plasmático total (390 ± 22 versus 308 ± 19 mg/ dl, $p < 0,05$ – Figura 13). O controle respiratório (C.R.) e a razão ADP/O (eficiência de fosforilação) foram essencialmente similares nas mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLR^{-/-} tratados ou não com lovastatina (Tabela 1).

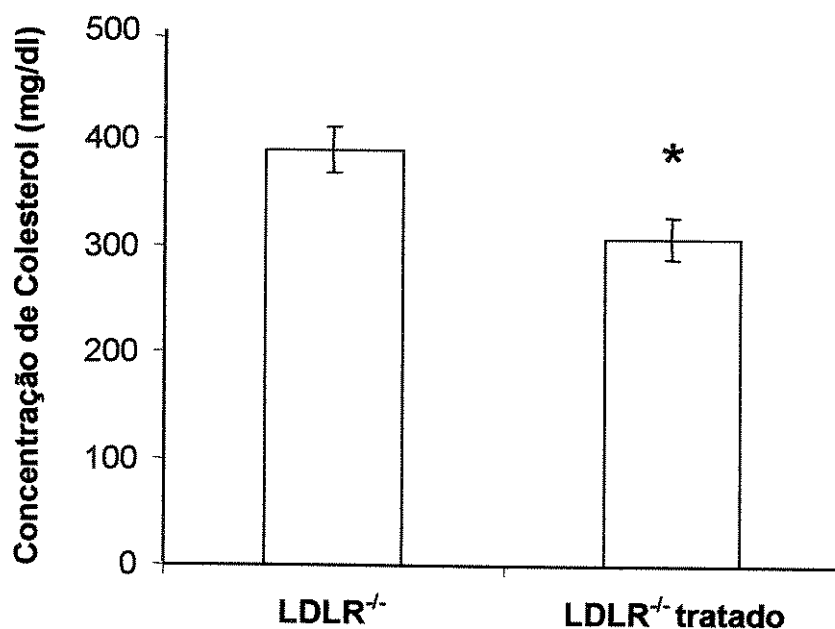


Figura 13- Concentração plasmática de colesterol em camundongos LDLR^{-/-} antes e após o tratamento com lovastatina. $n = 10$, * $p < 0,05$ quando comparado o grupo LDLR^{-/-} com o LDLR^{-/-} tratado.

Tabela 1- Controle respiratório (CR) e fosforilação oxidativa (ADP/O) em mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-} tratados ou não com lovastatina. Mitocôndrias de fígado de camundongos 0,5 mg/ml foram adicionadas ao meio de reação padrão acrescido de EGTA 0,1 mM na presença de substratos ligados ao NAD (malato + glutamato + α -cetoglutarato + piruvato) 5 mM. O estado 3 da respiração foi iniciado pela adição de 200 nmols ADP/mg proteína. Dados mostrados como média $\pm$ dp, n = 5.

Grupos	RC	ADP/O
LDLR ^{-/-}	4,34 $\pm$ 0,79	2,51 $\pm$ 0,34
LDLR ^{-/-} TRATADO	4,45 $\pm$ 0,64	2,52 $\pm$ 0,25

Queda de potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi$) e inchamento induzido pelo Ca²⁺ em mitocôndrias isoladas de camundongos controles e LDLR^{-/-}, tratados ou não com lovastatina

O processo de TPM foi investigado em camundongos controles e hipercolesterolêmicos, tratados ou não com lovastatina. A Figura 14 mostra que mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos controles (*linha a*) restabeleceram o potencial de membrana após quatro adições sequenciais de Ca²⁺ (25 nmol/ mg de proteína), já as mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos apresentaram baixa capacidade de sustentar o $\Delta\Psi$ após a terceira adição de Ca²⁺ (75 nmol) e perderam o $\Delta\Psi$ irreversivelmente após a quarta adição de Ca²⁺ (100 nmol). Estes resultados estão de acordo com dados prévios do nosso grupo, indicando que as mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos são mais suscetíveis à TPM (OLIVEIRA et al., 2005). A Figura 15 mostra o efeito de uma única adição de Ca²⁺ (100 nmol/mg de proteína); as mitocôndrias isoladas de camundongos controles mantiveram o $\Delta\Psi$ após o acúmulo de cálcio (Fig. 15, *linha a*), enquanto as mitocôndrias de camundongos hipercolesterolêmicos apresentaram queda do $\Delta\Psi$ (Fig.15, *linha b*). Surpreendentemente, o tratamento com lovastatina tornou

as mitocôndrias isoladas de camundongos hipercolesterolêmicos mais sensíveis ao colapso do potencial induzido por cálcio (Fig. 15, *linha c*).

Uma característica de mitocôndrias que sofrem transição de permeabilidade mitocondrial é a formação de um poro não-seletivo permeável a cátions, ânions e macromoléculas de até 1,4 kDa (KOWALTOWSKI et al., 1996A) o que causa inchamento mitocondrial. Este inchamento é traduzido em diminuição da turbidez da suspensão mitocondrial e pode ser acompanhado pela diminuição da absorbância no comprimento de onda de 520 nm. Os experimentos representados na Figura 16 mostram que mitocôndrias isoladas de fígado de animais hipercolesterolêmicos tratados com lovastatina (Fig. 16, *linha d*) incubadas em meio padrão contendo 100 μM de Ca^{2+} sofreram inchamento mais rápido quando comparadas com mitocôndrias de animais hipercolesterolêmicos não tratados (Fig. 16, *linha b*). Notadamente, as mitocôndrias isoladas de camundongos normocolesterolêmicos tratados com lovastatina (Fig. 16, *linha c*) também foram mais susceptíveis ao inchamento induzido pelo Ca^{2+} que mitocôndrias isoladas de controles não tratados (Fig. 16, *linha a*).

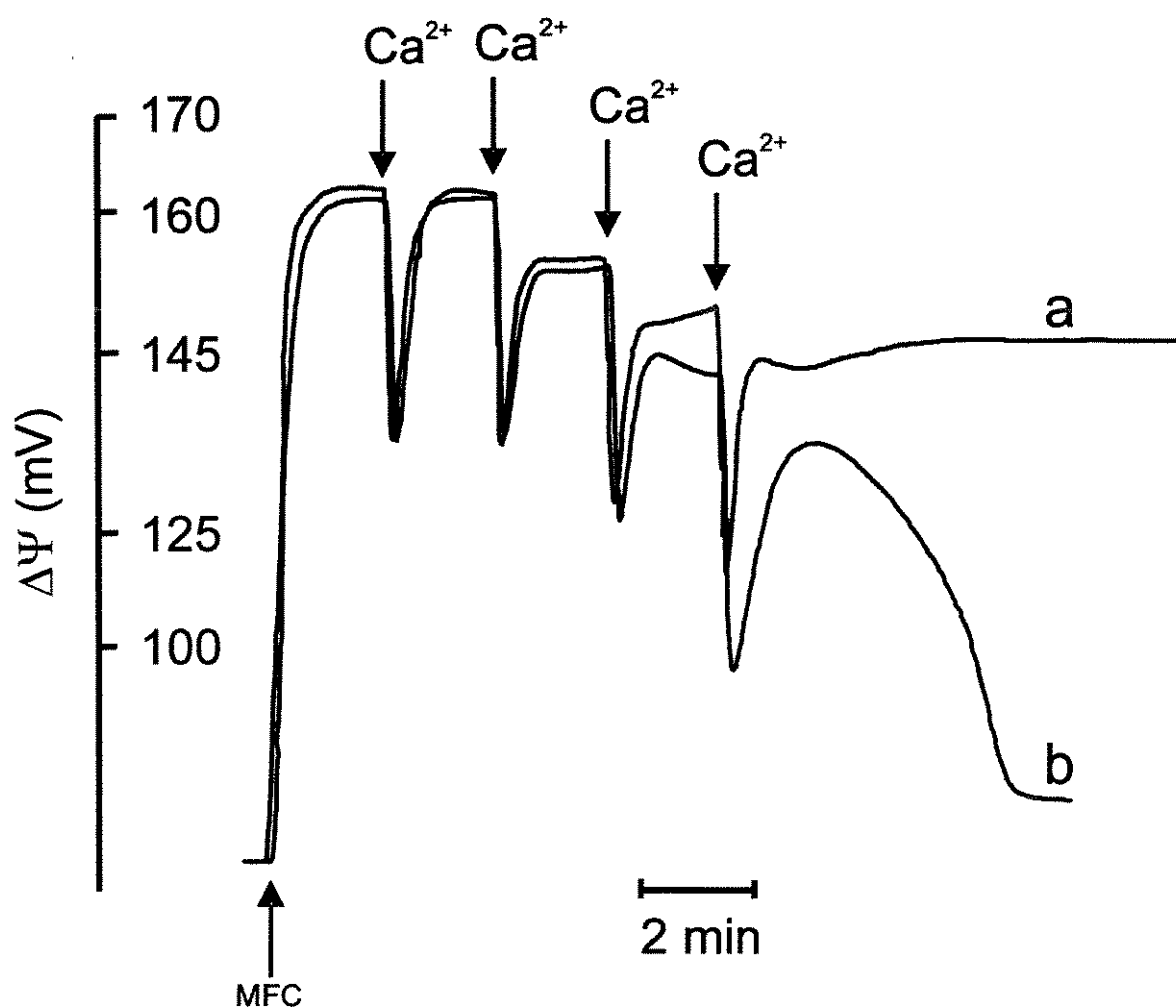


Figura 14- Mudanças no $\Delta\Psi$ induzidas por adições sequenciais de Ca^{2+} em mitocôndrias de fígado de camundongos controles e $\text{LDLR}^{-/-}$. MFC (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão contendo 3 μM TPP^+ . Adições de Ca^{2+} (25 nmol/mg de proteína) foram realizados onde indicado. Traços representam mitocôndrias de fígado isoladas a partir de: controles - camundongos C57Bl6 (*linha a*) e camundongos hipercolesterolêmicos (*linha b*). A figura é representativa de três experimentos independentes, realizados em duplicata. $\Delta\Psi$ em 12 min foi igual a $146,0 \text{ mV} \pm 2,8$ para o camundongo controle (*linha a*) vs. totalmente colapsado para o camundongo hipercolesterolêmico (*linha b*), $p < 0,001$.

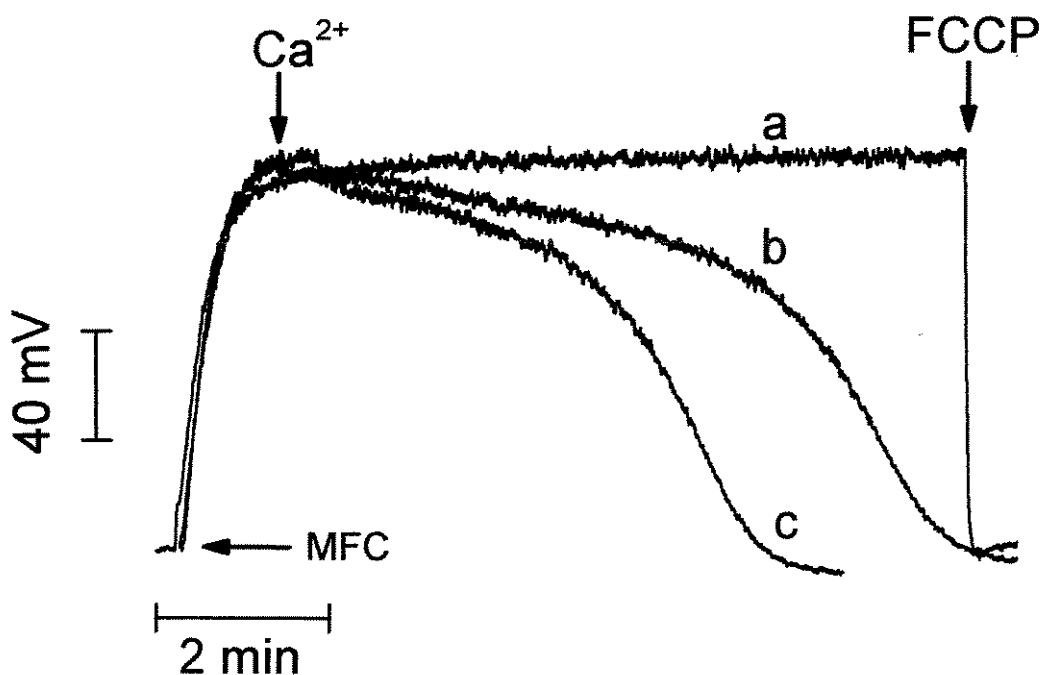


Figura 15- Efeito do tratamento com lovastatina, *in vivo*, sobre a perda do potencial transmembrânico mitocondrial induzido por Ca^{2+} . MFC (0,5 mg/ml) foram adicionadas ao meio de reação padrão acrescido de 5 μM de safranina. Ca^{2+} 100 μM e FCCCP 1 μM foram adicionados onde indicado. Traços representam mitocôndrias de fígado isoladas a partir de: camundongos controles (*linha a*), camundongos hipercolesterolêmicos (*linha b*) e camundongos hipercolesterolêmicos tratados com lovastatina (*linha c*). A figura é representativa de seis experimentos independentes realizados em duplicata. $\Delta\Psi$ em 5 min foi igual a $146,0 \text{ mV} \pm 2,8$ (*linha a*) vs. $141,0 \text{ mV} \pm 1,8$ (*linha b*), e totalmente colapsado (*linha c*), $p < 0,001$.

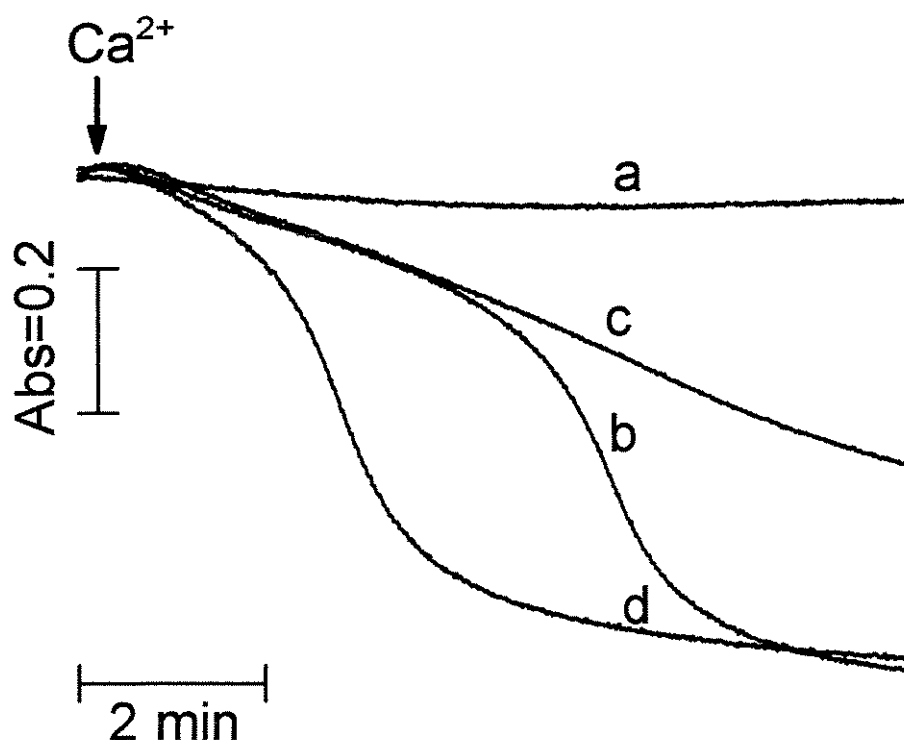


Figura 16- Efeito do tratamento com lovastatina, in vivo, sobre o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} . MFC (0,5 mg/ml) foram adicionadas ao meio de reação padrão e Ca^{2+} 100 μM foi adicionado onde indicado. Traços representam mitocôndrias de fígado isoladas a partir de: camundongos controles (*linha a*), camundongos hipercolesterolêmicos (*linha b*), camundongos controles tratados com lovastatina (*linha c*) e camundongos hipercolesterolêmicos tratados com lovastatina (*linha d*). A figura é representativa de seis experimentos independentes, realizados em duplicata. A absorbância em 5 minutos foi de: $1,481 \pm 0,028$ (*linha a*), $1,255 \pm 0,046$ (*linha b*) e $0,953 \pm 0,063$ (*linha d*), $p < 0,001$.

Queda do potencial elétrico de membrana e inchamento mitocondrial induzido pela lovastatina *in vitro*

Para checar se os efeitos da lovastatina *in vivo* seriam uma consequência da ação direta deste fármaco sobre a mitocôndria, nós conduzimos experimentos *in vitro*, utilizando mitocôndrias isoladas de camundongos ou ratos. Conforme pode ser observado nas Figuras 17 e 18, a adição de lovastatina ao meio de incubação promoveu colapso do $\Delta\Psi$ em mitocôndrias de músculo (Fig. 17, *linha b*) e de fígado (Fig. 18, *linha b*) de camundongos controles. O mesmo efeito, observado em mitocôndrias de camundongos, foi constatado em mitocôndrias de ratos: lovastatina promoveu queda do $\Delta\Psi$ (Fig. 19, *linha b*) e inchamento mitocondrial (Fig. 20, *linhas b-f*). Esses efeitos da lovastatina foram inibidos pela ciclosporina A (Figs. 17, 18 e 19: *linha c*; Fig. 20: *linha g*), um inibidor de ciclofilina, que previne a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. O experimento mostrado na Figura 20 revela que o inchamento mitocondrial induzido pela lovastatina é dose-dependente, na faixa de 10 - 80 μM (*linhas b-f*). Desde que mitocôndrias de camundongos e ratos responderam a ação da lovastatina de forma similar, nós realizamos os experimentos seguintes utilizando mitocôndrias de fígado de ratos.

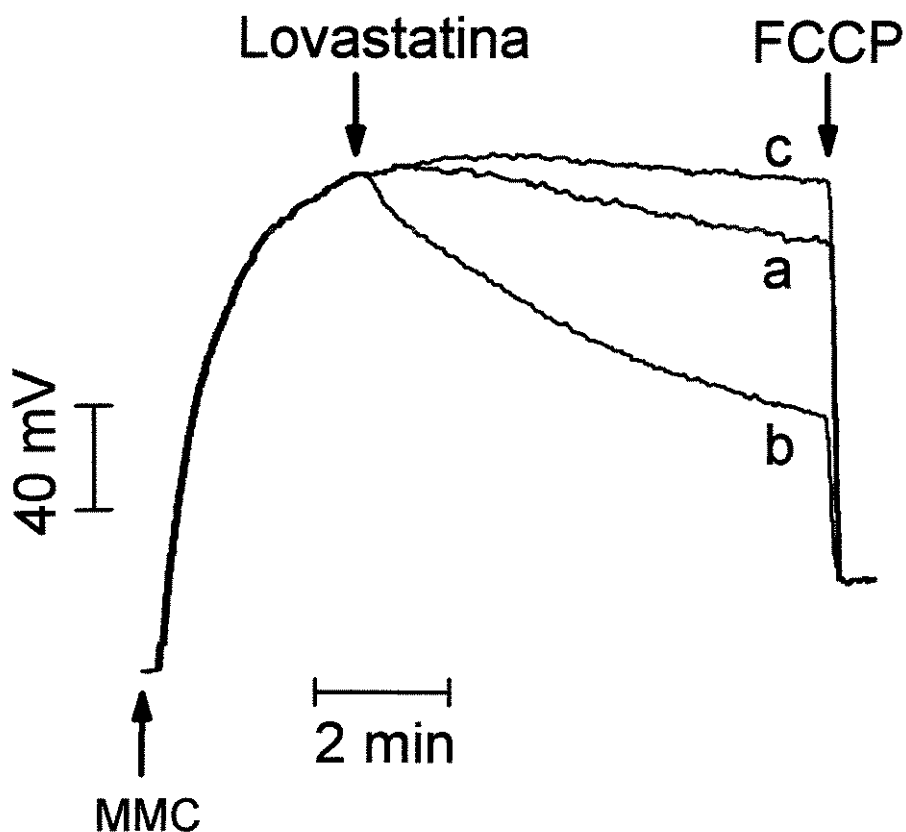


Figura 17- Lovastatina induz a perda do potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de músculo de camundongos. MMC (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão contendo substratos ligados ao NAD^+ (α -cetoglutarato, piruvato, malato e glutamato) 5 mM e safranina 5 μM (*linha a*), mais lovastatina 40 μM (*linha b*) acrescido de 1 μM de ciclosporina A (*linha c*). FCCP 1 μM foi adicionado onde indicado. A figura é representativa de três experimentos independentes, realizados em duplicata. $\Delta\Psi$ em 7 min foi: 154,0 mV $\pm$ 3,1 (*linha a*), vs. 99,0 mV $\pm$ 5,0 (*linha b*), ou 166,0 mV $\pm$ 4,1 (*linha c*), $p < 0,001$.

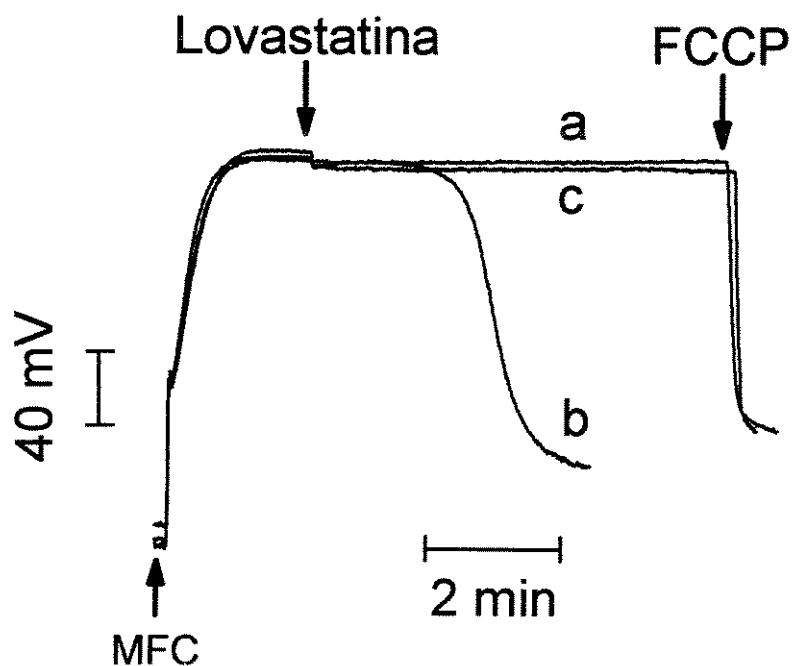


Figura 18- Colapso do potencial de membrana induzido pela lovastatina, *in vitro*, em mitocôndrias de fígado de camundongos. MFC (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão contendo safranina 5 μM (*linha a*), mais lovastatina 40 μM (*linha b*) acrescido de 1 μM de ciclosporina A (*linha c*). FCCP 1 μM foi adicionado onde indicado. A figura é representativa de três experimentos independentes, realizados em duplicata. $\Delta\Psi$ em 7 min foi de: 169,0 mV $\pm$ 3,0 (*linha a*) vs. totalmente colapsado (*linha b*) , e 170,0 mV $\pm$ 2,7 (*linha c*), $p < 0,001$.

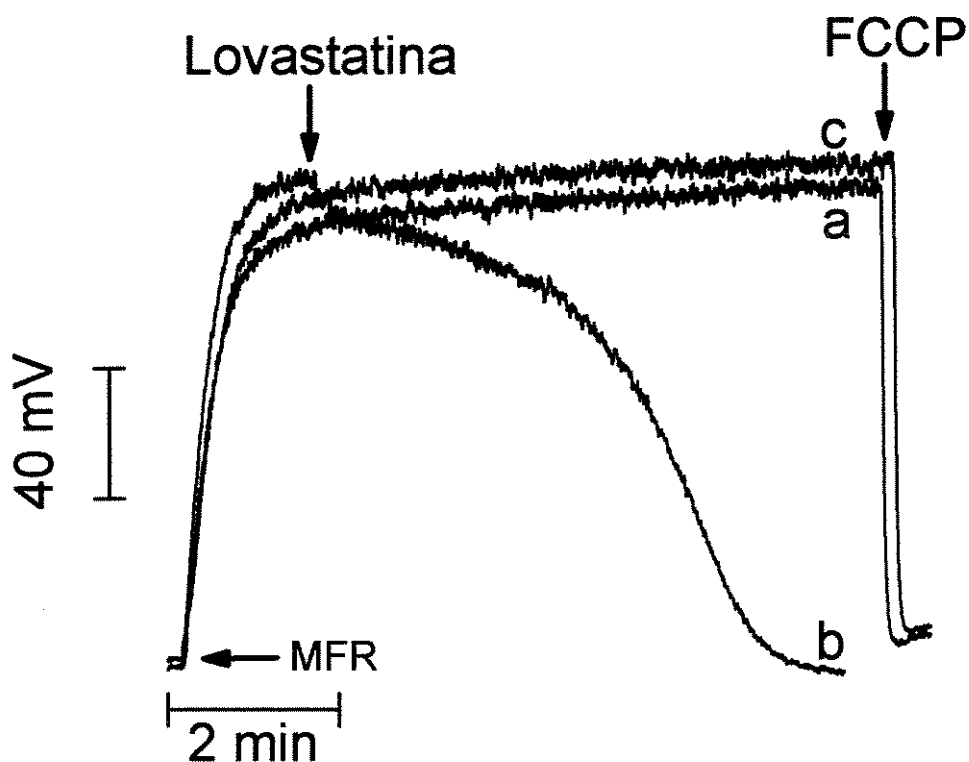


Figura 19- Colapso do potencial de membrana mitocondrial induzido pela lovastatina em mitocôndrias de fígado de rato. MFR (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão contendo safranina 5 μM (*linha a*), mais lovastatina 40 μM (*linha b*), acrescido de ciclosporina A 1 μM (*linha c*). FCCP 1 μM foi adicionado onde indicado. A figura é representativa de dez experimentos independentes, realizados em duplicata. $\Delta\Psi$ em 7 min foi de: 164,0 mV $\pm$ 3,9 (*linha a*) vs. totalmente colapsado (*linha b*), ou 166,3 mV $\pm$ 4,1 (*linha c*), $p < 0,001$.

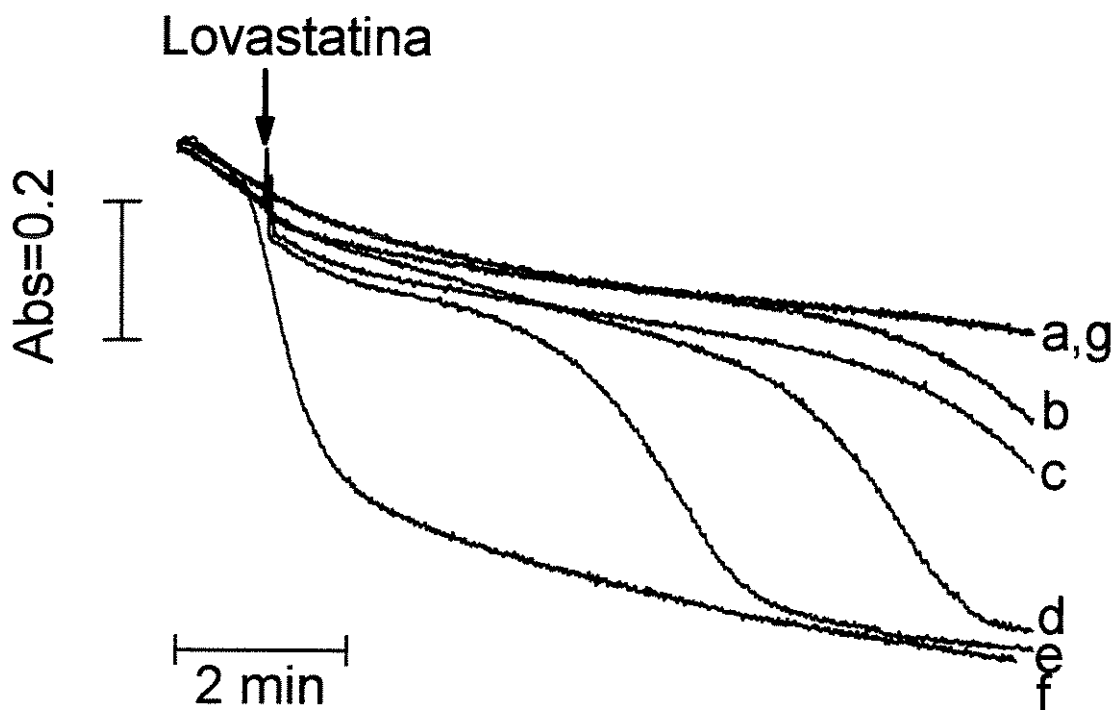


Figura 20- Efeito dose-dependente da lovastatina sobre o inchamento mitocondrial. MFR (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão contendo: 0, 10, 20, 30, 40 e 80 μ M de lovastatina, respectivamente *linhas a-f*, ou lovastatina 80 μ M acrescido de 1 μ M de ciclosporina A (*linha g*). A figura é representativa de seis experimentos independentes, realizados em duplicata. A absorbância em 8 minutos foi de: $1,453 \pm 0,040$ (*linha b*), $1,330 \pm 0,040$ (*linha c*), $1,172 \pm 0,042$ (*linha d*), $1,119 \pm 0,018$ (*linha e*), $1,074 \pm 0,049$ (*linha f*) vs. $1,529 \pm 0,035$ (*linha a*), $p < 0,001$.

DTT, ADP, EGTA e catalase inibem o inchamento mitocondrial induzido pela lovastatina

O mecanismo pelo qual a lovastatina induz a TPM foi adicionalmente investigado. A Figura 21 mostra que o EGTA (*linha c*) quelante de Ca^{2+} , inibiu totalmente o inchamento mitocondrial induzido pela lovastatina (*linha b*), indicando que este inchamento mitocondrial é Ca^{2+} -dependente. O inchamento mitocondrial foi também prevenido pela presença de ADP/oligomicina (*linha e*). A oligomicina foi utilizada para inibir a fosforilação do ADP, o qual se liga bloqueando o translocador de nucleotídeos de adenina, um possível componente do poro de TPM (HALESTRAP et al., 1997). A adição de catalase inibiu parcialmente o inchamento mitocondrial induzido pela lovastatina (*linha d*), sugerindo a participação de H_2O_2 neste processo. Ditioneitol (DTT, *linha f*), um redutor de dissulfeto, também inibiu o inchamento mitocondrial na presença de lovastatina. O efeito do DTT sugere que a oxidação de grupos tióis de proteínas está envolvida nesta permeabilização.

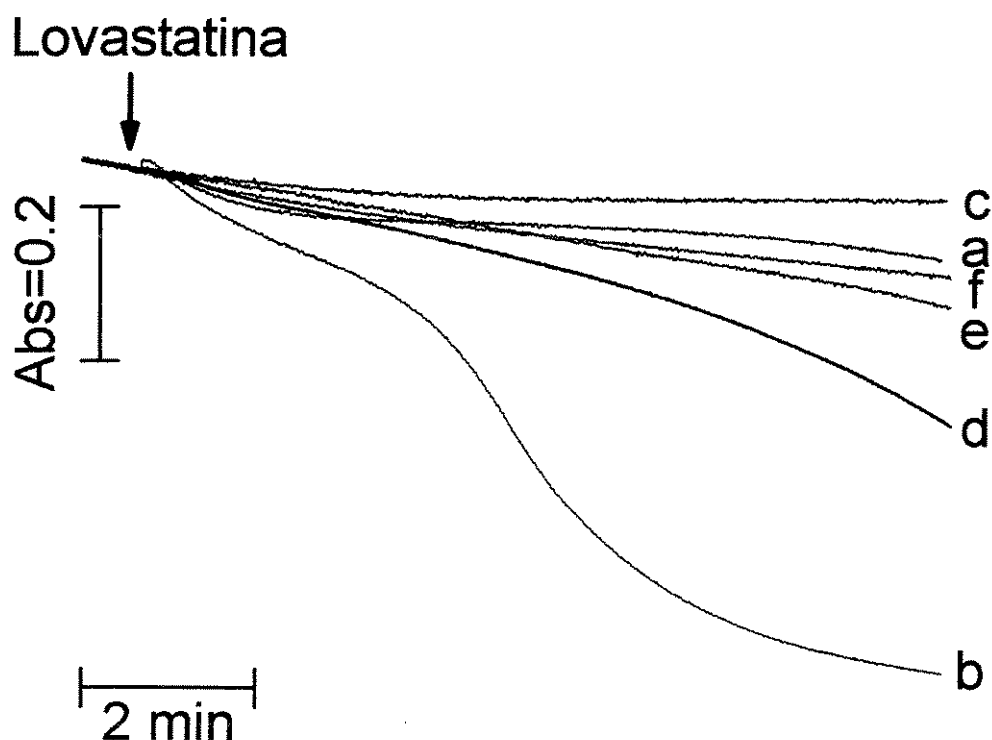


Figura 21- Efeito de EGTA, DTT, ADP e catalase sobre o inchamento mitocondrial induzido pela lovastatina. MFR (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão contendo lovastatina 40 µM (*linha b*) na presença de: 500 µM EGTA (*linha c*), 2 µM de catalase (*linha d*), 500 µM de ADP mais 1 µg/ml de oligomicina (*linha e*) ou 500 µM de ditioneitol (*linha f*). *Linha a* representa o controle. A figura é representativa de seis experimentos independentes, realizados em duplicata. A absorbância em 7 minutos foi de: $1,573 \pm 0,043$ (*linha a*), $1,122 \pm 0,033$ (*linha b*), $1,625 \pm 0,063$ (*linha c*), $1,470 \pm 0,038$ (*linha d*), $1,539 \pm 0,033$ (*linha e*), $1,566 \pm 0,038$ (*linha f*). *Linha b* (lovastatina) diferiu significativamente ($p < 0,001$) dos outros grupos (*a, c, d, e, f*).

Lovastatina induz oxidação de grupos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial

A participação do processo de oxidação de grupos tiólicos no mecanismo de indução de TPM pela lovastatina foi examinada através da determinação do conteúdo de grupos -SH de proteínas da membrana mitocondrial. Resultados apresentados na Tabela 2 indicam que há uma significativa diminuição no conteúdo de -SH, quando a suspensão mitocondrial é incubada na presença de lovastatina. Ambos inibidores da TPM, ADP e DTT preveniram a oxidação de grupos tiólicos. Como esperado e de acordo com resultados prévios do laboratório (Bernardes et al., 1994) a ciclosporina A apesar de inibir a abertura do poro não inibiu a oxidação de grupos tiólicos de proteínas.

Tabela 2- Oxidação de grupos tióis promovida por lovastatina e Ca^{2+} : prevenção por ADP e DTT. MFR (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão nas condições acima especificadas, durante 10 minutos, a seguir foi retirado uma alíquota para dosagem de -SH, conforme descrito em materiais e métodos.
* $p < 0,05$ quando comparado lovastatina com outras condições, exceto lovastatina + CsA (#, $p > 0,05$).

Condição	-SH (nmol/mg proteína)
100 μM EGTA	46 ± 0.7
Sem adição	40 ± 0.5
40 μM Lovastatina	$18 \pm 0.2^*$
40 μM Lovastatina + 0.5 mM DTT	44 ± 0.4
40 μM Lovastatina + 0.5 mM ADP	38 ± 0.6
40 μM Lovastatina + 1 μM CsA	$19 \pm 0.4^\#$

Efeito comparativo de diferentes estatinas sobre o inchamento mitocondrial

A figura 22 mostra que a lovastatina e a sinvastatina (estatinas hidrofóbicas) apresentaram efeitos similares para induzir inchamento mitocondrial (*linhas b e c*), na presença de Ca^{2+} . Entretanto o efeito da pravastatina (estatina hidrofílica, *linha d*) foi significativamente menor.

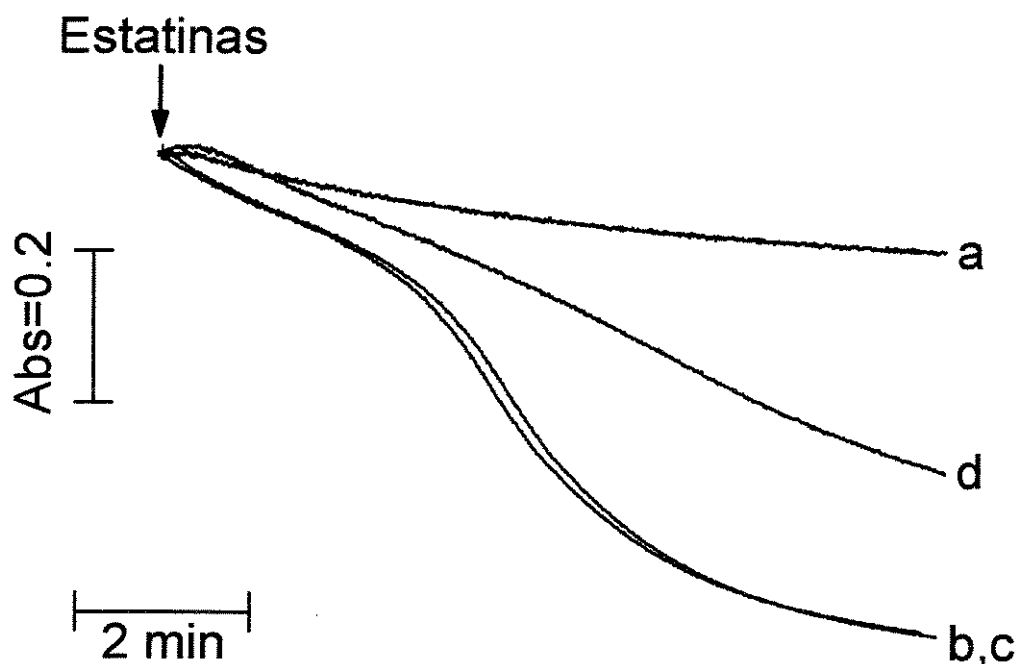


Figura 22- Efeito comparativo da lovastatina, pravastatina e sinvastatina sobre o inchamento mitocondrial. MFR (0,5 mg/ ml) foram incubadas em meio de reação padrão contendo 40 μM de lovastatina (*linha b*), sinvastatina (*linha c*), ou pravastatina (*linha d*). *Linha a* representa o controle. A figura é representativa de seis experimentos independentes, realizados em duplicata. A absorbância em 7 minutos foi de: $1,555 \pm 0,042$ (*linha a*), $1,270 \pm 0,020$ (*linha b*), $1,017 \pm 0,055$ (*linha c*), $1,026 \pm 0,060$ (*linha d*). *Linha a* é significativamente diferente ($p < 0,001$) das outras linhas (*b, c, d*).

5- DISCUSSÃO

O infarto do miocárdio, em consequência do processo de aterosclerose, é uma das principais causas de morte nas sociedades ocidentais (LIBBY, 2005), e altas concentrações plasmáticas de LDL estão intimamente relacionadas a este fenômeno. Numerosos estudos têm relacionado o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) com a formação de lesões vasculares (ROSS, 1999) através do mecanismo de oxidação de LDL (PATEL et al., 2000), uma das mais consistentes hipóteses para a aterogênese (STEINBERG, 1993).

As mitocôndrias representam o principal sítio intracelular de geração de EROs e são também alvos biológicos potenciais destas espécies. Entretanto, a mitocôndria possui um eficiente sistema de defesa antioxidante, assim em condições fisiológicas as EROs geradas são detoxificadas por esse sistema.

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 em uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, um fenômeno conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). 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 & SZABO, 1995). Vários estudos demonstram que a TPM representa um passo inicial para a morte celular, tanto por necrose como por apoptose (POLYAK et al., 1997; KIM et al., 2003; ARGRAUD et al., 2005).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa começou a investigar a função mitocondrial em modelos de hipercolesterolemia, obtendo resultados indicativos de que mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos, por deficiência do receptor de LDL (LDLR^{-/-}), apresentam maior susceptibilidade à TPM. Esta maior susceptibilidade a TPM ficou evidente pela menor resistência destas mitocôndrias ao inchamento e a perda do potencial eletroquímico de membrana mitocondrial induzida pelo Ca²⁺. A maior susceptibilidade das mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} à abertura do poro de TPM parece estar relacionada a menor capacidade destas mitocôndrias em manter o conteúdo de NAD(P)H no estado reduzido (OLIVEIRA et al., 2005).

No presente trabalho, em continuidade à investigação da função mitocondrial e estresse oxidativo em camundongos hipercolesterolêmicos LDLR^{-/-}, nós observamos que a adição de catalase exógena previniu a oxidação espontânea de NAD(P)H em mitocôndrias de fígado de camundongos destes animais. Este resultado indica que esta oxidação é mediada pelo H₂O₂ gerado na mitocôndria. Isto nos levou a investigar se havia diferenças na produção mitocondrial de EROs entre animais controles e hipercolesterolêmicos. Nossos resultados mostraram que mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-} apresentam geração de ânion superóxido similar a controles, no entanto detectou-se uma maior liberação de H₂O₂ em mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-}. Postulamos que essa maior liberação de H₂O₂ poderia estar acontecendo em função de uma deficiência no processo de detoxificação mitocondrial de EROs.

A mitocôndria contém Mn-superóxido dismutase (DOONAN et al., 1984) capaz de promover a dismutação do O₂^{•-} a H₂O₂, que pode ser detoxificado pela glutathione peroxidase (GPx) (SEIS AND MOSS, 1978) utilizando glutathione (GSH), a qual é oxidada no processo. A forma oxidada da glutathione pode novamente ser reduzida pela glutathione redutase (GR), através de um mecanismo que consome poder redutor na forma de NADPH.

Verificamos que mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-} e controles não apresentam diferenças significativas de atividade do sistema GPx/GR. No entanto, detectamos uma diminuição da razão GSH/GSSG em mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-}, o que implica num comprometimento da capacidade do sistema GPx/GR em detoxificar o H₂O₂. Uma causa para diminuição da razão GSH/GSSG em mitocôndrias de camundongos LDLR^{-/-} pode ser a redução da disponibilidade de NADPH, coenzima da glutathione redutase, observada nestas mitocôndrias ao longo do processo de incubação *in vitro*.

A incapacidade das mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-} em manter os níveis de NADPH sugere a existência de um menor conteúdo de substratos redutores desta coenzima nestes animais. Esta hipótese foi confirmada em experimentos, os quais mostraram que mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos, quando incubadas na ausência de substratos exógenos, apresentam

menor velocidade de respiração em relação a controles. A adição de isocitrato ao meio de reação levou os dois grupos a uma mesma velocidade de respiração, o que indica que ambas as mitocôndrias são igualmente funcionais e que o limitante para a velocidade respiratória é o conteúdo de substratos endógenos. Adicionalmente, nós determinamos a concentração de isocitrato e de seus precursores diretos, e observamos que mitocôndrias isoladas de camundongos LDLR^{-/-} apresentam uma diminuição de 40 % destes substratos quando comparadas a controles.

Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que a maior susceptibilidade dos animais LDLR^{-/-} ao estresse oxidativo é devida ao menor conteúdo de substratos respiratórios endógenos desses animais, principalmente aqueles ligados à redução da coenzima NADP. Resultados prévios do nosso laboratório (OLIVEIRA et al., 2005) permitem especular que a diminuição do conteúdo de substratos respiratórios endógenos seja causada pela maior síntese de colesterol observado nestes animais. Para a biosíntese de 1 mol de colesterol são necessários 24 mols de NADPH (GAYLOR, 2002). A elevação na síntese de colesterol pode desencadear um desvio do poder redutor da mitocôndria para o citosol via mecanismo de lançadeiras de substratos, principalmente a citrato-malato (DELVIN, 2000). A deficiência na concentração mitocondrial de citrato, levaria a diminuição dos níveis de isocitrato, que por sua vez comprometeria a produção de NADPH pela isocitrato desidrogenase, deixando o sistema enzimático antioxidante mitocondrial deficiente (vide Figura 23). De fato, as duas principais vias de produção de NADPH na mitocôndria são a isocitrato desidrogenase (JO et al., 2001) e a NAD(P) - transidrogenase (HOEK et al., 1998).

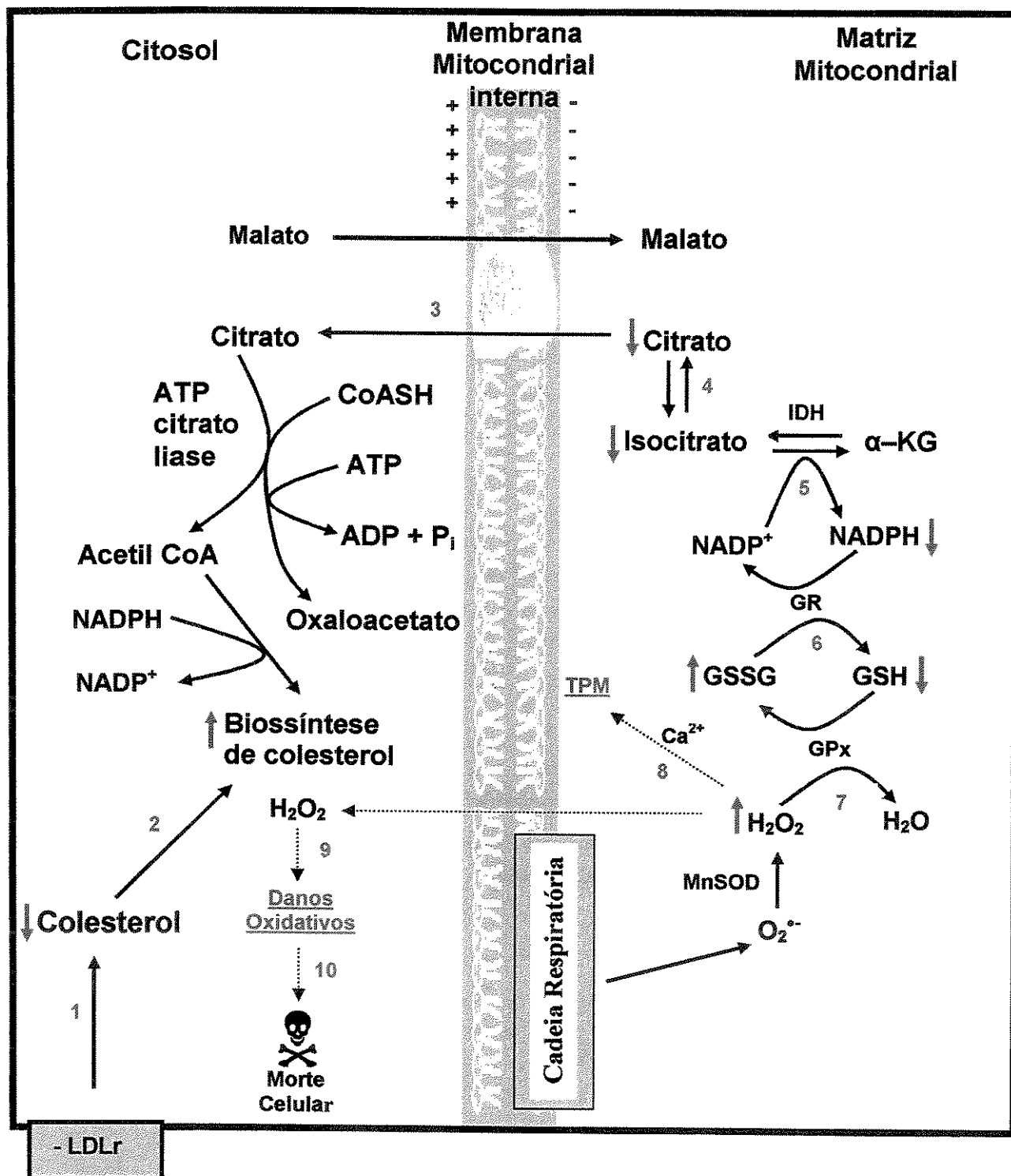


Figura 23- Modelo proposto para explicar o estado de estresse oxidativo mitocondrial em camundongos hipercolesterolêmicos (LDLR^{-/-}). A ausência de receptores para a captação de LDL (-LDLr) ocasiona uma diminuição dos níveis intracelulares de colesterol (1), o que estimula a sua biossíntese (2). NADPH e citrato são consumidos na biossíntese de colesterol, resultando na redução dos níveis mitocondriais de citrato (3) e isocitrato (4), conseqüentemente. A queda na concentração de isocitrato compromete a produção de NADPH, a partir da desidrogenação deste substrato pela isocitrato desidrogenase (IDH) (5), um dos principais mecanismos de produção de poder redutor, na forma de NADPH pela mitocôndria. A diminuição dos níveis de NADPH compromete o processo de redução da glutatona oxidada (GSSG) pela glutatona redutase (GR) (6). Em função da diminuição dos níveis de glutatona reduzida, substrato da glutatona peroxidase (GPx), a detoxificação de H₂O₂ fica comprometida (7). H₂O₂ acumula-se levando a TPM na presença de Ca²⁺ (8) e outros danos oxidativos celulares (9), que podem resultar na morte celular (10). α -KG: α -cetoglutarato; MnSOD: superóxido dismutase dependente de manganês. As setas em vermelho indicam aumento ou diminuição de processos ou concentração de compostos no hepatócito de camundongos LDLR^{-/-}.

Dado os efeitos benéficos da suplementação de mitocôndrias com isocitrato *in vitro*, nosso grupo de pesquisa testou o efeito do tratamento de camundongos LDLR^{-/-} com citrato, durante duas semanas. Notadamente foi observado que mitocôndrias isoladas de camundongos hipercolesterolêmicos tratados com citrato apresentam maior capacidade em manter o poder redutor na forma de NAD(P)H (PAIM, VELHO, CASTILHO, OLIVEIRA & VERCESI, dados não publicados), revertendo parcialmente à disfunção mitocondrial encontrada em hepatócitos desses animais.

Nós mostramos também que fígados de camundongos LDLR^{-/-} apresentam níveis de grupo carbonila, produto de oxidação de proteínas, significativamente maiores que controles, um forte indício que este modelo animal apresenta a condição de estresse oxidativo *in vivo*.

O estado de estresse oxidativo originado na mitocôndria pode contribuir para a oxidação de lipoproteínas, que juntamente com o aumento da susceptibilidade a morte celular induzida por TPM podem levar ao desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Além

do mais, nós acreditamos que o estresse oxidativo mitocondrial e a alta susceptibilidade à TPM representam fatores que contribuem efetivamente para a extensão de lesões teciduais relatadas em pacientes com hipercolesterolemia familiar vitimados com processos fisiopatológicos que envolvem isquemia-reperfusão, como o infarto do miocárdio.

Em uma segunda parte do trabalho, nós hipotetizamos que a inibição da síntese de colesterol através do tratamento de camundongos hipercolesterolêmicos com estatinas poderia restaurar a capacidade antioxidante destes animais. No entanto, nossos resultados mostraram que o tratamento com lovastatina torna as mitocôndrias de fígado de camundongos LDLR^{-/-} mais susceptíveis ao processo de estresse oxidativo. Notadamente, mitocôndrias de camundongos controles tratados com lovastatina também se apresentaram mais susceptíveis ao processo de TPM, sugerindo que estes fármacos possuem atuação direta na indução deste fenômeno.

Utilizando organelas isoladas de camundongos e ratos, nós demonstramos que estatinas podem exercer efeitos diretos em mitocôndrias de músculo e fígado. Lovastatina induziu a TPM de forma dose-dependente. Demonstramos que este fenômeno está associado com a oxidação de grupos tiólicos de proteínas de membrana, mas o mecanismo exato desta oxidação é desconhecido. No entanto, o envolvimento de espécies reativas de oxigênio no processo de TPM induzido pela lovastatina é claramente demonstrado em função da inibição parcial do inchamento mitocondrial induzido por estatinas na presença de catalase.

Lovastatina poderia atuar inibindo uma das tiol redutases da mitocôndria. Alternativamente, lovastatina poderia estimular a óxido nítrico sintase (NOS) mitocondrial, como previamente mostrado para a NOS endotelial (CASTRO et al., 2004; YOKOYAMA et al., 2005). Na ausência ou deficiência de substratos/cofatores, a NOS gera superóxido ao invés de NO (XIA et al., 1996).

Estatinas hidrofóbicas foram mais potentes que estatinas hidrofílicas em induzir a TPM, provavelmente em função da diferença de afinidade desses compostos em interagir com sítios críticos da membrana mitocondrial interna.

Tem sido proposto que o Ca^{2+} altera a reatividade de grupos tiólicos de proteínas de membrana a reagentes tiólicos (BERNARDES et al., 1994) e diretamente regula a abertura do poro de TPM (ZORATTI AND SZABO, 1995). O papel central do Ca^{2+} no mecanismo de ação de estatinas sobre as mitocôndrias é ainda suportado por estudos que mostram que as estatinas induzem alteração na homeostase intracelular deste cátion. Aumento na concentração do Ca^{2+} citosólico tem sido descrito em cultura de mioblastos tratados com sinvastatina (NAKAHARA et al., 1994), em músculos esqueléticos de ratos tratados com sinvastatina (PIERNO et al., 1999) e em fibras de músculo esquelético humano tratado com sinvastatina (SIRVENT et al., 2005).

Estatinas induzem apoptose em células de cultura e em alguns casos a apoptose ocorre via mitocôndria (MUTOH et al., 1999; KANETA et al., 2003; WENER et al., 2004). Embora este efeito tem sido considerado como ação potencial anti-câncer de estatinas (CAFFORIO et al., 2005), o mesmo pode ser visto como um efeito citotóxico.

O mecanismo pelo qual a mitocôndria poderia estar envolvida na morte celular induzida por estatinas ainda não é bem claro. Efeitos das estatinas *in vivo* e *in situ* podem também ser secundários às mudanças metabólicas induzidas pela inibição da HMG-CoA redutase.

A indução de TPM por estatinas, observada neste estudo, pode estar relacionada à indução de apoptose em células de cultura e aos efeitos adversos desses fármacos.

Durante o tratamento de pacientes com estatinas, as complicações mais freqüentes incluem danos à função hepática, músculo esquelético e nervos periféricos (MUSCARI, 2002). Miopatia é o efeito adverso mais comum do tratamento com estatinas, e é um fenômeno dose-dependente (ROSENSON, 2004). Estudos epidemiológicos mostram que a incidência de toxicidade muscular ocorre em 1 – 7 % dos pacientes tratados com estatinas (UCAR et al., 2000), sendo que este índice sobe para 25 % quando se avalia o grupo de usuários de estatinas praticantes de exercícios físicos regulares (DIRKS & JONES, 2006). Miopatia severa ocorre na faixa de 0,1 a 0,5 % com monoterapia (HODEL, 2002); entretanto, sinais de danos oxidativos sistêmicos podem ser detectados em 10 % dos pacientes tratados com estatinas (SINZINGER et al., 2002).

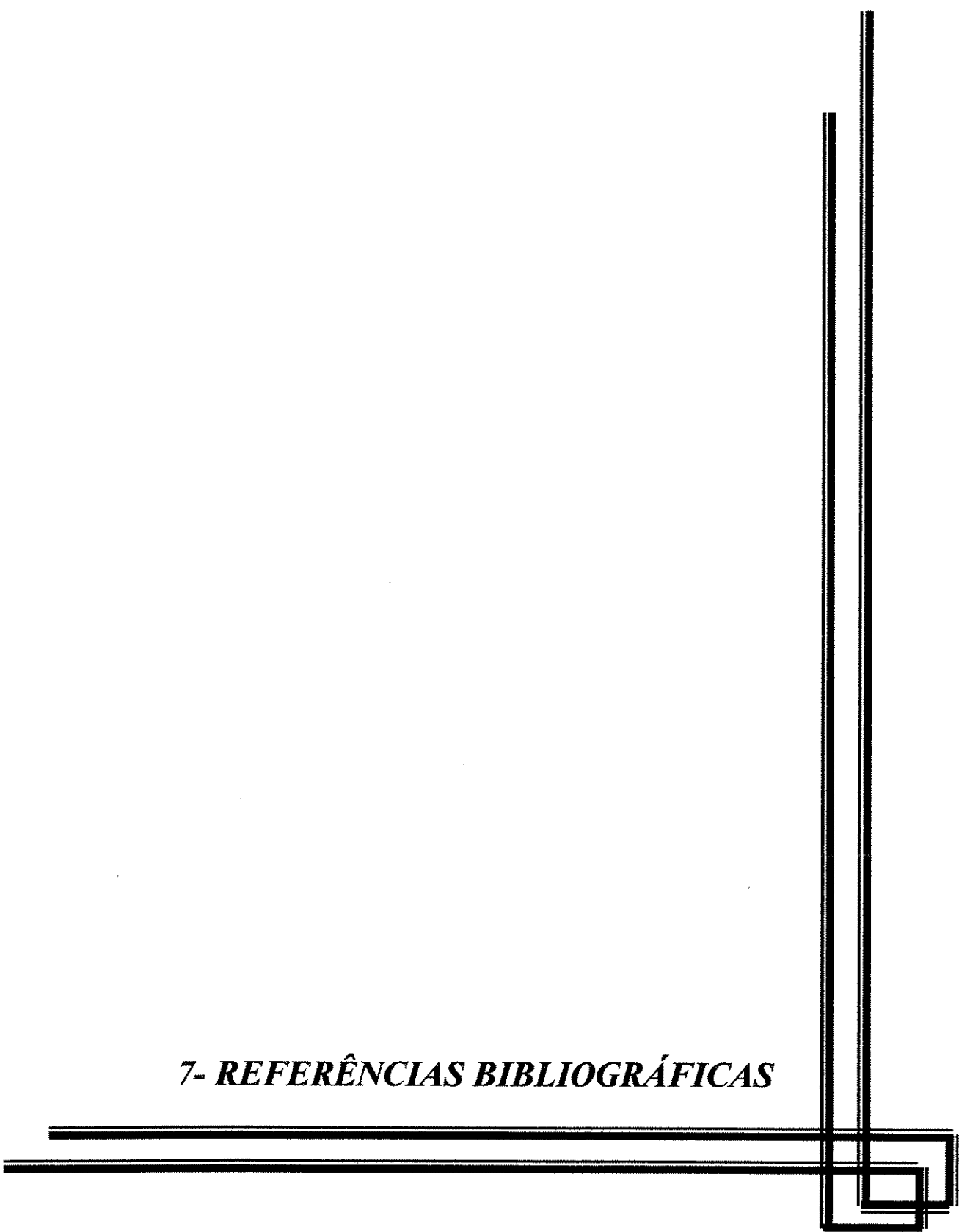
Estatinas inibem a síntese do mevalonato, um precursor da ubiquinona, a qual atua como transportadora de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e ainda representa função de antioxidante intra e extracelular (HARGREAVES, 2003). De fato, existem estudos que mostram diminuição dos níveis plasmáticos de coenzima Q₁₀, a forma predominante de ubiquinona em humanos, em pacientes tratados com estatinas quando comparados com controles não tratados (BELICHARD et al., 1993).

Os resultados observados neste trabalho nos permitem especular que a administração de inibidores do poro de TPM juntamente com estatinas poderia diminuir ou até eliminar os danos teciduais constatados em pacientes susceptíveis a miopatia e hepatotoxicidade induzidas por estatinas.

6- CONCLUSÕES

- ✓ Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos hipercolesterolêmicos (LDLR^{-/-}) apresentam deficiência do sistema antioxidante dependente de NADPH, em função do reduzido teor de substratos respiratórios endógenos destas organelas, o que limita o processo de detoxificação de espécies reativas de oxigênio.
- ✓ O comprometimento do sistema antioxidante mitocondrial em hepatócitos de camundongos LDLR^{-/-} implica em maior liberação de H₂O₂, maior susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial na presença de Ca²⁺ e lesões oxidativas teciduais.
- ✓ O tratamento de camundongos hipercolesterolêmicos (LDLR^{-/-}) com lovastatina aumenta a susceptibilidade de mitocôndrias hepáticas à transição de permeabilidade induzida pelo Ca²⁺.
- ✓ Estatinas podem atuar diretamente na mitocôndria, *in vitro*, induzindo transição de permeabilidade mitocondrial Ca²⁺-dependente, por um mecanismo relacionado à oxidação de grupos tiólicos de proteínas de membrana. Este processo é dose dependente e mais pronunciado por estatinas hidrofóbicas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- AKERMAN, K.E.O., WIKSTRON, K.F. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett**, 68:191-7, 1976.
- ARGAUD, L., GATEAU-ROESCH, O., MUNTEAN, D., CHALABREYSSE, L., LOUFOUAT, J., ROBERT, D., OVIZE, M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. **J Mol Cell Cardiol**, 38:367-74, 2005.
- BALLANTYNE, C.M. Clinical trial endpoints: angiograms, events, and plaque instability. **Am J Cardiol**, 82:5M-11M, 1998.
- BATES, T.E., LOESCH, A., BURNSTOCK, G., CLARK, J.B. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. **Biochem Biophys Res Commun**, 213:896-900, 1995.
- BELICHARD, P., PRUNEAU, D., ZHIRI, A. Effect of a long-term treatment with lovastatin or fenofibrate on hepatic and cardiac ubiquinone levels in cardiomyopathic hamster. **Biochim Biophys Acta**, 1169:98-102, 1993.
- BERLETT, B.S., STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J Biol Chem**, 272:20313 -16, 1997.
- BERLINER, J.A., HEINECKE, J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Radic Biol Med**, 20:707-27, 1996.
- BERNARDES, C.F., MEYER-FERNANDES, J.R., BASSERES, D.S., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. Ca^{2+} -dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4-diisothiocyanatostilbene-2,2-disulfonic acid (DIDS). **Biochim Biophys Acta**, 1188:93-100, 1994.
- BISGAIER, C.L., ESSENBURG, A.D., AUERBACH, B.J., PAPE, M.E., SEKERKE C.S., GEE, A., WOLLE, S., NEWTON, R.S. Attenuation of plasma low density lipoprotein cholesterol by select 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in mice devoid of low density lipoprotein receptors. **J Lipid Res**, 38:2502-15, 1997.
- BLIZNAKOV, E.G. Lipid-lowering drugs (statins), cholesterol, and coenzyme Q10. The Baycol case-a modern Pandora's box. **Biomed Pharmacother**, 56:56-9, 2002.

- BOUCHER, K., SIEGEL, C.S., SHARMA, P., HAUSCHKA, P.V., SOLOMON K.R. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in pericytes. **Microvasc Res**, 71: 91–102, 2006.
- BOVERIS, A., CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, 134:707-16, 1973.
- BROEKEMEIER, K.M., DEMPSEY, M.E., PFEIFFER, D.R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. **J Biol Chem**, 264:7826-30, 1989.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.I. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, 232:34-47, 1986.
- CAFFORIO P., DAMMACCO F., GERNONE A., SILVESTRIS F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. **Carcinogenesis**, 26:883-91, 2005.
- 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+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radic Biol Med**, 18:479-86, 1995.
- CASTRO, M.M., RIZZI, E., RASCADO, R.R., NAGASSAKI, S., BENDHACK, L.M., TANUS-SANTOS, J.E. Atorvastatin enhances sildenafil-induced vasodilation through nitric oxide-mediated mechanisms. **Eur J Pharmacol**, 498:189-94, 2004.
- CESAR, C., WILSON, J.E. All three isoforms of the voltage-dependent anion channel (VDAC1, VDAC2, and VDAC3) are present in mitochondria from bovine, rabbit, and rat brain. **Arch Biochem Biophys**, 422:191-96, 2004.
- CROMPTON, M., VIRJI, S., WARD, J.M. Cyclophilin-D binding proteins. **Biochem Soc Trans**, 26:330, 1998.
- DE PINIEUX, G., CHARLOT, P., AMMI-SAID, M., LOUARN, F., LEJONC, J.L., ASTIER, A., JACOTOT, B., GHERARDI, R. Lipid-lowering drugs and mitochondrial function: effects of HMG-CoA reductase inhibitors on serum ubiquinone and blood lactate/pyruvate ratio. **Br J Clin Pharmacol**, 42:333-37, 1996.

DEMYANETS S., KAUN C., PFAFFENBERGER S., HOHENSINNER P.J., REGA G., PAMMER J., MAURER G., HUBER K., AND WOJTA J. Hydroxymethylglutarylcoenzyme A reductase inhibitors induce apoptosis in human cardiac myocytes in vitro. **Biochem Pharmacol**, 71:1324-30, 2006.

DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2000.

DIRKS, A.J., JONES, K.M. Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. **Am J Physiol Cell Physiol**, 291:1208-12, 2006.

DOONAN, S., BARRA, D., BOSSA, F. Structural and genetic relationships between cytosolic and mitochondrial isoenzymes. **Int J Biochem**, 16:1193-99, 1984.

ERL W. Statin-induced vascular smooth muscle cell apoptosis: a possible role in the prevention of restenosis? **Current Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**, 5: 135-44, 2005.

ESTERBAUER, H., DIEBER-ROTHENEDER, M., WAEG, G., PUHL, H., TATZBER, F. Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation. **Biochem Soc Trans**, 18: 1059-61, 1990.

FAGIAN, M.M., PEREIRA-DA-SILVA, L., MARTINS, I.S. e VERCESI, A.E. Membrane protein thiol cross-link associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{+2} plus prooxidants. **J Biol Chem**, 265:19955-60, 1990.

FICHTENBAUM C.J., GERBER J.G., ROSENKRATZ S.L. Pharmacokinetic interactions between protease inhibitors and statins in HIV seronegative volunteers. **ACTG Study AIDS**, 16:569-77, 2002.

FOURNIER, N., DUCET, G., CREVAT, A. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. **J Bioenerg Biomembr**, 19:297-303, 1987.

FUTTERMAN, L.G., LEMBERG, L. Statin pleiotropy: fact or fiction? **Am J Crit Care**, 13:244-49, 2004.

GAYLOR, J. L. Membrane-bound enzymes of cholesterol synthesis from lanosterol. **Biochem Biophys Res Commun**, 292:1139-46, 2002.

- GHAFOURIFAR P. & RICHTER C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. **FEBS Lett**, 418:291-96, 1997.
- GHIRLANDA G., ORADEI A., MANTO A., LIPPA S., UCCIOLI L., CAPUTO S., GRECO A.V., LITTARRU, G.P. Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. **J Clin Pharmacol**, 33:226-29, 1993.
- GIULIVI C., PODEROSO J.J., BOVERIS A. Production of nitric oxide by mitochondria. **J Biol Chem**, 273:11038-43, 1998.
- GORNALL, A.G., BARDWILL, C.J., DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **J Biol Chem**, 177:751-66, 1949.
- GRUJALBA, M.T., VERCESI, A.E., SCHEREIER, S. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, 38:13279-87, 1999.
- HALESTRAP, A.P., MCSTAY, G.P., CLARKE S.J. The permeability transition pore complex, another view. **Biochimie**, 84:153-166, 2002.
- HALESTRAP, A.P., WOODFIELD, K.Y., CONNERN, C.P. Oxidative stress, thiol reagents and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. **J Biol Chem**, 272: 3346-54, 1997.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. **FEBS Lett**, 307, 108-12, 1992.
- HARGREAVES, I.P. Ubiquinone: cholesterol's reclusive cousin. **Ann Clin Biochem**, 40:207-18, 2003.
- HERMES-LIMA, M., VALLE, V.G., VERCESI, A.E., BECHARA, E.J. Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species, connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. **Biochim Biophys Acta**, 1056:57-63, 1991.

- HISSIN P.J., HILF R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, 74:214-26, 1976.
- HODEL, C. Myopathy and rhabdomyolysis with lipid-lowering drugs. **Toxicol Lett**, 128:159-68, 2002.
- HOEK, J.B., RYDSTROM, J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. **Biochem J**, 254:1-10, 1998.
- IKONEN E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. **Physiol Rev**, 86:1237-61, 2006.
- ISHIBASHI, S., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L., GERARD, R.D., HAMMER, R.E., HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **J Clin Invest**, 92:883-93, 1993.
- JACOBSON, T.A. Comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors. **Am J Cardiol**, 94:1140-6, 2004.
- 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. **Arch Biochem Biophys**, 248:305-23, 1986.
- JEZEK P., GARLID, K.D. Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. **Int J Biochem Cell Biol**, 30:163-68, 1998.
- JO, S.H., SON, M.K., KOH, H.J., LEE, S.M., SONG, I.H., KIM, Y.O., LEE, Y.S., JEONG, K.S., KIM, W.B., PARK, J.W., SONG, B.J., AND HUH, T.L. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. **J Biol Chem**, 276:16168-76, 2001.
- KAMO, N., MURATSUGU, M., HONGO, R., KOBATAKE, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. **J Membr Biol**, 49:105-21, 1979.

- KANETA, S., SATOH, K., KANO, S., KANDA, M., ICHIHARA, K. All hydrophobic HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptotic death in rat pulmonary vein endothelial cells. **Atherosclerosis**, 170:237-43, 2003.
- KAPLAN, R.R., PEDERSEN, P.L. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. **J Biochem**, 212:279-88, 1983.
- KIM, J.S., HE, L., QIAN, T., LEMASTERS, J.J. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. **Curr Mol Med**, 527-35, 2003.
- KLATT, P., ESTERBAUER, H. Oxidative hypothesis of atherogenesis. **J Cardiovasc Risk**, 3:346-51, 1996.
- KNIGHT-LOZANO, C.A., YOUNG, C.G., BUROW, D.L., HU Z.Y., UYEMINAMI, D., PINKERTON, K.E., ISCHIROPOULOS, H., BALLINGER, S.W. Cigarette smoke exposure and hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues. **Circulation**, 105:849-54, 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**, 271:2929-34, 1996A.
- KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett**, 378:150-52, 1996B.
- KOWALTOWSKI, A.J., NETTO, L.E.S., 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**, 273:12766-769, 1998.
- KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO R.F., VERCESI A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, 495:12-15, 2001.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

- LEWIN, J.J., NAPPI, J.M., TAYLOR, M.H. Rhabdomyolysis with concurrent atorvastatin and diltiazem. **Ann Pharmacother**, 36:1546-9, 2002.
- LIAO, J.K. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. **Int J Cardiol**, 86:5-18, 2002.
- LIBBY, P. The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. **J Am Coll Cardiol**, 46:1225-8, 2005.
- LIU, S.S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. **Biosc Rep**, 17:259-72, 1997.
- MACEDO, D.V., FERRAZ, V.L., PEREIRA DA SILVA, L., VERCESI, A.E. Ca^{2+} - dependent NAD(P)^+ -induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. **Integration of Mitochondrial Function**, Ed. J. Lemasters, Plenum, New York, p. 535-42, 1998.
- MCTAGGART, F., BUCKETT, L., DAVIDSON, R. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase inhibitor. **Am J Cardiol**, 87:28B-32B, 2001.
- MERRYFIELD, M. L., LARDY, H. A. Ca^{2+} -mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of Fe^{2+} from rat liver **J Biol Chem**, 257:3628-35, 1982.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, 191:144-8, 1961.
- MURATSUGU, M., KAMO, N., KURIHARA, K., KOBATAKE, Y. Selective electrode for dibenzyl dimethyl ammonium cation as indicator of the membrane potential in biological systems. **Biochim Biophys Acta**, 464:613-9, 1977.
- MUSCARI A., PUDDU G.M., PUDDU, P. Lipid-lowering drugs: are adverse effects predictable and reversible? **Cardiology**, 97:115-21, 2002.
- MUTOH, T., KUMANO, T., NAKAGAWA, H., KURIYAMA, M. Role of tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma1 in the signaling pathway of HMG-CoA reductase inhibitor-induced cell death of L6 myoblasts. **FEBS Lett**, 446:91-94, 1999.

- NAKAHARA K., YADA T., KURIYAMA M., OSAME M. Cytosolic Ca^{2+} increase and cell damage in L6 rat myoblasts by HMG-CoA reductase inhibitors. **Biochem Biophys Res Commun**, 202:1579-85, 1994.
- NAVAB, M., FOGELMAN, A.M., BERLINER, J.A., TERRITO, M.C., DEMER, L.L.; FRANK, J.S., WATSON, A.D., EDWARDS, P.A., LUSIS. A.J. Pathogenesis of atherosclerosis. **Am J Cardiol**, 76:18C– 23C, 1995.
- NICHOLLS, D.G., ÅKERMAN, K.E.O. Mitochondrial calcium transport. **Biochim Biophys Acta**, 683:57-88, 1982.
- NICHOLLS, D.G., BRAND, M.D. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. **Biochem J**, 188:113-18, 1980.
- NICHOLLS, D.G., FERGUSON, S.J. Proton Current and Respiratory Control. In: **Bioenergetics 3**, London, Academic Press Inc., 3th edition, p. 69-75, 2002.
- OLIVEIRA H.C., COSSO, R.G., ALBERICI, L.C., MACIEL, E.N., SALERNO, A.G., DORIGHELLO, G.G., VELHO, J.A., FARIA, E.C., VERCESI A.E. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **FASEB J**, 19:278-80, 2005.
- OMAR M.A., WILSON, J.P. FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis. **Ann Pharmacother**, 36:288-95, 2002.
- OSONO, Y., WOOLLETT, L.A., HERZ, J., DIETSCHY, J.M. Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. **J Clin Invest**, 95:1124-32, 1995.
- PATEL, R.P., MOELLERING, D., MURPHY-ULLRICH, J., JO, H., BECKMAN, J.S., DARLEY-USMAR, V.M. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. **Free Rad Biol Med**, 28:1780-94, 2000.
- PIERNO, S., DE LUCA, A., LIANTONIO, A., CAMERINO, C., CONTE CAMERINO, D. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on excitation-contraction coupling of rat skeletal muscle. **Eur J Pharmacol**, 364:43-48, 1999.

- POLYAK, K.; XIA, Y., ZWEIER, J.L., KINZLER, K.W., VOLGELSTEIN, B. A model for p53-induced apoptosis. **Nature** 389:300-05, 1997.
- PUDDU, G.M., CRAVERO, E., ARNONE, G., MUSCARI, A., PUDDU, P. Molecular aspects of atherogenesis: new insights and unsolved questions. **J Biomed Sci**,12:839-53, 2005.
- RADI R., TURRENS, J.F., CHANG, L.Y, BUSH, K.M., CRAPO, J.D., FREEMAN, B.A. Detection of catalase in rat heart mitochondria. **J Biol Chem**, 266, 22028-34, 1991.
- ROBINSON, J.; COOPER, J.M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Anal Biochem**, 33: 390-9, 1970.
- ROSENSON, R.S. Current overview of statin-induced myopathy. **Am J Med**, 116: 408-16, 2004.
- ROSS, R. Mechanisms of disease: Atherosclerosis – An inflammatory disease. **N Eng J Med**, 340:115-126, 1999.
- SAMEC S., SEYDOUX J., DULLOO A.G. Post-starvation gene expression of skeletal muscle uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 in response to dietary fat levels and fatty acid composition, a link with insulin resistance. **Diabetes**, 48:436-41, 1999.
- SCHILD L., REINHECKEL T., WISWEDEL I., AUGUSTIN W. Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification. **Biochem J**, 328:205-10, 1997.
- SCHLAME, M., RUA, D., GREENBERG, M. L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. **Prog Lipid Res**, 39:257-88, 2000.
- SCHNEIDER, W.C., HOGEBOM, G.H. Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation: a review. **Cancer Res**, 11:1-22; 1951.

- SHITARA Y, SUGIYAMA Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacol Ther**, 112:71-105, 2006.
- SIES, H., MOSS, K. M. A. Role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. **Eur J Biochem**, 84: 377-83, 1978.
- SINZINGER, H., CHEHNE, F., LUPATTELLI, G. Oxidation injury in patients receiving HMG-CoA reductase inhibitors: occurrence in patients without enzyme elevation or myopathy. **Drug Saf**, 25:877-83, 2002.
- SIRVENT P., MERCIER J., VASSORT G., LACAMPAGNE A. Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca^{2+} signaling alteration in skeletal muscle. **Biochem. Biophys. Res Commun**, 329:1067-75, 2005.
- SHAUKAT A., BENEKLI M., VLADUTIN G.D., SLACK J.L., WETZLER M., BAER M.R. Simvastatin-fluconazole causing rhabdomyolysis. **Ann Pharmacoter**, 37:1032-5, 2003.
- STAMLER, J.S. Redox signaling, nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, 78:931-36, 1994.
- STARKOV A.A., FISKUM G., CHINOPOULOS C., LORENZO B.J., BROWNE S.E., PATEL M.S., BEAL, M.F. Mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. **J Neurosci**, 24:7779-88, 2004.
- STEINBERG, D. Oxidative Modification of LDL in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Am J Geriatr Cardiol**, 2:38-41, 1993.
- TONKONOGLI, M., SALHIN, K. **Acta Physiol Scand**, 161:345-53, 1997.
- TRETTTER, L., ADAM-VIZI, V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by α -ketoglutarate dehydrogenase. **J Neurosci**, 24:7771-78, 2004.
- TURRENS J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, 552: 335-44, 2003.

- TURRENS, J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosci Rep**, 17:3-8, 1997.
- UCAR M., MJORNDAL T., DAHLQVIST R. HMG-CoA reductase inhibitors and myotoxicity. **Drug Saf**, 22:441-57, 2000.
- VALLE, V.G., FAGIAN, M.M., PARENTONI, L.S., MEINICKE, A.R., VERCESI, A.E. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. **Arch Biochem Biophys**, 307:1-7, 1993.
- VERCESI, A.E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 252:171 - 8, 1987.
- VOTYAKOVA, T.V., REYNOLDS, I.J. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. **J Neurochem**, 79:266-77, 2001.
- WERNER, M., SACHER, J., HOHENEGGER, M. Mutual amplification of apoptosis by statin-induced mitochondrial stress and doxorubicin toxicity in human rhabdomyosarcoma cells. **Br. J. Pharmacol**, 143:715-24, 2004.
- XIA, Y., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., SNYDER, S.H., ZWEIER, J.L. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93:6770-4, 1996.
- YOKOYAMA, S., IKEDA, H., HARAMAKI, N., YASUKAWA, H., KATOH, A., IMAIZUMI, T. HMG-CoA reductase inhibitor protects against in vivo arterial thrombosis by augmenting platelet-derived nitric oxide release in rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, 45:375-81, 2005.
- ZAKOWSKI, J.J., TAPPEL, A.L. Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase. **Biochim Biophys Acta**, 526:65-76, 1978.
- ZORATTI, M., SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, 1241:139-76, 1995

8- ANEXOS

Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria

Helena C. F. Oliveira,* Ricardo G. Cosso,[†] Luciane C. Alberici,[†] Evelise N. Maciel,[†] Alessandro G. Salerno,* Gabriel G. Dorighello,* Jesus A. Velho,[†] Eliana C. de Faria,[†] and Anibal E. Vercesi[†]

*Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, [†]Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil

H. C. F. Oliveira, R. G. Cosso, and L. C. Alberici contributed equally to this work.

Corresponding author: Anibal E. Vercesi, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil. E-mail: anibal@unicamp.br

ABSTRACT

Atherosclerotic disease remains a leading cause of death in westernized societies, and reactive oxygen species (ROS) play a pivotal role in atherogenesis. Mitochondria are the main intracellular sites of ROS generation and are also targets for oxidative damage. Here, we show that mitochondria from atherosclerosis-prone, hypercholesterolemic low-density lipoprotein (LDL) receptor knockout mice have oxidative phosphorylation efficiency similar to that from control mice but have a higher net production of ROS and susceptibility to develop membrane permeability transition. Increased ROS production was observed in mitochondria isolated from several tissues, including liver, heart, and brain, and in intact mononuclear cells from spleen. In contrast to control mitochondria, knockout mouse mitochondria did not sustain a reduced state of matrix NADPH, the main source of antioxidant defense against ROS. Experiments *in vivo* showed faster liver secretion rates and *de novo* synthesis of triglycerides and cholesterol in knockout than in control mice, suggesting that increased lipogenesis depleted the reducing equivalents from NADPH and generated a state of oxidative stress in hypercholesterolemic knockout mice. These data provide the first evidence of how oxidative stress is generated in LDL receptor defective cells and could explain the increased LDL oxidation, cell death, and atherogenesis seen in familial hypercholesterolemia.

Key words: hypercholesterolemia • LDL receptor • reactive oxygen species • mitochondria permeability transition • pyridine nucleotide oxidation

An elevated plasma concentration of low-density lipoprotein (LDL) is involved in the development of atherosclerosis (1–3), a leading cause of death in the western world. One of the most consistent hypotheses for atherogenesis (4) postulates that this disease is triggered by the LDL oxidation (5, 6) caused by reactive oxygen species (ROS) from vascular

wall cells (7–9). However, it is unclear where and how the oxidative stress condition is established. Mitochondria are the main intracellular sites of ROS generation and are also targets for oxidative damage (10). Increased mitochondrial generation of ROS leads to nonspecific permeabilization of the inner membrane, a phenomenon known as the mitochondrial permeability transition (MPT; ref 10). This process results in impairment of mitochondrial function and extensive organelle swelling with consequent outer membrane rupture and release of intermembrane components including apoptogenic signal molecules (11). The MPT appears to be formed by the assembly of membrane proteins via thiol cross-linking produced by the attack of ROS generated by the respiratory chain. This process is favored by the oxidized state of mitochondrial pyridine nucleotides, mainly NADPH, the major source of mitochondrial reducing equivalents for the antioxidant systems glutathione reductase/peroxidase and thioredoxine reductase/peroxidase (10).

In this work, we examined the mitochondrial function and production of ROS in the atherosclerosis-susceptible, hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice, which models the familiar hypercholesterolemia (FH), a major autosomal dominant disorder associated with increased risk of premature coronary heart disease. To date, over 600 mutations of the LDL receptor gene have been identified and the prevalence of the heterozygous form of FH is estimated at ~1:500, although it may be higher in population with founder effects. When maintained on a low fat diet, these LDL receptor knockout mice are healthy but present a two- to fourfold increase in plasma cholesterol concentration and seven- to ninefold increase in LDL-cholesterol levels (3). Under high fat and high cholesterol diet, they develop severe atherosclerosis and xanthomas. The hypothesis tested in this study was that mitochondria from LDL receptor defective cells might be involved in the establishment of an oxidative stress condition, which precedes the development of atherosclerosis in this genetic disorder.

MATERIALS AND METHODS

Animals and plasma lipid and glucose analyses

LDL receptor knockout founders were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Control wild-type mice were obtained from the breeding colony at the State University of Campinas. The experiments were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the university. The mice had access to standard laboratory rodent chow diet (Nuvital CR1) and water ad libitum and were housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12 h light:dark cycle. Male and female mice, 4 to 6 months old and weighing 20–26 g, were used. Blood samples were obtained from the retro-orbital plexus of mice fasted overnight and anesthetized with ketamine (50 mg/kg, Parke-Davis) and xylazine (10 mg/kg, Bayer). Glucose (Merck), triglycerides (Boehringer-Mannheim), total cholesterol (Merck), and free fatty acids (Wako Chemicals) were determined in plasma using enzymatic colorimetric methods according to the instructions of the manufacturer.

Isolation of mitochondria and respiration measurements

Mitochondria from liver, heart, and brain were isolated by conventional differential centrifugation. The protein concentration was determined by a modified Biuret assay. Oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode (Yellow Springs Instruments Co.) in a

1.3 ml glass chamber equipped with a magnetic stirring. The experiments were done at 28°C in a standard medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 2 mM inorganic phosphate, 1 mM magnesium chloride, and HEPES buffer, pH 7.2. Substrates for the respiratory chain were 5 mM potassium succinate and 2 μ M rotenone or a 5 mM mixture of NAD-linked substrates (malate+glutamate+ α -ketoglutarate+pyruvate).

Mitochondria transmembrane electrical potential

Mitochondria (1 mg/ml) were incubated in the standard reaction medium containing 3 μ M tetraphenylphosphonium (TPP⁺). The concentration of TPP⁺ in the extramitochondrial medium was continuously monitored with a TPP⁺-selective electrode prepared in our laboratory according to Kamo et al. (12). The membrane potential was then calculated by assuming that the TPP⁺ distribution between mitochondria and the medium followed the Nernst equation.

Reactive oxygen species production

The net reactive oxygen species (ROS) production by mitochondria (0.5 mg/ml) was monitored using the membrane-permeable fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂-DCFDA, 1 μ M) according to Garcia-Ruiz et al. (13). Fluorescence was determined at 488 nm for excitation and 525 nm for emission, with a slit width of 3 nm. A calibration curve was obtained with known concentrations of dichlorofluorescein (DCF), the product of H₂-DCFDA oxidation.

Spleen mononuclear cell isolation

Intact cells were isolated from spleen homogenate by the Ficoll-Hypaque technique described for the isolation of blood mononuclear cells (14). Briefly, three spleens were homogenized in 13 ml of PBS buffer, laid onto Ficoll-Hypaque solution, and centrifuged at 400 g for 25 min at room temperature. The interface cell layer was recovered with a large bore Pasteur pipette and washed twice in PBS buffer, and the cells were counted in a Newbauer hemocytometer, using trypan blue exclusion to determine cell viability.

Membrane cholesterol content

Lipids were extracted three times by shaking Percoll-purified mitochondrial preparations (5 mg of protein) with 5 ml of ether for 3 min. Butylated hydroxytoluene (0.01%, w/v) was added to ether as an antioxidant. After this extraction, no cholesterol was detectable in the remaining aqueous phase. The cholesterol was separated from the other lipids by HPLC using a Shimadzu model LC-10AD pump connected to SIL 10AD/VP auto injector and quantified by UV detection (Shimadzu, Tokyo, Japan). The system was equipped with a 250 $\times$ 4.6 mm (ID) (particle size 5 mm) LUNA C18(2) reversed-phase column (Phenomenex, Torrance, CA). The dried organic extract was dissolved in 250 ml of mobile phase that consisted of a mixture of acetonitrile, tetrahydrofuran, methanol, and 1% (w/v) ammonium acetate solution (684:220:68:28, v/v). Data acquisition was performed using the Shimadzu Class-VP chromatography data system software.

Membrane fluidity

The membrane fluidity was evaluated by the fluorescence anisotropy of the Percoll-purified mitochondria -bound dyes. The probes hematoporphyrin (HP) and 1,6-diphenyl-1,3,5-

hexatriene (DPH) were used for polar regions, such as proteins in the inner mitochondrial membrane and highly hydrophobic lipid phases, respectively, as described by Ricchelli et al. (15). HP (3 mM) and DPH (4 mM) were added to stirred mitochondrial suspensions (0.5 mg/ml and 1 mg/ml, respectively) containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES (pH = 7.2), 2 mM K₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, and 2 mM rotenone, and the mixture was incubated with HP for 5 min and with DPH for 1 h at 28°C before measuring the anisotropy. The fluorescence anisotropy (*r*) was estimated using the following relationship: $r = (I_{\parallel} - G I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2G I_{\perp})$, where *I*_∥ and *I*_⊥ are the parallel and perpendicular components of the vertical excitation and *G* is the correction factor determined by the intensity of the ratio between the parallel and perpendicular components of the horizontal excitation.

Manganese-dependent superoxide dismutase activity

Manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) was measured indirectly by the decrease in the velocity of cytochrome *c* reduction by superoxide radicals at 550 nm in a Hitachi U-3000 spectrophotometer (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan). The xantine/xantine oxidase system was used as the source of O₂^{•−}, as described by Flohé and Otting (16).

Kinetics of pyridine nucleotide oxidation

The redox state of pyridine nucleotides in the mitochondrial suspension (1 mg/ml) was followed in a Hitachi F-4010 spectrofluorometer (Hitachi) using excitation and emission wavelengths of 366 and 450 nm, respectively, and a slit width of 5 nm. The extent of pyridine nucleotide oxidation was calculated as a function of fluorescence increase induced by isocitrate addition. Internal calibration was done by the addition of known amounts of NADH.

Liver triglyceride and cholesterol secretion rates

The hepatic triglyceride and cholesterol secretion rates to plasma were measured after administration of Triton WR1339 as described previously by Voyiatzakis et al. (17). Briefly, anesthetized mice were bled to obtain baseline plasma samples and then injected intravenously (femoral) with Triton WR-1339 (Sigma, St. Louis, MO) at a dose of 500 mg/kg (15% solution in 0.9% NaCl). Blood samples (50 µl) were collected at 15, 30, 60, and 90 min after Triton injection. Triglycerides and cholesterol were measured in the plasma samples. The slopes of the linear regression of the lipid concentration vs. time curves were compared.

Lipid and cholesterol biosynthesis

Rates of total lipid and cholesterol synthesis were measured in vivo, between 8:00 and 10:00 AM, in mice fasted overnight. Each animal was injected intraperitoneally with 20 mCi of [³H]water dissolved in isotonic saline solution as described previously (18, 19). One hour later, blood samples were obtained from the retro-orbital plexus of anesthetized mice and livers were excised, minced, saponified, and hexane extracted. Radioactivity in the total lipid extract (lipogenesis) and in digitonin-precipitated sterols (cholesterol synthesis) was measured in a LS6000 Beckman Beta Counter. The specific activity of [³H]water was measured in plasma in triplicates. The rates of lipid and cholesterol synthesis were calculated as nanomoles of [³H]water incorporated into lipids and cholesterol per gram of tissue in 1 h (nmol/g/h).

RESULTS AND DISCUSSION

Healthy, chow fed LDL receptor knockout mice presented blood triglyceride, free fatty acid, and glucose levels similar to control mice. Both groups differed in their plasma total cholesterol concentration, which was fourfold higher in the knockout than in the control mice (314 ± 53 vs. 72 ± 20 mg/dl, $P < 0.0001$). Mitochondrial respiratory control (RC) (phosphorylating/resting respiration rate ratio) measured in calcium-free media containing NAD-linked substrates (malate+glutamate+ α -ketoglutarate+pyruvate) was essentially similar in knockout and control mouse liver mitochondria (4.34 ± 0.79 and 4.60 ± 0.81 , respectively). RC measured with succinate also did not differ in knockout and control mitochondria (3.40 ± 0.39 and 3.76 ± 0.58). Phosphorylation efficiency (ADP/O consumption ratio) was similar in both mitochondria: 2.56 ± 0.24 and 2.51 ± 0.34 .

To ascertain whether the LDL receptor cell defect could affect mitochondria tolerance to Ca^{2+} , the transmembrane electrical potential ($\Delta\psi$) was measured in mitochondria challenged by this cation (Fig. 1). The addition of Ca^{2+} resulted in a transient decrease in $\Delta\psi$ followed by its recovery and maintenance in control mitochondria (line a). In mitochondria from knockout mice (line b), the drop in $\Delta\psi$ induced by Ca^{2+} was only partially recovered and followed by an irreversible drop. Cyclosporin A (CsA), an inhibitor of the MPT formation, totally prevented the elimination of $\Delta\psi$ in mitochondria from knockout mice (line c), indicating that these mitochondria are more susceptible to Ca^{2+} -induced MPT than those isolated from control mice. In addition, liver mitochondria isolated from knockout mice underwent extensive CsA-sensitive swelling when incubated in the standard medium containing calcium, whereas mitochondria from control mice did not swell under these same experimental conditions (data not shown).

We have previously demonstrated that alterations in the lipid packing and domain formation as a result of Ca^{2+} binding to the inner membrane cardiolipin stimulate ROS production and MPT (20). Thus, we measured liver mitochondrial ROS generation by the oxidation of the membrane-permeable probe $\text{H}_2\text{-DCFDA}$ to DCF, which is fluorescent. In the absence of Ca^{2+} ions (100 μM EGTA present), the fluorescence due to the oxidation of $\text{H}_2\text{-DCFDA}$ increased slightly with time, indicating a slow production of ROS by both types of mitochondria (Fig. 2, lines a and b). In contrast, when EGTA was absent (~ 10 μM Ca^{2+}), the increase in fluorescence by ROS-induced DCF formation was much larger for mitochondria isolated from knockout (Fig. 2, line d) than from control (Fig. 2, line c) mice. Ca^{2+} -induced ROS production was also higher in other tissues from hypercholesterolemic knockout mice, including heart and brain, and in whole mononuclear cells isolated from spleen (Fig. 3).

A higher cholesterol content generally reduces the membrane fluidity and facilitates superoxide anion production at the level of respiratory chain complex III (21). Thus, we measured the cholesterol content and membrane fluidity in Percoll-purified liver mitochondrial preparations. No significant differences were observed in the cholesterol content (1.12 ± 0.13 and 1.11 ± 0.14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) and anisotropy of polar (0.282 ± 0.004 and 0.290 ± 0.009) and nonpolar (0.138 ± 0.009 and 0.142 ± 0.007) membrane regions in LDL receptor knockout and control mitochondria. In addition, the activity of MnSOD was similar in the LDL receptor knockout and control mitochondria: 4.0 ± 0.5 and 4.1 ± 0.5 U/mg protein, respectively.

MPT is favored by the oxidized state of mitochondrial pyridine nucleotides (22), mainly NADPH (23). To ascertain whether the higher content of ROS and higher susceptibility to MPT in knockout mice could be the consequence of a lower capacity of their antioxidant defense system, we examined the redox state of pyridine nucleotides. A smaller NADPH mitochondrial pool is a sufficient condition to cause oxidative stress, since it is a limiting step and the ultimate reducing power for the mitochondrial enzymatic antioxidant system (10). Pyridine nucleotide oxidation was followed under experimental conditions in which addition of Ca^{2+} caused opening of the permeability transition pore in knockout but not in control mitochondria (Fig. 4A). The addition of Ca^{2+} to both mitochondrial preparations was followed by an increase in NADPH fluorescence, as previously observed (24, 25). This was followed by a time-dependent decrease in fluorescence in knockout (Fig. 4A, line b) but not in control (Fig. 4A, line a) mitochondria. A later addition of β -hydroxybutyrate, a specific NAD^+ reductant that acts via the corresponding dehydrogenase, did not change the NADPH fluorescence of either mitochondria preparation. The same occurred after the addition of EGTA. In contrast, the addition of isocitrate, which can reduce NADP^+ in liver mitochondria (23), quickly restored the fluorescence of knockout mitochondria to the level of control mitochondria. No changes in the fluorescence of control mitochondria were observed after the addition of isocitrate or in knockout mitochondria when isocitrate was present from the beginning of the experiment (Fig. 4A, dotted line). These same marked distinct patterns of NADPH oxidation in control and knockout mitochondria occurred spontaneously, in the absence of Ca^{2+} (Fig. 4B), but in this case pyridine nucleotide oxidation is delayed as compared when Ca^{2+} is present.

The proposition that knockout mitochondria possess a lower antioxidant capacity was additionally investigated by using diamide (Fig. 5A), a thiol oxidant that oxidizes glutathione and hence pyridine nucleotides through the activities of the glutathione reductase and the NADP transhydrogenase (10). Therefore, the oxidation of glutathione by diamide can be followed through the decrease in NADPH fluorescence. It is shown in Fig. 5A that diamide addition quickly exhausted NADPH and consequently reduced glutathione in knockout mitochondria (Fig. 5A, line b). In contrast, in control mitochondria, this oxidation was biphasic with a slow second phase that took longer (~4 min, Fig. 5A, line a) to consume NADPH. This indicates that a much higher content of endogenous NADP and glutathione reductants increased the time period for their oxidation in control mitochondria. The subsequent addition of the thiol reductant DTT promptly reduced oxidized glutathione and NADP^+ as evidenced by the return of NADPH fluorescence to the original level in both mitochondria. The experiments above indicate that the greater susceptibility of knockout mitochondria to the MPT was associated with a more oxidized state of mitochondrial NADP. Indeed, additional experiments showed that isocitrate prevented the Ca^{2+} -induced decrease in $\Delta\Psi$ in knockout mitochondria (Fig. 5B).

We hypothesized that the lower content of reduced nucleotides in the knockout hepatocytes, which do not take up LDL cholesterol, could be the result of higher rates of lipogenesis. The latter would consume large amounts of reducing equivalents from NADPH. To assess this possibility, the hepatic secretion rate of triglycerides (TG) and cholesterol *in vivo* was investigated. The livers of hypercholesterolemic knockout mice secreted about twice as much TG and cholesterol as those of control mice (in mg/dl/min): TG: 4.49 ± 0.23 vs. 2.46 ± 0.19 ($P < 0.0001$) and cholesterol: 0.29 ± 0.05 vs. 0.14 ± 0.05 ($P = 0.054$). Therefore, the lower content of reduced nucleotides in knockout mitochondria probably reflected the higher output and/or lower input of reducing equivalents between mitochondria and the cytosol via substrate shuttling

mechanisms. Direct evidence supporting our proposal was obtained by measuring de novo synthesis of cholesterol and other lipids by the $^3\text{H}_2\text{O}$ incorporation technique. Indeed, total lipid and cholesterol synthesis (nmol $^3\text{H}_2\text{O}$ /g/h) was significantly increased in the livers of knockout as compared with control mice (total lipids: 632 ± 80 vs. 441 ± 35 , $P < 0.05$; cholesterol: 201 ± 26 vs. 127 ± 11 , $P = 0.014$), thus necessarily consuming more NADPH than the control livers. The biosynthesis of 1 mole of cholesterol oxidizes 24 moles of NADPH (26). Although this may not be the exclusive causative mechanism, it certainly contributes to reduce the NADPH pool in the knockout mitochondria.

Recently, Ballinger et al. (27) showed that oxidative mitochondrial DNA damage was positively correlated with the extent of atherosclerotic lesions in arteries from human and apoE knockout mice and that this damage preceded the establishment of the disease in these mice. The present findings suggest that LDL receptor knockout cells are more exposed to oxidative stress and thus more susceptible to cell death because of a less effective mitochondrial antioxidant defense system and a greater susceptibility to MPT. Thus, the LDL receptor defect leads to two important pro-atherogenic effects that can be observed even before the initiation of the disease, namely, increased extracellular levels of oxidizable substrate (LDL) and an imbalance in cell redox processes. As shown for mononuclear cells, the latter phenomenon probably occurs in the vascular wall, where it is responsible for the local oxidative stress, triggering lipoprotein oxidation, cell death, and atherogenesis in hypercholesterolemia caused by the lack of LDL receptor.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors thank Edilene Siqueira for technical assistance and Stephen Hyslop for English revision.

REFERENCES

1. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34–47
2. Stokes, J., III, Kannel, W. B., Wolf, P. A., Cupples, L. A., and D'Agostino, R. B. (1987) The relative importance of selected risk factors for various manifestations of cardiovascular disease among men and women from 35 to 64 years old: 30 years of follow-up in the Framingham Study. *Circulation* **75**, V65–V73
3. Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E., and Herz, J. (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* **92**, 883–893
4. Chisolm, G. M., and Steinberg, D. (2000) The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1815–1826

5. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320**, 915–924
6. Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **88**, 1785–1792
7. Morel, D. W., DiCorleto, P. E., and Chisolm, G. M. (1984) Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* **4**, 357–364
8. Parthasarathy, S., Printz, D. J., Boyd, D., Joy, L., and Steinberg, D. (1986) Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* **6**, 505–510
9. Lamb, D. J., Wilkins, G. M., and Leake, D. S. (1992) The oxidative modification of low density lipoprotein by human lymphocytes. *Atherosclerosis* **92**, 187–192
10. Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* **495**, 12–15
11. Skulachev, V. P. (2000) How proapoptotic proteins can escape from mitochondria? *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 1056–1059
12. Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., and Kobatake, Y. (1979) Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* **49**, 105–121
13. Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A., and Fernandez-Checa, J. C. (1997) 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
14. Boyum, A. (1976) Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* **5**, 9–15
15. Ricchelli, F., Gobbo, S., Jori, G., Salet, C., and Moreno, G. (1995) Temperature-induced changes in fluorescence properties as a probe of porphyrin microenvironment in lipid membranes. 2. The partition of hematoporphyrin and protoporphyrin in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **233**, 165–170
16. Flohe, L., and Otting, F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* **105**, 93–104
17. Voyiaziakis, E., Goldberg, I. J., Plump, A. S., Rubin, E. M., Breslow, J. L., and Huang, L. S. (1998) ApoA-I deficiency causes both hypertriglyceridemia and increased atherosclerosis in human apoB transgenic mice. *J. Lipid Res.* **39**, 313–321

18. Osono, Y., Woollett, L. A., Herz, J., and Dietschy, J. M. (1995) Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. *J. Clin. Invest.* **95**, 1124–1132
19. Dietschy, J. M., and Spady, D. K. (1984) Measurement of rates of cholesterol synthesis using tritiated water. *J. Lipid Res.* **25**, 1469–1476
20. Grijalba, M. T., Vercesi, A. E., and Schreier, S. (1999) Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry* **38**, 13279–13287
21. Gille, L., and Nohl, H. (2001) The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **388**, 34–38
22. Lehninger, A. L., Vercesi, A., and Bababunmi, E. A. (1978) Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1690–1694
23. Vercesi, A. E. (1987) The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**, 171–178
24. Zago, E. B., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (2000) The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. *FEBS Lett.* **478**, 29–33
25. Vinogradov, A. D., and Leikin, J. N. (1972) Fluorescence of nicotinamide adenine dinucleotides during the active transport of Ca^{2+} ions in liver mitochondria. *J. Bioenerg.* **3**, 203–209
26. Gaylor, J. L. (2002) Membrane-bound enzymes of cholesterol synthesis from lanosterol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 1139–1146
27. Ballinger, S. W., Patterson, C., Knight-Lozano, C. A., Burow, D. L., Conklin, C. A., Hu, Z., Reuf, J., Horaist, C., Lebovitz, R., Hunter, G. C., et al. (2002) Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* **106**, 544–549

Received May 25, 2004; accepted October 18, 2004.

Fig. 1

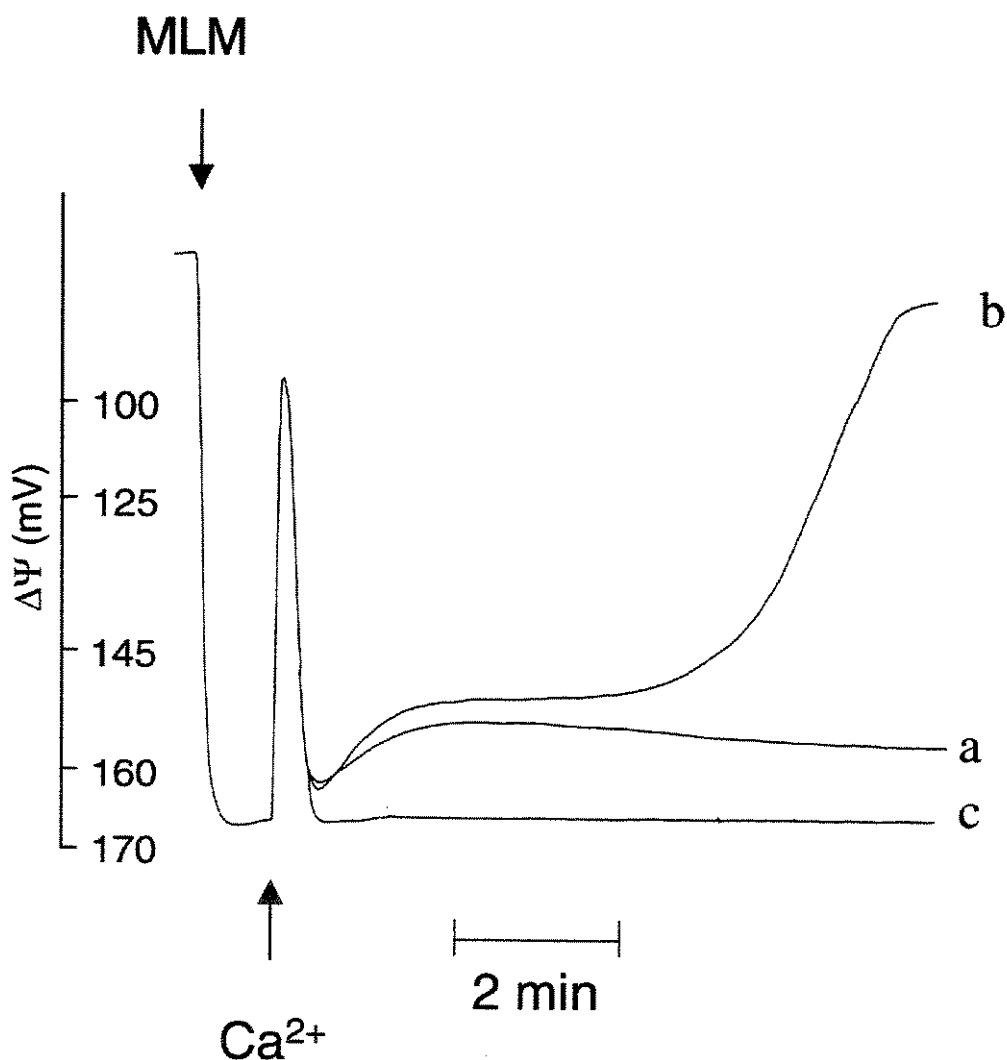


Figure 1. Changes in membrane electrical potential ($\Delta\Psi$) induced by Ca^{2+} in mouse liver mitochondria (MLM) from control (*line a*), LDL receptor knockout ($\text{LDLR}^{-/-}$, *line b*), and $\text{LDLR}^{-/-}$ mice plus 1 μM cyclosporin A (CSA, *line c*). Ca^{2+} (200 nmol/mg protein) was added as indicated. Representative of $n = 11$. $\Delta\Psi$ at 6 min was 157 ± 2.5 mV for controls and totally collapsed for knockout mitochondria.

Fig. 2

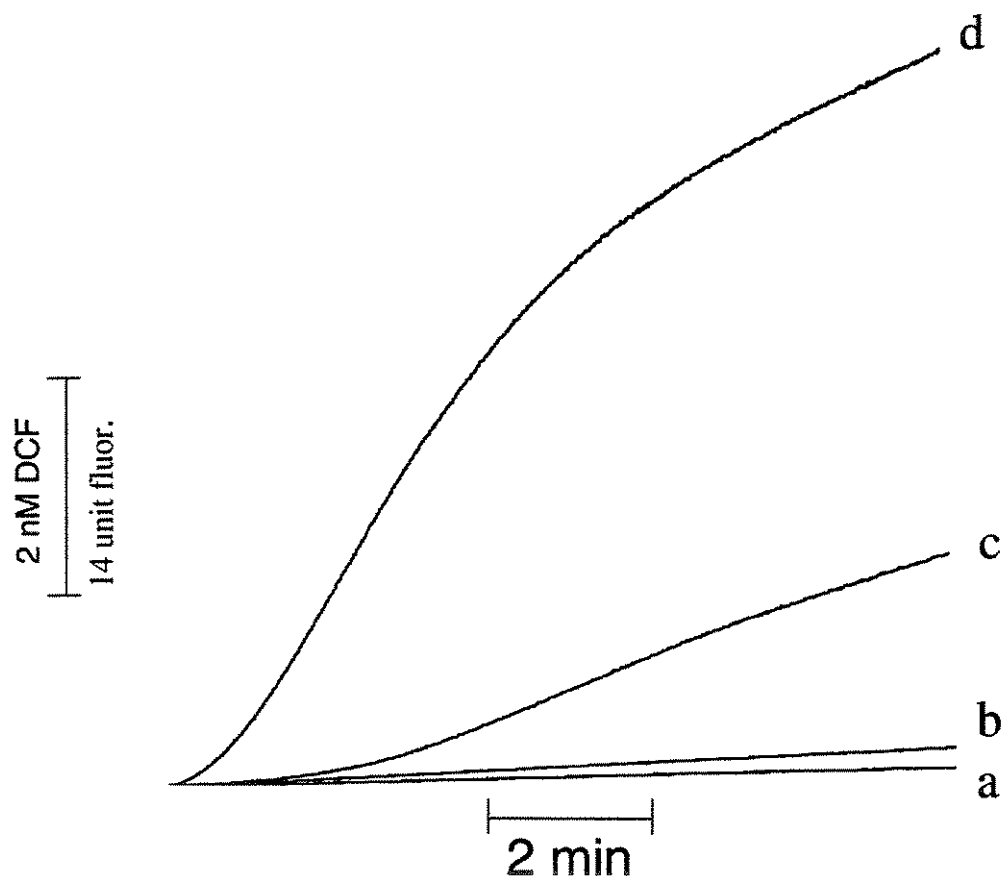


Figure 2. Generation of reactive oxygen species by control (*lines a and c*) and LDLR^{-/-} (*lines b and d*) MLM. Mitochondria were added to standard reaction medium containing H₂-DCFDA in the presence (*lines a and b*) or absence of 100 μ M EGTA (*lines c and d*). Representative of $n = 8$. Maximum rates (slopes) of DCF production (nmol/mg/min) are as follows: with EGTA: 0.096 ± 0.034 control (*a*) vs. 0.152 ± 0.043 knockout (*b*), $P > 0.05$; and without EGTA: 0.72 ± 0.18 control (*c*) vs. 2.70 ± 0.27 knockout (*d*), $P < 0.0001$.

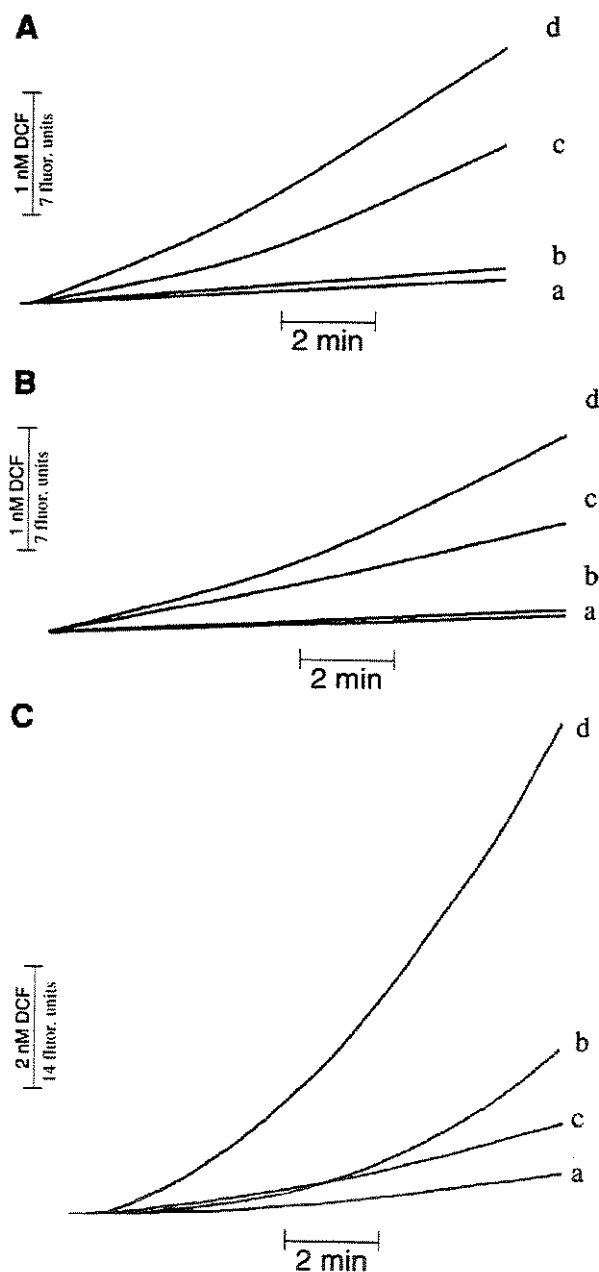


Figure 3. Generation of reactive oxygen species by mitochondria from mouse brain (A) and heart (B) and by whole spleen mononuclear cells (C). Mitochondria or whole cells were added to standard reaction medium containing H₂-DCFDA and NAD-linked substrates. In A and B, control (lines a and c) and LDLR^{-/-} (lines b and d) mitochondria were incubated in the presence of 100 μ M EGTA (lines a and b) or 100 μ M CaCl₂ (lines c and d). In C, intact control (line a) or LDLR^{-/-} (line b) spleen mononuclear cells and digitonin-permeabilized control (line c) or LDLR^{-/-} (line d) mononuclear cells were incubated in standard media without additions of either EDTA or CaCl₂. Representative of $n = 4-5$. Maximum rates (slopes) of DCF production (nmol/mg/min) are as follows: A) Brain, with Ca²⁺: 0.18 ± 0.02 control (c) vs. 0.35 ± 0.03 knockout (d), $P = 0.0058$. B) Heart, with Ca²⁺: 0.34 ± 0.01 control (c) vs. 0.48 ± 0.00 knockout (d), $P = 0.002$. C) Spleen mononuclear cells, intact cells: 0.16 ± 0.02 control (a) vs. 0.44 ± 0.10 knockout (b), $P = 0.035$; permeabilized cells: 0.70 ± 0.03 control (c) vs. 2.32 ± 0.07 knockout (d), $P = 0.003$.

Fig. 4

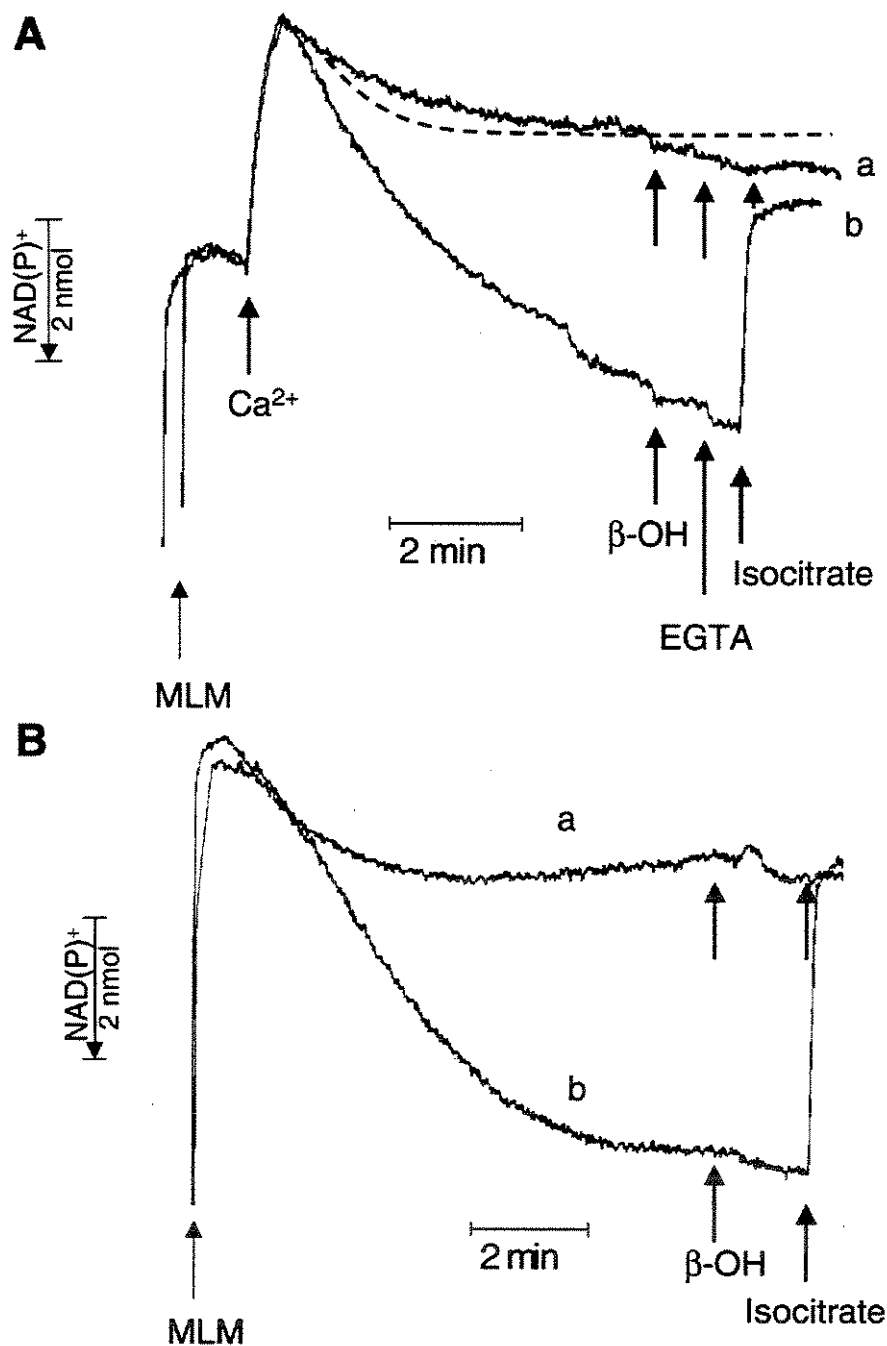


Figure 4. Oxidation of endogenous pyridine nucleotides by liver mitochondria from control (*line a*) and LDLR^{-/-} (*line b*) mice. MLM were added to standard reaction medium containing 200 μM Ca²⁺ (**A**) or 500 μM EGTA (**B**). β-hydroxybutyrate (β-OH, 5 mM) and 1 mM isocitrate were added as indicated. Representative of *n* = 8. Extent of pyridine nucleotide oxidation was calculated as a function of fluorescence increase induced by isocitrate addition. Amounts (nmoles) of NADP⁺ reduced by the isocitrate addition are as follows: **A**) with Ca²⁺ (at 8 min): none for control (*a*) vs. 3.05 ± 0.14 knockout (*b*). **B**) with EGTA (at 10 min): none for control (*a*) vs. 4.13 ± 0.20 knockout (*b*).

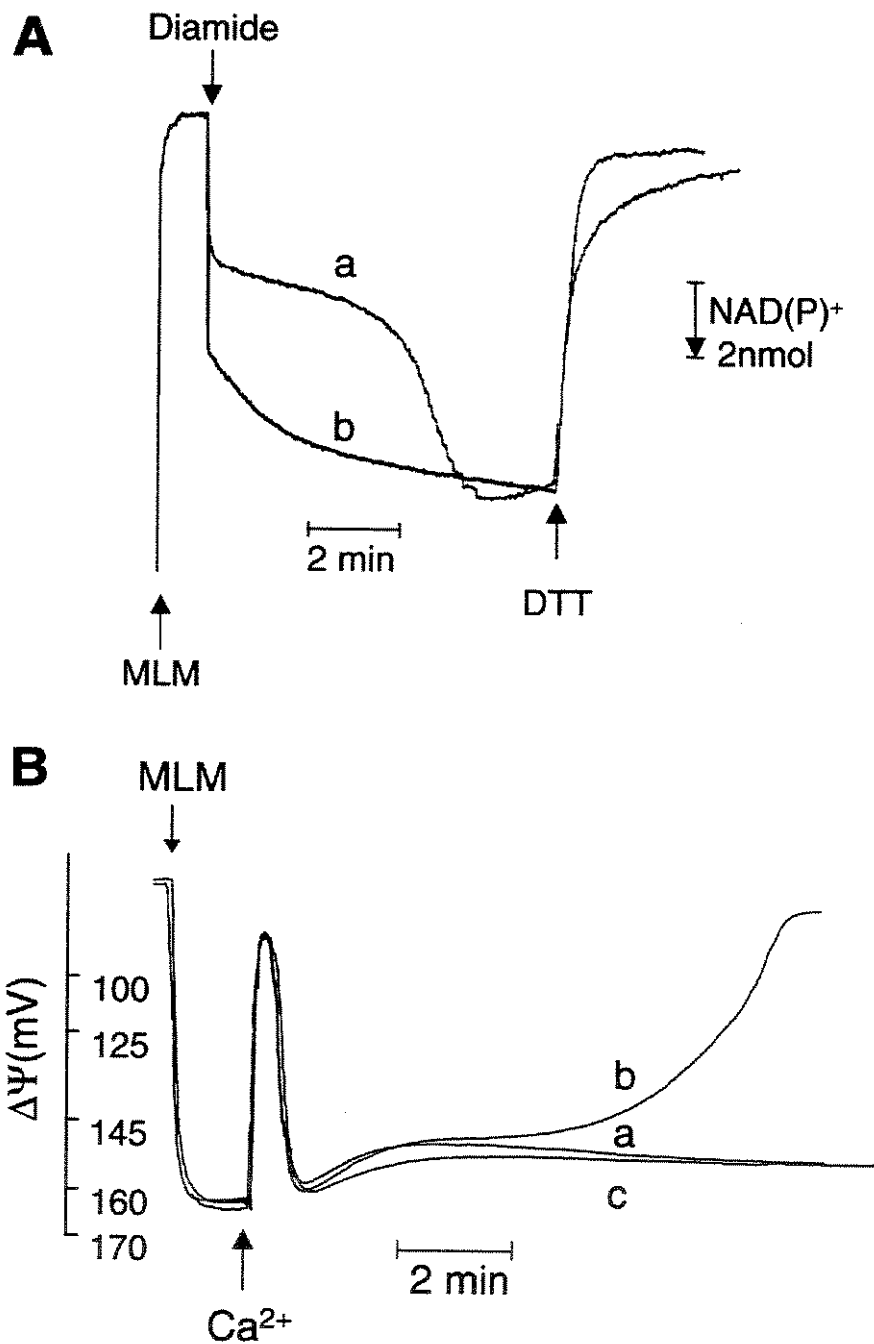


Figure 5. Oxidation of glutathione and pyridine nucleotides by diamide (**A**) and prevention of Ca²⁺-induced decrease in membrane electrical potential ($\Delta\Psi$) in mice liver mitochondria (**B**). MLM from control (*line a*), LDLR^{-/-} (*line b*), and LDLR^{-/-} plus 1 mM isocitrate (*line c*) were added to standard reaction medium. Diamide (500 μ M), DTT (1 mM), and Ca²⁺ (200 nmols/mg protein) were added as indicated. Representative of $n = 6-8$.

Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition

Jesus A. Velho^a, Heitor Okanobo^a, Giovanna R. Degasperi^a,
Márcio Y. Matsumoto^a, Luciane C. Alberici^a, Ricardo G. Cosso^a,
Helena C.F. Oliveira^b, Anibal E. Vercesi^{a,*}

^a Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil

Received 26 July 2005; received in revised form 7 November 2005; accepted 10 November 2005

Abstract

Statins (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors) are used in the treatment of hypercholesterolemic patients to reduce risk of cardiovascular diseases because of their cholesterol lowering action. Other lipid independent protective actions of statins have been reported. However, some adverse side effects have, also, been described. We report, here, that liver mitochondria isolated from hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice treated during 15 days with therapeutic doses (100 mg/kg, p.o.) of lovastatin presented a higher susceptibility to develop membrane permeability transition (MPT). In experiments *in vitro*, lovastatin-induced MPT in a dose-dependent manner (10–80 μ M) by a mechanism sensitive to cyclosporin A (cyclophilin sequestrant), dithiothreitol (reducing agent), adenine nucleotide carrier inhibitor (ADP), catalase (H_2O_2 reductant) and EGTA (calcium chelator). In agreement with the inhibition of the mitochondrial swelling by dithiothreitol, lovastatin, also, decreased the content of total mitochondrial membrane protein thiol groups. Simvastatin had similar effects on mitochondria; however, pravastatin, a hydrophilic statin, had a weaker effect in inducing MPT. In conclusion, statins can act directly on mitochondria either *in vivo* or *in vitro* inducing permeability transition, which is a process involved in cell death.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Statins; Mitochondrial permeability transition; Hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice

1. Introduction

Mitochondria use electron transport to generate an H^+ electrochemical gradient across the inner mitochondrial membrane. This electrochemical gradient is, then, used by the ATP synthase (F_1-F_0 ATPase) to phosphorylate ADP to ATP. To sustain this electrochemical potential the inner mitochondrial membrane should remain impermeable to H^+ (Mitchell, 1961). Loss of membrane impermeability to protons can be associated with a mitochondrial

Abbreviations: CsA, cyclosporin A; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid; EGTA, ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) N,N,N',N' -tetraacetic acid; FCCP, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; Hepes, 2-hydroxyethyl-1-piperazinethane-sulfonic acid; MLM, mice liver mitochondria; MMM, mice muscle mitochondria; MPT, mitochondrial permeability transition; RLM, rat liver mitochondria; ROS, reactive oxygen species; $\Delta\Psi$, transmembrane electrical potential

* Corresponding author. Tel.: +55 19 37887330;
fax: +55 19 37887330.

E-mail address: anibal@unicamp.br (A.E. Vercesi).

0300-483X/\$ – see front matter © 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.tox.2005.11.007

TOX-49288; No. of Pages 9

pathway of cell death, and membrane permeability transition (MPT) may be a key event in this process (Castilho et al., 1995; Kowaltowski et al., 2001). MPT is characterized by a Ca^{2+} promoted opening of a non selective proteinaceous inner membrane pore, sensitive to the immune suppressor cyclosporin A (Kowaltowski et al., 2001), associated with oxidative modifications of inner membrane protein thiol groups (Fagian et al., 1990).

Ca^{2+} -induced MPT is enhanced by a variety of compounds called inducers (for a list see Zoratti and Szabo, 1995) including inorganic phosphate (Kowaltowski et al., 1996), oxidants of pyridine nucleotides (Lehninger et al., 1978; Zago et al., 2000), and thyroid hormones (Castilho et al., 1998). Most of these inducers are compounds capable of enhancing Ca^{2+} -induced mitochondrial oxidative stress or to react with membrane protein thiol groups (Castilho et al., 1995; Kowaltowski et al., 2001). MPT has been directly implicated in either necrosis or apoptosis in a variety of pathological situations (Argaud et al., 2005; Kim et al., 2003; Polyak et al., 1997; Petit et al., 1996).

Recent results from our group demonstrated that mitochondria from atherosclerosis-prone, hypercholesterolemic, LDL receptor knockout mice have a higher susceptibility to develop mitochondrial membrane permeability transition (MPT). This was related to a lower mitochondria NADPH pool. Experiments *in vivo* provided direct evidence of higher cholesterol *de novo* synthesis, which decreases NADPH reducing equivalents in tissues from hypercholesterolemic mice. These findings could explain the reduced antioxidant capacity of mitochondria from hypercholesterolemic mice, leading to the greater susceptibility to MPT (Oliveira et al., 2005). Therefore, it is conceivable to hypothesize that inhibition of cholesterol synthesis by treatment with statins could correct the decreased mitochondria antioxidant defenses in hypercholesterolemic mice.

Statins are inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase, which catalyzes the rate-limiting step in cholesterol synthesis. Statins are frequently prescribed to effectively prevent and reduce the risk of coronary artery disease through lowering serum cholesterol levels (Shepherd et al., 1995). Other lipid independent protective effects, collectively called pleiotropic, have been described. They include improvement of endothelial cell dysfunction, anti-inflammatory and anti-proliferative actions (Futterman and Lemberg, 2004; Liao, 2002). Although large clinical trials revealed the efficacy and relative safety of statins, adverse effects may, also, arise. Complications chiefly concern the hepatic function, skeletal muscle and peripheral nerves (Muscari et al., 2002). Myopathies are the most com-

mon reported side effect (Rosenson, 2004; Anon., 2004; Ucar et al., 2000).

In this work, we investigated whether the treatment of LDL receptor knockout mice with lovastatin influences the susceptibility to develop MPT and whether statins could exert direct effects on isolated mitochondria.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of muscle and liver mitochondria

Muscle mitochondria were isolated from mice hind limb skeletal muscle by homogenization in ice-cold medium containing 100 mM sucrose, 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM K_2HPO_4 , 0.1 mM EGTA and 0.2% BSA, pH 7.4, followed by differential centrifugation (Tonkonogi and Salhin, 1997). The final mitochondrial pellet was resuspended in ice-cold storage buffer containing 0.2 M mannitol, 0.1 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. Addition of 0.2% fatty acid-free BSA in the buffers throughout the isolation procedure depleted mitochondria from endogenous FFA.

Liver mitochondria were isolated by conventional differential centrifugation (Kaplan and Pedersen, 1983) from adult mice or rats fasted overnight. The livers were homogenized in 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, and 10 mM Hepes buffer (pH 7.2). The mitochondrial suspension was washed twice in the same medium containing 0.1 mM EGTA and the final pellet was resuspended in 250 mM sucrose to a final protein concentration of 80–100 mg/ml.

2.2. Standard incubation procedure

The experiments were carried out at 30 °C, with continuous magnetic stirring, in standard medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 5 mM potassium succinate, 2 mM inorganic phosphate, 1 mM magnesium chloride, 2 μM rotenone, 10 mM Hepes buffer (pH 7.2), and 30 μM CaCl_2 . Other additions are indicated in the figure legends.

2.3. Mitochondrial swelling

Mitochondrial swelling was determined as the decrease in the turbidity of the mitochondrial suspension measured at 520 nm in a Hitachi U-3000 spectrophotometer.

2.4. Determination of protein thiol groups content

The mitochondrial suspension incubated in standard reaction medium was submitted to three subsequent freeze-thawing cycles to release matrix proteins and centrifuged at 10,000 rpm for 2 min. The pellet was treated twice with 200 μl of 6.5% trichloroacetic acid and centrifuged 2 min at 10,000 rpm in order to precipitate proteins. The final pellet was resuspended in 1 ml of medium containing 100 μM of DTNB, 0.5 mM EGTA, and 0.5 M Tris-HCl, pH 8.3. Absorption was measured at 412 nm, using cysteine for calibration.

2.5. Measurements of mitochondrial transmembrane electrical potential ($\Delta\Psi$) using safranin

The mitochondrial membrane potential was estimated as fluorescence changes of safranin O, recorded on a model F-4010 Hitachi fluorescence spectrophotometer operating at excitation and emission wavelengths of 495 and 586 nm, respectively, with a slit width of 5 nm. $\Delta\Psi$ was calculated according to Akerman and Wikström (1976) using a calibration curve obtained when mitochondria were incubated in a K^+ -free reaction medium containing 250 mM sucrose, 10 mM Na-Hepes buffer, pH 7.2, and 0.5 mM EGTA.

2.6. Measurements of mitochondrial transmembrane electrical potential ($\Delta\Psi$) using TPP^+

Mitochondria were incubated in the standard medium containing 3 μ M tetraphenylphosphonium (TPP^+). The concentration of TPP^+ in the extra mitochondrial medium was continuously monitored with a TPP^+ selective electrode prepared in our laboratory according to Kamo et al. (1979). The membrane potential was, then, calculated assuming that the TPP^+ distribution between mitochondria and medium follows the Nernst equation (Muratsugu et al., 1977).

2.7. Animals and lovastatin treatment

The experiments were approved by the university's Ethic Committee and were in accordance with the Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals published by the Universities Federation for Animal Welfare (1992). LDL receptor knockout mice (Ishibashi et al., 1993) had access to standard laboratory rodent chow diet (Nuvital CR1, PR, Brazil) and water ad libitum and were housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12 h light–dark cycle. Male and female, aged 4–6 months, were used in this study. Lovastatin (100 mg/kg) or placebo (2% arabic gum) were given daily through gavage, during 15 days.

2.8. Statistical analyses

The results of experiments performed in at least three independent experiments are displayed as means $\pm$ S.D. and significance was assessed by ANOVA, followed by the Tukey post test, with significance level set at $p < 0.05$ using InStat software (InStat Software Inc., Richmond, CA, USA).

2.9. Chemicals

Cyclosporin A, Oligomycin, DTNB, EGTA, FCCP, ADP, and DTT were purchased from Sigma (St. Louis, USA), Lovastatin, Pravastatin and Simvastatin were obtained from Galena Química e Farmacêutica Ltda (SP, Brazil). All other reagents were products of the highest purity grade available.

3. Results

3.1. Plasma cholesterol levels and mitochondrial respiration in LDL receptor knockout hypercholesterolemic mice treated with lovastatin

Two-week treatment of LDL receptor knockout mice with lovastatin (100 mg/kg BW) reduced plasma total cholesterol concentration by 20% (390 ± 22 versus 308 ± 19 mg/dl, $n = 10$, $p < 0.05$). Liver mitochondria respiratory control (phosphorylating/resting respiration ratio) measured in Ca^{2+} free medium were essentially similar in lovastatin treated as compared to untreated LDL receptor knockout mice (4.45 ± 0.64 and 4.34 ± 0.79). Phosphorylation efficiency (ADP/O consumption ratio) was similar in both mitochondria: 2.52 ± 0.25 and 2.51 ± 0.34 .

3.2. Membrane potential disruption and swelling of mitochondria isolated from hypercholesterolemic mice treated with lovastatin

Mitochondria membrane transport and permeability properties were investigated in control and in lovastatin treated or untreated hypercholesterolemic mice. The experiments depicted in Fig. 1 show that control mitochondria (line a) restores $\Delta\Psi$ after four sequential additions of Ca^{2+} (25 nmol/mg protein). However,

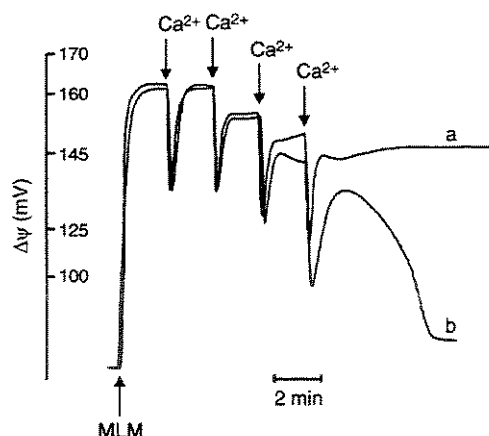


Fig. 1. Dose-response curve of mitochondrial membrane potential after sequential additions of Ca^{2+} . MLM (0.5 mg/ml) were incubated in the standard medium containing 3 μ M TPP^+ . Ca^{2+} (25 nmol/mg protein) was added as indicated. Traces represent liver mitochondria isolated from: control C57Bl6 mice (line a) and hypercholesterolemic mice (line b). The results are representative of three independent experiments performed in duplicates. $\Delta\Psi$ at 12 min was $146.0 \text{ mV} \pm 2.8$ for control mice (line a) vs. totally collapsed $\Delta\Psi$ for hypercholesterolemic mice (line b), $p < 0.001$.

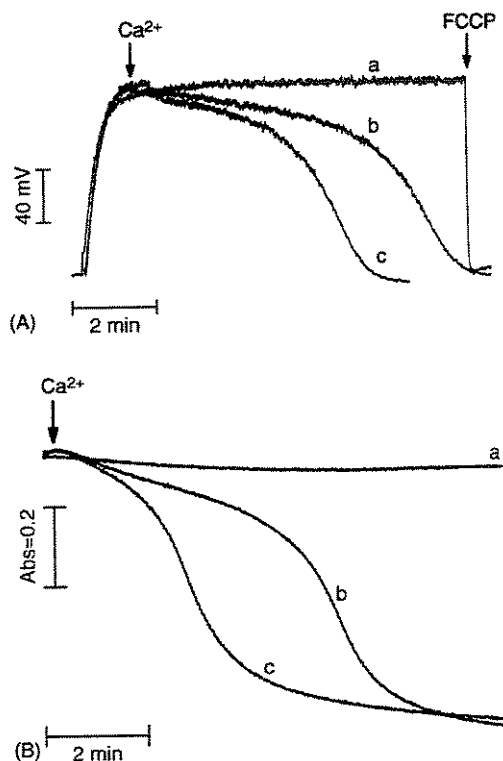


Fig. 2. Effect of in vivo lovastatin treatment on Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane potential disruption (A) and mitochondrial swelling (B). Panel A: MLM (0.5 mg/ml) were incubated in the standard medium containing 5 μM safranin plus 100 μM Ca^{2+} . Traces represent liver mitochondria isolated from: control mice (line a), hypercholesterolemic mice (line b) and hypercholesterolemic mice treated with lovastatin (line c). The results are representative of six independent experiments performed in duplicate. $\Delta\psi$ at 5 min were: $169.0 \text{ mV} \pm 2.2$ for control mice (line a) vs. $141.0 \text{ mV} \pm 1.8$ for hypercholesterolemic mice (line b), $p < 0.01$, and totally collapsed $\Delta\psi$ for hypercholesterolemic treated lovastatin (line c), $p < 0.001$. Panel B: MLM (0.5 mg/ml) were incubated in the standard medium containing 100 μM Ca^{2+} . Traces represent liver mitochondria isolated from: control mice (line a), hypercholesterolemic mice (line b) and hypercholesterolemic treated lovastatin (line c). The results are representative of six independent experiments performed in duplicates. The absorbances at 5 min were: control mice (line a: 1.481 ± 0.028), hypercholesterolemic (line b: 1.255 ± 0.046) and hypercholesterolemic mice treated with lovastatin (line c: 0.953 ± 0.063), $p < 0.001$.

hypercholesterolemic mice mitochondria (line b) showed decreased capacity to sustain $\Delta\psi$ after the third addition of calcium (75 nmol) and lost $\Delta\psi$ irreversibly after the fourth addition of calcium (100 nmol). Fig. 2 shows the effect of a single Ca^{2+} addition (100 nmol/mg protein) on mitochondria isolated from control mice (line a), hypercholesterolemic mice (line b) and hypercholesterolemic mice treated with lovastatin (line c). In agreement with Fig. 1, while the mitochondria from

control mice maintained $\Delta\psi$ after Ca^{2+} accumulation (Fig. 2A, line a), hypercholesterolemic mice mitochondria underwent $\Delta\psi$ decrease (Fig. 2A, line b). Lovastatin treatment enhanced mitochondria sensitivity to Ca^{2+} -induced loss of $\Delta\psi$ in hypercholesterolemic mice, as shown by the earlier disruption of $\Delta\psi$ (Fig. 2A, line c). Accordingly, liver mitochondria from hypercholesterolemic mice treated with lovastatin (Fig. 2B, line c) incubated in standard medium containing 100 μM calcium underwent swelling faster than untreated hypercholesterolemic mice mitochondria (Fig. 2B, line b) and controls (Fig. 2B, line a).

3.3. Mitochondrial membrane potential disruption and swelling induced by lovastatin in vitro

In order to check if the lovastatin in vivo effects described above could be a direct action of lovastatin on mitochondria, acute in vitro experiments were performed with isolated mice mitochondria. The addition of lovastatin in the incubation medium promoted $\Delta\psi$ disruption in mitochondria from muscle (Fig. 3A, line b) and liver (Fig. 3B, line b) of control C57Bl6 mice. The same effect observed in mice mitochondria was verified in rat liver mitochondria: lovastatin promoted $\Delta\psi$ disruption (Fig. 4, line b) and mitochondrial swelling (Fig. 5, lines b–f) when compared to the respective controls (lines a). These lovastatin effects were inhibited by cyclosporin A (Figs. 3 and 4: line c; Fig. 5: line g), a cyclophilin sequestrant, which prevents MPT pore opening. Mitochondrial swelling experiment shown in Fig. 5 shows that the lag time between drug addition and the onset of mitochondrial swelling was decreased with increasing lovastatin concentrations in the range of 10–80 μM (lines b–f).

Since mitochondria from mice and rats responded to lovastatin in a similar manner, we performed the following experiments on rat liver mitochondria.

3.4. Dithiothreitol, ADP, catalase and EGTA inhibited mitochondrial swelling induced by lovastatin

The mechanisms by which lovastatin-induced mitochondrial permeability transition (MPT) were additionally investigated. Fig. 6 shows that Ca^{2+} chelation by EGTA (line c) totally prevented the mitochondrial swelling that occurred in the presence of lovastatin (line b), indicating that the mitochondrial permeabilization is Ca^{2+} dependent. Membrane permeabilization was, also, prevented by the presence of ADP/Oligomycin (line

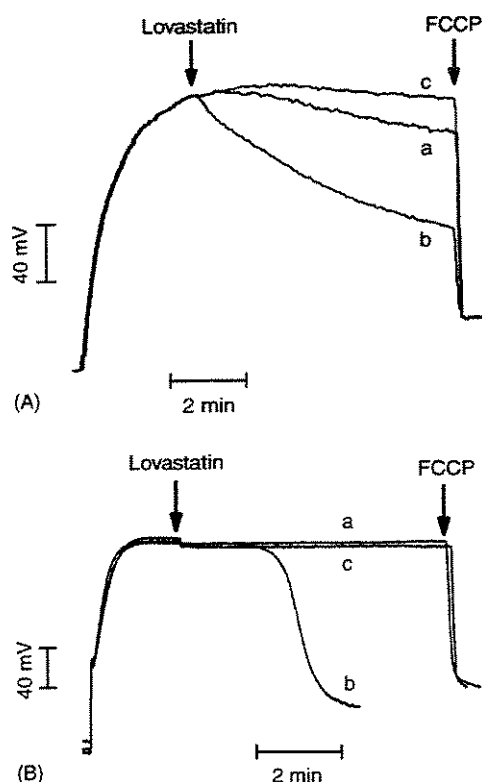


Fig. 3. Mitochondrial membrane potential disruption in muscle (A) and liver (B) mitochondria from mice induced by lovastatin in vitro. Panel A: RLM (0.5 mg/ml) were incubated in medium containing NAD⁺-linked substrates (α -ketoglutarate, pyruvate, malate, and glutamate) and 5 μ M safranin (line a), plus 40 μ M lovastatin (line b) and plus 1 μ M cyclosporin A (line c). FCCP (1 μ M) was added where indicated. The results are representative of three independent experiments performed in duplicates. $\Delta\Psi$ at 7 min were: 154.0 mV $\pm$ 3.1 (line a) vs. 99.0 $\pm$ 5.0 (line b), or 166.0 mV $\pm$ 4.1 (line c), $p < 0.001$. Panel B: MLM (0.5 mg/ml) were incubated in a standard medium containing 5 μ M safranin (line a) and 40 μ M lovastatin (line b) plus 1 μ M cyclosporin A (line c). FCCP (1 μ M) was added where indicated. The result is representative of three independent experiments performed in duplicate. $\Delta\Psi$ at 7 min was 169.0 mV $\pm$ 3.0 (line a) vs. totally collapsed (line b), or 170.0 mV $\pm$ 2.7 (line c), $p < 0.001$.

d). Oligomycin was used to prevent ADP phosphorylation allowing ADP to bind to and block the adenine nucleotide carrier, a putative component of the permeability transition pore (Halestrap et al., 1997). Addition of catalase (line e) partially inhibited lovastatin-induced mitochondrial swelling, suggesting the participation of H₂O₂ in this process. Dithiothreitol (DTT, line f), a disulfide reductant, also, blocked the lovastatin-induced MPT effect. The DTT effect suggests that the oxidation of protein thiol groups is involved in this permeabilization.

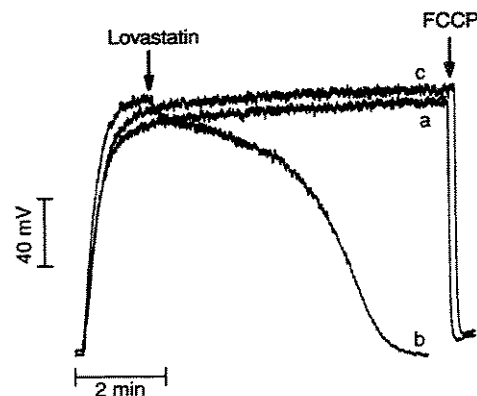


Fig. 4. Lovastatin-induced mitochondrial membrane potential disruption in rat liver mitochondria. RLM (0.5 mg/ml) were incubated in the standard medium containing 5 μ M safranin (line a), plus 40 μ M lovastatin (line b), plus 1 μ M cyclosporin A (line c). FCCP (1 μ M) was added where indicated. The results are representative of 10 independent experiments performed in duplicates. $\Delta\Psi$ at 7 min were 164.0 mV $\pm$ 3.9 (line a) vs. totally collapsed (line b), or 166.3 mV $\pm$ 4.1 (line c), $p < 0.001$.

3.5. Oxidation of mitochondrial membrane protein thiol groups is promoted by lovastatin in the presence of Ca²⁺

The participation of protein thiol groups' oxidation in the mechanism of MPT induction by lovastatin was examined by determining the content of reduced thiol groups in the mitochondrial membrane. Results presented in Table 1 indicate that there is a significant decrease in the protein thiol content, due to thiol oxidation, when mitochondria were incubated with lovastatin. Both MPT inhibitors, ADP and dithiothreitol, prevented

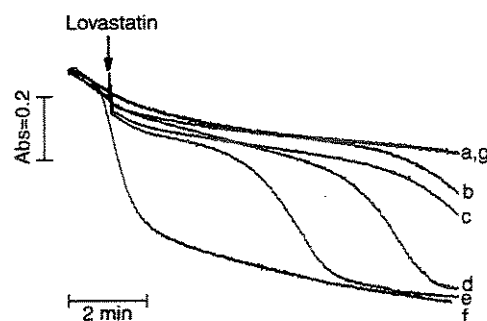


Fig. 5. Dose-dependent effect of lovastatin on mitochondrial swelling. RLM (0.5 mg/ml) were incubated in the standard medium containing: 0, 10, 20, 30, 40 and 80 μ M lovastatin, respectively (lines a–f) or 80 μ M lovastatin plus 1 μ M CsA (line g). The results are representative of six independent experiments performed in duplicate. The absorbance at 8 min was: 1.453 $\pm$ 0.040 (line b), 1.330 $\pm$ 0.040 (line c), 1.172 $\pm$ 0.042 (line d), 1.119 $\pm$ 0.018 (line e), 1.074 $\pm$ 0.049 (line f) vs. 1.529 $\pm$ 0.035 (line a), $p < 0.001$.

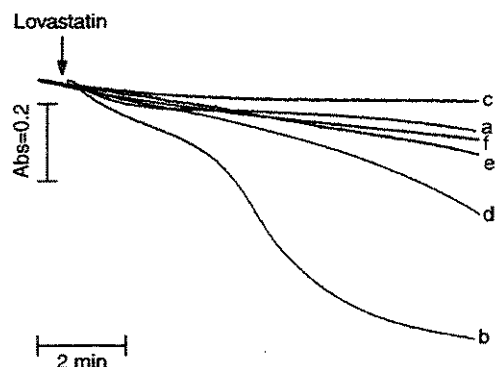


Fig. 6. Inhibition by EGTA, dithiothreitol, catalase and ADP on lovastatin-induced mitochondrial swelling. RLM (0.5 mg/ml) were incubated in the standard medium containing 40 μ M lovastatin (line b) in the presence of: 500 μ M EGTA (line c), 2 μ M catalase (line d), 500 μ M ADP plus 1 μ g/ml oligomycin (line e) or 500 μ M dithiothreitol (line f). Line a represents the control experiment (no additions). The results are representative of five independent experiments performed in duplicates. The absorbances at 7 min were 1.573 ± 0.043 (line a), 1.122 ± 0.033 (line b), 1.625 ± 0.063 (line c), 1.470 ± 0.038 (line d), 1.539 ± 0.033 (line e), 1.566 ± 0.038 (line f). Line b (lovastatin) differed significantly at $p < 0.001$ from all other treatments (a, c–f).

the thiol groups' oxidation. As expected, the presence of cyclosporin A did not inhibit the oxidation of the protein thiol groups.

3.6. Comparative effects of hydrophobic and hydrophilic statins on mitochondrial swelling

Fig. 7 shows that simvastatin and lovastatin (hydrophobic statins) presented similar effects of inducing mitochondrial swelling (lines b and c). However, the effect of pravastatin (hydrophilic statin) was significantly milder. Doubling pravastatin medium concentra-

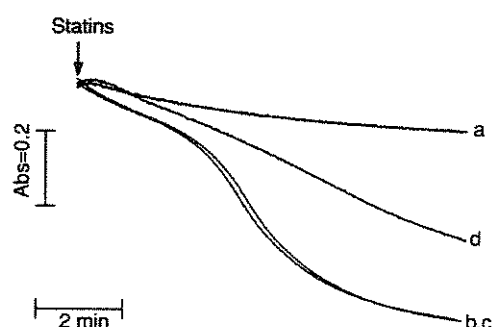


Fig. 7. Comparison of lovastatin, simvastatin, and pravastatin effects on mitochondrial swelling. RLM (0.5 mg/ml) were incubated in the standard medium containing 40 μ M lovastatin (line b), simvastatin (line c), or pravastatin (line d). Line a represents control (no additions). The results are representative of six independent experiments. The absorbances at 7 min were: 1.555 ± 0.042 (line a), 1.270 ± 0.020 (line b), 1.017 ± 0.055 (line c) and 1.026 ± 0.060 (line d). Line a is significantly different at $p < 0.001$ from others (b–d).

tion (80 μ M) promoted mitochondria swelling similarly to 40 μ M lovastatin (data not shown).

4. Discussion

The efficacy of statins in lipid lowering and reducing the risk of coronary heart disease is well established. New cholesterol guidelines (Stein, 2002) may lead to the use of statins more frequently and at higher doses. Myopathy, the most common adverse effect of statins is dose-related (Anon., 2004). Although strong epidemiology data are lacking, the incidence of muscular toxicity occurs in 1–7% of statin treated patients (Ucar et al., 2000) and severe myopathy is in the range of 0.1–0.5% with monotherapy (Hodel, 2002); however, signs of systemic oxidation injury (isoprostene levels) can be detected in ~10% of the treated patients (Sinzinger et al., 2002). Statins inhibit synthesis of mevalonate, a precursor of ubiquinone, which functions as an electron carrier in the mitochondrial respiratory chain and act as an important intracellular and systemic antioxidant as well (Hargreaves, 2003). Some studies have reported lowered plasma Coenzyme Q10 levels, the predominant form of ubiquinone in man, in statin treated than in untreated hypercholesterolemic patients (Ghirlanda et al., 1993; De Pinieux et al., 1996). Lower ubiquinone levels have, also, been reported in tissues (liver and heart) of statin treated hamsters (Belichard et al., 1993).

In this work, we used statins in an attempt to correct increased susceptibility to mitochondrial permeability transition observed in hypercholesterolemic mice (Oliveira et al., 2005), but we found that the drug treat-

Table 1

Oxidation of mitochondrial membrane protein thiol groups promoted by lovastatin and Ca^{2+} : prevention by ADP and DTT

Conditions	–SH (nmol/mg protein)
100 μ M EGTA	46 ± 0.7
No addition	40 ± 0.5
40 μ M lovastatin	$18 \pm 0.2^*$
40 μ M lovastatin + 0.5 mM DTT	44 ± 0.4
40 μ M lovastatin + 0.5 mM ADP	38 ± 0.6
40 μ M lovastatin + 1 μ M CsA	$19 \pm 0.4^{\#}$

Experiments were conducted under the same conditions to those of Fig. 1. The reactions were stopped at 10 min. Values represent average of three independent experiments $\pm$ S.D. * $p < 0.05$ when comparing lovastatin with other conditions, except lovastatin plus CsA ($^{\#}p > 0.05$) by ANOVA.

ment worsened this defect (Fig. 2). The doses of statins used in the present study were just the sufficient to reduce cholesterol in the hypercholesterolemic mice (Bisgaier et al., 1997). However, it should be emphasized that these doses were much higher than those used in humans. In vitro doses were similar to those used by others in isolated cell models (Sirvent et al., 2005; Cafforio et al., 2005; Kaneta et al., 2003; Zhong et al., 2003).

It has been previously reported that statins-induced apoptosis in cultured cells and, in some cases, the apoptosis occurred via the mitochondria pathway (Mutoh et al., 1999; Kaneta et al., 2003; Johnson et al., 2004; Werner et al., 2004). Although this property of statin has been considered as potential anti-cancer therapy (Cafforio et al., 2005), one should consider its actual cytotoxic action.

The mechanisms by which mitochondria would be involved in statin-induced cell death are not well clarified. Statin effects in vivo and in situ may be secondary to several metabolic changes in response to the HMG-CoA reductase inhibition. By using isolated mice and rat mitochondria preparations, we demonstrated direct effects of statins on muscle and liver mitochondria. Lovastatin-induced Ca^{2+} -dependent mitochondrial permeability transition in a dose-dependent manner, and this is associated with the oxidation of membrane protein thiol groups, but the exact mechanism of thiol group oxidation is unknown. In experiments using the probe $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, we did not observe an increase in formation of oxidized DCF in the presence of statin (data not shown). However, the involvement of ROS in lovastatin-induced MPT is clearly demonstrated by the partial inhibition of mitochondrial swelling in presence of catalase. Lovastatin could act indirectly by inhibiting one of the mitochondrial thiol reductase enzymes. Alternatively, lovastatin could stimulate mitochondria associated nitric oxide synthase (NOS), as previously shown for the endothelial NOS (Castro et al., 2004; Yokoyama et al., 2005). In the absence/deficiency of substrates/cofactors, NOS generates superoxide instead of NO (Xia et al., 1996). Hydrophobic statins were more potent than hydrophilic statins in inducing MPT, probably due to different affinities of these compounds to critical binding sites on the inner mitochondrial membrane.

It has been proposed that Ca^{2+} either alters the reactivity of mitochondrial membrane protein thiol groups in the presence of thiol reagents (Bernardes et al., 1994) or directly regulates the MPT pore opening (Zoratti and Szabo, 1995). The central role of calcium is, further, supported by studies showing that statins induce alterations in cellular Ca^{2+} homeostasis. Increased calcium cytosolic concentration has been shown in myoblasts cultured with simvastatin (Nakahara et al., 1994), skeletal mus-

cle of simvastatin treated rats (Pierno et al., 1999) and by acute application of simvastatin on human skeletal muscle fibers (Sirvent et al., 2005). In the latter study, the authors showed that a mitochondrial depolarization and Ca^{2+} efflux preceded a large sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release.

In summary, we demonstrated that statins directly induce mitochondrial membrane permeability transition through promoting calcium dependent oxidation of protein thiol groups. This process is dose-dependent and is more potentially triggered by hydrophobic statins. These effects on mitochondria might lead to cell injury or death contributing to the deleterious side effects reported in statin treated patients.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). JAV is a PhD student at the PhD Program in Fisiopatologia Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

References

- Akerman, K.E.O., Wikström, K.F., 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68, 191–197.
- Anon., 2004. Safety of aggressive statin therapy. *Med. Lett. Drugs Ther.* 46, 93–95.
- Argaud, L., Gateau-Roesch, O., Muntean, D., Chalabreysse, L., Loufouat, J., Robert, D., Ovize, M., 2005. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J. Mol. Cell Cardiol.* 38, 367–374.
- Belichard, P., Pruneau, D., Zhiri, A., 1993. Effect of a long-term treatment with lovastatin or fenofibrate on hepatic and cardiac ubiquinone levels in cardiomyopathic hamster. *Biochim. Biophys. Acta* 1169, 98–102.
- Bernardes, C.F., Meyer-Fernandes, J.R., Basseres, D.S., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 1994. Ca^{2+} -dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4-diisothiocyanatostilbene-2,2-disulfonic acid (DIDS). *Biochim. Biophys. Acta* 1188, 93–100.
- Bisgaier, C.L., Essenburg, A.D., Auerbach, B.J., Pape, M.E., Sekerke, C.S., Gee, A., Wolle, S., Newton, R.S., 1997. Attenuation of plasma low-density lipoprotein cholesterol by select 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in mice devoid of low-density lipoprotein receptors. *J. Lipid Res.* 38, 2502–2515.
- Cafforio, P., Dammacco, F., Gernone, A., Silvestris, F., 2005. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 26, 883–891.
- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Meinicke, A.R., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E., 1995. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radical Biol. Med.* 18, 479–486.
- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1998. 3,5,3'-Triiodothyronine induces mitochondrial permeability transition

- mediated by reactive oxygen species and membrane protein thiol oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 354, 151–157.
- Castro, M.M., Rizzi, E., Rascado, R.R., Nagassaki, S., Bendhack, L.M., Tanus-Santos, J.E., 2004. Atorvastatin enhances sildenafil-induced vasodilation through nitric oxide-mediated mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 498, 189–194.
- De Pinieux, G., Chariot, P., Ammi-Said, M., Louarn, F., Lejonec, J.L., Astier, A., Jacotot, B., Gherardi, R., 1996. Lipid-lowering drugs and mitochondrial function: effects of HMG-CoA reductase inhibitors on serum ubiquinone and blood lactate/pyruvate ratio. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 42, 333–337.
- Fagian, M.M., Pereira da Silva, L., Martins, I.S., Vercesi, A.E., 1990. Membrane protein cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. *J. Biol. Chem.* 265, 19955–19960.
- Futterman, L.G., Lemberg, L., 2004. Statin pleiotropy: fact or fiction? *Am. J. Crit. Care* 13, 244–249.
- Ghirlanda, G., Oradei, A., Manto, A., Lippa, S., Uccioli, L., Caputo, S., Greco, A.V., Littarru, G.P., 1993. Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Pharmacol.* 33, 226–229.
- Halestrap, A.P., Woodfield, K.Y., Connern, C.P., 1997. Oxidative stress, thiol reagents and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J. Biol. Chem.* 272, 3346–3354.
- Hargreaves, I.P., 2003. Ubiquinone: cholesterol's reclusive cousin. *Ann. Clin. Biochem.* 40, 207–218.
- Hodel, C., 2002. Myopathy and rhabdomyolysis with lipid-lowering drugs. *Toxicol. Lett.* 128, 159–168.
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., Herz, J., 1993. Hypercholesterolemia in low-density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* 92, 883–893.
- Johnson, T.E., Zhang, X., Bleicher, K.B., Dysart, G., Loughlin, A.F., Schaefer, W.H., Umbenhauer, D.R., 2004. Statins induce apoptosis in rat and human myotube cultures by inhibiting protein geranylgeranylation but not ubiquinone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 200, 237–250.
- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., Kobatake, Y., 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* 49, 105–121.
- Kaneta, S., Satoh, K., Kano, S., Kanda, M., Ichihara, K., 2003. All hydrophobic HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptotic death in rat pulmonary vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 170, 237–243.
- Kaplan, R.R., Pedersen, P.L., 1983. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. *J. Biochem.* 212, 279–288.
- Kim, J.S., He, L., Qian, T., Lemasters, J.J., 2003. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr. Mol. Med.* 3, 527–535.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E., 1996. 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.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 495, 12–15.
- Lehninger, A.L., Vercesi, A.E., Bababunmi, E.A., 1978. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation–reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1690–1694.
- Liao, J.K., 2002. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int. J. Cardiol.* 86, 5–18.
- Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148.
- Muratsugu, M., Kamo, N., Kurihara, K., Kobatake, Y., 1977. Selective electrode for dibenzyl dimethyl ammonium cation as indicator of the membrane potential in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta* 464, 613–619.
- Muscari, A., Puddu, G.M., Puddu, P., 2002. Lipid-lowering drugs: are adverse effects predictable and reversible? *Cardiology* 97, 115–121.
- Mutoh, T., Kumano, T., Nakagawa, H., Kuriyama, M., 1999. Role of tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma1 in the signaling pathway of HMG-CoA reductase inhibitor-induced cell death of L6 myoblasts. *FEBS Lett.* 446, 91–94.
- Nakahara, K., Yada, T., Kuriyama, M., Osame, M., 1994. Cytosolic Ca^{2+} increase and cell damage in L6 rat myoblasts by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 1579–1585.
- Oliveira, H.C., Cosso, R.G., Alberici, L.C., Maciel, E.N., Salerno, A.G., Dorighele, G.G., Velho, J.A., Faria, E.C., Vercesi, A.E., 2005. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. *FASEB J.* 19, 278–280.
- Petit, P.X., Suzin, S.A., Zamzami, N., Mignotte, B., Kroemer, G., 1996. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett.* 396, 7–13.
- Pierro, S., De Luca, A., Liantonio, A., Camerino, C., Conte Camerino, D., 1999. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on excitation–contraction coupling of rat skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 364, 43–48.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300–305.
- Rosenson, R.S., 2004. Current overview of statin-induced myopathy. *Am. J. Med.* 116, 408–416.
- Shepherd, J., Cobbe, S.M., Ford, I., Isles, C.G., Lorimer, A.R., MacFarlane, P.W., McKillop, J.H., Packard, C.J., 1995. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N. Engl. J. Med.* 333, 1301–1307.
- Sinzinger, H., Chehne, F., Lupattelli, G., 2002. Oxidation injury in patients receiving HMG-CoA reductase inhibitors: occurrence in patients without enzyme elevation or myopathy. *Drug Saf.* 25, 877–883.
- Sirvent, P., Mercier, J., Vassort, G., Lacampagne, A., 2005. Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca^{2+} signaling alteration in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 1067–1075.
- Stein, E., 2002. The lower the better? Reviewing the evidence for more aggressive cholesterol reduction and goal attainment. *Atheroscler. Suppl.* 2, 19–25.
- Tonkonogi, M., Salhin, K., 1997. *Acta Physiol. Scand.* 161, 345–353.
- Ucar, M., Mjorndal, T., Dahlqvist, R., 2000. HMG-CoA reductase inhibitors and myotoxicity. *Drug Saf.* 22, 441–457.
- Werner, M., Sacher, J., Hohenegger, M., 2004. Mutual amplification of apoptosis by statin-induced mitochondrial stress and doxorubicin toxicity in human rhabdomyosarcoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 143, 715–724.
- Xia, Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Snyder, S.H., Zweier, J.L., 1996. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in

- arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 93, 6770–6774.
- Yokoyama, S., Ikeda, H., Haramaki, N., Yasukawa, H., Katoh, A., Imaizumi, T., 2005. HMG-CoA reductase inhibitor protects against in vivo arterial thrombosis by augmenting platelet-derived nitric oxide release in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 45 (4), 375–381.
- Zago, E.B., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2000. The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. *FEBS Lett.* 23934, 1–5.
- Zhong, W.B., Wang, C.Y., Chang, T.C., Lee, W.S., 2003. Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells via inhibition of protein geranylgeranylation and de novo protein synthesis. *Endocrinology* 144, 3852–3859.
- Zoratti, M., Szabo, I., 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139–176.