



Efeito do envelhecimento na resposta *in vitro* de mitocôndrias renais à disfunção induzida por salicilato

Dissertação apresentada com vista à obtenção do 2º ciclo em Atividade Física para a Terceira Idade, da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto ao abrigo do Decreto de Lei nº.74/2006 de 24 de Março

Orientadores: Prof. Doutor António Ascensão e Prof. Doutor José António Lumini

Autora: Olinda Patrícia Ferreira da Silva

Porto, Setembro 2013

Ficha de catalogação

Silva, Olinda P. F. (2013). *Efeito do envelhecimento na resposta in vitro de mitocôndrias renais à disfunção induzida por salicilato*. Porto: O. P. F. Silva. Dissertação de Mestrado em Atividade Física para a Terceira Idade apresentada à Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

Palavras-Chave: ENVELHECIMENTO, BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, TOXICIDADE RENAL, SALICILATO.

Este trabalho foi elaborado no âmbito do projeto PTDC/DES/113580/20092009-FCOMP-01-0124-FEDER-014705 financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia e com o apoio do Centro de Investigação em Atividade Física Saúde e Lazer Unidade I&D (Pest OE/SAU/UI0617/2011).

FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional



À minha avó...
À minha mãe...
Por tudo...

Agradecimentos

Esta longa e difícil caminhada não podia ter sido realizada sozinha, todo este trabalho só foi possível com a ajuda e apoio de pessoas tão importantes para mim e que estiveram sempre do meu lado. Por tudo isto agradeço:

Aos meus orientadores, Prof. Doutor António Ascensão e Prof. Doutor José António Lumini pela partilha de conhecimentos, disponibilidade, apoio e compreensão sempre presentes.

À Sílvia Rodrigues pela ajuda incondicional, no esclarecimento de dúvidas e na realização escrita deste documento, obrigada pela preocupação, paciência e pelas horas de estudo que “perdeste” comigo.

À equipa de laboratório, Prof. Doutor José Magalhães, Inês Aleixo, Estela Alves, Pedro Coxito, Inês Gonçalves, Emanuel dos Passos pela preparação e realização de todo o trabalho experimental.

Ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto pela colaboração e ajuda nas análises sanguíneas.

Ao Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra pela colaboração ao longo destes anos, em especial pela cedência de eléctrodos para este protocolo experimental.

À Célia que me incentivou a iniciar este trabalho, pela amizade e estímulo durante todo este percurso.

À Inês que apesar de longe está sempre comigo, obrigada pelo ombro amigo...

À Vânia sempre pronta a ajudar, obrigada pela amizade e apoio.

À Sala de Convívio Beata Alexandrina, à Ritinha, a todos os voluntários e utentes, obrigada pelo carinho e apoio.

A todos os elementos da minha família, obrigada pela confiança, pelo incentivo pela preocupação.

Aos meus avós, e em especial à minha avó, onde quer que esteja eu sei que está sempre comigo...

Por fim um agradecimento especial aos meus pais e à minha irmã, por ser quem sou, pela educação, pelo exemplo de vida, obrigada por tudo.

Obrigada a todos aqueles que de uma forma ou de outra estiverem sempre presentes durante esta caminhada.

Índice Geral

Índice Geral.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas	viii
Resumo	ix
Abstract.....	xi
Abreviaturas e símbolos.....	xiii
1. Introdução.....	1
2. Revisão da literatura.....	3
2.1. Mitocôndria.....	3
- <i>Produção de energia.....</i>	<i>4</i>
- <i>Mitocôndria, espécies reativas de oxigênio e stress oxidativo.....</i>	<i>5</i>
- <i>Mitocôndria e regulação do cálcio.....</i>	<i>6</i>
- <i>Morte celular com origem e associação mitocondrial</i>	<i>8</i>
- <i>Importância da mitocôndria enquanto sensor de toxicidade, disfunção celular e tecidual</i>	<i>10</i>
2.2. Função renal e patologias associadas.....	11
2.3. Envelhecimento e declínio funcional	13
- <i>O papel da mitocôndria durante o envelhecimento.....</i>	<i>15</i>
2.4. Toxicidade renal no envelhecimento induzida por drogas	16
2.5. O papel “protetor” do exercício físico.....	19
3. Objetivos.....	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. Metodologia	23
4.1. Caracterização da amostra.....	23

4.2. Protocolo experimental	23
4.2.1. Sacrifício dos animais, extrações do plasma e do rim	23
4.2.2. Isolamento de mitocôndrias de rim	23
4.2.3. Atividade respiratória mitocondrial.....	24
4.2.4. Potencial eléctrico transmembranar mitocondrial	25
4.2.5. Swelling mitocondrial durante a indução do MPTP.....	26
4.2.6. Parâmetros de dano e stress oxidativo mitocondrial	26
4.3. Procedimentos estatísticos	28
5. Resultados	29
6. Discussão dos resultados	33
7. Conclusões	39
8. Referências bibliográficas	41

Índice de Figuras

Figura 1: Efeito combinado do envelhecimento e da presença de salicilato na suscetibilidade das mitocôndrias de rim à indução do MPTP por cálcio	32
---	----

Índice de Tabelas

Tabela I: Caracterização dos animais.....	29
Tabela II: Efeito do envelhecimento sobre os parâmetros de consumo de oxigénio nas mitocôndrias renais isoladas na presença e ausência de salicilato	30
Tabela III: Efeito do envelhecimento sobre os parâmetros do potencial eléctrico transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e da fosforilação do ADP <i>lag phase</i> das mitocôndrias renais isoladas na presença e ausência de salicilato.....	31
Tabela IV: Atividades da aconitase e superóxido dismutase mitocondrial e do conteúdo mitocondrial de grupos sulfidril e malondealdeído	32

Resumo

O envelhecimento e os efeitos colaterais induzidos por drogas podem contribuir para a degradação da bioenergética mitocondrial em muitos tecidos, incluindo o rim. Presume-se que a combinação do envelhecimento com a toxicidade de fármacos acelera o processo de degradação mitocondrial, levando à progressiva degradação bioenergética. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito do envelhecimento na resposta mitocondrial renal *in vitro* à disfunção induzida por salicilato.

Foram utilizados ratos Wistar macho (8 adultos com 19 semanas e 8 idosos com 106 semanas). Avaliámos *in vitro* a resposta mitocondrial de rim na presença e ausência de salicilato nos seguintes parâmetros: taxa de consumo de oxigénio, o potencial elétrico transmembranar e a suscetibilidade à abertura do poro de permeabilidade transitória (MPTP) induzido pelo cálcio. Foram igualmente avaliadas a atividade da aconitase e da MnSOD e o conteúdo de grupos sulfidril e de malondealdeído.

O envelhecimento induziu uma diminuição do consumo de oxigénio durante o estado 3 e a resistência ao MPTP observado pela diminuição do “tempo até $V_{máx}$ ”. Não foram encontradas alterações significativas nos marcadores de lesão oxidativa. A presença de salicilato aumentou o estado 2 respiratório e diminuiu o estado 3 e o RCR.

Os dados sugerem que o envelhecimento comprometeu a funcionalidade mitocondrial do rim. Contudo, o salicilato não promoveu deterioração adicional bioenergética mitocondrial renal nos animais idosos.

Palavras-chave: ENVELHECIMENTO, BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, TOXICIDADE RENAL, SALICILATO.

Abstract

Aging and drug-induced side effects may contribute to the deterioration of mitochondrial bioenergetics in many tissues, including the kidney. It is presumed that the combination of aging with the toxicity of medications accelerates the process of mitochondrial degradation, leading to progressive bioenergetics disruption. Therefore, the aim of this study was analyzing the effect of aging in the response of mitochondrial renal in vitro to the dysfunction induced by salicylate. Male-Wistar adults (19-wks) and aged (106-wks) rats were used. In vitro endpoints of oxygen consumption and membrane potential were evaluated in non-treated conditions (vehicle) and in the presence of salicylate (0.5mM) and diclofenac (50 μ M). The susceptibility to calcium- induced permeability transition pore (MPTP) was assessed. Aconitase and MnSOD activities and the content of sulfhydryl and malondialdehyde groups were measured.

The aging led to a decrease in the oxygen consumption during state 3 and the resistance to MPTP observed by the decrease of “time to $V_{m\acute{a}x}$ ”. We found no significant alterations in oxidative damage markers. Salicylate increased state 2 and decreased state 3 and the RCR.

These data suggest that aging compromised renal mitochondrial function. However, the salicylate did not promote mitochondrial renal bioenergetics additional deterioration in the elderly animals.

Keywords: AGING, MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS, RENAL TOXICITY, SALICYLATE.

Abreviaturas e símbolos

ADP	Adenosina difosfato
AIF	Fator indutor de apoptose
ALT	Alanina aminotransferase
Apaf-1	Fator de ativação da protease apoptótica
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro de boi
Ca²⁺	Ião cálcio
Cox	Cicloxigenase
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EGTA	Ácido etileno glicol tetracético
ETC	Cadeia transportadora de elétrons
FADH₂	Dinucleótido de flavina e adenina
G/M	Glutamato malato
GGT	Gama glutamil transferase
GPT	Glutamato piruvato transaminase

H⁺	Iões hidrogénio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
MDA	Malondealdeído
MPTP	Poros de permeabilidade transitória mitocondrial
NADH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NSAIDs	Anti-inflamatórios não esteroides
O₂	Oxigénio
RCR	Rácio de controlo respiratório
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SOD	Superóxido dismutase
TPP⁺	Tetrafenilfosfónio
VDAC	Canal iónico dependente de voltagem
$\Delta\Psi_m$	Variação de potencial de membrana
μM	Micromolar

1. Introdução

Mesmo na inexistência de doença, o envelhecimento por si só está relacionado com a falência e diminuição da funcionalidade de vários órgãos, incluindo o rim (Schmitt & Cantley, 2008), um tecido metabólico bastante ativo e com elevado gasto energético. Várias têm sido as teorias propostas para explicar este fenómeno do envelhecimento biológico sendo que a mais referida é a “teoria dos radicais livres”. Esta teoria sugere que pequenas quantidades de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e nitrogénio são produzidas na mitocôndria como subprodutos do fluxo de eletrões através da cadeia transportadora de eletrões (ETC, do inglês *electron transport chain*) levando a uma alteração gradual oxidativa de lípidos das membranas celulares, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), as quais se traduzem em alterações fenotípicas que caracterizam o envelhecimento (Sastre et al., 2003). Estas alterações, colocam as mitocôndrias como principais organelos celulares responsáveis por muitos dos mecanismos implicados na progressão da disfunção relacionada com a idade em vários tecidos, incluindo o rim (Skulachev et al., 2009).

Apesar de estudos sugerirem a inexistência de alterações funcionais nas mitocôndrias de fígado e do rim com o envelhecimento (Ferreira et al., 2003), outros observaram sinais de dano estrutural, bioquímico e funcional de mitocôndrias renais. Entre as principais alterações, observaram-se danos no sistema fosforilativo com consequentes deficiências nos índices respiratórios e na produção de adenosina trifosfato (ATP), bem como o aumento da suscetibilidade à abertura do poro de permeabilidade transitório mitocondrial (MPTP, do inglês *mitochondrial permeability transition pore*) induzida pelo ião cálcio (Ca^{2+}) (Goodell & Cortopassi, 1998; O'Toole et al., 2010; Serviddio et al., 2007).

Para além do envelhecimento, a funcionalidade mitocondrial pode ser afetada por outros agentes, incluindo fármacos clinicamente utilizados. O comprometimento da funcionalidade mitocondrial induzido por estes agentes tem sido uma preocupação que levou à retirada de alguns fármacos com

comprovada eficácia terapêutica mas associados a danos secundários (Sardao et al., 2008).

De facto, como consequência do processo de envelhecimento ou de patologias associadas, o recurso a fármacos é uma prática recorrente e por vezes inevitável. O salicilato é um exemplo dos fármacos mais utilizados pelos idosos, devido à sua ação analgésica e anti-inflamatória. Contudo, tem sido descrito que este composto tem um impacto negativo na função mitocondrial do rim ao nível do sistema fosforilativo, aumentando a suscetibilidade à abertura do MPTP, a sinalização apoptótica, e o stress oxidativo (Al-Nasser, 1999; Battaglia et al., 2005; Pigoso et al., 1998; Trost & Lemasters, 1997; Uyemura et al., 1997).

Do nosso conhecimento, não se sabe ainda qual a resposta mitocondrial de rim de ratos idosos à presença deste fármaco comparativamente à dos adultos jovens. Assim sendo, o nosso objetivo foi analisar a resposta “*in vitro*” de mitocôndrias isoladas de rim de ratos idosos e adultos na presença de salicilato. A hipótese avançada é que as mitocôndrias do grupo dos idosos são mais afetadas na presença de salicilato quando comparadas com os seus homólogos adultos jovens.

2. Revisão da literatura

2.1. Mitocôndria

Ao analisarmos a definição clássica dos livros de biologia celular e molecular, verificamos que estes nos descrevem as mitocôndrias como sendo um organelo celular com um comprimento aproximadamente de 1 a 2 micromolares (μM) e largura de 0,5 a 1 μM , constituídas por duas membranas, uma externa e uma interna, um espaço intermembranar e uma matriz mitocondrial (Azevedo, 2005). A membrana interna possui cristas que são invaginações que a torna mais extensa do que a externa (Mannella, 2008). Na matriz mitocondrial podemos encontrar importantes enzimas que metabolizam o piruvato e os ácidos gordos para produzir a acetil-coenzima A, e as enzimas responsáveis pelo ciclo de Krebs, β -oxidação e da ETC (Azevedo, 2005; Mannella, 2008). Adicionalmente, as mitocôndrias possuem um genoma próprio circular com transcrição mitocondrial-específica (Wallace, 1999).

Ao longo do tempo, as mitocôndrias têm sido alvo de estudo por vários autores e o seu entendimento sobre os aspetos estruturais e funcionais têm sofrido várias alterações.

Relativamente à sua origem, pensa-se que terão surgido acerca de 1,5 bilhões de anos atrás a partir de uma associação simbiótica entre uma célula glicolítica proto-eucariótica e uma bactéria oxidativa (Wallace, 1999).

No início do século XX, alguns autores demonstraram que as mitocôndrias tinham um papel relevante na transmissão da informação genética, tendo também sido sugerido que este organelo estaria associado à respiração celular o que fez aumentar o interesse pela hipótese de transmissão genética (Scheffler, 1999). Alguns anos de investigações conduziram à noção maioritária das mitocôndrias como “fábricas” de produção de energia celular, “*powerhouse of the cell*” (A. A. Ascensao et al., 2005; Labbe et al., 2008; Mannella, 2008; Psarra & Sekeris, 2009; Scheffler, 1999), gerando assim mais de 90% das suas necessidades energéticas (Dyken & Will, 2008; Psarra & Sekeris, 2009; Wallace, 1999) a partir da oxidação dos nutrientes.

Evidências sugeriram que os defeitos no DNA mitocondrial podem ser, pelo menos em parte, a base das doenças mitocondriais, enquanto que outros estudos reconheceram o importante papel das mitocôndrias na iniciação e execução da morte celular. Além disso, as mitocôndrias podem ser alvos da toxicidade, primários ou secundários, de muitos fármacos com ação terapêutica, sendo por isso consideradas importantes sensores de toxicidade da célula e dos tecidos (Dykens & Will, 2008).

Atualmente, às mitocôndrias são atribuídas funções essenciais na produção de energia, no controle do estado redox e pH, homeostasia do Ca^{2+} e nos mecanismos de sinalização e de morte celular (Ascensão et al., 2011; Kuznetsov & Margreiter, 2009; Lumini-Oliveira et al., 2010; Wallace, 1999), atuando também como sensores de toxicidade celular e tecidual.

Perante as distintas funções progressivamente descobertas, a exclusiva denominação de “centrais energéticas”¹ foi afastada, dando lugar à nova imagem misteriosa de “Caixa de Pandora”², sendo vistas como o organelo que determina o destino de uma célula (Lyamzaev et al., 2004).

- Produção de energia

De uma forma geral, o metabolismo aeróbio de todas as mitocôndrias tem como ponto inicial de convergência, a produção de acetil-coenzima A (Azevedo, 2005). Este composto associa-se ao oxaloacetato formando citrato que é o primeiro composto do ciclo de Krebs. Este ciclo tem lugar na matriz mitocondrial e nele atuam várias enzimas em sucessivas reações de oxidação e redução gerando equivalentes reduzidos, como o dinucleótido de nicotinamida-adenina (NADH) e o dinucleótido de flavina e adenina (FADH_2), essenciais para a síntese de ATP (Pessayre et al., 2010; Yap et al., 2009). A oxidação destas moléculas fornece elétrons aos complexos I e II da ETC, que utiliza essa energia para bombear prótons para o espaço intermembranar (Ascensão et al., 2011; Ballard & Whitlock, 2004; Yap et al., 2009). Enquanto os elétrons são transferidos entre os complexos cria-se um gradiente

¹ Fornecimento de energia (ATP).

² Origem de todos os males.

eletroquímico. Este gradiente é essencial à manutenção de inúmeras funções celulares mitocondrio-dependentes e na presença de adenosina difosfato (ADP), leva à síntese de ATP no complexo V (ATP sintase).

- Mitocôndria, espécies reativas de oxigénio e stress oxidativo

No decorrer dos processos de transferência de eletrões na ETC produzem-se radicais livres e outras espécies reativas não radicais (A. A. Ascensao et al., 2005; Ballard & Whitlock, 2004; Wallace, 1999). Os radicais livres são moléculas e átomos com eletrões desemparelhados numa das suas órbitas externas (Ascensão et al., 2011; Ascensao et al., 2003; Penna et al., 2009; Turrens, 2003). Esta condição confere-lhes instabilidade e reatividade bioquímica. Para que estes readquiram a estabilidade, interagem com substâncias não-radicaais, ao cederem o eletrão desemparelhado a uma molécula estável, formando assim um radical reduzido, ou recebendo um eletrão formando um radical oxidado (Ascensao et al., 2003). Em função do átomo base a que se liga o eletrão, os radicais são denominados de ROS ou de nitrogénio, sendo que as ROS são formadas em maior número devido à elevada dependência da maioria das células a esta molécula (Ascensao et al., 2003; Penna et al., 2009). Se por um lado, estes compostos são essenciais no controlo e ativação da sinalização celular, orquestrando uma variedade regulada de respostas celulares de forma a ativar programas de sobrevivência, por outro lado podem dar origem a subprodutos indesejáveis com ação tóxica para as nossas células em concentrações elevadas (Tota et al., 2009).

Em condições fisiológicas, a produção de ROS é mantida num estado de equilíbrio redox pela atuação dos sistemas antioxidantes, os quais neutralizam parte destes compostos (Silva & Coutinho, 2010). Todas as células possuem um conjunto de enzimas antioxidantes endógenas, das quais a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase e a glutathione redutase são as mais referidas. Este sistema quando atua em cooperação impede, essencialmente, a acumulação do radical superóxido e do peróxido de hidrogénio entre outros radicais (Dekkers et al., 1996). A SOD age

transformando os dois íons radicais superóxidos em um peróxido de hidrogénio e existem 3 isoformas dependendo do metal associado, cobre e zinco presentes no citoplasma das células eucariotes e a manganês na matriz mitocondrial. A glutathione peroxidase é uma enzima localizada no citosol e na matriz mitocondrial que reduz o peróxido de hidrogénio utilizando a glutathione, esta atua como substrato da glutathione peroxidase possuindo propriedades de dador de eletrões e poderá ser regenerada através da glutathione reductase com transferência de hidrogénio da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*). A catalase age sobre o peróxido de hidrogénio transformando-o em água e oxigénio (O₂).

Para além deste sistema, existem outros antioxidantes designados por “não-enzimáticos” que incluem as vitaminas A, C e E, os flavonóides, a ubiquinona, ácido úrico, bilirrubina, ferritina e alguns micronutrientes (ferro, zinco, cobre, selénio e magnésio) que podem atuar como co-fatores enzimáticos (Dekkers et al., 1996).

Contudo, em situações patológicas ou stress orgânico / tecidual / celular e comportamental, este equilíbrio é perturbado, quer por um aumento da concentração de ROS quer por uma diminuição na atividade de um ou mais sistemas antioxidantes, levando a uma situação designada por stress oxidativo adicional (Ascensao et al., 2003; Droge, 2002).

- Mitocôndria e regulação do cálcio

Para além da produção de energia, as mitocôndrias exercem um importante papel na regulação da homeostasia do Ca²⁺ intracelular. No entanto, sabe-se que esta regulação não é apenas executada pelas mitocôndrias mas também pelo retículo endoplasmático, o principal reservatório intracelular deste íon (Friel, 2000). O Ca²⁺ é libertado do retículo endoplasmático para o citoplasma, sendo uma parte deste Ca²⁺ captado pelas mitocôndrias de forma a evitar a propagação de ondas de Ca²⁺. Quando as concentrações de Ca²⁺ no citosol são elevadas, este é captado pelas mitocôndrias na tentativa de

restauro da homeostasia citosólica (Ascensão et al., 2011). Este processo é dependente da energia eletroquímica fornecida pela diferença de potencial elétrico membranar ($\Delta\Psi_m$), sendo este potencial estabelecido pelo bombeamento de prótons para fora da matriz mitocondrial, o qual é dependente da cadeia respiratória (Feissner et al., 2009).

A passagem do Ca^{2+} pela membrana externa mitocondrial é realizada através dos canais iónicos dependentes de voltagem (VDAC, do inglês *voltage-dependent anion channel*), que regulam a captura e a libertação do Ca^{2+} do citosol para o espaço intramembranar (Gincel et al., 2001). Por outro lado, dado o facto da membrana interna ser relativamente impermeável, existem vários mecanismos responsáveis quer pelo influxo quer pelo efluxo de Ca^{2+} através desta membrana (Gunter et al., 2000; O'Rourke, 2007). Para baixas concentrações de Ca^{2+} é ativado o canal uniporter que, apesar, de ser mais lento é a principal via de transporte de Ca^{2+} . Quando as concentrações de Ca^{2+} citosólico são elevadas, é ativado o modo rápido de absorção de Ca^{2+} , mecanismo que facilita a resposta rápida a eventos celulares dependentes de Ca^{2+} (Gunter et al., 2000). A captação de Ca^{2+} por este mecanismo é pelo menos 300 vezes mais rápida do que pelo sistema uniporter, contudo é inibida muito rapidamente, enquanto que a captação pelo uniporter continua a operar num tempo prolongado (Gunter et al., 2000). O terceiro mecanismo é reconhecido como associado à atividade do recetor de rianodina (Brookes et al., 2004). Por outro lado, existem três mecanismos de mediação de libertação do Ca^{2+} , um deles está associado ao aumento da permeabilidade da membrana e os outros dois referidos como dependentes ou independentes de sódio (Gunter et al., 2000). As concentrações mitocondriais de Ca^{2+} , em níveis fisiológicos, revestem-se de enorme importância para o funcionamento da bioenergética celular. Efetivamente, a captação de Ca^{2+} modela a função mitocondrial numa variedade de formas, aumentando a capacidade de captação de substratos (Satrustegui et al., 2007) e subsequente aumento da atividade do ciclo de Krebs, ao mesmo tempo que reforça a atividade da ATP sintase (Jouaville et al., 1999; Territo et al., 2000).

Em condições patológicas, tem sido descrito que concentrações elevadas de Ca^{2+} podem sobrecarregar a capacidade de tamponamento das mitocôndrias (Holmuhamedov et al., 2001). Em consequência, as membranas mitocondriais podem sofrer um aumento da permeabilidade resultando numa situação favorável para a formação de canais proteicos amplamente descritos na literatura como poro transitório de permeabilidade. A abertura destes canais permite o movimento de moléculas com massas moleculares até 1500Da pela abertura do MPTP (Crompton, 1999) o que poderá ter consequências celulares catastróficas, como a dissipação do gradiente protónico mitocondrial, libertação de citocromo c e, conseqüente, morte celular via apoptose (Feissner et al., 2009).

- Morte celular com origem e associação mitocondrial

A apoptose é um mecanismo fisiológico de morte celular altamente programado e regulado (Hengartner, 2000; Tsang et al., 2003; Tsujimoto & Shimizu, 2007). Assim, pode se tornar num mecanismo importante nos organismos multicelulares uma vez que se encontra relacionado com o *turnover* celular.

A apoptose está associada a um conjunto distinto de mudanças bioquímicas e físicas que envolvem coordenadamente o núcleo, o citoplasma e a membrana plasmática (Lawen, 2003). Durante este processo, ocorre uma diminuição do tamanho da célula, condensação nuclear, ativação das caspases, invaginação da membrana plasmática, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos, que poderão ser assimilados e fagocitados por células vizinhas (Wilson, 1998). Uma vez que os corpos apoptóticos são cercados por uma membrana plasmática intacta, a apoptose ocorre geralmente sem libertação do conteúdo da célula e sem inflamação associada, ao contrário da necrose, na qual a célula dilata e se desintegra de forma desordenada, levando à destruição dos organelos celulares e, por fim, à rutura da membrana plasmática e libertação do conteúdo celular (Wilson, 1998).

Apesar de outras vias estarem referenciadas e da extrema interconexão regulatória entre elas, a apoptose é geralmente regulada por duas vias de sinalização (Green & Evan, 2002; Hood et al., 2003). A normalmente designada por extrínseca encontra-se associada à ativação dos recetores de morte pela ligação extracelular específica a recetores de membrana como o Fas e o fator de necrose tumoral (Lawen, 2003). A designada via intrínseca inclui duas vias, a via mitocondrial e a do retículo endoplasmático (Childs et al., 2002; Lawen, 2003; Servais et al., 2008). A apoptose via mitocondrial está associada a um aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais com consequente libertação de várias proteínas do espaço intermembranar para o citoplasma, nomeadamente moléculas apoptogénicas tais como o citocromo c, Smac/Diablo, HtrA2/Omi, fator indutor de apoptose (AIF, do inglês *apoptosis inducing factor*) e DNaseG (Green & Evan, 2002; Tsujimoto, 2003). Uma vez no citoplasma, o citocromo c liga-se ao Apaf-1 (do inglês, *apoptotic protease activating factor-1*) formando o designado apoptossoma, seguindo-se a ativação da caspase 9, que consequentemente ativa a caspase 3 (Desagher & Martinou, 2000; Servais et al., 2008; Tsujimoto, 2003). A Smac/Diablo e a HtrA2/Omi inibem a atividade das proteínas anti-apoptóticas, facilitando a ativação das caspases. Já o AIF e a DNaseG funcionam como um estímulo apoptótico parecendo ser responsáveis pela condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Ravagnan et al., 2002). A síntese de proteínas apoptóticas da família Bcl-2, associadas à sua translocação para a membrana mitocondrial conduz, pelo menos parcialmente, à criação de condições para a formação do MPTP. Este pode ainda ocorrer devido a vários estímulos, como a produção adicional de ROS e/ou o aumento do Ca^{2+} intramitocondrial (Hood et al., 2003; Pessayre et al., 2010), regulando a libertação de citocromo c do espaço intramembranar para o citosol (Desagher & Martinou, 2000; Hengartner, 2000). Moléculas anti-apoptóticas da mesma família como é o caso da Bcl-2 e Bclx e moléculas pró-apoptóticas como a Bax, Bad, Bid e a Bim têm um papel decisivo na regulação da apoptose (Desagher & Martinou, 2000). Além da Bcl-2, também as proteínas de choque térmico HSP70 (do inglês, *heat shock protein*) têm sido descritas como importantes moléculas com ação anti-

apoptótica. Estas encontram-se no citosol e na mitocôndria e parecem inibir a libertação de AIF bem como a formação de apoptossomas via Apaf-1 (Hood et al., 2003).

As vias de sinalização (intrínseca e extrínseca) previamente referidas, convergem num ponto comum, a ativação de proteínas efetoras designadas por caspases (Servais et al., 2008). Estas subdividem-se em iniciadoras, dentro das quais identificam-se as caspases 2, 8, 9 e 10 e as caspases efetoras a 3, 6 e 7, sendo que as caspases iniciadoras se ligam às efetoras e estas aos substratos celulares (Lawen, 2003).

- Importância da mitocôndria enquanto sensor de toxicidade, disfunção celular e tecidual

Desde que a disfunção mitocondrial foi documentada, o papel crucial da mitocôndria na saúde e na doença tem sido bem descrito. (Duchen et al., 2008). Efetivamente, vários estudos reportaram a disfunção mitocondrial associada a várias patologias, tais como: diabetes *mellitus*, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), isquemia e reperfusão cardíaca, cancro, entre outras (Hall & Unwin, 2007). Mais recentemente, os fármacos emergiram como a maior causa da disfunção mitocondrial, o que pode explicar os diversos efeitos secundários observados em diferentes indivíduos (Neustadt & Pieczenik, 2008). As mitocôndrias podem ficar comprometidas direta e indiretamente pela ação dos fármacos. Estudos documentaram que algumas drogas podem inibir diretamente a transcrição do DNA mitocondrial dos complexos da ETC, enzimas necessárias à β -oxidação e podem interferir indiretamente via produção de radicais livres, diminuindo os antioxidantes endógenos como a glutatona e diminuindo alguns nutrientes importantes na função de enzimas mitocondriais (Neustadt & Pieczenik, 2008). Sendo as mitocôndrias as principais produtoras de energia da célula, uma perturbação no seu normal funcionamento poderá resultar na falência destes organelos com consequências catastróficas para a célula (Dyken & Will, 2008).

Do ponto de vista experimental, as mitocôndrias têm sido utilizadas como importantes sensores de toxicidade celular para entender possíveis mecanismos subjacentes ao dano mitocondrial induzidos pelos medicamentos e outros agentes tóxicos e, assim, ser possível desenvolver estratégias que atenuem esses potenciais efeitos tóxicos (Dykens & Will, 2008).

2.2. Função renal e patologias associadas

Os rins são órgãos que possuem três partes anatomicamente distintas: o córtex, a medula e a papila. Entre o córtex e a medula encontram-se os nefrônios que são as unidades funcionais dos rins (Hartmann, 1994). As principais funções dos rins são a filtração e reabsorção, a excreção para a regulação do sal e do teor de água corporais e remoção de resíduos, mantendo o equilíbrio destes produtos no sangue (Yu, 2006), desempenhando um importante papel na sua homeostasia (Tessari et al., 1999). Assim, a queda progressiva do ritmo de filtração glomerular, observada na doença renal crónica, e conseqüente a perda das funções reguladora, excretora e endócrina do rim, leva ao comprometimento de outros órgãos do organismo (Bastos et al., 2004).

A perda de filtração glomerular ocorre principalmente nos indivíduos diabéticos, tabagistas, hipertensos e indivíduos de idade avançada, havendo também uma predisposição para a doença em indivíduos que possuam familiares com falência renal, sendo estes os fatores de risco mais relevantes na manifestação da doença renal crónica (Bastos et al., 2004; Haroun et al., 2003).

A insuficiência renal aguda é caracterizada por uma redução abrupta da função renal, que se mantém por períodos variáveis de tempo, resultando na incapacidade de os rins exercerem as suas funções básicas de excreção e manutenção da homeostasia do organismo (Schor et al., 2000). Quando a queda do ritmo de filtração glomerular atinge valores muito baixos, geralmente inferiores a 15 ml/min, ocorre falência funcional renal, ou seja, o estágio mais avançado da perda contínua de funcionalidade progressiva, observando-se um estado de doença renal crónica (Bastos et al., 2004). Esta é uma patologia de

instalação lenta, progressiva e irreversível das funções renais presente num período igual ou superior a três meses. O nível de função renal determina o estágio da doença renal crónica (Bastos et al., 2004; Levey et al., 2003; Schor et al., 2000). Este tipo de insuficiência causa alterações na vida do indivíduo e caracteriza-se pela deterioração das funções bioquímicas e fisiológicas do organismo (Schor et al., 2000).

O envelhecimento é um processo que leva a alterações notáveis nos diferentes órgãos incluindo nos rins. Alterações estruturais e funcionais têm sido consideradas a causa do aumento da propensão das pessoas idosas à ocorrência de insuficiência renal crónica (Esposito & Dal Canton, 2010). Alguns estudos sobre o envelhecimento demonstraram que pacientes idosos com várias patologias como hipertensão e doença cardíaca podem, por si só, apresentar alterações renais. Em condições normais, um rim exerce as suas funções até uma idade muito avançada tornando-se, no entanto, frágil sob stress provocando situações patológicas quando submetidos a estímulos vasoconstritores (Davies & Shock, 1950).

O envelhecimento leva a várias alterações renais tais como a diminuição do peso do órgão, o espessamento da íntima vascular infrarrenal, alterações escleróticas dos glomérulos, infiltração de células inflamatórias crónicas e fibrose no estroma (Muhlberg & Platt, 1999). O rim idoso está constantemente exposto aos efeitos de uma variedade de potenciais tóxicos e prejuízos na capacidade de concentrar a urina, para conservar sódio e água (Mahesh et al., 2009). Alterações da função tubular renal, incluindo a movimentação deficiente de água, sódio e glicose, também estão frequentemente presentes no envelhecimento. Com o avançar da idade, o fluxo sanguíneo renal diminui progressivamente, a uma taxa aproximada de 10% por década entre os 30 e os 60 anos (Martin & Sheaff, 2007). Ocorre também o aumento da glomerulosclerose, atrofia tubular, fibrose intersticial e, em geral, uma perda de massa renal funcional (de até 25%) (Romano et al., 2010). Essas modificações resultam numa redução da taxa de filtração glomerular, da capacidade de excreção de drogas, agravando assim o desenvolvimento de doenças renais crónicas (Davies & Shock, 1950).

Efetivamente o declínio na função renal relacionado com a idade em humanos tem sido reconhecida por muitas décadas (Davies & Shock, 1950), e a prevalência da disfunção renal em indivíduos com idades superiores a 64 anos está entre os 23,4 e 35,8% (Zhang & Rothenbacher, 2008).

As células do rim que são mais suscetíveis à apoptose induzida por oxidantes e mutações são as do túbulo proximal, metabolicamente ativas e portanto com elevada densidade mitocondrial (Davies & Shock, 1950). Efetivamente, o rim necessita de grandes quantidades de energia para realizar as suas funções, nomeadamente a de transporte de solutos, que representa 10% do consumo de O_2 total do corpo e, como todos os órgãos, o rim recorre à fosforilação oxidativa mitocondrial para gerar aproximadamente 95% do ATP que necessita (O'Toole et al., 2010). As ROS são produzidas na mitocôndria como um subproduto do fluxo de eletrões através da cadeia respiratória (O'Toole et al., 2010).

Dada a incidência substancial da doença em geral e da patologia renal em particular, segue-se uma caracterização generalizada do envelhecimento biológico cujos mecanismos mediados pela mitocôndria, incluindo a sinalização redox, parecem assumir um papel importante.

2.3. Envelhecimento e declínio funcional

Para além do nascimento e da morte, uma das certezas da vida é que todas as pessoas envelhecem (Mota et al., 2004). A entrada na velhice depende de vários aspetos que ultrapassam limiares da mera cronologia e cada indivíduo reage de forma única ao avanço da idade (Farinatti, 2002). Desta forma, o idoso responde mais lentamente e menos eficazmente às alterações ambientais, devido a uma deterioração dos mecanismos fisiológicos, tornando-se mais vulnerável (Farinatti, 2002). Fisiologicamente, o envelhecimento é um estado em que ocorre um declínio progressivo das funções dos órgãos acompanhado pelo aparecimento e desenvolvimento de doenças, sendo as suas causas relacionadas a processos multifatoriais (Romano et al., 2010).

Segundo Mota *et al.* (2004), a maior ou menor velocidade do envelhecimento do organismo resulta da interação entre o genoma e os fatores estocásticos. Se a capacidade de adaptação do organismo for reduzida e/ou se a ação dos fatores estocásticos for exagerada, o resultado poderá ser um desequilíbrio excessivo que aumentará a suscetibilidade para acumular lesões e défices celulares, manifestando-se no fenómeno de envelhecimento celular, tecidual e orgânico (Mota *et al.*, 2004). Parece-nos importante que a compreensão deste fenómeno passe pelo conhecimento dos mecanismos biológicos específicos subjacentes aos desequilíbrios.

Várias teorias têm emergido para explicar os mecanismos relacionados com o fenómeno do envelhecimento biológico, a “teoria neuro-endócrina” considera que os mecanismos biológicos atuam de uma forma coordenada e equilibrada, de modo que quando um sistema é perturbado, os outros também são (Mota *et al.*, 2004). A “teoria mitocondrial do envelhecimento” associa o dano do DNA ao declínio bioenergético celular (Seidman *et al.*, 2000). De facto, tem sido descrito que durante o envelhecimento há um declínio na fidelidade da expressão genética que resulta na auto-amplificação de erros na síntese proteica, o acúmulo desses erros provoca o “erro-catástrofe”, sendo que estes danos moleculares acumulam-se principalmente no DNA (Weinert & Timiras, 2003). Os diferentes fenótipos característicos do envelhecimento são causados pelo aumento na frequência de células senescentes, que pode ser decorrente do encurtamento dos telómeros (senescência replicativa) e/ou do stress oxidativo celular. Enquanto que a “teoria dos radicais livres” defende que o stress oxidativo desempenha um papel fundamental no processo de envelhecimento, quando as concentrações de ROS são elevadas. A produção excessiva de ROS pode causar danos nas macromoléculas: lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Castillo *et al.*, 2005; Kireev *et al.*, 2007; Weinert & Timiras, 2003). Considerando a diminuição da função mitocondrial associada ao envelhecimento, alguns autores reportaram uma diminuição na atividade de várias enzimas e de alguns elementos da ETC, diminuindo também o $\Delta\Psi_m$ o que leva a um decréscimo do fornecimento de energia (Castillo *et al.*, 2005).

Evidências demonstraram que stress oxidativo associado à idade pode causar danos celulares funcionais e estruturais de tecidos, incluindo o rim (Castillo et al., 2005).

- O papel da mitocôndria durante o envelhecimento

O envelhecimento é um processo natural, biológico, complexo e multifatorial associado ao comprometimento da função bioenergética mitocondrial, ao aumento do stress oxidativo, a uma resposta diminuída ao stress e aumento do risco de contrair doenças associadas à idade (Paradies et al., 2010).

O estudo sobre o papel das mitocôndrias nas células conduziu a um profundo conhecimento da biologia do envelhecimento, devido ao papel central da mitocôndria na produção de energia química ATP de forma a atender aos requisitos da célula (Navarro & Boveris, 2007). De facto, a disfunção tecidual relacionada com o incremento da idade confirma a reduzida disponibilidade de ATP neste tecido (Serviddio et al., 2007).

Como referido anteriormente, as mitocôndrias são consideradas o organelo celular mais importante no processo de envelhecimento, principalmente através de disfunção da cadeia respiratória e pela formação de ROS, levando a danos nas proteínas mitocondriais, lípidos e DNA mitocondrial (Paradies et al., 2010).

A função bioenergética mitocondrial declina com a idade e um dos fatores que contribui para este facto é o aumento do dano oxidativo, apesar de existirem incertezas consideráveis sobre a quantidade e a importância do dano oxidativo mitocondrial no envelhecimento (Davies et al., 2001). Este stress pode levar a um ciclo vicioso em que as mitocôndrias danificadas produzem quantidades elevadas de ROS, levando por sua vez, a um aumento progressivo de lesões (Romano et al., 2010).

Os danos induzidos pelo stress oxidativo adicional levam à modificação de proteínas predominantemente nas subunidades do complexo I da ETC induzindo a disfunção da mesma (Boengler et al., 2009). O envelhecimento,

está relacionado com uma disfunção dos tecidos que se associa a uma reduzida disponibilidade de ATP nesse tecido (Serviddio et al., 2007). Existem vários fenótipos celulares comuns ao envelhecimento, incluindo a ativação da apoptose, a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, a oxidação da glutationa e o dano oxidativo no DNA mitocondrial.

2.4. Toxicidade renal no envelhecimento induzida por drogas

A maioria dos casos de insuficiência renal aguda são resultado de isquemia renal, intoxicação aguda ou exposição a tóxicos (Lieberthal & Nigam, 2000). A maioria dos fármacos nefrotóxicos é excretada pelos rins e acumula-se nas células tubulares em maior grau do que nas outras células, como resultado do aumento da concentração da droga localmente e à presença de células transportadoras específicas (Servais et al., 2008). Assim, a acumulação de substâncias ativas nas células renais não contribui, frequentemente, para o efeito terapêutico desejado.

O conceito de nefrotoxicidade está relacionado com alterações funcionais ou estruturais decorrentes da ação tóxica de substâncias do parênquima renal por atingirem altas concentrações e devido às características fisiológicas ou bioquímicas que o tornam num tecido mais suscetível àquelas substâncias (Gordon & Gattone, 1986). Uma das manifestações mais frequentes do dano nefrotóxico é a falência renal aguda, caracterizada por um declínio abrupto na filtração glomerular (Schnellmann, 2001). A apoptose desempenha um papel central não só nos processos fisiológicos de crescimento e remodelação dos rins, mas também em várias doenças renais induzidas por drogas (Servais et al., 2008).

Nos rins, a apoptose é um processo fisiológico de nefrogénese para a manutenção da homeostasia do tecido (Lemasters, 2005), mas na resposta à exposição a fármacos pode tornar-se crítica. Por um lado, leva à disfunção orgânica, sendo que, por outro lado contribui também para eliminar as células lesadas e realizar o controlo compensatório das respostas proliferativas (Lemasters, 2005). Segundo Servais et al. (2008), as drogas nefrotóxicas

parecem agir principalmente através da designada via intrínseca da apoptose, envolvendo a mitocôndria.

A lesão mitocondrial renal pode levar à libertação de ativadores de caspases, tais como o citocromo c, inibidores de respostas antiapoptóticas como o Smac / DIABLO e Omi/HtrA2 e caspases-independentes promotoras de morte celular, como AIF, que são abundantes no epitélio renal (Daugas et al., 2000).

Durante muitos anos, as investigações toxicológicas demonstraram que a sensibilidade do rim a paraxenobióticos evoluía dependendo da fase da vida. A necessidade crescente de informações sobre o potencial efeito nefrotóxico de drogas durante o desenvolvimento embrionário humano, a infância, a idade adulta e a senescência tem potencializado a realização de estudos toxicológicos (Trevisan et al., 2010).

O rim é um alvo frequente da ação de radicais livres e intermediários altamente eletrofílicos gerados no metabolismo da maior parte dos fármacos (Davies et al., 2001). A perturbação da homeostasia do Ca^{2+} celular está frequentemente relacionada com o início da citotoxicidade causada por estados patológicos ou agentes tóxicos (Pigoso et al., 1998). Assim, as mitocôndrias além de proporcionarem a maior parte da energia biologicamente útil têm um papel importante na manutenção dos níveis fisiológicos celulares de Ca^{2+} (Pigoso et al., 1998).

Os anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs, do inglês *non-steroid anti-inflammatory drugs*) compreendem uma vasta classe de compostos que inibem a cicloxigenase (COX), sendo estes fármacos muito utilizados para o alívio da dor e como agentes anti-inflamatórios num variado número de indicações terapêuticas (Lal et al., 2009). A base bioquímica dos efeitos secundários produzidos pelos NSAIDs tem sido mais estudada no trato gastrointestinal, onde se refletem, em parte, as consequências da diminuição das atividades da COX, especificamente a perda de um protetor de COX-1 (Lal et al., 2009). Adicionalmente, a sua ação subcelular, nomeadamente nas mitocôndrias tem sido igualmente observada através da inibição de desacoplamento, no transporte de eletrões e edema (Lal et al., 2009). Algumas drogas podem

também induzir dano nas mitocôndrias, incluindo a depleção rápida de ATP e a morte celular não apoptótica (necrose), enquanto outras provocam danos indiretos através da libertação de citocromo c, com consequente ativação da via apoptótica (Souid et al., 2003).

Muitos xenobióticos interagem com a ETC, aumentando a quantidade de ROS produzidos por diversos mecanismos (Turrens, 2003). Alguns compostos bloqueiam a ETC, aumentando o nível de redução dos transportadores e aumentando assim o stress oxidativo. Outros aceitam um eletrão de um transportador da ETC e transferem-no para o O₂ molecular, estimulando a formação de ROS sem que haja inibição da ETC (Turrens, 2003).

- Disfunção mitocondrial de rim induzida pelo salicilato

O rim não é somente o principal responsável pela excreção de alguns fármacos, mas é também o principal local de acumulação desses fármacos (Schnellmann, 2001).

Relatos de estudos realizados com mitocôndrias isoladas de córtex renal de ratos sugerem que o diclofenac de sódio e o ácido mefenâmico são desacopladores potentes da fosforilação oxidativa e inibidores da ETC, bem como indutores potentes do MPTP (Uyemura et al., 1997). Existem inúmeras drogas que são conhecidas como indutoras da apoptose em células renais e estão associadas à disfunção renal (Servais et al., 2008). De uma forma geral, a apoptose ocorre em baixos níveis de exposição ao fármaco, enquanto que a necrose requer doses superiores (Servais et al., 2008).

A aspirina (ácido acetilsalicílico) e vários outros anti-inflamatórios são responsáveis pelo sequestro da Acetil-coenzima A e das enzimas da β -oxidação, sendo responsáveis pela inibição quer da β -oxidação, quer da fosforilação oxidativa, podendo também prejudicar a transcrição do DNA mitocondrial ou diminuir a replicação do DNA (Fromenty & Pessayre, 1995). A aspirina é um anti-inflamatório não esteroide que bloqueia a produção de prostaglandinas por inibição irreversível de enzimas (Wu, 1998). O salicilato é o metabolito ativo da aspirina, tendo sido descrito que diminui o limiar de ativação

e abertura do MPTP em mitocôndrias isoladas do fígado e do rim (Al-Nasser, 1999). Efetivamente, o salicilato tem efeitos nocivos nas mitocôndrias como o incremento do intumescimento, causando desacoplamento da fosforilação oxidativa (Al-Nasser, 1999; Battaglia et al., 2005; Biban et al., 1995). Este efeito é especialmente pronunciado na presença de agentes, tais como hidróperóxido, o fosfato inorgânico ou stress oxidativo (Al-Nasser, 1999).

Como referido o aumento da suscetibilidade à abertura do MPTP torna as mitocôndrias permeáveis e conduz a uma dissipação do potencial de membrana, desacoplamento, a perda de Ca^{2+} pré acumulado e expansão do volume de matriz (Al-Nasser, 1999). A indução do MPTP induz também a libertação do citocromo c e de fatores indutores da apoptose (Battaglia et al., 2005).

2.5. O papel “protetor” do exercício físico

A manutenção de um estilo de vida saudável é sem dúvida uma garantia de um envelhecimento saudável e nele inclui-se a prática de exercício físico regular. É claramente evidente a importância do exercício físico na prevenção de várias doenças, nomeadamente cardiovasculares, respiratórias, neurodegenerativas, miopatias musculares, metabólicas, entre outras. Neste capítulo referir-mo-nos ao exercício físico descrito como uma estratégia não farmacológica útil na modelação da função mitocondrial em condições fisiológicas, patológicas e na ação de fármacos em vários tecidos (Marques-Aleixo, Oliveira, et al., 2012).

De uma forma geral, vários estudos reportaram que o exercício físico, particularmente de carácter crónico, aumenta a resistência tecidual a estímulos deletérios, diminuindo a intensidade do stress e lesão oxidativa e aumentando a resistência à indução da morte celular por apoptose em vários tecidos (Ascensao et al., 2008; Ascensao et al., 2010; Marques-Aleixo, Oliveira, et al., 2012). De facto, estudos em mitocôndrias cardíacas sugerem adaptações intrínsecas induzidas pelo exercício mediadas em parte por alterações redox e incluem a regulação de chaperonas mitocondriais, melhorando a capacidade

antioxidante, e/ou o aumento de outras moléculas protetoras contra a morte celular (Ascensao et al., 2012). É possível que em determinadas condições, o exercício possa diminuir o aumento da suscetibilidade das mitocôndrias ao MPTP através da modelação dos componentes ou sensibilizadores do poro. Este foi o que aconteceu em mitocôndrias cardíacas no estudo de Ascensão et al. (2011). No estudo de Navarro et al. (2004), o exercício moderado diminuiu significativamente o stress oxidativo associado ao envelhecimento prevenindo: a) o aumento das dos grupos carbonilos das proteínas e o conteúdo de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico; b) a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (as isoformas da SOD e catalase); c) a diminuição das atividades do NADH-citocromo c redutase e do citocromo c oxidase nos tecidos cerebral, cardíaco, hepático e renal em ratinhos com 52 semanas de idade. Por outro lado, tem sido descrito que uma baixa aptidão aeróbia está associada a uma baixa capacidade oxidativa mitocondrial hepática. No estudo de Thyfault et al. (2009) pretenderam investigar as diferenças intrínsecas aeróbicas, utilizando animais com baixa e elevada capacidade aeróbia mantidos em condições sedentárias e observaram que os animais com baixa capacidade aeróbia, exibiram baixo conteúdo mitocondrial (atividade da citrato sintase e conteúdo do citocromo c), reduzida capacidade oxidativa e um aumento da atividade peroxisomal (atividades da acil-coenzima A oxidase e da catalase) comparativamente aos animais com elevada capacidade aeróbia. Estes dados sugerem que uma baixa capacidade aeróbia causa uma diminuição da capacidade oxidativa mitocondrial hepática, o que poderá levar ao desenvolvimento de doenças hepáticas. Em animais envelhecidos naturalmente observaram também que os de baixa capacidade aeróbia possuíam maior propensão à lesão hepática (fibrose e apoptose).

Apesar dos poucos estudos abordarem os efeitos do exercício na funcionalidade mitocondrial de rim, os dados reportados noutros tecidos, como fígado e cérebro, sugerem um aumento na resistência tecidual a estímulos deletérios e leva-nos a crer que o exercício físico poderia assumir um importante papel na modelação da função mitocondrial renal dos animais velhos submetidos à ação do salicilato.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito do envelhecimento na resposta *in vitro* de mitocôndrias de rim de rato à presença de salicilato, um anti-inflamatório indutor de disfunção renal via ação mitocondrial.

3.2. Objetivos Específicos

No presente estudo teremos como objetivos específicos a análise da resposta de populações mitocondriais de rim de animais adultos vs. idosos à ação do salicilato nos seguintes parâmetros clássicos associados ao estudo da bioenergética mitocondrial:

- I. Atividade respiratória mitocondrial;
- II. Potencial da membrana mitocondrial;
- III. Na tolerância mitocondrial à indução do MPTP;
- IV. Parâmetros de dano e stress oxidativo mitocondrial

4. Metodologia

4.1. Caracterização da amostra

Para a realização deste estudo utilizamos uma amostra constituída por 8 ratos *Wistar* machos adultos com 19 semanas de idade e 8 ratos *Wistar* machos idosos com 106 semanas de idade. A idade considerada adequada para os ratos controlo jovens foi de 17 semanas, para avaliar as condições patológicas observadas no decorrer do envelhecimento utilizamos ratos com 106 semanas de idade (Garcia-Fernandez et al., 2008).

No decorrer do protocolo os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, contendo dois ratos por gaiola, em biotério com atmosfera normal (21-22 C°; 50-60 % humidade), comida e água *ad libitum* e num ciclo de 12 h dia/noite.

4.2. Protocolo experimental

4.2.1. Sacrifício dos animais, extrações do plasma e do rim

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical entre as 9:00h e as 10:00h da manhã para eliminar possíveis efeitos da variação diurna. O sangue foi colhido e, imediatamente, centrifugado a 5000xg durante 5 minutos a 4°C e uma alíquota de plasma foi obtido e armazenado a -80°C para posteriores análises bioquímicas. De seguida, procedeu-se à abertura da cavidade abdominal e torácica, de onde o rim foi rapidamente excisado, lavado e cuidadosamente seco e pesado.

4.2.2. Isolamento de mitocôndrias de rim

Inicialmente, as mitocôndrias renais foram preparadas usando os métodos convencionais de centrifugação diferencial (Santos et al., 2001). O rim

foi prontamente excisado no meio de isolamento (4.°C) contendo 250 mM sacarose, 10 mM HEPES, 1 mM de EGTA, pH 7.4 e 0,1% BSA livre de ácidos gordos.

Após a sua lavagem, o rim foi mecanicamente homogeneizado num Potter-Elvehjen. O homogeneizado foi centrifugado a 800xg durante 10 minutos e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 10000xg durante 10 minutos. O *pellet* mitocondrial foi ressuspensão usando um pincel e, posteriormente, centrifugado duas vezes a 10000xg durante 10 minutos para obtenção da suspensão mitocondrial final. Na última centrifugação, o *pellet* mitocondrial foi ressuspensão no meio de lavagem contendo 250mM sacarose, 10mM HEPES, pH 7.4. A concentração final de proteína mitocondrial foi determinada espectrofotometricamente pelo método do biureto utilizando BSA como padrão (Gornall et al., 1949).

As suspensões mitocondriais de rim foram utilizadas durante as 4 horas seguintes para os ensaios *in vitro* de avaliação de parâmetros associados ao consumo de oxigénio, potencial elétrico transmembranar e *swelling*, tendo sido mantidas em gelo (0-4°C) durante esse período. E uma alíquota separada e guardada a -80°C para as análises dos marcadores de dano e stress oxidativo mitocondrial.

4.2.3. Atividade respiratória mitocondrial

A função respiratória mitocondrial foi avaliada polarograficamente, a 25°C, utilizando um eléctrodo de O₂ tipo Clark (Hansatech DW 1, Norfolk, Reino Unido) conectado a um registador de papel. As reações ocorreram numa câmara de vidro de 2mL de volume, agitada magneticamente, contendo 0.5 mg de proteína mitocondrial num meio de reação composto por 130mM sacarose, 50 mM KCl, 5 mM HEPES, 2.5 mM KH₂PO₄, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, pH 7.4. Após um período de 1 minuto de equilíbrio do sistema, a respiração mitocondrial foi iniciada pela adição de glutamato/malato (G/M, 10 e 5 mM, respetivamente). O estado respiratório 3 foi determinado após a adição de 105 µM de ADP; o estado respiratório 4 foi medido como a taxa de consumo de O₂

após fosforilação do ADP adicionado. O rácio de controlo respiratório (RCR, estado 3 sobre estado 4) e o ADP/O (rácio entre o número de nmol de ADP fosforilado por nmol de O₂ consumido) foram calculados (Estabrook, 1967) considerando o valor de 474 ngatom O/mL para a solubilidade do O₂ a 25°C em água bidestilada. Nos ensaios realizados na presença de salicilato, este foi adicionado à suspensão no estado basal numa concentração final de 0.5 mM.

4.2.4. Potencial elétrico transmembranar mitocondrial

O $\Delta\Psi_m$ de membrana foi estimado com base na atividade do catião lipofílico tetrafenilfosfónio (TPP⁺) utilizando um eléctrodo seletivo para TPP⁺ preparado no nosso laboratório de acordo com Kamo *et al.* (1979) referência um eléctrodo AgCL (Tacussel, Model MI 402). Ambos os eléctrodos TPP⁺ e o de referência foram inseridos numa câmara aberta agitada magneticamente e conectada a um medidor de pH (Ortec, PHM 84). Os sinais foram ampliados através de um gravador potenciométrico (Allteck, Linear1200). Não foi utilizado qualquer fator de correção para retificar a contribuição passiva de TPP⁺ para o potencial de membrana, uma vez que o propósito deste estudo é observar as alterações relativas em detrimento de valores absolutos. Consequentemente, os valores de $\Delta\Psi_m$ obtidos *à priori* são ligeiramente sobrestimados. O $\Delta\Psi_m$ foi estimado através da equação (25°C):

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

em que:

v corresponde ao volume mitocondrial

V corresponde ao volume do meio de incubação

ΔE corresponde à deflexão do potencial do eléctrodo a partir do estado basal

Foi assumido um volume de matriz mitocondrial de 1.1 μ l/mg de proteína. Os ensaios foram realizados a 25°C em 2 mL de meio de reação contendo 130mM sacarose, 50 mM KCl, 5 mM HEPES, 2.5 mM KH₂PO₄, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, pH 7.4, suplementado com 3 μ M de TPP⁺ e 0.5 mg/ml de proteína mitocondrial. A avaliação do $\Delta\Psi_m$ foi realizada utilizando

substratos para o complexo I (10 mM de glutamato e 5 mM de malato). Foi utilizado ADP (105 μ M; 10 nmol) para induzir um ciclo fosforilativo. A *lag phase*, que reflete o tempo necessário para fosforilar o ADP adicionado, foi medida em segundos. O potencial elétrico transmembranar também foi medido na presença de salicilato numa concentração final de 0.5 mM.

4.2.5. Swelling mitocondrial durante a indução do MPTP

Estudos anteriores sobre a regulação do MPTP demonstraram menor capacidade de acumulação de Ca^{2+} com substratos do complexo I quando comparado com substratos do complexo II devido ao efeito regulador do complexo I, assim todos os ensaios envolvendo a indução do MPTP foram realizados com o succinato, substrato do complexo II.

As alterações osmóticas mitocondriais foram seguidas por monitorização da diminuição de absorvância a 540 nm utilizando um espectrofotómetro Jasco V-630. A amplitude de *swelling* após a adição de Ca^{2+} foi considerada para avaliar a suscetibilidade à abertura do MPTP. A reação foi continuamente agitada e a temperatura foi mantida a 25°C. Os ensaios foram realizados em 1 mL de meio de reação suplementado com rotenona (4 μ M), succinato (10 mM), cálcio (35 μ M) e um 0.5 mg/ml de proteína na ausência e presença de salicilato (0.5 mM). Os ensaios de controlo negativo foram realizados na presença de ciclosporina A (CsA, 1 μ M), um inibidor seletivo do MPTP (Broekemeier et al., 1989).

4.2.6. Parâmetros de dano e stress oxidativo mitocondrial

A lise das membranas mitocondriais foi realizada através de ciclos de congelamento-descongelamento para permitir o acesso dos substratos.

Peroxidação lipídica: determinada através do conteúdo de malondealdeído (MDA) por espectrofotometria, de acordo com o procedimento descrito por (Buege & Aust, 1978). A proteína mitocondrial foi suspensa numa solução contendo 175 mM KCl e 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 e, posteriormente foi

recolhido 150 μL e adicionado ácido tricloroacético (10%) e ácido tiobarbitúrico (1%). A mistura foi aquecida a 80-90°C durante 10 minutos e arrefecida em gelo por 10 minutos antes da centrifugação (4000xg durante 10 minutos). O sobrenadante foi aproveitado e medido numa absorvância de 535 nm. O conteúdo de MDA foi expresso em nanomoles de MDA por miligrama de proteína ($\epsilon_{535}=1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Grupos sulfidril: os grupos -SH oxidados, incluindo glutatona e outras proteínas contendo -SH, foram quantificados por espectrofotometria de acordo com o método proposto por Hu (1990). A suspensão mitocondrial contendo 5 mg/mL foi adicionada a uma solução com 0.25 M de Tris-base pH 8.2 e 10 mM DTNB (do inglês *5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)*) e o volume final ajustado com metanol absoluto até perfazer 1mL. A amostra-branco (sem DTNB) foi preparada da mesma forma, incubada em 30 minutos no escuro à temperatura ambiente e centrifugada a 3000xg durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e medido numa absorvância a 414 nm contra o branco. O conteúdo total de -SH foi expresso em nanomoles por miligrama de proteína ($\epsilon_{535}=1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Atividade da aconitase: determinada espectrofotometricamente através da monitorização da formação do cis-aconitase a partir do isocitrato a 240 nm a 25°C (A. Ascensao et al., 2005). As frações mitocondriais foram ressuspensas numa solução contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) e 0.6 mM MnCl_2 numa concentração final de 2 mg/mL. Subsequentemente, 25 μL foram recolhidos e o volume ajustado a 500 μL e adicionou-se isocitrato numa concentração de 200 mM. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmole de cis-aconitase por minuto ($\epsilon_{240}=3.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Atividade da superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD): medida espectrofotometricamente a 505 nm através do KIT comercial (RANSOD, Random Labs, Reino Unido). As mitocôndrias de rim foram misturadas em solução fosfato (10 mM, pH 7.0) para uma concentração final de 0.5 mg/mL. Posteriormente, 1 mL do substrato misturado (0.05 mmol/L xantina e 0,025 mmol/L INT) e 30 μL de amostra mitocondrial foram adicionados e a reação foi iniciada com a adição de 150 μL de xantina oxidase (80 U/L) mantendo sempre

numa temperatura de 37°C durante 3 minutos. A atividade da Mn-SOD foi determinada contra um ensaio branco e expresso em unidades por miligrama de proteína. Uma unidade de SOD é o que causa 50% de inibição da taxa de redução do INT sob as condições do ensaio.

4.3. Procedimentos estatísticos

Para a análise dos dados recolhidos recorreu-se ao programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad software, Estados Unidos da América). Média e erro padrão da média foram calculados para todas as variáveis de cada grupo. O significado estatístico foi determinado por t-teste student para medidas desemparelhadas e 2-way anova. Quando encontradas diferenças significativas, Bonferroni post hoc foi utilizado. O nível de significância foi estabelecido em 5 %.

5. Resultados

- Caracterização dos animais

A tabela I apresenta a idade dos animais, os valores médios e desvios padrão da média do peso corporal, peso do rim, relação entre o peso do rim e o peso corporal e marcadores plasmáticos, tais como GPT/ ALT, GGT, colesterol total e o HDL colesterol dos animais adultos e velhos estudados.

Como podemos observar, os animais do grupo velho mostraram um aumento significativo de peso corporal, peso do rim, razão entre peso do rim e peso corporal, e dos valores de colesterol total e HDL colesterol quando comparados com o grupo adulto.

Tabela I: Caracterização dos animais

	Adulto	Velho
Idade (semanas)	19	106
Peso corporal (g)	510.8±14.6	657.3±24*
Peso do rim (g)	2.9±0.1	4.47±0.4*
Peso do rim / Peso corporal	0.57±0.02	0.69±0.05*
Rendimento do isolamento mitocondrial (g/mg)	18.99±4.2	15.10±3.9
Plasma		
GPT/ALT (U/L)	42.5±4.6	46.75±7.1
GGT (U/L)	1.2±0.3	0.5±0.3
Colesterol total (g/L)	54.5±5.5	133.8±18.9*
Colesterol HDL (g/L)	32.8±2.89	78±11.0*

Valores médios ± desvio-padrão da média; * vs. Adulto (p≤0.05).

- Consumo de oxigénio e potencial elétrico transmembranar mitocondrial

O impacto do envelhecimento por si só ou em combinação com a toxicidade *in vitro* induzida pelo salicilato foi determinado através do consumo de O₂ (Tabela II) e das variações do $\Delta\Psi_m$ (Tabela III) que ocorrem durante a

fosforilação do ADP usando o G/M como substrato, em mitocôndrias renais de animais adultos e velhos.

O único parâmetro alterado com o envelhecimento quando na condição veículo (não tratado) foi o estado respiratório 3. Em geral, o tratamento *in vitro* com salicilato induziu alterações em alguns parâmetros respiratórios mitocondriais avaliados como pode ser observado pelo aumento do estado 2 e pela diminuição do estado 3 e do RCR (Tabela II).

Quando medimos as diferenças entre os grupos etários estudados em relação à resposta ao salicilato, verificamos que não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros do consumo de O₂. As percentagens correspondentes à diminuição nos dois grupos foram muito próximas: 5.1% vs. 4.1%.

Tabela II: Efeito do envelhecimento sobre os parâmetros de consumo de oxigênio nas mitocôndrias renais isoladas na presença e ausência de salicilato

	Veículo		Salicilato		ANOVA
	Adulto	Velho	Adulto	Velho	
Estado 2	12.20±0.74	14.77±1.11	19.46±1.07 [#]	24.04±2.12 [#]	S
Estado 3	65.41±3.68	48.67±2.37*	62.08±3.58	46.64±1.90*	E; S
Estado 4	20.06±2.19	16.35±0.78	27.26±2.70	20.24±1.02	NS
RCR	3.38±0.26	3.00±0.21	2.32±0.10 [#]	2.31±0.07 [#]	E
ADP/O	2.19±0.21	2.82±0.29	2.52±0.15	2.53±0.17	E

Valores médios ± desvio-padrão da média; * vs. Adulto (p≤0.05), [#] vs. Veículo (p≤0.05)

E- indica efeito do envelhecimento, S- indica o efeito do salicilato, NS- indica sem significado.

As unidades dos estados 2, 3 e 4 foram expressos em natomO/min/mgprot.

Relativamente ao $\Delta\Psi_m$, não se verificaram alterações notáveis com a idade (adulto vs. velho).

Por outro lado, a presença do salicilato tende a diminuir o $\Delta\Psi_m$ máximo das mitocôndrias de rim em ambos os grupos, embora não tenham sido

encontradas diferenças significativas (Tabela III). Relativamente à *lag phase*, as percentagens de alteração são as seguintes: 5.8% vs. 23.8% para o salicilato nos grupos adulto vs. velho.

Tabela III: Efeito do envelhecimento sobre os parâmetros do potencial elétrico transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e da fosforilação do ADP *lag phase* das mitocôndrias renais isoladas na presença e ausência de salicilato

	Veículo		Salicilato		ANOVA
	Adulto	Velho	Adulto	Velho	
Máximo $\Delta\Psi_m$ (-mV)	213.50±3.10	207.50±3.10	205.70±3.00	198.10±3.60	NS
Lag phase (s)	37.67±2.78	42.10±4.92	35.44±2.13	52.11±0.57	E; S

Valores médios \pm desvio-padrão da média;

E- indica efeito do envelhecimento, S- indica o efeito do salicilato, NS- indica sem significado,

O MPTP é, igualmente, um sensor de disfunção mitocondrial, sendo avaliado para analisar a toxicidade induzida por fármacos. Tem sido bastante associado à ativação da morte celular com origem mitocondrial (Trost & Lemasters, 1996). No nosso estudo, questionamos se as mitocôndrias de rim do grupo velho respondiam de forma diferente do grupo adulto na presença de salicilato.

O tempo até à taxa máxima de redução da absorvância (“tempo até V_{max} ”) durante o *swelling* após a adição do Ca^{2+} foi considerado como um indicador de suscetibilidade ao MPTP (Figura 1). Em condições sem tratamento (veículo), o envelhecimento diminuiu o “tempo até V_{max} ”. O tratamento *in vitro* com salicilato resultou numa indução mais rápida do MPTP quando comparado com as condições veículo. Não foram encontradas alterações adicionais na suscetibilidade à indução do MPTP no grupo velho comparado com o grupo adulto na presença do fármaco.

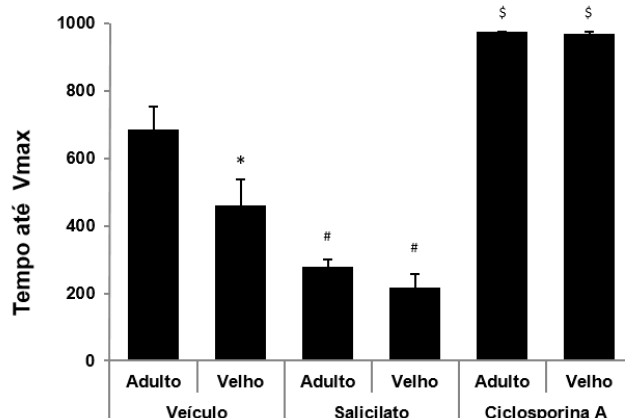


Figura 1: Efeito combinado do envelhecimento e da presença de salicilato na suscetibilidade das mitocôndrias de rim à indução do MPTP por cálcio

- *Dano oxidativo mitocondrial e antioxidantes*

A tabela IV apresenta as atividades da aconitase mitocondrial, Mn-SOD e os conteúdos de grupos –SH e MDA. Não foram encontradas alterações significativas entre os grupos estudados na atividade da aconitase, uma enzima do ciclo de Krebs suscetível às ROS, e da Mn-SOD, bem como os conteúdos de –SH e MDA.

Tabela IV: Atividades da aconitase e superóxido dismutase mitocondrial e conteúdo mitocondrial de grupos sulfidril e malondealdeído

	Adulto	Velho
Aconitase (U / mg prot)	61.93±9.35	63.92±10.47
Mn-SOD (U / mg prot)	16.34±3.36	19.54±4.03
Grupos -SH (nmol / mL / mg prot)	55.70±3.80	54.70±3.85
MDA (nmol /mg prot)	3,90±0,76	3,85±0,74

Valores médios ± desvio padrão da média

6. Discussão dos resultados

O envelhecimento é um estado fisiológico em que ocorre um declínio progressivo das funções de vários tecidos, acompanhado pelo aparecimento e desenvolvimento de doenças (Romano et al., 2010). Várias teorias referem que a disfunção mitocondrial está amplamente associada ao processo normal de envelhecimento, assim como a etiologia de várias doenças degenerativas no idoso (Mather & Rottenberg, 2000). Do ponto de vista experimental, as mitocôndrias têm sido utilizadas em vários estudos por terem um importante papel no metabolismo celular, sendo consideradas sensores de toxicidade e funcionalidade de vários tecidos do organismo tais como o rim (Dykens & Will, 2008). Os ensaios em mitocôndrias isoladas constituem um modelo bastante utilizado para avaliar o efeito modulador de vários estímulos e/ou toxicidade de algumas drogas como o salicilato. O uso de mitocôndrias isoladas provou ser uma ferramenta muito útil para o estudo da bioenergética, em geral, e do sistema fosforilativo, em particular, sob condições enzima/substrato que se assemelham às proporções *in vivo* (Oliveira, 2011).

No nosso estudo utilizamos ratos macho por ser um modelo conveniente na reprodução das alterações estruturais e funcionais observadas no processo do envelhecimento e tem sido utilizado por outros autores no estudo do envelhecimento (Monti et al., 1995). Relativamente ao sexo, têm sido descrito que a expressão e a atividade das enzimas antioxidantes são superiores nos ratos fêmeas do que nos ratos machos. Neste sentido, optámos por murganhos macho para evitar que o ambiente hormonal associado aos sistemas de defesa influenciasse os nossos resultados (Borras et al., 2003).

Na literatura, tem sido referido que o envelhecimento e os danos induzidos por fármacos têm sido associados à diminuição da funcionalidade de vários tecidos com elevadas cargas metabólicas, incluindo o rim, que pode ser provocada pelo progressivo colapso bioenergético (Beal, 2005; Pereira et al., 2012). Sendo as mitocôndrias organelos cruciais na regulação do metabolismo celular, este declínio funcional sugere que o envelhecimento possa ser o principal aditivo a contribuir para a toxicidade dos NSAIDs usados em todo o

mundo. Dos NSAIDs mais consumidos, o salicilato é utilizado essencialmente para reduzir a inflamação e como analgésico para reduzir a dor, sendo a sua molécula ativa, o salicilato, um dos agentes ativos de um dos fármacos mais prescritos em todo o mundo – aspirina, Esta molécula tem sido, por seu lado, associada a uma maior suscetibilidade mitocondrial em vários tecidos: cardíaco (Nulton-Persson et al., 2004), hepático (Battaglia et al., 2005), cerebral (Marques-Aleixo, Rocha-Rodrigues, et al., 2012) e renal (Al-Nasser, 1999). Neste sentido, o objetivo do nosso estudo foi verificar se o envelhecimento afetaria *in vitro* a resposta mitocondrial de rim à ação do salicilato.

De acordo com o objetivo proposto, avaliamos *in vitro* o consumo de O₂, potencial elétrico transmembranar, *swelling* osmótico e marcadores de lesão oxidativa em mitocôndrias isoladas de animais adultos (19 semanas de idade) velhos (106 semanas de idade) em condições controlo (veículo) e na presença de salicilato.

De uma forma geral, os resultados demonstraram um declínio da capacidade fosforilativa relacionado com a idade, observados pela diminuição do estado³ e pelo aumento da *lag phase* nos animais velhos. Contrariamente à nossa expectativa, o envelhecimento não agravou mais os efeitos nocivos *in vitro* provocados pelo salicilato nas mitocôndrias de rim.

- *Consumo de O₂ mitocondrial e o potencial elétrico transmembranar- interações entre o envelhecimento e o salicilato*

Para analisarmos os efeitos do salicilato na funcionalidade mitocondrial avaliamos o consumo de O₂ e o $\Delta\Psi_m$ através de ciclos fosforilativos (Bellance et al., 2008), utilizando substratos para o complexo I.

Os resultados obtidos nos parâmetros de consumo de O₂ e $\Delta\Psi_m$ sugerem que os animais velhos tiveram alterações no funcionamento da fosforilação oxidativa, o que pode ser confirmado pela diminuição da taxa respiratória no estado 3 nas mitocôndrias renais, ou seja houve uma diminuição do consumo de O₂ no estado 3 (Tabela II).

Apesar destas alterações, não houve diminuição no RCR nem no rácio ADP/O, dois importantes indicadores da eficiência fosforilativa mitocondrial (Brand & Nicholls, 2011). Estes dados sugerem que ocorreram algumas adaptações que protegeram a degenerescência da síntese mitocondrial de ATP associada à idade no tecido estudado (Goodell & Cortopassi, 1998; Kokoszka et al., 2001; Mather & Rottenberg, 2000; O'Toole et al., 2010; Satoh et al., 2011; Serviddio et al., 2007). No entanto, a preservação desta funcionalidade, contrasta com a diminuição de 37% do conteúdo de citocromo c, que decorre do declínio na fosforilação oxidativa associado ao envelhecimento nas mitocôndrias renais (O'Toole et al., 2010).

Considerando o papel crucial do stress oxidativo exacerbado e os danos na bioenergética mitocondrial, particularmente quando associados ao envelhecimento (Skulachev et al., 2009), medimos a atividade da aconitase (como um biomarcador indireto de produção de superóxido mitocondrial), o conteúdo mitocondrial de MDA (como marcador de peroxidação lipídica mitocondrial) e grupos -SH (oxidação de proteínas contendo grupos -SH) (Tabela IV). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os animais adultos e velhos. Este facto, parece sugerir que as mitocôndrias de animais velhos possuem uma adaptação antioxidante face ao aumento da produção de ROS. Tal acontecimento, poderá ser justificado pela existência de um sistema antioxidante específico modulado pelo envelhecimento a nível subcelular, incluindo nas mitocôndrias renais (Mahesh et al., 2009).

Além do seu papel fundamental no fornecimento de energia, as mitocôndrias também desempenham um papel central na regulação da função celular através da regulação da homeostasia do Ca^{2+} citosólico e da morte celular por apoptose (Crompton, 1999). Como referido anteriormente, as mitocôndrias têm uma capacidade limitada em acumular Ca^{2+} antes de ocorrer a abertura do MPTP dependente de Ca^{2+} , o que em alguns casos pode atuar como um ponto de não retorno levando à morte celular (Lemasters et al., 2009). O limiar para a abertura do MPTP diminui com a combinação do aumento do Ca^{2+} intra-mitocondrial e o aumento do stress oxidativo (Crompton, 1999). No presente estudo, o MPTP induzido pelo Ca^{2+} nas mitocôndrias renais

foi seguido através de ensaios de *swelling*. Em concordância com estudos anteriores (Seo et al., 2008; Vlessis & Mela-Riker, 1987), os nossos dados sugerem que o envelhecimento aumentou a vulnerabilidade à indução do MPTP pelo Ca^{2+} em condições sem tratamento (veículo), observada pela diminuição do “tempo até V_{max} ”. No entanto, contrariamente à nossa hipótese inicial, o envelhecimento não prejudicou adicionalmente a capacidade das mitocôndrias renais em acumular Ca^{2+} antes da indução do MPTP na presença de salicilato. Estes resultados contradizem outros estudos toxicológicos que demonstraram que o aumento da suscetibilidade à libertação do Ca^{2+} induzido pelo selenito é dependente da idade, uma vez que as mitocôndrias renais dos animais velhos mais suscetíveis à indução do MPTP (Vlessis & Mela-Riker, 1987).

O MPTP é influenciado por fatores fisiológicos, sendo cada vez mais reconhecido que a composição molecular do poro é variável (Zoratti et al., 2005). Embora os modelos clássicos sugiram que o ANT (do inglês *adenine nucleotide translocase*), VDAC e a matriz reguladora ciclofilina D sejam as principais proteínas a formar o MPTP (Crompton, 1999), outros estudos sugerem que estes componentes são dispensáveis (Chabi et al., 2008; McCommis et al., 2011; Picard et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, é provável que a ausência de danos adicionais nas mitocôndrias renais nos ratos velhos na presença do salicilato possa estar associada a um possível limiar prejudicial e/ou possíveis adaptações induzidas pelo envelhecimento em alguns sistemas antioxidantes que contribuíram para proteger o tecido de insultos mais intensos. Independentemente da causa e dos diferentes mecanismos associados, este trabalho contribuiu para destacar a necessidade de incorporar as adaptações mitocondriais dependentes do envelhecimento no contexto da idade como um fator de risco para a toxicidade de vários fármacos clinicamente utilizados.

Apesar de o isolamento mitocondrial ser considerado um modelo experimental estabelecido para analisar a toxicidade induzida por fármacos (Oliveira, 2011), são necessários estudos *in vivo* para melhor compreender se

os resultados aqui apresentados são repetidos num sistema biológico mais complexo.

Dado que o presente trabalho será apresentado com vista à obtenção do 2º ciclo em Atividade Física para a Terceira Idade, interessa, apesar de ser de forma bastante especulativa, referir-nos ao hipotético papel que o exercício físico e/ou a atividade física poderia ter na modulação da função mitocondrial renal de animais idosos, bem como na resposta à presença do fármaco no contexto do nosso estudo. Efetivamente, vários têm sido os trabalhos na literatura que mostraram que o exercício físico, particularmente o aeróbio e de caráter crónico, aumenta a resistência tecidual a estímulos deletérios, diminuindo a exuberância do stress e lesão oxidativos e aumentando a resistência à indução da morte celular por apoptose (Ascensao et al., 2012; Marques-Aleixo, Oliveira, et al., 2012). Estes trabalhos têm sido centrados, fundamentalmente, nos tecidos muscular esquelético e cardíaco e têm, igualmente, mostrado um papel central da bioenergética e metabolismo mitocondriais na tolerância conferida pelo exercício. Assim sendo, e apesar do rim, à semelhança do cérebro e do fígado, ser um órgão sem capacidade contráctil e portanto, não submetido à ação de estímulos mecânicos, é possível que a prática de exercício exerça efeitos modeladores importantes na funcionalidade deste tecido que derivem de alterações neuroendócrinas e inflamatórias sistémicas. Por exemplo, têm sido vários os relatos de melhoria da função mitocondrial hepática e cerebral induzidos pelo exercício, quer em condições basais (Boveris & Navarro, 2008; Liu et al., 2000; Radak et al., 2008), quer em animais portadores de patologia e disfunção hepática, por exemplo por esteatose ou ação de fármacos (Rector et al., 2008).

7. Conclusões

Os resultados do nosso estudo mostraram que o envelhecimento comprometeu a funcionalidade mitocondrial de rim e, contrariamente à hipótese inicial, não agravou adicionalmente a fragilidade da mitocôndria de rim induzida pelo salicilato.

A ausência do efeito combinado - envelhecimento e salicilato - poderá estar associado a um conjunto de adaptações celulares e mitocondriais em alguns sistemas de defesa que permitem uma preservação da funcionalidade na presença do salicilato.

8. Referências bibliográficas

- Al-Nasser, I. A. (1999). Salicylate-induced kidney mitochondrial permeability transition is prevented by cyclosporin A. *Toxicology Letters*, 105(1), 1-8.
- Ascensao, A., Azevedo, V., Ferreira, R., Oliveira, E., Marques, F., & Magalhaes, J. (2008). Physiological, biochemical and functional changes induced by a simulated 30 min off-road competitive motocross heat. *J Sports Med Phys Fitness*, 48(3), 311-319.
- Ascensao, A., Lumini-Oliveira, J., Machado, N. G., Ferreira, R. M., Goncalves, I. O., Moreira, A. C., Marques, F., Sardao, V. A., Oliveira, P. J., & Magalhaes, J. (2010). Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats. *Clin Sci (Lond)*, 120(1), 37-49.
- Ascensão, A., Lumini-Oliveira, J., Oliveira, P., & Magalhães, J. (2011). Mitochondria as a Target for Exercise-Induced Cardioprotection. *Current Drug Targets*, 12(5), 1-12.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J., Oliveira, J., & Duarte, J. A. (2003). Exercise and cardiac oxidative stress. *Rev Port Cardiol*, 22(5), 651-678.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J. M., Ferreira, R., Neuparth, M. J., Marques, F., Oliveira, P. J., & Duarte, J. A. (2005). Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(2), H722-731.
- Ascensao, A., Oliveira, P. J., & Magalhaes, J. (2012). Exercise as a beneficial adjunct therapy during Doxorubicin treatment--role of mitochondria in cardioprotection. *Int J Cardiol*, 156(1), 4-10.
- Ascensao, A. A., Magalhaes, J. F., Soares, J. M., Ferreira, R. M., Neuparth, M. J., Appell, H. J., & Duarte, J. A. (2005). Cardiac mitochondrial respiratory function and oxidative stress: the role of exercise. *Int J Sports Med*, 26(4), 258-267.
- Azevedo, C. (2005). *Biologia molecular e celular*. Lisboa: Lidel.
- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4), 729-744.
- Bastos, M. G., Carmo, W. B. d., Abrita, R. R., Almeida, E. C. d., Mafra, D., Costa, D. M. N. d., Gonçalves, J. d. A., Oliveira, L. A. d., Santos, F. R. d., & Paula, R. B. d. (2004). Doença Renal Crônica: Problemas e Soluções. *J Bras Nefrol*, 26(4), 202-215.

- Battaglia, V., Salvi, M., & Toninello, A. (2005). Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33864-33872.
- Beal, M. F. (2005). Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol*, 58(4), 495-505.
- Bellance, N., Benard, G., Smolkova, K., Begueret, H., Letellier, T., Merle, M., Baste, J. M., Moreau, P., & Rossignol, R. (2008). Mitochondrial OXPHOS system is enhanced in human lung cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1777, S81-S81.
- Biban, C., Tassani, V., Toninello, A., Siliprandi, D., & Siliprandi, N. (1995). The alterations in the energy linked properties induced in rat liver mitochondria by acetylsalicylate are prevented by cyclosporin A or Mg²⁺. *Biochem Pharmacol*, 50(4), 497-500.
- Boengler, K., Schulz, R., & Heusch, G. (2009). Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovascular research*, 83(2), 247-261.
- 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 Radic Biol Med*, 44(2), 224-229.
- Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*, 435(2), 297-312.
- 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 Biol Chem*, 264(14), 7826-7830.
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(4), C817-833.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-310.
- Castillo, C., Salazar, V., Ariznavarreta, C., Fossati, M., Tresguerres, J. A., & Vara, E. (2005). Effect of S-adenosylmethionine on age-induced hepatocyte damage in old Wistar rats. *Biogerontology*, 6(5), 313-323.
- Chabi, B., Ljubcic, V., Menzies, K. J., Huang, J. H., Saleem, A., & Hood, D. A. (2008). Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell*, 7(1), 2-12.

- Childs, A. C., Phaneuf, S. L., Dirks, A. J., Phillips, T., & Leeuwenburgh, C. (2002). Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2 : Bax ratio. *Cancer Research*, *62*(16), 4592-4598.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, *341* (Pt 2), 233-249.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*, *476*(3), 118-123.
- Davies, D. F., & Shock, N. W. (1950). Age changes in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, and tubular excretory capacity in adult males. *J Clin Invest*, *29*(5), 496-507.
- Davies, S. M. K., Poljak, A., Duncan, M. W., Smythe, G. A., & Murphy, M. P. (2001). Measurements of protein carbonyls, ortho- and metatyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats. *Free Radical Biology and Medicine*, *31*(2), 181-190.
- Dekkers, J. C., van Doornen, L. J., & Kemper, H. C. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med*, *21*(3), 213-238.
- Desagher, S., & Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, *10*(9), 369-377.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, *82*(1), 47-95.
- Duchen, M. R., Verkhratsky, A., & Muallem, S. (2008). Mitochondria and calcium in health and disease. *Cell Calcium*, *44*(1), 1-5.
- Dyken, J. A., & Will, Y. (2008). *Drug-induced mitochondrial dysfunction*. New Jersey: Wiley.
- Esposito, C., & Dal Canton, A. (2010). Functional changes in the aging kidney. *J Nephrol*, *23 Suppl 15*, S41-45.
- Estabrook. (1967). *Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios* (Vol. 10): Methods enzymol.
- Farinatti, P. d. T. V. (2002). Teorias biológicas do envelhecimento: do genético ao estocástico. *Rev Bras Med Esporte*, *8*(4), 129-138.

- Feissner, R. F., Skalska, J., Gaum, W. E., & Sheu, S. S. (2009). Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Frontiers in Bioscience*, *14*, 1197-1218.
- Ferreira, F. M., Palmeira, C. M., Seica, R., Moreno, A. J., & Santos, M. S. (2003). Diabetes and mitochondrial bioenergetics: alterations with age. *J Biochem Mol Toxicol*, *17*(4), 214-222.
- Friel, D. D. (2000). Mitochondria as regulators of stimulus-evoked calcium signals in neurons. *Cell Calcium*, *28*(5-6), 307-316.
- Fromenty, B., & Pessayre, D. (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther*, *67*(1), 101-154.
- Garcia-Fernandez, M., Delgado, G., Puche, J. E., Gonzalez-Baron, S., & Castilla Cortazar, I. (2008). Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. *Endocrinology*, *149*(5), 2433-2442.
- Gincel, D., Zaid, H., & Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J*, *358*(Pt 1), 147-155.
- Goodell, S., & Cortopassi, G. (1998). Analysis of oxygen consumption and mitochondrial permeability with age in mice. *Mech Ageing Dev*, *101*(3), 245-256.
- Gordon, J. A., & Gattone, V. H., 2nd. (1986). Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol*, *250*(6 Pt 2), F991-998.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*, *177*(2), 751-766.
- Green, D. R., & Evan, G. I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell*, *1*(1), 19-30.
- 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.
- Hall, A. M., & Unwin, R. J. (2007). The not so 'mighty chondrion': emergence of renal diseases due to mitochondrial dysfunction. *Nephron Physiol*, *105*(1), p1-10.
- Haroun, M. K., Jaar, B. G., Hoffman, S. C., Comstock, G. W., Klag, M. J., & Coresh, J. (2003). Risk factors for chronic kidney disease: a prospective study of 23,534 men and women in Washington County, Maryland. *J Am Soc Nephrol*, *14*(11), 2934-2941.

- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Holmuhamedov, E. L., Ozcan, C., Jahangir, A., & Terzic, A. (2001). Restoration of Ca²⁺(+)-inhibited oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria by mitochondrial Ca²⁺(+) unloading. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 220(1-2), 135-140.
- Hood, D. A., Adhihetty, P. J., Colavecchia, M., Gordon, J. W., Irrcher, I., Joseph, A. M., Lowe, S. T., & Rungi, A. A. (2003). Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway. *Med Sci Sports Exerc*, 35(1), 86-94.
- Hu, M. L. (1990). *Measurement of protein thiol groups and GSH in plasma*. San Diego, CA: Methods in Enzymology.
- Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A., & Rizzuto, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24), 13807-13812.
- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., & Kobatake, Y. (1979). Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J Membr Biol*, 49(2), 105-121.
- Kireev, R. A., Tresguerres, A. C., Castillo, C., Salazar, V., Ariznavarreta, C., Vara, E., & Tresguerres, J. A. (2007). Effect of exogenous administration of melatonin and growth hormone on pro-antioxidant functions of the liver in aging male rats. *J Pineal Res*, 42(1), 64-70.
- Kokoszka, J. E., Coskun, P., Esposito, L. A., & Wallace, D. C. (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2278-2283.
- Kuznetsov, A. V., & Margreiter, R. (2009). Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(4), 1911-1929.
- Labbe, G., Pessayre, D., & Fromenty, B. (2008). Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 22(4), 335-353.
- Lal, N., Kumar, J., Erdahl, W. E., Pfeiffer, D. R., Gadd, M. E., Graff, G., & Yanni, J. M. (2009). Differential effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs

- on mitochondrial dysfunction during oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*, 490(1), 1-8.
- Lawen, A. (2003). Apoptosis-an introduction. *Bioessays*, 25(9), 888-896.
- Lemasters, J. J. (2005). Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology*, 129(1), 351-360.
- Lemasters, J. J., Theruvath, T. P., Zhong, Z., & Nieminen, A. L. (2009). Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1787(11), 1395-1401.
- Levey, A. S., Coresh, J., Balk, E., Kausz, A. T., Levin, A., Steffes, M. W., Hogg, R. J., Perrone, R. D., Lau, J., & Eknoyan, G. (2003). National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med*, 139(2), 137-147.
- Lieberthal, W., & Nigam, S. K. (2000). Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278(1), F1-F12.
- Liu, J., Yeo, H. C., Overvik-Douki, E., Hagen, T., Doniger, S. J., Chyu, D. W., Brooks, G. A., & Ames, B. N. (2000). Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*, 89(1), 21-28.
- Lumini-Oliveira, J., Ascensao, A., Pereira, C. V., Magalhaes, S., Marques, F., Oliveira, P. J., & Magalhaes, J. (2010). Long-term hyperglycaemia decreases gastrocnemius susceptibility to permeability transition. *Eur J Clin Invest*, 40(4), 319-329.
- Lyamzaev, K. G., Izyumov, D. S., Avetisyan, A. V., Yang, F. Y., Pletjushkina, O. Y., & Chernyak, B. V. (2004). Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis. *Acta Biochimica Polonica*, 51(2), 553-562.
- Mahesh, R., Bhuvana, S., & Begum, V. M. (2009). Effect of Terminalia chebula aqueous extract on oxidative stress and antioxidant status in the liver and kidney of young and aged rats. *Cell Biochem Funct*, 27(6), 358-363.
- Mannella, C. A. (2008). Structural diversity of mitochondria: functional implications. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 171-179.
- Marques-Aleixo, I., Oliveira, P. J., Moreira, P. I., Magalhaes, J., & Ascensao, A. (2012). Physical exercise as a possible strategy for brain protection: evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. *Prog Neurobiol*, 99(2), 149-162.

- Marques-Aleixo, I., Rocha-Rodrigues, S., Santos-Alves, E., Coxito, P. M., Passos, E., Oliveira, P. J., Magalhães, J., & Ascensão, A. (2012). In Vitro salicylate does not further impair aging-induced brain mitochondrial dysfunction. *Toxicology*, 302, 51-59.
- Martin, J. E., & Sheaff, M. T. (2007). Renal ageing. *J Pathol*, 211(2), 198-205.
- Mather, M., & Rottenberg, H. (2000). Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(2), 603-608.
- McCommis, K. S., McGee, A. M., Laughlin, M. H., Bowles, D. K., & Baines, C. P. (2011). Hypercholesterolemia increases mitochondrial oxidative stress and enhances the MPT response in the porcine myocardium: beneficial effects of chronic exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 301(5), R1250-1258.
- Monti, E., Prosperi, E., Supino, R., & Bottiroli, G. (1995). Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by adriamycin in the rat. *Anticancer Res*, 15(1), 193-197.
- Mota, M. P., Figueiredo, P. A., & Duarte, J. A. (2004). Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 4(1), 81-110.
- Muhlberg, W., & Platt, D. (1999). Age-dependent changes of the kidneys: pharmacological implications. *Gerontology*, 45(5), 243-253.
- Navarro, A., & Boveris, A. (2007). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(2), C670-C686.
- 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.
- Neustadt, J., & Pieczenik, S. R. (2008). Medication-induced mitochondrial damage and disease. *Mol Nutr Food Res*, 52(7), 780-788.
- 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), 591-595.
- O'Rourke, B. (2007). Mitochondrial ion channels. *Annu Rev Physiol*, 69, 19-49.
- O'Toole, J. F., Patel, H. V., Naples, C. J., Fujioka, H., & Hoppel, C. L. (2010). Decreased cytochrome c mediates an age-related decline of oxidative phosphorylation in rat kidney mitochondria. *Biochem J*, 427(1), 105-112.

- Oliveira, P. J. (2011). Mitochondria as a drug target in health and disease. *Curr Drug Targets*, 12(6), 761.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., & Ruggiero, F. M. (2010). Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radic Biol Med*, 48(10), 1286-1295.
- Penna, C., Mancardi, D., Rastaldo, R., & Pagliaro, P. (2009). Cardioprotection: A radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1787(7), 781-793.
- Pereira, C. V., Nadanaciva, S., Oliveira, P. J., & Will, Y. (2012). The contribution of oxidative stress to drug-induced organ toxicity and its detection in vitro and in vivo. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 8(2), 219-237.
- Pessayre, D., Mansouri, A., Berson, A., & Fromenty, B. (2010). Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol*(196), 311-365.
- Picard, M., Csukly, K., Robillard, M. E., Godin, R., Ascah, A., Bourcier-Lucas, C., & Burelle, Y. (2008). Resistance to Ca²⁺-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(2), R659-668.
- Pigoso, A. A., Uyemura, S. A., Santos, A. C., Rodrigues, T., Mingatto, F. E., & Curti, C. (1998). Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on calcium efflux in isolated rat renal cortex mitochondria and aspects of the mechanisms involved. *Int J Biochem Cell Biol*, 30(9), 961-965.
- Psarra, A. M. G., & Sekeris, C. E. (2009). Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1787(5), 431-436.
- Radak, Z., Chung, H. Y., & Goto, S. (2008). Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*, 44(2), 153-159.
- Ravagnan, L., Roumier, T., & Kroemer, G. (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol*, 192(2), 131-137.
- Rector, R. S., Thyfault, J. P., Laye, M. J., Morris, R. T., Borengasser, S. J., Uptergrove, G. M., Chakravarthy, M. V., Booth, F. W., & Ibdah, J. A. (2008). Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *J Physiol*, 586(Pt 17), 4241-4249.
- Romano, A. D., Serviddio, G., de Matthaeis, A., Bellanti, F., & Vendemiale, G. (2010). Oxidative stress and aging. *J Nephrol*, 23 Suppl 15, S29-36.

- Santos, M. S., Santos, D. L., Palmeira, C. M., Seiça, R., Moreno, A. J., & Oliveira, C. R. (2001). Brain and Liver mitochondria isolated from diabetic Goto-Kakizaki rats show different susceptibility to induced oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev*, 17(3).
- Sardao, V. A., Pereira, S. L., & Oliveira, P. J. (2008). Drug-induced mitochondrial dysfunction in cardiac and skeletal muscle injury. *Expert Opin Drug Saf*, 7(2), 129-146.
- Sastre, J., Pallardo, F. V., & Vina, J. (2003). The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med*, 35(1), 1-8.
- Satoh, M., Fujimoto, S., Horike, H., Ozeki, M., Nagasu, H., Tomita, N., Sasaki, T., & Kashihara, N. (2011). Mitochondrial damage-induced impairment of angiogenesis in the aging rat kidney. *Lab Invest*, 91(2), 190-202.
- Satrustegui, J., Pardo, B., & Del Arco, A. (2007). Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiological Reviews*, 87(1), 29-67.
- Scheffler, I. E. (1999). *Mitochondria*. New York: Wiley.
- Schmitt, R., & Cantley, L. G. (2008). The impact of aging on kidney repair. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294(6), F1265-1272.
- Schnellmann, R. G. (2001). Toxic Responses of the kidney. In J. D. Louis J. Casarett, Curtis D. Klaassen (Ed.), *The basic science of poisons* (6 ed., pp. 491-514). New York: McGraw-Hill.
- Schor, N., Santos, O. F. P. d., & Boim, M. A. (2000). Insuficiência Renal Aguda. In *GUIA PRÁTICO DE UROLOGIA* (pp. 65-71).
- Seidman, M. D., Khan, M. J., Bai, U., Shirwany, N., & Quirk, W. S. (2000). Biologic activity of mitochondrial metabolites on aging and age-related hearing loss. *American Journal of Otology*, 21(2), 161-167.
- Seo, A. Y., Xu, J., Servais, S., Hofer, T., Marzetti, E., Wohlgemuth, S. E., Knutson, M. D., Chung, H. Y., & Leeuwenburgh, C. (2008). Mitochondrial iron accumulation with age and functional consequences. *Aging Cell*, 7(5), 706-716.
- Servais, H., Ortiz, A., Devuyst, O., Denamur, S., Tulkens, P. M., & Mingot-Leclercq, M. P. (2008). Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis*, 13(1), 11-32.
- Serviddio, G., Bellanti, F., Romano, A. D., Tamborra, R., Rollo, T., Altomare, E., & Vendemiale, G. (2007). Bioenergetics in aging: mitochondrial proton leak in aging rat liver, kidney and heart. *Redox Rep*, 12(1), 91-95.

- Silva, J. P., & Coutinho, O. P. (2010). Free radicals in the regulation of damage and cell death – basic mechanisms and prevention. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 4(3), 144-167.
- Skulachev, V. P., Anisimov, V. N., Antonenko, Y. N., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Elichev, V. P., Filenko, O. F., Kalinina, N. I., Kapelko, V. I., Kolosova, N. G., Kopnin, B. P., Korshunova, G. A., Lichinitser, M. R., Obukhova, L. A., Pasyukova, E. G., Pisarenko, O. I., Roginsky, V. A., Ruuge, E. K., Senin, II, Severina, II, Skulachev, M. V., Spivak, I. M., Tashlitsky, V. N., Tkachuk, V. A., Vyssokikh, M. Y., Yaguzhinsky, L. S., & Zorov, D. B. (2009). An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochim Biophys Acta*, 1787(5), 437-461.
- Souid, A. K., Tacka, K. A., Galvan, K. A., & Penefsky, H. S. (2003). Immediate effects of anticancer drugs on mitochondrial oxygen consumption. *Biochem Pharmacol*, 66(6), 977-987.
- Territo, P. R., Mootha, V. K., French, S. A., & Balaban, R. S. (2000). Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F₀/F₁-ATPase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 278(2), C423-C435.
- Tessari, P., Deferrari, G., Robaudo, C., Vettore, M., Pastorino, N., De Biasi, L., & Garibotto, G. (1999). Phenylalanine hydroxylation across the kidney in humans rapid communication. *Kidney Int*, 56(6), 2168-2172.
- Thyfault, J. P. (2009). Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. *J Physiol* 587.
- Tota, B., Cerra, M. C., & Handy, R. D. (2009). Radical species, mitochondria and cardiac function Preface. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1787(7), 773-773.
- Trevisan, A., Nicolli, A., & Chiara, F. (2010). Are rats the appropriate experimental model to understand age-related renal drug metabolism and toxicity? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6(12), 1451-1459.
- 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), 1000-1005.
- 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(2), 431-441.

- Tsang, W. P., Chau, S. P. Y., Kong, S. K., Fung, K. P., & Kwok, T. T. (2003). Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sciences*, 73(16), 2047-2058.
- Tsujimoto, Y. (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol*, 195(2), 158-167.
- Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2007). Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*, 12(5), 835-840.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552(Pt 2), 335-344.
- Uyemura, S. A., Santos, A. C., Mingatto, F. E., Jordani, M. C., & Curti, C. (1997). Diclofenac sodium and mefenamic acid: potent inducers of the membrane permeability transition in renal cortex mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 342(2), 231-235.
- Vlassis, A. A., & Mela-Riker, L. (1987). Selenite-induced NAD(P)H oxidation and calcium release in isolated mitochondria: relationship to in vivo toxicity. *Mol Pharmacol*, 31(6), 643-646.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283(5407), 1482-1488.
- Weinert, B. T., & Timiras, P. S. (2003). Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol*, 95(4), 1706-1716.
- Wilson, M. R. (1998). Apoptosis: unmasking the executioner. *Cell Death Differ*, 5(8), 646-652.
- Wu, K. K. (1998). Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol*, 55(5), 543-547.
- Yap, L. P., Garcia, J. V., Han, D., & Cadenas, E. (2009). The energy-redox axis in aging and age-related neurodegeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(14), 1283-1298.
- Yu, W. (2006). Quantitative microscopic approaches for studying kidney functions. *Nephron Physiol*, 103(2), p63-70.
- Zhang, Q. L., & Rothenbacher, D. (2008). Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. *BMC Public Health*, 8, 117.
- Zoratti, M., Szabo, I., & De Marchi, U. (2005). Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta*, 1706(1-2), 40-52.