



Efeitos *in vitro* da fluoxetina e do diclofenac na funcionalidade mitocondrial hepática de ratos idosos

Dissertação apresentada com vista a obtenção de
2ºciclo 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
Magalhães

Autora: Camila da Silva Bomfim

Porto, Setembro 2013

Ficha de Catalogação

Bomfim, C.S (2013) Efeitos in vitro da fluoxetina e do diclofenac na funcionalidade mitocondrial hepática de ratos idosos. Porto: C.S. Bomfim. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

PALAVRAS-CHAVE : ENVELHECIMENTO; TOXICIDADE HEPÁTICA; BIOENERGÉTICA; ANTI-INFLAMATÓRIO; ANTIDEPRESSIVO.

Este trabalho foi elaborado no âmbito do projeto PTDC/DES/113580/2009 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.



Agradecimentos

A minha maior inspiração e apoio, eu dedico e agradeço do fundo da alma à minha Mãe,
Obrigada por estar sempre presente, por maior que seja a distância entre nós.
Nada seria possível sem o teu apoio.

Agradeço ao Gabriel, meu irmão, meu amigo.

Aos meu familiares e amigos que estiveram comigo nesta jornada.

E de uma maneira mais do que especial, agradeço a minha família que se criou no meio deste caminho. Guilherme e David nada faria sentido sem vocês.

Inês Gonçalves, nem tenho palavras para descrever a tua colaboração e a tua amizade.

Aos colegas do laboratório Pedro Coxito, Estela Alves, Sílvia Rodrigues, Inês Aleixo e Emanuel Passos.

Ao departamento de Patologia Clínica do Hospital S. João.

Ao Professor João T. Guimarães.

Aos meus orientadores, Professor Doutor António Ascensão e Professor Doutor José Magalhães, muito obrigada pela oportunidade, pela orientação e pela paciência.

Aqueles que não se encontram mais por aqui, mas são de uma importância indescritível em todos os momentos da vida.

Resumo

O envelhecimento é uma condição associada à disfunção mitocondrial em diferentes tecidos. Por outro lado, conduz também ao aumento do consumo de fármacos que, por sua vez, também induzem na sua maioria à disfunção mitocondrial. Essas condições podem contribuir para o aumento da deterioração da bioenergética mitocondrial em diversos tecidos, incluindo o fígado. O presente trabalho analisou comparativamente as respostas *in vitro* de mitocôndrias hepáticas (MH) a dois fármacos amplamente utilizados, diclofenac e fluoxetina, em animais adultos e idosos.

Foram utilizados ratos Wistar macho adultos (19 semanas) e idosos (106 semanas). Foi analisado *in vitro* o consumo de O_2 e potencial da membrana em condições basais e na presença de diclofenac e fluoxetina. Foi analisada a suscetibilidade mitocondrial à indução do poro de permeabilidade transitória (MPTP) por cálcio (Ca^{2+}), as atividades da aconitase e Mn-SOD, bem como o conteúdo de proteínas do grupo -SH. A sinalização apoptótica foi avaliada através da atividade das caspases 3, 8 e 9, do conteúdo de Bax, Bcl2, CypD sendo o conteúdo de ANT igualmente semiquantificado.

As mitocôndrias hepáticas de ratos idosos apresentaram menor resistência ao MPTP, níveis inferiores de CypD, valores superiores para a lag phase e maior atividade da Mn-SOD. Para além disto, não foram detectados efeitos do envelhecimento no stress oxidativo e na apoptose em MH de ratos idosos. Estas MH de ratos idosos não são afetadas adicionalmente em resposta aos fármacos testados.

PALAVRAS-CHAVE: ENVELHECIMENTO; TOXICIDADE HEPÁTICA; BIOENERGÉTICA; ANTI-INFLAMATÓRIO; ANTIDEPRESSIVO.

Abstract

Aging and drug-induced side effects may contribute to the deterioration of mitochondrial bioenergetics in many tissues, including liver. One hypothesis is that the combination of both stimuli accelerates the process of mitochondrial degradation, leading to progressive bioenergetic disruption. We therefore analyzed *in vitro* liver mitochondrial (LM) response to diclofenac and fluoxetine in old and adult animals.

Male-Wistar adult (19-wks) and aged (106-wks) rats were used. *In vitro* endpoints of oxygen consumption and membrane potential were evaluated in non-treated conditions and in the presence diclofenac and fluoxetine and the susceptibility to calcium-induced permeability transition pore (MPTP) was assessed. Aconitase and Mn-SOD activities and -SH contents were measured. Apoptotic signaling was followed by measuring caspase 3, 8 and 9 activities, Bax, Bcl2 and CypD contents. ANT content was semiquantified.

In general, aging compromised liver mitochondrias displayed a decreased resistance to MPTP, decreased CypD and increased Mn-SOD. No age effect was noted in LM. Despite no detected aging-effect on oxidative stress and apoptosis, also aging did not impair LM response to the studied drugs.

KEYWORDS: AGING; HEPATIC TOXICITY; BIOENERGETICS; ANTI-INFLAMATORY; ANTI-DEPRESSANT

Índice geral

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
Índice geral.....	XI
Lista de abreviaturas e símbolos.....	XII
Índice de figuras.....	XV
Índice de quadros.....	XVI
Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
2.1. Bioenergética mitocondrial.....	3
2.2. O papel da mitocondria na função e na doença hepática.....	8
2.3. Envelhecimento e a deterioração dos marcadores de saúde	2
2.4. Envelhecimento e doenças mitocondriais.....	15
2.5. Toxicidade hepática induzida por fármacos no envelhecimento.....	16
2.6. Efeitos da fluoxetina e do diclofenac na funcionalidade mitocondrial hepática.....	18
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, extração do plasma e fígado.....	23
4.2.2. Isolamento de mitocondrias hepáticas.....	23
4.2.3. Atividade respiratória mitocondrial.....	24
4.2.4. Determinação do potencial elétrico transmembranar.....	24
4.2.5. Swelling mitocondrial.....	25
4.2.6. Marcadores de stress oxidativo.....	26

4.2.7. Atividade das caspases.....	27
4.2.8. Western blotting / conteúdo proteico.....	28
4.3. Procedimentos estatísticos.....	29
5. Resultados.....	31
6. Discussão.....	37
7. Conclusões.....	43
Bibliografia.....	45

Lista de abreviaturas e símbolos

ADP	Adenosina Difosfato
ADP/O	Rácio entre ADP fosforilado e o oxigénio consumido
ADR's	Reações adversas aos fármacos
AD	Doença de Alzheimer
AIF	Fator indutor de apoptose
ANT	Translocador de nucleótido de adenina
Apaf-1	Protease ativadora de apoptose
BSA	Abulmina do soro de boi
ATP	Adenosina trifosfato
°C	Graus celcius
Ca²⁺	lão de cálcio
CAT	Catalase
CpyD	Ciclofilina D
ETC	Cadeia transportadora de eletrões
CuZnSOD	Isoforma citosólica de superóxido dismutase
DILI	Lesão hepatica induzida por drogas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERON	Espécies reativas de oxigénio e nitorgénio
EGF	Fator de crescimento epidermal
GH	Hormona do crescimento
GR	Glutationa reductase
GSH	Glutationa
GPx	Glutationa Peroxidase
HD	Doença de Huntington
H₂O₂	Peróxido de oxigénio
HSP	Proteínas de choque térmico
IAPs	Proteínas indutoras da apoptose
K⁺	lão potássio
LSEC	Celula endotelial sinusoidal hepática
MH	Mitocondrias hepáticas
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Mn-SOD	Isoforma mitocondrial de superoxido dismutase
mtDNA	DNA mitocondrial
MPTP	Poros de permeabilidade transitória mitocondrial
NADH	Dinucleótido de adenina nicotinamida reduzido
nM	Milimolar

O₂	Oxigênio
O₂^{•-}	Radical superóxido
OH^{•-}	Radical hidroxilo
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
RCR	Rácio de controle respiratório
RE	Retículo endoplasmático
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ciclo ácido tricarboxílico
TPP⁺	Ião Tetrafenilfosfonium
UCP	Proteínas desacopladoras
VDAC	Canal iônico dependente de voltagem
μM	Micromolar

Índice de figuras

Figura 1. O efeito do envelhecimento no tempo até a taxa máxima de "swelling" em MH. Os dados são médias $\pm$ SEM MH (0.5mg/mL proteína) obtidas de diferentes preparações mitocondriais para cada grupo experimental. A absorvância da suspensão mitocondrial foi medida a 540 nm. Um único pulso de Ca^{2+} de 35 μM foi adicionado a 0.5 mg de proteína mitocondrial/mL de indução do "swelling" sensível à ciclosporina-A. Ambas as preparações de idosos e adultos, foram incubados com diclofenac e Fluoxetina.

* vs. Adulto ($p < 0.05$), # vs. Controlo ($p < 0.05$).....34

Figura 2. A influência do envelhecimento na atividade das caspases 3, 8 e 9 do fígado. Os dados são médias $\pm$ SEM para o tecido hepático obtidas para cada grupo experimental. A atividade das caspases foi medida colorimetricamente por pNA liberado dos substratos específicos das caspases.

* vs. Adult ($p < 0.05$).....35

Figura 3. A influência do envelhecimento na expressão de ciclofilina D (cyp D) (A), Bax (B) and Bcl-2 (C) e Bax/Bcl-2 (D). Os dados são média $\pm$ SEM para MH obtidas de diferentes preparações, para cada grupo experimental. * vs. ($p < 0.05$).....35

Índice de quadros

Quadro 1. Descrição funcional dos complexos proteicos constituintes da ETC.....	5
Quadro 2. Fármacos hepatotóxicos e seus correspondentes efeitos deletérios na mitocôndria.....	11
Quadro 3. Apresenta os valores médios e respectivo desvio padrão do peso corporal, peso do fígado e alguns marcadores plasmáticos.....	31
Quadro 4. Apresenta os valores médios da taxa respiratória em estado 2, estado 3, estado 4, RCR e ADP/O, usando o substrato glutamato/malato, na ausência e na presença de diclofenac.....	32
Quadro 5. Apresenta a resposta média do potencial máximo da membrana desenvolvido e a Lag phase da fosforilação do ADP , com o substrato glutamato/malato, na ausência e na presença de diclofenac.....	33
Quadro 6. Apresenta os valores médios da atividade da aconitase, Mn-SOD e grupos-SH em mitocôndrias hepáticas isoladas do grupo de animais adultos e idosos.....	33

Introdução

O envelhecimento, mesmo na ausência de doença, está relacionado com a disfunção de diversos órgãos, incluindo o fígado (Hoare et al., 2010). Diversas teorias surgiram com o propósito de explicar estas alterações, sendo a teoria dos radicais livres referida com maior frequência. Esta teoria afirma que espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (ERONS) são produzidas na mitocôndria como resultado do transporte de eletrões na cadeia transportadora de eletrões (ETC). Estas ERONS induzem gradualmente modificações nos lípidos e proteínas membranares, ácidos nucleicos do DNA (Sastre et al., 2003). Neste sentido, a mitocôndria surge como o organelo chave nos diversos mecanismos responsáveis pela disfunção induzida pelo envelhecimento (Skulachev et al., 2009). Apesar de vários estudos sugerirem que não ocorrem alterações funcionais em mitocôndrias hepáticas com o envelhecimento (Ferreira et al., 2003; Ferreira et al., 1999), outros têm demonstrado a existência de sinais de lesões estruturais, bioquímicas e funcionais em mitocôndrias hepáticas com o envelhecimento, incluindo alterações na fosforilação oxidativa (OXPHOS) com consequente comprometimento da respiração e da produção de ATP, assim como uma acrescida suscetibilidade ao MPTP induzido por Ca^{2+} (Goodell & Cortopassi, 1998; Kokoszka et al., 2001; Mather & Rottenberg, 2000; O'Toole et al., 2010; Satoh et al., 2011; Serviddio et al., 2007).

A função mitocondrial em determinados órgãos pode ser afetada igualmente por outras situações deletérias, como sendo o uso de alguns fármacos. A suscetibilidade mitocondrial relativa a utilização desses fármacos é uma preocupação que têm conduzido à retirada de utilização de determinados agentes farmacológicos (Nadanaciva & Will, 2011a, 2011b; Pereira et al., 2009; Sardao et al., 2008).

As condições patológicas ou o próprio processo de envelhecimento estão associadas ao aumento do consumo de fármacos como diclofenac e a fluoxetina. O diclofenac, tem sido apontado como responsável pelo

comprometimento da função mitocondrial hepática *in vitro*, nomeadamente na menor produção de ATP, pelo aumento da suscetibilidade mitocondrial à indução do MPTP e pelo aumento da sinalização apoptótica (Al-Nasser, 1999; Battaglia et al., 2005; Masubuchi et al., 2002; Mingatto et al., 1996; Pigoso et al., 1998; Trost & Lemasters, 1997).

A fluoxetina, um importante agente antidepressivo, têm sido também associada à alterações na funcionalidade mitocondrial hepática devido ao comprometimento da OXPHOS (Souza et al., 1994), mas também é referida pela ação inibidora da indução do MPTP e da apoptose (Nahon et al., 2005).

O comportamento de mitocôndrias hepáticas de ratos idosos relativamente a presença dos fármacos anteriormente referidos ainda é desconhecido. Desta forma, o objetivo do estudo foi analisar as respostas de mitocôndrias hepáticas *in vitro* ao diclofenac e fluoxetina, comparando ratos idosos e adultos partindo da hipótese de que as mitocôndrias hepáticas de ratos idosos são mais afetadas na presenças dos fármacos referidos, quando comparados ao grupo dos adultos.

2. Revisão de literatura

2.1 Bionergética mitocondrial

O evento crucial para a evolução terrestre foi o aparecimento e acumulação de oxigénio (O₂), colocando um desafio à maioria dos seres vivos, até então exclusivamente anaeróbios (*Bioquímica organização molecular da vida*, 2008). O O₂, por permitir maior produção de energia através da oxidação da glucose, permitiu que os seres se tornassem mais complexos. Surgindo a partir das bactérias primitivas procarióticas, as células eucarióticas evoluem com características específicas como núcleo, cloroplastos, mitocôndrias, entre outros organelos (Addabbo et al., 2009). Segundo a teoria endossimbiótica proposta Lynn Margulis (Margulis & Bermudes, 1985), duas bactérias, uma hospedeira e outra simbiote, indicada como ancestral da mitocôndria, uniram-se. A bactéria convertida em simbiote respiratória permitiu, assim, uma grande produção energética de forma aeróbia (Pessayre et al., 2010). A informação genética da simbiote respiratória teria sido transferida para o núcleo da célula e parte desta informação teria ficado retida na mitocôndria (Scheffler, 2001).

As mitocôndrias estão presentes essencialmente em todas as células eucarióticas e têm como funções a regulação osmótica, a modulação do estado redox, o controle do pH, a regulação da apoptose (Skulachev, 2000), o metabolismo de xenobióticos e lípidos, homeostasia do Ca²⁺ e principalmente produção de ATP (Brookes et al., 2004). Estes organelos citoplasmáticos são únicos por possuírem o seu próprio DNA, e por serem compostos por uma membrana interna e uma externa, que delimitam o espaço intermembranar mitocondrial, e a matriz mitocondrial (Hood et al., 2006).

A membrana mitocondrial externa é permeável a uma grande parte das moléculas enquanto a membrana interna, mais seletiva, é considerada a grande barreira entre o citosol e a matriz mitocondrial (Mayer & Oberbauer, 2003). Na matriz mitocondrial está localizada a ETC, composta por complexos enzimáticos que são responsáveis pela produção de ATP (Johannsen & Ravussin, 2009). O processo de produção de ATP envolve um conjunto de

reações que ocorrem numa primeira fase no Citosol (transformação da glucose em piruvato) e numa fase final na mitocondria (na matriz mitocondrial através do piruvato desidrogenase forma-se acetil-CoA, produzindo no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) os equivalentes reduzidos NADH e FADH₂, que servem como doadores de elétrons (Fariss et al., 2005). Os elétrons doados pelo NADH e FADH₂ são transportados do complexo I ou II ao IV, sendo simultaneamente bombeados prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, gerando um gradiente protónico. No complexo V, esse gradiente é dissipado pela ATPase e os prótons reentram na matriz mitocondrial, permitindo a síntese de ATP através da fosforilação do ADP, denominada fosforilação oxidativa (Navarro & Boveris, 2007). O conjunto de oxidações e reduções de substratos orgânicos, que se realizam em várias etapas por compostos que se reduzem ao receberem elétrons de um composto oxidado, são denominadas reações redox. Essas reações geram um potencial redox, fazendo com que a matriz se torne negativamente carregada com o bombeamento de H⁺ e o espaço intermembranar positivamente carregado (Mari et al., 2010).

Os complexos mitocondriais possuem determinadas características e funções importantes, que podemos observar no quadro a seguir.

Quadro 1 : Descrição funcional dos complexos proteicos constituintes da ETC. Adaptado de (Monteiro et al., 2003)

Complexo	Substrato	Inibidores	Função
I -NADH: Coenzima Q reductase	Glutamato+Malato Malato + Piruvato / 2-oxoglutarato	Rotenona Óxido nítrico Neurotoxina 1-metil-4-Fenilpiridina (MPP+).	Oxidar NADH; Bombear prótons para o espaço intermembranar
II - Succinato: Ubiquinona reductase	Succinato	Ácido 3-nitropropiónico Malonato Óxido nítrico	Oxidar succinato em fumarato; Formar ubiquinol a partir da ubiquinona
III - Ubiquinol: Citocromo c reductase		Antimicina A	Extrusão de um próton para o espaço intermembranar; Transferir um eletrão para citocromo c
IV - Citocromo c oxidase		Cianeto Azoto Monóxido de carbono	Reduzir o O ₂ a H ₂ O; Bombear prótons para o espaço intermembranar
V - ATP sintase		Oligomicina	Sintetizar ATP utilizando o gradiente protonico gerado pelos complexos (I a IV)

Os eletrões transferidos pelos complexos mitocondriais ao longo da ETC, por fim reagem com o O₂ e prótons formando água (H₂O) (Pessayre et al., 2004). Cerca de 2% a 5% do O₂ consumido pode sofrer uma redução, formando espécies reativas (Scheffler, 2001).

As ERONS são átomos, ou moléculas, que apresentam na sua órbita externa um eletrão desemparelhado (Mari et al., 2010). Instáveis e altamente reativas, estes compostos interagem com um não-radical, convertem-se em radicais oxidados (Gutteridge & Halliwell, 1992). Na literatura são referidos com maior

frequência o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) cuja produção pode levar à formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), este por sua vez, leva à produção de hidroxilo ($HO\cdot$) um radical com elevado poder de oxidação, que pode causar danos a proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (Powers & Jackson, 2008). O óxido nítrico (NO), radical igualmente produzido na mitocondria pode inibir o complexo III (Ott et al., 2007), aumentar a produção de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ e quando reage juntamente com $O_2^{\cdot-}$, leva a formação de peroxinítrito ($ONOO\cdot$), um forte agente oxidante capaz de inibir o complexo I e II e danificar proteínas e o DNA (Powers & Jackson, 2008). As ERONS são subprodutos de reações bioquímicas, consideradas intermediárias de muitos processos fisiológicos. Desta forma, concentrações baixas de ERONS possuem um papel específico na sinalização redox (Mari et al., 2010), enquanto elevadas concentrações podem induzir danos celulares, responsáveis por processos patológicos (Kowaltowski et al., 2001). Os seres vivos possuem um conjunto de defesas antioxidantes que podem equilibrar a ação das ERONS. Estas podem ser divididas em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Benard & Rossignol, 2008). Entre os antioxidantes enzimáticos são conhecidos a superóxido desmutase (SOD), que catalisa a reação que transforma o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e H_2O (Powers & Jackson, 2008), a catalase (CAT), que atua na dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 (Benard & Rossignol, 2008), a glutatona peroxidase (GPX) e glutatona reductase (GR), que degradam e ressintetizam GSH em ciclos da sua forma oxidada para reduzida com o objetivo de catalisar a dismutação do H_2O_2 em H_2O (Powers & Jackson, 2008).

Como antioxidantes não enzimáticos são referidos a vitamina C, Vitamina E, vitamina A, que atuam na redução da oxidação do DNA e lipídios. A coenzima Q10, uma importante ubiquinona na transferência de eletrões e protões da ETC, apresenta um papel considerável na desativação do $O_2^{\cdot-}$. (Powers & Sen, 2000).

Quando a produção de ERONS supera a capacidade dos antioxidantes, ocorre o stress oxidativo (Ott et al., 2007). Células expostas a condições severas de stress oxidativo podem desencadear mecanismos de morte por apoptose

(Skulachev, 2000). Neste processo, o Ca^{2+} apresenta-se como um importante íon de sinalização, uma vez que desempenha um papel chave na estimulação da OXPHOS, através da estimulação da ATPase e do translocador de nucleotídeo de adenina (ANT) (Zoratti et al., 2005). Assim, a perda da homeostase do Ca^{2+} citosólico ou mitocondrial, pode gerar implicações na funcionalidade mitocondrial e morte celular (Szabadkai & Duchen, 2008). A acumulação de Ca^{2+} na matriz induz consequentemente a perda do potencial da membrana ($\Delta\psi$) (Zoratti & Szabo, 1995), que por sua vez estimula a formação do MPTP (Kowaltowski et al., 2001), o "swelling" e consequentemente ruptura da membrana mitocondrial externa e liberação de proteínas pro-apoptóticas para o citoplasma levando a morte celular (Szabadkai & Duchen, 2008).

A morte celular pode ocorrer por dois processos clássicos denominados necrose e apoptose (Richter, 1997). O primeiro processo ocorre em resposta a falhas adaptativas genéticas ou metabólicas que ocorrem de uma maneira accidental, caracterizada pela perda da integridade membranar, "swelling", extravasamento do conteúdo intermembranar e desintegração de organelos (Ziegler & Groscurth, 2004). O segundo, é um processo de morte celular programada. A apoptose é essencial para a manutenção da homeostase, desenvolvimento e renovação tecidual. Para além destas funções a apoptose está, igualmente, associada à várias doenças e ao próprio processo de envelhecimento, podendo ocorrer por duas vias de sinalização denominadas via extrínseca e via intrínseca (Hampton et al., 1998).

A via extrínseca, é desencadeada pelo Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) que induz a formação de um complexo de sinalização e ativação das caspases efetoras da apoptose (Skulachev, 2000) .

A via intrínseca, inclui a mitocôndria e o retículo endoplasmático (RE), uma vez que, a presença prolongada ou severa de alterações na funcionalidade do RE, podem desencadear mecanismos de morte celular (Xu et al., 2005). A via intrínseca, pode ser desencadeada por diversos fatores, incluindo concentrações elevadas de Ca^{2+} mitocondrial e ERONS. Esta via envolve o

aumento da permeabilidade da membrana externa e a liberação de proteínas apoptogênicas do espaço intermembranar para o citoplasma. Relacionado com o aumento da permeabilidade está a abertura do MPTP. Vários estudos têm sugerido que o MPTP é constituído/regulado por sub-unidades de ATPsintase, pelo ANT da membrana interna mitocondrial e pela ciclofilina D (CypD). Na regulação da abertura do poro têm sido descritas as moléculas das família Bcl-2, que são divididas em anti-apoptóticas e pro-apoptóticas, (Tsujimoto & Shimizu, 2002). Das proteínas pro-apoptóticas associadas à apoptose são referenciadas o citocromo C que se liga ao fator de ativação apoptose-protease (Apaf-1), desencadeando a sua oligomerização, formando juntamente com a pro-caspase 9 o complexo proteico denominado apoptossoma (Mayer & Oberbauer, 2003), a Smac/Diablo remove proteínas inibidoras da apoptose (IAP) da sua ligação com as caspases (Grivicich et al., 2007), HtrA2/Omi, AIF e DNaseG, consideradas facilitadoras da ativação das caspases (Tsujimoto & Shimizu, 2007). O aumento da permeabilidade da membrana e a abertura do MPTP, permite um aumento da concentração de solutos de alta densidade molecular na matriz mitocondrial. Como consequência ocorre o enturmescimento mitocondrial (swelling) que se repercute na ruptura da membrana mitocondrial externa. A perda da integridade da membrana externa, leva a que proteínas do espaço intermembranar passem para o citosol, desencadeando a ativação das caspases-3 e outras caspases efetoras, capazes de danificar proteínas citosólicas e nucleares e desencadeando a apoptose (Pessayre et al., 2012).

2.2 O papel da mitocondria na função e na doença hepática

O tecido hepático desempenha uma função central no metabolismo de xenobióticos, tornando-o suscetível aos seus efeitos tóxicos. Assim, as Lesões Hepáticas Induzidas por Drogas (DILI), são um dos motivos mais frequentes que impedem a aprovação de medicamentos pelas companhias farmacêuticas. Na farmacologia moderna, podem ser encontrados mais de 1000 fármacos capazes de induzir lesões hepáticas através de diferentes mecanismos (Begriche et al., 2011; Russmann et al., 2009; Xu et al., 2008) .

Os xenobióticos, após serem absorvidos pelo trato gastrointestinal, sem diluição sistêmica, chegam ao fígado e são metabolizados por um conjunto de reações. A fase I é caracterizada por reações redox ou hidrolíticas, responsáveis pela conversão do fármaco lipofílico em um metabolito, envolvendo principalmente o citocromo P450 hepático. A fase II refere-se a um conjunto de reações de conjugação, com destaque para a metilação e acetilação, outra conjugação importante ocorre com a GSH, que promove reações de bioinativação (Lee et al., 2011).

O processo metabólico dos xenobióticos induz a formação de metabolitos capazes de reagir com macromoléculas do tecido hepático como por exemplo a GSH e ao citocromo que podem formar metabolitos reativos (Lee et al., 2011), sendo considerado como bastante associados às DILI (Park et al., 2005; Pessayre, 1995). Estes compostos podem causar toxicidade directa, reações imunes ou de tolerância, dependendo da capacidade reativa e da taxa de formação dos mesmos (Pessayre et al., 2008).

Os metabolitos reativos podem desencadear diretamente hepatotoxicidade através de mecanismos toxicológicos (Haouzi et al., 2000), nomeadamente a diminuição da GSH, o aumento das concentrações de Ca^{2+} celular (Pessayre et al., 2008), a ativação de diversas enzimas dependentes do Ca^{2+} e o aumento de proteínas que contribuem para a fragmentação do DNA (Haouzi et al., 2000), como a p53. Esta proteína está associada a mutações genéticas e tumores, responsáveis pelo sequestro de proteínas anti-apoptóticas e de sobreexpressão de proteínas pro-apoptóticas (Pessayre et al., 2008). Por sua vez, estes eventos podem induzir a abertura do MPTP, a ruptura da membrana mitocondrial externa, com consequente libertação do citocromo c no citosol e a ativação da procaspase-3, desencadeando a apoptose (Haouzi et al., 2000; Pessayre et al., 2010).

Os metabolitos reativos, quando formados em quantidades intermédias podem desencadear a toxicidade sem maiores consequências para a função hepática (Pessayre et al., 2008).

As reações inflamatórias e sinalização do sistema imunitário podem também induzir a morte das células alvo através da formação de Fas-L e de $\text{TNF-}\alpha$.

Estes compostos conduzem à permeabilização da membrana e, consequentemente, à apoptose (Pessayre et al., 2010).

Os metabolitos reativos quando formados em quantidades reduzidas são incapazes de induzir ligações covalentes ou sinalizações inflamatórias insuficientes para promover reações imunes ou toxicidade directa. Este fenómeno é denominado reação de tolerância (Pessayre et al., 2008).

A mitocondria tem sido sugerida como o principal alvo das DILI, estando envolvida nos mecanismos anteriormente referidos, com alteração da sua funcionalidade. A disfunção mitocondrial pode incluir alterações de diferentes vias metabólicas e/ou comprometimento dos componentes mitocondriais, nomeadamente inibição ou desacoplamento da respiração mitocondrial, depleção de ATP, aumento das concentrações de ERONS, danos ao DNA mitocondrial e permeabilização da membrana (Pessayre et al., 1999). Para além disto, os anti-inflamatórios não-esteróides também estão associados com a depleção de NADH e GSH (Pessayre et al., 2008; Vickers, 2009), bem como ao comprometimento ou inibição directa da β -oxidação, principal via de oxidação de lípidos do fígado, seguida da secreção hepática de triglicerídeos, que pode induzir à acumulação de ácidos gordos e/ou triglicerídeos e consequentemente conduzir à esteatose. Esta subdivide-se em microvisicular, quando ocorre de forma aguda, e macrovisicular, quando ocorre de forma crónica. No caso da acumulação dos lípidos no tecido hepático, a hepatotoxicidade é atribuída à inibição dos complexos da cadeia respiratória, depleção de ATP e stress oxidativo (Pessayre et al., 1999; Vickers, 2009).

As alterações deletérias anteriormente descritas repercutem-se no aparecimento de diferentes doenças hepáticas, nomeadamente hepatite aguda, que pode ser classificada como: Citólise hepática aguda e Colestase hepática aguda (Andrade et al., 2009; Begeriche et al., 2011). Os fármacos podem causar esteatose hepática, esteato-hepatite, cirrose, dilatação sinusoidal, peliose e tumores malignos no fígado (Pessayre et al., 2008).

O quadro 2 sintetiza alguns dos efeitos mitocondriais de alguns fármacos.

Quadro 2: Fármacos hepatotóxicos e seus correspondentes efeitos deletérios na mitocondria (Begriche et al., 2011).

Fármaco	MPTP	Inibição directa da oxidação de ácidos gordos	Respiração mitocondrial desacoplada	Inibição directa da cadeia respiratória mitocondrial	Depleção e danos ao DNA mitocondrial
Acetaminophen (APAP)	+			+	+
Alpidem	+		+	+	
Amineptine		+			
Amiodarone	+	+	+	+	
Buprenorphine		+	+	+	
Diclofenac	+	+	+		
Didanosine (DDI)					+
acetaminophen (APAP)	+			+	
Fialuridine (FIAU)					+
Ibuprofen		+	+		
Nilutamide				+	
Nimesulide	+		+		
Panadiplon		+			
Perhexiline		+	+	+	
Pirprofen		+			
Salicylic acid	+	+	+		
Stavudine(d4T)					+
Tacrine			+		+
Tamoxifen		+	+	+	+
Tetracyclin (e derivados)				+	
Troglitazone	+			+	+
Valproic acid (VPA)	+	+			
Zidovudine (AZT)					+

2.3 Envelhecimento e a deterioração dos marcadores de saúde

O envelhecimento é um fenómeno biológico progressivo, endógeno, irreversível e deletério para o indivíduo, caracterizado por alterações estruturais e funcionais que podem ser apresentadas através de diversas manifestações celulares e/ou tecidulares na presença, ou não, de processos patofisiológicos (Vijg & Campisi, 2008). A componente genética determina a esperança de vida dos indivíduos e o comprometimento de importantes funções, nomeadamente a síntese proteica que por sua vez compromete a funcionalidade dos tecidos (Nair, 2005).

Embora os mecanismos biológicos associados à perda da funcionalidade tecidular durante o processo de envelhecimento não estejam completamente esclarecidos, várias teorias têm sido sugeridas. Entre os referidos modelos explicativos, a teoria dos radicais livres, proposta por Harman em 1956, têm sido a mais descrita na literatura. De acordo com esta teoria, o envelhecimento é o resultado da acumulação de danos oxidativos, induzidos por radicais livres que deste modo comprometem a funcionalidade mitocondrial de vários tecidos (Floyd et al., 2001) e assim a capacidade funcional dos mesmos. No caso do tecido muscular esquelético, estas alterações repercutem-se na diminuição do volume e número de fibras musculares que, por conseguinte, induzem a diminuição da força muscular, podendo levar à fadiga precoce e à diminuição do dispêndio energético induzido pela diminuição da atividade física (Nair, 2005). A diminuição da atividade física, por sua vez, contribui para o declínio da massa óssea, associada ao envelhecimento, como resultado da diminuição da replicação e atividade dos osteoblastos. Este é um mecanismo patogénico importante na osteoporose (Syed & Ng, 2010), patologia caracterizada por danos na microarquitetura do tecido ósseo que aumentam a sua fragilidade e a probabilidade de ocorrência de fraturas (Marie & Kassem, 2011). O condicionamento da atividade física, associado às lesões teciduais anteriormente descritas, favorece igualmente a alterações na composição corporal, como o aumento da acumulação de gordura abdominal, e assim da prevalência de doenças metabólicas e cardiovasculares (Nair, 2005). No decurso do processo de envelhecimento, ocorrem também alterações

importantes no sistema cardiovascular como a perda da elasticidade e o aumento da rigidez de importantes artérias, que resultam no aumento da pressão sistólica e da pós-carga ventricular, bem como hipertrofia e aumento dos tempos de relaxamento do ventrículo esquerdo, diminuição da frequência cardíaca, calcificação da válvula aórtica, diminuição da capacidade de resposta à estimulação adrenérgica e da reatividade dos baro e quimio-receptores, aumentando a circulação das catecolaminas (Cheitlin, 2003). Este conjunto de alterações são responsáveis pelo deterioramento da funcionalidade cardíaca e, assim, por algumas das doenças cardiovasculares observadas em indivíduos idosos, nomeadamente a hipertensão sistólica isolada, disfunção diastólica, insuficiência cardíaca, calcificação da válvula aórtica e arterosclerose (Higami & Shimokawa, 2000). Para além das doenças cardiovasculares, ósseas e músculo-esqueléticas, o envelhecimento, têm sido igualmente associado ao aumento da prevalência de doenças neurodegenerativas que estão relacionadas com disfunções neuroendócrinas, como por exemplo as doenças de Parkinson e de Alzheimer. As referidas condições patológicas favorecem o aumento do consumo de fármacos, incluindo potenciais nefro e hepatotóxicos que poderão comprometer a funcionalidade do tecido hepático e renal. Todavia, o próprio processo de envelhecimento tem sido associado a diversas alterações renais e hepáticas, como a redução progressiva da massa renal e do número de glomérulos, o aumento da incidência e severidade de esclerose glomerular, que contribuem para o aumento da prevalência de patologias como nefropatia isquémica e doença renal crónica (Pannarale et al., 2010; Presta et al., 2012; Weinstein & Anderson, 2010).

As repercussões do envelhecimento a nível hepático podem ser observadas no sinusóide hepático, com alterações nas células endoteliais, que sofrem principalmente de pseudocapilarização, um conjunto de alterações que contribuem para a redução do "clerance". As LSEC parecem também influenciar a atividade das "*Stellate cells*" que por sua vez, aumentam em número e tamanho, induzindo a protusão do revestimento endotelial para o lúmen sinusoidal, contribuindo para a diminuição do fluxo sanguíneo sinusoidal e para a progressão da fibrose hepática. As "*Kupffer cells*" apresentam

aumento em número e na atividade basal, que parece ser justificada pelo aumento dos processos inflamatórios induzidos pelo próprio envelhecimento. Neste processo, os macrófagos apresentam um papel importante nas respostas inflamatórias na imune-modulação, na endocitose e na capacidade do tecido hepático de metabolizar fármacos (Hilmer et al., 2007; Le Couteur et al., 2008; Mitchell et al., 2011; Warren et al., 2011). O metabolismo hepático dos fármacos depende de enzimas como a citocromo P450 e a NADPH, que sofrem um declínio associado com o envelhecimento, comprometendo a fase I do metabolismo dos fármacos (Schmucker & Sanchez, 2011). O comprometimento da fase II parece ser resultado da redução da glucuronidação, sulfatação e conjugação da glutathione, quando observado em ratos (Mitchell et al., 2011). Estas alterações contribuem para a diminuição do metabolismo e "clearance" dos fármacos, pela diminuição da síntese, do fluxo e excreção do ácido biliar acoplada ao aumento do colesterol hepático (Schmucker, 2001). O "clearance" dos fármacos depende ainda do nível de proteínas séricas, nomeadamente a albumina que apresenta níveis inferiores com o aumento da idade (Schmucker & Sanchez, 2011). Para além disto, o tecido hepático sofre alterações deletérias com o envelhecimento que se repercutem na diminuição da capacidade de regeneração do fígado, após uma recesso. Estas alterações associadas incluem, a redução da capacidade de resposta aos fatores de crescimento epidermal (EGF), a perda em número de receptores EGF hepatocelulares, a diminuição da síntese de DNA relacionada ao EGF e o nível reduzido da hormona do crescimento (GH) nos hepatócitos (Schmucker & Sanchez, 2011). No processo de regeneração do fígado, a proteína oxidante p66^{Shc}, é conhecida por ter um papel importante na estimulação da apoptose e do stress oxidativo (Haga et al., 2010). Nos hepatócitos, é observado o aumento da acumulação de proteínas insolúveis oxidadas como a lipofusina que está associada ao stress oxidativo crónico (Hoare et al., 2010). Ao nível das mitocôndrias hepáticas ocorre o aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HO\cdot$ e uma diminuição da atividade antioxidante (SOD, GSH e CAT). Estas alterações deletérias são responsáveis por uma diminuição da respiração mitocondrial, do potencial da membrana e

consequentemente da produção de ATP (Kumar et al., 2011; Navarro & Boveris, 2004; Samartsev & Kozhina, 2008). Por sua vez, podem induzir um aumento da produção de agentes oxidantes criando um ciclo vicioso. Os estudos mostram que o aumento de mutações e lesões oxidativas no DNA mitocondrial (mtDNA) está associada à disfunção mitocondrial e ao envelhecimento (Castro Mdel et al., 2012). Estas alterações estão associadas a doenças hepáticas típicas em idosos, incluindo cirrose hepática alcoólica, hepatite, doença hepática crônica e carcinoma hepatocelular (Gregg et al., 2012).

2.4 Envelhecimento e doenças mitocondriais

A mitocondria parece desempenhar um papel importante no processo de envelhecimento e nas doenças degenerativas associadas, uma vez que o mtDNA codifica 13 polipeptídeos dos complexos enzimáticos I, III, IV e V, que por sua vez determinam a eficiência da OXPHOS e produção de energia. Para além disso, o mtDNA está localizado muito próximo da ETC, a principal fonte de ERONS, tornando-o muito suscetível e constantemente exposto aos possíveis danos oxidativos. Os danos oxidativos no mtDNA podem repercutir em alterações da bioenergética mitocondrial, nomeadamente ETC, potencial da membrana, produção de ATP e consequentemente maior produção de ERONS, criando um ciclo vicioso que pode causar falhas na obtenção de energia. Estas alterações da funcionalidade mitocondrial repercutem-se no comprometimento da função dos diversos tecidos (Castro Mdel et al., 2012; Genova et al., 2004; Hiona & Leeuwenburgh, 2008; Serviddio et al., 2007; Wallace, 2010; Wei et al., 2009).

Os danos oxidativos a nível mitocondrial parecem afetar mais os tecidos com maior necessidade energética, como no caso do tecido cerebral, levando ao aparecimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (AD), a doença de Parkinson (PD) e a doença de Huntington (HD). A AD é caracterizada por disfunção na ETC, um aumento da produção de ERONS induzido pelo citocromo c oxidase, diminuição na produção de energia e, por

consequente, alterações no metabolismo energético. A PD está associada a inibição da respiração mitocondrial, inibição de complexo I e a uma maior produção de ERONS. A HD está associada a alterações da estrutura mitocondrial, para além de danos no metabolismo energético, alterações na sinalização de Ca^{2+} e potencial da membrana (Marques-Aleixo et al., 2012; Shankar, 2010; Swerdlow, 2011; Uranga et al., 2010). Para além disto, a mitocondria desempenha um papel chave na patogénese de doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento (Dai & Rabinovitch, 2009; Lifton et al., 2001). A disfunção mitocondrial no sistema cardiovascular está associada ao aumento da produção de ERONS, sendo a enzima NADPH oxidase localizada na membrana mitocondrial uma das principais fontes de radicais livres no tecido cardíaco (Dai et al., 2011). Como mecanismo de defesa, a atividade antioxidante das GR e GPx estabelecem um potencial ciclo vicioso através do consumo de NADPH. Estudos indicam que o estado redox da GSH:GSSH e o potencial redox de NAD/NADH e NADP/NADPH, importantes enzimas antioxidantes, apresentam níveis mais baixos no tecido cardíaco de ratos idosos com um impacto direto no metabolismo mitocondrial, prejudicando a função do tecido e induzindo o desenvolvimento de cardiopatologias (Dai et al., 2012; Kumaran et al., 2004).

No tecido muscular esquelético, a perda da força e massa muscular, conhecido como sarcopénia, é a principal característica associada ao envelhecimento e a mitocondria parece ser o fator chave neste processo, uma vez que a mitocondria é a principal fonte e alvo de ERONS (Figueiredo et al., 2009; Rossi et al., 2008).

2.5 Toxicidade hepática induzida por fármacos no envelhecimento

O processo de envelhecimento é complexo e envolve o comprometimento progressivo da funcionalidade dos múltiplos sistemas e tecidos, induzindo o aparecimento de diversas doenças. A multimorbidade induz ao prolongado uso de fármacos. Os idosos consomem de 2 a 5 medicamentos diariamente, e a polifarmácia acontece entre 20% e 50% nesta população. Consequentemente,

a suscetibilidade as reações adversas aos fármacos (ADR's) é 2 a 3 vezes mais em idosos, quando comparados a jovens adultos (Gareri et al., 1998; Triantafyllou et al., 2010). As reações aos fármacos também podem ser influenciadas pela variabilidade genética, pelas alterações farmacodinâmicas e farmacogenéticas e pela fragilidade geriátrica, condição que aumenta a vulnerabilidade a reações adversas, o que gera um maior risco de toxicidade incluindo a DILI (Turnheim, 2004).

As alterações farmacocinéticas são influenciadas por modificações fisiológicas decorrentes do envelhecimento, afetando a absorção, distribuição, biotransformação e eliminação dos fármacos (Mori et al., 2007). A absorção é influenciada pela redução da motilidade gastrointestinal, aumento do pH gástrico, que induz a absorção de drogas básicas e reduz a absorção de drogas ácidas (Triantafyllou et al., 2010). A distribuição dos fármacos é influenciada pelo fluxo sanguíneo, ligações as proteínas plasmáticas como albumina principal ligação para drogas ácidas. Para além das propriedades físico-químicas do fármaco, o aumento do tecido adiposo induz uma maior distribuição e acumulação de fármacos lipossolúveis podendo aumentar o risco a efeitos adversos. Adicionalmente, a diminuição da quantidade de água no organismo gera menor distribuição de fármacos hidrossolúveis. A biotransformação é um ponto crucial da farmacocinética. Este processo submete o fármaco a reações químicas que possibilitam a sua eliminação. Estas reações compreendem, a nível hepático, as reações de fase I e II. Este "clearance" é dependente do fluxo sanguíneo e de importantes atividades enzimáticas, principalmente da fase I que são negativamente influenciadas pelo envelhecimento (Gareri et al., 1998).

Entre os agentes hepatotóxicos o acetaminofeno (ou paracetamol) é um dos mais estudados, devido a sua relevância clínica e o seu perfil de segurança. Este é um fármaco muito utilizado pela população em geral, porém um potencial indutor de alterações hepáticas em casos de overdose, mas também por doses terapêuticas, principalmente quando associado a fatores de risco como subnutrição, consumo crónico de álcool e simultâneo consumo de alguns fármacos (Mitchell et al., 2011). O mecanismo responsável por estas alterações

parece envolver a excessiva formação de metabolitos tóxicos, NAPQI que podem interagir directamente com macromoléculas e causar peroxidação lipídica, danos no DNA, no stress oxidativo e elevada depleção de GSH que, por sua vez, é responsável pela neutralização do NAPQI. O envelhecimento pode atuar aumentando a suscetibilidade à toxicidade hepática (Mitchell et al., 2011; Palomero et al., 2001; Russmann et al., 2009).

O Isoniazid é um fármaco que apresenta maior risco de hepatotoxicidade entre indivíduos idosos, sendo caracterizado por necrose hepatocelular, em que o mecanismo da toxicidade segue o modelo da formação de metabólitos hepatotóxicos. A Nitrofurantoína pode causar uma variedade de lesões hepáticas (colestase, hepatite crónica, fibrose e cirrose) e o Diclofenac está associado a casos agudos de hepatites, icterícia e casos graves de falha hepática (Sarich et al., 1995; Triantafyllou et al., 2010). De seguida, analisaremos os efeitos do diclofenac e da fluoxetina, dois fármacos largamente utilizados na função mitocondrial hepática.

2.6 Efeitos da fluoxetina e do diclofenac na funcionalidade mitocondrial hepática

A fluoxetina é um fármaco que seletivamente inibe a reabsorção de serotonina, utilizado no tratamento de doenças neurológicas como depressão e a ansiedade, comercialmente conhecido como Prozac ou Serafem. A fluoxetina parece induzir a hepatotoxicidade e afetar a atividade de enzimas hepáticas através de mecanismos ainda não completamente conhecidos (Nahon et al., 2005; Nahon et al., 2008). Num estudo feito em ratos, observou-se que a exposição à fluoxetina incrementa, a nível serológico, as atividades da alanina transaminase (ALT), da asparto transaminase (AST) e da glutathione-S transferase (GST). As concentrações de grupos carbonilo e TBARS indicam o aumento da oxidação proteica e lipídica (Inkielewicz-Stepniak, 2011).

Segundo Souza e et al. (1994), a fluoxetina tem múltiplos efeitos deletérios no metabolismo energético de mitocôndrias hepáticas, nomeadamente inibição do estado 3 da respiração mitocondrial e menor rácio de controle respiratório.

Contudo, Nahon et al. (2005) demonstraram que a fluoxetina interage com VDAC, diminuindo a sua condutância e inibe a suscetibilidade à abertura do MPTP, a liberação de citocromo c, mitigando a morte celular por apoptose.

Para além da fluoxetina, são observadas alterações mitocondriais com a utilização de outros fármacos, incluindo diclofenac, um anti-inflamatório não esteróide (NSAID), frequentemente prescrito no tratamento de doenças reumáticas. A hepatotoxicidade, induzida pelo diclofenac ainda não foi completamente elucidada. Todavia, entre os mecanismos propostos estão a toxicidade idiossincrática, imunológica e metabólica. A ativação metabólica aparece com maior relevância, uma vez que diversos metabolitos reativos foram identificados como possíveis responsáveis pela hepatotoxicidade em estudos com humanos e animais. No entanto, outros estudos sugerem que o diclofenac, por si, pode ser a causa da hepatotoxicidade e não os seus metabolitos (Masubuchi et al., 2002). A nível mitocondrial, o diclofenac atua como desacoplador da OXPHOS comprometendo a síntese de ATP. Estudos recentes sugerem que o MPTP constitui um importante mecanismo de toxicidade hepática. O MPTP é caracterizado pela progressiva despolarização da membrana mitocondrial, dependente da acumulação excessiva de Ca^{2+} intramitocondrial que resulta em "*swelling*" mitocondrial, liberação de Ca^{2+} acumulado e diminuição do $\Delta\psi$. Embora o MPTP pareça ter um papel crucial na patogénese de lesões hepáticas induzidas pelo diclofenac, mais estudos são necessários no sentido de elucidar os mecanismos necessários por esta hepatotoxicidade (Lal et al., 2009; Masubuchi et al., 2002).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo fundamental do presente estudo foi analisar, *in vitro*, o efeito do diclofenac e da fluoxetina na funcionalidade mitocondrial hepática de ratos idosos e adultos.

3.2 Objetivos

Podemos definir como objetivos específicos deste estudo a análise das respostas mitocondriais hepáticas de animais adultos e idosos à exposição aos fármacos diclofenac e fluoxetina nos seguintes parâmetros do estudo da bioenergética mitocondrial, determinando:

- I. Parâmetros respiratórios associados ao consumo de O₂;
- II. Potencial elétrico transmembranar mitocondrial e *lag phase*;
- III. Marcadores de stress oxidativo e defesas antioxidantes;
- IV. Parâmetros de sinalização apoptótica;
- V. Tolerância à indução do MPTP por cálcio.

4. Metodologia

4.1 Caracterização da amostra

A amostra deste estudo foi constituída por 16 ratos Wistar macho. Apenas foram utilizados ratos machos, para evitar alterações homônio-dependentes na função/toxicidade mitocondrial na presença de fármacos. Durante o protocolo experimental, os animais foram mantidos em gaiolas colectivas (2 ratos por gaiola) em biotério com atmosfera normal (21°-22°C; 50%-60% humidade), comida e água *ad libitum* e num ciclo de 12h dia/noite. Os animais foram divididos em dois grupos: adultos [A] (n=8, idade 19 semanas) e idosos [I] (n=8, idade 106 semanas).

4.2 Protocolo experimental

4.2.1 Sacrificio dos animais, extração do plasma e fígado

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, entre as 9:00 e 10:00 da manhã, para evitar possíveis efeitos devido a variação diurna. Os animais foram sacrificados deslocamento cervical, e o sangue foi recolhido e imediatamente centrifugado (5000xg por 5 min a 4°C) sendo o plasma armazenado em -80°C para análises bioquímicas.

Após abertura da cavidade torácica o fígado foi rapidamente excisado, lavado, cuidadosamente seco e pesado. Uma porção do tecido foi rapidamente armazenada a -80°C para determinação da actividade das caspases

4.2.2 Isolamento de mitocondrias hepáticas

As mitocondrias hepáticas (MH) foram preparadas utilizando métodos convencionais de centrifugação diferencial. Resumidamente, o tecido foi lavado e cortado num meio de isolamento (0-4°C) contendo 250 mM sacarose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA e BSA, pH 7.4. Em seguida o tecido foi homogeneizado com um "Potter-Elvehjem". Após a homogeneização, foi centrifugado 800xg

durante 10 min, seguido de suspensão e uma centrifugação de 10000xg durante 10 min. O pellet mitocondrial foi resuspendido com a utilização de um pincel e centrifugado duas vezes a 10000xg durante 10 min. para a obtenção da suspensão mitocondrial final. O EGTA e a BSA foram omitidos do meio na última centrifugação. A concentração final de proteína mitocondrial foi determinada pelo método biureto, utilizando o BSA como padrão (Gornall et al., 1949).

Uma amostra de MH foi separada e congelada a -80°C para futuras análises. Outra amostra foi separada e tratada para a semiquantificação de proteínas por Western Blotting. As restantes mitocondrias foram utilizadas no período de 1-3 horas para ensaios *in vitro* do consumo de O₂, potencial transmembranar e "swelling". O índice de controlo respiratório (RCR) das mitocondrias isoladas foi determinado de acordo com o método de (Estabrook 1967).

4.2.3 Atividade respiratória mitocondrial

A função da respiração mitocondrial foi avaliada polarograficamente utilizando um eléctrodo de O₂ tipo Clark (Yellow Springs Instruments, OH), conectado a um registrador em papel (Linseis L200E). As reações ocorreram numa câmara de vidro com 2ml, termicamente controlada (25°C) e contendo um agitador magnético. Nesta câmara colocou-se 0.5 mg/ml de proteína mitocondrial, num tampão com 130 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM HEPES, 2.5 mM KH₂PO₄, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, pH 7.4. Após o período de equilíbrio de 1 min, a respiração mitocondrial foi iniciada pela adição de glutamato/malato (G/M) a concentração final de 10 e 5 mM cada, respectivamente. O estado 3 foi determinado após a adição de ADP (105 µM; 210 nmol total); O estado 4 foi mensurado como a taxa de consumo de O₂ após a fosforilação do ADP. O RCR (Estado 3 / Estado 4) e o ADP/O (Número de nmol de ADP fosforilado pelo número de nmol O₂ consumido), foram calculados de acordo com Estabrook (1967), utilizando 474 ngatom O/ml como o valor para a solubilidade de O₂ a 25°C em água bidestilada. Os parâmetros de medida para o consumo de O₂ em LM foram também avaliados na presença de diclofenac (50 µM), incubadas

no meio antes da adição de ADP.

4.2.4 Determinação do potencial elétrico transmembranar ($\Delta\psi$)

O $\Delta\psi$ foi estimado com base na atividade do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP⁺) utilizando um eletrodo seletivo para TPP⁺ preparado no nosso laboratório de acordo com Kamo, (Kamo, Muratsugu, Hongoh, & Kobatake, 1979) e usando como referência um eletrodo AgCL (Tacussel, Model MI 402). Ambos os eletrodos TPP⁺ e o de referência foram inseridos numa câmara a 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 $\Delta\psi$ obtidos à priori são ligeiramente sobrestimados. O $\Delta\psi$ foi estimado através da equação ao (25 °C): $\Delta\psi = 59 \times \log (v/V) - 59 \times \log (10 \Delta E/59-1)$ Legenda: v - volume mitocondrial V - volume do meio de incubação ΔE - deflexão do potencial do eletrodo a partir do estado basal um volume de matriz mitocondrial de 1,1 µl/mg de proteína foi assumido. As reações foram realizadas em 2 ml de tampão de reação contendo 130mM de sacarose, 50 mM de KCl, 5 mM de HEPES, 2,5 mM de KH₂PO₄, 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de EGTA, pH 7,4, suplementado com 3 µM de TPP⁺ e 0,5 mg/ml de proteína com a temperatura mantida a 25°C. A avaliação do $\Delta\psi$ foi realizada utilizando substratos para o complexo I (10 mM de glutamato e 5 mM de malato). Foi utilizado ADP (105 µM - 210nmol) para induzir um ciclo fosforilativo. A fase de latência, que reflete o tempo necessário para fosforilar o ADP adicionado, foi também medida. Quando aplicável, foi adicionado diclofenac à suspensão numa concentração final de 0,5 mM.

4.2.5 Swelling mitochondrial

As alterações do volume osmótico mitocondrial foram observadas através da monitorização da diminuição da absorvância a 540 nm com um espectrofotómetro Jasco V-630. O tempo até a velocidade máxima do "swelling" depois da adição de Ca^{2+} foi considerado com índice de suscetibilidade do MPTP. A reação foi realizada com agitação contínua a uma temperatura constante de 25°C. Os ensaios foram realizados num meio de reação de 1 ml e às mitocondrias hepáticas (0,5 mg proteína/ml) foram adicionadas rotenona (4 μM), succinato (10 mM), Ca^{2+} (35 μM) na ausência ou presença de diclofenac (50 μM) ou fluoxetina (50 μM). Foi realizado um controlo negativo com 1 μM de ciclosporina-A, um inibidor do MPTP (Broekemeier et al., 1989). Estudos anteriores constataram uma menor capacidade de retenção de Ca^{2+} com substratos do complexo I, quando comparados com substratos do complexo II (Fontaine et al., 1998). Neste sentido, todas as medidas envolvendo a indução do MPTP utilizaram como substrato o succinato.

4.2.6 Marcadores de stress oxidativo

O conteúdo mitocondrial basal de grupos-SH foram quantificadas por medição espectrofotométrica de acordo com o método proposto por Hu (1990). Em resumo, a suspensão mitocondrial contendo 5 mg/ml de proteína foi misturada a um tampão de 0.25 M Tris-Base pH 8.2 e 10 mM DTNB e o volume foi ajustado para 1 ml com etanol absoluto. O branco e as amostras foram preparados similarmente e incubados durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente e centrifugado a 3000xg por 10 minutos. A leitura espectrofotométrica foi efetuada a 414 nm. O conteúdo total de SH foi expresso em nanomoles por miligramas de proteína mitocondrial ($\epsilon_{414}=13.6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). A atividade da aconitase foi medida espectrofotometricamente pela monitorização da formação de cis- aconitase a partir do isocitrato a 240 nm a 25°C, como descrito anteriormente (Ascensao et al., 2005). As fracções mitocondriais foram resuspensas em um tampão contendo 50 mM Tris-HCl (pH

7.4) e 0.6 mM MnCl_2 para um volume final de 2 mg/mL. Posteriormente, foram recolhidos 25 μL de cada amostra e o volume foi ajustado a 500 μL . Durante a leitura, foi adicionado isocitrato (200 mM). Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de cis-aconitato por minuto ($\epsilon_{240}=3.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A atividade da superoxide dismutase (Mn-SOD) em MH foi mensurada espectrofotometricamente a 505nm utilizando um kit RANSOD (RANDOX, Random Labs, UK). Resumidamente, as MH foram diluídas num tampão de fosfato (10 mM, pH7.0) para uma concentração final de 0.5 mg/ml. Posteriormente, 1 mL de uma mistura de substratos (0.05 mmol/l Xantine and 0.025 mmol/l INT) e 30 μL de amostras mitocondriais foram adicionadas à cuvette e a reação foi iniciada pela adição de 150 μL xantina oxidase (80 U/l), mantida a 37°C por 3 minutos. A atividade de Mn-SOD foi expressa em U/mg de proteína calculada utilizando uma curva padrão.

4.2.7 Atividade das caspases

Para avaliação da atividade das caspases 3, 8 e 9, o homogeneizado de fígado foi incubado com um tampão de reação [25 mM Hepes, pH 7.4, 10% (w/v) sucrose; 10 mM DTT (ditiotretitol), 0.1%CHAPS e 100 μM do substrato da caspase Ac (N-acetil)-LEHD-pNA (p-nitroanilina) (Calbiochem)] por 2 h a 37°C. A atividade das caspases foi determinada seguindo a detecção do cromóforo pNA após a clivagem do substrato marcado Ac-LEHD-p-nitroanilide a 405 nm como previamente descrito (Lumini-Oliveira et al., 2011). O método foi calibrado com diferentes concentrações de p-nitroanilide (Calbiochem, UK). A atividade das caspases foi calculada pela liberação de p-Na para equivalente concentração de proteína.

4.2.8 Stern blotting / Conteúdo Proteico

Amostras de MH foram separadas por SDS/PAGE (15% geis) como descrito (Laemmli, 1970), sendo transferidas para uma membrana de nitrocelulose

(Hybond™ ECL™ GE Healthcare, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, U.K.), de acordo com o método de Locke et al., 1990. O conteúdo mitocondrial do translocador mitocondrial externo TOM20 foi utilizado proteína controlo. Para além disto, as membranas foram marcadas com Ponceau S para verificar a qualidade da transferência. Depois da transferência, ligações não específicas da membrana foram bloqueadas durante a noite com 5% (w/v) de leite em pó e TBST [Solução salina tri- tamponada (TBS) com 0,1% Tween 20], as membranas foram posteriormente incubadas com os seguintes anticorpos durante 8 horas a temperatura de 4°C: anti-Bcl-2 (1:1000; #2870 rabbit monoclonal IgG; Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA), anti-Bax (1:1000; #2772 rabbit polyclonal IgG; Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA), anti-CypD (1:1000; MSA04 mouse monoclonal IgG; MitoSciences, Eugene, Oregon, USA) e anti-TOM20 (1:1000; sc-11415 rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, USA). De seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários: horseradish-peroxidase-conjugated anti-mouse ou anti-rabbit IgG (1:1000; Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 2h. As proteínas foram visualizadas por quimiluminescência utilizando ECL Plus™ (GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), num ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad Laboratories, Amadora, Portugal) e analisadas com o programa de análise de imagem Image Lab software (Bio-Rad Laboratories, Amadora, Portugal). Os dados são representados como a intensidade da imunocoloração (unidades arbitrárias) e os resultados foram expressos como a variação percentual dos valores do grupo adulto.

4.3 Procedimentos estatísticos

A média e o erro padrão da média foram calculados para todas as variáveis em cada grupo. O teste t-student para medidas independentes foi utilizado para comparar diferenças entre os grupos e o pair sample t-test foi utilizado para comparar a diferença nos grupos. Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., version 18.0) foi utilizado para todas as análises. O nível de significância estabelecido foi 5%.

5. Resultados

Caracterização dos animais

No Quadro 3 estão apresentados os valores médios e respectivo desvio padrão do peso corporal, peso do fígado e alguns marcadores plasmáticos. Os animais idosos apresentaram um aumento significativo dos valores do peso, dos níveis plasmáticos de colesterol total e de HDL quando comparados aos adultos.

Quadro 3: Estudo animal

	Adultos	Idosos
Idade (semanas)	19	106*
Peso corporal(g)	510.8±14.6	657,3±24*
Peso do fígado(g)	14.6±0.8	16,3±0,9
Peso do fígado(g)/ Peso corporal (g)	28.6±1.5	26,6±1.9
Mitocondria do fígado (g/mg)	6.88±0.71	6.94±0.97
Plasma GPT/ALT (U/L)	42,5±4,6	46,75±7,1
Plasma GGT (U/L)	1,2±0,3	0,5±0,3
Plasma Colesterol (g/L)	54,5±5,5	133,8±18,9*
Plasma HDL (g/L)	32,83±2,89	78±11,04*

*Valores médios ± SEM, p<0.05 vs. adulto.

Consumo de oxigénio mitocondrial e potencial elétrico transmembranar

A respiração de MH nos animais adultos e velhos foi mensurada para identificar os efeitos dependentes do envelhecimento (Quadro 4). Da mesma forma, variações no $\Delta\psi$ foram determinadas utilizando como substratos G/M (Quadro 5). Os mesmos parâmetros foram utilizados na presença de diclofenac. No Quadro 4 estão representados os valores médios dos parâmetros respiratórios das MH isoladas do grupo de animais adultos e idosos. Utilizando o G/M como substratos para energizar o complexo I da ETC e na ausência de diclofenac, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos relativamente aos parâmetros analisados. A incubação com diclofenac resultou

no comprometimento da função mitocondrial relativamente ao estado 2, 3 e 4, assim como a diminuição do RCR e ADP/O. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros avaliados.

Quadro 4: Valores médios $\pm$ da taxa respiratória em estado 2, estado 3, estado 4, RCR e ADP/O, usando como substrato glutamato/malato (10/7,5 mM), na ausência e presença de diclofenac (50mM).

	Controlo		Diclofenac	
	Adulto	Idoso	Adulto	Idoso
Fígado				
E2	8.56 $\pm$ 1.77	8.20 $\pm$ 0.80	15.31 $\pm$ 1.27#	13.19 $\pm$ 1.04#
E3	41.02 $\pm$ 3.54	36.47 $\pm$ 5.61	33.94 $\pm$ 2.34#	26.72 $\pm$ 4.36#
E4	6.80 $\pm$ 0.55	5.02 $\pm$ 0.58	9.31 $\pm$ 0.94#	8.89 $\pm$ 1.21#
RCR	6.59 $\pm$ 0.65	7.30 $\pm$ 0.90	3.76 $\pm$ 0.28#	3.61 $\pm$ 0.39#
ADP/O	2.83 $\pm$ 0.65	2.41 $\pm$ 0.27	2.51 $\pm$ 0.10#	2.31 $\pm$ 0.13#

* vs. Adulto ($p < 0.05$). # vs. Controlo ($p < 0.05$)

Os dados são média $\pm$ para MH (0.5 mg/mL proteína) obtidos a partir de diferentes preparações mitocondriais para cada grupo experimental energizado com glutamato(10mM) e malato (7.5mM). A fosforilação oxidativa foi medida polarograficamente a 25°C, num volume total de 2 ml. O meio de reação e outros detalhes são descritos nos métodos. S2 (estado 2), S3 (estado 3) and S4 (estado 4) são expressos em natomO/min/mg prot. RCR - ratio de controle respiratório. ADP/O - número em nmol de ADP fosforilado por natom oxigénio consumido.

No Quadro 5 são apresentadas os valores do potencial transmembranar ($\Delta\psi$) e da *lag phase* das MH isoladas, na presença e na ausência de diclofenac nos grupos de animais adultos e idosos.

Relativamente ao $\Delta\psi$ máximo, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo de animais adultos e idosos na ausência de diclofenac.

Na presença de diclofenac foram observadas diminuições significativas do $\Delta\psi$ máximo no grupo de animais adultos e idosos quando comparados com os respectivos grupos de controlo (não tratados). A *lag phase* foi maior no grupo de animais idosos quando comparada com o grupo de animais adultos na ausência de diclofenac. Apenas para o grupo de animais adultos na presença de diclofenac foi observado o aumento da *lag phase*.

Quadro 5: valores do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\psi$) e da *lag phase* com o substrato glutamato/malato (10/7,5 mM), das mitocôndrias hepáticas isoladas do grupo de animais adultos e idosos, na ausência e presença de diclofenac (50mM).

Controlo			Diclofenac	
	Adulto	Velho	Adulto	Velho
Max $\Delta\psi$ (-mV)	228.57±1.97	221.60±3.8	215.87±1.57 [#]	210.52±4.12 [#]
Lag phase (s)	124.95±8.79	227.95±37.46*	191.05±19.61 [#]	196.27±10.01

*vs. Adulto; # vs. controle (p< 0.05).

Os dados são a média $\pm$ SEM para MH (0.5 mg/mL proteína) obtidas a partir de diferentes preparações mitocondriais para cada grupo experimental, energizadas com glutamato (10mM) mais malato (7.5mM). O quadro mostra a resposta média do potencial máximo da membrana desenvolvido (-mV) e a Lag phase da fosforilação do ADP em (s). O potencial transmembranar mitocondrial foi medido através de um elétrodo selectivo de TPP⁺ com um volume total de 2 mL a 25°C. O meio de reação e outros foram descritos nos métodos.

No Quadro 6 são apresentados os valores médios da atividade da aconitase (como um biomarcador indireto da produção de superóxido mitocondrial), Mn-SOD e o conteúdo de grupos -SH (como um marcador da oxidação de proteínas com grupos -SH) em MH isoladas do grupo de animais adultos e idosos. Dos parâmetros avaliados, observou-se apenas o aumento da atividade da Mn-SOD no grupo de animais idosos. Nos demais parâmetros não foram observadas diferenças entre os grupos.

Quadro 6: Valores médios $\pm$ SEM da atividade da aconitase, Mn-SOD e grupos-SH em MH isoladas do grupo de animais adultos e idosos.

Fígado		
	Adultos	Idosos
Aconitase (U / mg prot)	20.57 $\pm$ 5.51	20.95 $\pm$ 3.99
Mn-SOD (U / mg prot)	30.05 $\pm$ 4.21	47.49 $\pm$ 3.67*
Grupos-SH (nmol / mL / mg/prot)	63. 39 $\pm$ 3.50	56.75 $\pm$ 5.93

* vs. Adult (p < 0.05).

A figura 1 mostra os resultados relativos ao "swelling" mitocondrial (indicador de suscetibilidade à abertura do MPTP induzido por Ca^{2+}) na presença e na ausência de diclofenac e fluoxetina. Foi observado uma diminuição significativa na suscetibilidade à abertura no grupo de controlo de animais idosos.

O tempo até se verificar a maior taxa de "swelling" foi menor na presença de diclofenac para ambos os grupos.

Na presença de fluoxetina ocorreu a inibição do MPTP para MH do grupo de animais adultos e idosos na mesma magnitude que a ciclosporina A. Não foram observadas diferenças entre o grupo de ratos idosos e adultos em resposta ao uso de fármacos.

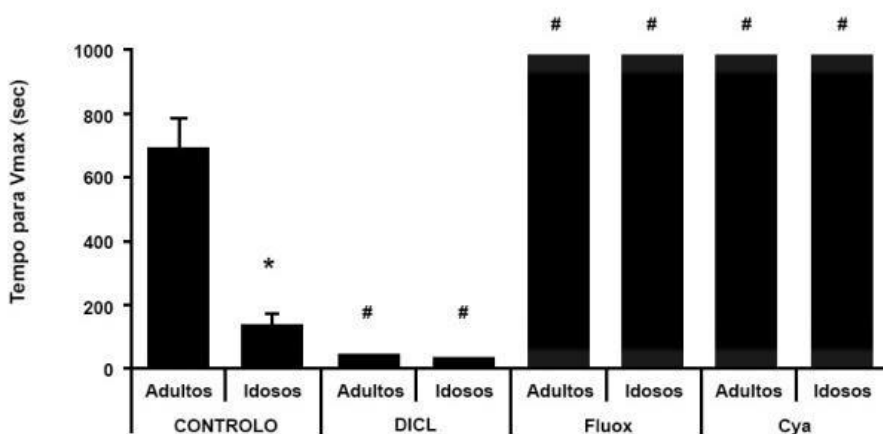


Figura 1 : O efeito do envelhecimento no tempo até a taxa máxima de "swelling" em MH. Os dados são médias $\pm$ SEM MH (0.5mg/mL proteína) obtidas de diferentes preparações mitocondriais para cada grupo experimental. A absorvância da suspensão mitocondrial foi medida a 540 nm. Um único pulso de Ca^{2+} de 35 μM foi adicionado a 0.5 mg de proteína mitocondrial/mL de indução do "swelling" sensível a ciclosporina-A. Ambas as preparações de idosos e adultos, foram incubados com diclofenac e Fluoxetina. * vs. Adulto ($p < 0.05$), # vs. Controle ($p < 0.05$).

Na figura 2 encontram-se representadas a atividade das caspases 3, 8 e 9. Não foram observadas diferenças significativas entre grupos na atividade das referidas proteases.

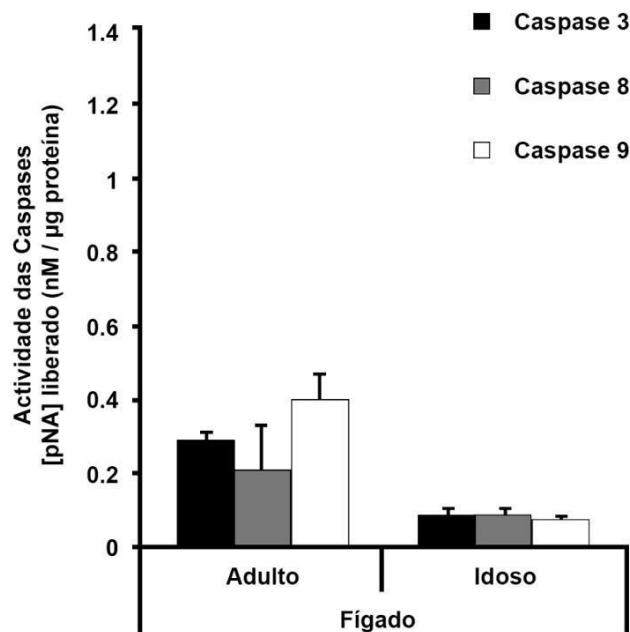


Figura 2: A influência do envelhecimento na atividade das caspases 3, 8 e 9 do fígado. Os dados são médias $\pm$ SEM para o tecido hepático obtidas para cada grupo experimental. A atividade das caspases foi medida colorimetricamente por pNA liberado dos substratos específico das caspases.

* vs. Adult ($p < 0.05$)

Na figura 3 estão representados os conteúdos de algumas proteínas associadas à apoptose (Bax, Bcl-2 e CypD). O conteúdo das proteínas da família Bcl-2 permaneceram inalterados. A expressão mitocondrial de CypD apresentou uma diminuição significativa no grupo de animais idosos quando comparados com o grupo de animais adultos.

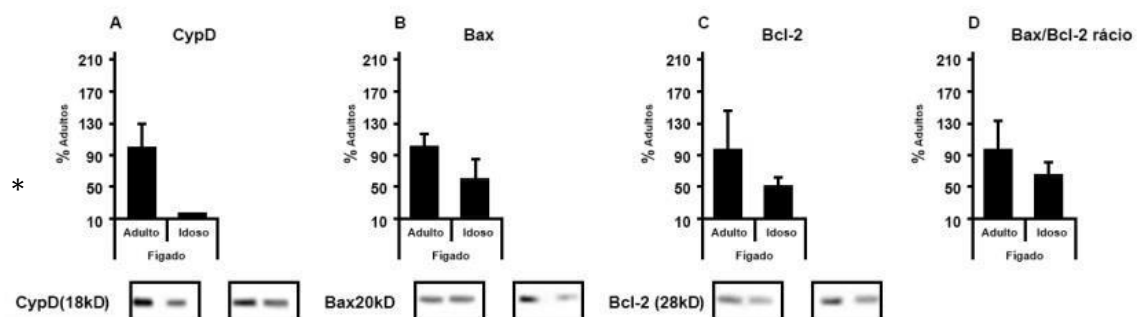


Figura3: A influência do envelhecimento na expressão de ciclofilina D (cyp D, A), Bax (B) and Bcl-2 (C) e Bax/Bcl-2 (D). Os dados são média $\pm$ SEM para MH obtidos de diferentes preparações, para cada grupo experimental. * vs. Adult ($p < 0.05$)

6. Discussão

O Envelhecimento e o consumo fármacos são duas condições que podem induzir alterações que comprometem a funcionalidade de diversos tecidos, incluindo o fígado (Beal, 2005; Pereira et al., 2012). É comum observar na população idosa o aumento de patologias e consequentemente o aumento do consumo de diversos fármacos. Os hepatócitos, devido ao seu papel central no metabolismo de xenobióticos, incluindo os fármacos, são vulneráveis aos seus efeitos deletérios (Malhi et al., 2010; Molpeceres et al., 2007).

A mitocôndria possui um papel central nas funções metabólicas das células, especialmente em tecidos com grande exigência metabólica, como é o caso do fígado.

A função mitocondrial pode ser afetada igualmente por outras situações incluindo o consumo de fármacos como diclofenac e fluoxetina. O diclofenac é um anti-inflamatório não esteróide (NSAID), frequentemente prescrito no tratamento de doenças reumáticas, inflamações e como analgésico para diminuição de dores em determinadas condições. A este fármaco têm sido apontados efeitos deletérios na funcionalidade mitocondrial hepática (Gomez-Lechon et al., 2003; Lal et al., 2009; Masubuchi et al., 2002; Masubuchi et al., 1999; Petrescu & Tarba, 1997; Siu et al., 2008). A Fluoxetina é uma molécula ativa do fármaco conhecido como Prozac, utilizado no tratamento de doenças neurológicas como ansiedade e depressão. Estudos demonstram efeitos distintos à exposição ao fármaco, como aumento do stress oxidativo (Inkielewicz-Stepniak, 2011) e seu efeito protector da morte celular por apoptose (Souza et al., 1994).

Com este estudo pretendeu-se perceber alterações mitocondriais a nível hepático associadas ao envelhecimento e se estas estão associadas a uma maior suscetibilidade à toxicidade induzida pelos fármacos diclofenac e fluoxetina. Para tal, foram analisados os parâmetros respiratórios, o potencial transmembranar, os marcadores de stress oxidativo e a sinalização apoptótica, assim como a suscetibilidade à abertura do MPTP.

Neste sentido, os ensaios em mitocôndrias isoladas constituem um modelo

bastante utilizado para avaliar o efeito modulador de vários estímulos e/ou da toxicidade de alguns fármacos, revelando-se como importantes sensores de toxicidade e/ou resposta tecidual a condições patofisiológicas (Oliveira, 2011). O envelhecimento está associado a alterações no tecido muscular esquelético, no dispêndio energético, na massa óssea, na atividade física, entre outras que favorecem alterações na composição corporal, incluindo acumulação de gordura (Gupta et al., 2000; Harris, 2002; Nair, 2005). No presente estudo e apesar do peso corporal do grupo de animais idosos ser significativamente superior, o peso do fígado assim como o rácio entre peso do fígado/peso corporal, não revelaram diferenças significativas. Os níveis de colesterol mais elevados são uma característica do envelhecimento, devido à capacidade de remoção do colesterol através da conversão em ácidos biliares estar progressivamente reduzida com o aumento da idade (Parini et al., 1999). O grupo de animais idosos apresentou níveis plasmáticos de colesterol total e HDL significativamente mais elevados, quando comparados aos adultos.

O tecido hepático é abundante em mitocôndrias e têm a função respiratória elevada, sendo fonte e, ao mesmo tempo, estando exposto a grandes quantidades de ERONS e ao stress oxidativo (Castillo et al., 2005). De fato, o envelhecimento está associado ao aumento da produção de radicais livres, diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, diminuição da respiração mitocondrial, diminuição do potencial da membrana e da produção de ATP (Kumar et al., 2011; Navarro, 2004; Navarro & Boveris, 2004; Samartsev & Kozhina, 2008). A mitocôndria têm sido sugerida como principal alvo de doenças hepáticas induzidas por fármacos, com alterações na sua funcionalidade (Pessayre et al., 1999). Neste sentido, o consumo de O₂ associado ao potencial transmembranar e aos ciclos fosforilativos induzidos por ADP (um estimulador da OXPHOS) têm sido utilizados como parâmetros *in vitro* da avaliação funcional da bioenergética mitocondrial. Foram analisados os seguintes parâmetros respiratórios: Estado 2, 3 e 4 e o RCR com o substrato G/M permitindo assim identificar e localizar o dano e a disfunção causada pelo estímulo *in vitro* (Ascensão et al., 2005). O RCR é um parâmetro importante da funcionalidade e da integridade das estruturas mitocondriais, bem como uma

medida de independência da taxa respiratória da síntese de ATP (Adam-Vizi & Chinopoulos, 2006; Ascensao et al., 2005). O estudo complementar do $\Delta\psi$ parece ser importante para a análise integrada da função mitocondrial, uma vez que reflete as reações energéticas básicas na manutenção da homeostasia celular. A *lag phase*, por sua vez, é um indicador da capacidade mitocondrial em recuperar rapidamente o seu potencial após a adição de ADP, isto é, avalia o tempo que as mitocôndrias demoram a readquirir o $\Delta\psi$ após a adição de ADP para induzir o ciclo fosforilativo, ou seja, configura-se de certa forma como um índice de capacidade fosforilativa.

O aumento significativo da *lag phase* nas MH do grupo de animais idosos sugere que estes animais apresentaram alterações da OXPHOS. Curiosamente, apesar desta alteração, o RCR e o rácio ADP/O (dois importantes indicadores da viabilidade mitocondrial (Brand & Nicholls, 2011)), não apresentaram alterações. Estes resultados sugerem que ocorreram algumas adaptações para proteger a síntese do ATP das alterações decorrentes do envelhecimento no fígado (Goodell & Cortopassi, 1998; Kokoska et al., 2001; Mather & Rottenberg, 2000). Estas funções, aparentemente inalteradas, são contrárias à diminuição do acoplamento entre o consumo de O_2 e à fosforilação do ADP em MH (Goodell & Cortopassi, 1998). Considerando o papel do stress oxidativo e os danos na bioenergética mitocondrial, particularmente quando associados ao envelhecimento (Skulachev et al., 2009), foram mensurados a atividade da aconitase e o conteúdo de grupos -SH. Não foram observadas alterações, com exceção do inesperado aumento na atividade da Mn-SOD observado em MH do grupo de animais idosos. Estes resultados parecem sugerir que as MH do grupo dos animais idosos desenvolveram uma adaptação face ao aumento da produção de ROS. Neste sentido, Mahesh et al. (2009), descreveram uma modulação específica do sistema anti-oxidante a nível sub-celular com o envelhecimento em MH.

Para além da produção de energia, a mitocôndria é um organelo chave na regulação da morte celular através da regulação da homeostase do Ca^{2+} citosólico (Crompton, 1999). Neste processo, o MPTP está envolvido no

controle de entrada e saída do Ca^{2+} entre os compartimentos celulares. O MPTP é dependente da capacidade mitocondrial de acumulação do Ca^{2+} que, em alguns casos, pode levar à morte celular (Lemasters et al., 2009). A suscetibilidade para a abertura do MPTP diminuiu com o aumento do stress oxidativo concomitantemente à acumulação do Ca^{2+} (Crompton, 1999). Neste estudo, a abertura do MPTP foi analisada através de ensaios de "swelling". Os resultados demonstraram o aumento significativo na suscetibilidade à abertura do MPTP induzido por Ca^{2+} do grupo de animais idosos sob condição de controle. Na presença dos fármacos estudados, as MH de animais idosos não apresentaram alterações na capacidade de acumulação de Ca^{2+} induzindo a abertura do MPTP embora fosse esperado o efeito protetor da fluoxetina (Nahon et al., 2005) e o aumento da suscetibilidade à abertura do MPTP na presença de diclofenac (Gomez-Lechon et al., 2003; Lal et al., 2009; Masubuchi et al., 2002; Masubuchi et al., 1999; Petrescu & Tarba, 1997; Siu et al., 2008).

O MPTP é influenciado por efetores fisiológicos, e a composição deste poro parece ser variável (Zoratti et al., 2005). Entretanto, o modelo clássico sugere que este seja formado/sintetizado principalmente pelas proteínas ANT, VDAC e CypD (Crompton, 1999). Outros estudos sugerem que estes componentes são dispensáveis (Chabi et al., 2008; McCommis et al., 2011; Picard et al., 2008). Todavia, a regulação do MPTP é associada ao CypD (Baines et al., 2005; Csukly et al., 2006; Matas et al., 2009). Neste sentido, os resultados deste estudo sugerem uma diminuição significativa no conteúdo de CypD em MH de animais idosos, concordando assim com a visão não clássica sobre o MPTP (Crompton, 1999). A possibilidade do envelhecimento alterar outros moduladores do MPTP, assim como as proteínas da família da Bcl-2 ou outros componentes/sintetizadores incluindo o ANT, parecem estar excluídas, uma vez que não foram observadas diferenças entre MH de ambos os grupos estudados. Apesar do aumento da suscetibilidade no grupo de animais idosos não foram observadas alterações na sinalização da apoptose, como pode ser visto no conteúdo de proteínas da família Bcl-2 e pela atividade das caspases 3, 8 e 9.

As respostas das MH de animais idosos à exposição dos fármacos estudados parecem estar associadas a um possível limiar e/ou a possíveis adaptações em algumas defesas anti-oxidantes, que podem contribuir para a proteção do tecido hepático contra novas agressões.

Para este estudo interessa ainda, mesmo que de forma especulativa, seja referido o papel que a atividade física poderia ter na modulação da função mitocondrial hepática de animais idosos, assim como na resposta das MH de animais idosos na presença dos fármacos estudados.

Neste sentido, a literatura tem sugerido que o exercício físico aumenta a resistência dos tecidos através da diminuição do stress oxidativo e do aumento da resistência à indução da morte celular por apoptose (Ascensao et al., 2006; Ascensao et al., 2011).

Embora estes estudos estejam centrados no tecido muscular e no tecido cardíaco, é possível que a prática de exercício físico também produzam efeitos moduladores importantes no tecido hepático. Relativamente ao tecido hepático, alguns estudos sugerem que a melhoria da função mitocondrial e hepática esteja associada ao exercício físico (Boveris & Navarro, 2008; Liu et al., 2000; Radak, Chung, & Goto, 2008; Ascensao et al., 2012; Gonçalves et al., 2013).

7. Conclusões

Os resultados do presente estudo confirmam o efeito nefasto do diclofenac na função mitocondrial hepática, bem como a ação protetora da fluoxetina contra a indução do MPTP.

Contudo, contrariamente à nossa hipótese inicial, o envelhecimento não incrementou adicionalmente o decréscimo da função mitocondrial hepática induzida por diclofenac nem alterou a resposta das mesmas na presença de fluoxetina.

Bibliografia

- Adam-Vizi, V., & Chinopoulos, C. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. In *Trends Pharmacol Sci* (Vol. 27, pp. 639-645). England.
- Addabbo, F., Montagnani, M., & Goligorsky, M. S. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. In *Hypertension* (Vol. 53, pp. 885-892). United States.
- Al-Nasser, I. A. (1999). Salicylate-induced kidney mitochondrial permeability transition is prevented by cyclosporin A. In *Toxicol Lett* (Vol. 105, pp. 1-8). Netherlands.
- Andrade, R. J., Agundez, J. A., Lucena, M. I., Martinez, C., Cueto, R., & Garcia-Martin, E. (2009). Pharmacogenomics in drug induced liver injury. *Curr Drug Metab*, 10(9), 956-970.
- 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.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J., Ferreira, R., Neuparth, M., Marques, F., Oliveira, J., & Duarte, J. (2005). Endurance training attenuates doxorubicin-induced cardiac oxidative damage in mice. In *Int J Cardiol* (Vol. 100, pp. 451-460). Ireland.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J. M., Ferreira, R., Neuparth, M. J., Marques, F., Oliveira, P. J., & Duarte, J. A. (2006). Endurance training limits the functional alterations of rat heart mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation. In *Int J Cardiol* (Vol. 109, pp. 169-178).
- Ascensao, A., & Magalhaes, J. 2006. Exercise and mitochondrial function in striated muscle. In A. J. Moreno, P. J. Oliveira, & M. C. Palmeira (Eds.), *Mitochondrial Pharmacology and Toxicology*: 237-270. Kerala: Transworld Research Network.
- 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. (2011). Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats. In *Clin Sci (Lond)* (Vol. 120, pp. 37-49). England.Ireland.
- Ascensao, A., Goncalves, I. O., Lumini-Oliveira, J., Marques-Aleixo, I., Dos Passos, E., Rocha-Rodrigues, S., Machado, N. G., Moreira, A. C., Oliveira, P. J., Torrella, J. R., & Magalhaes, J. (2012). Endurance training and chronic intermittent hypoxia modulate in vitro salicylate-induced hepatic mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion*, 12(6), 607-616.
- Battaglia, V., Salvi, M., & Toninello, A. (2005). Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria. In *J Biol Chem* (Vol. 280, pp. 33864-33872). United States.
- Beal, M. F. (2005). Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol*, 58(4), 495-505.
- Begrache, K., Massart, J., Robin, M. A., Borgne-Sanchez, A., & Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. In *J Hepatol* (Vol. 54, pp. 773-794). England.
- Benard, G., & Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal*, 10(8), 1313-1342.
- Bioquímica organização molecular da vida*. (2008). Lisboa: Lidel.
- Boveris, A., & Navarro, A. (2008). Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. In *Free Radic Biol Med* (Vol. 44, pp. 224-229). United States.
- 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. *American Journal Of Physiology. Cell Physiology*, 287(4), C817-C833.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-310.
- Carreira, R. S., Lee, Y., Ghochani, M., Gustafsson, A. B., & Gottlieb, R. A. (2010). Cyclophilin D is required for mitochondrial removal by autophagy in cardiac cells. In *Autophagy* (Vol. 6).
- 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.
- Castro Mdel, R., Suarez, E., Kraiselburd, E., Isidro, A., Paz, J., Ferder, L., & Ayala-Torres, S. (2012). Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys. In *Exp Gerontol* (Vol. 47, pp. 29-37). England.
- 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
- Cheitlin, M. D. (2003). Cardiovascular physiology-changes with aging. *Am J Geriatr Cardiol*, 12(1), 9-13.
- Dai, D. F., Chen, T., Johnson, S. C., Szeto, H., & Rabinovitch, P. S. (2012). Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 16(12), 1492-1526.
- Dai, D. F., Johnson, S. C., Villarin, J. J., Chin, M. T., Nieves-Cintrón, M., Chen, T., Marcinek, D. J., Dorn, G. W., 2nd, Kang, Y. J., Prolla, T. A., Santana, L. F., & Rabinovitch, P. S. (2011). Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. In *Circ Res* (Vol. 108, pp. 837-846). United States.

- Dai, D. F., & Rabinovitch, P. S. (2009). Cardiac aging in mice and humans: the role of mitochondrial oxidative stress. In *Trends Cardiovasc Med* (Vol. 19, pp. 213-220). United States.
- Fariss, M. W., Chan, C. B., Patel, M., Van Houten, B., & Orrenius, S. (2005). Role of mitochondria in toxic oxidative stress. In *Mol Interv* (Vol. 5, pp. 94-111). United States.
- 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.
- Ferreira, F. M., Seica, R., Santos, M. S., & Palmeira, C. M. (1999). Age-related alterations in liver mitochondrial bioenergetics of diabetic Goto-Kakizaki rats. In *Acta Diabetol* (Vol. 36, pp. 173-177). Germany.
- Figueiredo, P. A., Powers, S. K., Ferreira, R. M., Amado, F., Appell, H. J., & Duarte, J. A. (2009). Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle. In *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (Vol. 64, pp. 927-939). United States.
- Floyd, R. A., West, M., & Hensley, K. (2001). Oxidative biochemical markers; clues to understanding aging in long-lived species. In *Exp Gerontol* (Vol. 36, pp. 619-640). England.
- Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F., & Bernardi, P. (1998). Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem*, 273(20), 12662-12668.
- Gareri, P., Stilo, G., Bevacqua, I., Mattace, R., Ferreri, G., & De Sarro, G. (1998). Antidepressant drugs in the elderly. In *Gen Pharmacol* (Vol. 30, pp. 465-475). England.
- Genova, M. L., Pich, M. M., Bernacchia, A., Bianchi, C., Biondi, A., Bovina, C., Falasca, A. I., Formiggini, G., Castelli, G. P., & Lenaz, G. (2004). The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann N Y Acad Sci*, 1011, 86-100.

- Giorgio, V., Soriano, M. E., Basso, E., Bisetto, E., Lippe, G., Forte, M. A., & Bernardi, P. (2010). Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. In *Biochim Biophys Acta* (Vol. 1797, pp. 1113-1118). Netherlands.
- Gomez-Lechon, M. J., Ponsoda, X., O'Connor, E., Donato, T., Jover, R., & Castell, J. V. (2003). Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes. In *Toxicol In Vitro* (Vol. 17, pp. 675-680). England.
- Gomez-Lechon, M. J., Ponsoda, X., O'Connor, E., Donato, T., Castell, J. V., & Jover, R. (2003). Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. In *Biochem Pharmacol* (Vol. 66, pp. 2155-2167). England.
- Gonçalves, I. O., Oliveira, P. J., Ascensao, A., & Magalhães, J. (2013). Exercise as a therapeutic tool to prevent mitochondrial degeneration in nonalcoholic steatohepatitis. *European Journal of Clinical Investigation*, n/a-n/a.
- Goodell, S., & Cortopassi, G. (1998). Analysis of oxygen consumption and mitochondrial permeability with age in mice. In *Mech Ageing Dev* (Vol. 101, pp. 245-256). Ireland.
- 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.
- Gregg, S. Q., Gutierrez, V., Robinson, A. R., Woodell, T., Nakao, A., Ross, M. A., Michalopoulos, G. K., Rigatti, L., Rothermel, C. E., Kamileri, I., Garinis, G. A., Stolz, D. B., & Niedernhofer, L. J. (2012). A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology*, 55(2), 609-621.
- Gunter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R., & Gunter, K. (2000). Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. In *Cell Calcium* (Vol. 28, pp. 285-296). Scotland.
- Gupta, G., Cases, J. A., She, L., Ma, X. H., Yang, X. M., Hu, M., Wu, J., Rossetti, L., & Barzilai, N. (2000). Ability of insulin to modulate hepatic glucose production in aging rats is impaired by fat accumulation. *Am J Physiol*

- Endocrinol Metab, 278(6), E985-991.
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1992). Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med*, 12(1), 93-95.
- Haga, S., Morita, N., Irani, K., Fujiyoshi, M., Ogino, T., Ozawa, T., & Ozaki, M. (2010). p66Shc has a pivotal function in impaired liver regeneration in aged mice by a redox-dependent mechanism. *Lab Invest*, 90(12), 1718-1726.
- Hampton, M. B., Fadeel, B., & Orrenius, S. (1998). Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 854, 328-335.
- Haouzi, D., Lekehal, M., Moreau, A., Moulis, C., Feldmann, G., Robin, M. A., Letteron, P., Fau, D., & Pessayre, D. (2000). Cytochrome P450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*, 32(2), 303-311.
- Harris, T. B. (2002). Invited commentary: body composition in studies of aging: new opportunities to better understand health risks associated with weight. *Am J Epidemiol*, 156(2), 122-124; discussion 125-126.
- Higami, Y., & Shimokawa, I. (2000). Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res*, 301(1), 125-132.
- Hilmer, S. N., Cogger, V. C., & Le Couteur, D. G. (2007). Basal activity of Kupffer cells increases with old age. In *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (Vol. 62, pp. 973-978). United States.
- Hiona, A., & Leeuwenburgh, C. (2008). The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. In *Exp Gerontol* (Vol. 43, pp. 24-33) England.
- Hoare, M., Das, T., & Alexander, G. (2010). Ageing, telomeres, senescence, and liver injury. In *J Hepatol* (Vol. 53, pp. 950-961). England.

- Hood, D. A., Irrcher, I., Ljubicic, V., & Joseph, A. M. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. In *J Exp Biol* (Vol. 209, pp. 2265-2275). England.
- Inkielewicz-Stepniak, I. (2011). Impact of fluoxetine on liver damage in rats. *Pharmacol Rep*, 63(2), 441-447.
- Johannsen, D. L., & Ravussin, E. (2009). The role of mitochondria in health and disease. In *Curr Opin Pharmacol* (Vol. 9, pp. 780-786). England.
- 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. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 98, pp. 2278-2283). United States.
- Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. In *FEBS Lett* (Vol. 495, pp. 12-15). Netherlands.
- Kumar, P., Kale, R. K., & Baquer, N. Z. (2011). Estradiol modulates membrane-linked ATPases, antioxidant enzymes, membrane fluidity, lipid peroxidation, and lipofuscin in aged rat liver. *J Aging Res*, 2011, 580245.
- Kumaran, S., Savitha, S., Anusuya Devi, M., & Panneerselvam, C. (2004). L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid reverse the age-related deficit in glutathione redox state in skeletal muscle and heart tissues. In *Mech Ageing Dev* (Vol. 125, pp. 507-512). Ireland.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- 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.
- Le Couteur, D. G., Warren, A., Cogger, V. C., Smedsrod, B., Sorensen, K. K.,

- De Cabo, R., Fraser, R., & McCuskey, R. S. (2008). Old age and the hepatic sinusoid. *Anat Rec (Hoboken)*, 291(6), 672-683.
- Lee, K. S., Oh, S. J., Kim, H. M., Lee, K. H., & Kim, S. K. (2011). Assessment of reactive metabolites in drug-induced liver injury. *Arch Pharm Res*, 34(11), 1879-1886.
- Lifton, R. P., Gharavi, A. G., & Geller, D. S. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. In *Cell* (Vol. 104, pp. 545-556). United States.
- 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.
- Locke, M., Noble, E. G., & Atkinson, B. G. (1990). Exercising mammals synthesize stress proteins. *Am J Physiol*, 258(4 Pt 1), C723-729.
- Lumini-Oliveira, J., Magalhaes, J., Pereira, C. V., Moreira, A. C., Oliveira, P. J., & Ascensao, A. (2011). Endurance training reverts heart mitochondrial dysfunction, permeability transition and apoptotic signaling in long-term severe hyperglycemia. In *Mitochondrion* (Vol. 11, pp. 54-63). Netherlands.
- Mahesh, R., Bhuvana, S., & Hazeena 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 Biochemistry and Function*, 27(6), 358-363.
- Malhi, H., Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2010). Hepatocyte death: a clear and present danger. In *Physiol Rev* (Vol. 90, pp. 1165-1194). United States.
- Margulis, L., & Bermudes, D. (1985). Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis*, 1, 101-124.
- Mari, M., Colell, A., Morales, A., von Montfort, C., Garcia-Ruiz, C., & Fernandez-Checa, J. C. (2010). Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 12(11), 1295-1331.

- Marie, P. J., & Kassem, M. (2011). Extrinsic mechanisms involved in age-related defective bone formation. In *J Clin Endocrinol Metab* (Vol. 96, pp. 600-609). United States.
- 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.
- Masubuchi, Y., Nakayama, S., & Horie, T. (2002). Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats. In *Hepatology* (Vol. 35, pp. 544-551). United States.
- Masubuchi, Y., Yamada, S., & Horie, T. (1999). Diphenylamine as an important structure of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. In *Biochem Pharmacol* (Vol. 58, pp. 861-865). England.
- Mather, M., & Rottenberg, H. (2000). Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. In *Biochem Biophys Res Commun* (Vol. 273, pp. 603-608). United States.
- Mayer, B., & Oberbauer, R. (2003). Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci*, 18, 89-94.
- McCommis KS, McGee AM, Laughlin MH, Bowles DK, Baines CP. 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* 2011; 301:R1250-8.
- Melov, S., Coskun, P., Patel, M., Tuinstra, R., Cottrell, B., Jun, A. S., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M., Goodman, S. I., Huang, T. T., Miziorko, H., Epstein, C. J., & Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(3), 846-851.
- Mingatto, F. E., Santos, A. C., Uyemura, S. A., Jordani, M. C., & Curti, C. (1996). In vitro interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on

- oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. In *Arch Biochem Biophys* (Vol. 334, pp. 303-308). United States.
- Mitchell, S. J., Kane, A. E., & Hilmer, S. N. (2011). Age-related changes in the hepatic pharmacology and toxicology of paracetamol. *Curr Gerontol Geriatr Res*, 2011, 624156.
- Molpeceres, V., Mauriz, J. L., Garcia-Mediavilla, M. V., Gonzalez, P., Barrio, J. P., & Gonzalez-Gallego, J. (2007). Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. In *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (Vol. 62, pp. 687- 695). United States.
- Monteiro, P., Oliveira, P. J., Goncalves, L., & Providencia, L. A. (2003). Mitochondria: role in ischemia, reperfusion and cell death. *Rev Port Cardiol*, 22(2), 233-254.
- Mori, K., Blackshear, P. E., Lobenhofer, E. K., Parker, J. S., Orzech, D. P., Roycroft, J. H., Walker, K. L., Johnson, K. A., Marsh, T. A., Irwin, R. D., & Boorman, G. A. (2007). Hepatic transcript levels for genes coding for enzymes associated with xenobiotic metabolism are altered with age. In *Toxicol Pathol* (Vol. 35, pp. 242-251). United States.
- Nadanaciva, S., & Will, Y. (2011a). Investigating mitochondrial dysfunction to increase drug safety in the pharmaceutical industry. In *Curr Drug Targets* (Vol. 12, pp. 774-782). Netherlands.
- Nadanaciva, S., & Will, Y. (2011b). New insights in drug-induced mitochondrial toxicity. In *Curr Pharm Des* (Vol. 17, pp. 2100-2112). Netherlands.
- Nadtochiy, S. M., Tompkins, A. J., & Brookes, P. S. (2006). Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection. In *Biochem J* (Vol. 395, pp. 611-618). England.
- Nahon, E., Israelson, A., Abu-Hamad, S., & Varda, S. B. (2005). Fluoxetine (Prozac) interaction with the mitochondrial voltage-dependent anion

- channel and protection against apoptotic cell death. In *FEBS Lett* (Vol. 579, pp. 5105-5110). Netherlands.
- Nair, K. S. (2005). Aging muscle. In *Am J Clin Nutr* (Vol. 81, pp. 953-963). United States.
- Navarro, A. (2004). Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. In *Mol Aspects Med* (Vol. 25, pp. 37-48). England.
- Navarro, A., & Boveris, A. (2004). Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. In *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (Vol. 287, pp. R1244-1249). United States.
- Navarro, A., & Boveris, A. (2007). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. In *Am J Physiol Cell Physiol* (Vol. 292, pp. C670-686). United States.
- 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. In *Biochem J* (Vol. 427, pp. 105-112). England.
- Oliveira, P. J. (2011). Mitochondria as a drug target in health and disease. In *Curr Drug Targets* (Vol. 12, pp. 761). Netherlands.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922.
- Palomero, J., Galan, A. I., Munoz, M. E., Tunon, M. J., Gonzalez-Gallego, J., & Jimenez, R. (2001). Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. In *Free Radic Biol Med* (Vol. 30, pp. 836-845). United States.
- Pannarale, G., Carbone, R., Del Mastro, G., Gallo, C., Gattullo, V., Natalicchio, L., Navarra, A., & Tedesco, A. (2010). The aging kidney: structural changes. In *J Nephrol* (Vol. 23 Suppl 15, pp. S37-40). Italy.
- Parini, P., Angelin, B., & Rudling, M. (1999). Cholesterol and lipoprotein metabolism in aging: reversal of hypercholesterolemia by growth

- hormone treatment in old rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(4), 832- 839.
- Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M., & Williams, D. P. (2005). The role of metabolic activation in drug-induced epatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 177-202.
- Pereira, C. V., Moreira, A. C., Pereira, S. P., Machado, N. G., Carvalho, F. S., Sardao, V. A., & Oliveira, P. J. (2009). Investigating drug-induced mitochondrial toxicity: a biosensor to increase drug safety? *Curr Drug Saf*, 4(1), 34-54.
- 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. (1995). Role of reactive metabolites in drug-induced hepatitis. *J Hepatol*, 23 Suppl 1, 16-24.
- Pessayre, D., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M. A., Letteron, P., Moreau, R., & Mansouri, A. (2012). Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev*, 44(1), 34-87.
- Pessayre, D., Fromenty, B., & Mansouri, A. (2004). Mitochondrial injury in steatohepatitis. In *Eur J Gastroenterol Hepatol* (Vol. 16, pp. 1095-1105). England.
- Pessayre, D., Mansouri, A., Berson, A., & Fromenty, B. (2010). Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol*(196), 311-365.
- Pessayre, D., Mansouri, A., Haouzi, D., & Fromenty, B. (1999). Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biol Toxicol*, 15(6), 367-373.
- Petrescu, I., & Tarba, C. (1997). Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. In *Biochim Biophys Acta* (Vol. 1318, pp. 385-394). Netherlands.
- Picard M, Csukly K, Robillard ME, Godin R, Ascah A, Bourcier-Lucas C, et al. Resistance to Ca^{2+} induced opening of the permeability transition pore

- differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295:R659-68.
- 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. In *Int J Biochem Cell Biol* (Vol. 30, pp. 961-965). England.
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. In *Physiol Rev* (Vol. 88, pp. 1243-1276). United States.
- Presta, P., Lucisano, G., Fuiano, L., & Fuiano, G. (2012). The kidney and the elderly: why does the risk increase? *Int Urol Nephrol*, 44(2), 625-632.
- Radak, Z., Chung, H. Y., & Goto, S. (2008). Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. In *Free Radic Biol Med* (Vol. 44, pp. 153-159). United States.
- Rector, R. S., & Thyfault, J. P. (2011). Does physical inactivity cause nonalcoholic fatty liver disease? In *J Appl Physiol* (Vol. 111, pp. 1828-1835). United States.
- 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. In *J Physiol* (Vol. 586, pp. 4241-4249). England.
- Rector, R. S., Thyfault, J. P., Morris, R. T., Laye, M. J., Borengasser, S. J., Booth, F. W., & Ibdah, J. A. (2008). Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. In *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (Vol. 294, pp. G619-626). United States.
- Richter, C. (1997). Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial **Ca²⁺** homeostasis and respiration. *Biosci Rep*, 17(1), 53.-

- Rossi, P., Marzani, B., Giardina, S., Negro, M., & Marzatico, F. (2008). Human skeletal muscle aging and the oxidative system: cellular events. *Curr Aging Sci*, 1(3), 182-191.
- Rusmann, S., Kullak-Ublick, G. A., & Grattagliano, I. (2009). Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Curr Med Chem*, 16(23), 3041-3053.
- Samartsev, V. N., & Kozhina, O. V. (2008). Oxidative stress as regulatory factor for fatty-acid-induced uncoupling involving liver mitochondrial ADP/ATP and aspartate/glutamate antiporters of old rats. In *Biochemistry (Mosc)* (Vol. 73, pp. 783-790). United States.
- 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.
- Sarich, T. C., Zhou, T., Adams, S. P., Bain, A. I., Wall, R. A., & Wright, J. M. (1995). A model of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits. In *J Pharmacol Toxicol Methods* (Vol. 34, pp. 109-116). United States.
- Sastre, J., Pallardo, F. V., & Vina, J. (2003). The role of mitochondrial oxidative stress in aging. In *Free Radic Biol Med* (Vol. 35, pp. 1-8). United States.
- 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. In *Lab Invest* (Vol. 91, pp. 190-202). United States.
- Scheffler, I. E. (2001). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion*, 1, 3-31.
- Schmucker, D. L. (2001). Liver function and phase I drug metabolism in the elderly: a paradox. In *Drugs Aging* (Vol. 18, pp. 837-851). New Zealand.
- Schmucker, D. L., & Sanchez, H. (2011). Liver regeneration and aging: a current perspective. *Curr Gerontol Geriatr Res*, 2011, 526379.
- 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.
- Shankar, S. K. (2010). Biology of aging brain. In *Indian J Pathol Microbiol* (Vol. 53, pp. 595-604). India.
- Siu, W. P., Pun, P. B., Latchoumycandane, C., & Boelsterli, U. A. (2008). Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), distinct from the mitochondrial permeability transition, is a key mechanism in diclofenac-induced hepatocyte injury: Multiple protective roles of cyclosporin A. In *Toxicol Appl Pharmacol* (Vol. 227, pp. 451-461). United States.
- Skulachev, V. P. (2000). Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong". *IUBMB Life*, 49(5), 365-373.
- 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. In *Biochim Biophys Acta* (Vol. 1787, pp. 437-461). Netherlands.
- Souza, M. E., Polizello, A. C., Uyemura, S. A., Castro-Silva, O., & Curti, C. (1994). Effect of fluoxetine on rat liver mitochondria. In *Biochem Pharmacol* (Vol. 48, pp. 535-541). England.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D. K., Bachoo, R., & Spiegelman, B. M. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. In *Cell* (Vol. 127, pp. 397-408). United States.
- Swerdlow, R. H. (2011). Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. In *Biochim Biophys Acta* (Vol. 1812, pp. 1630-1639). Netherlands.

- Syed, F. A., & Ng, A. C. (2010). The pathophysiology of the aging skeleton. *Curr Osteoporos Rep*, 8(4), 235-240.
- Szabadkai, G., & Duchen, M. R. (2008). Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling. In *Physiology (Bethesda)* (Vol. 23, pp. 84-94). United States.
- Toman, J., & Fiskum, G. (2011). Influence of aging on membrane permeability transition in brain mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 43(1), 3-10.
- Triantafyllou, K., Vlachogiannakos, J., & Ladas, S. D. (2010). Gastrointestinal and liver side effects of drugs in elderly patients. In *Best Pract Res Clin Gastroenterol* (Vol. 24, pp. 203-215). Netherlands.
- 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. In *Toxicol Appl Pharmacol* (Vol.147, pp. 431-441). United States.
- Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2002). The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. In *Biochimie* (Vol. 84, pp. 187-193). France.
- Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2007). Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*, 12(5), 835-840.
- Turnheim, K. (2004). Drug therapy in the elderly. In *Exp Gerontol* (Vol. 39, pp. 1731-1738). England.
- Uranga, R. M., Bruce-Keller, A. J., Morrison, C. D., Fernandez-Kim, S. O., Ebenezer, P. J., Zhang, L., Dasuri, K., & Keller, J. N. (2010). Intersection between metabolic dysfunction, high fat diet consumption, and brain aging. In *J Neurochem* (Vol. 114, pp. 344-361). England.
- Vickers, A. E. (2009). Characterization of hepatic mitochondrial injury induced by fatty acid oxidation inhibitors. In *Toxicol Pathol* (Vol. 37, pp. 78-88). United States.
- Vijg, J., & Campisi, J. (2008). Puzzles, promises and a cure for ageing. In *Nature* (Vol. 454, pp. 1065-1071). England.
- Wallace, D. C. (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging.

- Environ Mol Mutagen, 51(5), 440-450.
- Warren, A., Cogger, V. C., Fraser, R., Deleve, L. D., McCuskey, R. S., & Le Couteur, D. G. (2011). The effects of old age on hepatic stellate cells. *Curr Gerontol Geriatr Res*, 2011, 439835.
- Wei, Y. H., Wu, S. B., Ma, Y. S., & Lee, H. C. (2009). Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J*, 32(2), 113-132.
- Weinstein, J. R., & Anderson, S. (2010). The aging kidney: physiological changes. In *Adv Chronic Kidney Dis* (Vol. 17, pp. 302-307). United States.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., & Reed, J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*, 115(10), 2656-2664.
- Xu, J. J., Henstock, P. V., Dunn, M. C., Smith, A. R., Chabot, J. R., & de Graaf, D. (2008). Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury. In *Toxicol Sci* (Vol. 105, pp. 97-105). United States.
- Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*, 19, 124-128.
- Zoratti, M., & Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. In *Biochim Biophys Acta* (Vol. 1241, pp. 139-176). Netherlands.
- Zoratti, M., Szabò, I., & De Marchi, U. (2005). Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *BBA - Bioenergetics*, 1706(1/2), 40-52.