



# **Efeito do treino de *endurance* e da hipoxia hipobárica intermitente na disfunção mitocondrial hepática induzida por salicilato.**

Dissertação apresentada com vista à obtenção do 2º  
Ciclo em Actividade Física e Saúde, da Faculdade de  
Desporto da Universidade do Porto, ao abrigo do  
decreto de lei nº. 74/2006 de 24 de Março

**Orientador:** Prof. Doutor António Ascensão  
**Co-Orientador:** Prof. Doutor José Magalhães  
**Autora:** Liliana Sofia Gonçalves Brochado

Porto, Setembro 2011

Brochado, L. (2011). *Efeito do treino de endurance e da hipoxia hipobárica intermitente na disfunção mitocondrial hepática induzida por salicilato*. Porto: Liliana Brochado. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

Este trabalho foi elaborado no âmbito do projecto PTDC/DES/113580/2009  
financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.





## Agradecimentos

A concretização deste trabalho só foi possível graças ao apoio e disponibilidade de diversas pessoas que, de forma directa ou indirecta, me ajudaram ao longo de todo este percurso, pelo que não poderia deixar de mostrar o meu reconhecimento e expressar os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. António Ascensão e Prof. Dr. José Magalhães, pela oportunidade oferecida em estudar este “novo mundo”; pela disponibilidade e apoio sempre presentes, acentos numa formação que me tornou um ser mais autónomo.

À equipa de laboratório: Inês Oliveira, Inês Aleixo, Emanuel dos Passos e Sílvia Rodrigues, pelo ensino das técnicas de laboratório; pelo incessante acompanhamento na realização escrita do presente documento; pelas palavras de apoio nos momentos mais difíceis. Simplesmente porque são pessoas fantásticas que me acompanharam sempre!

Aos meus pais, por mais este voto de confiança, sem eles seria impensável me increver em *mais* este curso; por me deixarem sempre “ser do tamanho do meu sonho”, mesmo que isso acarrete inúmeros sacrifícios.

Ao Pauleta, por me amar. Também te amo!

Ao melhor grupo de todo o sempre, Flyers Desportus, pelo suor e dedicação em cada mortal, em cada pino; pelos maravilhosos jantares; por tudo o que significa a mãosota, a amizade, a união...; por terem sempre *aquele abraço!*

**...a todos, o meu Muito Obrigado!**



---

## Índice Geral

Agradecimentos .....	III
Índice Geral.....	V
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Quadros.....	XI
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XIII
Resumo.....	XV
Abstract.....	XVII
1 – Introdução .....	1
2 – Revisão da Literatura .....	5
2.1 – A Mitocôndria.....	5
2.1.1 – Estrutura mitocondrial .....	5
2.1.2 – Produção de energia e função mitocondrial .....	6
2.1.3 – Produção de Espécies Reactivas de Oxigénio.....	8
2.1.4 – Apoptose .....	10
2.1.5 – Poro de Permeabilidade Mitocondrial e sua regulação .....	13
2.2 – Disfunções hepáticas mitocondriais.....	15
2.2.1 – Esteatohepatite não alcoólica (NASH) .....	15
2.2.2 – Papel das mitocôndrias hepáticas e do stress oxidativo na NASH	16
2.2.3 – Lesões hepáticas mitocondriais, induzidas pela administração de fármacos .....	17
2.2.3.1 – Salicilato: indutor de disfunções em mitocôndrias hepáticas ..	18
2.3 – Cardioprotecção .....	21
2.3.1 – Treino de <i>endurance</i> e cardioprotecção.....	22
2.3.2 – Hipóxia Hipobárica Intermitente e cardioprotecção.....	25

---

2.4 – Efeitos do treino de <i>endurance</i> na funcionalidade mitocondrial hepática. .....	28
3 – Definição dos Objectivos.....	31
3.1 – Objectivo geral.....	31
3.2 – Objectivos específicos .....	31
4 – Metodologia.....	33
4.1 – Caracterização da amostra.....	33
4.2 – Protocolo experimental .....	33
4.2.1 – Hipoxia hipobárica intermitente e treino de <i>endurance</i> .....	33
4.2.2 – Extração de sangue e isolamento de mitocôndrias hepáticas.....	34
4.2.3 – Determinação do consumo do O <sub>2</sub> mitocondrial .....	35
4.2.4 – Determinação do potencial elétrico transmembranar ( $\Delta\psi$ ) .....	35
4.2.5 – Swelling mitocondrial.....	37
4.3 – Procedimentos estatísticos .....	37
5 – Apresentação dos Resultados .....	39
5.1 – Efeito do treino de <i>endurance</i> e da hipóxia hipobárica intermitente no peso do órgão e rendimento mitocondrial.....	39
5.2 – Efeito do treino de <i>endurance</i> e da hipóxia hipobárica intermitente no consumo de oxigénio mitocondrial.....	40
5.3 – Efeito do treino de <i>endurance</i> e da hipóxia hipobárica intermitente no potencial de membrana mitocondrial .....	42
5.4 – Efeito do treino de <i>endurance</i> e da hipóxia hipobárica no Swelling mitocondrial .....	43
6 – Discussão dos Resultados.....	45
6.1 – Adaptações induzidas pelo treino de <i>endurance</i> e pela hipóxia hipobárica intermitente na morfologia animal .....	46

6.2 – Efeitos do treino de <i>endurance</i> e da hipóxia hipobárica intermitente na actividade respiratória e no potencial transmembranar .....	47
6.3 – O efeito do treino de <i>endurance</i> e da hipóxia hipobárica intermitente em mitocôndrias hepáticas sujeitas a salicilato .....	51
7 – Conclusões .....	57
Referências Bibliográficas.....	I



## Índice de Figuras

<b>Fig. 1</b> Fosforilação Oxidativa (Cooper & Hausman, 2007).....	7
<b>Fig. 2</b> Ensaio típicos de A) variações do consumo de O <sub>2</sub> e B) potencial transmembranar durante um ciclo fosforilativo induzido por ADP.....	8
<b>Fig. 3</b> Formação e indução do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM). .....	13
<b>Fig. 4</b> Ciclos de disfunção mitocondrial hepática em NASH (Pessayre, 2007).....	17
<b>Fig. 5</b> Valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) da taxa do estado 4 respiratório, na presença de salicilato (0,5mM) usando como substrato Glutamato-malato (10/5mM) e Succinato (10mM/) inibindo o complexo I com rotenona (4 $\mu$ M). .....	41
<b>Fig. 6</b> – Valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) de: Figura 6A – Máxima taxa de <i>swelling</i> ; Figura 6B – Amplitude do <i>swelling</i> ; Figura 6C – Média da taxa de <i>swelling</i> . Na presença e na ausência de salicilato .....	44



---

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1</b> Valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) das características dos animais e rendimento mitocondrial .....	39
<b>Quadro 2</b> Valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) da taxa respiratória em estado 3 e 4 e RCR, usando como substratos Glutamato-malato (10/5mM) e Succinato (10mM) na presença de rotenona (4 $\mu$ M).....	40
<b>Quadro 3</b> valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) das flutuações do potencial mitocondrial transmembranar ( $\Delta\psi$ ) e da <i>lag phase</i> , após um ciclo fosforilativo de ADP, usando como substratos Glutamato-malato (10/5mM) e Succinato (10mM) na presença de rotenona (4 $\mu$ M).....	42
<b>Quadro 4</b> valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) das flutuações do potencial mitocondrial transmembranar ( $\Delta\psi$ ) e da <i>lag phase</i> , de um ciclo fosforilativo de ADP, usando como substrato Succinato-rotenona (10mM/4 $\mu$ M) na presença de salicilato (0,5mM). .....	43



## Lista de Abreviaturas e Símbolos

- [Ca<sup>2+</sup>] – Concentração do Ião Cálcio  
μM – micro molar  
Δψ – Potencial eléctrico transmembranar  
ADP – Adenosina Difosfato  
AINE – Anti-Inflamatório Não-Esteróide  
ANT – Traslocador de Nucleotidos de Adenina  
ATP – Adenosina Trifosfato  
Ca<sup>2+</sup> – Ião Cálcio  
CAT – Catalase  
CK – Creatina Quinase  
CoA – Coenzima A  
CsA – Ciclosporina A  
CTE – Cadeia Transportadora de Electrões  
Cyp-D – Ciclofilina D  
ERN – Espécies Reactivas de Nitrogénio  
ERO – Espécies Reactivas Oxigénio  
FADH<sub>2</sub> – Dinucleótido de Flavina Adenina reduzida  
g – grama  
GPX – Glutathiona Peroxidase  
GSH – Glutathiona Reduzida  
h – hora  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogénio  
HE – Hipóxico Exercitado  
HHI – Hipoxia Hipobárica Intermitente  
HK – Hexoquinase  
HO• – Radical Hidróxilo  
HS – Hipóxico Sedentário  
HSP – Proteínas de Choque Térmico  
I/R – Isquemia-Reperfusão

m – metros

MDA – Malondialdeído

mDNA – Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial

min – Minutos

mitoKATP – canais de potássio mitocondriais dependentes de ATP

mM – milimolar

MnSOD – Isoforma mitocondrial de superóxido dismutase

N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Óxido Nitroso

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido reduzida

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótidofosfato

NAFLD – Doenças de “Fígado Gordão” de origem Não Alcoólica

NASH – Esteatohepatite Não-Alcoólica

NE – Normóxico Exercitado

NO• – Radical Óxido Nítrico

NOS – Oxido Nítrico Sintetase

NS – Normóxico Sedentário

O<sub>2</sub> – Oxigénio

O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> – Radical Superóxido

ONOO<sup>-</sup> – Peroxinitrito

PBR – Receptor Periférico de Benzodiazepinas

Pi – Fosfato Inorgânico

PKC – Proteína Quinase C

PPTM – Poro de Permeabilidade Transitória mitocondrial

RCR – Rácio de Controle Respiratório

SOD – Superoxido Dismutase

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral α

VDAC – Canal iónico Dependente de Voltagem

## Resumo

O treino de *endurance* e a hipóxia hipobárica intermitente (HHI) possuem efeitos cardioprotectores, à semelhança de alguns fármacos como a aspirina, de que o salicilato é o principal metabolito. Sabe-se que o salicilato tem efeitos nefastos sobre as mitocôndrias hepáticas, contudo os efeitos do treino de *endurance* e da HHI, quer isoladamente ou de forma combinada, na função hepática e em particular sobre a bioenergética mitocondrial ainda é pouco conhecido. Este estudo teve como objectivo analisar o efeito isolado e combinado de treino de *endurance* e da HHI na função mitocondrial do fígado na presença e na ausência de salicilato. Vinte e três ratos adultos Wistar (5 semanas) foram distribuídos aleatoriamente: Normóxico Sedentário (NS) (n=7), Normóxico Exercitado (NE) (n=5), Hipóxico Sedentário (HS) (n=6) e Hipóxico Exercitado (HE) (n=5). Os grupos HS e HE foram submetidos a hipoxia intermitente, 5h/dia, 5 dias/semana, a 6000m de altitude. Os grupos NE e HE foram sujeitos a treino de *endurance*, com duração de 1h/dia, ao longo de 5 semanas a uma velocidade de 25m/min (0% de inclinação). Foram avaliados *in vitro*, na presença e ausência de salicilato, a taxa de consumo de oxigénio mitocondrial, o potencial transmembranar ( $\Delta\psi$ ) e o swelling mitocondrial. Na ausência de salicilato, os grupos NE, HS e HE apresentaram taxas de consumos de O<sub>2</sub> inferiores ao grupo NS, para ambos os estados e substratos, sendo na presença de salicilato esta diferença significativa no estado 4 para o complexo I. A *lag phase* do complexo II do grupo HE, na ausência de salicilato, foi significativamente inferior à dos grupos HS e NE. Na presença de salicilato, no complexo II, todos os grupos possuem *lag phase* inferior ao NS. Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes grupos, nos ensaios de *swelling* quer na ausência quer na presença de salicilato. Os resultados obtidos parecem demonstrar que o treino de *endurance* e a HHI induzem melhorias na capacidade do sistema fosforilativo das mitocôndrias, revelando efeitos protectores contra a toxicidade hepática induzida por este fármaco.

**PALAVRAS-CHAVE:** TREINO DE ENDURANCE; HIPÓXIA HIPOBÁRICA INTERMITENTE; SALICILATO; FUNÇÃO MITOCONDRIAL; FÍGADO; PORO DE PERMEABILIDADE TRANSITÓRIA; CARDIOPROTECÇÃO.



## Abstract

The endurance training and intermittent hypobaric hypoxia have cardioprotective effects as some drugs such as Aspirin, of which salicylate is the active metabolite. It is known that salicylate has damaging effects on liver mitochondria. However, the effects of endurance training and intermittent hypobaric hypoxia on liver function and in particular on the mitochondrial bioenergetics is still unknown. The purpose of this study was to determine the isolated and combined effects of endurance training and HII on liver mitochondrial function in the presence and in absence of salicylate. Twenty-three adult Wistar rats (5 weeks) were randomly divided into four groups: normoxic Sedentary (NS) (n = 7), normoxic exercised (NE) (n = 5), Hypoxic Sedentary (HS) (n = 6) and Hypoxic exercised (HE) (n = 5). The HS and HE groups were submitted to intermittent hypobaric hypoxia, 5h/day, 5 days/week, 6000m altitude. NE and HE groups were exposed to endurance training lasted 1 hour, over four weeks at a speed of 25m/min with 0% grade. *In vitro* mitochondrial oxygen consumption rates, transmembrane potential fluctuations ( $\Delta\psi$ ) and mitochondrial swelling were evaluated, in the presence and absence of salicylate. In the absence of salicylate NE HS and HE had lower O<sub>2</sub> consumption rates than the NS, for both state 3 and 4 and used substrates. With salicylate, this significant difference is in state 4 of the complex I. The lag phase of the complex II of group HE in the absence of salicylate was significantly lower than that of HS and NE. In the presence of salicylate, for complex II, all groups presented lower *lag phase* than the NS. The *swelling* tests experiments did not reveal significant differences between groups, both in the presence and absence of salicylate. These data demonstrate that endurance training and intermittent hypobaric hypoxia results in improvements in the liver mitochondria phosphorylation system protective against liver toxicity induced by salicylate.

**KEYWORDS:** ENDURANCE TRAINING; INTERMITTENT HYPOBARIC HYPOXIA; SALICYLATES; MITOCHONDRIAL FUNCTION; LIVER; PERMEABILITY TRANSITIONAL PORE CARDIOPROTECTION.



## 1 – Introdução

A prevalência da obesidade e da resistência à insulina está a aumentar rapidamente a nível mundial, sendo este fenómeno explicado, em parte, pelo aporte de uma dieta hipercalórica conjugado com um estilo de vida sedentário. Diversos autores têm vindo a sugerir que este estado opolente pode levar à disfunção de alguns órgãos, nomeadamente o fígado, estando na origem da esteatose hepática, caracterizada pela acumulação de vácuos lipídicos, no citoplasma das células hepáticas. No entanto, a acumulação de gordura no fígado resultante da obesidade e e da resistência à insulina não é a única causa para a designada estaetatohepatite não-alcoólica (NASH). Na verdade, a NASH também pode ocorrer após a administração de certos fármacos/drogas, como alguns anti-arrítmicos, anti-anginosos, anti-estrogênicos, anti-neoplásicos, anti-retrovirais e anti-inflamatórios (Begrliche et al 2006; Labbe et al 2008).

Seja qual for a etiologia, actualmente, existe um conjunto de evidências que sugerem que a disfunção mitocondrial desempenha um papel importante na esteatose e na NASH. As limitações funcionais das mitocôndrias não afectam apenas a homeostasia da gordura hepática, como também leva à produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e nitrogénio (ERN) que desencadeiam a peroxidação lipídica, a oxidação protéica e a morte celular (Pessayre et al 2004; Begrliche et al 2006; Pessayre 2007; Labbe et al. 2008).

Os fármacos designados como terapêuticos acima referidos são conhecidos por causar toxicidade hepática através da interacção com diversos mecanismos prejudiciais à bioenergética mitocondrial, comprometendo o sistema fosforilativo, incluindo a cadeia de transporte de electrões (CTE), as desidrogenases do ciclo de Krebs envolvidas na produção de equivalentes reduzidos, o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), a ATP-sintetase, e o aumento da vulnerabilidade à permeabilidade transitória mitocondrial (Labbe et al. 2008).

De facto, os fármacos e seus metabólitos reactivos podem desencadear a permeabilização da membrana externa ou ruptura, devido à abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM) dependendo, principalmente, da sobrecarga do ião cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e do aumento do stress oxidativo. A abertura do PPTM pode contribuir para a apoptose de células do fígado através da libertação do citocromo c e outras proteínas pró-apoptóticas mitocondriais (Pessayre et al., 2010).

A aspirina, de que o salicilato é o metabolito activo, é amplamente prescrita como terapia anti-inflamatória, bem como no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares (Nulton-Persson et al., 2004). Sabe-se que o salicilato tem efeitos nefastos sobre as mitocôndrias isoladas do fígado, causando desacoplamento da fosforilação oxidativa (Charnock & Opit 1962), *swelling* (Gutknecht 1990), e indução do PPTM na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (Trost & Lemasters 1996, 1997), estando o último associado com aumento do stress oxidativo (Battaglia et al. 2005).

Diversas intervenções não-farmacológicas têm sido amplamente recomendadas para antagonizar os efeitos adversos causados por uma variedade de complicações, incluindo as resultantes de doenças metabólicas e cardiovasculares (Johnson & George 2010). O exercício físico regular e hipoxia crónica intermitente de estão incluídos nestas estratégias. Na verdade, a investigação tem demonstrado resultados promissores do exercício contra isquemia e reperfusão (I/R) cardíaca, bem como outros modelos cardiotoxicos em diferentes níveis de organização do tecido (Ascensão et al., 2007; Powers et al 2008; Kavazis 2009; Ascensão et al., 2011a,b). As adaptações decorrentes da hipoxia crónica intermitente de também têm sido eficazes na protecção do miocárdio contra as I/R (Dong et al 2003; Zhu et al 2003; Kolar et al 2007). No entanto, pouco é conhecido sobre o efeito de ambas as intervenções, quer isoladamente ou de forma combinada, na função hepática e em particular sobre a bioenergética mitocondrial.

O exercício físico pode melhorar a sensibilidade à insulina no músculo, aumentando a actividade da AMPK (Musi et al 2003; Ruderman et al 2003). Curiosamente, o treino também aumenta a actividade da AMPK no fígado,

sugerindo que a estimulação da oxidação dos ácidos gordos e a melhoria da sensibilidade à insulina devido ao exercício não são restritos ao músculo esquelético (Park et al 2002; Ruderman et al 2003). Recentemente, Thyfault, et al. (2009) observaram que animais selectivamente criados com baixa capacidade aeróbica apresentam uma capacidade mitocondrial oxidativa reduzida no tecido hepático e maior susceptibilidade para desenvolver esteatose hepática, quando comparados com animais com maior capacidade aeróbica. Contudo, os mecanismos mitocondriais por detrás do fenótipo protector e do efeito terapêutico do exercício físico ainda não estão completamente compreendidos (Romijn & Pijl 2009). Por outro lado, existem sugestões de que o treino de *endurance* pode causar stress mitocondrial hepático e diminuição da capacidade de oxidar substratos (Terblanche et al 2001; Sun et al 2010).

Do nosso conhecimento, não existem dados sobre os efeitos da hipoxia crónica intermitente na função mitocondrial do fígado.

Assim sendo, este estudo teve como objectivo analisar os efeitos isolados e combinados de treino de resistência e da hipoxia crónica intermitente, duas estratégias utilizadas na prevenção e no tratamento de diversas patologias, incluindo doenças metabólicas e cardiovasculares, na função mitocondrial do fígado, na presença e na ausência de salicilato, um metabólito anti-inflamatório que causa lesão hepática mitocondrial.



## **2 – Revisão da Literatura**

### **2.1 – A Mitocôndria**

#### **2.1.1 – Estrutura mitocondrial**

As mitocôndrias são organelos que se encontram no citoplasma da célula, constituindo uma vasta rede reticular tridimensional (Bernard e Rossignol, 2008). A célula eucariótica contém cerca de 2000 mitocôndrias, ocupando em alguns tecidos, cerca de metade do seu volume total (Edgar & Trifunovic, 2007).

As mitocôndrias possuem duas membranas fosfolipídicas que separam a matriz mitocondrial do citoplasma. A membrana interna e externa delimitam o espaço intermembranar mitocondrial e possuem características morfológicas e funcionais muito diferentes (Cadenas, 2004). A membrana externa mitocondrial é altamente permeável por conter canais transmembranares, formados pelas proteínas porinas, permitindo a passagem de iões e metabolitos com pesos moleculares inferiores a 1000Da (Cooper & Hausman 2007). A membrana interna mitocondrial forma invaginações ou cristas que ampliam a sua área de superfície, sendo mais selectiva quanto à sua permeabilidade, devido ao alto teor de cardiolipina (Turcotte, 2003). Assim a entrada e saída de moléculas está dependente de sistemas de transportes específicos. Além disso, esta membrana é descrita como uma barreira funcional na passagem de moléculas pequenas, entre o citosol e a matriz, que lhe permite manter o gradiente electroquímico essencial à funcionalidade mitocondrial (Cooper & Hausman 2007).

Na bicamada lipidica da membrana interna insere-se a cadeia transportadora de electrões (CTE), composta por cinco complexos proteico/enzimáticos (I-IV e ATP sintetase) e dois transportadores de electroes móveis (coenzima Q e citocromo C) (Gilkerson et al., 2003); e diversas desidrogenases e proteínas responsaveis pelo transporte de substâncias para o interior da mitocôndria (Alberts et al., 2002).

As mitocôndrias são os únicos organelos celulares, para além do núcleo, que possuem o seu próprio DNA (mDNA), codificando cerca de 13 subunidades proteicas importantes para a produção de energia (Anderson et al., 1981; Turcotte, 2003). Este sistema genético encontra-se na matriz mitocondrial, juntamente com enzimas mitocondriais relacionadas com o ciclo de Krebs e responsáveis pelo metabolismo oxidativo (Cooper, 2000).

A estes organelos são atribuídas funções importantes para a vida celular, entre elas, regulação osmótica, modulação do estado *redox* celular, controlo de pH, transdução do sinal e homeostasia ao  $Ca^{2+}$ . Contudo, a sua principal função é a produção de energia essencial às necessidades biológicas da maior parte dos tecidos (Bernard & Rossignol, 2008).

### **2.1.2 – Produção de energia e função mitocondrial**

O sistema de fosforilação oxidativa é a via comum final para a produção de energia intracelular, seja derivada dos glúcidos, lípidos ou proteínas. Associado a este processo energético, as mitocôndrias, através do Ciclo de Krebs, geram equivalentes reduzidos, como a nicotinamida adenina dinucleótido reduzido (NADH) e o dinucleótido de flavina adenina reduzida ( $FADH_2$ ) (Andreyev et al., 2005; Benard & Rossignol, 2008). Estes equivalentes reduzidos são, posteriormente, reoxidados na cadeia respiratória mitocondrial num processo designado por fosforilação oxidativa. Os electrões libertados pela oxidação do NADH e  $FADH_2$  são transferidos ao longo da CTE (Fariss et al., 2005), culminando na redução tetravalente do  $O_2$ , na matriz, pelo complexo IV. Este fluxo de electrões é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranar (complexos I, III e IV), produzindo um gradiente electroquímico (Nelson et al., 2008) utilizado, pela ATP-sintetase, para converter a adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP) (Stock et al. 1999).

O ATP é translocado para o espaço intermembranar através do ANT, que permite a reentrada de ADP necessário para a ressíntese de ATP (Stepien et al., 1992). A migração do ATP para o espaço intermembranar para o citosol é

feita através dos canais proteicos da membrana externa, nomeadamente o canal iónico dependente de voltagem (VDAC - *voltage dependent anion channel*) (Duchen, 2004).

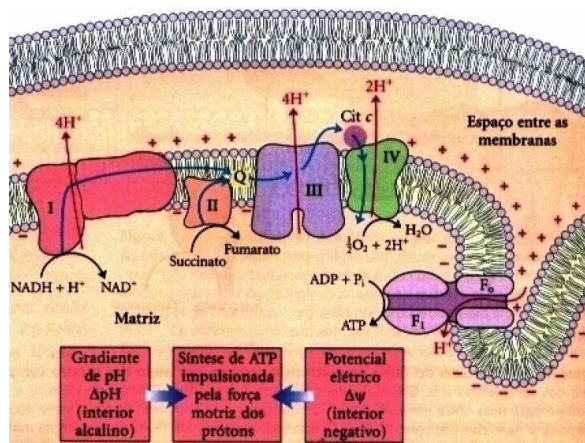
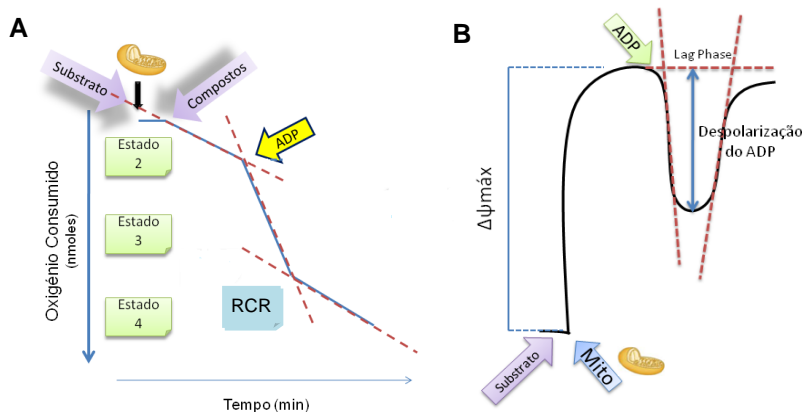


Fig. 1 Fosforilação Oxidativa (Cooper & Hausman, 2007)

Existem vários métodos capazes de avaliar a função mitocondrial. Uma das técnicas clássicas usadas consiste em medir o consumo de  $O_2$  em mitocôndrias isoladas, usando um eléctrodo sensível à variação de  $O_2$  (fig.2A). Este método permite a medição da respiração mitocondrial basal (estado 1); da respiração após a adição de substratos específicos dos complexos da cadeia respiratória I-IV (estado 2); taxa respiratória após adição de ADP (estado 3- fosforilativo) 3); taxa respiratória após deplecção do ADP adicionado (estado 4) A razão estado 3/estado 4 é referida como a razão de controlo respiratório (RCR) (Estabrook, 1967), sendo um forte indicador da capacidade respiratória mitocondrial.

Outra técnica clássica da funcionalidade mitocondrial é o potencial transmembranar ( $\Delta\psi$ ) que reflecte as relações energéticas básicas na manutenção da homeostasia celular (Cooper & Hausman, 2007). O  $\Delta\psi$  decorre do bombeamento de prótons através da membrana interna e é indispensável para a fosforilação oxidativa do ADP (Stock et al., 1999). Durante o estado respiratório 3, a fosforilação do ADP em ATP é acompanhada pela entrada de  $H^+$  na mitocôndria e como tal, o  $\Delta\psi$  baixa. No estado respiratório 4, após a fosforilação de ADP, o  $\Delta\psi$  aumenta. Também tem sido utilizada a *lag phase*

como um indicador da capacidade funcional, em que é medido o tempo que as mitocôndrias demoram a readquirir o potencial após a adição do ADP.



**Fig. 2** Ensaio típicos de A) variações do consumo de  $O_2$  e B) potencial transmembranar durante um ciclo fosforilativo induzido por ADP

### 2.1.3 – Produção de Espécies Reactivas de Oxigénio

As ERO são compostos químicos derivados do  $O_2$  com actividade *redox* e englobam, além dos radicais de  $O_2$ , espécies químicas não radiculares com potencial oxidante (Cooper et al., 2002; Urso & Clarkson, 2003; Ascensão et al., 2005). As ERO são geradas continuamente durante os processos metabólicos, tendo como principal fonte os organelos citoplasmáticos que metabolizam o oxigénio e o azoto (Cooper et al., 2002)

As potenciais fontes exógenas de produção de ERO incluem, entre outros, alguns agentes ambientais e/ou agentes xenobióticos, como o ácido salicílico (Labbe et al., 2008) Por outro lado, têm sido descritas como potenciais fontes endógenas, as mitocôndrias (Starkov, 2008); o reticulo endoplasmático (Gross et al. 2006); os peroxissomas (principalmente através da  $\beta$ -oxidação (Boveris et al. 1972)); o citosol (principalmente através da NO sintetase (Roy et al 1994)); a membrana plasmática (principalmente através da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase (O'Donnell & Azzi 1996) e no espaço extra-celular (principalmente através dos mecanismos associados às enzimas xantina oxidase (McNally et al. 2003).

Recentemente, Brown et al (2011) questionaram a contribuição relativa de cada uma destas vias para a produção de ERO, contudo a maioria dos autores

considera as mitocôndrias como um alvo terapêutico importante (no envelhecimento e em patologias como a diabetes, a neurodegeneração, o cancro e as doenças cardiovasculares) devido a ser consideradas como uma das principais fontes de ERO intracelulares.

Em condições fisiológicas, as mitocôndrias são responsáveis por cerca de 90% do consumo celular de  $O_2$ , estimando-se que entre 0,1 a 5% seja incompletamente oxidado e convertido em ERO (Kang & Hamasaki, 2005). Efectivamente, a produção de ERO está acoplada com algumas reacções decorrentes da fosforilação oxidativa (Ji, 1999, Di Meo et al., 2001; Vanden Hoek et al., 1998; Pollack et al., 2000), particularmente nos complexos I e III (Di Meo et al., 2001).

O radical livre de oxigénio a formar-se primeiro na mitocôndria é o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que se transforma em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) espontaneamente ou por acção da superóxido-dismutase (SOD). O  $H_2O_2$ , na presença de iões metálicos como o ferro, pode transformar-se em radicais hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) pela reacção de *Fenton* (Halliwell, 2000; Monteiro et al., 2003; Ascensão et al., 2005).

As células possuem um conjunto de enzimas antioxidantes endógenas, das quais a SOD, a catalase (CAT), a glutathione reductase (GSH) e glutathione peroxidase (GPx) são as mais referidas, neutralizando os alguns efeitos nefastos induzidos pelas ERO (Ascensão et al. 2003; Pessayre et al. 2008; Powers & Jackson, 2008). Apesar dos mecanismos antioxidantes, num intervalo fisiológico, serem responsáveis pela manutenção da concentração intracelular de ERO, um distúrbio no equilíbrio oxidante/antioxidante pode resultar num fenómeno de stress oxidativo adicional com consequências lesivas para o tecido (Adam-Vizi & Chinopoulos 2006).

De facto, o dano oxidativo induzido pelas ERO é provavelmente uma das principais fontes de instabilidade do genoma mitocondrial, levando à disfunção respiratória e inviabilidade celular (Orrenius et al., 2007). Para além dos danos ocorridos no mDNA, as proteínas mitocondriais podem também ser consideradas alvos importantes da produção exarcebada de ERO levando ao

comprometimento do ciclo de Krebs, tendo um impacto negativo sobre a produção de energia e viabilidade celular (Orrenius et al., 2007).

As membranas fosfolipídicas das mitocôndrias são também extremamente sensíveis à oxidação (Esterbauer et al. 1991), verificando-se o fenómeno de peroxidação lipídica quando produção ERO é exacerbada. Como consequência as funções vitais das mitocôndrias sofrem alterações, tais como a fosforilação oxidativa, as propriedades de impermeabilidade da membrana interna, a manutenção do potencial de membrana mitocondrial e a capacidade de tamponamento mitocondrial ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Albano et al., 1991).

Em casos extremos, a produção elevada de ERO pode levar a um ciclo vicioso de lesões oxidativas, causando progressivas alterações no mDNA e na função mitocondrial podendo contribuir para um declínio na produção energética, desequilíbrios redox e consequente, disfunção celular (Bernard & Resignol, 2008).

Em contraste com a ideia de que as ERO apenas contribuem para lesar as estruturas biológicas, parece haver evidências que ao nível fisiológico, uma baixa mas relevante concentração destas espécies pode regular uma variedade de mecanismos moleculares (Cadenas, 2004, Brookes 2004). De facto, as ERO parecem desempenhar funções importantes na sinalização celular, afectando não só o sistema antioxidante mas também processos metabólicos relacionados com o transporte de glucose, actividade da ATP sintase, libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  e biogénese mitocondrial (Sakamoto & Goodyear, 2002).

#### **2.1.4 – Apoptose**

A disfunção mitocondrial pode ser considerada um dos mecanismos associados à remodelação celular por estimulação de um processo ou morte celular como a necrose a autofagia ou a apoptose. A apoptose, ou morte celular programada, foco de estudo do nosso trabalho, envolve uma série de processos bem coordenados, que desencadeiam a activação de proteases e

enzimas hidrolíticas, induzindo a proteólise, a fragmentação do DNA e a condensação da cromatina (Orrenius et al., 2007)

Este processo pode ser desencadeado ou activado por via extrínseca mitocondrial ou via intrínseca mitocondrial, dependendo do estímulo a que a célula é sujeita. Na via extrínseca mitocondrial ocorre pela interação entre o receptor e o seu ligante, como por exemplo o Fas ligante, o factor de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). Accionando a sinalização intracelular levando à activação da caspase-8 e, conseqüentemente, às caspases efectoras 3 (Oberholzer et al., 2001).

Na via intrínseca mitocondrial, regulada pelos membros da família da Bcl-2, ocorre quando há lesão ao DNA por radiação, toxinas ou radicais livres, sendo nestas condições, os membros da família Bcl-2 anti-apoptóticos (por exemplo, Bcl-2 e Bcl-XL), que se encontram na membrana externa da mitocôndria, podem ser desestabilizados pela indução dos factores pró-apoptóticos da família Bcl-2 (por exemplo, Bax, Bad e Bak) (Campo, 2009). Nesta situação, observa-se um desequilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e as anti-apoptóticas, promovendo a formação dos oligómeros Bax, Bak na membrana externa mitocondrial. Estes oligómeros comprometem a permeabilidade desta membrana, através da formação de canais proteicos na membrana externa (Pavlov et al. 2001). Como consequência, factores pró-apoptóticos do espaço intermembranar mitocondrial são libertados para o citoplasma, nomeadamente o citocromo c, Smac / DIABLO, HtrA2 (Omi), AIF-1, e DNaseG (Kroemer et al. 2007). Na presença de ATP, o citocromo c liga-se a Apaf-1 e desencadeia sua oligomerização, com o recrutamento da pro-caspase-9 que sofre auto-activação. O complexo de proteínas que inclui citocromo c, Apaf-1 e caspase-9 é designado de "apoptossoma" (Tsujimoto & Shimizu, 2007). Este complexo, que medeia a auto-activação da caspase 9, activa as caspases 3, 6 e 7 (Fuentes-Prior & Salvesen 2004).

Contudo, os membros da família Bcl-2 não são os únicos agentes capazes de promover a permeabilidade da membrana mitocondrial, e assim a libertação de factores pró-apoptóticos do espaço intermembranar das mitocôndrias. Outros agentes, como as ceramidas, as ERO e o  $Ca^{2+}$ , também

podem influenciar a permeabilidade da membrana interna mitocondrial (Kroemer et al. 2007).

O principal papel do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial é a estimulação da fosforilação oxidativa (Das e Harris, 1990; Hansford e Zorov, 1998; Balaban, 2002) através da activação das enzimas que actuam no ciclo de Krebs (McCormack e Denton, 1993), bem como da estimulação do complexo ATP-sintetase (Das e Harris, 1990). Assim sendo, o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]$  mitocondrial resulta num aumento da velocidade da actividade da CTE, e consequentemente numa maior produção de ATP (Brookes et al., 2004).

Porém, tal como afirmam Gunter et al. (1998) e Brookes et al. (2004), se em condições fisiológicas, o  $\text{Ca}^{2+}$  é benéfico para a função mitocondrial, já na presença de um estímulo patológico, o  $\text{Ca}^{2+}$  é prejudicial, provocando disfunção mitocondrial, através da produção de ERO. Por sua vez, as ERO podem modificar os mecanismos de captação e libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Pariente et al., 2001; Gonzalez et al., 2005), gerando deste modo um ciclo “vicioso” entre a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  e a produção de ERO (Brookes et al., 2004).

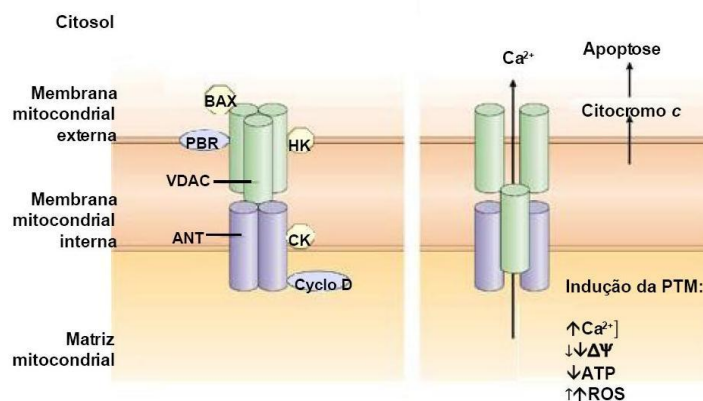
De facto, a estimulação do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa pelo  $\text{Ca}^{2+}$  aumentam a produção de ERO. Pois, como nos é sugerido por Perez-Campo et al. (1998), um metabolismo mais rápido resulta num maior fluxo de electrões da cadeia respiratória e consequentemente num aumento do consumo de  $\text{O}_2$ . O  $\text{Ca}^{2+}$  é ainda um estimulador do óxido nítrico sintase (NOS) (Alderton et al., 2001) gerando óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ), que inibe o complexo IV (Cleeter et al., 1994), aumentando, desta forma, a produção de ERO no complexo III.

Nestas circunstâncias, a capacidade de tamponamento do  $\text{Ca}^{2+}$  é limitada, verificando-se uma perda de homeostasia ao  $\text{Ca}^{2+}$ , ocorrendo mudanças drásticas na morfologia mitocondrial e sua actividade funcional, devido à abertura de um poro inespecífico na membrana interna, vulgarmente conhecido como o PPTM (Hunter & Haworth, 1979), que levará à morte celular programada.

### 2.1.5 – Poro de Permeabilidade Mitocondrial e sua regulação

O modelo desenvolvido para explicar o aumento da permeabilidade da membrana das mitocôndrias tem como base, pelo menos em parte, a teoria da abertura do PPTM (Kroemer e tal., 1995).

Apesar dos estudos extensivos, a identidade molecular exacta do PPTM permanece incerta (Tsujimoto & Shimizu, 2007). Três moléculas têm sido aceites como componentes estruturais e essenciais do PPTM: o ANT no interior da membrana, a ciclofilina D (Cyp-D) na matriz, e o VDAC na membrana externa (Halestrap et al 1998; Crompton, 1999; Zoratti et al, 2005). Contudo, recentemente algumas proteínas como a creatina quinase (CK), a hexoquinase (HK), o receptor periférico de benzodiazepinas (PBR), e os membros da família Bcl-2, também têm sido enunciadas como importantes na regulação e na formação do PPTM (Zamzami & Kroemer, 2001; Enriquez & Lemasters, 2004; Kroemer et al., 2007; Weiss et al., 2008), no entanto o seu papel é ainda controverso (Halestrap, 2009).



**Fig. 3** Formação e indução do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM). Condições patofisiológicas como concentrações elevadas de  $Ca^{2+}$ , stresse oxidativo, depleção de ATP, despolarização mitocondrial e aumento dos níveis da proteína BAX na membrana mitocondrial (factor pró-apoptótico), são indutores da permeabilidade transitória mitocondrial. A indução da PTM resulta em entumescimento mitocondrial, com consequente libertação de cálcio e de proteínas apoptogénicas, como citocromo c e procaspases (Abou-Sleiman et al., 2006).

Durante a abertura do PPTM são libertados componentes que incluem enzimas catabólicas e uma infinidade de iões e moléculas com actividade pró-apoptótica, como o citocromo c, Smac/DIABLO, AIF-1, entre outras (Verhagen et. al., 2000; wang, 2001; Kroemer et al. 2007) Para além disto, a abertura do

PPTM conduz ao colapso da força protomotriz, à disrupção da homeostasia iónica, ao *swelling* mitocondrial, hidrólise massiva de ATP através da  $F_0F_1$  ATPase e, em última instancia morte celular (Imberti et al., 1993; Ankarcrona et al. 1995).

De entre os factores que regulam a formação e abertura do PPTM podemos destacar as elevadas  $[Ca^{2+}]$  citosólico, aumento das ERO, diminuição do  $\Delta\psi$ , aumento da concentração de fosfato inorganico (Pi), redução do conteúdo dos nucleotidos de adenina (ATP e ADP), ácidos gordos, ceramida, proteínas pró-apoptóticas como a Bax, Bid, Bad, Bak (Tornero et al., 2002; Tsujimoto & Shimizu, 2007; Salido 2009). Por outro lado, o PPTM é inibido pelo pH ácido, antioxidantes como a GSH, SOD e CAT, proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 e Bcl-x<sub>L</sub> pelo aumento do  $\Delta\psi$  e, ainda, por diversos fármacos como a Ciclosporina A (CsA) (Tornero et al., 2002; Salido 2009). A CsA, pela sua ligação à Cyp-D, impede a interacção desta ciclofilina ao ANT, e com isso impede a formação e abertura do PPTM (Broekemeier et al., 1989). Contudo, não está absolutamente esclarecido o process pelo qual a CsA inibe esta interacção (Crompton et al., 1998; Woodfiel et al., 1998).

Na actualidade, sabe-se que alterações na estrutura e função mitocondrial têm implicações determinantes na fisiologia celular, representando um “gatilho” para a adaptação celular em situações/estímulos que podem ser deletérios para os diferentes tecidos. Nestes incluem-se quer tecidos contrácteis, como o músculo esquelético e o músculo cardíaco, mas também tecidos com uma taxa metabólica considerável, como o fígado, o rim ou o cérebro. Por outro lado, algumas doenças metabólicas como a obesidade traduzem-se em disfunções hepáticas com consequências para a função mitocondrial.

## **2.2 – Disfunções hepáticas mitocondriais**

### **2.2.1 – Esteatohepatite não alcoólica (NASH)**

A obesidade é hoje uma epidemia mundial, atingindo cerca de 500 milhões de adultos, segundo a Organização Mundial de Saúde. O incremento desta doença deve-se, pelo menos em parte, ao estilo de vida sedentário conjugado com uma dieta hipercalórica. Tem sido sugerido que este estilo de vida poderá estar na origem de diversas doenças, tais como diabetes tipo II, hiperlipidemia, doenças cardiovasculares, alguns câncros e doenças hepáticas (Kopelman, 2000).

De facto, esta condição patológica tem repercussões negativas em alguns órgãos, nomeadamente o fígado, afectando a sua morfologia e função (Angulo, 2002). Estima-se que até 70% das pessoas obesas e diabéticas podem desenvolver doenças de “fígado gordo” de origem não alcoólica (NAFLD) (Angulo, 2002; Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003; Browning & Horton, 2004). A NAFLD refere-se a uma série de doenças associadas que inclui a esteatose “simples”, que a longo prazo, pode evoluir para uma esteatohepatite não-alcoólica (NASH) em 10-20% dos pacientes (Angulo, 2002; Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003). A prevalência da NASH em indivíduos obesos pode atingir 20% desta população, podendo mesmo alcançar os 50% em pacientes com obesidade mórbida (Silverman et al., 1990). A NASH é a forma mais preocupante de NAFLD, pois pode evoluir para fibrose hepática, cirrose, ou até mesmo carcinoma hepatocelular (Day, 2002; Day et al., 2002).

Apesar do mecanismo molecular ainda não estar completamente compreendido, diversos estudos têm vindo a demonstrar uma associação clara entre a obesidade, a resistência à insulina, a inflamação sistémica, e o stress oxidativo no desenvolvimento da NASH, envolvendo as mitocôndrias no processo (Day & James, 1998; Vigano et al., 2000; Sanyal et al, 2001; Hebbard & George, 2010). Day & James (1998) desenvolveram o modelo de “duas etapas”, para o desenvolvimento da NASH, onde reforçam a ideia de que a existência de lesão oxidativa é decisiva para a evolução da doença.

### 2.2.2 – Papel das mitocôndrias hepáticas e do stress oxidativo na NASH

Embora o “modelo de duas etapas” seja útil para a compreensão da origem e evolução da NAFLD, os dados de modelos animais têm demonstrado que as etapas secundárias, como o stress oxidativo por si só podem induzir a acumulação de gordura no fígado (Hebbard & George, 2010). No estado basal estamos constantemente a produzir ERO, sendo esta formação reforçada em fígados com esteatose, principalmente, devido ao aumento do fluxo da  $\beta$ -oxidação (Begrache et al., 2005). Deste modo, seja qual for a causa da esteatose hepática, a situação clínica agrava-se, indefinidamente, porque o processo da doença, directamente, causa em si aumentos na formação de ERO (Pessayre et al., 2001).

Vários ciclos viciosos podem causar disfunção mitocondrial hepática na NASH (fig 4). Por um lado, o aumento da  $\beta$ -oxidação aumenta a formação de NADH e FADH<sub>2</sub> e consequente cedência de electrões para CTE (fig 4). O desequilíbrio entre o maior fluxo de electrões para o CTE e o parcial bloqueio da sua cedência ao O<sub>2</sub> (devido ao aumento da peroxidação lipídica e diminuição dos polipeptídeos da CTE), provoca fuga de electrões na CTE, que ao reagirem com o O<sub>2</sub> formam ERO e ERN, nomeadamente, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO<sup>-</sup> e Peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>).

Por outro lado, as ERO despontarão a produção de TNF- $\alpha$  (fig.4). Este, por sua vez, age no seu receptor para desencadear a activação da caspase-8, a translocação da Bax para a mitocôndria e sua associação com a Bak, permeabilizando a membrana externa mitocondrial e consequente libertação do citocromo c, prejudicando, assim, parcialmente o fluxo de electrões na CTE e, com isso, formação de ERO e ERN (Pessayre, 2007).

Por último, a peroxidação lipídica, resultante da formação de ERO e ERN, causa libertação de aldeídos reactivos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Pessayre et al, 1999; 2001; Begrache et al., 2006). Paralelamente, as ERO também aumentam a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a interleucina-8 (IL-8), TNF- $\alpha$  e Fas ligante (FasL) (Begrache et al., 2006). Os

produtos da peroxidação lipídica e as citocinas estão envolvidos no desenvolvimento de lesões no fígado através de diferentes mecanismos, que poderão levar à inflamação do fígado, à morte celular e à fibrose (Begrache et al., 2006).

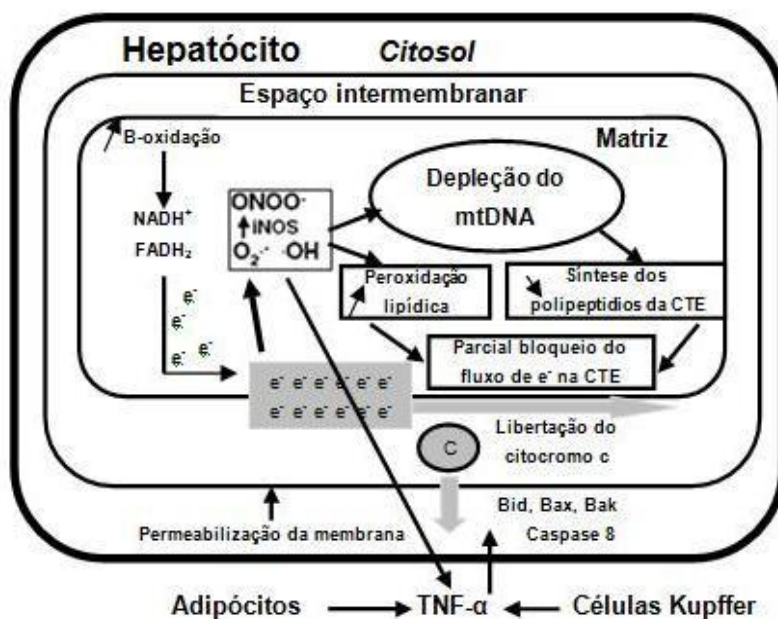


Fig. 4 Ciclos de disfunção mitocondrial hepática em NASH (Pessayre, 2007).

### 2.2.3 – Lesões hepáticas mitocondriais, induzidas pela administração de fármacos

Além dos sinais característicos de NASH associada à obesidade e à resistência à insulina, a administração/consumo de algumas drogas ou fármacos tem surgido como um factor de risco secundário capaz de explicar o aparecimento desta patologia (Pessayre et al., 2002). Diversos fármacos induzem esteatose macrovesicular (caracterizada pela presença de um único vácuo lipídico, dentro do citoplasma dos hepatócitos), e em casos mais severos, esteatose microvesicular (Labbe et al., 2008). A aspirina (anti-inflamatório não-esteróide (AINE)) é um exemplo de fármaco que induz a esteatose microvesicular (caracterizada pela presença de muitas gotículas lipídicas pequenas no citoplasma dos hepatócitos) (Labbe et al., 2008).

As doenças hepáticas induzidas por fármacos resultam de diferentes mecanismos de disfunção mitocondrial, incluindo a permeabilização da membrana mitocondrial, a depleção do mDNA (Fromenty & Pessayre, 1995; Labbe et al., 2008; Pessayre et al., 2010) levando à redução de síntese de polipeptídeos da CTE, prejudicando a sua actividade e conduzindo, conseqüentemente, à geração de ERO (Labbe et al., 2008).

Segundo Pessayre et al. (2008), diversas drogas hepatotóxicas são transformadas pelo citocromo P450 em metabolitos quimicamente reactivos, causando, por um lado, danos no mDNA, que pela mutação da p53 poderá induzir à activação de proteínas pró-apoptóticas. Por outro lado, os metabolitos reactivos causam depleção da GSH e das ligações covalentes aos grupos tióis de proteína, inactivando os transportadores  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática, com conseqüente aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  celular e posterior abertura do PPTM (Pessayre et al., 2008).

Contudo, os mecanismos precisos pelo qual os fármacos podem induzir a abertura do PPTM ainda não são totalmente conhecidos, embora Begriche et al. (2011) sugerem pelo menos três hipóteses: em primeiro lugar, os fármacos podem interagir com alguns componentes do PPTM, como por exemplo, a PBR, na membrana externa, e com isso desencadear permeabilização da membrana mitocondrial e morte celular; Em segundo lugar, o fármaco que induziu stress oxidativo pode favorecer a oxidação dos grupos tióis localizados dentro de alguns componentes do PPTM; Em terceiro lugar, alguns fármacos podem, ainda, induzir permeabilidade transitória mitocondrial através da activação da JNK (c-Jun N-terminal quinase).

#### **2.2.3.1 – Salicilato: indutor de disfunções em mitocôndrias hepáticas**

Um dos fármacos mais utilizados devido às suas propriedades analgésicas, anti-térmicas, anti-inflamatórios e anti-trombóticas (Awtry & Loscalzo, 2000; Wu, 2000) é a Aspirina (ácido acetilsalicilato), no qual o salicilato é o metabolito reactivo. Os salicilatos têm mostrado serem eficazes na

prevenção primária e secundária de eventos cardiovasculares, bem como no tratamento agudo do enfarto do miocárdio (Nulton-Persson et al., 2004).

Após ingerida, a aspirina é rapidamente hidrolisada em ácido salicílico, que é activado pela ligação salicilil-CoA na membrana externa mitocondrial (Pessayre et al., 2008). A formação excessiva desta molécula resultará numa concentração insuficiente de CoA para activar os ácidos gordos de cadeia longa, o que impedirá a sua entrada na mitocôndria e respectiva  $\beta$ -oxidação (Pessayre et al., 2008) com conseqüente aumento citoplasmático dos níveis de ácidos gordos. Contudo, os salicilatos além de poderem originar esteatose microvesicular, como referido anteriormente, poderão estar na origem do desenvolvimento de lesões mitocôndrias hepáticas.

Trost & Lemasters (1997) demonstraram que em hepatócitos intactos, altas concentrações de salicilato ( $> 3\text{mM}$ ) promoveram o início do PPTM e posterior morte celular, principalmente quando estavam carregados com  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto, em doses baixas ( $<1\text{mM}$ ), o salicilato pode não causar morte celular, embora tenha reduzido o limite para o início da permeabilidade transitória mitocondrial. Battaglia et al. (2005) afirmaram que o salicilato interage com a CTE das mitocôndrias hepáticas originando  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, muito provavelmente, outras ERO, que por sua vez oxidam grupos tiois e a GSH. Este stress oxidativo leva à indução da permeabilidade transitória mitocondrial, porém apenas na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (Battaglia et al., 2005).

Os mecanismos pelos quais os salicilatos induzem a abertura do PPTM ainda não foi elucidado, embora alguns modelos têm sido propostos: 1) Os salicilatos podem-se ligar directamente à estrutura do poro, levando à sua abertura (Trost & Lemasters, 1997); 2) os salicilatos poderão alojar-se na membrana mitocondrial, alterando o  $\Delta\psi$  e diminuindo a propagação do potencial do poro (Broekemeier & Pfeiffer, 1995); 3) em células tumorais, o PPTM é induzido devido ao stress oxidativo gerado da produção de ERO, através da via Rac1-oxidase NADPH-dependente (Chung et al., 2003).

Parece que a aspirina afecta a homeostasia mitocondrial ao  $\text{Ca}^{2+}$ , dependendo da concentração utilizada. Nos estudos de Togo et al. (2009), em baixas concentrações ( $\leq 0,3\text{ mM}$ ) de aspirina, aumentou o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ,

enquanto que em concentrações elevadas (> 1 mM), a aspirina suprimiu influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Os salicilatos são ainda vistos como desacopladores da membrana mitocondrial hepática. Petrescu & Tarba (1997) verificaram que 5mM de acetil-salicilato produz colapso no potencial de membrana. No entanto, para concentrações de 3mM, não foi suficiente para o colapso do potencial de membrana ser irreversível, tendo-se verificado uma ligeira tendência de recuperação.

Nos estudos de Doi & Horie (2010), o declínio nos teores de ATP, demonstrou-se dependente das concentrações do ácido salicílico (1mM e 3mM apresentaram  $p < 0,05$ ; 2mM, 4mM e 5mM apresentam  $p < 0,01$ ), a taxa de consumo de  $\text{O}_2$  do estado 3 diminuiu acentuadamente com o aumento da concentração de ácido salicílico, enquanto que o estado 4 aumentou, revelando mais uma vez, desacoplamento da membrana mitocondrial. Enquanto que a diminuição do estado 3 é normalmente interpretado como um sinal de disfunção da CTE através de danos intrínseca nas óxido redutases e/ou uma limitação na disponibilização de equivalentes reduzidos com consequente declínio no fornecimento de electrões para a CTE (Nulton-Persson & Szweda, 2001), ou a danos específicos no sistema fosforilativo mitocondrial como aumento da actividade das enzimas do ciclo de Krebs (Holloszy et al., 1970). O RCR também diminuiu com o aumento da concentração do ácido salicílico (Doi & Horie, 2010).

Como podemos constatar, os salicilatos possuem uma acção tóxica sobre as mitocôndrias hepáticas, com consequências danosas para a função dos hepatócitos, causando o desacoplamento da fosforilação oxidativa e swelling (Martens & Lee, 1984; Segalman & Lee, 1995); a abertura do PPTM, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (Biban e tal., 1995; Trost & Lemasters, 1997; Battaglia et al., 2005); afectação da homeostasia mitocondrial ao  $\text{Ca}^{2+}$  e consequente disfunção da respiração mitocondrial e síntese de ATP, também pela inibição da enzima  $\alpha$ -cetoglutamato desidrogenase (Nulton-Presson et al., 2004).

Diversas abordagens terapêuticas e preventivas têm sido propostas para atenuar e/ou antagonizar estes efeitos. Contudo, o estudo da interacção da

toxicidade hepática com o exercício físico poderá ser de potencial interesse, atendendo ao papel protector do exercício físico contra inúmeras condições fisiopatológicas.

### **2.3 – Cardioprotecção**

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade nos países industrializados, constituindo-se um problema mundial de saúde pública. O enfarte agudo do miocárdio é um processo de necrose por falta de aporte adequado de nutrientes e oxigénio, causado pela redução do fluxo sanguíneo coronariano de magnitude e duração suficiente para não ser compensado pelas reservas orgânicas (Barash & Akhtar, 2010). A causa habitual da morte celular é uma isquemia (deficiência de aporte sanguíneo) no músculo cardíaco, por oclusão de uma artéria coronária (Guan et al., 2010).

Diversos factores inter-relacionados contribuem para a lesão de Isquemia-Reperfusão (I/R), incluindo a diminuição dos níveis celulares de ATP, produção de ERO/ERN, acumulação excessiva de  $Ca^{2+}$ , activação das calpaínas e activação de leucócitos (Gottlieb, 2003; Solaini & Harris, 2005; Zweier & Talukder, 2006; French et al., 2006; Powers et al., 2008) promovendo assim, danos celulares.

Durante o fenómeno de I/R, a produção excessiva de ERO e a entrada excessiva de  $Ca^{2+}$  nas mitocôndrias têm sido descritas como os principais factores desencadeadores da lesão oxidativa (Downey et al., 1990; Hamilton et al., 2003; Quindry et al., 2005; French et al., 2006). Na isquemia, a acidose intracelular, juntamente com os altos níveis de  $Mg^{2+}$  e ADP promovem as condições para a diminuição do  $\Delta\psi$  e o aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  e Pi. Por outro lado, durante a reperfusão, a recuperação do pH, juntamente com uma explosiva formação de ERO, na presença de elevadas  $[Ca^{2+}]$  e Pi na matriz, criam o cenário perfeito para a abertura do PPTM, apesar da recuperação do  $\Delta\psi$  (Di Lisa et al., 2007).

Actualmente, um dos métodos capazes de induzir cardioproteção de forma sustentável contra as lesões no miocárdio é o treino de *endurance*. Há evidências de que, além de reduzir o risco de desenvolver doença cardiovascular, a prática de exercício físico aeróbio (estudos realizados em corrida e natação) também fornece protecção contra os danos induzidos pela Isquemia-Reperusão (I/R) (Yamashita et al., 1999; Brown et al., 2005). Adicionalmente, um outro modelo de cardioprotecção com resultados promissores é o da hipoxia hipobárica intermitente (HHI).

### **2.3.1 – Treino de *endurance* e cardioprotecção**

Vários estudos têm sugerido que o treino de *endurance* induz melhorias na tolerância do miocárdio às lesões de I/R, em animais jovens e idosos (Powers et al., 1998; Taylor et al., 1999; Yamashita et al., 1999; Zhang et al., 2000; Demirel et al., 2001; Hamilton et al., 2001; Powers et al., 2002; Hamilton et al., 2003; Starnes et al., 2003; Lennon et al., 2004; Powers et al., 2004; Brown et al., 2005; Quindry et al., 2005; French et al., 2006). De facto, esta cardioprotecção tem sido observada quer na isquemia de duração moderada (5-20 min) quer de longa duração (40-60 min), resultando em enfarto do miocárdio (Bowles et al., 1992; Ji et al., 1994; Powers et al., 1998; Taylor et al., 1999; Hamilton et al., 2001; Powers et al., 2002).

Adicionalmente, existem um conjunto de evidências que mostraram que o treino de *endurance* de curta duração (3-5 dias consecutivos) e longa duração (10 semanas) induzem efeitos cardioprotectores após um insulto de IR *in vivo* (Powers et al., 1998; Demirel et al., 2001; Hamilton et al., 2001; Lennon et al., 2004; Brown et al., 2005; Quindry et al., 2005; Ascensão et al., 2007; Powers et al., 2008); sendo observadas diminuições dos marcadores de lesão oxidativa (Powers et al., 1998; Powers et al., 2002). No exercício, factores como a duração e a intensidade são proponderantes na obtenção de um fenótipo cardioprotector (Lennon et al., 2004a; Starnes et al., 2005)

Têm sido reunidos esforços na tentativa de entender os mecanismos responsáveis pela protecção do tecido cardíaco contra a IR induzida pelo

exercício, todavia, permanecem controversos. Neste seguimento, Kavazis et al. (2009) apontaram alguns mecanismos, entre eles: alterações anatômicas e fisiológicas nas artérias coronárias (circulação colateral); a indução de proteínas de choque térmico do miocárdio (HSPs); melhoramento funcional dos canais de potássio mitocondriais e sarcolemais dependentes de ATP (mitoKATP e/ou sarcoKATP); e aumento da capacidade antioxidante do miocárdio.

O mecanismo da circulação colateral parece estar associada ao treino de *endurance* de longa duração, contudo, a cardioproteção verificada no treino de *endurance* de curta duração não pode ser explicada por este processo (Yamashita et al., 1999; Perez et al., 2003).

Relativamente à indução das HSP, existem evidências de que estas proteínas não têm um papel crucial na proteção do tecido cardíaco, ao contrário do que vinha sendo proposto (Hamilton et al., 2001; Quindry et al., 2007), pois foi sugerida por alguns autores que a cardioproteção resultante do treino de *endurance*, pode ser conseguida sem aumento dos níveis cardíacos de HSP10, HSP27, HSP40, HSP60, HSP72, HSP73, HSP90. Lennon et al. (2004) relataram que os níveis de HSP72 mantiveram-se elevados entre o primeiro e o terceiro dia após a cessação do exercício, retomando a valores iniciais 9 dias após a cessação do exercício, contudo a cardioproteção persistiu.

Na literatura há evidências no sentido de que a activação dos canais de mitoKATP parecem induzir a alcalinização da matriz mitocondrial, diminuição da produção de ERO durante a reperfusão, bem como a acumulação de  $Ca^{2+}$  mitocondrial e melhoria na produção de energia mitocondrial após a isquemia (Powers et al., 1993; Gross & Peart, 2003). Em contraste, a utilização de um inibidor dos canais mitoKATP, Brown et al. (2005), sugerem que estes canais não são os principais mediadores na cardioproteção induzida pelo treino de *endurance* contra I/R. dada a sua importância na proteção celular associada ao contra os efeitos deletérios da I/R, este mecanismo merece maior atenção por parte dos investigadores.

O mecanismo de cardioprotecção que reúne maior consenso, actualmente, passa pelo sistema antioxidativo. Neste ponto, o exercício tem sido descrito como tendo uma influência positiva sobre esta defesa. Diversos estudos onde o treino de *endurance* foi aplicado demonstram: i) um aumento da actividade da GPX, GR (Lew & Quintanilha 1991; Somani et al 1995; Venditti & Di Meo 1996; Ramires & Ji 2001), CAT (Lew & Quintanilha 1991; Somani et al 1995; Kim et al, 1996), SOD (Ramires & Ji 2001) e redução dos marcadores de peroxidação lipídica (Somani et al 1995; Frankiewicz-Jozko et al., 1996; Venditti & Di Meo, 1996; Kim et al 1996; Husain, 2003); ii) a um aumento do nível de GSH citosólico (Somani et al., 1995) e da actividade da desidrogenase glicose-6-fosfato (G6PDH) (Lew Quintanilha & 1991), uma enzima essencial no ciclo das pentoses, uma das principais fontes celulares de NADPH.

Porém, há enorme variabilidade na literatura sobre quais os antioxidantes que efectivamente aumentam após exercício de *endurance* (Ascensão et al., 2007). Sendo que a maioria dos autores referem a SOD como a principal defesa antioxidante associada à redução do risco de lesão no tecido cardíaco. De facto, Yamashita et al. (1999) e Hamilton, et al. (2004) demonstraram que a inibição de MnSOD resultou numa perda de cardioprotecção induzida pelo exercício.

Corroborando esta linha de pensamento, Quindry et al. (2005), observaram incrementos da actividade da MnSOD, após treino de *endurance*, em animais, associado a uma redução da activação das calpaínas e da caspase-3, durante episódios de I/R. Estes resultados sugerem que o exercício protege contra a apoptose decorrente de episódios de I/R, pelo menos em parte, pelo retardamento da calpaína e activação da caspase-3.

Estudos com o treino de *endurance* parecem proteger contra a morte celular por apoptose e o envelhecimento do coração. Efectivamente, um estudo de Kavazis et al. (2008) mostrou que o treino de *endurance* provoca um fenótipo mitocondrial protector contra estímulos apoptóticos, pois as mitocôndrias intermiofibrilares e subsarcolemais apresentam uma menor taxa máxima de abertura do PPTM.

Em mitocôndrias cardíacas isoladas de animais treinados foi demonstrado que a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  necessário para induzir abertura do PPTM foi superior (47%), sugerindo que o treino de *endurance* estabelece-se como modulador do PPTM (Marcil et al., 2006). O possível papel protector do treino de *endurance* associado à reperfusão, pode ser explicado em parte por uma diminuição da produção de ERO, contribuindo para a diminuição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e, conseqüente, menor susceptibilidade da abertura do PPTM (Starnes et al., 2007).

Em suma, as adaptações mitocondriais decorrentes do treino de *endurance* podem contribuir para a cardioproteção, incluindo a diminuição da produção de ERO e/ou aumento da actividade das enzimas antioxidantes mitocondrias, bem como uma melhoria na capacidade em tolerar maiores  $[\text{Ca}^{2+}]$  (Starnes & Taylor, 2007).

### **2.3.2 – Hipóxia Hipobárica Intermitente e cardioprotecção**

O treino de *endurance* em altitude tem sido usado com frequência por atletas com o intuito de melhorar a sua *performance*. Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento notável no que se refere ao número de técnicas que visam "trazer a montanha até ao atleta", desde casas de nitrogénio, a tendas de hipoxia, a aparelhos respiratórios simuladores das condições ambientais em alta altitude (Levine, 2002). O Treino hipóxico intermitente inclui o uso descontínuo da normobarica ou da hipoxia hipobárica, numa tentativa de reproduzir algumas das características da adaptação à altitude, com o objectivo final de melhorar a nível do mar, o desempenho atlético (Levine, 2002). Este interesse actual pelo treino de hipoxia intermitente deriva, sobretudo, da elaboração do modelo "Living high training low" de Levine & Stray-Gundersen (1997). Esta estratégia combina adaptação à altitude, com treino em baixa altitude.

Adicionalmente à *performance* atlética, a área de estudo da saúde também tem sido favorecida com o modelo da hipóxia hipobárica intermitente (HHI), visto diversos estudos terem comprovado que esta aumenta a tolerância

cardíaca à I/R aguda, através da redução do enfarto do miocárdio, da preservação da contractilidade do miocárdio, da prevenção da apoptose em cardiomiócitos e do aumento da estabilidade eléctrica da membrana celular (Zhang et al., 2000; Dong et al., 2003; Zhang et al., 2004). A adaptação à HHI ajudou ainda a evitar deterioração do mDNA, preservando a ultraestrutura mitocondrial quando o coração foi submetido a lesões por I/R (Zhong et al., 2000a; Xie et al., 2004).

Alguns mecanismos têm sido sugeridos como contribuidores para a cardioproteção em ratos sujeitos a HHI, como a indução de HSP70 (Zhong et al., 2000; Ding et al., 2005); a activação mitoKATP; a inibição dos PPTM (Zhu et al., 2003; Zhu et al., 2006.), e a activação da proteína quinase C (PKC) (Ding et al., 2004).

A exposição à hipoxia crónica intermitente (Howald & Hoppeler, 2003) e contínua (Wen et al., 2002) induziram um aumento da resistência e da sobrevivência a lesões de I/R, devido a mecanismos de protecção relacionados com a superexpressão de HSP70. O papel da superexpressão de HSP70 contra a lesão de I/R tem sido descrita através de seus efeitos moduladores sobre o complexo mitocondrial da CTE cardíaca e actividade da SOD, bem como sobre a redução da apoptose (Sammur et al., 2001; Suzuki et al., 2002).

Zhu et al., (2006) verificou que a utilização de CsA em corações normóxicos para inibir a abertura do PPTM durante a reperfusão resulta em efeitos protectores semelhantes aos observados em animais adaptados à HHI. Deste modo, comprovou que a inibição da abertura do PPTM com CsA mimetizava os efeitos protectores da HHI, sugerindo que a inibição da abertura do PPTM na reperfusão contribui para a cardioproteção conferida pela HHI. Deste modo, a adaptação à HHI protege o miocárdio contra a lesão por I/R por supressão da abertura do PPTM durante a reperfusão (Zhu et al., 2006).

Para além disto, diversos autores (Zhu et al., 2003; Ding et al., 2004) demonstraram que a adaptação à HHI inibe a sobrecarga intracelular de  $Ca^{2+}$  durante a I/R. Num estudo mais recente, Zhu et al., (2006), demonstraram que, em cardiomiócitos adaptados à HHI ocorreu uma forte inibição não só da  $[Ca^{2+}]$  citosólico, como também da  $[Ca^{2+}]$  mitocondrial durante a reperfusão, em

comparação com os ratos normóxicos, em que a I/R estimulou um aumento das  $[Ca^{2+}]$  citosólico e mitocondrial. Estas observações são sugestivas de que a redução da abertura do PPTM na reperfusão pode reduzir a  $[Ca^{2+}]$  citosólico e mitocondrial, desempenhando assim um papel na protecção miocárdica em ratos adaptados à HHI. Adicionalmente, este estudo (Zhu et al., 2006) mostra que a adaptação à HHI impede, significativamente, o swelling mitocondrial cardíaco e consequente libertação do citocromo c induzido pelo aumento da  $[Ca^{2+}]$ . Deste modo, a adaptação à HHI aumenta a tolerância mitocondrial à sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , não ocorrendo indução da abertura do PPTM, que parece ser um evento crítico para a lesão irreversível do miocárdio após um insulto isquémico (Halestrap et al., 1998; Hausenloy et al., 2002).

Adicionalmente a adaptação à HHI tem uma acção na abertura dos canais mitoKATP (Asemu et al., 1999; Neckar et al., 2002; Zhu et al., 2003) melhorando a tolerância mitocondrial à sobrecarga de  $Ca^{2+}$  pela consequente dissipação do  $\Delta\psi$  e libertação do  $Ca^{2+}$  das mitocôndrias.

Em analogia com a protecção de curta duração induzida pelo pré-condicionamento, Kolar et al. (2007) e Hlaváckova et al. (2010) têm demonstrado que a PKC (Asemu et al., 1999; Arnaud et al., 2002), os canais mitoKATP (Becker, 2004; Bouwman e tal., 2004), e as ERO (Chang e tal., 1989) estão envolvidos no mecanismo cardioprotector conferido pela HHI Crónica, embora as interacções precisa entre esses componentes não são claras.

O envolvimento da PKC na cardioproteção resultante da hipoxia crónica é suportada pela observação de que a queleritrina, inibidor geral da PKC, aboliu completamente os efeitos da hipoxia crónica intermitente, no que se refere aos efeitos sobre o tamanho do enfarto (Rafiee et al., 2002; Neckar e tal., 2005; Ding e tal., 2004). Nos estudos de Kolar et al. (2007) a hipoxia crónica intermitente aumentou, significativamente, o teor de proteína PKC- $\delta$ , em relação ao homogeneizado de miocárdio. A activação da PKC- $\delta$  durante a reperfusão leva a uma estimulação da das vias pró-apoptóticas e exacerbação da lesão cardíaca (Inagaki et al., 2003; Murriel et al., 2004). Contudo, os efeitos

cardioprotectores da PKC- $\delta$  manifestam-se quando a enzima é activada antes do insulto de I/R (Hirotsu & Sadoshima, 2005; Inagaki & Mochly-Rosen, 2005).

Por outro lado, a activação da PKC medeia a formação de ERO, induzidas por pré-condicionamento agudo (Baines et al., 1997). No estudo de Kolar et al., (2007) a hipoxia crónica intermitente não alterou a concentração miocárdica de GSH, mas aumentou significativamente a proporção de GSSG e diminuiu a proporção GSH-GSSG. Zhu et al. (2004) observaram um aumento da MnSOD e CAT, em corações de ratos, expostos à hipoxia crónica intermitente, logo após o nascimento por 60 dias. Contudo, segundo Kolar et al., (2007), o aumento da tolerância isquémica, em corações adultos, cronicamente expostos à hipoxia parece improvável que seja mediada pelo aumento da capacidade de defesa antioxidante.

## **2.4 – Efeitos do treino de *endurance* na funcionalidade mitocondrial hepática.**

O fígado exerce um papel central no metabolismo, desempenhando inúmeras funções importantes, entre as quais o armazenamento de glicogénio, a gliconeogénese, a lipogénese, a decomposição de hemácias, a conversão de amónia em ureia, desintoxicação de drogas e toxinas, entre outros. (Huang et al., 2010). Uma vez que o fígado apresenta um papel central no metabolismo, está sujeito a um conjunto de produtos metabólicos prejudiciais formados em outros órgãos, como coração, músculos esqueléticos e rins através da circulação sanguínea (Taysi et al., 2008), podendo-se justificar deste modo o seu estudo em animais sujeitos a exercício físico.

O treino de *endurance* tem demonstrado aumentar a capacidade oxidativa e melhorar a sensibilidade à insulina no músculo-esquelético. Contudo, os efeitos do treino de *endurance* sobre as mitocôndrias do tecido hepático, além de serem escassos são muitas vezes contraditórios na literatura.

Sílvia et al. (2009) demonstram que o treino de *endurance* induz melhorias no metabolismo oxidativo, diminuindo as agressões quer nos lipídeos quer em proteínas e regulando a actividade antioxidante em mitocôndrias hepáticas. De acordo com os resultados deste estudo, ratos sujeitos a treino de *endurance* (45min, 5 dias/semana, durante 8 semanas) apresentaram uma diminuição no nível de lipoperoxidação e de carboxilação de proteínas e um aumento significativo da actividade da SOD, apesar da actividade da CAT ser reduzida. Na literatura, o aumento da actividade da CAT hepática foi relatada após 21 semanas de treino de natação (1h/dia, 5dias/semana) (Kanter et al., 1985) e 12 semanas de treino em tapete rolante (Kakarla et al., 2005). Estes resultados são apoiados pelas pesquisas de Radak et al. (2004), onde verificaram, igualmente, como consequência do treino de *endurance*, um aumento nos níveis de enzimas antioxidantes, neste caso, a GSH hepático. Radak et al. (2004) relataram que de o treino de *endurance*, em tapete rolante, com duração de 8 semanas, diminuiu a taxa de formação de ERO em mitocôndrias hepáticas. Havendo ainda evidencias que o treino de *endurance* diminui o conteúdo de TBARS em mitocôndrias hepáticas após 24 semanas de treino (Boveris & Navarro, 2008)

Tendo por base esta premissa, Taysi et al. (2008) analisaram, os efeitos do treino de *endurance* contra os efeitos deletérios do exercício exaustivo agudo em mitocôndrias hepáticas. Os resultados deste estudo sugerem que o treino de *endurance* atenua os efeitos do exercício exaustivo agudo ao evitar a diminuição da enzima antioxidante GPX, e com isso, verificou-se uma diminuição da produção de ERO durante o exercício exaustivo agudo. Contudo a literatura não é consensual, visto que, recentemente, Sun et al. (2010), após sujeitarem animais a 4 semanas de treino de *endurance*, observaram incremento do stress oxidativo mitocondrial. Este estudo corrobora as investigações de Terblanche et al. (2001) e Navarro et al. (2004), onde treino de *endurance* diminuiu a capacidade oxidativa das mitocôndrias hepáticas. Estes resultados corroboram com os estudos de Venditi et al. (1999), onde a aplicação de uma única sessão de treino de *endurance* (5-8h), na piscina, revelou um decréscimo nos níveis de antioxidantes e na capacidade oxidativa,

assim como um aumento da peroxidação lipídica. Esta temática é ainda tão controversa, que existem ainda estudos que demonstraram que a capacidade oxidativa das mitocôndrias hepáticas, não tinha sido afectada pelo treino de *endurance* (Willis et al., 1992; ŽGuzman & Castro, 1988). Recentemente, Sun et al., 2010, sugeriram que o treino de *endurance* tanto pode induzir efeitos deletérios em mitocôndrias hepáticas, como desenvolver o sistema antioxidante, visto terem observado incrementos das concentrações de GSH.

## **3 – Definição dos Objectivos**

### **3.1 – Objectivo geral**

O objectivo do presente estudo foi analisar o efeito sinérgico e isolado da hipoxia hipobárica intermitente (HHI) e do treino de *endurance* na funcionalidade de mitocôndrias hepáticas, na presença e ausência de salicilato.

### **3.2 – Objectivos específicos**

Podemos definir como objectivos específicos do presente estudo a análise das adaptações induzidas pela hipoxia hipobárica intermitente e pelo treino de *endurance*, na presença e na ausência de salicilato:

- i) na actividade respiratória mitocondrial;
- ii) no potencial da membrana mitocondrial;
- iii) na tolerância mitocondrial à indução do poro de permeabilidade transitória (PPTM).



---

## 4 – Metodologia

### 4.1 – Caracterização da amostra

A amostra foi constituída por 23 ratos *Wistar* macho (5 semanas e aproximadamente 190g no início do protocolo). Durante o protocolo experimental os animais foram mantidos em gaiolas colectivas (dois ratos por gaiola) em biotério com atmosfera normal (21-22°C; 50-60% humidade), comida e água *ad libitum* e num ciclo de 12h dia/noite.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Normóxico Sedentário (NS) (n=7), Normóxico Exercitado (NE) (n=5), Hipóxico Sedentário (HS) (n=6) e Hipóxico Exercitado (HE) (n=5).

O protocolo experimental seguiu as normas internacionais previstas para a saúde, cuidado, utilização e manipulação laboratorial de animais em investigação.

### 4.2 – Protocolo experimental

#### 4.2.1 – Hipoxia hipobárica intermitente e treino de *endurance*

Os animais dos grupos HS e HE foram submetidos a um período de aclimatização de 7 dias (após os 2500m atingidos no 1º dia de hipoxia, os níveis de hipoxia foram incrementados no correspondente a uma altitude de 500m/dia até serem atingidos os 6000m), numa câmara hipobárica. Após o período de aclimatização os respectivos grupos foram submetidos a hipoxia intermitente de alta altitude, 5h/dia, 5 dias/semana, a uma pressão atmosférica de 49,3kPa (370mmHg), o equivalente a uma altitude de 6000m. O período de pressurização e de despressurização teve uma duração de 12min.

Os animais dos grupos NS e NE foram submetidos a uma pressão atmosférica de 101,3kPa (760mmHg), o equivalente aos valores encontrados ao nível do mar.

Após o período de hipoxia, os animais do grupo HE manteve-se em repouso durante 1h até iniciar o treino de *endurance*. Os animais dos grupos exercitados (NE e HE) foram adaptados ao tapete rolante durante 7 dias, antes

de iniciar o protocolo. Nos dois primeiros dias, os animais correram à velocidade de 15m/min, sendo que a velocidade foi aumentada a 5m/min, a cada 2 dias até à velocidade de 25m/min ser atingida.

O treino de *endurance* consistiu num período de exercício de tapete rolante, com duração de 1h, ao longo de 5 semanas a uma velocidade de 25m/min (0% de inclinação).

Os grupos sedentários (NS e HS) foram colocados em tapete rolante parado durante 1h, no sentido de reproduzir as condições ambientais dos grupos exercitados.

#### **4.2.2 – Extração de sangue e isolamento de mitocôndrias hepáticas**

Após os períodos de hipoxia intermitente e treino de *endurance*, os animais foram sacrificados, sendo-lhes, rapidamente, extraído o fígado para isolamento de mitocôndrias e foi colectado 2ml de amostra de sangue num tubo com ECTA, através da veia cava inferior, usado para analisar parâmetros hematológicos, tais como concentração de hemoglobina e do hematócrito. O fígado foi prontamente excisado e cortado num meio de isolamento (0-4°C) contendo 250mM de sacarose, 10mM de HEPES, 0,5 mM de EGTA com pH7,4 e albumina de soro de boi (BSA). A amostra foi cuidadosamente homogenizada com um pistão de teflon inserido num poter de vidro (*Potter-Elvehjen*).

A homogenizado de tecido foi centrifugado a 800xg durante 10 minutos, sendo que o *pellet* resultante desta centrifugação foi desperdiçado e o sobrenadante foi centrifugado a 10000xg durante 10 minutos. Seguidamente, o sobrenadante foi decantado e o *pellet* foi delicadamente ressuspenso em meio de isolamento e centrifugado novamente a 10000xg durante 10 minutos . Por fim, o sobrenadante foi decantado e o *pellet* resultante da centrifugação anterior foi ressuspenso em meio de ressuspensão (250mM de sacarose, 10mM de HEPES e pH 7,4) e centrifugado novamente a 10000xg durante 10 minutos. De modo a concluir todo este processo, o sobrenadante foi desperdiçado e o *pellet* final, contendo mitocôndrias, foi gentilmente ressuspenso em meio de ressuspensão.

Todos os procedimentos de isolamento das mitocôndrias foram realizados a uma temperatura entre os 0 e os 4°C. A concentração da proteína mitocondrial foi determinada espectrofotometricamente (Jasco V-630), recorrendo ao método do biureto, BSA como padrão. A suspensão mitocondrial final foi utilizada nas 4h seguintes e mantida entre os 0 e os 4°C.

#### **4.2.3 – Determinação do consumo do O<sub>2</sub> mitocondrial**

O consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial foi avaliado polarograficamente utilizando um eléctrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark (Yellow Springs Instruments, OH). As reacções ocorreram numa câmara de vidro fechada, termoregulada (25°) e agitada magneticamente, com um volume de 0,75ml, contendo 0,5mg de proteína mitocondrial hepática, num meio de reacção contendo 125 mM de sacarose, 5mM de HEPES, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 65 mM de KCl, 5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e pH 7.2.

Após 1minuto de estabilização, a respiração mitocondrial iniciou-se com a adição de glutamato-malato (10/5mM) ou succinato/rotenona (10mM/4µM), na concentração final.

A determinação do estado 3 respiratório foi efectuada após a adição de ADP numa concentração final de 200µM e o estado 4 respiratório foi medido como a taxa de consumo de O<sub>2</sub> que se segue à fosforilação do ADP. O RCR, ou seja, o rácio entre o estado 3 e o estado 4, foi calculado segundo Estabrook (1967) usando 235 mM O<sub>2</sub>/ml como valor de solubilidade do O<sub>2</sub> a 25°.

#### **4.2.4 – Determinação do potencial eléctrico transmembranar ( $\Delta\psi$ )**

O  $\Delta\psi$  de membrana foi estimulado com base na actividade do catião lipofílico tetrafenilfosfónio (TPP<sup>+</sup>) utilizando um eléctrodo selectivo para TPP<sup>+</sup> preparado no nosso laboratório de acordo com Kamo et al. (1979) e usado como referência um eléctrodo AgCl (Tacussel, Model MI 402). Ambos os eléctrodos TPP<sup>+</sup> e o de referência foram inseridos numa câmara aberta agitada magneticamente e conectada a um medidor de pH (rtec, PHM 84). Os sinais foram ampliados através de um gravador potenciométrico (Alteck, linear 1200).

Não foi utilizado qualquer factor de correcção para rectificar a contribuição passiva de  $\text{TPP}^+$  para o potencial de membrana, uma vez, que o propósito deste estudo é observar as alterações relativas entre grupos em detrimento de valores absolutos. Consequentemente, os valores de  $\Delta\psi$  obtidos *à priori* são ligeiramente sobrestimados. O  $\Delta\psi$  foi estimado através da equação (25°C):

$$\Delta\psi = 59 \times \log(v/V) - 59 \times \log(10 \Delta E/59-1)$$

Legenda:

v – volume mitocondrial

V – volume do meio de incubação

$\Delta E$  – deflecção do potencial do eléctrodo a partir do estado basal

As reacções ocorreram em 1ml de meio de reacção, contendo 125 mM de sacarose, 5mM de HEPES, 2,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 65 mM de KCl, 5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e pH 7.2, suplementado com  $\text{TPP}^+$  (3 $\mu\text{M}$ ) e 1mg de proteína (25°C).

Para a monitorização do  $\Delta\psi$  com substratos para o complexo I foi adicionado glutamato/malato (10/5mM, respectivamente) e o potencial de despolarização foi registado após a adição de ADP (200 $\mu\text{M}$ ). Para a monitorização do  $\Delta\psi$  máximo com substratos para o complexo II foi adicionado succinato (10mM) ao meio de reacção contendo rotenona (4 $\mu\text{M}$ ), na presença e na ausência de salicilato (0,5mM).

A *lag phase*, expressa em segundos, reflecte a capacidade mitocondrial para despolarizar e repolarizar após adição de ADP, foi avaliada em ambas as condições de utilização de substratos.

#### **4.2.5 – Swelling mitocondrial**

As alterações osmóticas do volume mitocondrial foram acompanhadas através da monitorização do decréscimo da absorvância a 540nm usando um espectrofotómetro Jasco V-630.

Os ensaios foram realizados em 1ml de meios de reacção (130mM de sacarose, 5mM de HEPES, 50mM de KCL, 2,5mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10µM de EGTA e pH a 7,4), suplementado com rotenona (4µM), succinato (10mM) e Ca<sup>2+</sup> (240µM), com 1mg de proteína, na presença e ausência de salicilato (0,5mM). O ensaio de controlo foi realizado através do uso de 1µM de ciclosporina A.

#### **4.3 – Procedimentos estatísticos**

O tratamento estatístico dos dados foi realizado recorrendo ao programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS in. version 18 para *Windows*).

Para a comparação de médias foram utilizados os seguintes testes paramétricos: *t-test student* e a ANOVA de medidas independentes seguida pelo *teste à post hoc* de Bonferroni.

Em ambos os testes o nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p \leq 0,05$ ).



## 5 – Apresentação dos Resultados

### 5.1 – Efeito do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente no peso do órgão e rendimento mitocondrial

No quadro 1 podem ser observados os valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) do peso corporal, peso do fígado, rácio do comprimento do fémur e peso do coração pelo peso corporal, assim como de hemoglobina, hematocrito e rendimento mitocondrial hepático, dos diferentes grupos presentes no estudo.

**Quadro1** Valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) das características dos animais e rendimento mitocondrial

	NS	NE	HS	HE
<b>Peso animal (sacrifício) (g)</b>	382,1 $\pm$ 7,1	346,6 $\pm$ 7,4	356,1 $\pm$ 10,4	319,0 $\pm$ 11,4*
<b>Peso fígado (g)</b>	9,77 $\pm$ 0,33	9,82 $\pm$ 0,46	10,33 $\pm$ 0,45	9,18 $\pm$ 0,46
<b>Peso fígado/peso corporal (mg.g<sup>-1</sup>)</b>	0,03 $\pm$ 0,0006	0,03 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,0007	0,3 $\pm$ 0,0005
<b>Peso coração/peso corporal (mg.g<sup>-1</sup>)</b>	0,22 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,01*
<b>Comprimento fémur/peso corporal (cm.g<sup>-1</sup>)</b>	0,95 $\pm$ 0,02	1,06 $\pm$ 0,02*	0,99 $\pm$ 0,91	1,12 $\pm$ 0,05*#
<b>Hemoglobina (g.dl<sup>-1</sup>)</b>	14,1 $\pm$ 0,3	14,4 $\pm$ 0,12	20,0 $\pm$ 0,83*	18,7 $\pm$ 0,12*#
<b>Hematocrito (%)</b>	43,2 $\pm$ 1,34	43,1 $\pm$ 0,5	63,7 $\pm$ 3,37*	57,4 $\pm$ 0,45*#
<b>Rendimento mitocondrial (mg.g<sup>-1</sup>)</b>	5,09 $\pm$ 0,41	5,79 $\pm$ 0,51	4,76 $\pm$ 3,08	6,56 $\pm$ 0,85

Nota: NS: Normoxico Sedentário; NE: Normoxico Exercitado; HS: Hipóxico Sedentário; HE: Hipoxico Exercitado

\*vs. NS ( $p < 0,05$ )

#vs. HS e HE ( $p < 0,05$ )

Foi observada uma significativa diminuição do peso corporal do grupo HE em relação aos do grupo NS. Por outro lado, no grupo HE foi observado um aumento significativo dos seguintes parâmetros, em relação a NS: rácio peso coração/peso corporal; rácio comprimento fémur/peso corporal; hemoglobina e hematocrito. O grupo HS apresentou uma concentração de hemoglobina e hematocrito significativamente superior a NS e a HE.

Contudo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos, no que diz respeito ao peso do fígado, rácio peso fígado/peso corporal e rendimento do isolamento mitocondrial.

## 5.2 – Efeito do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente no consumo de oxigénio mitocondrial

Para ilustrar os efeitos do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente no consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial hepático, foram determinadas taxas respiratórias utilizando substratos para a oxidação do NADH e FADH<sub>2</sub> através dos complexos mitocondriais I e II, respectivamente. Os resultados dos diferentes grupos nos parâmetros respiratórios mitocondriais estado 3, estado 4 e RCR estão representados no quadro 2.

**Quadro 2** Valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) da taxa respiratória em estado 3 e 4 e RCR, usando como substratos Glutamato-malato (10/5mM) e Succinato (10mM) na presença de rotenona (4 $\mu$ M).

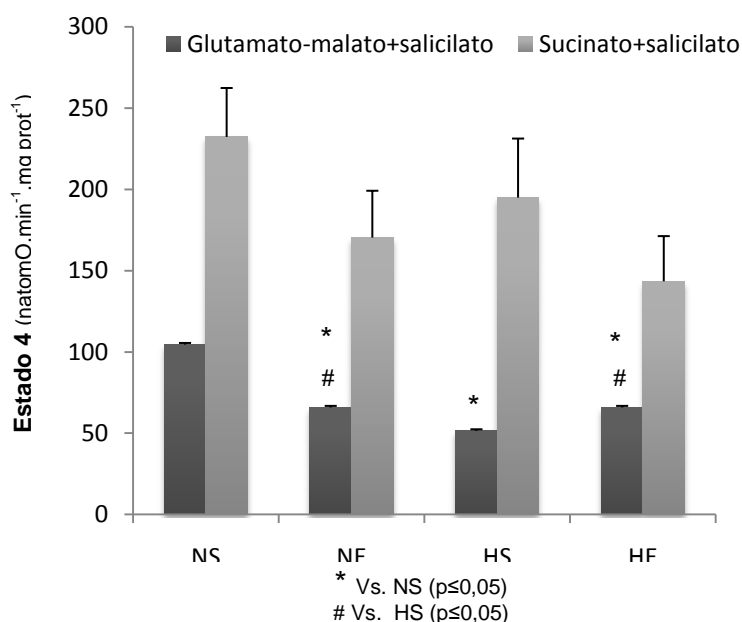
<b>Glutamato-Malato</b>	<b>NS</b>	<b>NE</b>	<b>HS</b>	<b>HE</b>
Estado 3 (natomO.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	249,1 $\pm$ 6,5	160,9 $\pm$ 10,0*	168,3 $\pm$ 21,0*	169,9 $\pm$ 8,2*
Estado 4 (natomO.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	73,7 $\pm$ 2,8	46,0 $\pm$ 2,9*	33,4 $\pm$ 2,8*	44,8 $\pm$ 5,7*
RCR	3,4 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,8
<b>Succinato</b>				
Estado 3 (natomO.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	364,1 $\pm$ 24,6	313,5 $\pm$ 49,5	293,3 $\pm$ 44,4	215,7 $\pm$ 16,7*
Estado 4 (natomO.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	146,6 $\pm$ 7,2	104,0 $\pm$ 12,6*	113,6 $\pm$ 9,2	106,9 $\pm$ 6,7*
RCR	2,7 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,2

\*vs. NS (p<0,05)

Utilizando glutamato-malato como substrato observou-se que, comparativamente com o grupo NS, os grupos NE, HS e HE apresentam uma taxa respiratória inferior durante o estado 3 e o estado 4 ( $\approx$ 35-40%). Utilizando succinato como substrato foram observadas reduções significativas no estado 3, entre os grupos NS-HE, e no estado 4 entre os grupos NS-NE e NS-HE.

De realçar, ainda, que não se verificaram diferenças significativas no RCR quando utilizados ambos os substratos entre quaisquer dos grupos analisados.

A figura 5 mostra os resultados dos diferentes grupos no estado 4, na presença de salicilato, utilizando ambos os substratos (glutamato-malato e succinato).



**Fig. 5** Valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) da taxa do estado 4 respiratório, na presença de salicilato (0,5mM) usando como substrato Glutamato-malato (10/5mM) e Succinato (10mM) inibindo o complexo I com rotenona (4 $\mu$ M).

Na presença de salicilato, a taxa respiratória do estado 4 foi superior, em todos os grupos e para ambos os substratos, quando comparado com o mesmo parâmetro na ausência deste fármaco. Na presença de salicilato, utilizando glutamato-malato para energizar o complexo I, podemos verificar diferenças significativas em todos os grupos relativamente ao grupo de controle (NS). O grupo HE apresenta diferenças significativas relativamente ao grupo HS, contudo o mesmo não se verifica em relação ao grupo NE.

Por outro lado, na presença de salicilato, não se verificam diferenças significativas entre grupos quando as mitocôndrias são energizadas.

### 5.3 – Efeito do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente no potencial de membrana mitocondrial

De forma a averiguar mais detalhadamente os efeitos do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente na função mitocondrial foram avaliadas as variações no potencial de membrana mitocondrial (fig. 2B), utilizando glutamato-malato e succinato como substratos para o complexo I e II da CTE, as quais são apresentados no quadro 3.

**Quadro 3** valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) das flutuações do potencial mitocondrial transmembranar ( $\Delta\psi$ ) e da *lag phase*, após um ciclo fosforilativo de ADP, usando como substratos Glutamato-malato (10/5mM) e Succinato (10mM) na presença de rotenona (4 $\mu$ M).

<b>Glutamato-Malato</b>	<b>NS</b>	<b>NE</b>	<b>HS</b>	<b>HE</b>
$\Delta\psi$ Máximo (-mV)	218,1 $\pm$ 2,8	213,3 $\pm$ 4,2	218,6 $\pm$ 1,9	209,9 $\pm$ 4,5
$\Delta\psi$ Despolarização (-mV)	188,2 $\pm$ 2,6	181,2 $\pm$ 4,7	186,8 $\pm$ 2,7	173,7 $\pm$ 7,3
$\Delta\psi$ Repolarização (-mV)	212,3 $\pm$ 3,3	208,6 $\pm$ 4,7	212,9 $\pm$ 2,6	202,6 $\pm$ 7,2
<i>Lag phase</i> (s)	66,1 $\pm$ 5,0	67,5 $\pm$ 6,3	64,9 $\pm$ 3,0	49,6 $\pm$ 3,8
<b>Succinato</b>				
$\Delta\psi$ Máximo (-mV)	220,9 $\pm$ 3,0	216,3 $\pm$ 3,0	219,2 $\pm$ 1,3	215,6 $\pm$ 1,7
$\Delta\psi$ Despolarização (-mV)	192,8 $\pm$ 3,0	189,3 $\pm$ 2,9	187,4 $\pm$ 1,8	184,5 $\pm$ 2,5
$\Delta\psi$ Repolarização (-mV)	218,2 $\pm$ 2,5	214,3 $\pm$ 3,2	216,8 $\pm$ 1,1	213,4 $\pm$ 2,1
<i>Lag phase</i> (s)	84,4 $\pm$ 2,8	96,8 $\pm$ 2,2	92,7 $\pm$ 4,5	73,6 $\pm$ 9,0*

\*vs. NE e HS ( $p < 0,05$ )

Podemos observar que não existem diferenças significativas entre grupos no  $\Delta\psi$  máximo,  $\Delta\psi$  despolarização e repolarização, para ambos os substratos utilizados.

Ainda no quadro 3 podemos observar os valores médios da *lag phase* de um ciclo fosforilativo induzido pela adição de ADP utilizando como substratos glutamato-malato e succinato. Como é possível verificar, não existem diferenças significativas entre grupos na *lag phase*, apesar de existir uma tendência para a *lag phase* do grupo HE ser inferior à dos restantes (22-26%). Quando utilizado succinato para a energização do complexo II, observamos diferenças significativas entre na *lag phase* entre os grupos HS-HE e os grupos HE-NE.

No quadro 4 são apresentados os resultados relativos às flutuações do  $\Delta\psi$  após um ciclo fosforilativo, assim como os valores médios da *lag phase*, na presença de salicilato, utilizando succinato como substrato.

**Quadro 4** valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) das flutuações do potencial mitocondrial transmembranar ( $\Delta\psi$ ) e da *lag phase*, de um ciclo fosforilativo de ADP, usando como substrato Succinato-rotenona (10mM/4 $\mu$ M) na presença de salicilato (0,5mM).

<b>Succinato+salicilato</b>	<b>NS</b>	<b>NE</b>	<b>HS</b>	<b>HE</b>
$\Delta\psi$ Máximo (-mV)	201,4 $\pm$ 3,0	202,1 $\pm$ 2,0	202,1 $\pm$ 3,5	194,6 $\pm$ 2,1
$\Delta\psi$ Despolarização (-mV)	183,0 $\pm$ 2,1	185,4 $\pm$ 0,7	182,1 $\pm$ 2,4	182,4 $\pm$ 2,4
$\Delta\psi$ Repolarização (-mV)	199,5 $\pm$ 2,5	203,0 $\pm$ 1,7	201,8 $\pm$ 2,5	201,8 $\pm$ 1,6
<i>Lag phase</i> (s)	151,0 $\pm$ 3,3	129,5 $\pm$ 1,7*	107,3 $\pm$ 5,0 <sup>#</sup> *	105,4 $\pm$ 6,9 <sup>#</sup> *

\*vs. NS ( $p < 0,05$ )

#vs. NE ( $p < 0,05$ )

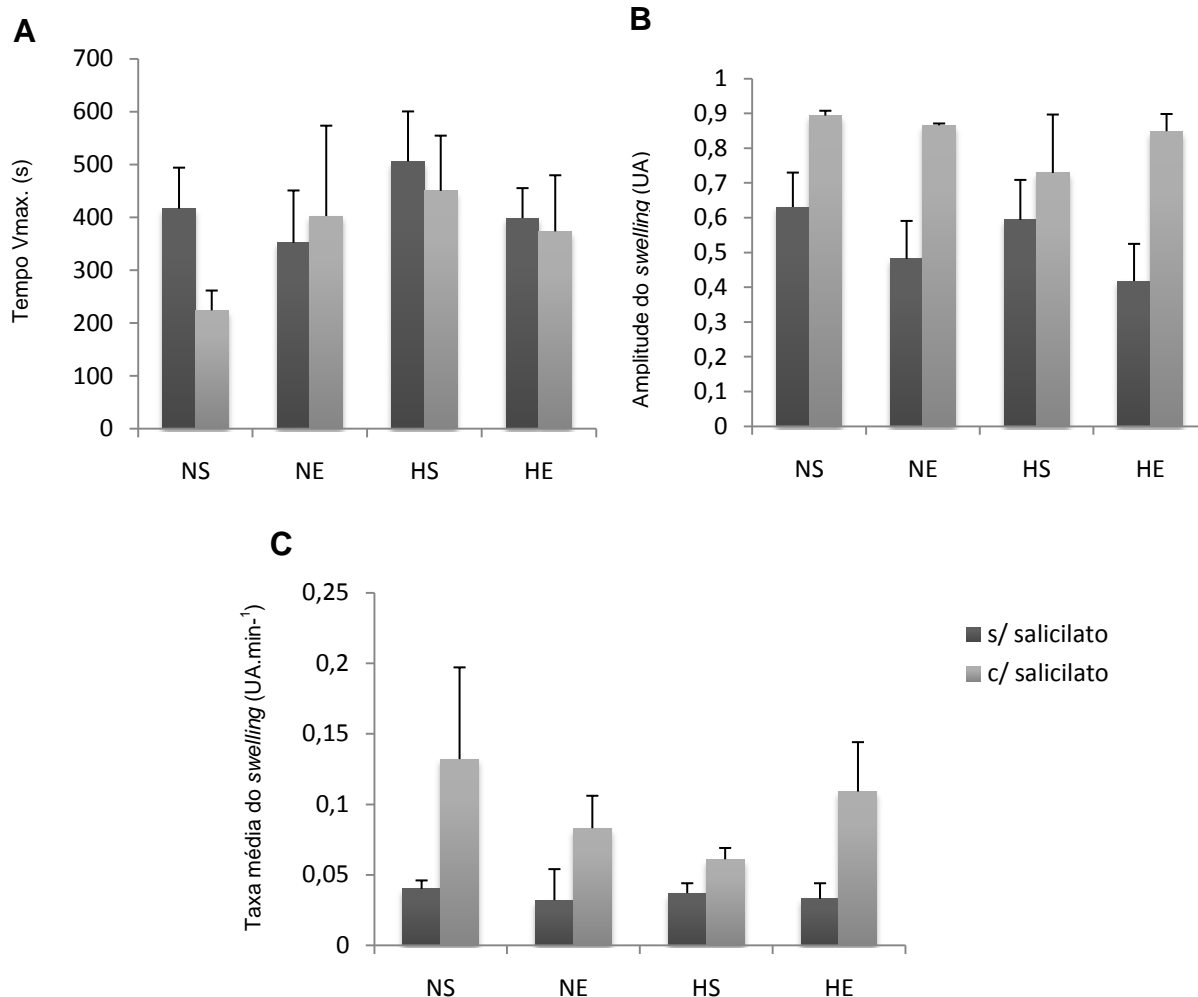
Na referida condição, a *lag phase* aumentou em todos os grupos comparativamente com a condição de ausência de salicilato no meio de reacção. O grupo NS é o que apresenta maior *lag phase*, verificando-se diminuições estatisticamente significativas entre este grupo (NS) e os restantes. De realçar o facto dos grupos submetidos ao protocolo de hipoxia hipobarica intermitente apresentarem *lag phase* inferior quando comparados com os grupos normóxia, sendo esta diferença estatisticamente significativa, destacando-se a relação entre HE-NE. Contudo não existem diferenças significativas entre os grupos submetidos a hipoxia hipobárica intermitente (HS-HE).

#### **5.4 – Efeito do treino de *endurance* e da hipoxia hipobárica no Swelling mitocondrial**

Foram igualmente avaliados espectralmente os efeitos do treino de *endurance* e da hipoxia hipobárica intermitente na susceptibilidade das mitocôndrias hepáticas à abertura do PPTM na presença e ausência de salicilato.

Na figura 6 podem-se observar os resultados da avaliação dos parâmetros do *swelling osmótico*, nomeadamente, o tempo até atingimento da

velocidade máximo de *swelling* (Tempo Vmax.) (figura 6A); a amplitude do *swelling* (figura 6B) e a taxa média de *swelling* (figura 6C), na presença e na ausência de salicilato.



**Fig. 6** – Valores médios e respectivo erro padrão da média ( $X \pm SEM$ ) de: Figura 6A – Máxima taxa de *swelling*; Figura 6B – Amplitude do *swelling*; Figura 6C – Média da taxa de *swelling*. Na presença e na ausência de salicilato

Os valores relativos aos ensaios de *swelling* não apresentam diferenças significativas entre os diferentes grupos. Contudo, há uma tendência para que na presença de salicilato o tempo até ao atingimento da velocidade máxima de *swelling* seja menor, a amplitude de *swelling* seja maior, assim como a taxa média de *swelling* seja superior relativamente aos ensaios efectuados na ausência de salicilato.

## 6 – Discussão dos Resultados

A disfunção hepática é um dos principais problemas associados a diversas condições patológicas como a obesidade. Adicionalmente, muitas outras formas de toxicidade hepática encontram-se associadas à ingestão de fármacos para o tratamento de doenças crónicas. O salicilato, metabolito principal da Aspirina, se por um lado tem demonstrado eficácia na prevenção primária e secundária de eventos cardiovasculares, assim como no tratamento agudo do enfarto do miocárdio (Nulton-Persson et al., 2004), por outro lado, pode originar esteatose microvesicular, estando na origem de lesões mitocondrias hepáticas (Labbe et al. 2008). O estudo da toxicidade mitocondrial hepática de sujeitos submetidos a estímulos crónicos como o exercício físico de *endurance* e a hipoxia hipobárica intermitente revela ser de potencial interesse, visto estas serem duas estratégias utilizadas na prevenção e no tratamento de diversas patologias, incluindo doenças metabólicas e cardiovasculares (Powers et al., 1998; Zhang et al., 2000; Powers et al., 2002; Hamilton et al., 2003; Starnes et al., 2003; Dong et al., 2003; Zhang et al., 2004; Lennon et al., 2004; Powers et al., 2004; Brown et al., 2005; Quindry et al., 2005; French et al., 2006; Ascensão et al., 2007; Ascensão et al., 2011).

Deste modo, o nosso estudo surgiu com o intuito de perceber as implicações na funcionalidade mitocondrial hepática destas intervenções isoladamente e combinadamente, na presença e na ausência de salicilato, um metabolito anti-inflamatório que causa lesão hepática mitocondrial.

A nossa amostra foi constituída por ratos, sendo este considerado um modelo animal adequado no estudo de alterações estruturais e funcionais observadas em pacientes (Monti et al. 1995). Relativamente ao género do animal, tem sido descrito que a expressão e a actividade das enzimas antioxidantes é mais elevada nos ratos fêmeas do que nos machos (Borras et al. 2003), pelo que não foram incluídos ratos fêmea no nosso estudo.

De acordo com o nosso objectivo, os ensaios foram realizados *in vitro* e medimos o consumo de oxigénio, o potencial transmembranar e o swelling

mitocodondrial em mitocôndrias isoladas de fígado. Neste sentido, os ensaios em mitocôndrias isoladas constitui um modelo bastante utilizado para avaliar o efeito modulador de vários estímulos e/ou da toxicidade de algumas drogas, como o salicilato. As alterações na funcionalidade mitocondrial avaliados *in vitro* constitui-se, portanto, como interessantes sensores de toxicidade e/ou resposta tecidual a condições patofisiológicas (Oliveira, 2011).

### **6.1 – Adaptações induzidas pelo treino de *endurance* e pela hipóxia hipobárica intermitente na morfologia animal**

O nosso estudo revelou uma tendência para os grupos NE e HS possuírem um peso corporal inferior ao do grupo de controlo (NS). Contudo, apenas o grupo que foi submetido a ambos os estímulos (HE) foi significativamente diferente relativamente ao grupo NS. Os estudos de Zhang et al. (2010) indicam que não existem diferenças significativas no do peso corporal e no rácio entre o peso do coração/peso corporal entre o grupo sujeito a hipóxia hipobárica intermitente (HS) e o grupo normóxico (NS). Contudo, Neckar et al. (2002) verificaram que o peso corporal dos ratos sujeitos a hipóxia hipobárica intermitente é significativamente inferior do que o grupo normóxico, o que vem, em parte, ao encontro dos nossos resultados. Relativamente aos efeitos do treino de *endurance*, diversos autores, tal como o nosso estudo, verificaram que este diminui o peso corporal (Arcos et al., 1968; Baldwin et al., 1975; Starnes et al., 2003; Lennon et al., 2004; Quindry et al., 2005; Boluyt et al., 2006; Starnes et al., 2007; Huang et al., 2009). O peso do fígado e do coração não sofreram, no nosso estudo, qualquer alteração significativa, sendo de esperar o aumento do peso relativo do coração, visto esta ser uma das adaptações clássicas desencadeadas pelo treino de *endurance* em ratos (Baldwin et al., 1977; Hickson et al., 1983; Kingwell et al., 1998). Verificamos ainda, um aumento significativo do rácio peso do coração/peso corporal (quando 1) no grupo HE, evidenciando que o treino de *endurance* em simultâneo com a hipóxia hipobárica intermitente constitui um estímulo capaz de induzir hipertrofia cardíaca.

O hematócrito, ou seja, a percentagem que os glóbulos vermelhos ocupam no sangue, e a concentração de hemoglobina aumentaram significativamente nos grupos sujeitos a hipóxia. Estes efeitos estão descritos na literatura como adaptações crónicas à alta altitude. Mairbaurl (1994) verificou que a concentração de hemoglobina no sangue aumenta linearmente até uma altitude de 4000m e acima deste valor até aos 6000m aumenta desproporcionalmente. Numa fase inicial de exposição aguda à alta altitude, os valores do hematócrito são incrementados essencialmente à custa da diminuição do volume plasmático e sanguíneo, só posteriormente o aumento da massa dos glóbulos vermelhos compensa o decréscimo do volume plasmático, reestabelecendo o volume sanguíneo total e compensando a redução do conteúdo arterial de oxigénio (Mairbaurl, 1994). O aumento da viscosidade sanguínea, induzido por este aumento do hematócrito, associado à diminuição do volume plasmático, poderá aumentar o dispêndio energético cardíaco e dificultar o fluxo sanguíneo nos capilares, diminuindo a eficácia cardiovascular no transporte de oxigénio para os tecidos (Mairbaurl, 1994).

## **6.2 – Efeitos do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente na actividade respiratória e no potencial transmembranar**

De modo a estudar os efeitos do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente na função mitocondrial hepática, avaliamos o consumo de O<sub>2</sub> associado ao potencial de membrana mitocondrial e ciclo fosforilativos induzidos pelo ADP. O ADP é o estimulador da fosforilação oxidativa e regulador da via glicolítica (Bernard & Rossignol, 2008). Assim sendo, a análise dos parâmetros respiratórios estudados; estado 3, estado 4 e RCR, com substratos para o complexo I (malato-malato) e II (sucinato) teve como intuito estudar: (i) a respiração em mitocôndrias isoladas acopladas na presença de ADP; (ii) o estado respiratório após a fosforilação do ADP em estado 3, designado por estado 4, reflectindo o índice de permeabilidade da membrana a

protões; (iii) a relação entre estado 3/estado 4, considerado um índice de acoplamento ou desacoplamento da fosforilação oxidativa, isto é, entre o consumo de O<sub>2</sub> e a produção de ATP.

No que diz respeito ao complexo I, podemos observar que todos os grupos (NE, HS e HE) possuem consumo de O<sub>2</sub> em estado 3 inferior relativamente ao grupo NS. Os resultados apontam um decréscimo da capacidade fosforilativa mitocondrial hepática nos ratos sujeitos a treino de endurance e a hipóxia hipobárica intermitente, em separado ou em conjunto, expressa pela diminuição do estado 3 o que sugere que a potência oxidativa das mitocôndrias hepáticas foi afectada. A diminuição da capacidade das mitocôndrias hepáticas em fosforilar ADP após treino de *endurance* corrobora com alguns resultados de estudos onde não ocorreram alterações ou ocorreram diminuições na capacidade oxidativa das mitocôndrias hepáticas (Terblanche et al., 2001; Navarro et al. 2004). Uma diminuição do estado 3 pode ser interpretada como um sinal da disfunção da CTE, através de danos intrínsecos nas óxido-redutases ou na limitação dos equivalentes redutores (Willet et al., 2000), com um consequente declínio dos electrões fornecidos para a CTE; pela diminuição do conteúdo e actividade do ANT (Oliveira & Wallace, 2006); ou por danos específicos no sistema de fosforilação mitocondrial, com declínio da actividade de enzimas do ciclo de Krebs (Holloszy et al., 1970).

Tem sido sugerido que em algumas circunstâncias, como por exemplo *stress* oxidativo acrescido *in vivo* (Magalhaes et al., 2005), existe a ocorrência de disfunção reversível de algumas enzimas do ciclo de krebs, tal como a succinato desidrogenase, a  $\alpha$ -cetoglutamato desidrogenase, ou a aconitase, resultando na diminuição dos níveis de NADH e FADH<sub>2</sub>. Esta poderá ser uma das hipóteses para o facto de se verificar diminuição do estado 3 em de ambos os complexos. Por outro lado, os complexos enzimáticos mitocondriais, em particular o complexo I, possuem grupos ferro-enxofre que podem ser oxidativamente modificados ou desactivados pela interacção com radicais resultando, consequentemente, na redução da sua actividade e no comprometimento da potência do estado 3. De facto, recentemente, Sun et al.

(2010) observaram incrementos de stress oxidativo em mitocôndrias hepáticas de animais sujeitos a treino de endurance, sugerindo o decréscimo do estado 3 pela diminuição da actividade de alguns complexos enzimáticos da CTE, por oxidação proteica mediada por radicais livres (Yen et al., 1996) ou por peroxidação das moléculas de cardiolipina da membrana interna (Paradies et al., 2002). Contudo, a diminuição significativa do estado 4 nos grupos NE HS e HE em relação a NS, poderá sugerir que o treino de *endurance* e a hipóxia hipobárica intermitente aumentaram o acoplamento da membrana interna mitocondrial, resultando numa menor permeabilidade a protões, provavelmente devido a um menor dano causado pelo stress oxidativo induzido a lipídios e/ou proteínas da membrana (Choksi et al., 2004).

A possível diminuição dos níveis de lesão oxidativa mitocondrial hepática (particularmente em componentes associados à permeabilidade de membrana a protões) no grupo NE, sujeitos a treino de *endurance*, poderá ser consequência do aumento, no fígado, da GSH (Radak et al., 2004, Sun et al., 2010) e de enzimas antioxidantes como a SOD (Sílvia et al., 2009) e a CAT (Kakarla et al., 2004), ou mesmo da diminuição da taxa de formação de ERO (Radak et al. 2004). Por outro lado, é possível equacionar a melhoria no acoplamento da fosforilação oxidativa como resultado do aumento/manutenção da integridade de cardiolipina. A cardiolipina encontra-se principalmente na membrana mitocondrial interna e tem um importante papel na estrutura e função da mitocôndria (Hoch, 1992). A cardiolipina interage com várias proteínas da membrana interna mitocondrial, tendo um papel central na manutenção de suas actividades. De todas as proteínas destacamos o citocromo c, o translocador ADP/ATP (ANT), o translocador de Pi e o complexo ATP-sintetase. Além disso, a cardiolipina parece exercer um papel central no controle da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a pequenas moléculas, bem como na manutenção do gradiente de protões (Hoch, 1988; Shidoji et al., 1999; Hauff & Hatch, 2006). De facto o aumento do acoplamento da membrana interna mitocondrial pode ser devido a várias causas, incluindo: o aumento de acoplamento intrínseco de alguns complexos da CTE; preservação ou aumento do conteúdo de componentes da membrana interna, como a

cardiolipina; ou possivelmente alterando as propriedades físico-químicas da membrana, tais como índices insaturados ou outras características de composição. De facto, foi observado que o treino de *endurance* diminuiu as gorduras monoinsaturadas e aumenta as gorduras poliinsaturadas em mitocôndrias hepáticas (Quiles, Huertas et al. 2001).

Apoiando-nos em estudos que pretenderam analisar os efeitos cardioprotectores da hipoxia hipobárica intermitente, podemos associar um maior acoplamento membranar, nos grupos sujeitos a este estímulo, a um aumento da capacidade antioxidante (Zhu et al., 2004; Kolar et al., 2006) e a um aumento da superexpressão de HSP70 (Zhong et al., 2000; Ding et al., 2005). Alguns autores têm demonstrado que esta sobreexpressão se encontra associada ao aumento da funcionalidade mitocondrial, incluindo o consumo de O<sub>2</sub>, a actividade dos complexos da CTE e à diminuição da apoptose (Sammut & Harrison, 2003; Sammut et al., 2001).

Contudo, temos de ressaltar que um excessivo acoplamento da membrana interna poderá não beneficiar a funcionalidade mitocondrial, visto que segundo alguns autores (Miwa & Brand 2003; Garvey, 2003; Brookes, 2005) uma ligeira dissipação do gradiente de prótons tem-se revelado benéfica para a função mitocondrial pela diminuição da produção de ERO, preservando assim os componentes da matriz mitocondrial, tais como mDNA, componentes da CTE e outras moléculas susceptíveis à interacção com ERO.

Em relação ao RCR, parâmetro associado à funcionalidade e integridade mitocondrial, os resultados do nosso estudo não demonstram diferenças significativas entre os quatro grupos. Efectivamente, esta ausência de diferenças resulta de uma diminuição proporcional dos estados 3 e 4, para ambos os substratos utilizados. No entanto, é também importante referir que valores elevados de RCR ilustram uma funcionalidade intacta das mitocôndrias, com uma boa ligação entre o consumo de O<sub>2</sub> e a produção de ATP (Tonkonogi et al., 2000).

As alterações descritas nos parâmetros da actividade respiratória mitocondrial foram acompanhadas pela redução da *lag phase*, usando glutamato-malato e succinato (quadro 3). A *lag phase* é um indicador que

reflecte a capacidade mitocondrial de repolarizar rapidamente após a adição de ADP. Neste parâmetro o grupo HE destacou-se, quer no complexo I, quer no complexo II. Os efeitos em simultâneo do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente parecem diminuir o tempo necessário para restabelecer o  $\Delta\psi$  dissipado após a adição e consequente fosforilação do ADP das mitocôndrias hepáticas. A *lag phase* do grupo HE é inferior no complexo I, relativamente a todos os restantes grupos, enquanto no complexo II, esta diferença é significativa para aos grupos HS e NE, revelando deste modo o efeito adicional que ambos os estímulos produzem em simultâneo.

O estudo complementar do  $\Delta\psi$  parece ser imprescindível para uma análise integrada da função mitocondrial, uma vez que reflecte as relações energéticas básicas na manutenção da homeostasia celular. Segundo os resultados obtidos (quadro 3), o treino de *endurance* e a hipoxia hipobárica intermitente não afectaram o  $\Delta\psi$  máximo usando como substratos succinato e glutamato-malato, nem as flutuações associadas ao ciclo fosforilativo. A análise do  $\Delta\psi$  máximo é fundamental para percebermos a eficiência do ciclo fosforilativo, sendo que neste caso, nenhum dos grupos registou um  $\Delta\psi$  máximo inferior a 200mV, e como tal, dificilmente a bioenergética mitocondrial dependente de  $\Delta\psi$  seria comprometida (Nadtochiy et al., 2006).

### **6.3 – O efeito do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente em mitocôndrias hepáticas sujeitas a salicilato**

O salicilato é um metabolito activo com propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias a curto prazo, aliviando a dor, diminuindo a febre e a inflamação e prevenindo a formação de coágulos na corrente sanguínea. Porém são cada vez mais evidentes as lesões que este fármaco acarreta ao nível das mitocôndrias hepáticas.

A concentração de salicilato utilizada no presente estudo (0,5 mM), é da mesma ordem de magnitude da verificada no citosol de células hepáticas após terapia com aspirina (Flower et al., 1985; Trost & Lemasters, 1997).

No nosso estudo, na presença de salicilato, a taxa respiratória do estado 4 foi superior em todos os grupos e para ambos os substratos (fig. 5), quando comparado com o mesmo parâmetro na ausência deste fármaco, vindo deste modo ao encontro da literatura que aponta o salicilato como sendo um desacoplador da membrana mitocondrial (Martens & Lee, 1984; Tosgard & Getz, 1995; Segalman & Lee, 1995; Petrescu & Tarba, 1997), aumentando a fuga de prótons. Esta mudança na permeabilidade mitocondrial resultou numa ligeira diminuição do  $\Delta\psi$  máximo, após adição de salicilato, sendo de pressupor que a produção de ATP foi afectada, tal como nos estudos de Doi & Horie (2010) e Nulton-Presson et al. (2004). Adicionalmente, estes últimos alegam que os declínios da síntese de ATP poderão também ser consequência da inibição da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase por parte do fármaco.

Na presença de salicilato, utilizando glutamato-malato para energizar o complexo I, podemos verificar que todos os grupos possuem um estado 4 significativamente inferior ao grupo de controlo (NS) (fig. 5). Estes resultados parecem indicar que o treino de *endurance* e a hipóxia hipobárica intermitente possuem efeitos protectores contra a toxicidade hepática do salicilato. É ainda visível uma clara redução do consumo de  $O_2$  quando a mitocôndria é energizada com succinato, por parte dos grupos NE HS e HE em relação ao grupo NS. Contudo, estas diferenças não são estatisticamente significativas devido aos elevados erros padrões da média observados. O grupo HE, quando energizado com glutamato-malato, possui um aumento significativo do consumo de  $O_2$  relativamente ao grupo HS, fazendo pressupor que o exercício de *endurance* retrocede o efeito acoplador que a hipóxia hipobárica intermitente confere. Contudo, o facto de o grupo HE, quando energizado com succinato possuir o menor consumo de  $O_2$  contraria este resultado, demonstrando que poderá existir um efeito benéfico na conjugação do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente, traduzindo-se num melhor acoplamento mitocondrial.

Na presença de salicilato, a *lag phase* aumentou em todos os grupos comparativamente com a condição de ausência de salicilato no meio de reacção. Como podemos observar no quadro 4, o grupo NS é o que apresenta

maior *lag phase*, verificando-se diferenças estatisticamente significativas entre este grupo (NS) e os restantes. Ou seja, os animais submetidos ao protocolo de treino de *endurance* e de hipóxia hipobárica intermitente, isoladamente ou combinadamente, apresentam um menor tempo para restabelecimento do  $\Delta\psi$ , logo são mais eficazes a fosforilar o ADP na presença do farmaco. De realçar o facto dos grupos submetidos ao protocolo de hipoxia hipobarica intermitente apresentarem uma *lag phase* significativamente inferior quando comparados com os grupos normóxia, destacando-se a relação entre HE-NE, que sugere que a hipóxia hipobárica intermitente possui um efeito protector aditivo sobre o treino de *endurance*, que por si só é igualmente protector contra a toxicidade hepática.

O desacoplamento mitocondrial pode ser induzido pela depleção do mDNA que o fármaco induz, levando com isso à redução da síntese de polipeptídeos da CTE, prejudicando a sua actividade, e consequente geração de ERO (Fromenty & Pessayre, 1995; Labbe et al., 2008; Pessayre et al., 2010). A sobreexpressão de ERO induzida pelo salicilato tem um impacto directo sobre a oxidação das membranas fosfolipídicas das mitocôndrias, ficando comprometidas as propriedades de impermeabilidade da membrana interna, a manutenção do potencial e a capacidade de tamponamento mitocondrial ao  $\text{Ca}^{2+}$ , induzindo a abertura do PPTM (Battaglia et al., 2005). Assim sendo, visto haver sugestões que o treino de *endurance* aumenta a expressão de enzimas antioxidantes em mitocôndrias hepáticas (Radak et al., 2004; Kakarla et al., 2004; Silvia et al., 2009; Sun et al., 2010), este poderá ser um dos principais mecanismos que justifiquem a protecção contra a toxicidade hepática que o treino de *endurance* e a hipóxia hipobárica intermitente conferiram no presente estudo.

Diversos autores defendem que os fármacos (Labbe et al., 2008; Pessayre et al., 2008; Begriche et al., 2011) e especificamente o salicilato (Biban et al., 1995; Trost & Lemasters, 1997; Al Nasser, 1999; Oh et al. 2003; Battaglia et al., 2005) induzem a abertura do PPTM. Tem sido descrito que uma das características do PPTM, após perda do  $\Delta\psi$ , se prende com o aumento da amplitude de *swelling* induzido pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , na presença de fosfato (Gunter et al.,

2000). No presente estudo, a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  às mitocôndrias causou um decréscimo acentuado da absorvância, típico do swelling mitocondrial induzido pela abertura do PPTM no fígado.

Segundo Bataglia et al. (2005), a abertura do PPTM na presença de salicilato ocorre devido ao aumento do consumo de  $\text{O}_2$ , à geração de, à oxidação dos grupos tiois, dos nucleotídeos de piridina e da GSH, observada na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Com a abertura do PPTM, o  $\Delta\psi$  entra em colapso, ocorre um aumento no fluxo de electrões ao longo da CTE de modo a recuperar o  $\Delta\psi$ , resultando, por sua vez, num aumento no consumo de  $\text{O}_2$  e, conseqüentemente, um aumento da produção de ERO pela CTE, oxidando cada vez mais as membranas mitocondriais. A perda de integridade da membrana externa mitocondrial permitirá, possivelmente, a libertação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar para o citosol, podendo activar a via intrínseca da apoptose com origem mitocondrial (Susin et al., 1996).

Há uma tendência expressiva para que na presença de salicilato o tempo até ao atingimento da velocidade máxima de *swelling* seja menor, a amplitude de *swelling* seja maior, assim como a taxa média de *swelling* seja superior relativamente aos ensaios efectuados na ausência de salicilato, corroborando com autores que afirmam que o salicilato induz a abertura do PPTM (Bataglia et al., 2005).

Quando comparamos os efeitos protectores do treino de *endurance* e da hipoxia hipobárica relativamente à abertura do PPTM, verificamos que não existem diferenças significativas entre os diferentes grupos, nos parâmetros de *swelling* analisados, provavelmente, segundo a nossa interpretação, devido às variações diárias na preparação do isolamento mitocondrial, podendo ter influenciado a capacidade de carga para a mesma quantidade de adição de  $\text{Ca}^{2+}$ . Contudo, é de destacar que os grupos NE, HS e HE, conseguem manter uma velocidade máxima de *swelling*, na presença de salicilato, semelhante à verificada quando este estímulo deletério não é aplicado. Estes resultados contrastam com o expressivo declínio deste parâmetro no grupo NS, pressupondo, que o treino de *endurance* e a hipoxia hipobárica intermitente

conferem às mitocôndrias hepáticas protecção contra a abertura do PPTM, quando estas são sujeitas a salicilato, um estímulo caracterizado por estimular a abertura do PPTM. Sendo sugerido mais estudos para a melhor compreensão dos efeitos do treino de endurance e da HHI em resposta à indução do PPTM.



## 7 – Conclusões

O presente trabalho fornece conhecimento adicional sobre os efeitos do treino de *endurance* e da hipóxia hipobárica intermitente (HHI) na bioenergética mitocondrial do fígado, na presença e na ausência de salicilato.

Os resultados obtidos parecem mostrar que o programa de treino de *endurance* assim como a hipoxia hipobárica intermitente induzem algumas melhorias na capacidade do sistema fosforilativo das mitocôndrias hepáticas, observável através do consumo de O<sub>2</sub>, bem como em alguns parâmetros relacionados com o  $\Delta\psi$ , na presença e ausência de salicilato, revelando serem efeitos protectores contra a toxicidade hepática induzida por este fármaco.

Apesar do treino de *endurance* e a HHI, em conjunto ou separadamente, revelarem tais resultados em relação ao grupo de controlo, os efeitos aditivos de ambos os estímulos não foram evidentes. Este efeito foi observado aquando da recuperação do  $\Delta\psi$  após adição de ADP, quer na presença e ausência de salicilato.



---

## Referências Bibliográficas

- Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C. (2006) Bioenergetics and the formation of reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci. Dez*; 27 (12), 639-45
- Albano E, Bellomo G, Parola M, Carini R, Dianzani MU. 1991. Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1091, 310–16
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science.
- Alderton WK, Cooper CE, and Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593–615, 2001
- Al Nasser, I. A. (1999). Salicylate-induced kidney mitochondrial permeability transition is prevented by cyclosporin A. *Toxicol. Lett.* 105, 1–8.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457– 65
- Andreyev, A.Y.; Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 70(2), 200-214
- Angulo, P., 2002. Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* 346, 1221– 1231.
- Ankarcrona, M.; Dypbukt, J.M.; Bonfoco, E.; Zhivotivsky, B.; Orrenius, S.; Lipton, S.A.; Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15, 961-973
- Arcos, J.C.; Sohal, R.S.; Sun, S.C.; Argus, M.F.; Burch, G.E. (1968). Changes in ultrastructure and respiratory control in mitochondria of rat heart hypertrophied by exercise. *Exp. Mol. Pathol*, 8 49-65
- Ascensão ,A., Magalhães ,J., Soares , J., Oliveira J., Duarte J. (2002) Exercício e stress oxidativo cardíaco. *Ver. Port. Cardiol* 22(5), 651-678
- Ascensão A, Magalhães J. Soares J., Ferreira R. Neuparth M., Appell H, Duarte J (2005). Cardiac mitochondrial respiratory function and oxidative stress: the role of exercise. *Int J sports med* 26, 258-267
- Ascensão, A., Ferreira, R., Magalhaes, J. (2007). Exercise-induced cardioprotection— biochemical, morphological and functional evidence in wole tissue and isolated mitochondria. *Int. J. Cardiol.* 117(1), 16-30
- Ascensão A., Oliveira-Lumini J., Machado N.G., Ferreira R., Gonçalves I.O, Moreira A.C., Marques F., Sardão V., Oliveira P.J., Magalhães J (2011a). Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats. *Clinical Science* 120, 37-49
- Ascensão A., Oliveira-Lumini J., Oliveira P.J., Magalhães J. (2011b). Mitochondria as a Target for exercise-induced cardioprotection. *Current drug tardeets*, 12, 860-871
- Asemu, G., Neckar, J., Szarszoi, O., Papousek, F., Ostadal, B., Kolar, F., 2000. Effect of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol. Res.* 49, 597–606
- Awtry EH, Loscalzo J. (2000) Aspirin. *Circulation*.101:1206–1218.

- Balaban R.S. (2002). Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol* 34, 1259–1271,
- Baldwin, K.M., Cooke, D.A.; Cheadle, W.G. (1977). Time course adaptations in cardiac and skeletal muscle to different running programs. *J Appl Physiol*, 42 267-272
- Baldwin, K.M.; Fitts, R.H.; Booth, F.W., Winder, W.W. Holloszy, J.O. (1975). Depletion of muscle and liver glycogen during exercise. *Pflugers Arch*, 354 203-212
- Barash, P. & Akhtar, S. (2010). Coronary stents: factors contributing to perioperative major adverse cardiovascular events. *Br J Anesth.* 105 suppl 1:i3-15. Review.
- Battaglia, V., Salvi, M., Toninello, A., (2005). Oxidative Stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria. *The journal of biological chemistry* 280(40), 33864–33872
- Begriche, K., Igoudjil, A., Pessayre, D., Fromenty, B (2006). Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6; 1-28
- Begriche, K., Massart, J., Robin, M., Sanchez, A., Fromenry, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol* 54(4), 773-94
- Benard, G.; Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of mitochondria and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal* 10(8), 1313-42
- Biban C., Tassani V., Toninell A., Siliprandi D., Siliprandi, N., (1995). The alterations in the energy linked properties induced in rat liver mitochondria by acetylsalicylate are prevented by cyclosporine A or  $Mg^{2+}$ . *Biochem Pharmacol.* 8; 50(4):497-500.
- Boluyt M.O.; Brevick, J.L.; Rogers, D.S.; Randall, M.J.; Scalia A.F.; Li Z.B. (2006). Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics* 6, 3154-3169
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B., 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128, 617–630.
- Borras, C.; Sastre, J.; Garcia-Sala, D.; Lloret, A.; Pallardo, F.V.; Vina, J. (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 34(5) 546-552
- Boveris, A.; Navarro, A. (2008). Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free radical biology & medicine* 44, 224-229
- Bowles D.K., Farrar R.P., Starnes J.W. (1992): Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart. *Am J Physiol*, 263:H804–H809
- Broekemeier K.M., Dempsey M.E., Pfeiffer, D.R. (1989) Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Bio Chem.* 264(14):7826-30
- Broekemeier, K. M., and Pfeiffer, D. R. (1995) Inhibition of mitochondrial permeability transition by cyclosporine A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases. *Biochemistry* 34, 16440–16445
- Brookes, P., Yoon, Y., Robotham, J., Anders, M., Sheu, S. (2004). Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287,817-833
- Brookes, P. S. (2005). Mitochondrial H<sup>(+)</sup> leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med* 38(1): 12-23.

- Brown, D. A.; Chicco, A. J.; Jew, K. N.; Johnson, M. S.; Lynch, J. M.; Watson, P. A.; Moore, R. L. (2005) Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J. Physiol.* 569:913–924;
- Brown, G.C., Borutaite, V., (2011). There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells, *Mitochondrion* doi:10.1016/j.mito.2011.02.001
- Browning J.D, Horton J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114, 147–152
- Cadenas, E. (2004). Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med*, 25 (1-2),17-26
- Campo, M.L. (2009) Apoptosis. In Salido G. & Rosado J. (Ed.) Apoptosis: Involvement ROS oxidative stress: Springer.
- Charnock J.S. & Opit L.J. (1962) The effect of salicylate on adenosine-triphosphatase activity of rat liver mitochondria. *Biochem J.* 83, 596-602.
- Choksi, K.B.; Boylston, W.H.; Rabek, J.P.; Widger W.R.; Papaconstantinou, J. (2004) Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochim Biophys Acta.* 1688(2) 95-101
- Chung, Y. M., Bae, Y. S., and Lee, S. Y. (2003) Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 434–442
- Cleeter M.W., Cooper J.M., Darley-Usmar V.M., Moncada S., Schapira A.H. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 345, 50–54
- Cooper C.E., Vollaard, N.B., Choueiri, T., & Wilson, M.T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem soc Trans*, 30(20), 280-285.
- Cooper M., Hausman, E., (2007). The cell A Molecular Approach, *Fifth Edition*.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341 (Pt2) 233-249
- Crompton, M., Virji, S., Ward, J.M. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition por. *Eur J Biochem*, 258 729-735.
- Das A.M. Harris D.A. (1990). Control of mitochondrial ATP synthase in heart cells: inactive to active transitions caused by beating or positive inotropic agents. *Cardiovasc Res* 24: 411–417,
- Day C.P. (2002). Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): where are we now and where are we going? *Gut* 50, 585 588.
- Day CP, James OF. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114, 842–5
- Day CP, Saksena S. (2002). Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 17, S377-384
- Demirel, H. A.; Powers, S. K.; Zergeroglu, M. A.; Shanely, R. A.; Hamilton, K.; Coombes, J.; Naito, H. (2001). Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia–reperfusion in the rat. *J. Appl. Physiol.* 91, 2205–2212
- Di Lisa F., Canton M., Menabò R., Kaludercic N, Benardi P. (2007). Mitochondria and cardioprotection. *Heart Fail Ver.* 12(3-4), 249-60. Review

- Di Meo S, Venditti P. (2001) Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10,125-40
- Ding H.L., Zhu H.F., Dong J.W., Zhu W.Z., Yang W.W., Yang H.T., and Zhou Z.N. (2005). Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia-reperfusion injury. *Acta Pharmacol Sinica* 26, 315–322
- Doi H. & Horie T. (2010). Salicylic acid-induced hepatotoxicity triggered by oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions* 183, 363-368
- Dong J.W., Zhu H.F., Zhu W.Z., Ding H.L., Ma T.M., and Zhou Z.N. (2003). Intermittent hypoxia attenuates ischemia-reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Res.* 13,385–391
- Downey, J. M. (1990). Free radicals and their involvement during longterm myocardial ischemia and reperfusion. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 487–504
- Duchen, M.R. (2004). Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 53, S96.
- Edgar, D. & Trifunovic, A. (2007). Mitochondria: The Dark side. In V. Stocchi (Ed.), *Role of Physical Exercise in Preventing Disease and Improving the Quality of Life*: Springer.
- Enriquez S. & Lemasters J.J. (2004). Role of mitochondrial permeability transition pore in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(12): 2463-72
- Estabrook, R. (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. *Methods Enzymol*, 10, 41-47
- Fariss, M.W., Chan, C.B., Patel, M., Van Houten, B., & Orrenius, S. (2005). Role of mitochondria in toxic oxidative stress, *Mol Interv*, 5(2), 94-111
- Flower, R. J., Moncada, S., and Vane J. R. (1985) in *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Gillman, A. G., Goodman, L. S., Rall, T. W., and Murad, F., eds). 674–715, Pergamon Press, New York
- Frankiewicz-Jozko A., Faff J., Sieradzan-Gabelska B. (1996). Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 74(5),470-4.
- French, J. P., J. C. Quindry, D. J. Falk (2006) Ischemiareperfusion- induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290,H128–H136,
- Fromenty B, Pessayre D. (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 67, 101–154.
- Fuentes-Prior P & Salvesen G.S. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, action and inhibition. *Biochem J.* 384 (Pt2),201-32.
- Garvey, W.T. (2003). The role of uncoupling protein 3 in human physiology. *J Clin Invest.* 111: 438-441
- Gilkerson, R.W.; Selker, J.M.; Capaldi, R.A. (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*, 546, 355-358
- Gonzalez A, Granados MP, Salido GM et al. (2005) H2O2-induced changes in mitochondrial activity in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Mol Cell Biochem* 269,165–173
- Gottlieb, R. A. (2003). Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. *Basic Res. Cardiol.* 98, 242–249
- Gross, G. J.; Peart, J. N. (2003). KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H921–H930

- Gross, E., Sevier, C.S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C.A., Thorpe, C., Fass, D., (2006). Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase *Ero1p*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 299–304.
- Guan T.F., Pritts T.A., Montrose M.H. (2010). Ischemic post-conditioning to counteract intestinal ischemia/reperfusion injury. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 1(14),137-43
- Gunter T. E., Buntinas L., Sparagna G. C. and Gunter K. K. (1998) The Ca<sup>2+</sup> transport mechanisms of mitochondria and Ca<sup>2+</sup> uptake from physiological-type Ca<sup>2+</sup> transients. *Biochem. Biophys. Acta* 1366, 5–15.
- Gunter, T.E.; Buntinas, L.; Sparagna, G.; Eliseev, R.; Gunter, K. (2000). Mitochondrial calcium transport mechanisms and functions. *Cell Calcium*, 28 (5-6): 285-296
- Gutknecht (1990). Salicylates and proton transport through lipid bilayer membranes: a model for salicylate-induced uncoupling and swelling in mitochondria. *J Membr Biol*, 115(3),253-60
- Halestrap (2009). Mitochondrial calcium in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1787(11), 1289-90
- Halestrap A.P., Kerr P.M., Javadov S., Woodfield K.Y. (1998). Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1366, 79–94.
- Hamilton K.L, Powers S.K., Sugiura T., Kim S., Lennon S., Turner N., Mehata J.L. (2001). Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H1346–H1352
- Hamilton, K. L., Staib J. L., Phillips T., Hess A., Lennon S. L., Powers S. K. (2003). Exercise, antioxidants, HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 800–809
- Hamilton, K. L.; Quindry, J. C.; French, J. P.; Staib, J.; Hughes, J.; Mehta, J. L.; Powers, S. K. (2004). MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radic. Biol. Med.* 37,1360–1368
- Hansford R.G., Zorov D. (1998). Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol Cell Biochem* 184, 359–369,
- Hauff, K.D.; Hatch, G. M. (2006). Cardiolipin metabolism and Barth Syndrome. *Prog. Lipid Res., Elmsford*, 45(2) 91-101
- Hausenloy D.J., Maddock H.L., Baxter G.F., Yellon D.M.(2002). Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 55, 534–43.
- Hebbard L., George J. (2010) Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8(1), 35-44
- Hickson, R.C.; Galassi, T.M.; Dougherty, K.A. (1983). Repeated development and regression of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *J Appl Physiol*, 54 794-797
- Hirota S. & Sadoshima J, (2005) Preconditioning effects of PKCdelta. *J Mol Cell Cardiol* 38(4),719-21
- Hlaváckova M., Kozichová K., Neckár J., Kolar F., Musters R., Novak F., Novakova O. (2010). Up-regulation and redistribution of protein kinase C- in chronically hypoxic heart. *Mol Cell Biochem* 345, 271-282
- Hoch, F.L. (1988). Lipids and thyroid hormones. *Prog. Lipid Res., Elmsford*, 27 199-270
- Hoch, F. L (1992). Cardiolipins and biomembranes function. *Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam*, 1113, 71-133

- Holloszy, J.O.; Oscai, L. B.; Don, I.J.; Mole, P.A. (1970). Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: Adaptative response to exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commum*, 40 1368-1373
- Howald, H. and Hoppeler, H. (2003). Performing at extreme altitude: muscle cellular and subcellular adptations. *Eur J Appl Physiol*, 90, 360-4
- Huang C., Lin W., Hsu F., Tsai P., Hou C, (2010) Metabolomics investigation of exercise-modulated changes in metabolism in rat liver after exhaustive and endurance exercises *Eur J Appl Physiol*, 108, 557–566
- Hunter D.R., Haworth R.A. (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 453–59
- Husain K. (2005). Interaction of physical training and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure, nitric oxide, and oxidants/antioxidants in the rat heart. *Pharmacol Res* 3:253–61.
- Imberti R., Nieminen A.L., Herman B., Lemansters J.J. (1993). Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide:protection by fructose, cyclosporine A and trifluoperazine. *J Pharmacol. Exp. Ther*, 265, 392-400
- Inagaki K., Mochly-Rosen D. (2005). DeltaPKC-mediated activation of epsilonPKC in ethanol-induced cardiac protection from ischemia. *J Moll Cell Cardiol.* 39(2), 203-11
- Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, Rezaee M, Yock PG, Murphy E, Mochly-Rosen D (2003) Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation* 108(19), 2304-7
- Ji L.L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 222,283-92
- Ji L.L., Fu R.G., Mitchell E.W., Griffiths M., Waldrop T.G., Swartz H.M. (1994) Cardiac hypertrophy alters myocardial response to ischemia and reperfusion in vivo. *Acta Physiol Scand* 151,279–290
- Kakarla P, Vadluri G, Reddy Kesireddy S. (2005). Response of hepatic antioxidant system to exercise training in aging female rat. *J. Exp. Zoolog. A Comp. Exp. Biol.* 303, 203–208
- Kang D. & Hamasaki, N. (2005). Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles. *Ann N Y Acad Sci*, 1042, 101-8
- Kanter M.M., Hamlin R.L., Unverferth D.V., Davis H.W., Merola A.J. (1985) Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. *J. Appl. Physiol.* 59, 1298–1303
- Kavazis A.N. (2009). Exercise Preconditioning of the Myocardium. *Sports Med*, 39(11): 923-935
- Kavazis A.N.; McClung J.M.; Hood D.A.; Powers S.K. (2008). Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294 (2), H928-35
- Kim JD, Yu BP, McCarter RJ, Lee SY, Herlihy JT (1996) Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. *Free Radie Biol Med* 20, 83-88
- Kingwell, B. A., Arnold, P.J.; Jennings, G.L.; Dart, A.M. (1998). The effects of voluntary running on cardiac mass and aortic compliance in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 16 181-185
- Kolar, F., Jezkova, J., Balkova, P., Breh, J., Neckar, J., Novak, F., Novakova, O., Tomasova, H., Srbova, M., Ostadal, B., Wilhelm, J., Herget, J. (2007). Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H224–H230
- Kopelman, P.G., (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635–643

- Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssière J.L., Mignotte B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J.* 9(13), 1277-87.
- Kroemer G., Galluzi L, Brenner C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87(1), 99-163
- Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. (2008). Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol*, 22, 335–353
- Leeuwenburgh C.; Ji L.L. (1996). Alteration of Glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *The journal of nutrition* 13, 1833-1843
- Lennon S.L, Quindry J., Hamilton K.L., French J., Staib J., Mehta J.L., Powers S.K. (2004) Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *J Appl Physiol* 96 (4), 1299-305
- Lennon S. L., Quindry J. C., French J.P., Kim S., Mehta J.L., Powers S.K. (2004a) Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand* 182 (2), 161-9
- Levine B.D. & Stray-Gundersen J. (1997). "Living high-training low". Effects of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *J Appl Physiol* 83(1):102-12
- Levine B.D. (2002). Intermittent Hypoxic Training: Fact and Fancy. *High altitude medicine & biology* 3(2), 177-193
- Lew H, Quintanilha A (1991) Effects of endurance training and exercise on tissue antioxidative capacity and acetaminophen detoxification. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 16, 59-68
- Magalhaes, J.; Ascensão, A.; Soares, J.M.; Ferreira, R.; Neuparth, M.J.; Marques, F. (2005) Acute and severe hypobaric hypoxia increases oxidative stress and impairs mitochondrial function in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 99(4), 1247-1253
- Mairbaurl, H. (1994). Red blood cell function in hypoxia at altitude and exercise. *Int J Sports Med* 15: 51-63
- Marcil M, Bouduas K, Ascah A, Burell Y. (2006). Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart circ Physiol*, 290(4), H1549-57
- Martens M.E. & Lee C.P. (1984) Reye's syndrome: salicylates and mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol.* 33(18), 2869-79
- McCormack JG and Denton RM. (1993). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and the role of intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of energy metabolism. *Dev Neurosci* 15, 165–173
- McNally, J.S., Davis, M.E., Giddens, D.P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., Jo, H., Harrison, D. G., (2003). Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am. J. Physiol.* 285, H2290–H2297.
- Miwa, S. and M. D. Brand (2003). "Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1300-1301
- Monteiro P., Oliveira P.J., Gonçalves L., Providência L. (2003). Mitocôndrias: Que papel na Insquémia, reperfusão e morte celular? *Ver Port Cardiol* 22 (2), 233-254
- Monti, E., Prosperi, E.; Supino, R.; Bottiroli, G. (1995). Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by Adriamycin in th rat. *Anticancer Res.* 15(1) 193.197

- Murriel C.L., Chuechill E., Inagaki K, Szweda L.I., Mochly-Rosen D. (2004). Protein Kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. *J Biol Chem.* 279(46), 47985-91
- Musi N., Yu H., Goodyear L.J. (2003). AMP-activated protein kinase regulation and action in skeletal muscle during exercise. *Biochem Soc Trans.* 31(Pt1),191-5
- Nadtochiy, S.M., Tompkins, A.J., Brookes, P.S. (2006) Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection. *Biochem J*, 395(3), 611-618
- Navarro, A. ; Gomez, C.; Lopez-Cepero, J.M.; Boveris, A. (2004). Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(3): R505-511
- Neckar, J., Papousek, F., Novakova, O., Ostadal, B., Kolar, F. (2002). Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res. Cardiol.* 97, 161–167.
- Neckar J, Markova I, Novak F, Novakova O, Szarszoi O, Ostadal B, Kolar F. (2005) Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-ε in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1566–H1572
- Neuschwander-Tetri B.A. & Caldwell S.H. (2003). Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single Topic Conference. *Hepatology* 37(5), 1202-19
- Nulton-Persson, A.C.; Szweda, L.I. (2001). Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276(26) 233357-23361
- Nulton-Persson A.C., Szweda L.I., Sadek H.A. (2004). Inhibition of cardiac mitochondrial respiration by salicylic acid and acetylsalicylate. *J Cardiovasc Pharmacol* 44(5), 591-5
- Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL: Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *Faseb J* 2001, 15(6):879-892.
- O'Donnell, V.B., Azzi, A. (1996). High rates of extracellular superoxide generation by cultured human fibroblasts: involvement of a lipid-metabolizing enzyme. *Biochem. J.* 318, 805–812.
- Oh Ki-Wan; Qian T.; Brenner D.A.; Lemasters J.J (2003) Salicylate Enhances Necrosis and Apoptosis Mediated by the Mitochondrial Permeability Transition. *Toxicological Sciences* 73, 44-52
- Oliveira, P. J. (2011). Mitochondria as a drug target in health and disease. *Current drug targets* 12(6): 761.
- Oliveira, P. J. Wallace, K. B. (2006). Depletion of adenine nucleotide translocator protein in heart mitochondria from doxorubicin-treated rats relevance for mitochondrial dysfunction. *Toxicology*, 220 (2-3), 160-168
- Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:143-83
- Paradies, G.; Petrosillo, G.; Pistolese, M., Ruggiero, F.M. (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*, 286(1), 135-141
- Pariante JA, Camello C, Camello PJ et al. (2001) Release of calcium from mitochondrial and nonmitochondrial intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells by hydrogen peroxide. *J Membr Biol* 179:27–35
- Park H., Kaushik V.K., Constant S., Prentki M., Przytkowski E., Ruderman N.B. Saha A.K. (2002). Coordinate Regulation of Malonyl-CoA Decarboxylase, sn-Glycerol-3-phosphate Acyltransferase,

- and Acetyl-CoA Carboxylase by AMP-activated Protein Kinase in Rat Tissues in Response to exercise. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(86) 32571-77
- Pavlov E.V., Priault M., Pietkiewicz D., Cheng E.H., Antonsson B., Manon S., Korsmeyer S.J., Mannella C.A., Kinnally K.W. (2001). A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155(5):725-31
- Perez A.C., Cabral de Oliveira A.C., Estevez E., Molina A.J., Prieto J.G., Alvarez A.I. (2003). Mitochondrial, sarcoplasmic membrane integrity and protein degradation in heart and skeletal muscle in exercised rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 134: 199-206
- Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Cadenas S, Rojas C, and Barja G. (1998). The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol [B]* 168, 149–158
- Pessayre D. (2007). Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 23(3) 501-2
- Pessayre, D., Mansouri, A., Haouzi, D., Fromenty, B. (1999). Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biol. Toxicol.* 15, 367–373.
- Pessayre, D., Berson, A., Fromenty, B., Mansouri, A. (2001). Mitochondria in steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* 21, 57–69
- Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. (2002). Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 282, G193–9
- Pessayre D., Fromenty B., Mansouri A. (2004). Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 16(11) 1095-105
- Pessayre D., Berson A., Fromenty B. (2008). Features and mechanisms of drug-induced liver injury in Drug-induced mitochondrial dysfunction, Janes A.Dykens and Yvone Will (Ed.)
- Pessayre D., Mansouri A., Berson A., Fromenty B. (2010). Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol*, 196, 311–365.
- Petrescu I. & Tarba C. (1997). Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated mitochondria of rat. *Biochim Biophys Acta* 1218(3), 385-94
- Pollack M., Leeuwenburgh C. (2000). Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease. In: CK Sen, L Packer, O Hanninen, eds. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. *Basel: Elsevier Science B.V.*, 881-923
- Powers S.K. & Jackson M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88(4), 1243-76
- Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D., Lieu F.K., Ji L.L., Herb R.A. (1993). Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol* 265, H2094–H2098
- Powers S.K., Demirel H.A., Vincent H.K., Coombes J.S., Naito H., Hamilton K.L., Shanely R.A., Jessup J. (1998). Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol* 275, R1468–R1477
- Powers S.K., Lennon S.L., Quindry J., Mehta J.L. (2002). Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol* 17, 495-502
- Powers S.K., Quindry J, Hamilton K. (2004) Aging, exercise and cardioprotection. *Ann N Y Acad Sci* 1019, 462-70

- Powers S.K. Quindry J.C. Kavazis A.N. (2008). Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biology & Medicine* 44, 193-201
- Quiles, J. L.; Huertas, J.R.; Manas, M.; Ochoa, J.J.; Battino, M.; Mataix, J. (2001). Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. *J Bioenerg Biomembr* 33(2): 127-134.
- Quindry J, Frencj J., Hamilton K, Lee Y, Mehta J.L., Powers S. (2005). Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals. *Exp Gerontol.* 40(5), 416-25
- Radak Z., Chung H.Y., Naito H., Takahashi R., Jung K.J., Kim H.J., Goto S. (2004). Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *Faseb J.* 18, 749–750
- Rafiee P., Shi Y., Kong X., Pritchard K.A., Tweddell J.S., Litwin S.B., Mussato K., Jaquiss R.D., Su J., Baker J.E. (2002). Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation* 106, 239–245
- Ramires PR, Ji LL (2001) Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H679-688
- Romijn J.A. & Pijl H. (2009). The muscle-liver axis: does aerobic fitness induce intrahepatic protection against non-alcoholic fatty liver disease? *J. Physiol.* 587(Pt8), 1637
- Roy, P., Roy, S.K., Mitra, A., Kulkarni, A.P. (1994). Superoxide generation by lipoxygenase in the presence of NADH and NADPH. *Biochim. Biophys. Acta* 1214, 171–179
- Ruderman N.B., Park H., Kaushik V.K, Dean d., Constant S., Prentki M., Saha A.K. (2003). AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol Scand* 178(4), 435-42
- Sakamoto, K.; Goodyear L.J. (2002) exercise Effects on Muscle Insulin Signaling and Action Invited Review: Intravellular signaling in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 93, 369-383
- Salido G.M. (2009) Oxidative stress, intracellular calcium signals and apoptotic process. In apoptosis: involvement of oxidative stress and intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Salido G.M. & Rosado J.A. (Ed.) Springer.
- Sammut, I.A.; Harrison, J.C. (2003) Cardiac mitochondrial complex activity is enhanced by heat shock proteins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(1-2) 110-115
- Sammut, I.A., Jayakumar, J., Latif, N., Rothery, S., Severs, N.J., Smolenski, R.T., Bates, T.E. and Yacoub, M.H. (2001). Heat stress contributes to the enhancement of cardiac mitochondrial complex activity. *Am J Pathol*, 158, 1821-31
- Sanyal A.J., Campbell-Sargent C., Mirshahi F., Rizzo W.B., Contos M.J., Sterling R.K., Luketic V.A., Shiffman M.L., Clore J.N. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120,1183–92
- Segalman, T. Y., and Lee, C. P. (1995) Enhanced induction of the mitochondrial permeability transition following acute menadione administration. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 79–84
- Shidoji, Y.; Hayashi, K.; Komura, S.; Ohishi, N.; Yagi, K. (1999). Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, San Diego, 264(2) 343-347

- Silverman J.F., O'Brien K.F., Long S., Leggett N., Khazanie P.G., Pories W.J., Norris H.T., Caro J.F. (1990). Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 85:1349–55.
- Sílvia L.A., Pinho C.A., Rocha L.C., Tuon T., Silveira P.L., Pinho R. A. (2009). Effect of diferente models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver. *Appl Physiol Nutr Metab* 34:60-65
- Solaini, G., Harris, D. A. (2005). Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem. J.* 390, 377–394
- Somani S.M., Frank S., Rybak L.P. (1995). Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. *Pharmacol Biochem Behav* 51(4), 627-34
- Starkov, A.A.. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* 1147, 37–52
- Starnes J.M., Taylor R.P. (2007). Exercise-induced cardioprotection: endogenous mechanisms. *Med Sci Sports Exerc* 39(9): 1537-43
- Starnes J.W., Taylor R.P., Park Y. (2003) Exercise improves postischemic function in aging hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285(1): H347-51
- Starnes J.W., Taylor R.P., Ciccolo J.T.(2005). Habitual low-intensity exercise does not protect against myocardial dysfunction after ischemia in rats. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 12 (2), 169-74
- Starnes J.W., Barnes B.D., Olsen M.E. (2007) Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca<sup>2+</sup> induced dysfunction. *J Appl Physiol* 102(5), 1793-8.
- Stock D., Leslie A.G., Walker J.E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286(5445),1700-5
- Sun L., Shen W., Liu Z., Guan S., Liu J., Ding S. (2010). Endurance exercise cause mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life sciences* 86, 39-44
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M.; Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A. (1996). Bcl-2 innibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 185(4) 1331-1341
- Suzuki, K., Murtuza, B., Sammut, I.A., Latif, N., Jayakumar, J., Smolenski, R.T., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H. and Yacoub, M.H. (2002). Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity durinh myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation*, 106, I270-6
- Taylor R.P., Harris M.B., Starnes J.W. (1999). Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am J Physiol* 276:H1098–H1102
- Taysi S., Oztasan N., Efe H., Polat M.F., Gumustekin K., Siktar E, Canakci E., Akcay F., Dane S., Gul M.(2008) endurance training attenuates the oxidative stress due ti acute exhaustive exercise in rat liver. *Acta Physiol Hung* 95(4): 337-47
- Terblanche S.E., Gohil K., Packer L., Henderson S., Brooks G.A. (2001). The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (*Rattus norvegicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 128(4), 889-96
- Thyfault, J.P., Rector R.S., Uptergrove G.M., Borengasser S.J. Morris E.M. Wei Y., Laye M.J. Burant C.F., Qi N.R., Ridenhour S.E., Koch L.G., Britton S.L., Ibsah J.A. (2009). Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. *J Physiol.*, 587(pt8): 1805-16

- Togo, K.; Suzuki, Y.; Yoshimaru, T.; Inoue, T.; Terui, T.; Ochiai, T.; Ra, C. (2009). Aspirin and salicylates modulate IgE-mediated leukotriene secretion in mast cells through a dihydropyridine receptor-mediated  $Ca^{2+}$  influx. *Clin. Immunol.* 131, 145–156.
- Tonkonogi, M., Krook, A., Walsh, B, Sahlin, K. (2000). Endurance training increases stimulation of uncoupling of skeletal muscle mitochondria in humans by non-esterified fatty acids: an uncoupling-protein-mediated effect? *Biochem J*, 351 Pt 3, 805-810
- Tornero D, Cena V., González-García C., Jordán J. (2002). The role of the mitochondria permeability transition pore in neurodegenerative processes. *Rev Neurol* 35(4), 354-61.
- Trost, L. C., Lemasters, J. J (1996). The mitochondrial permeability transition: a new pathophysiological mechanism for Reye's syndrome and toxic liver injury. *J Pharmacol Exp Ther* 278(3), 1000-5
- Trost, L. C., Lemasters, J. J. (1997). Role of the mitochondrial permeability transition in salicylate toxicity to cultured rat hepatocytes: Implications for the pathogenesis of Reye's syndrome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 431–44
- Tsujimoto Y., Shimizu S. (2007) Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*, 12(5) 835-40
- Turcotte, L.P. (2003). Mitochondria: biogenesis, structure, and function-symposium introduction. *Med Sci Sport Exerc*, 35(1) 82-85
- Urso M.L., Clarkson P.M. (2003). Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189(1-2) 41-54
- Vanden Hoek T.L., Becker L.B., Shao Z., Li C., Schumacker P.T. (1998). Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273, 18092-8.
- Venditti, P, Di Meo, S. (1996) Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys* 331, 63-68
- Venditti, P.; Massullo, P.; Di Meo, S. (1999). Effects of exercise duration on characteristics of mitochondrial population from rat liver. *Archives of biochemistry and biophysics*. 368(1) 112-120
- Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102(1) 43-53.
- Vigano M, Vergani A, Trombini P, Paleari F, Piperno A. (2000) Insulin resistance influence iron metabolism and hepatic steatosis in type II diabetes. *Gastroenterology* 118, 986–7.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15(22), 2922-175
- Weiss J.N., Korge P., Honda H.M, Ping P. (2008). Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res*. 93:292-301
- Wen, H.C., Lee, C.C., Lee, W.C., Huang, K.S. and Lin, M.T. (2002). Chronic hypoxia preconditioning increases survival in rats suffering from heatstroke. *Clin ExpPharmacol Physiol*, 29, 435-40
- Willet, K., Detry, O.; Lambermont, B.; Meurisse, M.; Defraigne, J. O. Sluse-Goffart, C. (2000). Effects of cold and warm ischemia on the mitochondrial oxidative phosphorylation of swine lung. *Transplantation*, 69 (4), 582-588
- Woodfiel K., Ruck A., Brdiczka D, Halestrap A.P.(1998). Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J*. 336(pt2) 287-90

- Wu K.K. (2000). Aspirin and salicylate: An old remedy with a new twist. *Circulation*, 102, 2022–2023.
- Xie Y., Zhu W.Z., Zhu Y., Chen L., Zhou Z.N., Yang H.T. (2004). Intermittent high altitude hypoxia protects the heart against lethal  $Ca^{2+}$  overload injury. *Life Sci* 76, 559–72.
- Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M., Kuzuya T., Hori M. (1999) Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 189, 1699–1706
- Yen, H.C.; Oberley, T.D.; Vichitandha, S.; Ho, Y. S.; St Clair, D. K. (1996). The protective role of manganese superoxide dismutase against Adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest*, 98 (5), 1253-1260
- Zamzami N. & Kroemer G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(1), 67-71
- Zhang Y., Zhong N., Gia J., and Zhou Z. (2004). Effects of chronic intermittent hypoxia on the hemodynamics of systemic circulation in rats. *Jpn. J. Physiol.* 54, 171–174
- Zhang, Y. Zhong, N.; Zhou Z. (2010). Effects of chronic intermittent hypobaric hypoxia on the L-type calcium current in rat ventricular myocytes. *High altitude medicine & biology* 11(1) 61-67
- Zhong N., Zhang Y., Fang Q.Z., and Zhou Z.N. (2000). Intermittent hypoxia exposure-induced heat-shock protein 70 expression increases resistance of rat heart to ischemic injury. *Acta Pharmacol. Sinica* 21, 467–472
- Zhong N., Zhang Y., Zhu H.F., Zhou Z.N. (2000a). Intermittent hypoxia exposure prevents mtDNA deletion and mitochondrial structure damage produced by ischemia/reperfusion injury. *Sheng Li Xue Bao*, 52, 375–80.
- Zhu H.F., Dong J.W., Zhu W.Z., Ding H.L., and Zhou Z.N. (2003). ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 73,1275–1287
- Zhu W.Z., Dong J.W., Ding H.L., Yang H.T., Zhou Z.N. (2004). Postnatal development in intermittent hypoxia enhances resistance to myocardial ischemia/reperfusion in male rats. *Eur J Appl Physiol* 91, 716-722
- Zhu W.Z., Xie Y., Chen L., Yang H.T., and Zhou Z.N. (2006). Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. *J. Mol. Cellular Cardiol.* 40, 9–106
- Zoratti M., Szabò I, De Marchi U. (2005). Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta* 1706(1-2),40-52
- Zweier, J. L.; Talukder M. A. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 70,181–190